



PT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

10-54267

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: VACUNA VIVA AVIRULENTA DE MYCOPLASMA
HYOPNEUMONIAE CON ADYUVANTE

SOLICITANTE: WYETH LLC

DIRECCIÓN: Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 6 de mayo de 2010

P2010/000061

Podio C

06-06-2010
Nº 446

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOU

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-054267 - 00000-0000

Fecha: 2010-05-06 16:36:06
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 109



PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2010/000061

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: WYETH LLC

Dirección Five Giralda Farms Madison, NJ
07940 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8ª-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/082454

Fecha Noviembre 5, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/061798

Fecha May 14 2009

6

Título (54) VACUNA VIVA AVIRULENTA DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE
CON ADYUVANTE

Clasificación Internacional (51) A61K 39/02, C07K 14/30

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Noviembre 6, 2007

(31) Número de Solicitud

60/985,811

9

Comprobante de pago No. 10-

Fecha Mayo 5 de 2010



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



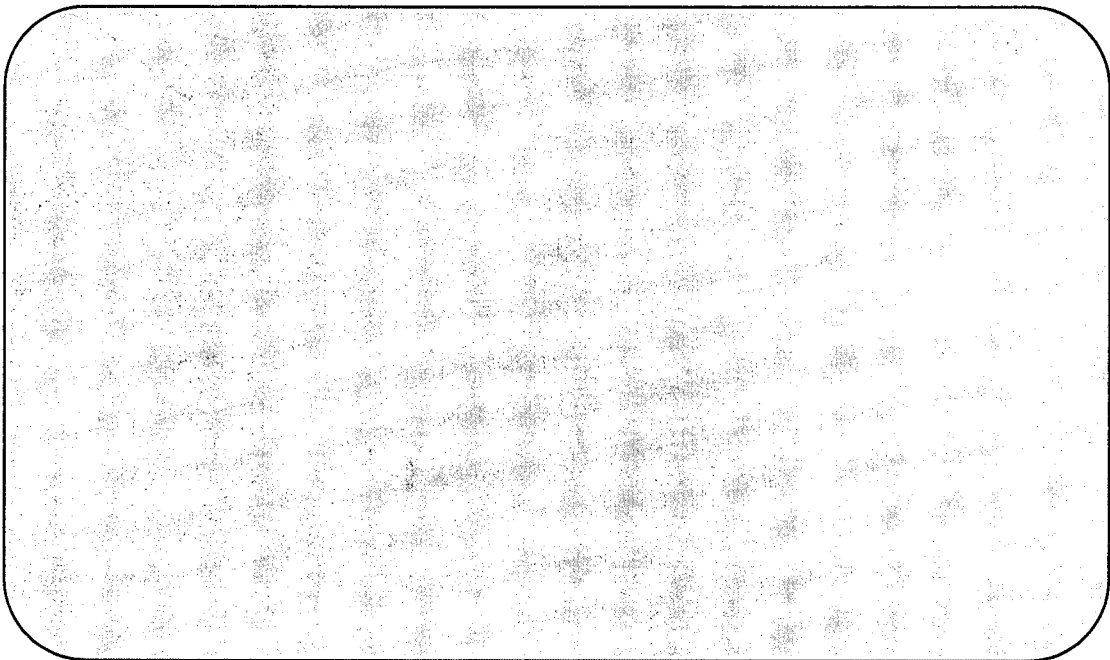
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. *Formulario PCT/IB1306.*



Otros. Búsqueda Internacional

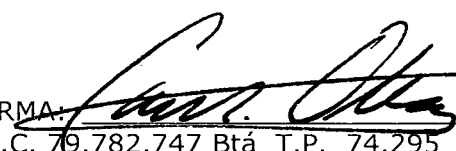


FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2008/082454

3

**Hsien-Jue CHU,
15671 Cedar Lane,
Bonner Springs,
Kansas 66012
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense**

**XU, Zhichang
2920 18th Avenue North,
Fort Dodge, Oiwa 50501
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense**

**Wumin LI,
1519 Knollcrest Drive,
Fort Dodge, Iowa 50501
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense**

**Nicole Rae GIBSON,
1645 220th Street,
Hombolt, Iowa 50548
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 35,519
FECHA : MAYO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-054267- -00000-0000

Fecha: 2010-05-06 16:36:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 109

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	6238665	05/05/2010	4,158,000.00
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	174686676	05/05/2010	706,000.00
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	174686680	05/05/2010	1,412,000.00
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	174695205	05/05/2010	706,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 May 2009 (14.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/061798 A1

- (51) International Patent Classification:
A61K 39/02 (2006.01) C07K 14/30 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2008/082454
- (22) International Filing Date:
5 November 2008 (05.11.2008)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/985,811 6 November 2007 (06.11.2007) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): CHU, Hsien-Jue
[US/US]; 15671 Cedar Lane, Bonner Springs, Kansas 66012 (US). XU, Zhichang [US/US]; 2920 18th Avenue North, Fort Dodge, Iowa 50501 (US). LI, Wumin [US/US]; 1519 Knollcrest Drive, Fort Dodge, Iowa 50501 (US). GIBSON, Nicole, Rae [US/US]; 1645 220th Street, Hombolt, Iowa 50548 (US).
- (74) Agent: MALLON, Veronica; Wyeth, Patent Law Department, Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report

(54) Title: MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE AVIRULENT -ADJUVANTED LIVE VACCINE

(57) Abstract: Provided are immunogenic and vaccine compositions and methods for their preparation and use, which compositions are effective in protecting against, minimizing the severity of, preventing, and/or ameliorating M. hyopneumoniae infection. Administration to an animal of one or two doses of an adjuvanted live avirulent M. hyopneumoniae composition disclosed herein is effective in providing immunity to the animal and protection from infection with a virulent strain of M. hyopneumoniae thereby reducing the severity of and/or preventing disease caused by one or more virulent strain of M. hyopneumoniae. Also provided are compositions, which further comprise one or more antigen such as, for example, one or more live bacteria, bacterin, toxoid, and/or virus and/or viral antigen. Exemplified are immunogenic compositions, comprising an adjuvanted live avirulent M. hyopneumoniae and compositions, comprising Porcine Circovirus Type 1-Type 2 chimera modified live vaccine (cPCV1-2) in further combination with an adjuvanted live avirulent M. hyopneumoniae.

WO 2009/061798 A1

MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE AVIRULENT ADJUVANTED LIVE VACCINE

FIELD OF THE INVENTION

The present disclosure relates generally to the fields of immunology and veterinary medicine. More specifically, the present disclosure provides adjuvanted live avirulent *M. hyopneumoniae* compositions based on a J strain of *M. hyopneumoniae*, including immunogenic or vaccine compositions, which aid in reducing the severity of and/or in preventing disease caused by one or more virulent strain of *M. hyopneumoniae*. Also provided are adjuvanted live avirulent *M. hyopneumoniae* compositions, including immunogenic or vaccine compositions, further comprising Porcine Circovirus Type 1-Type 2 chimera modified live vaccine (cPCV1-2). One or two-dose administration to an animal of an adjuvanted live avirulent *M. hyopneumoniae* composition disclosed herein is effective in providing immunity, including cell-mediated immunity and/or humoral immunity, from infection with a virulent strain of *M. hyopneumoniae*.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Mycoplasma hyopneumoniae (also referred to as *M. hyopneumoniae*) is the etiologic agent of swine mycoplasmal pneumonia. The disease causes a chronic cough, dull hair coat, retarded growth and unthrifty appearance lasting several weeks. Characteristic lesions of purple to gray areas of consolidation, particularly in ventral apical and cardiac lobes are observed in infected animals. Although the disease causes little mortality, affected swine are often prone to secondary infections by opportunistic pathogens, resulting in death or stress. (R. F. Ross, Mycoplasmal diseases, pp. 436-444, in A. D. Laman, *et al.*, (eds.) Diseases of Swine, Iowa State University Press, 1986).

The disease is believed to be one of the most important causes of disease-associated loss in swine (Whittlestone, pp. 133-176, in Tully and Whitcomb (eds.), The Mycoplasma Vol 2: Human and Animal Mycoplasmas, New York, Academic Press, (1979)). The disease generally results in inefficient weight gainers, and in stunted and sickly animals. Also, affected swine are often prone to secondary infection by opportunistic organisms (Burch, Pig America pp. 26-27, December, 1982). The economic impact of the disease is significant. Economic losses alone have been estimated at between 200 to 250 million dollars annually.

Mycoplasma hyopneumoniae is a slow growing, fastidious bacterium that lacks a cell wall. It is frequently difficult to isolate from the respiratory tract due to *Mycoplasma hyorhinis*, a common secondary agent also located in the respiratory tract. The disease is spread by aerosol, produced by coughing, and by direct contact from an affected or

convalescent carrier swine. Mingling of infected animals and uninfected animals results in early and frequent reinfection. Infection frequently starts with infection of piglets by carrier sows at farrowing.

Due to herd management techniques, infection may not become evident until later in life. Additional infection usually is observed after weaning when pigs are pooled. Overt disease is normally observed in pigs at six weeks of age or older. Growth rates and feed conversion rates are markedly reduced in affected animals. Existing treatments using antibiotics are expensive and require prolonged use. Animal reinfection remains a problem.

Thus, vaccines are presently the most effective method for avoiding infections and their consequences. There have been numerous attempts to provide a vaccine for protecting swine against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Several investigators have disclosed vaccines comprising recombinantly produced surface antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae*, Schaller et al., U.S. Patent No. 4,894,332, issued Jan. 16, 1990; European Patent Publication No. 283,840, published Sep. 28, 1988. PCT Publication No. WO 86/00019, published Jan. 3, 1986, discloses a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine comprising exclusively *Mycoplasma hyopneumoniae* plasma membranes, free of other cell components. Etheridge et al., Res. Vet. Sci. 33:188 (1982), found incomplete protection against lung colonization by *Mycoplasma hyopneumoniae* when a live vaccine was given intravenously, subcutaneously, or intraperitoneally. Kristensen et al., Am. J. Vet. Res. 42:784 (1981), found no protection of swine against mycoplasmal pneumonia after injection with heat-inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae*. Ross et al., Am. J. Vet. Res. 45:1899 (1984), found that use of *Mycoplasma hyopneumoniae* extracts prepared by a freeze-thaw procedure to immunize swine, provided only variable protection, and in some instances, enhanced lesion development was noted in immunized swine. These investigators also studied a whole-cell vaccine prepared by formalin inactivation. Formalin inactivation significantly hindered the protective immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae*, and this vaccine was not effective. Yoshioka et al., U.S. Patent No. 3,917,819 (issued Nov. 4, 1975) discloses several killed *Mycoplasma* vaccines comprising *Mycoplasma* inactivated with formalin, including an inactivated vaccine for *Mycoplasma hyopneumoniae*. Chung-Nan European Patent Publication 571,648 disclosed an *M. hyopneumoniae* vaccine based on the highly proliferative and antigenic strain PRIT-5.

Vaccines based on inactivated virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strains are commercially available. Fort Dodge Animal Health (FDAH) markets *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin under the name Suvaxyn® and Respifend® *Mycoplasma hyopneumoniae* for use as a vaccine to protect healthy swine against clinical signs caused

by *Mycoplasma hyopneumoniae*. This bacterin vaccine is recommended as a two-dose vaccine for pigs at least one-week old, with the second dose two to three weeks after the first vaccination.

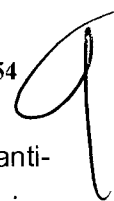
The *M. hyopneumoniae* J strain is a non-pathogenic strain with reduced capacity to adhere to porcine cilia and, therefore, to cause disease. Castro *et al.*, *Veterinary Microbiology* 116:258-269 (2006) and Vasconcelos *et al.*, *J. Bacteriol.* 187(16):5568-5577 (2005) (describing the complete genome sequence of *M. hyopneumoniae* J strain (ATCC 25934)). Genomic comparisons between pathogenic and nonpathogenic strains (J strain) have revealed variations in surface proteins, including cilium adhesin, that are believed to be determinative of relative pathogenic properties between *M. hyopneumoniae* strains. Vasconcelos *et al.* (2006) and Djordjevic *et al.*, *Infection and Immunity* 72(5):2791-2802 (2004).

M. hyopneumoniae expresses, on its cell surface, membranous lipoproteins, particularly the P46, P65, and P97 proteins, which carry species-specific antigenic determinants. Recently, Bouh *et al.* described monoclonal antibodies to P46 and P65 of live avirulent *M. hyopneumoniae* reference J strain ATCC 25934. *Clin. Diag. Lab. Immunology* 10(3):459-468 (2003). Blank and Stemke described a physical and genetic map of *M. hyopneumoniae* strain J genome, *Can. J. Microbiol.* 46:832-840 (2000), and Wilton *et al.* described the screening of expression libraries generated from the non-pathogenic *M. hyopneumoniae* J strain and the screening of those libraries with porcine hyperimmune antiserum against *M. hyopneumoniae*.

There is a need for compositions, including immunogenic or vaccine compositions, made from live adjuvanted avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae*, which compositions provide efficacy against virulent strains of *M. hyopneumoniae*. The citation of any reference herein should not be deemed as an admission that such reference is available as prior art to the instant invention.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present disclosure provides compositions, including immunogenic compositions or vaccine compositions, comprising an immunologically effective amount of a live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* and a biologically acceptable adjuvant. Compositions disclosed herein elicit an immune response against *Mycoplasma hyopneumoniae*, thereby preventing and/or minimizing the severity of disease caused by this organism or ameliorating at least one symptom associated with the disease.



Accordingly, in one aspect, the invention provides a composition for eliciting an anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* immune response in an animal, said composition comprising an immunologically effective amount of a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a biologically acceptable adjuvant.

5 In one embodiment, the composition comprises a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* whose genome comprises a nucleic acid sequence having at least about 90% homology to the nucleic acid sequence of a reference J strain.

In one embodiment, the composition comprises a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* whose genome comprises a nucleic acid sequence having at least about
10 95% homology to the nucleic acid sequence of a reference J strain.

In one embodiment, the composition comprises a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* whose genome comprises a nucleic acid sequence having at least about 99% homology to the nucleic acid sequence of a reference J strain.

In one embodiment, the composition comprises a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* that has at least about 70% polymorphic identity to a reference J strain.
15

In one embodiment, the composition comprises a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* that has at least about 85% polymorphic identity to a reference J strain.

In one embodiment, the composition comprises a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* that has at least about 95% polymorphic identity to a reference J strain.

20 In one embodiment, the percent homology of the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* used in the compositions described herein are determined by comparison to an avirulent reference J strain having ATCC accession number 25934 (GenBank Accession Number AE017243) or 27715. In other certain embodiments, the reference strain may be a strain that is a virulent strain, for example, those having ATCC accession numbers 25617 or
25 25095.

In one embodiment, the percent polymorphic identity of the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* used in the compositions described herein are determined by comparison to an avirulent reference J strain having ATCC accession number 25934 or 27715. In other certain embodiments, the reference strain may be a strain that is a virulent
30 strain, for example, those having ATCC accession numbers 25617 or 25095.

In one embodiment, the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* used in the compositions described herein is a J strain designated as ATCC accession number 25934 or 27715.

In one embodiment, the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* used in the
35 compositions described herein is a J strain designated as ATCC accession number 27715.

In one embodiment, the immune response elicited by a live-avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* protects an animal against infection with, or reduces the severity of at least one symptom associated with an infection by a virulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae*.

5 In one embodiment, one-dose administration to an animal of an adjuvanted live avirulent *M. hyopneumoniae* composition disclosed herein is effective in providing immunity to the animal from *Mycoplasma* infection.

10 In one embodiment, two-dose administration to an animal of an adjuvanted live avirulent *M. hyopneumoniae* composition disclosed herein is effective in providing immunity to the animal from *Mycoplasma* infection.

Adjuvanted live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine compositions disclosed herein may be suitably employed for use in swine against infection and disease caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* and will find utility in managing and/or preventing the spread of infection and disease caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine populations.

15 Thus, immunogenic compositions and vaccine compositions of the present disclosure employ one or more live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* in combination with one or more adjuvant such as a biologically acceptable adjuvant. The biologically acceptable adjuvant may, optionally, be one or more adjuvant(s) selected from the group consisting of SP-Oil, SL-CD, an acrylic acid polymer (such as Carbopol®, Noveon, Inc., Cleveland, OH),
20 and a mixture of a metalizable oil such as one or more unsaturated terpene hydrocarbon(s), for example squalene or squalane, and a polyoxyethylene-polypropylene block copolymer such as Pluronic® (BASF, Florham Park, New Jersey).

The concentration of adjuvant employed in the compositions described herein will depend upon the nature of the adjuvant. Adjuvants are typically present in the compositions described herein at a final concentration of about 1-50% (v/v) and more typically at a final
25 concentration of about 10%, 15%, 20%, 25%, or 30% (v/v). In compositions comprising SP-Oil, the adjuvant is typically present at between about 1% and about 25% (v/v), more typically between about 5% and about 15% (v/v) such as, for example, at about 10% (v/v). In compositions comprising an acrylic acid polymer and a mixture of a metabolizable oil that
30 comprises one or more terpene hydrocarbon(s) and a polyoxyethylene-polypropylene block copolymer, the ratio of acrylic acid polymer to metabolizable oil/polyoxyethylene-polypropylene block copolymer mixture is typically in a ratio of between about 1:25 and about 1:50 and typically at a final concentration of between about 1% and about 25% (v/v).

In one embodiment, the biologically acceptable adjuvant comprises SP-Oil. In one
35 embodiment, the SP-Oil is present at a concentration of between about 1% and about 25%

v/v. In one embodiment, the SP-Oil is present at a concentration of between about 5% and about 15% v/v. In one embodiment, the SP-Oil is present at a concentration of about 10% v/v.

Within certain embodiments, compositions disclosed herein may employ, in further combination, one or more other live bacteria, bacterin, toxoid, and/or viral antigen. Thus, within certain aspects of these embodiments, the adjuvanted live avirulent *M. hyopneumoniae* composition may comprise an immunologically effective amount of live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* and one or more biologically acceptable adjuvant(s) in further combination with (a) one or more live bacteria; (b) one or more bacterin; (c) one or more purified toxoid from one or more pathogens such as, for example, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* and leptospira bacteria; and/or (d) one or more viral antigen wherein the virus is selected from the group consisting of swine influenza virus (SIV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), raccoon poxvirus expressing PRRS and/or other antigens, TGEV expressing PRRS and/or other antigens, and porcine circovirus (PCV). Within certain aspects of these embodiments, exemplified herein are compositions, including immunogenic compositions or vaccine compositions, which employ, in further combination, Porcine Circovirus Type 1-Type 2 chimera modified live vaccine (cPCV1-2). Within these or alternative embodiments, compositions, including immunogenic or vaccine compositions, may additionally or optionally include a preservative and stabilizer such as, for example, SGGK, thimerosol and/or EDTA.

The concentration of such other live bacteria, bacterin, toxoid, and/or viral antigen employed in the compositions described herein will depend upon the nature of the live bacteria, bacterin, toxoid, and/or viral antigen and are typically present in the compositions described herein. For such compositions wherein the other antigen is bacterial, the bacteria are typically present at a final concentration of between about 0.5×10^5 to 0.5×10^{10} per milliliter. Alternatively, the bacteria are present at a final concentration of between about 0.5×10^6 to 0.5×10^9 per milliliter or at a final concentration of between about 0.5×10^7 to 0.5×10^8 per milliliter.

A second aspect of the invention provides methods for generating an immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae*, or for protecting an animal against disease caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or for preventing or ameliorating an outbreak of such disease among animal populations by administering an adjuvanted live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* composition as described herein. In a related aspect, the

present disclosure also provides methods for enhancing an immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Such methods comprise the steps of administering to an animal, such as swine, in one or two doses, a composition comprising one or more adjuvanted live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain.

5 In one embodiment the methods of the present invention use a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* whose genome comprises a nucleic acid sequence having about 90% homology to the nucleic acid sequence of a reference J strain.

In one embodiment the methods of the present invention use a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* whose genome comprises a nucleic acid sequence having
10 about 95% homology to the nucleic acid sequence of a reference J strain.

In one embodiment the methods of the present invention use a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* whose genome comprises a nucleic acid sequence having about 99% homology to the nucleic acid sequence of a reference J strain.

In one embodiment the methods of the present invention use a live avirulent strain of
15 *Mycoplasma hyopneumoniae* that has at least about 70% polymorphic identity to a reference J strain.

In one embodiment the methods of the present invention use a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* that has at least about 85% polymorphic identity to a reference J strain.

20 In one embodiment, the methods of the present invention use a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* that has at least about 95% polymorphic identity to a reference J strain.

In one embodiment, the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* used in the methods of the invention, as described herein, is a J strain designated as ATCC accession
25 number 25934 or 27715.

In one embodiment, the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* used in the methods of the invention, as described herein, is a J strain designated as ATCC accession number 27715.

In one embodiment, the invention provides a method for enhancing an immune
30 response to *Mycoplasma hyopneumoniae*, the method comprising the steps of:

- a) at a first time, administering a first immunogenic composition comprising an immunologically effective amount of a live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain adjuvanted with a biologically acceptable adjuvant material to an animal;

3

b) at a second time, administering a second immunogenic composition comprising an immunologically effective amount of a live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* adjuvanted with a biologically acceptable adjuvant material to an animal.

