(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 729 579**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2002** **E 14182639 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 2842569**

(54) Título: **Vacuna monodosis con Mycoplasma hyopneumoniae**

(30) Prioridad:

02.07.2001 US 302636 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

KEICH, ROBIN LEE y
SABBADINI, LISA GRACE

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 729 579 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 monodosis con *Mycoplasma hyopneumoniae*

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o de un trastorno en ganado porcino causado por una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo)* mediante la administración al ganado porcino de los tres (3) días a los diez días de edad de una única dosis de una cantidad eficaz de la vacuna de *M. hyo*. La vacuna de *M. hyo* es una preparación de células total o parcialmente inactivadas. La vacuna de *M. hyo* que se administra de acuerdo con la presente invención puede producirse de manera sintética o recombinante.

Antecedentes de la invención

M. hyo es un patógeno bacteriano que provoca una neumonía enzoótica en el ganado porcino. La neumonía enzoótica es una enfermedad crónica que da como resultado una mala conversión de la comida, un crecimiento deficiente y una predisposición a infecciones pulmonares secundarias. *M. hyo* es transmitido fácilmente a través de las secreciones del tracto respiratorio y mediante una transmisión de la cerda al lechón, y es muy prevalente en las granjas de cerdos. Aproximadamente el 99 % del ganado porcino de los Estados Unidos está infectado, lo que cuesta a la industria porcina aproximadamente 300 millones de dólares anualmente.

La mayoría de las vacunas conocidas contra *M. hyo* se han basado en preparaciones de células completas de *M. hyo* inactivadas con un coadyuvante. Además, las vacunas basadas en polipéptidos o en proteínas inmunógenos pueden ser sintetizadas o preparadas mediante la clonación y la expresión recombinante de los genes de *M. hyo*. Los genes de *M. hyo* capaces de expresar dichos polipéptidos o proteínas *in vivo* también pueden usarse como vacunas.

Algunos ejemplos de vacunas de células completas inactivadas de M. hyo incluyen RESPISURE® y STELLAMUNE®, disponibles comercialmente en Pfizer Inc., Estados Unidos

Además, se han descrito varios polipéptidos o proteínas inmunógenos de *M. hyo* producidos recombinantemente que pueden ser útiles como vacunas de subunidad. La Publicación de Patente Internacional WO 96/28472 describe seis especies de antígenos proteicos de *M. hyo* con unos pesos moleculares de 46 - 48, de 52 - 54, de 60 - 64, de 72 - 75, de 90 - 94 y de 110 - 114 kilodaltons, y desvela secuencias parciales de proteínas de los antígenos de 52 - 54, de 60 - 64 y de 72 - 75 kilodalton y las secuencias completas de nucleótidos y de aminoácidos del antígeno de 46 - 48 kilodalton.

La clonación del gen que codifica para la proteína P46 de *M. hyo*, es decir, p46, también fue descrita por Futo y col. (1995; J. Bacteriol 177: 1915 - 1917). El mismo grupo demostró que el producto génico expresado *in vitro* era útil en el diagnóstico de las respuestas de los anticuerpos frente a las infecciones por *M. hyo* sin ninguna reactividad cruzada con otras especies de *Mycoplasma* (Futo y col*.,* 1995, J. Clin. Microbiol. 33: 680 - 683). Las secuencias y los usos diagnósticos del gen *p46* descritos por Futo y col. se divulgan adicionalmente en la Publicación de Patente Europea Nº 0 475 185 Al

Wise y Kim (1987, J. Bacteriol., 169: 5546 - 5555) informan de que existen cuatro especies de proteínas de membrana integrales en *M. hyo,* denominadas p70, p65 (P65, *supra),* p50 y p44, y que las tres últimas están modificadas mediante la unión covalente de lípidos e inducen una fuerte respuesta inmunitaria humoral. Los efectos protectores de la respuesta inmunitaria no fueron investigados. Se ha clonado el gen que codifica para la proteína P65, y sus secuencias y usos en vacunas y en diagnóstico se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 5.788.962.

La Publicación de Patente Internacional WO 91/15593 describe cinco proteínas de *M. hyo* con unos pesos moleculares aparentes de 105, de 90, de 85, de 70 y de 43 kilodaltons. Se proporciona una secuencia completa del gen que codifica para la proteína de 85 kilodalton (proteína C), así como las secuencias parciales de los nucleótidos que codifican para las otras cuatro proteínas.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.252.328 a favor de Faulds desvela las secuencias amino terminales de las proteínas inmunorreactivas de *M. hyo*, cuyos pesos moleculares son de 36, de 41, de 44, de 48, de 64, de 68, de 74,5, de 79, de 88,5, de 96 y de 121 kilodaltons. Se divulgaron otras proteínas identificadas según sus movilidades electroforéticas, pero para las que no se divulgaron las secuencias proteicas, que tienen unos pesos moleculares aparentes de 22,5, de 34 y de 52 kilodaltons. Mientras que la Patente de Estados Unidos Nº 5.252.328 propuso el uso de estas proteínas en formulaciones de vacuna, no se notificaron los resultados los ensayos con la vacuna.

La Publicación de Patente Internacional WO 95/09870 desvela métodos bioquímicos para la purificación de las adhesinas de *M. hyo*, las proteínas de membrana integrales del mycoplasma responsables de la adhesión a los cilios del epitelio del tracto respiratorio superior del hospedador. El documento WO 95/09870 también propone ensayos y usos para estas proteínas, por ejemplo, en vacunas y como diagnóstico.

