

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 899**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2014 PCT/EP2014/076224**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015 WO15082458**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2014 E 14805617 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3076996**

54 Título: **Vacuna contra circovirus porcino de tipo 2**

30 Prioridad:

03.12.2013 EP 13195515

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

07.07.2020

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**FACHINGER, VICKY;
SNO, MELANIE y
WITVLIET, MAARTEN HENDRIK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 771 899 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 contra circovirus porcino de tipo 2

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una vacuna contra el circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2).

Antecedentes en la técnica

10 PCV-2 está vinculado al síndrome consuntivo multisistémico posterior al destete (PMWS) observado en lechones. Esta enfermedad apareció por primera vez en Canadá en 1991. Los signos clínicos y la patología se duplicaron en 1996, e incluyen consunción progresiva, disnea, taquipnea y, ocasionalmente, ictericia y amarilleamiento hepático. Nayar et al., Can. Vet. J. Volumen 38, junio de 1997 detectó el circovirus porcino en ratones con síntomas clínicos de
15 PMWS y concluyó que un PCV, diferente del PCV conocido y reconocido como habitante natural de células PK-15, se puede vincular al PMWS. Las últimas publicaciones (Hamel et al., J. Virol., 72(6), 5262-5267, 1998; Meehan et al., J. Gen. Virol., 79, 2171-2179, 1998) confirmó estos hallazgos, y se propuso (Meehan et al., supra) denominar al nuevo PCV patógeno como PCV-2, mientras que el aislado del cultivo celular PK-15 original (Tischer et al., Nature 295, 64-66, 1982) deberá denominarse como PCV-1. PCV-2 es un virus pequeño (17-22 nm) icosaédrico no
20 encapsidado que contiene un genoma de ADN circular monocatenario. La longitud del genoma de PCV-2 es de aproximadamente 1768 pb. Los aislados de PCV-2 originados en diferentes regiones del planeta parecen estrechamente relacionados entre sí y representan de 95 al 99 % de identidades en la secuencia de nucleótidos (Fenaux et al., J. Clin. Microbiol., 38(7), 2494-2503, 2000). El ORF-2 de PCV codifica la proteína de la cápsida del virus. El ORF 2 de PCV 2 codifica una proteína de 233 aminoácidos. El ORF 2 de todos los aislados de PCV-2
25 comparten un 91-100 % de identidad de secuencia de aminoácidos y un 90-100 % de la identidad deducida de la secuencia de aminoácidos.

Una vacuna convencional para tratar profilácticamente a los animales, en particular a cerdos, contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2 patógeno, se puede basar en el virus PCV-2 completo como inmunógeno (no
30 replicante). Sin embargo, en el caso de PCV-2, el tema se complica por el hecho que PCV-2 no se replica con títulos altos en un cultivo de células. Una vacuna basada en el virus completo como el inmunógeno es por tanto menos ideal desde un punto de vista práctico (económico). En la técnica se ha comprobado que la proteína de la cápsida codificada por ORF2 (incluso cuando está expresado de forma recombinante) es adecuada como subunidad inmunógena del circovirus porcino de tipo 2 para su uso en una vacuna adecuada. Esto se puede entender porque
35 esta subunidad, en el sistema circulatorio, se muestra de la misma forma que el propio virus, difiriendo esencialmente por el hecho de que el ADN y las proteínas no estructurales no están presentes dentro de la cápsida.

Se conocen y están comercialmente disponibles en la técnica diversas vacunas contra el PCV2.

40 Porcilis® PCV (disponible de MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos) es una vacuna para proteger los cerdos contra el circovirus porcino de tipo 2, para su uso en cerdos de tres semanas y más edad. Cuando se administra como vacuna en dos disparos (dos dosis), la duración de la inmunidad (DOI) es de 22 semanas, lo que cubre casi completamente el período de engorde de los cerdos. La vacunación puede producir hipotermia y otras reacciones sistémicas.

45 Ingelvac CicroFlex® (disponible de Boehringer Ingelheim, Ingelheim) es una vacuna para proteger los cerdos contra el circovirus porcino de tipo 2, para su uso en cerdos de dos semanas y más edad. Cuando se administra como vacuna en un disparo (una dosis), la DOI es de 17 semanas. La vacunación puede producir hipotermia y, muy pocas veces, reacciones anafilácticas. Circovac® (disponible de Merial, Lyon, Francia) es una vacuna para proteger los cerdos contra Lyon, porcino de tipo 2, para su uso en cerdos de tres semanas y más edad. Cuando se administra
50 como vacuna en dos disparos, la DOI es de 14 semanas solamente. La vacunación puede producir hipotermia y otras reacciones sistémicas, tales como una reducción en la ingesta de alimento.

Suvaxyn® PCV (disponible de Zoetis, Capelle a/d IJssel, Países Bajos) es una vacuna para proteger los cerdos contra el circovirus porcino de tipo 2, para su uso en cerdos de tres semanas y más edad. Cuando se administra como vacuna en un disparo, la DOI es de 19 semanas. La vacunación puede producir hipotermia y otras reacciones
55 sistémicas, tales como vómitos.

Otras vacunas se describen, por ejemplo, en los documentos WO2007/028823, WO 2007/094893 y WO2008/076915. Ninguna de estas muestra un DOI superior a lo ya conocido para las vacunas comercialmente
60 disponibles.

Objetivo de la invención

El fin de la presente invención es diseñar una vacuna que pueda proporcionar un DOI contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2 patógeno al menos tan prolongado como el de las vacunas existentes, incluso aunque el
65 animal en el momento de la vacunación tenga en su circulación anticuerpos dirigidos contra el circovirus porcino de tipo 2, siendo al mismo tiempo la vacuna cómoda de usar y segura para los animales, en particular induciendo pocos

o ningunos efectos secundarios sistémicos tales como la hipertemia.

Sumario de la invención

5 Para satisfacer el objetivo de la invención se ha diseñado una nueva vacuna, comprendiendo la vacuna un inmunógeno no replicante del circovirus porcino de tipo 2, en particular una proteína de ORF2 expresada de forma recombinante del circovirus porcino de tipo 2, para su uso en el tratamiento profiláctico de un animal que tenga en su circulación anticuerpos dirigidos contra el circovirus porcino de tipo 2, en particular anticuerpos procedentes de la madre, contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2 patógeno mediante la administración de una única
10 dosis de la vacuna en la dermis del animal.

Sorprendentemente, se ha descubierto que cuando se vacuna un animal en su dermis con solamente una dosis de la vacuna que contiene un inmunógeno no replicante del circovirus porcino de tipo 2, se puede obtener un DOI muy prolongado de 23 semanas contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2 patógeno, incluso aunque el
15 animal tenga en su circulación un nivel de medio a elevado de anticuerpos contra el circovirus porcino de tipo 2, sin ninguno, o muy pocos, efectos secundarios sistémicos. De esta forma, se puede obtener un DOI que es incluso sustancialmente más prolongado que el DOI que pueda obtenerse a partir de cualquier vacuna en monodosis existente. Esto fue especialmente sorprendente, ya que se descubrió que estos anticuerpos pueden ser anticuerpos procedentes de la madre.

20 La invención se también habilita un método para el tratamiento profiláctico de un animal que tenga en su circulación anticuerpos dirigidos contra el circovirus porcino de tipo 2, contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2 patógeno mediante la administración de una única dosis de la vacuna que comprende un inmunógeno no replicante del circovirus porcino de tipo 2, en particular una proteína de ORF2 expresada de forma recombinante del circovirus porcino de tipo 2, en la dermis el animal. Otros métodos que habilita la invención son: un método en el que la vacuna comprende, además, un inmunógeno no vivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* para tratar el animal contra una
25 infección por bacterias patógenas de *Mycoplasma hyopneumoniae*; y un método adicional en el que la vacuna comprende, además, un inmunógeno no vivo de *Lawsonia intracellularis* para tratar el animal contra una infección por bacterias patógenas de *Lawsonia intracellularis*; un método para el tratamiento profiláctico de un animal que tenga en su circulación anticuerpos dirigidos contra el circovirus porcino de tipo 2 contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2 y *Mycoplasma hyopneumoniae*, en el que el método comprende administrar al animal una sola dosis de una vacuna que comprende un inmunógeno no replicante del circovirus porcino de tipo 2 en la dermis, en particular una proteína de ORF2 expresada de forma recombinante del circovirus porcino de tipo 2, y en paralelo administrar al animal una sola dosis de una vacuna que comprende un inmunógeno no vivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* en la dermis; y un método para el tratamiento profiláctico de un animal que tenga en su circulación anticuerpos dirigidos contra el circovirus porcino de tipo 2 contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2 y *Lawsonia intracellularis*, en el que el método comprende administrar al animal una sola dosis de una vacuna que comprende un inmunógeno no vivo del circovirus porcino de tipo 2, en particular una proteína de ORF2 expresada de forma recombinante del circovirus porcino de tipo 2, en la dermis, y en paralelo administrar al animal una sola
40 dosis de una vacuna que comprende un inmunógeno no vivo de *Lawsonia intracellularis* en la dermis.