In certain embodiments, depending upon the precise application contemplated, compositions may be administered parenterally, such as through intramuscular, subcutaneous, or intraperitoneal injection, or by topical application of a cream. Alternatively, compositions may be administered through aerosol, intranasal, or oral routes, such as by intranasal spray or oral administration by hand delivery or mass application.

A third aspect of the invention provides use of the *Mycoplasma hyopneumoniae* strains described herein and compositions comprising these strains for preparation of a medicament for treating an animal suffering from an infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* or suffering from at least one symptom associated with an infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*.

These and other embodiments, features and advantages of the invention will become apparent from the detailed description and the appended claims set forth herein below. All patents, patent applications, and other literature cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety. In the case of inconsistencies, the present disclosure will prevail.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Before the present methods and treatment methodology are described, it is to be understood that this invention is not limited to particular methods, and experimental conditions described, as such methods and conditions may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for purposes of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting.

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, references to "the method" includes one or more methods, and/or steps of the type described herein and/or which will become apparent to those persons skilled in the art upon reading this disclosure and so forth.

Accordingly, in the present application, there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985);



Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, the preferred methods and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

DEFINITIONS

The terms used herein have the meanings recognized and known to those of skill in the art, however, for convenience and completeness, particular terms and their meanings are set forth below.

The term "about" or "approximately" means within a statistically meaningful range of a value. Such a range can be within an order of magnitude, typically within 50%, more typically within 20%, more typically still within 10%, and even more typically within 5% of a given value or range. The allowable variation encompassed by the term "about" or "approximately" depends on the particular system under study, and can be readily appreciated by one of ordinary skill in the art.

"Adjuvant" means a composition comprised of one or more substances that enhances the antigenicity of live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* in a composition, typically a vaccine composition. An adjuvant can serve as a tissue depot that slowly releases the antigen and also as a lymphoid system activator that non-specifically enhances the immune response (Hood, *et al.*, *Immunology, Second Ed.*, Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. p. 384). Often, a primary vaccination with an antigen alone, in the absence of an adjuvant, will fail to elicit a humoral or cellular immune response. Adjuvants include, but are not limited to, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil or hydrocarbon emulsions, keyhole limpet hemocyanins, and potentially useful human adjuvants such as N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine, BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*. Preferably, the adjuvant is biologically acceptable.

6

Adjuvants employed in the compositions described herein are typically "biologically acceptable adjuvants" and, thus, may be used in combination with live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* such that the resulting compositions may be administered *in vivo* without concomitant toxicity to an animal. Exemplified herein are compositions including live
5 avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* in combination with one or more biologically acceptable adjuvant selected from the group consisting of SP-Oil, SL-CD, Carbopol, and a mixture of a metabolizable oil such as one or more unsaturated terpene hydrocarbon(s), for example squalene or squalane, and a polyoxyethylene-polypropylene block copolymer such as Pluronic®.

10 A live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain or molecule therefrom is "antigenic" when it is capable of specifically interacting with an antigen recognition molecule of the immune system, such as an immunoglobulin (antibody) or T cell antigen receptor. Typically, an antigenic molecule is a polypeptide, or variant thereof, which contains an
15 "epitope" of at least about five and typically at least about 10 amino acids. An antigenic portion of a polypeptide, also called herein the "epitope," can be that portion that is immunodominant for antibody or T cell receptor recognition, or it can be a portion used to generate an antibody to the molecule by conjugating the antigenic portion to a carrier polypeptide for immunization. A molecule that is antigenic need not be itself immunogenic, *i.e.*, capable of eliciting an immune response without a carrier.

20 The term "at least" means not less than.

As used herein, a "bacterin" is a bacterium harvest that has been inactivated and that, in combination with certain adjuvants, can elicit protective immunity to protect against disease or infection when administered to animals.

25 Acrylic acid polymers are typically carbomers. Carbomers are commercially available under the trade name "Carbopol" and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 2,909,462 and 3,790,665, each of which is incorporated herein by reference.

The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, stabilizer, preservative, and/or vehicle with which a compound or composition is administered. Such carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or
30 synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water or aqueous solution saline solutions, for example, phosphate-buffered saline, Ringer's solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are frequently employed as carriers, particularly for injectable solutions. The carrier or diluent must be non-toxic and must not affect the biological activity of the antigen/immunogen. Other additional auxiliary substances,
35 such as wetting or emulsifying agents, surfactants, pH buffering sbstances and the like may

also be used in the compositions of the invention. Preservatives may include, for example, thimerosal and/or EDTA. Suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin, 18th Edition. A wide variety of carriers are well known in the art, and the selection of specific carriers is well within the level of those skilled in the art.

The term "colony forming unit" or "CFU" is a unit of measure used to indicate the number of organisms capable of replication in a given sample. This is based on the theory that a colony is derived from the replication of a pair/cluster or single cell of bacteria.

The "immunologically effective amount" is the amount of live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* that will elicit an immune response against *Mycoplasma hyopneumoniae*. The "immunologically effective amount" will depend upon the species, breed, age, size, health status of the recipient animal and will be influenced by the previous exposure of the animal to one or more strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* whether that one or more strain is a virulent strain or an avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae*. As used herein, an "immunologically effective amount" of live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae*, when employed in combination with a suitable adjuvant, is that amount of *Mycoplasma hyopneumoniae* that is sufficient to enhance the immunogenicity of the live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* and thus provides for protective immunity against challenge with a virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. In one embodiment, an immunologically effective amount is a minimum of about 1×10^3 organisms. In one embodiment, an immunologically effective amount ranges from about 1×10^3 colony forming units/ml (CFU/ML) to about 1×10^{11} CFU/ML. In one embodiment, an immunologically effective amount is about 5×10^7 CFU/ML.

As used herein, the term "immunogenic" means that the live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* is capable of eliciting a humoral and/or cellular immune response. An immunogenic strain is also antigenic. An immunogenic composition is a composition that elicits a humoral and/or cellular immune response when administered to an animal.

The term "immunogenic composition" relates to any pharmaceutical composition containing an antigen, eg. a microorganism, which composition can be used to elicit an immune response in a mammal. The immune response can include a T cell response, a B cell response, or both a T cell and B cell response. The composition may serve to sensitize the mammal by the presentation of antigen in association with MHC molecules at the cell surface. In addition, antigen-specific T-lymphocytes or antibodies can be generated to allow for the future protection of an immunized host. An "immunogenic composition" may contain a live, attenuated, or killed/inactivated vaccine comprising a whole microorganism or an

immunogenic portion derived therefrom that induces either a cell-mediated (T cell) immune response or an antibody-mediated (B cell) immune response, or both, and may protect the animal from one or more symptoms associated with infection by the microorganism, or may protect the animal from death due to the infection with the microorganism.

5 As used herein, the term "isolated" means that the referenced material is removed from its native environment. Thus, an isolated biological material can be free of some or all cellular components, *i.e.*, components of the cells in which the native material occurs naturally (*e.g.*, cytoplasmic or membrane component). A material is isolated if it is present in a cell extract or supernatant. An isolated protein may be associated with other proteins or
10 nucleic acids, or both, with which it associates in the cell, or with cellular membranes if it is a membrane-associated protein. An isolated organelle, cell, or tissue is removed from the anatomical site in which it is found in an organism. An isolated material may be, but need not be, purified.

As used herein, the term "MHDCE" designates *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA cell
15 equivalents and is defined as a unit of measure used to determine the approximate number of *Mycoplasma hyopneumoniae* organisms present in a given sample.

The term "parenteral administration" as used herein means administration by some other means than through the gastrointestinal tract, particularly to the introduction of substances into an organism by intravenous, subcutaneous, intramuscular, or intramedullary
20 injection, but also to other non-oral and non-nasal routes of administration such as intraperitoneal injection or topical application.

The term "polymorphic identity to a reference J strain" refers to similarity between the protein expression profile of one non-J strain *Mycoplasma hyopneumoniae* to a reference J strain of *Mycoplasma hyopneumoniae*. The polymorphic identity may be based on one or
25 more characteristics of one or more proteins, including, but not limited to, for example, the amount or size of one or more proteins of the *Mycoplasma hyopneumoniae* microorganism under investigation, to the sedimentation rate of one or more proteins, or to changes in the physical or biochemical characteristics of one or more proteins. The term may also include similarity between the nucleotide sequences that encode any one or more proteins of one
30 non-J strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a reference J strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* and includes any mutations in these sequences, including deletions or substitutions. The change in the nucleotide or amino acid sequence is one that allows for retention of the avirulent nature of the *Mycoplasma hyopneumoniae* organism. A wide variety of assays for observing perturbations in nucleotide and amino acid sequences are
35 well known in the art. For example, the size and structure of nucleic acid or amino acid

sequences are observed by the Northern, Southern, Western, SDS-PAGE ELISA profiling, PCR and DNA sequencing protocols as known to those skilled in the art (see, e.g. Calus, D. *et al.* Veterinary Microbiology, Vol. 120, Issues 3-4, March 10, 2007, pages 284-291; Scarman, AL, *et al.* Microbiology (1997), Vol. 143: 663-673). In addition, other methods for observing perturbations in nucleotide and amino acid sequences such as single strand conformation polymorphism analysis are well known in the art (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,382,510 issued 7 Sep. 1999, and U.S. Pat. No. 5,952,170 issued 17 Jan. 1995).

The term "purified" as used herein refers to material that has been isolated under conditions that reduce or eliminate the presence of unrelated materials, *i.e.*, contaminants, including native materials from which the material is obtained. For example, a purified bacteria or protein is typically substantially free of host cell or culture components, including tissue culture or egg proteins, non-specific pathogens, and the like. As used herein, the term "substantially free" is used operationally, in the context of analytical testing of the material. Typically, purified material substantially free of contaminants is at least 50% pure; more typically at least 90% pure, and more typically still at least 99% pure. Purity can be evaluated by chromatography, gel electrophoresis, immunoassay, composition analysis, biological assay, and other methods known in the art. Methods for purification are well-known in the art. The term "substantially pure" indicates the highest degree of purity which can be achieved using conventional purification techniques known in the art.

A "reference strain" refers to a strain of microorganism, for example, *Mycoplasma hyopneumoniae*, that is obtained from a reliable source and which may be used as a control strain for which comparisons with other unestablished or unknown cultures may be compared. In the present invention, the reference strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* may be avirulent J strains that are obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and are assigned ATCC accession numbers 25934 and 27715. In the present invention, these "reference strains" having ATCC accession numbers 25934 or 27715 have also been used to prepare the immunogenic compositions of the invention. In other certain embodiments of the present invention, the reference strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* may be obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and are assigned ATCC accession numbers 25617 and 25095.

The term "SL-CD" refers to a sulpholipo-cyclodextrin that falls within the family of cyclodextrin adjuvants described in U.S. patent numbers 6,610,310 and 6,165,995. Typically, SL-CD is formulated in a mixture with a metabolizable oil such as one or more unsaturated terpene hydrocarbons, for example, squalane and preferably with a non-ionic surfactant, such as polyoxyethylene sorbitan monooleate.



The term "SP-Oil" refers to an adjuvant that is an oil emulsion comprising: 1% to 3% vol/vol of polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer; 2% to 6% vol/vol of squalane; 0.1% to 0.5% vol/vol of polyoxyethylene sorbitan monooleate; and a buffered salt solution.

5 The terms "vaccine" or "vaccine composition", which are used interchangeably, refer to pharmaceutical compositions comprising at least one immunogenic composition that induces an immune response in an animal. A vaccine or vaccine composition may protect the animal from disease or possible death due to an infection, and may or may not include one or more additional components that enhance the immunological activity of the active
10 component. A vaccine or vaccine composition may additionally comprise further components typical to pharmaceutical compositions. A vaccine or vaccine composition may additionally comprise further components typical to vaccines or vaccine compositions, including, for example, an adjuvant or an immunomodulator. The immunogenically active component of a vaccine may comprise complete live organisms in either their original form,
15 or as attenuated organisms in a modified live vaccine, or organisms inactivated by appropriate methods in a killed or inactivated vaccine, or subunit vaccines comprising one or more immunogenic components of the virus, or genetically engineered, mutated or cloned vaccines prepared by methods known to those skilled in the art. A vaccine or vaccine composition may comprise one or simultaneously more than one of the elements described
20 above.

 As used herein, "virulent" refers to the ability of a *Mycoplasma hyopneumoniae* strain to cause disease associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Virulence can be evaluated by observing disease progression in the animal. An example of a "virulent" strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is that exemplified by the challenge strain of *Mycoplasma*
25 *hyopneumoniae*, as described and used in the present invention. Other virulent strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* are available from the American Type Culture Collection (ATCC), designated as Strain No. 25617 or 25095. The term "avirulent" refers to strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* that are lacking in virulence. That is, avirulent strains, isolates, or constructs are non-pathogenic and are incapable of causing disease. As used herein the
30 term "avirulent" is used synonymously with the term "non-virulent." Exemplified herein are compositions employing the *M. hyopneumoniae* avirulent live culture strain J (FCX3-Line 1, which is available from the American Type Culture Collection (ATCC) as Strain No. 27715). Another "avirulent" strain that is also available from the ATCC is designated as Strain No. 25934. The J strain designated as ATCC accession number 27715 was cloned from the

parental J strain designated as ATCC accession number 25934, as described in the ATCC catalogue.

GENERAL DESCRIPTION

5 The present disclosure is based upon the discovery that one or two-dose regimens of a *Mycoplasma hyopneumoniae* composition, including an immunogenic composition or a vaccine composition, using one or more live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae*, such as, for example, strain J (FCX3-Line 1; ATCC Accession No. 27715) and one or more adjuvant, typically a biologically-acceptable adjuvant, are effective in protecting against and/or
10 preventing or ameliorating disease associated with virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* infection.

 In one embodiment, other live avirulent strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*, including, but not limited to, J strains, whose genome comprises a nucleic acid sequence having at least about 90% homology, or at least about 95% homology, or at least about 99%
15 homology, with a reference J strain, are contemplated for use in the compositions and methods of the present invention.

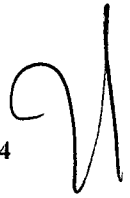
 In one embodiment, other live avirulent strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*, including, but not limited to, J strains, which have at least about 70% polymorphic identity, or at least about 85% polymorphic identity, or at least about 95% polymorphic identity, to that of
20 a reference J strain, are contemplated for use in the compositions and methods of the present invention.

 The reference J strain may be selected from the *Mycoplasma hyopneumoniae* strains designated as ATCC accession number 25934 or 27715.

 In one embodiment, the live avirulent J strain used in the compositions and methods
25 of the present invention is a J strain designated as ATCC accession number 25934 or 27715.

 In one embodiment, the live avirulent J strain used in the compositions and methods of the present invention is a J strain designated as ATCC accession number 27715.

 It is also disclosed herein that compositions, including vaccine compositions, which
30 employ one or more live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain in further combination with Porcine Circovirus Type 1-Type 2 chimera modified live vaccine (cPCV1-2) (See U.S. Patent Publication number 2003/0170270 and number 2004/0253270) are also effective in protecting against and/or preventing or ameliorating disease associated with virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* infection and/or virulent Porcine Circovirus infection.



In certain embodiments, the compositions of the invention further comprise one or more live bacteria, bacterin and/or one or more purified toxoid selected from the group consisting of *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*,
5 *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and leptospira bacteria.

In certain embodiments, the compositions of the invention further comprise one or more viral antigen selected from the group consisting of a swine influenza virus (SIV) antigen, a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen, raccoon poxvirus expressing PRRS or other antigens, TGEV expressing PRRS or other antigens,
10 and a porcine circovirus (PCV) antigen.

Within certain embodiments, the present disclosure is described hereinafter with reference to protection against infection with a lung homogenate designated as LI-34 containing virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 11 (See J. Clin. Microbiol. 1999 Mar; 37(3):620-7. It is, however, contemplated that the compositions disclosed herein will be
15 effective in protecting against and/or preventing or ameliorating disease or at least one symptom associated with the disease that are associated with a wide range of virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. Numerous virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates are known in the art and are available from various sources including the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852. Examples of these
20 virulent strains include, but are not limited to, ATCC accession numbers 25095, 27714 and 25617.

Compositions, in particular immunogenic compositions or vaccine compositions, of the present disclosure may be prepared from lyophilized or freshly harvested cultures of live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* by one or more methodology that is readily available
25 in the art. Exemplified herein are compositions comprising the live avirulent *M. hyopneumoniae* strain J (FCX3-line 1) which is available as ATCC Number 27715 (a filtered and cloned 3 times isolate of ATCC Number 25934).

Live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* may be cultured by the methodology described in U.S. Patent Nos. 5,338,543 and 5,565,205, each of which is incorporated in its
30 entirety herein. More specifically, *Mycoplasma hyopneumoniae* may be propagated in culture medium such as PPLO (Pleuropneumonia-like organism) complete medium (Difco; Becton Dickinson and Company, San Jose, California). Growth of the organism is monitored by standard techniques such as determining color changing units (CCU), and harvested when a sufficiently high titer has been achieved. The stocks may be further concentrated or
35 lyophilized by conventional methods before inclusion in the composition formulations. Other

2

methods, such as those described in Thomas *et al.*, *Agri-Practice* 7(5):26-30, may also be employed.

The conditions under which an isolate of *Mycoplasma hyopneumoniae* is grown may vary depending upon the precise composition of the medium and the specific isolate being grown. *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates are typically grown from about 48 hours to about 144 hours, measured from the time of incubation to the time of harvest.

Depending upon the precise composition to be formulated, *Mycoplasma hyopneumoniae* may be concentrated by, for example, ultracentrifugation or ultrafiltration. The concentrated *Mycoplasma hyopneumoniae* may be recovered by methodology known in the art and may be mixed with a suitable physiologically acceptable carrier -- typically an aqueous media such as, for example, saline, phosphate-buffered saline (PBS), minimal essential media (MEM), or MEM with HEPES buffer. It may then be further combined with an appropriate adjuvant to provide the desired concentration on a volume per volume basis (v/v). Compositions may further comprise one or more chelator, such as EDTA, typically at a concentration of about 0.05% to about 0.20% (w/v). Alternatively, the *Mycoplasma hyopneumoniae* strain to be used in the immunogenic or vaccine compositions may be concentrated as described above, or lyophilized and resuspended in an appropriate adjuvant at the desired concentration on a weight per volume (w/v) basis.

As indicated above, compositions, including immunogenic compositions or vaccine compositions, of the present disclosure generally comprise a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* in combination with one or more adjuvant, typically a biologically acceptable adjuvant.

For one-dose administration, compositions may contain an amount of live avirulent *Mycoplasma pneumoniae* corresponding to about 1×10^8 to about 3×10^{11} MHDCE/ml. Alternatively, compositions may contain an amount of live avirulent *Mycoplasma pneumoniae* corresponding to about 1×10^9 to about 3×10^9 MHDCE/ml. Compositions are formulated such that each administration dose will be between about one (1) ml and about five (5) ml, or between about two (2) ml, per animal for administration intramuscularly, subcutaneously, or intraperitoneally and between about one (1) and about ten (10) ml, or between about two (2) and about five (5) ml, for administration orally or intranasally.

For two-dose administration, compositions typically contain an amount of live avirulent *Mycoplasma pneumoniae* of about 1×10^8 to about 3×10^{11} MHDCE/ml, more typically about 1×10^9 to about 3×10^9 MHDCE/ml. In certain embodiments for two dose administration, compositions may contain an amount of live avirulent *Mycoplasma pneumoniae* containing about 10^3 CFU/ML TO 10^{11} CFU/ML. Compositions are formulated

93

such that each administration dose will be between about one (1) ml and about five (5) ml, preferably about two (2) ml per animal for administration intramuscularly, subcutaneously, or intraperitoneally and between about one (1) and about ten (10) ml, typically between about two (2) and about five (5) ml for administration orally or intranasally.

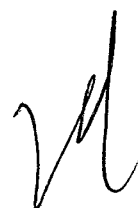
5 The adjuvant mixture for use in the immunogenic compositions and vaccine compositions of the present disclosure enhances the immune response by stimulating cell mediated and/or local (secretory IgA) immune responses. The biologically acceptable adjuvant may, for example, be one or more adjuvant selected from the group consisting of SP-Oil, SL-CD, an acrylic acid polymer (such as Carbopol), and a mixture of a metabolizable
10 oil such as one or more unsaturated terpene hydrocarbon(s), for example squalene or squalane, and a polyoxyethylene-polypropylene block copolymer such as Pluronic®. Adjuvants may be further selected from cytokines, such as IL-12 and IL-18; aluminum hydroxide; ethylene maleic acid copolymer; DEAE dextran; mycobacteria cell wall derived adjuvant; and the like.

15 The concentration of adjuvant employed in the compositions described herein will depend upon the nature of the adjuvant. Adjuvants are typically present in the compositions described herein at a final concentration of about 1-50% and more typically at a final concentration of about 10%, 15%, 20%, 25%, or 30%. The concentration of the antigen in the adjuvant may be prepared on a weight per volume basis (w/v) or on a volume per
20 volume (v/v) basis. For example, the antigen to be delivered in the compositions of the invention may be prepared in a lyophilized form, followed by reconstitution in the adjuvant directly to result in the specified concentrations on a weight per volume basis. Alternatively, the antigen may first be reconstituted in an appropriate diluent (for example, a buffer) to which is then added an adjuvant in a volume sufficient to result in the final desired
25 concentration of both antigen and adjuvant on a volume per volume basis, as described above.