Un artículo de investigación de King y col. (1997; Vacuna 15: 25 - 35) divulgó la Mhp1, una adhesina de 124 kilodalton que es una variante de estirpe de la P97.

Una variante de la P97 de 94 kilodalton fue identificada por Wilton y col. (1998, Microbiology 144: 1931 - 1943). Adicionalmente, se demostró que el gen *p97* era parte de un operón que también codifica para una segunda proteína, denominada P102, con un peso molecular predicho de aproximadamente 102 kilodaltons (Hsu y col., 1998, Gene 214: 13 - 23). Minion y Hsu sugieren el uso de la P102 en vacunas en la publicación de patente internacional WO 99/26664 pero no notifican los ensayos con la vacuna.

El documento WO 94/07531 desvela la administración de única dosis de una vacuna de la bacterina de Mycobacterium hyopneumoniae en lechones de una semana de edad. Sin embargo, ninguna de las vacunas conocidas de *M. hyo* ha sido descrita como eficaz en la prevención o la reducción de lesiones pulmonares mediante la administración de una única dosis en ganado porcino a los 3 a diez días de edad en las que dicha dosis única elimina la necesidad de administración de dosis adicionales para generar inmunidad contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Dicha vacuna eliminaría la necesidad de múltiples dosis, y por lo tanto reduciría significativamente los costes y el trabajo relacionados con la vacunación masiva mundial de los rebaños de cerdos. Por lo tanto, existe una necesidad de una vacuna eficaz de *M. hyo* que pueda ser administrada a los cerdos en una vacunación de dosis única a de 3 a 10 días de edad para la protección y la prevención frente a las enfermedades o los trastornos causados por *M. hyo*.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un uso de una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o de un trastorno en ganado porcino causado por una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* para su administración al ganado porcino a de 3 a 10 días de edad de una cantidad eficaz de una única dosis de la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en la que dicha dosis única es eficaz previniendo o reduciendo lesiones pulmonares y dicha dosis única elimina la necesidad de administración de dosis adicionales para generar inmunidad contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La vacuna fabricada de acuerdo con la presente invención elimina la necesidad de dosis adicionales con objeto de generar y/o de mantener una inmunidad frente a *M. hyo.* La vacunación de (una) dosis única proporciona protección a cerdos tanto seronegativos como seropositivos frente a una exposición a *M. hyo* virulenta. La vacuna de la presente invención es eficaz en el tratamiento o en la prevención de los síntomas causados por una infección por *M. hyo,* que incluyen, por ejemplo, la prevención y la reducción de las lesiones de pulmón en cerdos.

La vacuna fabricada de acuerdo con la presente invención engloba la administración a cerdos de una cantidad eficaz de una única dosis de una vacuna de *M. hyo*, en la que la vacuna de *M. hyo* comprende una preparación de células totales o parciales (bacterina).

La vacuna de *M. hyo* administrada de acuerdo con la presente invención puede incluir componentes adicionales, tales como un adyuvante. Varios de los adyuvantes que pueden usarse incluyen aquellos descritos en el presente documento y aquellos conocidos en la materia.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso de una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o de un trastorno en ganado porcino causado por una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* para su administración al ganado porcino a de 3 a 10 días de edad de una cantidad eficaz de una única dosis de la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en la que dicha dosis única es eficaz previniendo o reduciendo lesiones pulmonares y dicha dosis única elimina la necesidad de administración de dosis adicionales para generar inmunidad contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La vacunación de dosis única de la presente invención elimina la necesidad de la administración de dosis adicionales al cerdo con objeto de generar y/o de mantener una inmunidad frente a *M. hyo.*

Para clarificar la divulgación, y no como limitación, la descripción detallada de la invención está dividida en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, formas de realización o aplicaciones de la invención.

Las vacunas fabricadas de acuerdo con la presente invención comprenden una vacuna de preparación de células parciales o totales inactivadas de *M. hyo* (bacterina) y un portador farmacéuticamente aceptable, o una vacuna de preparación de células parciales o totales inactivadas de *M. hyo* (bacterina) y un adyuvante.

Definiciones y abreviaturas

® significa marca registrada.

El término “tratar o prevenir” con respecto a una infección por *M. hyopneumoniae* según se usa en el presente documento significa inhibir la replicación de la bacteria *M. hyopneumoniae*, inhibir la transmisión de *M.*

hyopneumoniae o prevenir que *M. hyopneumoniae* se establezca en su hospedador, y aliviar los síntomas de la enfermedad o el trastorno causado por la infección por *M. hyopneumoniae*. El tratamiento se considera terapéutico si existe una reducción en la carga bacteriana, una disminución en las infecciones pulmonares y/o un aumento en la ingesta de alimentos y/o en el crecimiento. La vacuna de *M. hyo* fabricada de acuerdo con la presente invención es, por ejemplo, eficaz en la prevención o en la reducción de las lesiones de pulmón.

El término "vacuna de *M. hyo*", según se usa en el presente documento, se refiere a una vacuna útil en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno causado por una infección por *M. hyo.* La vacuna de *M. hyo* es eficaz en el tratamiento o en la prevención de una infección en cerdos por *M. hyo.* La vacuna de *M. hyo* de la presente invención es una preparación de células totales o parciales de *M. hyo*, una vacuna de bacterina inactivada.

El término "cerdo", según se usa en el presente documento, se refiere a lechones, cerdos, ganado porcino, cerdas, cerdas jóvenes, cerdos castrados, verracos y miembros de la familia *Suidae*.