Se destaca que Opriessnig et al. en *Veterinary Microbiology* 131 (2008) 103-114, informan de un programa de investigación destinado a establecer si hay diferencias entre la vacunación intradérmica e intramuscular con PCV2. La conclusión extraída por Opriessnig es que "no se descubrieron diferencias entre la vía intradérmica y la intramuscular de administración de la vacuna". Teniendo en cuenta dicho documento, resulta incluso más sorprendente que los solicitantes descubrieran una diferencia significativa entre la vacunación intradérmica y la intramuscular, en particular una respuesta de anticuerpos significativamente diferente. Con el conocimiento de la presente invención disponible, una posible explicación para el hecho de que Opriessnig no encontrara ninguna diferencia puede ser que, sin saberlo, simplemente ambas vacunas se aplicaran por vía intramuscular. Esto se puede entender de la siguiente forma: Opriessnig usó un sistema de inyección sin aguja Pulse 250™ (Pulse NeedleFree Systems Inc. Lenexa, KS, EE.UU.) para aplicar la vacuna. Este dispositivo, aunque no utiliza agujas, no está especialmente configurado para la aplicación intradérmica. El productor de este sistema indica en el folleto de este dispositivo (véase http://www.pulse-nfs.com/pdfs/250_swine.pdf), que el dispositivo se ha diseñado para administrar "a través de la piel y dentro del tejido muscular". El volumen de inyección utilizado por Opriessnig, viz.
55 2 ml, es bastante alto y es típico de la vacunación intramuscular. La Organización Mundial de la Salud, en su boletín del 27 de agosto de 2009, denominado "Intradermal Delivery of Vaccines; A review of the literature and the potential for development for use in low- and middle-income countries" también indica que la vacunación "sin aguja" no significa necesariamente vacunación "intradérmica" (véase la Tabla 1, página 3, de dicha revisión). Solamente cuando un dispositivo sin agujas está "configurado para vacunación intradérmica", entonces una vacuna puede administrarse indudablemente en la dermis. De lo contrario, se puede administrar por vía subcutánea o intramuscular. Por tanto, dado que Opriessnig usó un dispositivo que no estaba especialmente configurado para vacunación intradérmica, que utilizó un elevado volumen de inyección y, de forma más importante, que no encontró diferencias entre la vacunación intradérmica y la vacunación intramuscular mientras que los presentes inventores encontraron una diferencia sustancial (en particular, con respecto a los títulos de IgM), solamente se puede concluir que Opriessnig simplemente aplicó la vacuna notificada en su artículo como "administrada por vía intradérmica" dentro del músculo de los animales.
65

También debe señalarse que se ha notificado recientemente que el impacto de los anticuerpos procedentes de la madre (MDA) sobre la eficacia de la vacunación no se ha estudiado bien, aunque se cree que el impacto global es poco importante (véase, APVS Vietnam, 23-25 de septiembre de 2013; Brad Tacker et al: Diagnostic Laboratory Survey of Porcine Circovirus Type 2 and Mycoplasma Hypopneumoniae Maternally derived Antibodies). Sin embargo, al mismo tiempo se notificaba que cuando se vacunaba en presencia de niveles de anticuerpo de medios a elevados, se usaban dos vacunaciones para asegurar que los anticuerpos procedentes de la madre no alteraban la eficacia de la vacunación con PCV2.

Los documentos WO 2008/076915 y EP 1958644 (Fachinger et al) describen una vacuna de PCV2 en una sola dosis usando CircoFLEX® para adquirir una inmunidad activa contra el circovirus porcino de tipo 2, donde la vacuna se administra por vía intramuscular. La inmunidad adquirida se sometió a ensayo 9 semanas después de la vacunación. El documento WO 2009/126356 (Roof et al.) describe un enfoque de una vacuna de PCV2 en una sola dosis usando CircoFLEX® en donde la vacuna se administra por vía intramuscular. La vacuna se administra a animales negativos para MDA, y el estímulo se produce 4½ semanas después de la vacunación.

El documento WO 2005/009462 (Parisot et al) describe varios enfoques de vacunación contra el PCV2 basados en virus de PCV2 inactivados. En primer lugar, un enfoque de vacunación IM con un solo disparo en animales negativos para MDA (Ejemplo 5). Un enfoque de vacuna de PCV2 en el que la vacuna se administra por vía intramuscular en animales negativos para MDA y el estímulo se produce 5 semanas después de la vacunación (Ejemplo 6). Un enfoque de vacunación IM con un solo disparo a cerdas con anticuerpos en circulación, que hace que los lechones queden protegidos contra el PCV2 (Ejemplo 7). No existe divulgación alguna acerca de una vacuna que comprenda una proteína ORF2 expresada de forma recombinante, para un enfoque de administración en un solo disparo para animales que tengan en su circulación anticuerpos contra el PCV2, en particular anticuerpos procedentes de la madre, mediante administración intradérmica. En solitario, no hay ninguna expectativa de que esto pudiera producir un DOI muy prolongado. Aunque se mencionan en la página 19 varios dispositivos de administración sin agujas, no se indica que se utilizan para administración intradérmica. Como es de conocimiento general, por ejemplo, el mencionado Biojector está diseñado en particular para administración IM y SC.

El documento WO 00/01409 menciona en el Ejemplo 17 la preparación de una vacuna que comprende un virus de PCV2 inactivado que se puede administrar mediante la vía intradérmica. Sin embargo, este documento no consigue mostrar una vacuna que comprenda una proteína ORF2 expresada de forma recombinante, para un enfoque de administración en un solo disparo para animales que tengan en su circulación anticuerpos contra el PCV2, en particular anticuerpos procedentes de la madre, mediante administración intradérmica.

Gamage en Vaccine 27 (2009) 6595 - 6604 menciona que el suero de cerdos vacunados tres veces con una proteína de la cápsida de PVC expresada en fago puede neutralizar el virus PCV2. En Gamage no se muestra que después de la primera vacunación haya una respuesta protectora, ni tampoco se aclara en Gamage si la pistola inyectora utilizada es indudablemente capaz de administración intradérmica. Como se muestra anteriormente con respecto a Opriessnig, en la técnica se indica frecuentemente que las pistolas sin aguja inyectan en la dermis, pero solamente pocos inyectores pueden administrar realmente una vacuna en la dermis.

El documento EP 1 958 644 menciona rasgos de la presente invención como rasgos aislados a lo largo de su memoria descriptiva, pero no consigue mostrar todos los rasgos de la presente invención.

DEFINICIONES

Inmunógeno no replicante de un virus es cualquier sustancia o compuesto correspondiente al virus, que no sea el virus replicante ("vivo") como un todo, contra el que se desencadene una respuesta inmunitaria, de tal forma que el correspondiente virus virulento o uno o más de sus factores de virulencia se reconozcan por el sistema inmunitario del hospedador como resultado de esta respuesta inmunitaria y quede finalmente neutralizado. Lo ejemplos típicos de inmunógenos no replicantes son virus completos muertos o subunidades de estos virus tales como cápsidas y proteínas expresadas en la superficie, por ejemplo, expresadas de forma recombinante. Una vacuna que comprende un inmunógeno no replicante del virus difiere de una vacuna de virus "vivo", pero también de una vacuna de ADN en la que el ADN no es tan inmunógeno tal cual, sino que después de su incorporación a las células hospedadoras, expresa el inmunógeno correspondiente.

Tratamiento profiláctico contra una infección por un virus es ayudar a prevenir o mejorar una infección resultado de un estímulo posterior al tratamiento con un virus patógeno, en particular para reducir la carga vírica en el hospedador después de dicho estímulo.

Tratamiento profiláctico contra una enfermedad resultante de una infección por un virus es ayudar a prevenir o mejorar una o más manifestaciones clínicas resultantes de una infección posterior al tratamiento con el virus.