In certain embodiments, an adjuvant may be administered with the antigen/immunogen as a single composition, or can be administered before, concurrent with, or after administration of the antigen/immunogen.

30 The choice of the adjuvant depends on the stability of the antigen/immunogen containing the adjuvant, the route of administration, the dosing schedule, the efficacy of the adjuvant for the species being vaccinated and must also be one approved for use in animals or humans by the pertinent regulatory bodies.

In compositions comprising SP-Oil, the adjuvant is typically present at between about
35 1% and about 25% (v/v), more typically between about 5% and about 15% (v/v) such as, for



example, at about 10% (v/v); in compositions comprising an acrylic acid polymer and a mixture of a metabolizable oil that comprises one or more terpene hydrocarbon(s) and a polyoxyethylene-polypropylene block copolymer, the ratio of acrylic acid polymer to metabolizable oil/polyoxyethylene-polypropylene block copolymer mixture is typically in a ratio of between about 1:25 and about 1:50. A metabolizable oil, a polyoxyethylene-polypropylene block copolymer, and an acrylic acid polymer may be employed in the form of an oil in water emulsion wherein acrylic acid polymers are typically employed at a concentration of between about 0.5 g/l and about 10 g/l; metabolizable oils are typically employed at a concentration of between about 2 ml/l and about 6 ml/l; and polyoxyethylene-propylene block copolymers are typically employed at a concentration of between about 1 ml/l and about 3 ml/l.

Exemplary suitable adjuvant mixtures include, but are not limited to, mixtures of one or more acrylic acid polymer(s) with a mixture of metabolizable oil, for example an unsaturated terpene hydrocarbon or a hydrogenation product thereof, preferably squalane (2,3,10,15,19,23-hexamethyltetracosane) or squalene, and a polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer. Such an acrylic acid polymer may be a homopolymer or a copolymer.

Acrylic acid polymers are typically carbomers. Carbomers are commercially available under the trade name Carbopol and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 2,909,462 and 3,790,665, each of which is incorporated herein by reference.

The polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymers are surfactants, typically liquid surfactants, which aid in suspending solid and liquid components. Surfactants are commercially available as polymers under the trade name Pluronic®. The surfactant poloxamer 401 is commercially available under the trade name Pluronic® L121.

The adjuvant mixture may comprise a metabolizable oil, an acrylic acid polymer and a polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer formulated as an emulsion in an aqueous medium. Within certain embodiments, the adjuvant mixture may include a metabolizable oil and polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer such as a mixture of squalane and Pluronic® L121 (poloxamer 401) which may be present in an amount of between about 50 ml/l and about 100 ml/l and the carboxymethylene polymer may be Carbopol 934P (Carbamer 934P), which may be present in amount of about 2 ml/l.

Preferred acrylic acid polymers are those marketed by B. F Goodrich as Carbopol 934 P NF and 941 NF, which are polymers of acrylic acid cross-linked with polyallylsucrose and which have the chemical formula $(CH_2CHOOH)_n$. These polymers form aqueous gels which suitably formulate with aqueous carriers. Polyoxyethylene-polypropylene block



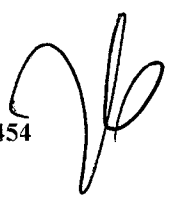
copolymers may be the nonionic surfactants marketed by BASF as Pluronic® L121, L61, L81 or L101.

Within certain embodiments, compositions disclosed herein may employ, in further combination, one or more other live bacteria, bacterin, toxoid, and/or viral antigen. Thus, within certain aspects of these embodiments, the adjuvanted live avirulent *M. hyopneumoniae* composition may comprise an immunizing amount of a live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* and one or more biologically acceptable adjuvant in further combination with (a) one or more live bacteria such as, for example, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and leptospira bacteria; (b) one or more bacterin; (c) one or more purified toxoid from one or more pathogens such as, for example, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and leptospira bacteria; and/or (d) one or more viral antigen wherein the virus is selected from the group consisting of swine influenza virus (SIV; such as SIV strains H1N1, H1N2, and H3N2), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), raccoon poxvirus expressing PRRS and/or other antigens, TGEV expressing PRRS and/or other antigens, and porcine circovirus (PCV). Exemplified herein are compositions, including vaccine compositions, which employ one or more live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain in further combination with porcine circovirus Type 1-Type 2 chimera modified live vaccine (cPCV1-2) (See U.S. Patent Publications 2003/0170270 and 2004/0253270).

Within these or alternative embodiments, compositions, including vaccine compositions, may additionally or optionally include a preservative such as, for example, thimerosal and/or EDTA. See, also, U.S. Patent Publication Nos. 2002/0131980 and 2003/0017171, each of which is herein incorporated by reference in its entirety.

The concentration of such other live bacteria, bacterin, toxoid, and/or viral antigen employed in the compositions described herein will depend upon the nature of the bacterin, toxoid, and/or viral antigen and are typically present in the compositions described herein at a final concentration of between about 0.5×10^5 to 0.5×10^{10} per ml. Alternatively, the bacteria are present in a final concentration of between about 0.5×10^6 to 0.5×10^9 per ml or between about 0.5×10^7 to 0.5×10^8 per ml.

Compositions of the present disclosure will find utility in methods for protecting an animal against disease caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or for preventing or ameliorating an outbreak of such disease among animal populations by administration an



adjuvanted live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* composition as described herein. Compositions described herein may also be advantageously employed in methods for enhancing in an animal an immune response, such as a cell-mediated and/or humoral immune response, to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Such methods comprise the steps of administering to an animal, typically swine, in one or two doses, a composition comprising one or more adjuvanted live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. Depending upon the precise application contemplated, compositions may be administered intramuscularly, subcutaneously, orally, by aerosol, or intranasally.

According to the methods of the present disclosure, a desirable dosage regimen involves administration of one or more doses of desired vaccine composition to the pig. Typically, where two doses are administered to the animal, the doses are administered between about one (1) week apart and about four (4) weeks apart, more typically between about two (2) weeks apart and about three (3) weeks apart.

EXAMPLES

The present disclosure will be better understood by reference to the following non-limiting examples:

EXAMPLE 1: Preparation of an *M. hyopneumoniae* Avirulent Adjuvanted Live Vaccine

This Example discloses the preparation of an exemplary adjuvanted live avirulent *M. hyopneumoniae* composition according to the present disclosure.

Mycoplasma hyopneumoniae may be obtained from any number of readily available sources. In one embodiment described herein, *M. hyopneumoniae* avirulent live culture strain J (FCX3-Line 1), was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) as ATCC Strain No. 27715. Any other avirulent strain of *M. hyopneumoniae* may be used for preparation of the compositions, such as, for example, the parent J strain designated as ATCC accession number 25934. In certain other embodiments, it is envisioned that any live virulent strain of *Mycoplasma pneumoniae*, may be modulated, attenuated or mutated until the culture is established to be avirulent, as determined by *in vitro* or *in vivo* testing, using procedures known to those skilled in the art. The full genomic sequence of the ATCC 25934 J strain has been published by Vasconcelos et al (J. Bacteriol. (2005), 187(16): 5568-5577) and has been assigned GenBank accession number AE017243. Several of the sequences associated with ATCC strain 25934 may be found in PubMed and have GenBank accession numbers AY737012 (16S ribosomal RNA gene),

AY512905 (adhesin gene, AF013714 (prolipoprotein p65 gene), U02538 (23S rRNA gene) and U02537 multidrug resistance protein homolog genes).

Each vaccine composition for the bactericidal assay was prepared from one lyophilized vial of a *M. hyopneumoniae* culture rehydrated with 20 ml of normal saline.

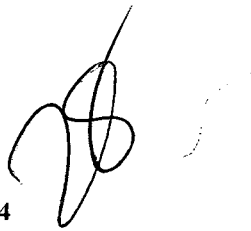
5 Vaccine compositions included a combination of 5 ml of the rehydrated culture and adjuvant sufficient to acquire the specified adjuvant concentration in a final volume of 10 ml. A control composition was also prepared by combining 5 ml of rehydrated culture with 5 ml of normal saline. All compositions were mixed for 5 minutes prior to sampling. Samples were taken from all compositions at 5 minutes (0 hour), 3 hours, and 7 hours after blending. The
10 viability of each vaccine was determined by Colony Forming Units (CFU) at each sampling point (see Table 1).

TABLE 1

Adjuvant	CFU/ml			MPN/ml		
	0 hour	3 hour	7 hour	0 hour	3 hour	7 hour
30% SL-CD	1.44E+07	0	0	1.15E+07	0	0
10%SL-CD	1.48E+07	6.40E+05	5.2E+03	2.87E+07	8.42E+05	0.00E+00
Control	8.30E+07	1.06E+08	9.00E+07	3.62E+07	6.22E+07	3.62E+07
5% SP-Oil	9.46E+07	7.60E+07	2.55E+07	4.67E+07	9.40E+07	6.22E+06
5% SP-Oil /0.2%	1.50E+08	5.61 E+07	4.53E+07	4.27E+08	7.74E+07	2.84E+06
Control	2.17E+08	1.41E+08	9.86E+07	1.91E+08	8.42E+07	4.67E+07
10%SP oil	1.09E+07	1.07E+07	7.13E+06	3.40E+06	7.74E+06	3.62E+06
Control	3.50E+07	4.75E+07	7.20E+07	1.03E+07	8.42E+07	3.14E+07
10%Sp-oil+0.2%carbopol	5.20E+07	1.30E+07	8.13E+06	5.50E+07	1.91E+07	2.26E+06
0.2%carbopol	6.80E+07	6.67E+07	6.60E+07	1.63E+08	1.38E+08	4.45E+07
control	2.90E+07	no test	5.54E+07	1.23E+08	No test	1.38E+07

15 The average viability of the stock culture was determined by averaging all the control viabilities at 0 hour, average 9.09×10^7 CFU/ml. In comparison, the most-probable number (MPN) was determined for the stock cultures resulting in 1.85×10^8 MPN/ml. Vaccine blending and vaccination typically takes less than 3 hours; therefore when looking at the bactericidal effect of adjuvants, the 3 hour time point is the most important. The trend for SP-Oil at 5% and 10% at the 3-hour sampling compared to the control is a 2-fold difference
20 and 4-fold difference, respectively.

Vaccine A was prepared by rehydrating vials of lyophilized culture with diluent containing 10% (v/v) SP-Oil final concentration. The placebo vaccine was sterile normal saline.



EXAMPLE 2: *In vivo* Efficacy of *M. hyopneumoniae* Avirulent Adjuvanted Live Vaccines in Pigs

This Example demonstrates the *in vivo* efficacy of exemplary adjuvanted live avirulent *M. hyopneumoniae* vaccine compositions.

A total of 30, four to six week-old pigs were acquired from Fort Dodge Animal Health's SPF herd in Charles City, Iowa. Pigs were maintained on feed without antibiotics or growth promotants and given water and food *ad libitum*. Animals receiving vaccine compositions and control compositions were housed in different rooms and all pigs were maintained under similar conditions during vaccination, monitoring, and challenge periods.

The 30 pigs were randomly assigned into three (3) groups as follows: One (1) group received a vaccine composition, one (1) group received a placebo, and one (1) group served as an environmental control. Pigs were grouped as shown in Table 2.

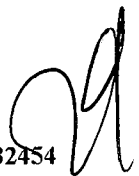
TABLE 2

Group	Total# of pigs	Vaccine	# Pigs challenged
1	13	A	13
2	12	placebo	12
3	5	N/A	N/A

Four to six week-old pigs were vaccinated intramuscularly with a 2 ml dose of the appropriate vaccine. Group 1 was administered vaccine A, group 2 was administered the placebo. Pigs from group 3 were not vaccinated or challenged and served as environmental controls. Pigs in group 1 were vaccinated twice, two weeks apart. Two weeks after the second vaccination, all pigs in groups 1 and 2 were challenged with a lung homogenate (LI-34) containing a virulent strain of *M. hyopneumoniae* Strain 11 (J. Clin. Microbiol., 1999 Mar; 37(3):620-7). Four weeks after challenge, all pigs in groups 1-3 were necropsied and lung lesions were evaluated.

Preparation of Lung Homogenate (LI-34) FOR *M. hyopneumoniae* Challenge Strain

Seven cross-bred pigs were procured from Spring Prairie Colony Farms (Genetipork) and were inoculated intratracheally with 10 ml of a 1:30 dilution of a 10% crude lung homogenate (LI31) of *M. hyopneumoniae* strain 11. The LI31 crude lung homogenate had been produced by passaging lung homogenate containing *M. hyopneumoniae* in specific



pathogen free pigs and harvesting the resulting pneumonic lungs at early mid-stage of the disease. The lung homogenates were stored at -70° C until needed.

Serum was collected upon arrival and at necropsy from all pigs and was evaluated at the ISU Veterinary Diagnostic Laboratory (ISU-VDL) for evidence of antibodies to TGE (PRCV), SW and PRV. In addition, ELISA's for PRRSV and *M. hyopneumoniae* antibodies were performed and all samples were negative for all of the above respiratory pathogens.

All pigs were necropsied. Pentobarbital was used to induce deep anesthesia of pigs prior to exsanguination. The ventral chest wall was opened and areas of pneumonic lesions typical of *M. hyopneumoniae* were removed aseptically and placed individually in sterile containers.

A small portion of each lung was ground and checked for purity on blood agar plates, beef heart infusion broth, and Friis media. Tube dilutions were performed in Friis media to titrate out the *M. hyopneumoniae*. The remaining lung pieces were frozen in 50 ml centrifuge tubes at -70° C until the results of the bacteriology and mycoplasma isolation were known.

Lung lobes from 3 of the 7 pigs were used to produce the *M. hyopneumoniae* lung inoculum.

Lobe chunks were thawed from pigs #329, 331, and 332 and ground in Friis media containing no antibiotics. Purity of lung inoculum was confirmed by culture on beef heart infusion, blood agar and Friis media. Only micrococci consistent with environmental contamination were found on one plate. The lung inoculum was titrated for *M. hyopneumoniae* levels and found to contain approximately 10⁷ CCU/ml. An aliquot was submitted to ISU-VDL for virus isolation assays for SN, EMS, enterovirus, HEV, PRCV, PRRSV, Pseudorabies, TGE, parvovirus, and rotavirus. The results of all assays were negative. Final volume of ground lung inoculum (labeled LI 34) was 1780 ml from 178.1 grams of lung tissue. This was aliquoted into 100 X 5 ml and 110 X 10 ml volumes.

In the second phase of the study, 9 pigs were used in the determination of the concentration of lung inoculum required to induce an average of 8% pneumonic-lung lesions in a minimum of 80% of the pigs. All pigs were challenged with the LI34 *M. hyopneumoniae* strain 11 intratracheally on as previously described. Challenge dilutions included 1:30, 1:100, and 1:500.

The pigs were necropsied. Pentobarbital was used to induce deep anesthesia prior to exsanguination. The lungs were removed and lung lesions sketched on standard lung diaphragms. Serum was collected from all pigs and was assayed by ELISA for antibodies to *M. hyopneumoniae*. All pigs were either low positive or seronegative for *M. hyopneumoniae* suggesting no previous exposure to *M. hyopneumoniae* prior to arrival. Tracheal swabs were collected aseptically from all pigs. *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* were

isolated from 4 and 3 pigs respectively. *M. hyopneumoniae* was isolated from all challenged pigs. Lung sketches were evaluated with a Zelss Image analysis system to determine the percentage of pneumonic lung lesions.

5 Conclusions

The challenge of the pigs was successful and a dilution of 1:100 would be the optimal dilution to use. The average percentage of pneumonia induced was 10.17 +/- 6.6, which is higher than normal, however this may be attributed to the presence of *Pasteurella multocida* and/or *parasuis* in the pigs. In addition, 100% of the pigs inoculated with the challenge
10 inoculum had significant lung lesions. Overall, these results are fairly typical of what we observe in our studies of *M. hyopneumoniae*, in that if there are other pathogens present, there is an increase in pneumonia. This may be due to the interaction between the pathogens and the immune system. We produced 1,600 ml of *M. hyopneumoniae* lung inoculum for use in experimental challenge experiments. The inoculum will produce at least
15 8% or higher pneumonic lung lesions in a minimum of 80% of inoculated pigs when used at a 1: 100 dilution intratracheally.

The vaccine was titrated prior to the day of vaccination and bactericidal assays were conducted to determine the appropriate adjuvant systems to be used (see Example 1). From these data, 10% SP-Oil adjuvant system was chosen for further study. The average
20 viability per vial of stock culture was 3.64×10^9 CFU/Bottle.

On the day of the first administration, vaccine compositions were prepared as follows: Vaccine A -- each of three vials of avirulent *M. hyopneumoniae* lyophilized culture was rehydrated with 10 ml of 10% SP-Oil diluent. The three vials of vaccine composition for each diluent type were pooled and allowed to mix for 20 minutes on a stir plate with stir bar. The
25 placebo was normal saline aliquoted into a sterile bottle for administration. The compositions remained on ice during the course of vaccination for 2 hours.

On the day of the second administration, vaccine compositions were prepared as follows: Vaccine A -- each of three vials of avirulent *M. hyopneumoniae* lyophilized culture was rehydrated with 10 ml of 10% SP-Oil Diluent. The three vials of rehydrated culture for
30 each diluent type were pooled and allowed to mix for 20 minutes on a stir plate with stir bar. The placebo was normal saline aliquoted into a sterile bottle for administration. The compositions remained on ice during the course of vaccination for 2 hours.

The concentration of viable *M. hyopneumoniae* in each composition was determined before and after administration. Viability was evaluated by determining Colony Forming
35 Units (CFU/ml). A vial of lyophilized stock culture was rehydrated with 10 ml of normal saline,

allowed to mix for 20 minutes, and served as a control for the viability assay. Since the first control viability was lower than the test vaccine viability, during the second administration, two vials were rehydrated and pooled to serve as the control (see Table 3 for test vaccine viabilities and control viabilities).

5

TABLE 3

Vaccine	First Vaccination CFU/mL	Second Vaccination CFU/mL
Group 1: Adjuvant 10% SP-Oil	2.79E+08	2.27E+08
Viability Control	1.29E+08	2.69E+08

All pigs were observed daily for temperatures and clinical symptoms starting two days prior to each administration and continued for seven days after each administration. Pigs were observed for clinical symptoms, which included, but were not limited to, coughing, sneezing, nasal discharge, depression, inappetance, and labored breathing.

10

Fourteen days after the second administration, pigs in group 1 were challenged trans-tracheally with a virulent strain of *M. hyopneumoniae*.

15

On the day of challenge, a virulent *M. hyopneumoniae* challenge stock of frozen (-70°C) lung homogenate (LI-34), was thawed rapidly under warm water and diluted (1:100 dilution) with. Pigs were sedated with a mixture of Xylazine-Ketamine-Telazol™ consisting of 50 mg/ml Xylazine, 50 mg/ml Ketamine, and 100 mg/ml Telazol. Each pig was given 10 ml of the challenge material trans-tracheally. To ensure needle placement, air was drawn into the syringe prior to administration of the challenge material. All pigs were observed daily for clinical symptoms post-challenge.

20

Pigs were bled for serum on days 0, 14, 28, and 56. Serological response of the pigs to *M. hyopneumoniae* challenge was determined by ELISA. Four weeks after challenge, all pigs from groups 1-3 were euthanized and lungs were removed. Test groups were blinded and scored for gross lung lesions. Atypical *M. hyopneumoniae* lesions were formalin fixed for subsequent histopathological evaluation. Swab samples from affected lung were collected for bacterial isolation.

25

The average lung lesion score for pigs in group 1 (5.9%) was approximately 50% less than the placebo group (14.8%). When the statistical analysis was adjusted for litter, the mitigated fraction for group 1 was 69.2% reduction in severity of lung lesions when compared to controls. These data are summarized in Table 4. All of the pigs were sero-negative on the day of first administration indicating that the pigs were susceptible to *M. hyopneumoniae* infection. With the exception of one (1) pig in the SP-Oil group, pigs did not

30

32

sero-convert after the first vaccination. All pigs receiving the SP-Oil adjuvanted vaccine composition developed an antibody response after the second shot. Serological response demonstrates that an immune response to *M. hyopneumoniae* was elicited. (See Table 9. for serology results)

5

TABLE 4

Vaccine	Description	Mitigated Fraction Reduction in Lesions Compared to Control	Mitigated Fraction Reduction Lower Confidence Level
Vaccine A	Avirulent <i>M. hyopneumoniae</i> live with 10% SP-Oil	69.2	40.2
Control	Placebo	NA	NA

10

The statistical analysis of the data must meet the criteria for the mitigated fraction (<50% with lower confidence level >30%) for reduction in lung lesions for a vaccine to be considered efficacious for *M. hyopneumoniae*. In total, these data demonstrate that a live avirulent adjuvanted *M. hyopneumoniae* may be advantageously employed for eliciting a protective immune response when administered *in vivo* to an animal.