El término "bacterina", según se usa en el presente documento, se refiere a una preparación de células completas o parciales inactivadas de *M. hyo* adecuadas para su uso como una vacuna.

El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de vacuna de *M. hyo* suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria en el sujeto en el que es administrada. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, la inducción de una inmunidad innata, celular y/o humoral.

Vacunas de células (totales o parciales) inactivadas

Los métodos para la preparación de vacunas convencionales de células parciales o totales para su uso en la fabricación de vacunas de acuerdo con la presente invención son conocidos en la materia.

Las bacterinas de *M. hyo* que pueden emplearse en la presente vacunación de dosis única pueden ser obtenidas a partir de varias fuentes disponibles públicamente. Por ejemplo, las bacterinas de *M. hyo* pueden ser preparadas a partir de cepas clínicas de *M. hyo.* Los expertos en la materia conocen numerosas cepas clínicas de *M. hyo* y están disponibles, por ejemplo, en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Estas incluyen, por ejemplo: los nºs de la ATTC 25095, 25617, 25934, 27714 y 27715.

Las cepas clínicas de *M. hyo* también pueden obtenerse directamente a partir de lesiones pulmonares porcinas infectadas de forma natural o experimental mediante el uso de técnicas conocidas.

Las cepas clínicas de *M. hyo* pueden ser inactivadas mediante el uso de una diversidad de métodos conocidos, por ejemplo, el tratamiento de la cepa clínica bacteriana con etilenoimina binaria (BEI) según se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.565.205, o la inactivación, por ejemplo, con formalina, calor, BPL, irradiación o glutaraldehído.

Las bacterinas *de M. hyo* adecuadas para su uso en la vacuna fabricada de acuerdo con la presente invención también pueden obtenerse a través de diversas fuentes comerciales. Dichas fuentes incluyen, pero no se limitan a: RESPIFEND® (Fort Dodge, American Home Products), HYORESP® (Merial Ltd), M + PAC® (Schering Plough), PROSYSTEM M® (Intervet), INGLEVAC M® (Boehringer), RESPISURE (Pfizer Inc.) y STELLAMUNE MYCOPLASMA (Pfizer Inc.).

Una fuente preferida de la bacterina de *M. hyo* para su uso en la presente invención es RESPISURE y STELLAMUNE MYCOPLASMA.

Una fuente particularmente preferida de la bacterina de *M. hyo* para su uso en la presente invención es RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.), que contiene la cepa P-5722-3 (NL1042), adquirida en Purdue University, Estados Unidos.

Preferiblemente, la cepa P-5722-3 es inactivada con BEI y coadyuvada con un adyuvante disponible comercialmente, preferiblemente, AMPHIGEN® (Hydronics, Estados Unidos). Una dosis preferida es de aproximadamente 2,0 ml. Algunos conservantes usados convencionalmente incluyen mertiolato / EDTA. Puede añadirse un portador, preferiblemente PBS. La preparación de vacunas de células vivas modificadas, tales como mediante la atenuación de cepas virulentas mediante el paso en cultivos, es conocida en la materia.

Formulaciones de vacuna

Algunas preparaciones adecuadas de la vacuna fabricada de acuerdo con la presente invención incluyen inyectables, tanto soluciones como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en un líquido antes de su inyección. La preparación también puede estar emulsionada. Los principios activos inmunógenos a menudo se mezclan con adyuvantes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo.

Los polipéptidos pueden ser formulados en la vacuna en su forma neutra o salina. Algunas sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres del péptido) y las que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos tales

como acético, oxálico, tartárico, maleico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férricos, con bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares.

Las formulaciones de vacuna fabricadas de acuerdo con la presente invención comprenden una cantidad inmunizante eficaz de una bacterina de *M. hyo* y un portador farmacéuticamente aceptable. Las preparaciones de vacuna comprenden una cantidad inmunizante eficaz de uno o más antígenos adicionales y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico estéril, y combinaciones de los mismos. Un ejemplo de dicho portador aceptable es un medio de cultivo fisiológicamente equilibrado que contiene uno o más agentes estabilizantes tales como proteínas estabilizadas hidrolizadas, lactosa, etc. El portador es preferiblemente estéril. La formulación debe ser adecuada para el modo de administración.

El uso de antígenos purificados puede llevarse a cabo mediante los métodos habituales. Por ejemplo, la(s) proteína(s) purificada(s) debería(n) ajustarse a una concentración apropiada, formularse con cualquier adyuvante de vacuna adecuado y envasarse para su uso. Algunos adyuvantes adecuados pueden incluir, pero no se limitan a: geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio; sustancias tensioactivas tales como lisolecitina; glucósidos, por ejemplo, saponina y derivados de saponina tales como Quill A® o GPI-0100; tensioactivos catiónicos, por ejemplo, DDA (halogenuros de hidrocarburos de amonio cuaternario, polioles plurónicos; polianiones e iones poliatómicos; ácidos poliacrílicos, polímeros en bloque no iónicos, por ejemplo, Pluronic® F-127 (B.A.S.F., Estados Unidos); Avridina y Rantidina; péptidos; toxinas lábiles mutantes recombinantes, por ejemplo, leucotoxina (rmlT) o toxina colérica (CT); transportadores moleculares unidos químicamente o en una proximidad cercana; aceites minerales, por ejemplo, Montanide® ISA-50 (Seppic, París, Francia), carbopol®, Amphigen (Hydronics, Estados Unidos), Omaha, NE, Estados Unidos, Alhidrogel®, (Superfos Biosector, Frederikssund, Dinamarca) y emulsiones oleosas, por ejemplo, una emulsión de un aceite mineral tal como de Bayol®F / Ariacel® A y agua, o una emulsión de un aceite vegetal, agua y un emulsionante tal como lecitina; alum, MDP, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D- isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi(-etilamina; citocinas de colesterol y combinaciones de adyuvantes. Los iones poliatómicos también pueden actuar como agentes dispersantes, espesantes y antiagregantes que permiten resuspender la vacuna en forma de una suspensión monodispersada después de un periodo de asentamiento prolongado. Las combinaciones de adyuvantes pueden presentarse en una forma acuosa, encapsulada (de liberación controlada o retardada) o microencapsulada.