Administración de una vacuna en la dermis significa que una cantidad suficiente de la vacuna se deposita en la dermis, lo que lleva a una respuesta inmunitaria significativamente diferente (en particular: cuando se usa la prueba

de la suma de los rangos de Wilcoxon en un conjunto de ensayos como se ha detallado en el Ejemplo 3, el valor p deberá ser menor de 0,10, preferentemente menor de 0,05) derivado de una administración intramuscular con la misma vacuna y volumen de la misma. Varios dispositivos están comercialmente disponibles para vacunación intradérmica, por ejemplo, el vacunador IDAL® (MSD Animal Health), el Pulse 50 MicroDose (Pulse Needle Free Systems), u otros dispositivos que se describen en *Vaccine*, 11 Ene 2012;30(3):523-38 (véase en particular la Tabla 1, página 525: "An overview of different devices for liquid and solid formulation administration")

Administración de una sola dosis de una vacuna para su uso en el tratamiento profiláctico significa que, para obtener una inmunidad protectora, la vacuna no tiene que reforzarse con una segunda administración. En un régimen de dos disparos, la primera vacunación (cebado) se refuerza de forma típica en un plazo de 6 semanas desde la primera administración, habitualmente en un plazo de 3 o incluso 2 semanas desde la primera administración, y solo después de la segunda administración (refuerzo), se puede obtener la inmunidad protectora.

REALIZACIONES DE LA INVENCION

En una primera realización, la administración en una sola dosis comprende menos de 0,5 ml de la vacuna, preferentemente 0,2 ml de la vacuna. Una dosis por debajo de 0,5 ml parece ser adecuada para la vacunación intradérmica. Con una dosis tan baja, la dermis permanece al menos lo suficientemente intacta y disponible para recibir la vacuna, mientras que con una dosificación sustancialmente superior, existe el riesgo de romper la dermis, dejando la dermis no disponible para recibir la vacuna.

En una realización siguiente, la vacuna se administra con un dispositivo de vacunación sin agujas, usando un chorro de la vacuna para alcanzar la dermis a través de la piel del animal. La vacunación en la dermis se proporciona, en la presente realización, mediante un dispositivo de vacunación sin agujas usando un chorro líquido de la vacuna (una corriente de fluido a alta presión), de forma típica, usando un volumen muy bajo de vacuna comprendido en el intervalo de 0,05 a 0,2 ml. Esto además aumenta la seguridad de la vacuna y del método de administración.

En otra realización, el inmunógeno no replicante es una proteína de ORF2 expresada de forma recombinante del circovirus porcino de tipo 2, por ejemplo, expresada en baculovirus como es conocido en la técnica, o en un virus quimérico PCV1-PCV2. Esta proteína recombinante ha mostrado ser adecuada para su aplicación en la presente invención. En particular, la proteína de ORF2 se puede expresar en un sistema de expresión en baculovirus tal como se describe en los documentos WO2007/028823, WO 2007/094893 o WO2008/076915.

En otra realización más, el animal, en el momento de administración, tiene anticuerpos en circulación en un título de 7 log₂ (7 unidades de un logaritmo en base 2) o superior (establecido de acuerdo con los métodos descritos en este punto según el Ejemplo 1, "Serología"). Se ha descubierto que incluso con este título del anticuerpo de medio a alto, la presente invención sigue siendo eficaz.

Se describe que la única dosis de la vacuna comprende menos de 5000 UA del inmunógeno (la cantidad mínima que es una cantidad que sigue produciendo una respuesta inmunitaria eficaz). Se ha descubierto que, para esta dosis, menor que la dosis de la vacuna existente Porcillus PCV (autorizada con un régimen de vacunación en dos disparos para alcanzar un DOI de 22 semanas), se sigue pudiendo obtener un DOI de más de 23 semanas después de solamente una vacunación. En una alternativa, la dosis única de la vacuna comprende aproximadamente 2000 UA del inmunógeno. Esta cantidad parece ser suficiente para obtener las ventajas de la presente invención.

En otra realización, la vacuna comprende un inmunógeno no vivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* para tratar el animal contra una infección por bacterias patógenas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, y/o la vacuna comprende un inmunógeno no vivo de *Lawsonia intracellularis* para tratar el animal contra una infección por bacterias patógenas de *Lawsonia intracellularis*.

En otra realización adicional, la vacuna comprende un adyuvante que comprende aceite mineral, caracterizado en que la cantidad de aceite mineral en la vacuna está comprendida entre 1 y el 10 % (volumen de aceite respecto del volumen total de la vacuna). Se sabe habitualmente que el aceite mineral es un muy buen potenciador de la respuesta inmunitaria (también denominado como "adyuvante"). Sin embargo, en cerdos, frecuentemente produce reacciones locales graves (hinchamientos que tienen un diámetro promedio de más de 5 cm) en particular si se administra por vía intradérmica. Se ha descubierto sorprendentemente que para la actual vía de vacunación intradérmica, dichas reacciones locales graves pueden no producirse de forma alguna, y el diámetro medio de las hinchazones pueden incluso permanecer por debajo de 3 cm, lo que se considera aceptable. En una realización adicional, la cantidad de aceite mineral está comprendido entre 2,5 y 5 % v/v. Se ha descubierto que incluso a esta concentración tan baja de aceite mineral, la respuesta inmunitaria era eficaz.

En alternativas del método relacionadas con la invención, un animal recibe la administración de una única dosis de la vacuna que comprende un inmunógeno no replicante del circovirus porcino de tipo 2 en la dermis, y en paralelo (es decir, en un plazo de un día, preferentemente en unas pocas horas, minutos o segundos) recibe una administración de una única dosis de una vacuna que comprende un inmunógeno no vivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) en la dermis para tratar una infección por circovirus porcino de tipo 2 y una infección por *Mycoplasma*

hyopneumoniae al mismo tiempo. Algunos inmunógenos no vivos de *Mycoplasma hyopneumoniae* a utilizar en esta o cualquiera de las otras alternativas son conocidos en la técnica, tales como las bacterinas (*Swine Health and Production*, 1998; 6(3):107-112), antígenos de Mhyo expresados de forma recombinante (*Infection and Immunity*, junio de 1997 vol. 65 n.º 6 2502-2507), la fracción soluble de un cultivo de Mhyo (documento WO 2013/152083) etc.

En otra alternativa, un animal recibe una administración de una sola dosis de una vacuna que comprende un inmunógeno no replicante del circovirus porcino de tipo 2 en la dermis, y en paralelo, recibe una administración de una única dosis de una vacuna que comprende un inmunógeno no vivo de *Lawsonia intracellularis* en la dermis para tratar una infección por circovirus porcino de tipo 2 y una infección por *Lawsonia intracellularis* al mismo tiempo. Con respecto a los inmunógenos de *Lawsonia intracellularis* a utilizar en esta o cualquiera otra de las alternativas, se conocen varios tipos de inmunógenos no vivos en la técnica, y por ejemplo, se describen en el documento WO2009/144088 (inmunógenos de célula completa destruidos), documentos WO2005/070958 (subunidades) y documento WO97/20050 (inmunógenos de célula completa destruidos). La combinación de antígenos de PCV y Mhyo es tal como se describe en el documento WO2009/144088.

Ejemplos

El Ejemplo 1 es un experimento para mostrar que una vacunación intradérmica en una sola dosis puede proporcionar veintitrés semanas de inmunidad contra una infección por circovirus porcino de tipo 2.

El Ejemplo 2 es otro experimento con un enfoque de una sola vacunación con PCV2 ID que muestra que la vacunación es segura y produce títulos protectores.

El Ejemplo 3 es una comparación entre la vacunación intradérmica e intramuscular. El Ejemplo 4 describe experimentos con vacunación intradérmica combinada.

El Ejemplo 5 describe un experimento con vacunas de combinación, varias dosificaciones de antígenos y varios adyuvantes.

- Figura 1 Serología en un estudio DOI
- Figure 2 Carga vírica en suero, heces y órganos
- Figura 3 Temperaturas corporales promedio
- Figure 4 Resultados promedio total de Ab Ig PCV2
- Figure 5 Resultados promedio de Ab IgM PCV2
- Figura 6 Títulos de anticuerpos en un estudio de duración
- Figura 7 Carga vírica en órganos
- Figura 8 Carga vírica en órganos

Ejemplo 1

DISEÑO EXPERIMENTAL

En este estudio se usaron 10 cerdas con anticuerpos contra PCV2. Los lechones se dividieron por camadas en 2 grupos de 15 animales. A las 3 semanas de edad, los lechones del grupo 1 se vacunaron por vía intradérmica en el lado derecho del cuello con 0,2 ml de una vacuna que comprende una proteína ORF2 expresada de forma recombinante del circovirus porcino de tipo 2 (véase el documento WO 2007/028823 para la provisión de la proteína), usando el dispositivo de vacunación intradérmica comercialmente disponible IDAL® (disponible de MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos), mientras que el grupo 2 se dejó sin vacunar y sirvió como grupo de control. Todos los animales del estudio se observaron diariamente para determinar los signos clínicos. Se tomaron muestras de sangre de todos los animales en el momento de la vacunación, 9, 17, 19 y 21 semanas después. Veintitrés semanas después de la vacunación, cada animal se infectó con estímulo usando una cepa no genomanipulada de virus PCV2 como estímulo aplicada por vía intranasal.