15

20

While the invention has been described in each of its various embodiments, it is expected that certain modifications thereto may be undertaken and effected by the person skilled in the art without departing from the true spirit and scope of the invention, as set forth in the previous description and as further embodied in the following claims. The present disclosure is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and the accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims. It is further to be understood that all values are approximate, and are provided for description. All patents and patent applications cited herein are hereby incorporated herein by reference in their entireties.

25

EXAMPLE 3: Preliminary Immunogenicity Study of the *Mycoplasma hyopneumoniae* Fraction of *Mycoplasma hyopneumoniae* Live Avirulent strain-Porcine Circovirus Type 1-Type 2 Chimera Modified Live

Combination Vaccine in 3-4 Week Old Pigs

This Example discloses the efficacy of a combination vaccine comprising an adjuvanted live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* J (FCX3-line1) strain and a Porcine

33

Circovirus (PCV) Type 1-Type 2 Chimera live vaccine (cPCV1-2; see U.S. Patent Nos. 7,279,166 and 7,276,353) when administered intramuscularly (IM) or intranasally (IN) in 3-4 week old pigs. This combination vaccine (PCV/MH) is suitable for use for the vaccination of healthy swine as an aid in the prevention and/or to reduce the severity of disease caused by *M. hyopneumoniae* and Porcine Circovirus.

The targeted test vaccine should contain about 4.0 Log₁₀ FAID₅₀/dose of cPCV1-2 modified live virus and 4x10⁸ CFU/dose of *M. hyopneumoniae* J strain (see King *et al*, Journal of Comparative Medicine and Vet. Science, 29: 85-89 (1965) and U.S. patent number 4,824,785 for the FAID method). The vaccine was adjuvanted to contain 10% (v/v) SP-Oil final concentration. The placebo vaccine was sterile Normal Saline.

A total of 66 3-4 week-old pigs were employed in this study. 16 pigs were administered 2 ml of PCV/MH live vaccine intramuscularly once and challenged (Group 1); 15 pigs were administered 2 ml of PCV/MH live vaccine intramuscularly twice (two weeks apart) and challenged (Group 2); 15 pigs were administered 2 ml (1 ml/nostril) of PCV/MH live vaccine intranasally twice (two weeks apart) and challenged (Group 3); 15 pigs were not administered the PCV/MH live vaccine and challenged (Group 4); and 5 pigs served as environmental controls (Group 5).

The vaccine used in the study disclosed herein was a combination of MH lyophilized live antigen (lot#1744-56) and diluent containing PCV (LotC108-56) live vaccine. On the day of vaccination, the lyophilized live MH cake was rehydrated with diluent containing PCV live virus (4.0Log₁₀FAID₅₀/mL adjuvanted with 10% SP Oil). Final vaccine was assigned Lot# 2315-30. Viability for the MH fraction was determined before and after vaccination, 3.18 x 10⁸ CFU/mL (before) and 1.65 x 10⁸ CFU/mL (after), respectively. The PCV titer for the vaccine pre and post vaccination was 4.09 Log₁₀ FAID₅₀ and 3.7 Log₁₀ FAID₅₀, respectively. The vaccine for second vaccination was prepared as above and assigned Lot# 2315-32. Viability for the MH fraction was 1.24 x 10⁸ CFU/mL and 1.5x 10⁸ CFU/mL pre and post vaccination respectively. The viability for the PCV fraction was 4.36 Log₁₀ FAID₅₀ and 3.83 Log₁₀ FAID₅₀, respectively.

The pigs were observed for 7 days following vaccination for any adverse reactions to the vaccine. Three pigs died during the post vaccination observation period due to non-MH or PCV related causes. A summary of the clinical observations from the post vaccination period is found in Table 5.

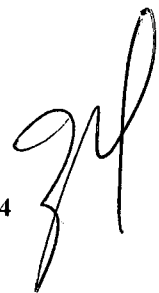


Table 5

Group	# of pigs	Treatment	Route	Dosage	Observation after vaccination
1	16	Vaccination	IM	1 dose	One pig was noted to have elevated temp (105.1-106.2°F) for 7 consecutive days starting on fifteen days post first vaccination. Another pig was noted to have an elevated temp, inappetance and depression for 4 consecutive days starting 18 days post first vaccination.
2	15	Vaccination	IM	2 doses	One pig died the day before second vaccination due to possible HPS or S. suis infection. Clinical signs of depression and thin were noted prior to vaccination. One pig had 3 consecutive days of elevated temp (105.0-106.7°F) starting 5 days post first vaccination.
3	15	Vaccination	IN	2 doses	Two days prior to second vaccination one pig died due to intestinal perforation. Two pigs had swollen joints and coughing for 8 consecutive days, which had originated prior to first vaccination. Two other pigs one day prior to second vaccination was noted to have swollen hocks for 7 consecutive days in which one resulted in an abscess, the other healed.
4	15	Saline	IM	2doses	One pig was noted to have swollen hocks throughout the study noted prior to first vaccination. Another pig also had swollen hocks for

					several days during the study. One pig had two days of elevated temp. for two consecutive days 105.1°F and 106.5°F starting 6 days after second vaccination.
5	5	No Vaccination	NA	NA	Housed with group 4 pigs during vaccination. No adverse reactions noted.

NA: Not applicable

IN: intranasal

IM: intramuscular

5 All pigs in Groups 1-4 were challenged with a virulent strain of *M. hyopneumoniae* (pig lung homogenate containing virulent MH (LI-34)). Pigs from Group 1 were challenged four weeks after first vaccination. Pigs in Groups 2-4 were challenged two weeks after second vaccination. At four weeks after challenge, all pigs in Groups 1-5 were necropsied and lung lesions were evaluated.

10 The vaccine was titrated prior to the day of vaccination. Lyophilized culture of avirulent *M. hyopneumoniae* was rehydrated on the day of vaccination. The concentration of *M. hyopneumoniae* organisms in the vaccine was approximately 2×10^8 CFU/ml. A sample of vaccine was retained and a viability assay performed before and after vaccination to confirm actual CFU/ml. The vaccine was held on ice during the course of vaccination.

15 All pigs were observed daily for temperatures and clinical signs starting two days prior to each vaccination continuing for seven days after each vaccination. Pigs were observed for clinical symptoms, which included, but were not limited to, coughing, sneezing, nasal discharge, depression, inappetance, and labored breathing. 14 days after the second vaccination, pigs in Groups 1-4 were challenged trans-tracheally with a virulent strain of *M. hyopneumoniae*.

20 On the day of challenge, the virulent *M. hyopneumoniae* challenge stock, a frozen (-70°C) lung homogenate (LI-34) was thawed rapidly under warm water and diluted (1:100 dilution) using sterile *M. hyopneumoniae* growth medium. Pigs were sedated with a mixture of Xylazine-Ketamine-Telazol™ comprising 50 mg/ml Xylazine, 50 mg/ml Ketamine and 100 mg/ml Telazol. Each pig was given 10 ml of the challenge material transtracheally. To
25 ensure needle placement, air was drawn into the syringe prior to administration of the challenge material.

9/6

All pigs were observed grossly for clinical signs after challenge. The observation was conducted daily for any abnormal clinical sign. Pigs were bled for serum (no more than 13 ml whole blood) on day 0, 14, 28, and 56 of the study. Serum was collected, but not evaluated. ELISA may be conducted to evaluate serological response of the pigs using the serum collected during the study period in the future.

Four weeks after challenge, all pigs from Groups 1-5 were euthanized and lungs were removed. Atypical *M. hyopneumoniae* lesions were formalin fixed and the samples were examined for histopathology. Swab samples from affected lung were collected for bacterial isolation. Pigs that died after challenge were necropsied and samples collected as described above. Vaccine efficacy was defined as a combined average lung lesion score of the vaccinates that was 50% less than the combined average lung lesion score of the controls.

On the day of necropsy all pigs were euthanized, lung lesions scored and swabbed for bacterial isolation. Bacteria isolated from the swabs consisted of the following: *Staphylococcus heamolyticus*, *Streptococcus suis* (P322), *Staphylococcus epidermis*, *A. pyogenes*, *aerococus species*, *S. uberis*, *Bordetella bronchiseptica* (P344) and Microbacterium. The statistical analysis for the Lung lesion scores is in Table 6.

Table 6

Group	Protection ratio	MF litter adjusted	MF Lower confidence level	Litter adjusted percent lung lesion score	LCL lung lesion score	Standard deviation of lung lesion	Mean percentile for lesions
Vaccinate IM single dose	1/15	52.9%	19.6%	6.30%	3.86%	4.41	0.37
Vaccinate IM double dose	3/15	63.8%	33.8%	5.03%	2.39%	4.59	0.31
Vaccinate IN double dose	0/14	-8.6%	-51.8%	12.86%	8.59%	7.38	0.65
Control	0/15	NA	NA	11.46%	8.41%	5.5	0.62

LCL= Lower Confidence Level
MF=Mitigated Fraction

The statistical analysis of the data met the criteria for the mitigated fraction (<50%, with LCL >30%) for reduction in lung lesions. This example demonstrates (a) the efficacy of the MH/PCV vaccine for the MH fraction with two 2 mL doses administered IM, at 3.18×10^8 CFU/mL and (b) the safety of the MH/PCV vaccine due to lack of clinical signs related to MH or PCV following vaccination.

EXAMPLE 4: Immunogenicity Study of the *Mycoplasma hyopneumoniae* Fraction of *Mycoplasma hyopneumoniae* Live Avirulent strain- Porcine Circovirus Type 1-Type 2 Chimera Modified Live Combination Vaccine in 3-4 Week Old Pigs

This Example discloses an immunogenicity study which supports the results from the study presented in Example 4 and confirms the efficacy of the *M. hyopneumoniae* fraction of *Mycoplasma hyopneumoniae* live avirulent strain-Porcine Circovirus Type 1-Type 2 (cPCV1-2) chimera modified live vaccine combined vaccine (MH/PCV) when administered intramuscularly. The MH/PCV vaccine disclosed herein may be suitably employed for the vaccination of healthy swine as an aid in preventing and/or minimizing the severity of disease caused by *M. hyopneumoniae* and Porcine Circovirus.

The pigs used in the present study were sero-negative to *M. hyopneumoniae* as determined by ELISA.

A total of 79, three to four week-old pigs were randomized into four groups. 24 pigs, Group 1, were vaccinated with a single dose of the combination PCV/MH live vaccine. 24 pigs, Group 2, were vaccinated with the combination vaccine twice two weeks apart. 24 pigs, Group 3, were vaccinated with normal saline twice two weeks apart to serve as challenge controls. All vaccines were administered intramuscularly. Four pigs, Group 4, were neither vaccinated nor challenged and served as environmental controls.

The vaccine used in the study was a combination of MH lyophilized live antigen (Lot1744-66) and diluent containing PCV (cPCV1-2 LotC108-56) live vaccine. On the day of vaccination, the lyophilized live MH cake was rehydrated with diluent containing PCV live virus ($3.5 \text{Log}_{10} \text{FAID}_{50}/\text{mL}$ adjuvanted with 10% SP Oil). Final vaccine was given Lot2315-40. Viability for the MH fraction was determined before and after vaccination, 2.09×10^8 CFU/mL and 1.56×10^8 CFU/mL respectively. The placebo vaccine was sterile normal saline.

The vaccine for second vaccination was prepared as above and given Lot# 2315-42. Viability for the MH fraction was 1.05×10^8 CFU/mL and 6.72×10^7 CFU/mL pre and post vaccination respectively. The viability for the PCV fraction diluent was $3.44 \text{Log}_{10} \text{FAID}_{50}$.

The vaccine was titrated prior to the day of vaccination. Lyophilized culture of avirulent *M. hyopneumoniae* was rehydrated on the day of vaccination. A sample of vaccine was retained and a viability assay performed before and after vaccination to determine CFU/ml. The vaccine remained on ice during the course of vaccination.

5 All pigs were observed daily for temperatures and clinical signs starting two days prior to each vaccination continuing for 7 days after each vaccination. Pigs were observed for clinical symptoms, which included, but were not limited to, coughing, sneezing, nasal discharge, depression, inappetance, and labored breathing.

10 The pigs were observed for 7 days following vaccination for any adverse reactions to the vaccine. Three pigs died during the post vaccination observation period due to non-MH or PCV related causes. A summary of the clinical observations from the post vaccination period is found in Table 7.

Table 7

Group	# of pigs	Treatment	Dosage	Observation after vaccination
1	24	Vaccination	1 dose	No adverse reactions noted due to vaccination
2	24	Vaccination	2 doses	One pig died in this group due to intestinal perforation. On 5 days post first vaccination one pig had a temp of 105.5°F and labor breathing noted for one day.
3	24	Saline vaccination	NA	On 6 days post first vaccination one pig was noted with labor breathing for a single day.
4	4	No Vaccination	NA	Housed with group 3 pigs during vaccination. No adverse reactions noted.

NA: Not applicable

15 All pigs in Groups 1-3 were challenged with a virulent strain of *M. hyopneumoniae* at approximately 7 weeks of age. Pigs from Group 1 were challenged four weeks after first vaccination. Pigs in Groups 2 and 3 were challenged two weeks after second vaccination. The virulent *M. hyopneumoniae* challenge stock, a frozen (-70°C) lung homogenate (LI-34) was thawed rapidly under warm water and diluted (1:100 dilution) using sterile *M. hyopneumoniae* growth medium. Pigs were sedated with a mixture of Xylazine-Ketamine-Telazol™ comprising 50 mg/ml Xylazine, 50 mg/ml Ketamine, and 100 mg/ml Telazol. Each pig was given 10 ml of the challenge material trans-tracheally.

20 Pigs were bled for serum on day 0, 14, 28, and 56 of the study. Serum samples collected from this study may be tested to evaluate animal serological response to *M. hyopneumoniae* and PCV2 using ELISA methods well known in the art. Serum samples

34

collected from zero-days post vaccination (0DPV) and zero-days post challenge (0DPC) may be tested for antibodies to *M. hyopneumoniae*, Swine influenza (H1N1), and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) using commercially available ELISA test kits.

Four weeks (28 DPC) after challenge, all pigs from groups 1-4 were euthanized and lungs were removed. Lung lesion scores were recorded and typical *M. hyopneumoniae* lesions were formalin fixed. Samples were examined for histopathology. Swab samples from one *M. hyopneumoniae* affected lobe were collected for bacterial isolation for detection of secondary infections. In addition, bronchial alveolar lavage fluid was collected. The lungs were lavaged with phosphate buffered saline and the resulting fluid was aliquoted for testing by PCR.

For the evaluation of reduction in the severity of lung lesions, the estimator was the mitigated fraction (MF) statistic. The mitigated fraction was calculated as:

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

where:

- W_1 = Wilcoxon Rank sum statistic
- n_c = number of subjects in the control group
- n_v = number of subjects in the vaccinated group

The 95% confidence interval for the mitigated fraction was calculated.

For the claim of reduction in severity of lung lesions:

- $H_0: M_v = M_c$
- $H_A: M_v < M_c$

where:

- M_v = Median of the lung lesion score in the vaccinated group
- M_c = Median of the lung lesion score in the control group

The frequency distribution of the continuous outcome variables was assessed using PROC UNIVARIATE, which performs parametric and nonparametric analysis of a sample from a single population. (SAS Institute Inc., Cary NC). Log transformations of the antibody titers were employed to meet the normality assumption required for parametric tests. Baseline evaluations to evaluate comparability of groups for litter and room will be made by chi-square. The severity of lung lesions was compared between each vaccinated group and the control group by Wilcoxon rank sum test (PROC NPAR1WAY with lung lesion score as the dependent variable and treatment included as an independent variable. PROC

NPARIWAY, which performs nonparametric tests for location and scale differences across a one-way classification; PROC NPARIWAY also provides a standard analysis of variance on the raw data and statistics based on the empirical distribution function. (SAS Institute Inc., Cary NC).

5 All statistical analysis will be performed using the SAS system. In cases where transformation did not improve the distribution of the residuals for any transformed variables as determined by the W test for normality, non-parametric tests were employed as needed. The level of significance will be set at $p < 0.05$.

10 On the day of necropsy all pigs were euthanized, lung lesions scored and swabbed for bacterial isolation. Bronchoalveolar lavages (BAL) were also collected. Bacteria isolated from the swabs consisted of the following: *Actinobacillus species*, *Moraxella osloensis*, *Streptococcus sanguinis*, *A. pyogenes* and *Bordetella bronchiseptica*. BAL samples were tested for MH by PCR methodology; two samples from environmental control group with lesions recorded and two samples with low lesion scores in the vaccinate and control group.

15 BAL samples for both pigs from the environmental control group with lesions were negative and both pigs in with low lesion scores in the vaccinate group were positive. The statistical analysis for the lung lesion scores is in Table 8.

Table 8

Group	Protection ratio	MF litter adjusted	MF Lower confidence level	Litter adjusted percent lung lesion score	LCL lung lesion score	Standard deviation of lung lesion	Mean percentile for lesions
Vaccinate IM single dose	1/23	58.4%	31%	8.84%	6.68%	4.99	0.38
Vaccinate IM double dose	4/19	71.2%	48.7%	6.62%	4.37%	4.67	0.3
Control	0/23	NA	NA	19.27%	14.62%	10.76	0.69

LCL= Lower Confidence Level

20 MF=Mitigated Fraction

The statistical analysis of the data met the criteria for the mitigated fraction ($< 50\%$, with LCL $> 30\%$) for reduction in lung lesions. The vaccine is considered efficacious for the MH fraction with a 2mL dose administered IM, either single dose or double dose, at 2.09×10^8 CFU/mL. In addition the vaccine is considered safe due to lack of clinical signs related to MH or PCV following vaccination.

25

fl

TABLE 9
SEROLOGY RESULTS FOR EXAMPLE 2

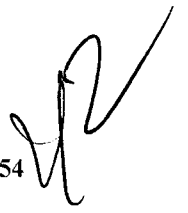
Pig ID	Group	ODPV1	ODPV2	ODPC	Necropsy	Lung score
730	1	<50	100	400	400	9.5
733	1	<50	<50	100	>400	35.5
735	1	<50	<50	100	200	5.5
740	1	<50	<50	200	400	5.5
742	1	<50	<50	200	200	0.5
745	1	<50	<50	200	100	0.9
754	1	<50	<50	400	400	6.8
755	1	<50	<50	400	>400	0.0
761	1	<50	<50	200	200	4.5
762	1	<50	<50	>400	200	0.5
763	1	<50	<50	400	200	2.7
771	1	<50	<50	>400	>400	5.5
774	1	<50	<50	>400	>400	0.0
732	2	<50	<50	<50	<50	1.8
738	2	<50	<50	<50	<50	5.9
739	2	<50	<50	<50	50	18.2
743	2	<50	<50	<50	50	19.1
747	2	<50	<50	<50	200	0.5
749	2	<50	<50	<50	50	21.4
752	2	<50	<50	<50	<50	9.5
759	2	<50	<50	<50	<50	15.9
764	2	<50	<50	<50	<50	26.4
768	2	<50	<50	<50	<50	31.8
769	2	<50	<50	<50	<50	16.8
773	2	<50	<50	<50	<50	10.0
726	3	<50	<50	<50	<50	0.0
744	3	<50	<50	<50	<50	0.0
750	3	<50	<50	<50	<50	0.0
767	3	<50	<50	<50	<50	1.4
770	3	<50	<50	<50	<50	0.5

Group 1: SP Oil vaccine (vaccinated and challenged)

Group 2: Control/challenge (unvaccinated and challenged)

Group 3: Non-challenged control (unvaccinated and not challenged)

ODPV1 and ODPV2: The numbers indicate the highest dilution that was positive in the ELISA test after the first dose of vaccine (ODPV1) or after the second dose of vaccine (ODPV2).



ODPC: The numbers indicate the ELISA results Post Challenge. The higher number indicates seroconversion.

Lung Score: The number indicates the percent of lesions in the lungs of the animals. The higher number indicates a greater number of lung lesions due to a lack of protective immunity. The lower number indicates a healthier pig with fewer lesions due to induction of a protective immune response.

5

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition for eliciting an anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* immune response in an animal, said composition comprising an immunologically effective amount of a live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a biologically acceptable adjuvant.

5 2. The composition of claim 1, wherein the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is a strain whose genome comprises a nucleic acid sequence having at least about 90% homology to the nucleic acid sequence of a reference J strain.

10 3. The composition of claim 2, wherein the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is a strain that has at least about 70% polymorphic identity to a reference J strain.

4. The composition of either of claims 2 or 3, wherein the reference J strain is a strain having ATCC accession number 25934 or 27715.

15 5. The composition of any of claims 1-3, wherein the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is a J strain designated as ATCC accession number 25934 or 27715.

6. The composition of claim 5, wherein the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is a J strain designated as ATCC accession number 27715.

20 7. The composition of any of claims 1-6, wherein said biologically acceptable adjuvant is selected from the group consisting of one or more of SL-CD, Carbopol and SP-Oil.

8. The composition of claim 7 wherein said biologically acceptable adjuvant comprises SP-Oil.

9. The composition of claim 8 wherein said SP-Oil is present at a concentration between about 1% and about 25%.

25 10. The composition of claim 9 wherein said SP-Oil is present at a concentration of about 10%.

11. The composition of any of claims 1 through 10, further comprising one or more live bacteria, bacterin and/or one or more purified toxoid selected from the group

consisting of *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and leptospira bacteria.