El inmunógeno también puede incorporarse en liposomas, o conjugarse con polisacáridos y/o con otros polímeros en los casos en los que el antígeno recombinante es un hapteno, es decir, una molécula que es antigénica porque puede reaccionar selectivamente con anticuerpos relacionados, pero no es inmunógena porque no puede desencadenar una respuesta inmunitaria, el hapteno puede estar unido covalentemente a una molécula portadora o inmunógena; por ejemplo, una proteína grande tal como la albúmina sérica conferirá inmunogenicidad al hapteno que este acoplado a ella. El portador del hapteno puede formularse para su uso como una vacuna.

Vacunas génicas y de ácidos nucleicos

También se desvelan en el presente documento genes o ácidos nucleicos de *M. hyo* que codifican para las proteínas inmunógenas, los polipéptidos y los fragmentos inmunógenos de dichas proteínas y polipéptidos. Dichos genes y ácidos nucleicos pueden ser expresados *in vivo* y pueden ser preparados mediante el uso de técnicas conocidas en la materia. Una vacuna alternativa comprende al menos un gen o un ácido nucleico que codifica para una proteína de *M. hyo* tal como, pero no se limita a, P46, P65, P97, P102, P70, P50 y P44.

Los genes o los ácidos nucleicos que codifican para los fragmentos inmunógenos de las proteínas o de los polipéptidos de *M. hyo* tienen una secuencia que comprende al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos contiguos de las proteínas y de los polipéptidos inmunógenos, que incluyen, pero no se limitan a, P46, P65, P97, P102, P70, P50 y P44.

El gen o los ácidos nucleicos usados son administrados mediante métodos conocidos, tales como, por ejemplo, mediante el uso de un cañón de genes.

Alternativamente, el gen o los ácidos nucleicos usados son vacunas de ADN. Además, el ácido nucleico o los genes pueden estar presentes en asociación con liposomas o con otros agentes que faciliten la transfección, según se sabe en la materia.

Los métodos para la preparación y la administración de vacunas de ADN son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Krishnan, B. R., “Current Status of DNA vaccines in veterinary medicine”, Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier Science (2000).

Sistemas de expresión

Puede utilizarse una variedad de sistemas vectoriales de expresión en el hospedador para expresar secuencias de las proteínas antigénicas. Dichos sistemas de expresión en el hospedador representan vehículos mediante los cuales pueden producirse las secuencias de interés y posteriormente purificarse, pero también representan las células que pueden mostrar, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, los productos génicos de *M. hyo in situ.* Estas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli, B. subtilis)* transformadas con vectores de expresión recombinantes de ADN de bacteriófago, de ADN de plásmido o de ADN de cósmido que contienen las secuencias codificantes de *mhp3*; con levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen las secuencias codificantes del producto génico de *M. hyo*; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificantes de *M. hyo*; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de un plásmido recombinante (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen las secuencias codificantes de *M. hyo*; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) portadores de constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de las células de mamífero (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus de vaccinia de 7,5 K). En una forma de realización preferida, el sistema de expresión es un sistema bacteriano.

Los polipéptidos y las proteínas, y los fragmentos inmunógenos de los mismos de *M. hyopneumoniae* también pueden ser expresados y administrados mediante el uso de vectores vivos recombinantes víricos y bacterianos tales como adenovirus o S*almonella.* Los vectores reales también son conocidos y están fácilmente disponibles en la materia, o pueden ser construidos por el experto en la materia mediante el uso de una metodología bien conocida.

Dosificación y modos de administración

De acuerdo con la presente invención, una única dosis de una cantidad eficaz de una vacuna de *M. hyo* administrada a ganado porcino de 3 a 10 días de edad proporciona una inmunidad eficaz frente a una posterior exposición a *M. hyo.* Preferentemente, la vacuna de *M. hyo* se administra de aproximadamente seis a aproximadamente ocho días de edad. Lo más preferentemente, la vacuna de *M. hyo* se administra a aproximadamente siete días de edad.

La cantidad eficaz de una vacuna de una bacterina de *M. hyo* en la administración de una dosis contiene aproximadamente entre 1 x 10^6 y 5 x 10^{10} unidades de cambio de color (CCU) por dosis. Preferiblemente, una vacuna de una bacterina de *M. hyo* que proporciona una inmunidad eficaz en una única dosis contiene aproximadamente entre 1 x 10^8 y 5 x 10^{10} CCU/dosis y más preferiblemente, aproximadamente entre 5 x 10^8 y 5 x 10^{10} CCU/dosis.

De acuerdo con la presente invención, cuando se administra el producto preferido de bacterina RESPISURE - 1, la cantidad de RESPISURE - 1 para la administración de una dosis es de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3,0 ml, preferiblemente de entre aproximadamente 1,5 ml y aproximadamente 2,5 ml, y más preferiblemente de aproximadamente 2 ml.