Las muestras de suero y los hisopos fecales se tomaron un día antes del estímulo y una, dos y tres semanas después del estímulo, y se examinaron para buscar ácido nucleico vírico del PCV2 mediante PCR cuantitativa. Además, las muestras de suero se examinaron para determinar anticuerpos de PCV2. Tres semanas después del estímulo, todos los animales se sometieron a necropsia, y los ganglios linfáticos inguinales, la amígdala y los pulmones se muestrearon para determinar antígenos víricos y ácido nucleico de PCV2.

La vacuna utilizada se proporcionó como emulsión aceite/agua, que comprendía un 5 % v/v del aceite mineral Marcol® 52 (Exxon), 0,30 % p/v de acetato de vitamina E y 0,32 % de Polisorbato 80 (Tween 80; Sigma Aldrich), agua para inyección y 2000 UA de proteína de PCV2 por 0,2 ml. Las unidades UA se calcularon basándose en el ensayo AlphaLISA de PerkinElmer. Para este ensayo, los pocillos de una placa de microvaloración de poliestireno se rellenaron con diluciones en serie de la muestra de ensayo que contenía antígeno de ORF2 de PCV2 junto con diluciones en serie de un patrón de referencia. Estas diluciones se incubaron con perlas aceptoras (revestidas con anticuerpo monoclonal dirigido contra ORF2 de PCV2) y anticuerpo secundario marcado con biotina que también estaba dirigido contra ORF2 de PCV2. La cantidad de anticuerpo secundarios unido se cuantificó a continuación por

incubación con perlas donantes revestidas con estreptavidina y detección por quimioluminiscencia. El patrón de referencia es tal que la vacuna comercialmente disponible Porcilis® PCV se establece para contener 5000 UA por dosis (2 ml).

5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Observación diaria

10 Todos los cerdos se observaron diariamente para determinar los signos clínicos de la enfermedad. Las observaciones consistieron en reacciones sistémicas incluida pérdida de apetito, tendencia a tumbarse, languidez o somnolencia, temblores, cerdas erizadas, edema (especialmente alrededor de los ojos), vómitos, diarrea y disnea.

Muestreo de la sangre

15 Las muestras de sangre se recogieron antes de la vacunación, 9, 17, 19 y 21 semanas después. Las muestras de sangre se recogieron un día antes del estímulo y 7, 13 y 19 días después del estímulo. Esto se realizó para todos los cerdos individualmente.

Hisopo fecal

20 Los hisopos fecales se tomaron de todos los animales, usando un hisopo seco por animal, un día antes del estímulo, 7, 13 y 18 días después del estímulo. Los hisopos se tomaron usando procedimientos convencionales, en medio que contenía antibióticos. Las suspensiones del material del hisopo en medio se clarificaron por centrifugación, se distribuyeron en alícuotas y se almacenan a ≤ -18 °C hasta su uso posterior.

Serología

25
30 Todas las muestras de suero se examinaron para determinar los anticuerpos contra PCV2, usando procedimientos convencionales de ELISA. En resumen, las muestras de suero diluidas en serie se incubaron sobre placas de microtitulación revestidas con baculovirus que expresaba en antígeno de ORF2 de PCV2. Tras retirar el suero, todos los pocillos se incubaron con una cantidad fija de anticuerpo monoclonal específico de PCV2 marcado con biotina. El MoAb unido se incubó a continuación con estreptavidina conjugada con peroxidasa seguido por detección cromofórica. Los títulos se expresaron como títulos en \log_2 .

35 Exploración postmortem

40 Al finalizar el experimento, todos los animales se eutanzaron mediante exanguinación tras aturdimiento. Durante la necropsia, se abrió el animal y las vísceras se inspeccionaron in-situ, prestando especial atención a los siguientes órganos: pulmones, ganglios linfáticos inguinales y mesentéricos, amígdalas, timo, bazo, hígado y riñones. Después de esto, las muestras de las amígdalas, pulmones (lóbulos secundarios) y ganglios linfáticos inguinales se extrajeron para una congelación rápida y posterior análisis mediante PCR cuantitativa (qPCR).

PCR cuantitativa

45 La PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo sobre todos los sueros e hisopos fecales, y sobre homogenizados al 10 % de tejido de la amígdala, pulmón y ganglios linfáticos inguinales. En resumen, el ADN se extrajo de las muestras utilizando un kit comercial. El ADN genómico de PCV2 de cada muestra se cuantificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores y una sonda de hidrólisis doblemente marcada específica de PCV2. El número de ciclo donde la fluorescencia específica supera el umbral se correlacionó con el número de ciclos para un conjunto de muestras que contenían cantidades conocidas de un plásmido que contiene PCV2. Los resultados se expresaron como \log_{10} copias/ μ l de mezcla de reacción (\log_{10} c/ μ l).

RESULTADOS

55 Al principio del experimento, todos los animales se encontraban sanos. En el grupo del control, un animal apareció muerto a las 6 semanas después de la vacunación (wpv). Dos animales vacunados tuvieron ligeros problemas locales, *viz.* una leve disfunción del movimiento (rigidez en una pata). Dado el problema, estos animales no se trataron. Ninguno de los animales vacunados mostró ningún signo de enfermedad ni de reacciones sistémicas tales como la hipotermia, reducción en la ingesta de alimentos, choque anafiláctico o vómitos.

60 Los resultados de la serología se proporcionan en la Figura 1. Es evidente que los animales vacunados mantienen un título anti-PCV2 que parece exceder de aproximadamente 4,0 \log_2 , mientras que los animales de control, el título disminuyó por debajo del límite de detección. Tras el estímulo (23 wpv, a una edad de 26 semanas), los títulos aumentaron ligeramente en el grupo vacunado. En el grupo del control, los títulos aumentaron hasta el mismo nivel.

65 Los resultados de la qPCR se muestran en las Figuras 2A, 2B y 2C ("dpc" = días después del estímulo). Parece que

los animales vacunados, 23 semanas después de la vacunación, quedaron protegidos de la infección de estímulo con PCV2, como se muestra por la significativa reducción del ácido nucleico de PCV2 en suero, órganos linfoides y pulmón. Asimismo, la vacuna fue capaz de reducir la diseminación vírica como se demuestra por una reducción significativa de la carga vírica en hisopos fecales contra el PCV2 de al menos 23 semanas. Esto se realizó en animales de campo, que tienen títulos de anticuerpos contra el PCV2 en circulación de aproximadamente $7 \log 2$, lo que se considera un nivel intermedio.

Ejemplo 2

10 DISEÑO EXPERIMENTAL

Un total de 46 lechones de un mismo parto se distribuyeron en 4 grupos de tratamiento: dos grupos vacunados de 13 lechones cada uno y dos grupos del control con 10 lechones. El grupo uno se vacunó como se ha indicado anteriormente en el Ejemplo 1 cuando los lechones tenían aproximadamente dos semanas de edad, el grupo dos se vacunó cuando los lechones tuvieron aproximadamente tres semanas de edad. Los lechones se vacunaron por vía intradérmica en el lado derecho del cuello con una dosis única de la vacuna. Los grupos 3 (grupo de control animales de 2 semanas de edad) y 4 (grupo de control de 3 semanas de edad) no se vacunaron. Se recogieron muestras de suero de todos los animales el día de la vacunación, 2, 3 y 4 semanas después de la vacunación. Se tomaron las temperaturas un día antes de la vacunación, en el día de la vacunación, y cuatro horas después y a los 1, 2, 3, 4 días después de la vacunación.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Antes de la vacunación, los lechones se observaron para determinar el estado de salud general. Las temperaturas corporales se tomaron de todos los lechones, el día $T = -1$, el día $T = 0$ a 0 y 4 horas después de la vacunación, y el día $T = 1, 2, 3, 4$ después de la vacunación.