12. The composition of any of claims 1 through 10, further comprising one or more viral antigen selected from the group consisting of a swine influenza virus (SIV) antigen, a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen, raccoon poxvirus expressing PRRS or other antigens, TGEV expressing PRRS or other antigens, and a porcine circovirus (PCV) antigen.

13. The composition of claim 12 wherein said porcine circovirus (PCV) antigen is a Porcine Circovirus Type 1-Type 2 (cPCV1-2) chimera.

14. The composition of any of claims 1-13, wherein the immune response elicited by a live-avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* protects an animal against infection with, or reduces the severity of at least one symptom associated with an infection by a virulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae*.

15. A method for protecting an animal against a disease associated with a virulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae*, or for preventing or reducing at least one symptom associated with the disease, said method comprising the step of administering to said animal a composition according to any one of claims 1-14.

16. The method of claim 15 wherein the step of administering is achieved by parenteral administration.

17. The method of claim 16 wherein the parenteral administration step is achieved by intramuscular injection.

18. The method of claim 15 wherein the step of administering is achieved by oral administration.

19. The method of claim 18 wherein the oral administration step is achieved by hand delivery or mass application.

20. The method of claim 15 wherein the step of administering is achieved by nasal administration.

US

21. The method of any one of claims 15-20 wherein said animal is a pig.

22. A method of preventing or ameliorating an outbreak of *Mycoplasma hyopneumoniae*, which comprises the step of administering to an animal a composition of any one of claims 1-14.

5 23. The composition of any one of claims 1-14, wherein the composition is an immunogenic composition.

24. The immunogenic composition of claim 23 wherein said biologically acceptable adjuvant is selected from the group consisting of one or more of SL-CD, Carbopol and SP-Oil.

10 25. The immunogenic composition of claim 24 wherein said biologically acceptable adjuvant comprises SP-Oil.

26. The immunogenic composition of claim 25 wherein said SP-Oil is present at a concentration between about 1% and about 25%.

15 27. The immunogenic composition of claim 26 wherein said SP-Oil is present at a concentration of about 10%.

20 28. The immunogenic composition of any of claims 23-27, further comprising one or more live bacteria, bacterin and/or one or more purified toxoid selected from the group consisting of *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and leptospira bacteria.

25 29. The immunogenic composition of any of claims 23-27, further comprising one or more viral antigen selected from the group consisting of a swine influenza virus (SIV) antigen, a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen, Raccoon Poxvirus expressing PRRS or other antigens, TGEV expressing PRRS or other antigens, and a porcine circovirus (PCV) antigen.

30. The immunogenic composition of claim 29 wherein said porcine circovirus (PCV) antigen is a Porcine Circovirus Type 1-Type 2 (cPCV1-2) chimera.

46

31. A method for enhancing an immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae*, said method comprising the step of administering a single or multiple doses of an immunogenic composition to an animal according to any one of claims 23-30.

32. The method of claim 31, wherein the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is a strain whose genome comprises a nucleic acid sequence having about 90% homology to the nucleic acid sequence of a reference J strain.

33. The method of claim 31, wherein the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is a strain that has at least about 70% polymorphic identity to a reference J strain.

34. The method of either of claims 32-33, wherein the reference J strain is a strain having ATCC accession number 25934 or 27715.

35. The method of either of claims 32-33, wherein the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is a J strain designated as ATCC accession number 25934 or 27715.

36. The method of claim 35, wherein the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is a J strain designated as ATCC accession number 27715.

37. A method for enhancing an immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae*, said method comprising the steps of:

a) at a first time, administering a first immunogenic composition comprising an immunologically effective amount of a live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain adjuvanted with a biologically acceptable adjuvant material to an animal;

b) at a second time, administering a second immunogenic composition comprising an immunologically effective amount of a live avirulent *Mycoplasma hyopneumoniae* adjuvanted with a biologically acceptable adjuvant material to an animal.

38. The method of claim 37, wherein the live avirulent strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* is a strain as defined in any one of claims 2-10.

VACUNA VIVA AVIRULENTE DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE CON ADYUVANTE

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente descripción se refiere, en general, a los campos de la inmunología y medicina veterinaria. Más específicamente, la presente descripción proporciona composiciones de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante basadas en una cepa J de *M. hyopneumoniae* con adyuvante, incluyendo composiciones inmunogénicas o de vacuna, que ayudan a reducir la gravedad y/o

10 prevenir la enfermedad producida por una o más cepas virulentas de *M. hyopneumoniae*. También se proporcionan composiciones de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento, incluyendo composiciones inmunogénicas o de vacuna, que comprenden además vacuna viva modificada de quimera de tipo 1-tipo 2 de circovirus porcino (cPCV1-2). La administración de una o dos dosis a un animal de

15 una composición de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante descrita en la presente memoria es eficaz para proporcionar inmunidad, incluyendo inmunidad mediada por células y/o inmunidad humoral, frente a la infección con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 *Mycoplasma hyopneumoniae* (también denominado *M. hyopneumoniae*) es el agente etiológico de la neumonía porcina por micoplasma. La enfermedad produce tos crónica, pelo sin brillo, retraso del crecimiento y aspecto desharrapado que dura varias semanas. En los animales infectados se observan lesiones características de áreas de consolidación de color morado a gris, particularmente

25 en los lóbulos apical ventral y cardiaco. Aunque la enfermedad produce poca mortalidad, los cerdos afectados con frecuencia son propensos a infecciones secundarias por patógenos oportunistas, produciéndose la muerte o estrés. (R. F. Ross, *Mycoplasmal diseases*, páginas 436-444, en A. D. Laman, *et al.*, (eds.) *Diseases of Swine*, Iowa State University Press, 1986).

30 Se cree que la enfermedad es una de las causas más importantes de pérdida asociada con enfermedad en cerdos (Whittlestone, pág. 133-176, in Tully and Whitcomb (eds.), *The Mycoplasma Vol 2: Human and Animal Mycoplasmas*, New York, Academic Press, (1979)). La enfermedad generalmente hace que se produzca una ganancia de peso ineficaz y animales atrofiados y enfermos. Además,

35 los cerdos afectados con frecuencia son propensos a padecer una infección

secundaria por organismos oportunistas (Burch, Pig America pág. 26-27, diciembre de 1982). El impacto económico de la enfermedad es significativo. Sólo las pérdidas económicas suponen una estimación de entre 200 y 250 millones de dólares al año.

Mycoplasma hyopneumoniae es una bacteria molesta, de crecimiento lento, que carece de pared celular. Con frecuencia es difícil de aislar del tracto respiratorio debido a *Mycoplasma hyorhinis*, un agente secundario común también localizado en el tracto respiratorio. La enfermedad se propaga por aerosol, producido por la tos, y por contacto directo con un cerdo portador afectado o convaleciente. La mezcla de animales infectados y no infectados produce una reinfección precoz y frecuente. La infección a menudo empieza con la infección de los lechones por madres portadoras en el parto.

Debido a la técnicas de tratamiento de las piaras, la infección puede no ser evidente hasta más tarde en la vida del cerdo. Normalmente se observa otra infección después del destete cuando se reúnen los cerdos. La enfermedad manifiesta normalmente se observa en los cerdos a las seis semanas de edad o más. Las tasas de crecimiento y las tasas de conversión de alimento están notablemente reducidas en los animales infectados. Los tratamientos existentes que usan antibióticos son caros y requieren un uso prolongado. La reinfección de los animales sigue suponiendo un problema.

Por lo tanto, las vacunas son actualmente el método más eficaz para evitar infecciones y sus consecuencias. Ha habido numerosos intentos de proporcionar una vacuna para proteger a los cerdos frente a la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Varios investigadores han descrito vacunas que comprenden antígenos de superficie producidos de manera recombinante de *Mycoplasma hyopneumoniae*, Schaller et al., patente de Estados Unidos N° 4.894.332, expedida el 16 de enero de 1990; publicación de patente europea N° 283.840, publicada el 28 de septiembre de 1988. La publicación PCT N° WO 86/00019, publicada el 3 de enero de 1986, describe una vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* que comprende exclusivamente membranas plasmáticas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, sin otros componentes celulares. Etheridge et al., Res. Vet. Sci. 33:188 (1982) consideró incompleta la protección frente a la colonización pulmonar por *Mycoplasma hyopneumoniae* cuando se administraba una vacuna viva por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Kristensen et al., Am. J. Vet. Res. 42:784 (1981) no observó protección del ganado porcino frente a la neumonía por micoplasma después de la inyección con *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivado

MA

por calor. Ross *et al.*, *Am. J. Vet. Res.* 45:1899 (1984) descubrió que el uso de extractos de *Mycoplasma hyopneumoniae* preparados por un procedimiento de congelación-descongelación para inmunizar cerdos proporcionaba sólo una protección variable, y en algunos casos se detectó un mayor desarrollo de lesiones en cerdos inmunizados. Estos investigadores también estudiaron una vacuna de células enteras preparada por inactivación con formalina. La inactivación con formalina obstaculizó considerablemente la inmunogenicidad protectora de *Mycoplasma hyopneumoniae*, y esta vacuna no era eficaz. Yoshioka *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 3.917.819 (expedida el 4 de noviembre de 1975) describe varias vacunas de *Mycoplasma* muerto que comprende *Mycoplasma* inactivado con formalina, incluyendo una vacuna inactivada para *Mycoplasma hyopneumoniae*. La publicación de patente europea de Chung-Nan 571.648 describió una vacuna de *M. hyopneumoniae* basada en la cepa altamente proliferativa y antigénica PRIT-5.

En el mercado están disponibles vacunas basadas en cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento inactivado. Fort Dodge Animal Health (FDAH) comercializa bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* con el nombre *Mycoplasma hyopneumoniae* Suvaxyn® y Respifend® para uso como vacuna para proteger a los cerdos sanos frente a los signos clínicos producidos por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Esta vacuna de bacterina se recomienda como una vacuna de dos dosis para cerdos de al menos una semana de edad, administrando la segunda dosis de dos a tres semanas después de la primera vacunación.

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

M. hyopneumonia expresa, en su superficie, lipoproteínas membranas, particularmente las proteínas P46, P65 y P97, que llevan determinantes antigénicos específicos de especie. Recientemente, Bouh *et al.* describieron anticuerpos monoclonales contra P46 y P65 de la cepa J de referencia de *M. hyopneumoniae*

SD

vivo avirulento ATCC 25934. *Clin. Diag. Lab. Immunology* 10(3):459-468 (2003). Blank y Stemke describieron un mapa físico y genético del genoma de la cepa J de *M. hyopneumoniae*, *Can. J. Microbiol.* 46:832-840 (2000) y Wilton *et al.* describieron la exploración de bibliotecas de expresión generadas a partir de la cepa J no patógena de *M. hyopneumoniae* y la exploración de esas bibliotecas con antisuero hiperinmune porcino contra *M. hyopneumoniae*.

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

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente descripción proporciona composiciones, incluyendo composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna, que comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento y un adyuvante biológicamente aceptable. Las composiciones descritas en la presente memoria inducen una respuesta inmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, previniendo y/o minimizando de esta manera la gravedad de la enfermedad producida por este organismo o mejorando al menos un síntoma asociado con la enfermedad.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una composición para inducir una respuesta inmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en un animal, comprendiendo dicha composición una cantidad inmunológicamente eficaz de una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* y un adyuvante biológicamente aceptable.

En una realización, la composición comprende una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de al menos 90% con la secuencia de ácido nucleico de una cepa J de referencia.

En una realización, la composición comprende una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de al menos 95% con la secuencia de ácido nucleico de una cepa J de referencia.

En una realización, la composición comprende una cepa viva avirulenta de

51

Mycoplasma hyopneumoniae cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de al menos 99% con la secuencia de ácido nucleico de una cepa J de referencia.

5 En una realización, la composición comprende una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* que tiene una identidad polimórfica de al menos aproximadamente 70% con una cepa J de referencia.

En una realización, la composición comprende una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* que tiene una identidad polimórfica de al menos aproximadamente 85% con una cepa J de referencia.

10 En una realización, la composición comprende una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* que tiene una identidad polimórfica de al menos aproximadamente 95% con una cepa J de referencia.

En una realización, el porcentaje de homología de la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en las composiciones descritas en la presente memoria se determina por comparación con una cepa J avirulenta de referencia que tiene el número de acceso ATCC 25934 (Número de Acceso del GenBank AE017243) o 27715. En ciertas realizaciones distintas, la cepa de referencia puede ser una cepa que es una cepa virulenta, por ejemplo, las que tienen los números de acceso ATCC 25617 ó 25095.

20 En una realización, el porcentaje de identidad polimórfica de la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en las composiciones descritas en la presente memoria se determina por comparación con una cepa J avirulenta de referencia que tiene el número de acceso ATCC 25934 o 27715. En ciertas realizaciones distintas, la cepa de referencia puede ser una cepa que es una cepa virulenta, por ejemplo, las que tienen los números de acceso ATCC 25617 ó 25095.

En una realización, la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en las composiciones descritas en la presente memoria es una cepa J designada con el número de acceso de la ATCC 25934 ó 27715.

30 En una realización, la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en las composiciones descritas en la presente memoria es una cepa J designada con el número de acceso de la ATCC 27715.

En una realización, la respuesta inmune inducida por una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* protege a un animal frente a la infección con, o reduce la gravedad de al menos un síntoma asociado con una infección por una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

En una realización, la administración de una dosis a un animal de una composición de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante descrita en la presente memoria es eficaz para proporcionar inmunidad al animal frente a la infección por *Mycoplasma*.

5 En una realización, la administración de dos dosis a un animal de una composición de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante descrita en la presente memoria es eficaz para proporcionar inmunidad al animal frente a la infección por *Mycoplasma*.

10 Las composiciones de vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante descritas en la presente memoria pueden emplearse de manera adecuada para uso en cerdos frente a la infección y enfermedad producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* y encontrarán utilidad en el tratamiento y/o prevención de la propagación de la infección y enfermedad causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* en poblaciones porcinas.

15 De esta manera, las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna de la presente descripción emplean uno o más *Mycoplasma hyopneumoniae* vivos avirulentos en combinación con uno o más adyuvantes tales como un adyuvante biológicamente aceptable. El adyuvante biológicamente aceptable puede ser, opcionalmente, uno o más adyuvantes seleccionados entre el grupo consistente en SP-Oil, SL-CD, un polímero de ácido acrílico (tal como Carbopol®, Noveon, Inc., Cleveland, OH) y una mezcla de un aceite metalizable tal como uno o más hidrocarburos de terpeno insaturados, por ejemplo escualeno o escualano, y un copolímero de bloque de polioxietileno-polipropileno tal como Pluronic® (BASF, Florham Park, New Jersey).

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

53

copolímero de bloque de polioxietileno-polipropileno, la relación entre polímero de ácido acrílico y copolímero de bloque de polioxietileno-polipropileno/aceite metabolizable típicamente está en una relación comprendida entre aproximadamente 1:25 y aproximadamente 1:50 y típicamente en una
5 concentración final comprendida entre aproximadamente 1% y aproximadamente 25% (v/v).

En una realización, el adyuvante biológicamente aceptable comprende SP-Oil. En una realización, el SP-Oil está presente a una concentración comprendida entre aproximadamente 1% y aproximadamente 25% v/v. En una realización, el SP-
10 Oil está presente a una concentración comprendida entre aproximadamente 5% y aproximadamente 15% v/v. En una realización, el SP-Oil está presente a una concentración de aproximadamente 10% v/v.

Dentro de ciertas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden emplear, en una combinación adicional, una o más bacterias vivas
15 distintas, bacterinas, toxoides y/o antígenos virales. De esta manera, dentro de ciertos aspectos de estas realizaciones, la composición de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante puede comprender una cantidad inmunológicamente eficaz de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento y uno o más adyuvantes biológicamente aceptables en combinación adicional con (a) una o más bacterias
20 vivas; (b) una o más bacterinas; (c) uno o más toxoides purificados de uno o más patógenos tales como, por ejemplo, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y bacteria *Leptospira*; y/o (d) uno o más antígenos virales en los que el virus se selecciona entre el grupo
25 consistente en virus de la gripe porcina (SIV), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de la viruela de mapache que expresa PRRS y/u otros antígenos, TGEV que expresa PRRS y/u otros antígenos, y circovirus porcino (PCV). Dentro de ciertos aspectos de estas realizaciones, en la presente memoria se ejemplifican composiciones, incluyendo composiciones inmunogénicas
30 o composiciones de vacuna, que emplean, en combinación adicional, vacuna viva modificada de quimera de tipo 1-tipo 2 de circovirus porcino (cPCV1-2). Dentro de estas realizaciones o de realizaciones alternativas, las composiciones, incluyendo composiciones de vacuna o inmunogénicas, pueden incluir además u opcionalmente un conservante y estabilizante tal como, por ejemplo, SGGK,
35 timerosol y/o EDTA.

SH

La concentración de dicha otra bacteria viva, bacterina, toxoide y/o antígeno viral empleado en las composiciones descritas en la presente memoria dependerá de la naturaleza de la bacteria viva, bacterina, toxoide y/o antígeno viral que típicamente están presentes en las composiciones descritas en la presente memoria. Para las composiciones en las que el otro antígeno es bacteriano, las bacterias típicamente están presentes a una concentración final comprendida entre aproximadamente $0,5 \times 10^5$ y $0,5 \times 10^{10}$ por mililitro. Como alternativa, las bacterias están presentes a una concentración final comprendida entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ y $0,5 \times 10^9$ por mililitro o a una concentración final comprendida entre aproximadamente $0,5 \times 10^7$ y $0,5 \times 10^8$ por mililitro.

Un segundo aspecto de la invención proporciona métodos para generar una respuesta inmune frente a *Mycoplasma hyopneumoniae*, o para proteger a un animal frente a la enfermedad producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* y/o para prevenir o mejorar un brote de dicha enfermedad entre poblaciones animal por medio de la administración de una composición de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante como se describe en la presente memoria. En un aspecto relacionado, la presente descripción también proporciona métodos para potenciar una respuesta inmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Estos métodos comprenden las etapas de administrar a un animal, tal como un cerdo, en una o dos dosis, una composición que comprende una o más cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante.

En una realización, los métodos de la presente invención usan una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de 90% con la secuencia de ácido nucleico de una cepa J de referencia.

En una realización, los métodos de la presente invención usan una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de 95% con la secuencia de ácido nucleico de una cepa J de referencia.

En una realización, los métodos de la presente invención usan una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de 99% con la secuencia de ácido nucleico de una cepa J de referencia.

En una realización, los métodos de la presente invención usan una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* que tiene una identidad polimórfica



de al menos aproximadamente 70% con una cepa J de referencia.

En una realización, los métodos de la presente invención usan una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* que tiene una identidad polimórfica de al menos aproximadamente 85% con una cepa J de referencia.

5 En una realización, los métodos de la presente invención usan una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* que tiene una identidad polimórfica de al menos aproximadamente 95% con una cepa J de referencia.

 En una realización, la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en los métodos de la invención, como se describe en la presente memoria,
10 es una cepa J designada con el número de acceso de la ATCC 25934 ó 27715.

 En una realización, la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* usada en los métodos de la invención, como se describe en la presente memoria, es una cepa J designada con el número de acceso de la ATCC 27715.

 En una realización, la invención proporciona un método para potenciar una
15 respuesta inmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, comprendiendo el método las etapas de:

 a) en un primer momento, administrar una primera composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento con un material adyuvante
20 biológicamente aceptable a un animal;

 a) en un segundo momento, administrar una segunda composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento con un material adyuvante biológicamente aceptable a un animal;

25 En ciertas realizaciones, dependiendo de la aplicación precisa contemplada, las composiciones pueden administrarse por vía parenteral, tal como por inyección intramuscular, subcutánea o intraperitoneal, o por aplicación tópica de una crema. Como alternativa, las composiciones pueden administrarse por medio de un aerosol, por vía intranasal u oral, tal como por pulverización intranasal o
30 administración oral mediante administración manual o aplicación en masa.

 Un tercer aspecto de la invención proporciona el uso de las cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* descritas en la presente memoria y de composiciones que comprenden estas cepas para la preparación de un medicamento para tratar a un animal que padece una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* o que
35 padecen al menos un síntoma asociado con una infección con *Mycoplasma*

hyopneumoniae.

Estas y otras realizaciones, características y ventajas de la invención serán evidentes tras la descripción detallada y reivindicaciones adjuntas indicadas más adelante en la presente memoria. Todas las patentes, solicitudes de patente y otras referencias bibliográficas citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de incoherencias prevalecerá la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de describir los métodos y la metodología de tratamiento de la presente memoria, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritas, ya que estos métodos y condiciones pueden variar. También se tiene que entender que la terminología usada en la presente memoria sólo tiene el fin de describir realizaciones particulares y no debe considerarse limitante.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto especifique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en la presente memoria y/o que serán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de esta descripción y similares.

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

Si bien en la práctica o ensayos de la invención se puede emplear cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente

memoria, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

DEFINICIONES

5 Los términos usados en la presente memoria tienen los significados reconocidos y conocidos por los expertos en la materia, sin embargo, por conveniencia y para que resulte más completo, a continuación se exponen términos particulares y sus significados.