La cantidad de una vacuna de *M. hyo* que es una vacuna de subunidad que comprende una o más proteínas o polipéptidos o fragmentos inmunógenos de dichas proteínas o polipéptidos eficaces en la presente invención es de entre aproximadamente 0,01 µg y aproximadamente 200 µg.

La cantidad de una vacuna de *M. hyo* que es una vacuna que comprende uno o más genes o ácidos nucleicos de *M. Hyo* (preferiblemente ADN) que codifican para las proteínas o los polipéptidos inmunógenos o los fragmentos inmunógenos de dichas proteínas o polipéptidos, eficaz en la presente invención es de entre aproximadamente 0,1 µg y aproximadamente 200 mg.

De acuerdo con la presente invención, la administración puede llevarse a cabo mediante las vías conocidas, incluyendo la vía oral, intranasal, tópica en la mucosa, transdérmica y parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular). La administración también puede llevarse a cabo mediante el uso de dispositivos de administración sin agujas. La administración también puede llevarse a cabo mediante el uso de una combinación de vías, por ejemplo, una primera administración mediante el uso de una vía parental y una administración posterior mediante el uso de una vía a través de la mucosa. Una vía de administración preferida es la administración intramuscular.

Las dosis eficaces (las cantidades inmunizantes) de las vacunas de la invención también pueden extrapolarse de las curvas de respuesta a las dosis, procedentes de sistemas de ensayo modelo.

Las vacunas fabricadas de acuerdo con la presente invención proporcionan una inmunidad protectora, tanto en lechones seropositivos como en lechones seronegativos para *M. hyo.* Los lechones seropositivos se refieren a aquellos lechones que tienen en el suero anticuerpos contra *M. hyo.* Los lechones seronegativos se refieren a aquellos lechones que no tienen en el suero niveles detectables de anticuerpos contra *M. hyo.*

La presente invención esta adicionalmente ilustrada, pero no limitada, por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de una bacterina de *M. hyo*

Se usa etilenoimina binaria (BEI) para la inactivación de la cepa de *M. hyo* NL1042.

Al final del periodo de crecimiento, el pH del cultivo se elevó hasta 7,8 ± 0,2, y el pH se mantuvo en este intervalo durante al menos una hora. En ese momento se añadió una solución acuosa filtrada estéril de bromhidruro de 2-brometilamina (BEA) a una concentración final de aproximadamente 4,0 mM. En presencia de un elevado pH, el BEA cambia químicamente a BEI. El cultivo se incubó a 37 + 2 ºC con agitación constante durante al menos 24 horas.

Después de la incubación de 24 horas, se añadió una solución acuosa filtrada estéril de tiosulfato de sodio a una concentración final de aproximadamente 4 mM para neutralizar el exceso de BEI. El cultivo se incubó a 37 + 2 ºC con agitación constante durante 24 horas adicionales.

Después de la inactivación, pero antes de la neutralización con tiosulfato de sodio, se tomó una muestra representativa y se ensayó para comprobar que se había completado la inactivación. Se inoculó medio reciente que contenía un 0,0026 % de rojo fenol con un inóculo del 5 - 20 % y se incubó a 37 + 2 ºC durante al menos una semana antes del análisis del cambio de color, lo que es indicativo de que no se ha conseguido la inactivación. Se ensayó la esterilidad de las muestras en bruto en caldo de tioglucolato a 37 + 2 ºC, y en caldo de tripticasa de soja a la temperatura ambiente. El cultivo inactivado puede transferirse a recipientes de almacenamiento estériles y almacenarse de 2 a 8 ºC hasta su ensamblaje.

La potencia se determinó mediante un ensayo serológico *in vitro* para cuantificar el antígeno en el recipiente final. La potencia de las vacunas usadas en el estudio de eficacia determina la potencia mínima que debe estar presente en la vacuna en la fecha de caducidad.

Se ensayaron muestras a granel o del recipiente final del producto completado de cada serie o de la primera subserie para la comprobación de *M. hyo* como sigue.

La bacterina se almacenó a -50C en viales de 100 ml. Los viales se descongelaron y se almacenaron subalícuotas de 15 ml a 5 +/- 2C hasta su uso.

Para ensayar la potencia de la serie ensamblada se comparó una muestra de la serie con una referencia y se determinaron las unidades de RP para la serie. Una serie o una subserie deberían contener preferiblemente al menos 6,33 RP al inicio de la datación, y al menos 5,06 RP a lo largo de la datación.

RP se refiere a la potencia relativa. Las RP pueden ser determinadas mediante una cuantificación relativa del antígeno en comparación con una vacuna de referencia. En este caso la referencia tiene por definición una RP = 1,0, El producto de dosis única de la presente invención tiene preferiblemente una RP de 6,33, lo que es 6,33 veces la referencia.

Se añade mertiolato como conservante a una concentración final no superior al 0,01 % (p/v).

Se añade una solución de ácido etilendiaminotetraacético al 10 % (EDTA, sal disódica o tetrasódica) como conservante a una concentración final de aproximadamente el 0,07 % (p/v).