Las muestras de sangre se recogieron el día de la vacunación y 2, 3 y 4 semanas después. Esto se realizó para todos los cerdos individualmente de acuerdo con procedimientos convencionales. Las muestras de sangre se recogieron sin adición de anticoagulante. El suero se preparó a partir de las muestras de sangre coagulada y las alícuotas se introdujeron y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

El anticuerpo de Ig de PCV2 total y el anticuerpo de IgM de PCV2 total se analizaron como se ha indicado en el presente documento, en el Ejemplo 1 ("Serología"), salvo en el caso del anticuerpo IgM por ELISA, las placas se revistieron con anticuerpo IgM y después se incubaron con el antígeno de ORF2 de PCV2, antes de la incubación con una cantidad fija de anticuerpo monoclonal específico de PCV2 marcado con biotina.

RESULTADOS

Al principio del experimento, todos los animales se encontraban sanos. En la Figura 3 se muestran los resultados promedio de las temperaturas corporales. No se pudo apreciar diferencias en el aumento promedio de la temperatura corporal observado en cualquiera de los animales de dos y tres semanas de edad (el aumento promedio máximo estuvo comprendido entre $0,0 - 0,3^\circ\text{C}$). Además, el aumento máximo en la temperatura corporal de los animales individuales del grupo 1 y el grupo 2 fue comparable al aumento máximo en la temperatura de los animales individuales de los dos grupos del control.

Anticuerpo de Ig de PCV2 total por ELISA

En la Figura 4 se resumen los resultados promedio de la respuesta del anticuerpo de Ig de PCV2 total.

En el momento de la vacunación, los lechones vacunados de 2 semanas de edad tenían títulos de anticuerpos más altos (muy probablemente procedentes de la madre) contra PCV2 con los lechones vacunados de 3 semanas de edad. Los animales vacunados mostraron un aumento de títulos notablemente mayor que los animales del control.

55 *Anticuerpo de IgM de PCV2 por ELISA*

En la Figura 5 se muestran los resultados promedio de la respuesta del anticuerpo de IgM de PCV2. En el momento de la vacunación, todos los animales dieron resultado negativo para los anticuerpos de IgM. Después de la vacunación, los animales de tres semanas de edad tuvieron una respuesta de anticuerpos IgM notablemente más rápida y elevada que los animales de dos semanas de edad. Los animales del control siguieron dando resultado negativo durante la totalidad del estudio.

Basándose en estos resultados, se puede concluir que la vacunación intradérmica con una sola dosis de los lechones de 2 y 3 semanas de edad dio como resultado un perfil de seguridad adecuado y una buena respuesta serológica. Se obtuvieron resultados comparables en otro experimento (no se muestran los datos) donde el nivel inicial de títulos de anticuerpos en circulación fue incluso superior, *viz.* hasta $9,4 \log 2$, que se considera como el

extremo superior de un intervalo medio.

Ejemplo 3

5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Un total de 40 lechones se distribuyeron entre cuatro grupos de tratamiento de 10 lechones cada uno. Los lechones de los grupos 1 y 2 se vacunaron por vía intradérmica con una dosis única de la vacuna como se ha indicado anteriormente en el presente documento en el Ejemplo 1. La diferencia entre el grupo 1 y el 2 fue que el vacunador IDAL del grupo 2 tuvo una acumulación de presión algo superior (125 % del valor del vacunador IDAL usado para el grupo 1). Los lechones del grupo 3 se vacunaron por vía intramuscular con una sola dosis de la misma vacuna, en la misma cantidad en el mismo sitio (en el cuello), y los lechones del grupo 4 se dejaron sin tratar. Se recogieron muestras de suero de todos los animales el día de la vacunación, tres y cinco semanas después de la vacunación.

15 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Antes de la vacunación, los lechones se observaron para determinar el estado de salud general, de acuerdo con procedimientos convencionales. El muestreo de la sangre y la serología de los anticuerpos totales dirigidos contra PCV2 y anticuerpos IgM específicos de ORF2 de PCV2 se realizó de acuerdo con el procedimiento indicado anteriormente en el presente documento en el Ejemplo 2.

RESULTADOS

Al principio del estudio, todos los animales se encontraban sanos. Los resultados de la serología se resumen en la Tabla 1 (títulos expresados como log2). En el momento de la vacunación, el promedio de los títulos de anticuerpos fue relativamente alto. Después de la vacunación, ninguno de los animales mostró un aumento en el título de Ab de PCV2. A 3 y 5 semanas después de la vacunación, en los grupos ID se pudieron observar títulos de anticuerpos de PCV2 medios superiores que en el grupo IM.

30 **Tabla 1: Resultados de anticuerpo promedio**

Grupos	Título 0 wpv	Título 3 wpv	Título 5 wpv
1	8,2	7,3	6,2
2	8,3	7,0	5,9
3	8,6	6,5	5,1
4	8,4	6,2	4,3

Los resultados de la serología de IgM contra PCV2 se resumen en la Tabla 2 (títulos expresados como log2). A las tres semanas después de la vacunación, los títulos de anticuerpo de IgM de PCV2 de los dos grupos ID fueron considerablemente más altos que los del grupo IM y los del grupo de control.

35 **Tabla 2: Resultados promedio de anticuerpos de IgM contra PCV2**

Grupo	título IgM 3 wpv
1	12,7
2	8,9
3	3,4
4	1,0

40 Cuando se aplica la prueba de la suma de los rangos de Wilcoxon, los valores p para la diferencia en la respuesta de IgM para cada uno de los grupos ID (1 y 2) versus el grupo IM (3) fue menor de 0,05, viz. 0,0001 y 0,0329 respectivamente.

Ejemplo 4

45 La progenie de varias cerdas con anticuerpos contra PCV2 estuvieron disponibles para este estudio. Los lechones se dividieron por camadas en 3 grupos de 18 animales. A las 3 semanas de edad, los lechones del grupo 1 y 2 se vacunaron por vía intradérmica como se ha indicado anteriormente en el presente documento en el Ejemplo 1. Los animales del grupo 2 se vacunaron por vía intradérmica al mismo tiempo con la vacuna comercialmente disponible Porcilis® M Hyo ID Once (que contiene una bacterina M hyo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en el otro lado del cuello. Los animales del grupo 3 (grupo del control) permanecieron sin tratar. Todos los animales del estudio se observaron diariamente. Se tomaron muestras séricas en el momento de la vacunación y en semanas alternas hasta que los animales se enviaron al matadero (23-25 semanas de edad). Estas muestras se examinaron para determinar anticuerpos de PCV2.

55 Los procedimientos experimentales fueron como se indica anteriormente en el presente documento en el Ejemplo 1. En la Figura 6 se muestra la serología resultante. De esta figura es evidente que los títulos anti-PCV2 siguen

bastante por encima del nivel 4 log 2 como se establece según experimentos como los descritos en el Ejemplo 1 y se descubrió que eran protectores. No hay indicación de interferencia negativa entre las vacunas.

5 Este experimento se repitió para comprobar la protección contra el *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento. En este experimento repetido se utilizaron seis lechones. Cuarenta animales se vacunaron a la edad de 18-24 días con la vacuna Mhyo y veinte de estos animales también se vacunaron con la vacuna PCV. Veinte animales no se vacunaron y sirvieron como control del estímulo. Tres semanas después de la vacunación, todos los animales se infectaron con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae* y tres semanas después del estímulo, todos los animales se estudiaron post-mortem para determinar lesiones pulmonares. Las puntuaciones de lesión pulmonar (LLS) se compararon entre los grupos.

15 La LLS de los grupos vacunados con Porcilis® M Hyo ID Once fueron significativamente inferiores a la del grupo de control ($p < 0.05$, prueba de Dunn). No hubo diferencias significativas entre los grupos que se habían vacunado con Porcilis® M Hyo ID Once en solitario o junto con la vacuna PCV. Por tanto, se puede concluir que la vacuna combinada no tuvo efectos negativos sobre la inmunidad obtenida con Porcilis® M Hyo ID Once.