10 El término "aproximadamente" o "más o menos" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Dicho intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, típicamente dentro de 50%, más típicamente dentro de 20%, aún más típicamente dentro de 10% e incluso más típicamente dentro de 5% de un valor o intervalo dado. La variación permisible incluida por el término "aproximadamente" o "más o menos" depende del sistema particular que se
15 esté estudiando y, puede apreciarse fácilmente por un experto habitual en la materia.

"Adyuvante" significa una composición compuesta por una o más sustancias que potencian la antigenicidad de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento en una composición, típicamente una composición de vacuna. Un adyuvante puede
20 servir como depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfóide que potencia de manera no específica la respuesta inmune (Hood, et al., *Immunology, Segunda Ed.*, Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. pág. 384). Con frecuencia, una vacunación primaria con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, no podrá inducir una respuesta
25 inmune humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, hemocianinas de lapa californiana y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como N-
30 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, BCG (*bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Preferiblemente, el adyuvante es biológicamente aceptable.

35 Los adyuvantes empleados en las composiciones descritas en la presente

56

memoria típicamente son "adyuvantes biológicamente aceptables" y, por lo tanto, pueden usarse en combinación con *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento de tal forma que las composiciones resultantes pueden administrarse *in vivo* sin toxicidad concomitante a un animal. En la presente memoria se ejemplifican composiciones que incluyen *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento en combinación con uno o más adyuvantes biológicamente aceptables seleccionados entre el grupo consistente en SP-Oil, SL-CD, Carbopol, y una mezcla de un aceite metabolizable tal como uno o más hidrocarburos de terpeno insaturados, por ejemplo escualeno o escualano y un copolímero de bloque de polioxietileno-polipropileno tal como Pluronic®.

Una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento o molécula del mismo es "antigénica" cuando es capaz de interaccionar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmune, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor de antígeno de células T. Típicamente, una molécula antigénica es un polipéptido, o una variante del mismo, que contiene un "epítipo", de al menos aproximadamente cinco y típicamente al menos aproximadamente 10 aminoácidos. Una parte antigénica de un polipéptido, también denominada en la presente memoria "epítipo" puede ser la parte que es inmunodominante para el anticuerpo o el reconocimiento del receptor de células T o puede ser una parte usada para generar un anticuerpo contra la molécula por conjugación de la parte antigénica con un polipéptido de soporte para la inmunización. Una molécula que es antigénica no necesita ser inmunogénica por sí misma, es decir, capaz de inducir una respuesta inmune sin un soporte.

La expresión "al menos" significa no menos de.

Como se usa en la presente memoria, una "bacterina" es un conjunto de bacteria que se ha inactivado y que, en combinación con ciertos adyuvantes, puede inducir inmunidad protectora para proteger frente a una enfermedad o infección cuando se administra a animales.

Los polímeros de ácido acrílico son típicamente carbómeros. Los carbómeros están disponibles en el mercado con el nombre comercial "Carbopol" y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 2.909.462 y 3.790.665, de las que cada una se incorpora en la presente memoria como referencia.

El término "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, estabilizante, conservante y/o vehículo con el cual se administra un compuesto o

composición. Estos vehículos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Con frecuencia se emplean como vehículo, particularmente para soluciones inyectables, agua o soluciones acuosas, soluciones salinas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato, soluciones de Ringer y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol. El vehículo o diluyente no puede ser tóxico y no puede afectar a la actividad biológica del antígeno/inmunógeno. En las composiciones de la invención también pueden usarse otras sustancias auxiliares adicionales tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes del pH y similares. Los conservantes pueden incluir, por ejemplo, timerosol y/o EDTA. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, 18ª Edición se describen vehículos farmacéuticos adecuados. En la técnica se conocen bien una amplia diversidad de vehículos y la selección de vehículos específicos está bien dentro del nivel de los expertos en la materia.

La expresión "unidad formadora de colonias" o "CFU" es una unidad de medición usada para indicar el número de organismos que pueden replicarse en una muestra dada. Se basa en la teoría de que una colonia procede de la replicación de un par/grupo de células de bacterias individuales.

La "cantidad inmunológicamente eficaz" es la cantidad de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento que inducirá una respuesta inmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. La "cantidad inmunológicamente eficaz" dependerá de la especie, variedad, edad, tamaño y estado de salud del animal receptor y se verá influenciada por la exposición previa del animal a una o más cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* tanto si una o más cepas son una cepa virulenta o una cepa avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Como se usa en la presente memoria, una "cantidad inmunológicamente eficaz" de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo a virulento, cuando se emplea en combinación con un adyuvante adecuado, es la cantidad de *Mycoplasma hyopneumoniae* que es suficiente para potenciar la inmunogenicidad del *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento y por lo tanto proporciona inmunidad protectora frente a la exposición a una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*. En una realización, una cantidad inmunológicamente eficaz es un mínimo de aproximadamente 1×10^3 organismos. En una realización, una cantidad inmunológicamente eficaz varía de aproximadamente 1×10^3 unidades formadoras de colonias/ml (CFU/ML) a

10

aproximadamente 1×10^{11} CFU/ML. En una realización, una cantidad inmunológicamente eficaz es aproximadamente 5×10^7 CFU/ML.

Como se usa en la presente memoria, el término "inmunogénico" significa que el *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento es capaz de inducir una
5 respuesta inmune humoral y/o celular. Una cepa inmunogénica también es antigénica. Una composición inmunogénica es una composición que induce una respuesta inmune humoral y/o celular cuando se administra a un animal.

La expresión "composición inmunogénica" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo, un
10 microorganismo, pudiéndose usar dicha composición para inducir una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmune puede incluir una respuesta de células T, una respuesta de células B, o una respuesta tanto de células T como de células B. La composición puede servir para sensibilizar al mamífero por la presentación de antígeno en asociación con moléculas del MHC en la superficie
15 celular. Además, pueden generarse linfocitos T o anticuerpos con especificidad de antígeno para permitir la protección futura de un hospedador inmunizado. Una "composición inmunogénica" puede contener una vacuna viva, atenuada o muerta/inactivada que comprende un microorganismo entero o una parte inmunogénica derivada del mismo que induce una respuesta inmune mediada por
20 células (células T) o una respuesta inmune mediada por anticuerpos (células B), o ambas, y puede proteger al animal de uno o más síntomas asociados con la infección por el microorganismo, o puede proteger al animal de la muerte debido a la infección por el microorganismo.

Como se usa en la presente memoria, el término "aislado" significa que el
25 material mencionado se retirado de su entorno nativo. De esta manera, un material biológico aislado puede carecer de algunos o todos los componentes celulares, es decir, componentes de las células en las que existe de forma natural el material nativo (por ejemplo componentes citoplásmicos o de la membrana). Un material está aislado si está presente en un extracto o sobrenadante celular. Una proteína
30 aislada puede estar asociada con otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambas cosas, con las que está asociada en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a la membrana. Un orgánulo, célula o tejido aislado se retira del sitio anatómico en el que se encuentran en un organismo. Un material aislado puede estar purificado pero no lo está necesariamente.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "MHDCE" se refiere a

equivalentes celulares de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae* y se define como una unidad de medición usada para determinar el número aproximado de organismos *Mycoplasma hyopneumoniae* presentes en una muestra dada.

La expresión "administración parenteral", como se usa en la presente memoria, significa la administración por algún otro medio distinto del tracto gastrointestinal, particularmente la introducción de sustancias en un organismo por inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intramedular, pero también otras vías de administración no orales y no nasales tales como inyección intraperitoneal o aplicación tópica.

La expresión "identidad polimórfica con una cepa J de referencia" se refiere a una similitud entre el perfil de expresión de proteínas de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* que no es la cepa J y una cepa J de referencia de *Mycoplasma hyopneumoniae*. La identidad polimórfica puede basarse en una o más características de una o más proteínas, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, la cantidad o tamaño de una o más proteínas del microorganismo *Mycoplasma hyopneumoniae* en investigación, la velocidad de sedimentación de una o más proteínas, o cambios en las características físicas o bioquímicas de una o más proteínas. La expresión también puede incluir similitud entre las secuencias de nucleótidos que codifican una cualquiera o más proteínas de una cepa que no es la cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae* y una cepa J de referencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* e incluye cualquier mutación en estas secuencias, incluyendo delecciones o sustituciones. El cambio en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos es uno que permite la retención de la naturaleza avirulenta del organismo *Mycoplasma hyopneumoniae*. En la técnica se conocen una amplia diversidad de ensayos para observar alteraciones en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos. Por ejemplo, el tamaño y estructura de las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos se observan por perfilado Northern, Southern, Western, SDS-PAGE ELISA, PCR y protocolos de secuenciación de ADN como los conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Calus, D. *et al.* Veterinary Microbiology, Vol. 120, Ejemplares 3-4, 10 de marzo de 2007, páginas 284-291; Scarman, AL, *et al.* Microbiology (1997), Vol. 143: 663-673). Además, en la técnica son bien conocidos otros métodos para observar alteraciones en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos tales como el análisis de polimorfismos de conformación de una sola cadena (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.382.510 expedida el 7 septiembre de 1999 y la Patente de

[2]

Estados Unidos N° 5.952.170 expedida el 17 de enero de 1995).

El término "purificado" como se usa en la presente memoria, se refiere a un material que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluyendo materiales nativos a partir de los cuales se obtiene el material. Por ejemplo, una bacteria o proteína purificada típicamente carece sustancialmente de componentes de la célula hospedadora o cultivo, incluyendo proteínas de cultivo tisular o de huevo, patógenos no específicos y similares. Como se usa en la presente memoria, la expresión "sustancialmente sin" se usa de forma operativa, en el contexto del ensayo analítico del material. Típicamente, un material purificado sustancialmente sin contaminantes tiene una pureza de al menos 50%; más típicamente una pureza de al menos 90% y aún más típicamente una pureza de al menos 99%. La pureza puede evaluarse por cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de composición, ensayos biológicos y otros métodos conocidos en la técnica. Los métodos para la purificación son bien conocidos en la técnica. La expresión "sustancialmente puro" indica el mayor grado pureza que puede conseguirse usando técnicas de purificación convencionales conocidas en este campo.

Una "cepa de referencia" se refiere a una cepa de microorganismos, por ejemplo, *Mycoplasma hyopneumoniae*, que se obtiene a partir de una fuente fiable y que puede usarse como cepa de control para la cual pueden realizarse comparaciones con otros cultivos no establecidos o desconocidos. En la presente invención, las cepas de referencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden ser cepas J avirulentas que se obtienen en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y a las que se les asignan los números de acceso de la ATCC 25934 y 27715.

En la presente invención, estas "cepas de referencia" que tienen los números de acceso de la ATCC 25934 o 27715 también se han usado para preparar las composiciones inmunogénicas de la invención. En otras ciertas realizaciones de la presente invención, las cepas de referencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden obtenerse en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se les asigna los números de acceso de la ATCC 25617 y 25095.

El término "SL-CD" se refiere a una sulfolipo-ciclodextrina que pertenece a la familia de adyuvantes de ciclodextrina descritos en las patentes de Estados Unidos números 6.610.310 y 6.165.995. Típicamente, SL-CD se formula en una mezcla con un aceite metabolizable tal como uno o más hidrocarburos de terpeno

63

insaturados, por ejemplo, escualano, y preferiblemente con un tensioactivo no iónico, tal como monooleato de polioxietileno sorbitano.

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

Las expresiones "vacuna" o "composición de vacuna", que se usan indistintamente, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunogénica que induce una respuesta inmune en un animal. Una vacuna o composición de vacuna puede proteger al animal de la enfermedad o posible muerte debido a una infección, y puede o puede no incluir uno o más componentes adicionales que potencian la actividad inmunológica del componente activo. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender además otros componentes típicos de las composiciones farmacéuticas. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender además otros componentes típicos de vacunas o composiciones de vacuna, que incluyen, por ejemplo, un adyuvante o un inmunomodulador. El componente inmunogénicamente activo de una vacuna puede comprender organismos vivos completos en su forma original, o como organismos atenuados en una vacuna viva modificada, u organismos inactivados por métodos apropiados en una vacuna muerta o inactivada, o vacunas de subunidad que comprenden uno o más componentes inmunogénicos del virus, o vacunas modificadas por ingeniería genética, mutadas o clonadas preparadas por métodos conocidos por los expertos en la materia. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender uno o simultáneamente más de uno de los elementos descritos anteriormente.

Como se usa en la presente memoria, "virulento" se refiere a la capacidad de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* de producir la enfermedad asociada con la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*. La virulencia se puede evaluar observando la progresión de la enfermedad en el animal. Un ejemplo de una cepa "virulenta" de *Mycoplasma hyopneumoniae* es la ejemplificada por la cepa de exposición de *Mycoplasma hyopneumoniae*, como se describe y se usa en la presente invención. Otras cepas virulentas de *Mycoplasma hyopneumoniae* están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), designadas como Cepas N° 25617 ó 25095. El término "avirulento" se refiere a cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* que carecen de virulencia. Es decir, cepas avirulentas, aislados o

Ed

construcciones que no son patógenas y que no pueden producir la enfermedad. Como se usa en la presente memoria, el término "avirulento" se usa como sinónimo del término "no virulento". En la presente memoria se ejemplifican composiciones que emplean la cepa J de cultivo vivo avirulento de *M. hyopneumoniae* (FCX3-Line 1, que está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como Ceba N° 27715). Otra cepa "avirulenta" que también está disponible en la ATCC se denomina Ceba N° 25934. La cepa J designada con el número de acceso de la ATCC 27715 se clonó a partir de la cepa J parental a la que se le ha asignado el número de acceso de la ATCC 25934, como se describe en el catálogo de la ATCC.

10 DESCRIPCIÓN GENERAL

La presente descripción se basa en el descubrimiento de que uno o dos regímenes de dosificación de una composición de *Mycoplasma hyopneumoniae*, que incluye una composición inmunogénica o una composición de vacuna, usando uno o más *Mycoplasma hyopneumoniae* vivos avirulentos, tales como, por ejemplo la cepa J (FCX3-Line 1; N° de Acceso de la ATCC 27715) y uno o más adyuvantes, típicamente un adyuvante biológicamente aceptable, son eficaces para proteger frente a y/o prevenir o mejorar la enfermedad asociada con la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento.

En una realización, se contemplan otras cepas vivas avirulentas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, que incluyen, pero sin limitación, cepas J, cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de al menos aproximadamente 90%, o una homología de al menos aproximadamente 95%, o una homología de al menos aproximadamente 99%, con una cepa J de referencia, para uso en las composiciones y métodos de la presente invención.

En una realización, se contemplan otras cepas vivas avirulentas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, que incluyen, pero sin limitación, cepas J, que tienen una identidad polimórfica de al menos aproximadamente 70%, o una identidad polimórfica de al menos aproximadamente 85%, o una identidad polimórfica de al menos aproximadamente 95%, con una cepa J de referencia, para uso en las composiciones y métodos de la presente invención.

La cepa J de referencia se puede seleccionar entre las cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* a las que se les han asignado los números de acceso de la ATCC 25934 ó 27715.

En una realización, la cepa J viva avirulenta usada en las composiciones y métodos de la presente invención es una cepa J a la que se le ha asignado el

número de acceso de la ATCC 25934 ó 27715.

En una realización, la cepa J viva avirulenta usada en las composiciones y métodos de la presente invención es una cepa J a la que se le ha asignado el número de acceso de la ATCC 27715.

5 También se describe en la presente memoria que composiciones, incluyendo composiciones de vacuna que emplean una o más cepas vivas avirulentas de *Mycoplasma hyopneumoniae* en combinación adicional con vacuna viva modificada de quimera de Tipo 1 - Tipo 2 de Circovirus Porcino (cPCV1-2) (Véase la Publicación de Patente de Estados Unidos número 2003/0170270 y
10 número 2004/0253270) también son eficaces para proteger frente a y/o prevenir o mejorar la enfermedad asociada con la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento y/o la infección por Circovirus Porcino virulento.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden también una o más bacterias vivas, bacterinas y/o uno o más toxoides purificados
15 seleccionados entre el grupo consistente en *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y bacteria *Leptospira*.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden
20 además uno o más antígenos virales seleccionados entre el grupo consistente en un antígeno del virus de la gripe porcina (SIV) un antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de la viruela del mapache que expresa PRRS u otros antígenos, TGEV que expresa PRRS u otros antígenos, y un antígeno de circovirus porcino (PCV).

25 Dentro de ciertas realizaciones, la presente descripción se describe en lo sucesivo haciendo referencia a la protección frente a la infección con un homogeneizado pulmonar denominado LI-34 que contiene la cepa 11 de *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento (Véase J. Clin. Microbiol. 1999 Mar; 37:620-7(3). Sin embargo, se contempla que las composiciones descritas en la presente
30 memoria serán eficaces para proteger frente a y/o prevenir o mejorar la enfermedad o al menos un síntoma asociado con la enfermedad que está asociada con una amplia serie de infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento. En la técnica se conocen numerosos aislados de *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento y están disponibles a partir de diversas fuentes que incluyen la Colección Americana
35 de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852. Los ejemplos de

estas cepas virulentas incluyen, pero sin limitación, los números de acceso de la ATCC 25095, 27714 y 25617.

Las composiciones, en particular composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna, de la presente descripción pueden prepararse a partir de cultivos liofilizados o recogidos recientemente de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento por una o más metodologías fácilmente adquiribles en la técnica. Aquí se ejemplifican composiciones que comprenden la cepa J de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento (FCX3-line 1) que está disponible con el Número de la ATCC 27715 (un aislado filtrado y clonado tres veces con el Número de la ATCC 25934).

Mycoplasma hyopneumoniae vivo avirulento puede cultivarse por la metodología descrita en las Patentes de Estados Unidos N° 5.338.543 y 5.565.205, incorporándose ambas en su totalidad en la presente memoria. Más específicamente, *Mycoplasma hyopneumoniae* puede propagarse en medio de cultivo tal como medio completo PPLO (organismo de tipo de Pleuropneumonia) (Difco; Becton Dickinson and Company, San Jose, California). El crecimiento del organismo se controla por técnicas convencionales tales como la determinación de unidades de cambio de color (CCU) y se recoge cuando se ha conseguido un título suficientemente elevado. Las soluciones madre pueden concentrarse adicionalmente o liofilizarse por métodos convencionales antes de la inclusión en las formulaciones de composición. También pueden emplearse otros métodos tales como los descritos en Thomas *et al.*, *Agri-Practice* 7(5): 26-30.

Las condiciones en las que se desarrolla un aislado de *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden variar dependiendo de la composición precisa del medio y el aislado específico que se está desarrollando. Los aislados de *Mycoplasma hyopneumoniae* típicamente se desarrollan de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 144 horas, medido desde el tiempo de incubación al tiempo de recolección.

Dependiendo de la composición precisa a formular, *Mycoplasma hyopneumoniae* puede concentrarse, por ejemplo, por ultracentrifugación o ultrafiltración. El *Mycoplasma hyopneumoniae* concentrado puede recuperarse por una metodología conocida en la técnica y puede mezclarse con un vehículo fisiológicamente aceptable adecuado -- típicamente un medio acuoso tal como, por ejemplo, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), medio esencial mínimo (MEM), o MEM con tampón HEPES. Después puede combinarse adicionalmente con un adyuvante apropiado para proporcionar la concentración

deseada en una base de volumen por volumen (v/v). Las composiciones pueden comprender además uno o más quelantes, tales como EDTA, típicamente a una concentración de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,20% (p/v). Como alternativa, la cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* a usar en las composiciones inmunogénicas o de vacuna puede concentrarse como se ha descrito anteriormente o liofilizarse y resuspenderse en un adyuvante apropiado a la concentración deseada en una base de peso por volumen (p/v).

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones, incluyendo composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna, de la presente descripción generalmente comprenden una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* en combinación con uno o más adyuvantes, típicamente un adyuvante biológicamente aceptable.

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

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

(10) ml, típicamente entre aproximadamente dos (2) y aproximadamente cinco (5) ml, para la administración por vía oral o intranasal.

La mezcla adyuvante para uso en las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna de la presente descripción potencia la respuesta inmune estimulando las respuestas inmunes mediadas por células y/o locales (secretora de IgA). El adyuvante biológico aceptable puede ser, por ejemplo, uno o más adyuvantes seleccionados entre el grupo consistente en SP-Oil, SL-CD, un polímero de ácido acrílico (tal como Carbopol), y una mezcla de un aceite metabolizable tal como uno o más hidrocarburos de terpeno insaturados, por ejemplo escualeno o escualano y un copolímero de bloque de polioxietileno-polipropileno tal como Pluronic®. Los adyuvantes pueden seleccionarse adicionalmente entre citocinas, tales como IL-12 e IL-18; hidróxido de aluminio; copolímero de etileno-ácido maleico; DEAE dextrano; adyuvante derivado de pared celular de micobacterias; y similares.

La concentración de adyuvante empleado en las composiciones descritas en la presente memoria dependerá de la naturaleza del adyuvante. Los adyuvantes típicamente están presentes en las composiciones descritas en la presente memoria a una concentración final de aproximadamente 1-50% y más típicamente a una concentración final de aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25% o 30%. La concentración del antígeno en el adyuvante puede prepararse en una base de peso por volumen (p/v) o en una base de volumen por volumen (v/v). Por ejemplo, el antígeno a administrar en las composiciones de la invención puede prepararse en una forma liofilizada, seguido de reconstitución en el adyuvante directamente para producir las concentraciones específicas en una base de peso por volumen. Como alternativa, el antígeno primero puede reconstituirse en un diluyente apropiado (por ejemplo un tampón) al que después se le añade un adyuvante en un volumen suficiente para proporcionar la concentración final deseada de antígeno y adyuvante en una base de volumen por volumen, como se ha descrito anteriormente.