Ejemplo 2

Animales

Para la vacunación se seleccionaron cerdos de aproximadamente una semana de edad. Se evaluó el estado serológico con respecto a *M. hyo* mediante un ensayo de ELISA. Los cerdos con un valor de ELISA < 0,50 se consideraron negativos para *M. hyo*. Los cerdos con un valor de ELISA mayor de 0,50 se consideraron serológicamente positivos para *M. hyo.*

Vacunas

Se usó la bacterina de *M. hyo* de RESPISURE -1 (Pfizer Inc.) para vacunar a los cerdos. Se determinó la potencia de la vacuna antes de su uso mediante una cuantificación relativa del antígeno en comparación con una bacterina de referencia de *M. hyo*. La vacuna de referencia (RF = 1,0) contenía aproximadamente 8.000 unidades del antígeno (aproximadamente entre 1 y 2 x 10^8 CCU de células viables recogidas antes de la inactivación) por dosis, determinadas mediante un inmunoensayo en fase sólida que medía la cantidad de antígeno de *M. hyo* en la vacuna.

Como placebo se usó el mismo coadyuvante líquido (AMPHIGEN) usado en la formulación de RESPISURE -1 (es decir, sin células bacterianas).

Inóculo de exposición

El inóculo de exposición fue proporcionado en forma de alícuotas de 10 ml de homogeneizado de pulmón congelado a -70 ºC, y fue identificado como un derivado de la cepa de *M. hyo* 11 (L1 36). El inóculo se descongeló y después se diluyó con un caldo Friis Mycoplasma para conseguir una dilución de 1:25, y se mantuvo en hielo hasta su administración. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml (2,5 ml por fosa nasal) de la suspensión 1:25 los días especificados en cada uno de los siguientes ejemplos. El día de la exposición se cultivó una alícuota del inóculo de pulmón para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Se retrovaloró una segunda alícuota cada uno de los 3 días, los resultados indicaron que el inóculo contenía aproximadamente 10^6 - 10^7 unidades de cambio de color (CCU)/ml de *M. hyo.*

Procedimiento experimental

Los cerdos fueron identificados con etiquetas auriculares mientras todavía estaban en la piara [Día (-1)]. Los cerdos fueron asignados a corrales y a grupos de tratamiento de acuerdo con un diseño en bloque aleatorio generalizado. Los cerdos se bloquearon basándose en el corral de camada y posterior al destete.

En el Día 0 los cerdos fueron vacunados bien con una dosis intramuscular de 2 ml de la bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.) o bien con una dosis intramuscular de 2 ml de placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml de la suspensión 1:25 del inóculo de exposición en los días especificados en cada uno de los siguientes ejemplos. Diariamente se monitorizaron todos los cerdos y se comprobaron los signos de enfermedad clínica.

En un momento específico después del primer día de exposición, todos los cerdos fueron sacrificados y se les realizó una necropsia. Se extrajeron los pulmones y se evaluaron. El análisis post-mortem incluía una estimación del grado de patología asociada con la enfermedad respiratoria por mycoplasma. Se analizó cada lóbulo pulmonar y las lesiones se delimitaron para estimar el porcentaje de implicación de cada lóbulo. Se registró el grado de las lesiones macroscópicas presentes.

Análisis de los datos

La eficacia se evaluó basándonos en el porcentaje de lesiones pulmonares típicas de una infección por *M. hyo*. Se determinó que los cerdos de un grupo de tratamiento (vacunados) tenían un porcentaje total de pulmones con lesiones que era significativamente ($P < 0,05$) menor que en los cerdos del grupo con placebo.

Porcentaje total de pulmón con lesiones

Se ponderó el porcentaje de implicación macroscópica de cada lóbulo mediante el uso de las siguientes proporciones entre los lóbulos pulmonares individuales y la masa pulmonar total: craneal izquierdo 10 %, intermedio izquierdo 10 %, caudal 25 izquierdo%, craneal derecho; 10 %, intermedio derecho 10 %, caudal derecho 25 % y accesorio 10 %. Después se sumaron los valores de los lóbulos pulmonares ponderados para todos los lóbulos, para producir el porcentaje total de pulmón con lesiones (Pointon y col„ 1992).

Ejemplo 3

La protección frente a la exposición a *M. hyo* virulento se evaluó en cerdos serológicamente positivos para *M. hyo* mediante el uso de una única dosis de la bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 (Pfizer Inc), administrada a cerdos de entre 3 y 8 días de edad.

Se llevaron a cabo cinco réplicas de ensayos de potencia para RESPISURE - 1 en el momento de la vacunación o próximo. Se determinó la potencia relativa (RP) mediante una cuantificación del antígeno relativo en comparación con una vacuna de referencia. La vacuna de referencia, que tiene una RP = 1,0, contenía aproximadamente 8.000 unidades del antígeno de *M. hyo*. Las RP de estos cinco ensayos eran de 5,42, de 3,96, de 4,71, de 5,49 y de 4,36, respectivamente.

En el Día 0, los cerdos del Grupo de Tratamiento T02 (véase la Tabla 1, a continuación) fueron vacunados con una dosis intramuscular de 2 ml de la bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.). Los cerdos del Grupo T01 fueron vacunados intramuscularmente con 2 ml de un placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml de la suspensión 1:25 del inóculo de exposición los Días 178, 179 y 180. En cada uno de los 3 días se cultivó una alícuota del material de exposición en el momento de la inoculación para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Se retrovaloró una segunda alícuota para confirmar que la solución madre de exposición contenía aproximadamente 10^7 CCU/ml de M. *hyo.* Diariamente se monitorizaron todos los cerdos y se comprobaron los signos de enfermedad clínica.