Ejemplo 5

20 En total, se formularon ocho vacunas que contenían PCV2 (250 a 6000 UA/0,2 ml), M hyo (en el mismo nivel que en Porcilis® Mhyo ID Once) y antígeno de Lawsonia (véase el documento WO 20089/127684, ejemplo 2 para los antígenos de células completas destruidas: a un nivel de aproximadamente 1×10^9 células por 0,2 ml). Las vacunas contenían diferentes adyuvantes. Algunas vacunas usaron el adyuvante existente Diluvac Forte (MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos; denominadas "DF"). Otros usaron la formulación adyuvante que se ha descrito anteriormente en el presente documento en el Ejemplo 1 (denominado "X-solve 12"), o adyuvantes formulados con los mismos constituyentes que X-solve 12, pero a la mitad de las concentraciones (denominadas "X-solve 6"), o 2½ veces las concentraciones de X-solve 12 (denominado "X-solve 30"). Las vacunas resultantes fueron las siguientes (los antígenos Mhyo y *Lawsonia* no se citan; contenido por dosis):

- 30 Grupo 1: 2000 UA PCV2/X-solve 30
- Grupo 2: 250 UA PCV2/X-solve 12
- Grupo 3: 500 UA PCV2/X-solve 12
- Grupo 4: 2000 UA PCV2/X-solve 12
- Grupo 5: 2000 UA PCV2/X-solve 6
- 35 Grupo 6: 500 UA PCV2/DF
- Grupo 7: 2000 UA PCV2/DF
- Grupo 8: 6000 UA PCV2/DF

40 En este estudio se usó la progenie de 8 cerdas. Los lechones tenían una cantidad moderada (nivel medio) de anticuerpos procedentes de la madre (MDA) contra PCV2 (promedio: 6,7 log₂). A tres/cuatro semanas de edad, los lechones de los grupos uno a ocho se vacunaron por vía intradérmica con una sola dosis, usando un vacunador IDAL®. Los lechones del grupo nueve quedaron sin vacunar. A las siete semanas después de la vacunación, todos los animales se transportaron hasta las instalaciones de estímulo. Un día después los animales se infectaron como estímulo con una cepa de estímulo de PCV2. Todos los lechones se observaron diariamente para determinar los signos clínicos.

45 Las reacciones locales se controlaron mediante palpación, desde el día de la vacunación, y cada dos días después de la vacunación hasta veintidós días después de la vacunación.

50 Se recogieron muestras de sangre de todos los animales el día de la vacunación y tres semanas después, un día antes del estímulo, 1 y 2 semanas después y en el momento de la necropsia. Las muestras de suero tomadas de cada animal se analizaron para determinar anticuerpos contra PCV2 y M hyo. Durante la necropsia, los ganglios linfáticos mesentéricos e inguinales, la amígdala y los pulmones se muestrearon para cuantificar el ácido nucleico de PCV2.

55 Los procedimientos experimentales fueron los mismos que los descritos anteriormente en el presente documento en el Ejemplo 2. La respuesta de anticuerpos de IgM de PCV2 en el momento de la vacunación estuvo por debajo del nivel de detección para todos los grupos (por debajo de 2.0 log₂). 3 semanas después de la vacunación, el título de anticuerpos de PVC fue el mayor para la vacuna 2000 UA PCV2/X-solve 30, viz. 20 log₂. Los grupos de X-solve 12, que comprenden 250, 500 y 2000 UA de antígeno de PCV2 por dosis tuvieron un título de 9, 16 y 19 log₂ respectivamente. El grupo que recibió la vacuna 2000 AU/X-solve 6 tuvieron un título de 15 log₂. Los grupos DF que comprenden 500, 2000 y 6000 UA de antígeno de PCV2 por dosis tuvieron un título de 8, 14 y 16 log₂ respectivamente. Los controles tuvieron un título por debajo del nivel de detección.

65 En este estudio, se evaluaron las reacciones sistémicas y locales. No se observaron reacciones sistémicas atribuibles a la vacunación. En lo que respecta a los efectos locales citados, no más de tres animales vacunados (que han recibido el X-solve 12 500 y 2000 UA, o DF 6000 UA PCV2 por dosis de vacuna, respectivamente) tuvieron

ligeros problemas de movilidad, el mismo número que para los animales del control. Por tanto, estas reacciones se pueden considerar razonablemente como no relacionadas con la vacunación. Con respecto a otras reacciones locales, muchos animales (entre aproximadamente 60-100 %) vacunados con X-solve mostraron reacciones locales, el tamaño promedio de las hinchazones fue menor de 3 cm, viz. entre 1-2 cm, y las hinchazones desaparecieron en un plazo de 2-6 días. Usando DF, solo aproximadamente un 30 % de los animales mostraron hinchazones locales, siendo el tamaño medio menor de 0,5 cm, y desaparecieron en el plazo de un día.

En las figuras 7 y 8, la carga vírica de los órganos (promediada) se representa gráficamente para las diversas vacunas. Parece que todas las vacunas son capaces de reducir sustancialmente (en estos casos, al menos 3 unidades logarítmicas) la carga vírica en los órganos relevantes.

En este estudio, pareció que todos los adyuvantes utilizados eran seguros, indujeron una respuesta de IgM contra PCV2 y fueron capaces de tratar un animal contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2 patógeno. No se descubrió interferencias negativas entre los diversos antígenos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende una proteína ORF2 expresada de forma recombinante del circovirus porcino de tipo 2 para su uso en el tratamiento profiláctico de un animal que tenga en su circulación anticuerpos dirigidos contra el circovirus porcino de tipo 2, contra una infección por el circovirus porcino de tipo 2 patógeno mediante la administración de una única dosis de la vacuna en la dermis del animal.
- 10 2. Vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la administración en una sola dosis comprende menos de 0,5 ml de la vacuna.
- 15 3. Vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la vacuna se administra con un dispositivo de vacunación sin agujas.
- 20 4. Vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el animal, en el momento de administración, tiene anticuerpos en circulación en un título de 7 log₂ o superior.
- 25 5. Vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la vacuna comprende un inmunógeno no vivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* para tratar al animal contra una infección por bacterias patógenas de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 30 6. Vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la vacuna comprende un inmunógeno no vivo de *Lawsonia intracellularis* para tratar al animal contra una infección por bacterias patógenas de *Lawsonia intracellularis*.
7. Vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la vacuna comprende un adyuvante que comprende aceite mineral, caracterizada porque la cantidad de aceite mineral en la vacuna está comprendida entre el 1 y el 10 % v/v.
8. Vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada porque** la cantidad de aceite mineral está comprendida entre el 2,5 y el 5 % v/v.