En ciertas realizaciones, un adyuvante puede administrarse con el antígeno/inmunógeno como una sola composición, o puede administrarse antes, conjuntamente con o después de la administración del antígeno/inmunógeno.

La elección del adyuvante depende de la estabilidad del antígeno/inmunógeno que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, la eficacia del adyuvante para la especie que se está

69

vacunando y también debe ser uno aprobado para uso en animales o seres humanos por los cuerpos reguladores pertinentes.

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

Las mezclas de adyuvantes adecuadas ejemplares incluyen, pero sin limitación, mezclas de uno o más polímeros de ácido acrílico con una mezcla de aceite metabolizable, por ejemplo un hidrocarburo de terpeno insaturado o un producto de hidrogenación del mismo, preferiblemente escualano (2,3,10,15,19,23-hexametiltetracosano) o escualeno, y un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno. Dicho polímero de ácido acrílico puede ser un homopolímero o un copolímero.

Los polímeros de ácido acrílico son típicamente carbómeros. Los carbómeros están disponibles en el mercado con el nombre comercial Carbopol y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 2.909.462 y 3.790.665, incorporándose ambas en la presente memoria como referencia.

Los copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno son tensioactivos, típicamente tensioactivos líquidos, que ayudan en la suspensión de componentes sólidos y líquidos. Los tensioactivos están disponibles en el mercado como polímeros con el nombre comercial Pluronic®. El tensioactivo poloxamer 401

está disponible en el mercado con el nombre comercial Pluronic® L121.

La mezcla de adyuvantes puede comprender un aceite metabolizable, un polímero de ácido acrílico y un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno formulado como una emulsión en un medio acuoso. Dentro de
5 ciertas realizaciones, la mezcla de adyuvantes puede incluir un aceite metabolizable y un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno tal como una mezcla de escualano y Pluronic® L121 (poloxámero 401) que puede estar presente en una cantidad comprendida entre aproximadamente 50 ml/l y aproximadamente 100 ml/l y el polímero de carboximetileno puede ser Carbopol 934P (Carbamer 934P), que
10 puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2 ml/l.

Los polímeros de ácido acrílico preferidos son los comercializados por B. F Goodrich como Carbopol 934 P NF y 941 NF, que son polímeros de ácido acrílico reticulados con polialilsacarosa y que tienen la fórmula química $(CH_2CHOOH)_n$. Estos polímeros forman geles acuosos que convenientemente se formulan con
15 vehículos acuosos. Los copolímeros de bloque de polioxietileno-polipropileno pueden ser los tensioactivos no iónicos comercializados por BASF como Pluronic® L121, L61, L81 o L101.

Dentro de ciertas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden emplear, en una combinación adicional, una o más bacterias
20 vivas, bacterinas, toxoides y/o antígenos virales distintos. De esta manera, dentro de ciertos aspectos de estas realizaciones, la composición de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante puede comprender una cantidad inmunizadora de un *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento y uno o más adyuvantes biológicamente aceptables en combinación adicional con (a) una o más bacterias
25 vivas tales como, por ejemplo, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y bacteria *Leptospira*; (b) una o más bacterinas; (c) uno o más toxoides purificados de uno o más patógenos tales como, por ejemplo, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus*
30 *suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y bacteria *Leptospira*; y/o (d) uno o más antígenos virales donde el virus se selecciona entre el grupo consistente en virus de la gripe porcina (SIV; tal como las cepas H1N1, H1N2 y H3N2 de SIV), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de la viruela del
35 mapache que expresa PRRS y/u otros antígenos, TGEV que expresa PRRS y/u

otros antígenos y circovirus porcino (PCV). En la presente memoria se ejemplifican composiciones, incluyendo composiciones de vacuna, que emplean una o más cepas vivas avirulentas de *Mycoplasma hyopneumoniae* en combinación adicional con la vacuna viva modificada de quimera de Tipo 1- Tipo 2 de circovirus porcino (cPCV1-2) (Véanse las Publicaciones de Patente de Estados Unidos 2003/0170270 y 2004/0253270).

Dentro de estas realizaciones o realizaciones alternativas, las composiciones, incluyendo composiciones de vacuna, pueden incluir además u opcionalmente un conservante tal como, por ejemplo timerosol y/o EDTA. Véanse también las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2002/0131980 y 2003/0017171, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

La concentración de estas otras bacterias vivas, bacterina, toxoide y/o antígeno viral empleado en las composiciones descritas en la presente memoria dependerá de la naturaleza de la bacterina, toxoide y/o antígeno viral y típicamente éstos están presentes en las composiciones descritas en la presente memoria a una concentración final comprendida entre aproximadamente $0,5 \times 10^5$ y $0,5 \times 10^{10}$ por ml. Como alternativa, las bacterias están presentes en una concentración final comprendida entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ y $0,5 \times 10^9$ por ml o comprendida entre aproximadamente $0,5 \times 10^7$ y $0,5 \times 10^8$ por ml.

Las composiciones de la presente descripción encontrarán utilidad en métodos para proteger a un animal contra la enfermedad producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* y/o para prevenir o mejorar un brote de dicha enfermedad entre poblaciones de animales por medio de la administración de una composición de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante como se describe en la presente memoria. Las composiciones descritas en la presente memoria también pueden emplearse ventajosamente en métodos para potenciar una respuesta inmune en un animal, tal como una respuesta inmune mediada por células y/o humoral, contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Estos métodos comprenden las etapas de administrar a un animal, típicamente un cerdo, en una o dos dosis, una composición que comprende una o más cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante. Dependiendo de la aplicación precisa contemplada, las composiciones pueden administrarse por vía intramuscular, subcutánea oral por aerosol o intranasal.

De acuerdo con los métodos de la presente descripción, un régimen de

22

dosificación deseable implica la administración de una o más dosis de una composición de vacuna deseada al cerdo. Típicamente, cuando se administran dos dosis al animal, las dosis se administran dejando un intervalo comprendido entre aproximadamente una (1) semana y aproximadamente cuatro (4) semanas, más típicamente entre aproximadamente dos (2) semanas y aproximadamente tres (3) semanas.

EJEMPLOS

La presente descripción se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes:

10 EJEMPLO 1: Preparación de una Vacuna Viva Avirulenta de *M. hyopneumoniae* con Adyuvante

Este ejemplo describe la preparación de una composición de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante de acuerdo con la presente descripción.

15 *Mycoplasma hyopneumoniae* puede obtenerse a partir de varias fuentes disponibles fácilmente. En una realización descrita en la presente memoria, la cepa J del cultivo vivo avirulento de *M. hyopneumoniae* (FCX3-Line 1), se obtuvo en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas, VA) como Cepa de la ATCC N° 27715. Puede usarse cualquier otra cepa avirulenta de *M.*
20 *hyopneumoniae* para la preparación de las composiciones tales como, por ejemplo, la cepa J parental a la que se le ha asignado el número de acceso de la ATCC 25934. En ciertas realizaciones distintas, se prevé que cualquier cepa viva virulenta de *Mycoplasma pneumoniae* puede modularse, atenuarse o mutarse hasta que se establezca que el cultivo es avirulento, como se determina por ensayo *in vitro* o *in*
25 *vivo*, usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. La secuencia genómica completa de la cepa J ATCC 25934 se ha publicado por Vasconcelos et al (J. Bacteriol. (2005), 187(16): 5568-5577) y se le asignado el número de acceso del GenBank AE017243. Varias de las secuencias asociadas con la cepa de ATCC 25934 pueden encontrarse en PubMed y tienen los números de acceso del
30 GenBank AY737012 (gen de ADN ribosómico 16S), AY512905 (gen de adhesina), AF013714 (gen de prolipoproteína p65), U02538 (gen de ARNr 23S) y U02537 (genes homólogos de proteína de resistencia multifármaco).

Cada composición de vacuna para el ensayo bactericida se preparó a partir de un vial liofilizado de un cultivo de *M. hyopneumoniae* rehidratado con 20 ml de
35 solución salina normal. Las composiciones de vacuna incluían una combinación de

23

5 ml del cultivo rehidratado y adyuvante suficiente para adquirir la concentración de adyuvante especificada en un volumen final de 10 ml. También se preparó una composición de control combinando 5 ml de cultivo rehidratado con 5 ml de solución salina normal. Todas las composiciones se mezclaron durante 5 minutos antes del muestreo. Se tomaron muestras a partir de todas las composiciones a 5 minutos (0 horas), 3 horas y 7 horas después de la mezcla. La viabilidad de cada vacuna se determinó por Unidades Formadoras de Colonias (CFU) en cada punto de muestreo (véase la Tabla 1).

TABLA 1

	CFU/ml			MPN/ml		
Adyuvante	0 horas	3 horas	7 horas	0 horas	3 horas	7 horas
30% de SL-CD	1,44E +07	0	0	1,15E +07	0	0
10% de SL-CD	1,48E +07	6,40E +05	5,2E +03	2,87E +07	8,42E +05	0,00E +00
Control	8,30E +07	1,06E +08	9,00E +07	3,62E +07	6,22E +07	3,62E +07
5% de SP-Oil	9,46E +07	7,60E +07	2,55E +07	4,67E +07	9,40E +07	6,22E +06
5% de SP-Oil /0,2% de Carbopol	1,50E +08	5,61 E +07	4,53E +07	4,27E +08	7,74E +07	2,84E +06
Control	2,17E +08	1,41E +08	9,86E +07	1,91E +08	8,42E +07	4,67E +07
10% de SP-Oil	1,09E +07	1,07E +07	7,13E +06	3,40E +06	7,74E +06	3,62E +06
Control	3,50E +07	4,75E +07	7,20E +07	1,03E +07	8,42E +07	3,14E +07
10% de SP-Oil /+0,2% de Carbopol	5,20E +07	1,30E +07	8,13E +06	5,50E +07	1,91E +07	2,26E +06
0,2% de carbopol	6,80E +07	6,67E +07	6,60E +07	1,63E +08	1,38E +08	4,45E +07
Control	2,90E +07	no ensayado	5,54E +07	1,23E +08	no ensayado	1,38E +07

7d

La viabilidad media del cultivo madre se determinó calculado la media de todas las viabilidades de control a 0 horas, media $9,09 \times 10^7$ CFU/ml. En comparación, se determinó el número más probable (MPN) para los cultivos madre dando como resultado $1,85 \times 10^8$ MPN/ml. La mezcla de la vacuna y la vacunación típicamente tarda menos de 3 horas; por lo tanto, cuando se observa el efecto bactericida de los adyuvantes, el punto de tiempo de 3 horas es el más importante. La tendencia para SP-Oil al 5% y 10% en el punto de muestreo de 3 horas en comparación con el control es una diferencia de dos veces y de cuatro veces, respectivamente.

Se preparó vacuna A por rehidratación de viales de cultivo liofilizado con diluyente que contenía una concentración final de SP-Oil de 10% (v/v). La vacuna de placebo era solución salina normal estéril.

EJEMPLO 2: EFICACIA *IN VIVO* DE VACUNAS VIVAS AVIRULENTAS DE *M. HYOPNEUMONIAE* CON ADYUVANTE EN CERDOS

Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* de composiciones de vacuna de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante ilustrativas.

Se adquirió un total de 30 cerdos, de cuatro a seis semanas de edad en la piara SPF de Fort Dodge Animal Health en Charles City, Iowa. Los cerdos se mantuvieron sin antibióticos o promotores del crecimiento y recibieron agua y alimento *ad libitum*. Los animales que recibieron composiciones de vacuna y composiciones de control se encerraron en diferentes sales y todos los cerdos se mantuvieron en condiciones similares durante los periodos de vacunación, control y exposición.

Los 30 cerdos se asignaron aleatoriamente a tres (3) grupos como se indica a continuación: Uno (1) recibió una composición de vacuna, otro (1) grupo recibió un placebo y otro (1) grupo sirvió como control ambiental. Los cerdos se agruparon como se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2

Grupo	Nº de Total de cerdos	Vacuna	Nº de cerdos expuestos
1	13	A	13
2	12	Placebo	12
3	5	N/A	N/A

Los cerdos de cuatro a seis semanas de edad se vacunaron por vía intramuscular con una dosis de 2 ml de la vacuna apropiada. Al grupo 1 se le

75

administró vacuna A, al grupo 2 se le administró el placebo. Los cerdos del grupo 3 no se vacunaron ni se expusieron y sirvieron como controles ambientales. Los cerdos del grupo 1 se vacunaron dos veces, con un intervalo de dos semanas. Dos semanas después de la segunda vacunación, todos los cerdos de los grupos 1 y 2 se expusieron con un homogeneizado pulmonar (LI-34) que contenía una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae* Cepa 11 (J. Clin. Microbiol., 1999 Mar; 37(3): 620-7). Cuatro semanas después de la exposición, todos los cerdos de los grupos 1-3 se sometieron a una necropsia y se evaluaron las lesiones pulmonares.

Preparación de Homogeneizado Pulmonar (LI-34) PARA la Cepa de Exposición de *M. hyopneumoniae*

Se obtuvieron siete cerdos cruzados de Spring Prairie Colony Farms (Genetipork) y se inocularon por vía intratraqueal con 10 ml de una dilución 1:30 de un homogeneizado pulmonar bruto al 10% (LI31) de la cepa 11 de *M. hyopneumoniae*. El homogeneizado pulmonar bruto de LI31 se había producido sometiendo a pases homogeneizado pulmonar que contenía *M. hyopneumoniae* en cerdos sin patógeno específicos y recogiendo los pulmones neumónicos resultantes en la primera fase del estadio medio de la enfermedad. Los homogeneizados pulmonares se almacenaron a -70°C hasta que se necesitaron.

Se recogió suero tras la llegada y en la necropsia de todos los cerdos y se evaluó en el ISU Veterinary Diagnostic Laboratory (ISU-VDL) para demostrar la presencia de anticuerpos contra TGE (PRCV), SW y PRV. Además, se realizaron ELISA para anticuerpos contra PRRSV y *M. hyopneumoniae* y todas las muestras fueron negativas para todos los patógenos respiratorios anteriores.

Todos los cerdos se sometieron a una necropsia. Se usó pentobarbital para inducir anestesia profunda de cerdos antes de la exsanguinación. Se abrió la pared torácica ventral y se extrajeron áreas de lesiones neumónicas típicas de *M. hyopneumoniae* asépticamente y se pusieron individualmente en recipientes estériles.

Una pequeña porción de cada pulmón se trituró y se comprobó la pureza en placas de agar sangre, caldo de infusión cardíaca bovina y medio Friis. Las diluciones de los tubos se realizaron en medio Friis para titular el *M. hyopneumoniae*. Las piezas de pulmón restantes se congelaron en tubos de centrifuga de 50 ml a -70°C hasta que se conocieron los resultados de la bacteriología y el aislamiento de micoplasma. Se usaron lóbulos pulmonares de 3 de los 7 cerdos para producir el inóculo pulmonar de *M. hyopneumoniae*.

Ab

Se descongelaron trozos de lóbulos de los cerdos nº 329, 331 y 332 y se trituraron en medio Friis que no contenía antibióticos. La pureza del inóculo pulmonar se confirmó por cultivo en infusión de corazón bovino, agar sangre y medio Friis. Sólo se encontraron micrococos consistentes con la contaminación ambiental en una placa. El inóculo pulmonar se tituló con respecto a los niveles de *M. hyopneumoniae* y se descubrió que contenía aproximadamente 10^7 CCU/ml. Una alícuota se sometió a ISU-VDL para ensayos de aislamiento de virus para SN, EMS, enterovirus, HEV, PRCV, PRRSV, Pseudorrabia, TGE, parvovirus y rotavirus. Los resultados de todos los ensayos fueron negativos. El volumen final del inóculo pulmonar triturado (etiquetado como LI 34) fue de 1780 ml a partir de 178,1 gramos de tejido pulmonar. Se dividió en 100 alícuotas de 5 ml y 110 alícuotas de 10 ml.

En la segunda fase del estudio, se usaron 9 cerdos en la determinación de la concentración de inóculo pulmonar necesaria para inducir una media de 8% de lesiones pulmonares neumónicas en un mínimo de 80% de los cerdos. Todos los cerdos se expusieron a la cepa 11 de *M. hyopneumoniae* LI34 por vía intratraqueal como se ha descrito previamente. Las diluciones de exposición incluían 1:30, 1:100 y 1:500.

Los cerdos se sometieron a necropsias. Se usó pentobarbital para inducir anestesia profunda de cerdos antes de la exsanguinación. Los pulmones se retiraron y se dibujaron las lesiones pulmonares en diagramas pulmonares convencionales. Se recogió suero de todos los cerdos y se ensayó por ELISA con respecto a los anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*. Todos los cerdos fueron poco positivos o seronegativos para *M. hyopneumoniae*, lo que sugiere que no hubo exposición previa a *M. hyopneumoniae* antes de la llegada. Se recogieron torundas traqueales asépticamente de todos los cerdos. Se aislaron *Pasteurella multocida* y *Haemophilus parasuis* a partir de 3 y 4 cerdos respectivamente. Se aisló *M. hyopneumoniae* a partir de todos los cerdos expuestos. Los dibujos pulmonares se evaluaron con un sistema de análisis de imágenes Zelss para determinar el porcentaje de lesiones pulmonares neumónicas.

30 CONCLUSIONES

La exposición de los cerdos fue satisfactoria y una dilución de 1:100 sería la dilución óptima de uso. El porcentaje medio de neumonía inducida fue 10,17 +/- 6,6, que es mayor de lo normal, sin embargo esto puede atribuirse a la presencia de *Pasteurella multocida* y *lo parasuis* en los cerdos. Además, 100% de los cerdos inoculados con el inóculo de exposición tuvieron lesiones pulmonares significativas.

En general, estos resultados son bastantes típicos de lo que se observa en los estudios de *M. hyopneumoniae*, ya que si están presentes otros patógenos, hay un aumento en la neumonía. Esto puede deberse a la interacción entre los patógenos y el sistema inmune. Los presentes solicitantes produjeron 1.600 ml de inóculo pulmonar de *M. hyopneumoniae* para uso en experimentos de exposición experimentales. El inóculo producirá al menos 8% o más lesiones pulmonares neumónicas en un mínimo de 80% de cerdos inoculados cuando se use a una dilución de 1: 100 por vía intratraqueal.

La vacuna se tituló antes del día de la vacunación y se realizaron ensayos bactericidas para determinar los sistemas adyuvantes apropiados a usar (véase el Ejemplo 1). A partir de estos datos, se eligió sistema adyuvante SP-Oil al 10% para un estudio adicional. La viabilidad media por vial de cultivo madre fue $3,64 \times 10^9$ CFU/Frasco.

El día de la primera administración, se prepararon composiciones de vacuna como se indica a continuación: Vacuna A -- cada uno de tres viales de cultivo liofilizado de *M. hyopneumoniae* avirulento se hidrató con 10 ml de diluyente SP-Oil al 10%. Los tres viales de composición de vacuna para cada tipo de diluyente se reunieron y se dejaron mezclar durante 20 minutos en una placa de agitación con una barra de agitación. El placebo era solución salina normal dividida en alícuotas en un frasco estéril para la administración. Las composiciones permanecieron en hielo durante el transcurso de la vacunación durante 2 horas.

El día de la segunda administración, se prepararon composiciones de vacuna como se indica a continuación: Vacuna A -- cada uno de tres viales de cultivo liofilizado de *M. hyopneumoniae* avirulento se hidrató con 10 ml de diluyente SP-Oil al 10%. Los tres viales de cultivo rehidratado para cada tipo de diluyente se reunieron y se dejaron mezclar durante 20 minutos en una placa de agitación con una barra de agitación. El placebo era solución salina normal dividida en alícuotas en un frasco estéril para la administración. Las composiciones permanecieron en hielo durante el transcurso de la vacunación durante 2 horas.

La concentración de *M. hyopneumoniae* viable en cada posición se determinó antes y después de la administración. La viabilidad se evaluó determinando las Unidades Formadoras de Colonias (CFU/ml). Un vial de cultivo madre liofilizado se rehidrató con 10 ml de solución salina normal, se dejó mezclar durante 20 minutos y sirvió como control para el ensayo de viabilidad. Como la viabilidad del primer control fue menor que la viabilidad de la vacuna de ensayo,

28

durante la segunda administración se rehidrataron dos viales y se reunieron para servir como control (véanse las viabilidades de la vacuna de ensayo y las viabilidades de control en la Tabla 3).