Después de treinta días de la primera exposición, todos los cerdos fueron sacrificados y se les realizó una necropsia. Se extrajeron los pulmones y se evaluaron. El análisis post-mortem incluía una estimación del grado de patología asociada con la enfermedad respiratoria por mycoplasma. Se analizó cada lóbulo pulmonar y las lesiones se delimitaron para estimar el porcentaje de implicación de cada lóbulo. Se registró el grado de las lesiones

macroscópicas presentes

Tabla 1

Grupo de tratamiento	Compuesto de vacunación	Número	Vacunados el Día 0	Exposición el Día 178 [1]	Exposición el Día 179 [1]	Exposición el Día 180 [1]
T01	Placebo	26	26	26	26	26
T02	Vacuna	26	26	24 [2]	22 [3]	22 [3]

[1] Inóculo virulento de *M. hyo*
[2] Los cerdos 71 y 73 fueron eliminados del estudio antes de la exposición debido a que ambos animales perdieron las etiquetas de sus orejas y por lo tanto no pudo determinarse la identidad de cada animal.
[3] El cerdo 36 se encontró muerto el Día 178 debido a complicaciones anestésicas. El cerdo 31 se encontró muerto el Día 179 debido a complicaciones anestésicas.

Los resultados de las lesiones de pulmón se resumen en la Tabla 2. Los resultados indicaban que los cerdos vacunados (T02) tenían un porcentaje de la media de mínimos cuadrados significativamente menor (P = 0,0385) de las lesiones del pulmón neumónico que los cerdos con placebo (T01) (2,0 frente a 4,5 %).

Tabla 2. Resumen del porcentaje de lesiones de pulmón totales

Tratamiento	Compuesto	Número de cerdos	Media de mínimos cuadrados	Intervalo
T01	Placebo	26	4,5 [a]	Desde 0 hasta 36,75
T02	Vacuna	22	2,0 [b]	Desde 0 hasta 13,75

[a, b] Los valores con un superíndice diferente son estadísticamente significativos (P = 0,0385)

Los resultados indican que una única vacunación de los cerdos de aproximadamente una semana de edad con la bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1, indujo protección frente a una posterior exposición a *M. hyo* virulenta.

Ejemplo 4

Se evaluó la protección frente a la exposición a *M. hyo* virulento en cerdos serológicamente negativos para *M. hyo* mediante el uso de una única dosis de la bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1, administrada a cerdos de entre 3 y 8 días de edad.

Se llevaron a cabo cinco réplicas de ensayos de la vacuna en el momento de la vacunación o próximo. Se determinó la RP mediante una cuantificación del antígeno relativo en comparación con una vacuna de referencia. La vacuna de referencia, que tiene una RP = 1,0, contenía aproximadamente 8.000 unidades del antígeno de *M. hyo*. Las RP de estos cinco ensayos eran de 5,42, de 3,96, de 4,71, de 5,49 y de 4,36, respectivamente.

En el Día 0, los cerdos del Grupo de Tratamiento T02 fueron vacunados con una dosis intramuscular de 2 ml de la bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1. Los cerdos del Grupo T01 fueron vacunados intramuscularmente con 2 ml de un placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml de la suspensión 1:25 del inóculo de exposición los Días 173, 174 y 175. En cada uno de los 3 días se cultivó una alícuota del material de exposición en el momento de la inoculación para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Se retrovaloró una segunda alícuota para confirmar que la solución madre de exposición contenía aproximadamente 10^6 CCU/ml de *M. hyo.* Diariamente se monitorizaron todos los cerdos y se comprobaron los signos de enfermedad clínica.

Veintinueve días después del primer día de exposición, todos los cerdos fueron sacrificados y se les realizó una necropsia. Se extrajeron los pulmones y se evaluaron. El análisis post-mortem incluía una estimación del grado de patología asociada con la enfermedad respiratoria inducida por *M. hyo*. Se analizó cada lóbulo pulmonar y las lesiones se delimitaron para estimar el porcentaje de consolidación en cada lóbulo. Se registró el grado de lesiones macroscópicas presentes.

La Tabla 3 resume el diseño experimental.

Tabla 3

Grupo de tratamiento	Compuesto de vacunación	Número	Vacunados el Día 0	Exposición el Día 173 [1]	Exposición Día 174 [1]	Exposición el Día 175 [1]
T01	Placebo	26	26	25 [2]	24 [4]	24

(continuación)

Grupo de tratamiento	Compuesto de vacunación	Número	Vacunados el Día 0	Exposición el Día 173 [1]	Exposición Día 174 [1]	Exposición el Día 175 [1]
T02	Vacuna	26	26	23 [3]	20 [5]	20

[1] *M. hyo* virulento
[2] El cerdo 123 fue sacrificado el Día 19 debido a una poliartritis séptica crónica.
[3] El cerdo 222 se encontró muerto el Día 40, la necropsia reveló una gran cantidad de líquido pericárdico y una hemorragia en el pericardio. El cerdo 102 fue sacrificado el Día 95 debido a un prolapso rectal. El cerdo 204 se encontró muerto el Día 145. No se realizó necropsia debido a la avanzada descomposición del cadáver.
[4] El cerdo 244 se encontró muerto el Día 174 después del primer día de exposición debido a complicaciones anestésicas.
[5] NEEA considera 3 cerdos

Los resultados de las lesiones de pulmón se resumen en la Tabla 4. El análisis global indicó que los cerdos vacunados (T02) tenían un porcentaje de la media de mínimos cuadrados significativamente menor (P = 0,0001) de las lesiones del pulmón neumónico que los cerdos con placebo (T01) (0,3 frente al 5,9 %).