Figura 1

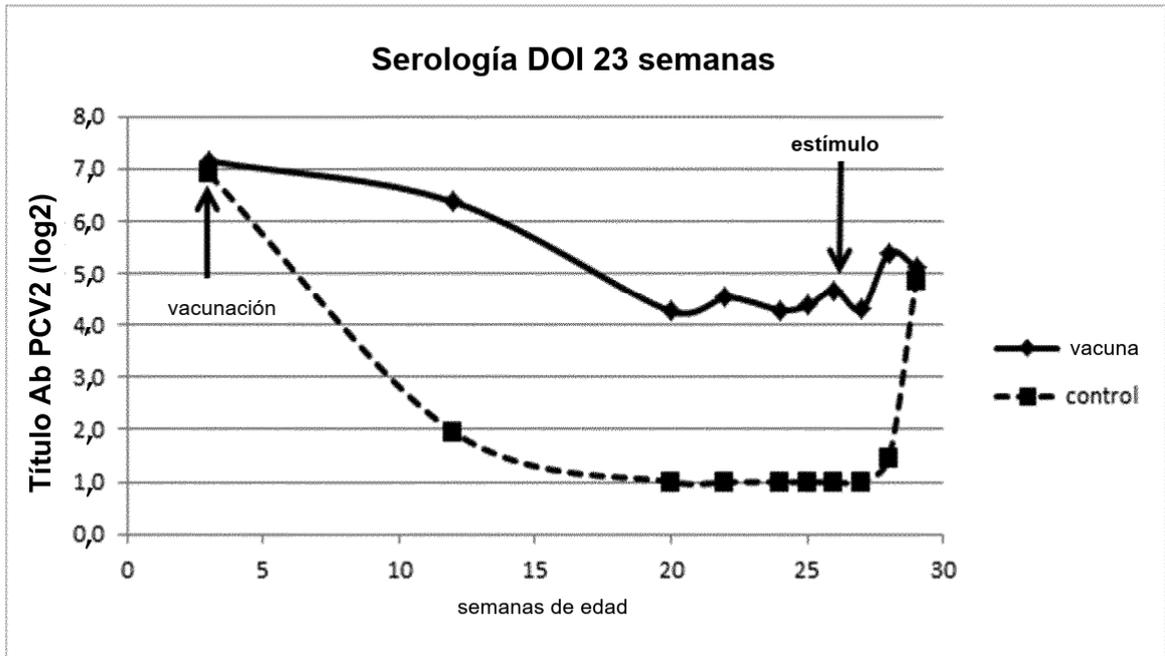


Figura 2

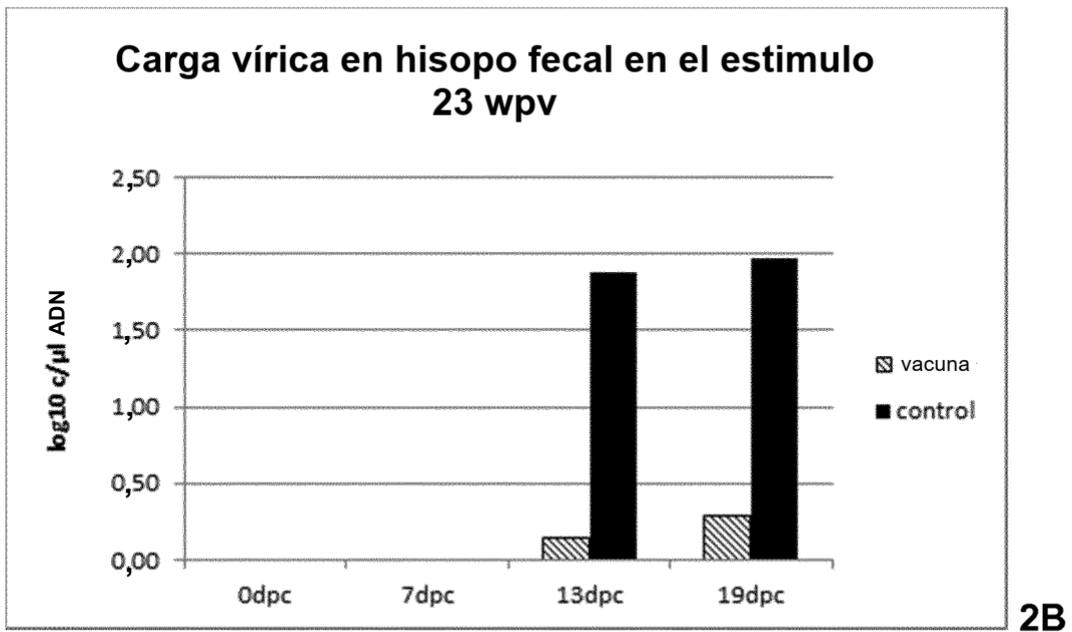
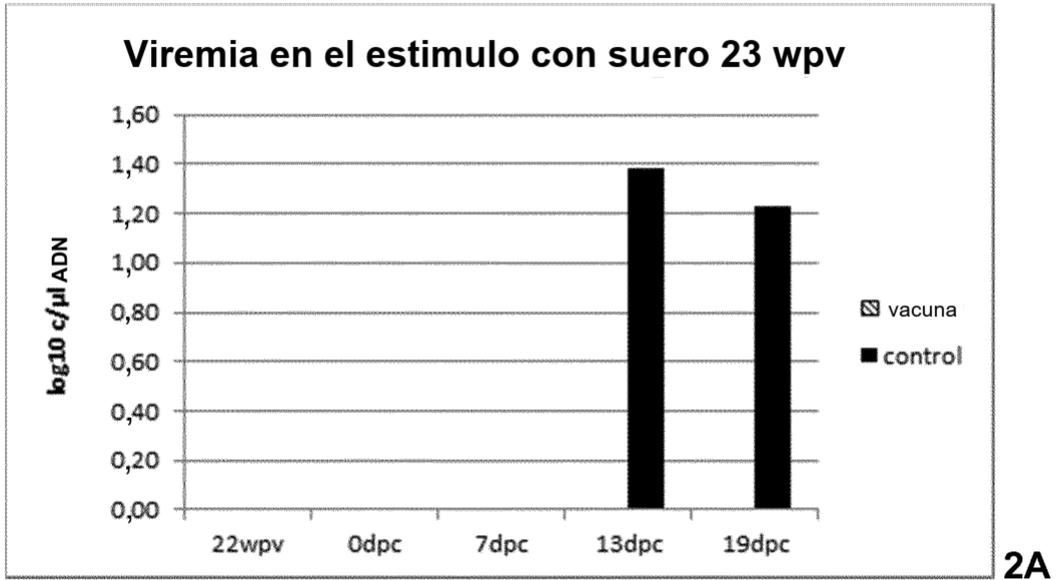
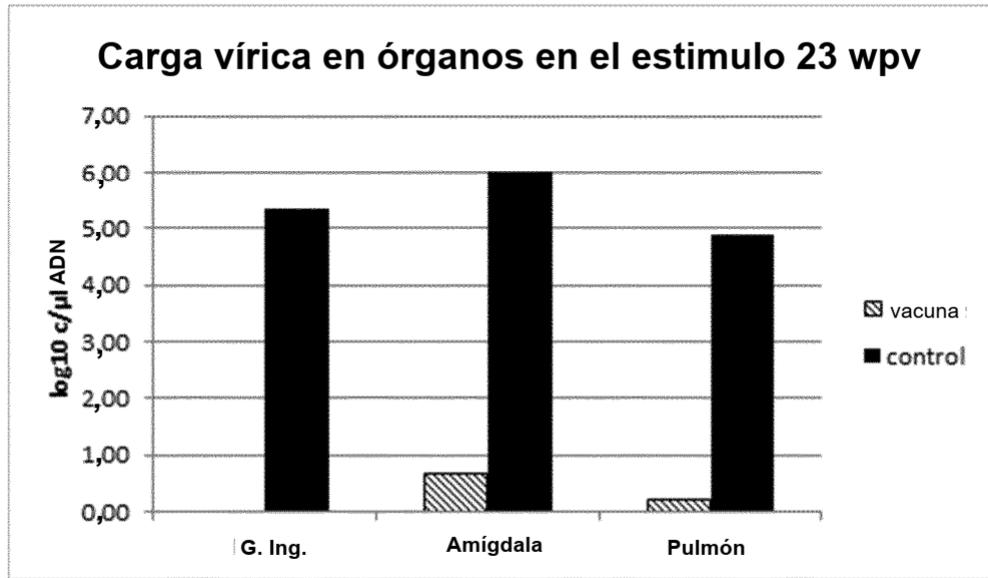