Tabla 4. Resumen del porcentaje de lesiones de pulmón totales

Porcentaje de pulmón con lesión

	Compuesto de tratamiento	Número de cerdos	Media de mínimos cuadrados	Intervalo
T01	Placebo	24	5,9 [a]	Desde 0 hasta 36
T02	Vacuna	20	0,3 [b]	Desde 0 hasta 6

[a, b] Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes (P = 0,0001).

Los resultados de este estudio indican que una única vacunación de cerdos con la bacterina de *M. hyo* RESIPURE ONE indujo protección frente a una posterior exposición a *M. hyo* virulento.

Ejemplo 5

Se evaluó la protección frente a la exposición a *M. hyo* virulento en cerdos serológicamente negativos para *M. hyo* mediante el uso de una única dosis de la bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 administrada a cerdos de entre 3 y 8 días de edad.

Se llevaron a cabo cinco réplicas de ensayos de la bacterina en el momento de la vacunación o próximo. Se determinó la RP mediante una cuantificación del antígeno relativo en comparación con una vacuna de referencia. La vacuna de referencia, que tiene una RP = 1,0, contenía aproximadamente 8.000 unidades del antígeno de *M. hyo*. Las RP de estos cinco ensayos eran de 5,42, de 3,96, de 4,71, de 5,49 y de 4,36, respectivamente.

En el Día 0, los cerdos del Grupo de Tratamiento T02 fueron vacunados con una dosis intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo*. Los cerdos del Grupo T01 fueron vacunados intramuscularmente con 2 ml de un placebo. Cada cerdo recibió una dosis intranasal de 5 ml (2,5 ml por fosa nasal) de la suspensión 1:25 del inóculo de exposición los Días 76, 77 y 78. En cada uno de los 3 días se cultivó una alícuota del material de exposición en el momento de la inoculación para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Se retrovaloró una segunda alícuota para confirmar que la solución madre de exposición contenía aproximadamente 10^6 CCU/ml de *M. hyo*. Diariamente se monitorizaron todos los cerdos y se comprobaron los signos de enfermedad clínica.

Veintinueve días después del primer día de exposición, todos los cerdos fueron sacrificados y se les realizó una necropsia. Se extrajeron los pulmones y se evaluaron. El análisis post-mortem incluía una estimación del grado de patología asociada con la enfermedad respiratoria inducida por *M. hyo*. Se analizó cada lóbulo pulmonar y las lesiones se delimitaron para estimar el porcentaje de consolidación en cada lóbulo. Se registró el grado de consolidación presente.

La Tabla 5 resume el diseño experimental.

Tabla 5

Grupo de tratamiento	Compuesto de vacunación	Número	Vacunados el Día 0	Exposición el Día 176 [1]	Exposición Día 177 [1]	Exposición el Día 178 [1]
T01	Placebo	26	26	23 [2]	23	23
T02	Vacuna	26	26	21 [3]	21	21

[1] Inóculo virulento de *M. hyo*
[2] Los cerdos 237 y 239 dieron positivo el Día -1 para neumonía por *M. hyo*. Estos lechones fueron eliminados del estudio el Día 14 y se sacrificaron. El cerdo 220 se encontró muerto el Día 3 porque fue aplastado por la piara.
[3] Los cerdos 238, 240 y 277 dieron positivo el Día -1 para neumonía por *M. hyo*. Estos lechones fueron eliminados del estudio el Día 14 y se sacrificaron. El cerdo 280 fue sacrificado el Día 7 después de estar anoréxico y manirroto. El cerdo 177 fue sacrificado el Día 40 debido a un síndrome consuntivo crónico.

Los resultados de las lesiones de pulmón se resumen en la Tabla 6. El análisis global indicó que los cerdos vacunados (T02) tenían un porcentaje de la media de mínimos cuadrados significativamente menor (P = 0,0001) de las lesiones del pulmón neumónico que los cerdos con placebo (T01) (0,5 frente al 9,9 %).

Tabla 6. Resumen del porcentaje de lesiones de pulmón totales

Porcentaje de pulmón con lesión

Tratamiento	Compuesto	Número de cerdos	Media de mínimos cuadrados	Intervalo
T01	Placebo	23	9,9 [a]	Desde 0 hasta 40,5
T02	Vacuna	21	0,5 [b]	Desde 0 hasta 5

[a, b] Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes (P = 0,0001).

REIVINDICACIONES

1. Uso de una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en ganado porcino causado por una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* para su administración al animal de 3 a 10 días de edad, de una cantidad eficaz de una única dosis de la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en el que dicha dosis única es eficaz en la prevención o reducción de lesiones pulmonares y dicha dosis única elimina la necesidad de administración de dosis adicionales para generar inmunidad contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que la dosis única de la vacuna de *M. hyopneumoniae* contiene de $1x10^6$ a $5x10^{10}$ unidades de cambio de color (CCU) por dosis.

3. El uso de la reivindicación 1, en el que la cantidad de dicha vacuna administrada es de 0,5 a 3,0 ml.

4. El uso de la reivindicación 1, en el que la bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* contiene la cepa P-5722-3.

5. El uso de la reivindicación 1, en el que la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* comprende además un antígeno vírico o bacteriano distinto de *Mycoplasma hyopneumoniae.*

6. El uso de la reivindicación 5, en el que los dichos antígenos víricos o bacterianos se seleccionan de entre el virus de la gripe porcina (SIV), el virus de la enfermedad reproductora y respiratoria porcina (PRRS o enfermedad porcina misteriosa), diarrea post-destete (PWD) y enteritis proliferativa porcina (PPE).

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* es para administración intramuscular.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* comprende además un adyuvante.