Figura 2 Continuación



2C

Figura 3

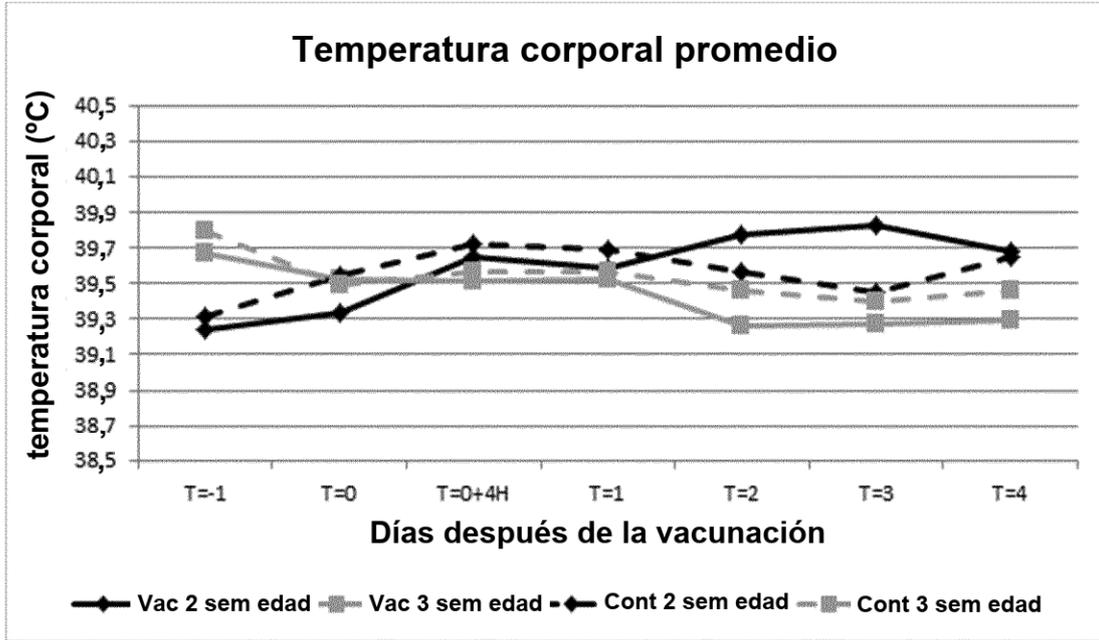


Figura 4

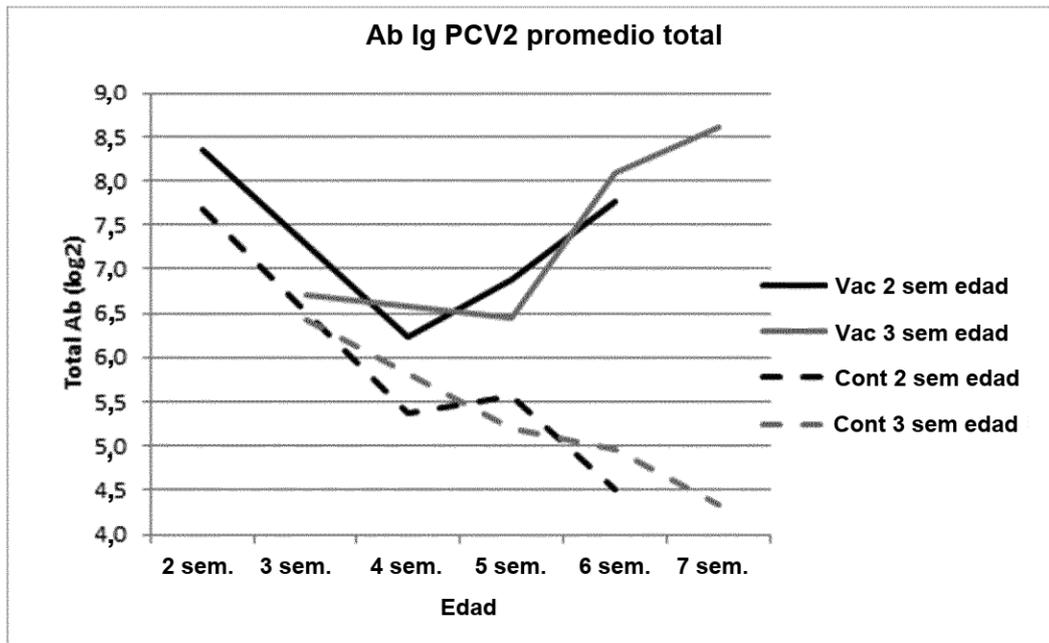


Figura 5

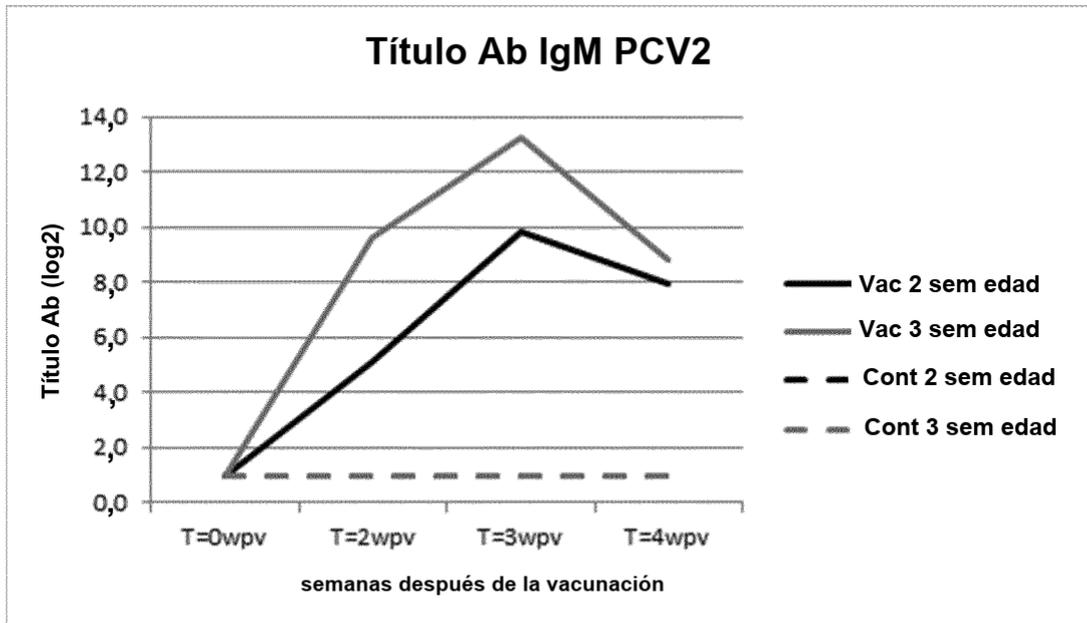


Figura 6

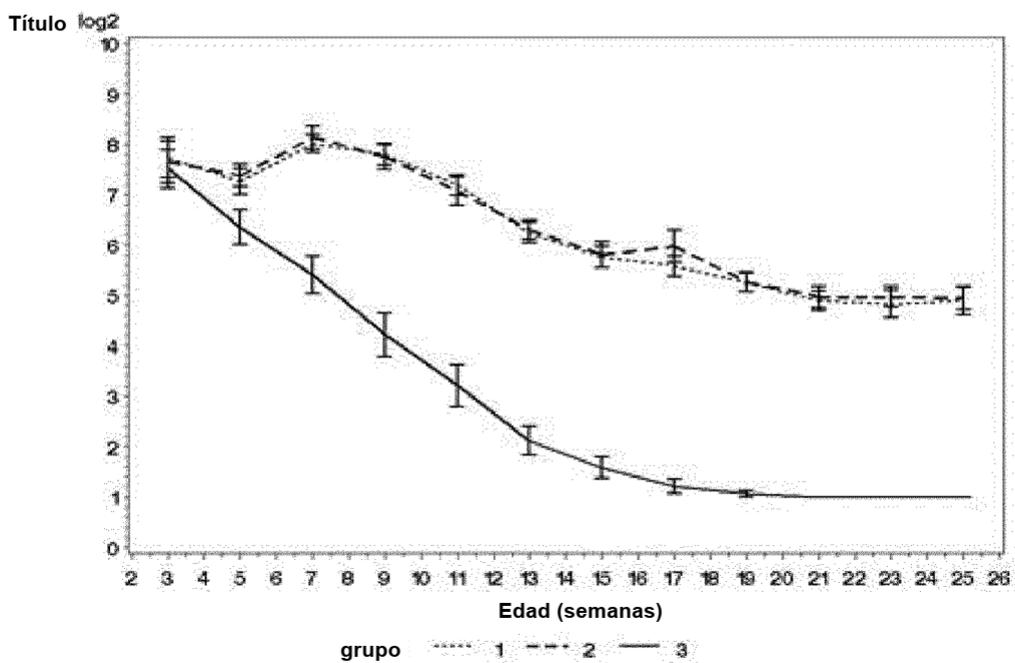


Figura 7

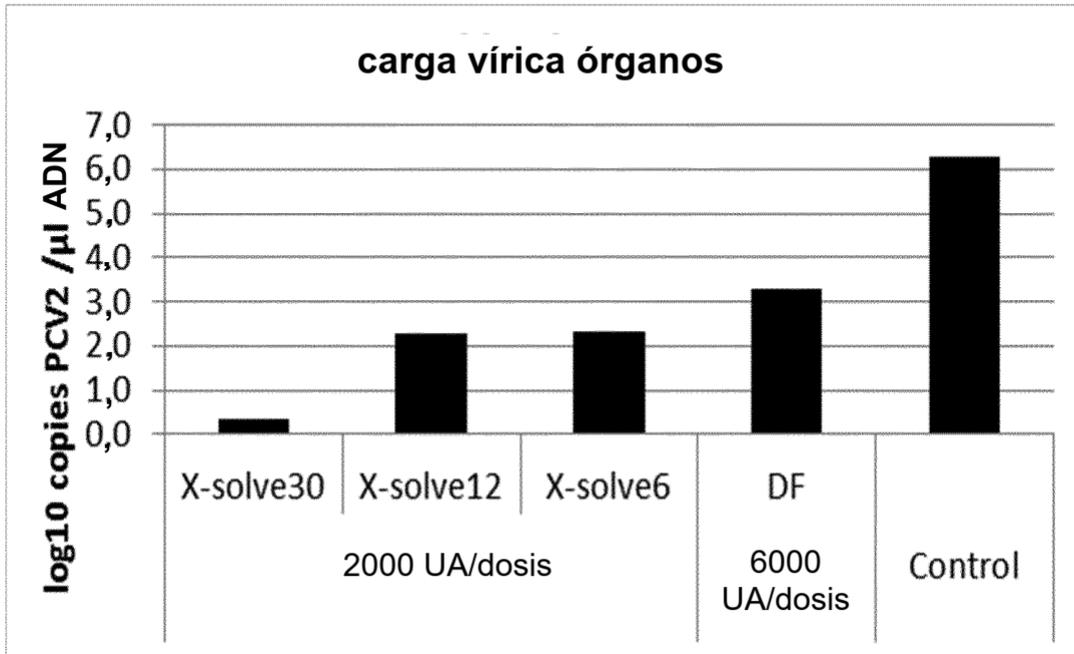


Figura 8