TABLA 3

Vacuna	Primera Vacunación CFU/ml	Segunda Vacunación CFU/ml
Grupo 1: Adyuvante SP-Oil al 10%	2,79E +08	2,27E +08
Control de Viabilidad	1,29E +08	2,69E +08

- 5 En todos los cerdos se observaron diariamente las temperaturas y los síntomas clínicos empezando dos días antes de cada administración y continuando durante siete días después de cada administración. En los cerdos se observaron los síntomas clínicos que incluían, pero sin limitación, tos, estornudos, descarga nasal, depresión, inapetencia y dificultad de respirar.
- 10 Catorce días después de la segunda administración, los cerdos del grupo 1 se expusieron por vía intratraqueal a una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae*.
- El día de la exposición, una solución madre de exposición de *M. hyopneumoniae* virulento de homogeneizado pulmonar congelado (-70°C) (LI-34), se descongeló rápidamente con agua caliente y se diluyó (dilución 1:100). Los
- 15 cerdos se sedaron con una mezcla de Xylazine-Ketamine-Telazol™ consistente en 50 mg/ml de Xylazine, 50 mg/ml de Ketamine y 100 mg/ml de Telazol. Cada cerdo recibió 10 ml del material de exposición por vía transtraqueal. Para asegurar la colocación de la aguja, se aspiró aire en la jeringa antes de la administración del material de exposición. En todos los cerdos se observaron diariamente los síntomas
- 20 clínicos después de la exposición.
- Se extrajo sangre de los cerdos para recoger suero los días 0, 14, 28 y 56. La respuesta serológica de los cerdos a la exposición a *M. hyopneumoniae* se determinó por ELISA. Cuatro semanas después de la exposición, todos los cerdos de los grupos 1-3 se sacrificaron y se retiraron los pulmones. Los grupos de ensayo
- 25 tuvieron un diseño ciego y se puntuaron con respecto a las lesiones pulmonares macroscópicas. Las lesiones de *M. hyopneumoniae* atípicas se fijaron con formalina para la evaluación histopatológica posterior. Se recogieron muestras de torunda del pulmón afectado para el aislamiento de bacterias.
- La puntuación de lesión pulmonar media para los cerdos del grupo 1 (5,9%)

fue aproximadamente 50% menor que en el grupo del placebo (14,8%). Cuando el análisis estadístico se ajustó por camada, la fracción mitigada para el grupo 1 fue una reducción de 69,2% en la gravedad de las lesiones pulmonares en comparación con los controles. Estos datos se resumen en la Tabla 4. Todos los cerdos fueron seronegativos el día de la primera administración, lo que indica que los cerdos eran susceptibles a la infección por *M. hyopneumoniae*. Con la excepción de un (1) cerdo en el grupo de SP-Oil, los cerdos no se seroconvirtieron después de la primera vacunación. Todos los cerdos que recibían la composición de vacuna con SP-Oil como adyuvante desarrollaron una respuesta de anticuerpo después de la segunda exposición. La respuesta serológica demuestra que se indujo una respuesta inmune contra *M. hyopneumoniae*. (Véanse los resultados serológicos en la Tabla 9)

TABLA 4

Vacuna	Descripción	Reducción de Fracción Mitigada en Lesiones en Comparación con el Control	Reducción de Fracción Mitigada Menor Nivel de Confianza
Vacuna A	<i>M. hyopneumoniae</i> vivo avirulento con 10% de SP-Oil	69,2	40,2
Control	Placebo	NA	NA

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

Aunque la invención se ha descrito en cada una de sus diversas realizaciones, es de esperar que el experto en la materia pueda realizar y ejecutar ciertas modificaciones sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención, como se indica en la descripción previa y como se incorpora adicionalmente en las siguientes reivindicaciones. La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente



memoria. De hecho, serán evidentes para los expertos en la materia diferentes modificaciones de la invención además de las descritas en esta memoria a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende que dichas modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además

5 debe entenderse que todos los valores son aproximados y se proporcionan con fines descriptivos. Todas las patentes y solicitudes de patente citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

EJEMPLO 3: ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD PRELIMINAR DE LA FRACCIÓN DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* DE VACUNA VIVA MODIFICADA DE

10 QUIMERA DE TIPO 1 - TIPO 2 DE CIRCOVIRUS PORCINO - CEPA VIVA AVIRULENTE DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*

Vacuna de Combinación en Cerdos de 3-4 Semanas de Edad

Este ejemplo describe la eficacia de una vacuna de combinación que comprende una cepa J (FCX3-line1) de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo

15 avirulento con adyuvante y una vacuna viva de quimera de Tipo 1 - Tipo 2 de Circovirus Porcino (PCV) (cPCV1-2; véanse las Patentes de Estados Unidos N° 7.279.166 y 7.276.353) cuando se administra por vía intramuscular (IM) o vía intranasal (IN) en cerdos de 3-4 semanas. Esta vacuna de combinación (PCV/MH) es adecuada para uso para la vacunación de cerdos sanos como ayuda en la

20 prevención y/o reducción de la gravedad de la enfermedad producida por *M. hyopneumoniae* y Circovirus Porcino.

La vacuna de ensayo objetivo debe contener aproximadamente 4,0 Log₁₀ FAID₅₀/dosis de virus vivo modificado cPCV1-2 y 4x10⁸ CFU/dosis de cepa J de *M. hyopneumoniae* (véase King *et al*, Journal of Comparative Medicine and Vet.

25 Science, 29: 85-89 (1965) y la patente de Estados Unidos N° 4.824.785 en relación con el método FAID). A la vacuna se le añadió adyuvante para que contuviera una concentración final de SP-Oil de 10% (v/v). La vacuna de placebo era solución salina normal estéril.

En este estudio se empleó un total de 66 cerdos de 3-4 semanas de edad. A

30 16 cerdos se les administraron 2 ml de vacuna viva PCV/MH por vía intramuscular una vez y se sometieron a la exposición (Grupo 1); a 15 cerdos se les administraron 2 ml de vacuna viva PCV/MH por vía intramuscular dos veces (con un intervalo de dos semanas) y se sometieron a la exposición (Grupo 2); a 15 cerdos se les administraron 2 ml (1 ml/cavidad nasal) de vacuna viva PCV/MH por vía intranasal

35 dos veces (con un intervalo de dos semanas) y se sometieron a la exposición

81

(Grupo 3); a 15 cerdos no se les administró la vacuna viva de PCV/MH y se sometieron a exposición (Grupo 4); y 5 cerdos sirvieron como controles ambientales (Grupo 5).

La vacuna usada en el estudio descrito en la presente memoria era una combinación de antígeno vivo liofilizado MH (lote nº 1744-56) y vacuna viva PCV (Lote C108-56) que contenía diluyente. El día de la vacunación, la torta de MH vivo liofilizado se rehidrato con diluyente que contenía virus vivo PCV (4,0Log₁₀FAID₅₀/ml con SP Oil al 10% como adyuvante). A la vacuna final se le asignó el número de lote 2315-30. La viabilidad para la fracción MH se determinó antes y después de la vacunación, 3,18 x 10⁸ CFU/ml (antes) y 1,65 x 10⁸ CFU/ml (después), respectivamente. El título de PCV para la vacuna antes y después de la vacunación fue de 4,09 Log₁₀ FAID₅₀ y 3,7 Log₁₀ FAID₅₀, respectivamente. La vacuna para la segunda vacunación se preparó como se ha indicado anteriormente y recibió el número de lote 2315-32. La viabilidad para la fracción de MH fue 1,24 x 10⁸ CFU/ml y 1,5 x 10⁸ CFU/ml antes y después de la vacunación respectivamente. La viabilidad para la fracción de PCV fue de 4,36 Log₁₀ FAID₅₀ y 3,83 Log₁₀ FAID₅₀, respectivamente.

Los cerdos se observaron durante 7 días después de la vacunación para determinar cualquier reacción adversa a la vacuna. Tres cerdos murieron durante el periodo de observación posterior a la vacunación debido a causas no relacionadas con MH o PCV. En la Tabla 5 se encuentra un resumen de las observaciones clínicas del periodo posterior a la vacunación.

Tabla 5

Grupo	Nº de cerdos	Tratamiento	Vía	Dosificación	Observación después de la vacunación
1	16	Vacunación	IM	1 dosis	Se detectó que un cerdo tenía temperatura elevada (105,1-106,2°F) durante 7 días consecutivos empezando quince días después de la primera vacunación. Se detectó que otro cerdo tenía temperatura elevada, inapetencia y depresión durante 4 días consecutivos

82

					empezando 18 días después de la primera vacunación.
2	15	Vacunación	IM	2 dosis	Un cerdo murió el día antes de la segunda vacunación debido a posible infección por HPS o S. suis. Se detectaron signos clínicos de depresión y delgadez antes de la vacunación. Un cerdo tuvo temperatura elevada 3 días consecutivos (105,0-106,7°F) empezando 5 días después de la primera vacunación.
3	15	Vacunación	IN	2 dosis	Dos días antes de la segunda vacunación, un cerdo murió debido a una perforación intestinal. Dos cerdos tuvieron inflamación en las articulaciones y tos durante 8 días consecutivos, que se había originado antes de la primera vacunación. En otros dos cerdos, se detectaron un día antes de la segunda vacunación que tenían corvejones inflamados durante 7 días consecutivos en los que uno produjo un absceso y el otro se curó.
4	15	Solución salina	IM	2 dosis	Se detectó que un cerdo tenía corvejones inflamados a lo largo del estudio antes de la primera vacunación. Otro cerdo también tuvo corvejones hinchados varios días durante

83

					el estudio. Un cerdo tuvo temperatura elevada durante dos días consecutivos de 105,1°F y 106,5°F empezando 6 días después de la segunda vacunación.
5	5	Sin vacunación	NA	NA	Alojados con los cerdos del grupo 4 durante la vacunación. Sin detectarse reacciones adversas.

NA No aplicable

IN: intranasal

IM Intramuscular

5 Todos los cerdos de los grupos 1-4 se expusieron con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae* (homogeneizado pulmonar de cerdo que contenía MH virulento (LI-34)). Los cerdos del Grupo 1 se expusieron cuatro semanas después de la primera vacunación. Los cerdos de los Grupos 2-4 se expusieron dos semanas después de la segunda vacunación. A las cuatro semanas después de la exposición, todos los cerdos de los Grupos 1-5 se sometieron a necropsias y se

10 evaluaron las lesiones pulmonares.

La vacuna se tituló antes del día de la vacunación. El cultivo liofilizado de *M. hyopneumoniae* avirulento se rehidrató el día de la vacunación. La concentración de organismos de *M. hyopneumoniae* en la vacuna fue de aproximadamente 2×10^8 CFU/ml. Se conservó una muestra de vacuna y se realizó un ensayo de viabilidad

15 antes y después de la vacunación para confirmar las CFU/ml reales. La vacuna se mantuvo en hielo durante el transcurso de la vacunación.

En todos los cerdos se observaron diariamente las temperaturas y signos clínicos empezando dos días antes de cada vacunación y continuando durante siete días después de cada vacunación. En los cerdos se observaron los síntomas

20 clínicos que incluían, pero sin limitación, tos, estornudos, descarga nasal, depresión, inapetencia y dificultad de respirar. Catorce días después de la segunda administración, los cerdos de los grupos 1-4 se expusieron por vía intratraqueal con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae*.

El día de la exposición, la solución madre de exposición de *M. hyopneumoniae* virulento, un homogeneizado pulmonar congelado (-70°C) (LI-34)

25

se descongeló rápidamente con agua caliente y se diluyó (dilución 1:100) usando medio de crecimiento de *M. hyopneumoniae* estéril. Los cerdos se sedaron con una mezcla de Xylazine-Ketamine-Telazol™ que comprendía 50 mg/ml de Xylazine, 50 mg/ml de Ketamine y 100 mg/ml de Telazol. Cada cerdo recibió 10 ml del material de exposición por vía transtraqueal. Para asegurar la colocación de la aguja, se aspiró aire en la jeringa antes de la administración del material de exposición.

Todos los cerdos se observaron macroscópicamente para determinar los signos clínicos después de la exposición. La observación se realizó diariamente para cualquier signo clínico anormal. Se extrajo sangre de los cerdos para recoger suero (no más de 13 ml de sangre entera) los días 0, 14, 28 y 56 del estudio. Se recogió suero, pero no se evaluó. Puede realizarse un ELISA en el futuro para evaluar la respuesta serológica de los cerdos usando el suero recogido durante el periodo de estudio.

Cuatro semanas después de la exposición, todos los cerdos de los grupos 1-5 se sacrificaron y se retiraron los pulmones. Las lesiones de *M. hyopneumoniae* atípicas se fijaron con formalina y las muestras se examinaron para histopatología. Se recogieron muestras de torunda del pulmón afectado para el aislamiento de bacterias. Los cerdos que murieron después de la exposición se sometieron a necropsias y se recogieron muestras como se ha descrito anteriormente. La eficacia de la vacuna se definió como una puntuación de lesión pulmonar media combinada de los animales vacunados que fue 50% menos que la puntuación de lesión pulmonar media combinada de los controles.

El día de la necropsia todos los cerdos se sacrificaron, se puntuaron las lesiones pulmonares y se recogieron muestras de torunda para el aislamiento de bacterias. Las bacterias aisladas a partir de las torundas consistían en las siguientes: *Staphylococcus heamolyticus*, *Streptococcus suis* (P322), *Staphylococcus epidermis*, *A. pyogenes*, *aerococus species*, *S. uberis*, *Bordetella bronchiseptica* (P344) y *Microbacterium*. El análisis estadístico para las puntuaciones de lesión pulmonar se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Grupo	Relación de protección	Ajustado Camada MF	MF nivel de confianza menor	Puntuación de lesión pulmonar en porcentaje ajustada por camada	Puntuación de lesión pulmonar LCL	Desviación típica de lesión pulmonar	Percentil medio para lesiones
Vacunado IM una sola dosis	1/15	52,9%	19,6%	6,30%	3,86%	4,41	0,37
Vacunado IM doble dosis	3/15	63,8%	33,8%	5,03%	2,39%	4,59	0,31
Vacunado IN doble dosis	0/14	-8,6%	-51,8%	12,86%	8,59%	7,38	0,65
Control	0/15	NA	NA	11,46%	8,41%	5,5	0,62

LCL = Nivel de Confianza Menor

MF = Fracción Mitigada

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

EJEMPLO 4: Estudio de Inmunogenicidad de la Fracción de *Mycoplasma hyopneumoniae* de Vacuna de Combinación Viva Modificada de Quimera de Tipo 1 - Tipo 2 de Circovirus Porcino - Cepa Viva Avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* en Cerdos de 3-4 Semanas de Edad

Este ejemplo describe un estudio de inmunogenicidad que confirma los resultados del estudio presentado en el Ejemplo 4 y confirma la eficacia de la fracción de *M. hyopneumoniae* de la vacuna combinada de vacuna viva modificada de quimera de Tipo 1 - Tipo 2 de Circovirus Porcino (cPCV1-2) cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* (MH/PCV) cuando se administra por vía

86

intramuscular. La vacuna de MH/PCV descrita en la presente memoria puede emplearse de manera adecuada para la vacunación de cerdos sanos como ayuda en la prevención y/o minimización de la gravedad de la enfermedad producida por *M. hyopneumoniae* y Circovirus Porcino.

5 Los cerdos usados en el presente estudio eran seronegativos a *M. hyopneumoniae* como se determina por ELISA.

Un total de 79 cerdos de tres a cuatro semanas de edad se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos. 24 cerdos, Grupo 1, se vacunaron con una sola dosis de la vacuna viva de combinación de PCV/MH. 24 cerdos, Grupo 2, se
10 vacunaron con la vacuna de combinación dos veces con un intervalo de dos semanas. 24 cerdos, Grupo 3, se vacunaron con solución salina normal dos veces con un intervalo de dos semanas para servir como controles de exposición. Todas las vacunas se administraron por vía intramuscular. Cuatro cerdos, Grupo 4, ni se vacunaron ni se expusieron y sirvieron como controles ambientales.

15 La vacuna usada en el estudio fue una combinación de antígeno vivo liofilizado MH (lote nº -66) y diluyente que contiene vacuna viva de PCV (cPCV1-2 Lote C108-56). El día de la vacunación, la torta de MH vivo liofilizado se rehidrató con diluyente que contenía virus vivo PCV ($3,5 \text{Log}_{10} \text{FAID}_{50}/\text{ml}$ con SP Oil al 10% como adyuvante). A la vacuna final se le dio el nombre de Lote 2315-40. La
20 viabilidad para la fracción MH se determinó antes y después de la vacunación, $2,09 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ y $1,56 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$, respectivamente. La vacuna de placebo era solución salina normal estéril.

La vacuna para la segunda vacunación se preparó como se ha indicado anteriormente y recibió el número de lote 2315-42. La viabilidad para la fracción de
25 MH fue $1,05 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ y $6,72 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$ antes y después de la vacunación respectivamente. La viabilidad para el diluyente de la fracción de PCV fue $3,44 \text{Log}_{10} \text{FAID}_{50}$.

La vacuna se tituló antes del día de la vacunación. El cultivo liofilizado de *M. hyopneumoniae* avirulento se rehidrató el día de la vacunación. Se retuvo una
30 muestra de vacuna y se realizó un ensayo de viabilidad antes y después de la vacunación para confirmar las CFU/ml. La vacuna se mantuvo en hielo durante el transcurso de la vacunación.

En todos los cerdos se observaron diariamente las temperaturas y signos clínicos empezando dos días antes de cada vacunación y continuando durante 7
35 días después de cada vacunación. En los cerdos se observaron los síntomas

87

clínicos que incluían, pero sin limitación, tos, estornudos, descarga nasal, depresión, inapetencia y dificultad de respirar.

Los cerdos se observaron durante 7 días después de la vacunación para determinar cualquier reacción adversa a la vacuna. Tres cerdos murieron durante el periodo de observación posterior a la vacunación debido a causas no relacionadas con MH o PCV. En la Tabla 7 se encuentra un resumen de las observaciones clínicas del periodo posterior a la vacunación.

TABLA 7

Grupo	Nº de cerdos	Tratamiento	Dosificación	Observación después de la vacunación
1	24	Vacunación	1 dosis	Sin reacciones adversas detectadas debido a la vacunación
2	24	Vacunación	2 dosis	Un cerdo murió en este grupo debido a perforación intestinal. En los 5 días posteriores a la primera vacunación un cerdo tuvo una temperatura de 105,5°F y se detectó dificultad respiratoria durante un día.
3	24	Vacunación con solución salina	NA	6 días después de la primera vacunación en un cerdo se detectó dificultad respiratoria durante un solo día.
4	4	Sin vacunación	NA	Alojados con los cerdos del grupo 3 durante la vacunación. Sin detectarse reacciones adversas.

NA: No aplicable

Todos los cerdos de los Grupos 1-3 se expusieron con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae* a aproximadamente a las 7 semanas de edad. Los cerdos del Grupo 1 se expusieron cuatro semanas después de la primera vacunación. Los cerdos de los Grupos 2 y 3 se expusieron dos semanas después de la segunda vacunación. La solución madre de exposición de *M. hyopneumoniae* virulento, un homogeneizado pulmonar congelado (-70°C) (LI-34) se descongeló rápidamente con agua caliente y se diluyó (dilución 1:100) usando medio de crecimiento de *M. hyopneumoniae* estéril. Los cerdos se sedaron con una mezcla de Xylazine-

Ketamine-Telazol™ que comprendía 50 mg/ml de Xylazine, 50 mg/ml de Ketamine y 100 mg/ml de Telazol. Cada cerdo recibió 10 ml del material de exposición por vía transtraqueal.

Se extrajo sangre de los cerdos para recoger los suero los días 0, 14, 28 y 56 del estudio. Las muestras de suero recogidas de este estudio pueden ensayarse para evaluar la respuesta serológica de los animales a *M. hyopneumoniae* y PCV2 usando métodos ELISA bien conocidos en este campo. Las muestras de suero recogidas desde cero días después de la vacunación (0DPV) y cero días después de la exposición (0DPC) pueden ensayarse con respecto a los anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*, gripe porcina (H1N1) y síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) usando kits de ensayo ELISA disponibles en el mercado.

Cuatro semanas (28 DPC) después de la exposición, todos los cerdos de los grupos 1-4 se sacrificaron y se retiraron los pulmones. Se registraron las puntuaciones de lesión pulmonar y las lesiones de *M. hyopneumoniae* típicas se fijaron con formalina. Se examinaron muestras para la histopatología. Se recogieron muestras de torundas de un lóbulo afectado por *M. hyopneumoniae* para el aislamiento de bacterias para detectar infecciones secundarias. Además, se recogió fluido de lavado bronquioalveolar. Los pulmones se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y el fluido resultante se dividió en alícuotas para el ensayo por PCR.

Para la evaluación de la reducción de la gravedad de las lesiones pulmonares, el estimador fue el parámetro estadístico fracción mitigada (MF). La fracción mitigada se calculó como:

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

donde:

W_1 = suma de rangos de Wilcoxon

n_c = número de sujetos en el grupo de control

n_v = número de sujetos en el grupo vacunado

Se calculó el intervalo de confianza de 95% para la fracción mitigada.

Para la reivindicación de reducción de gravedad de lesiones pulmonares:

$$H_0: M_v = M_c$$

$$H_A: M_v < M_c$$

donde:

89

M_v = mediana de la puntuación de lesión pulmonar en el grupo vacunado

M_c = mediana de la puntuación de lesión pulmonar en el grupo de control

5 La distribución de frecuencia de las variables de resultados continuos se evaluó usando PROC UNIVARIATE, que realiza análisis paramétricos y no paramétricos de una muestra de una sola población. (SAS Institute Inc., Cary NC). Se emplearon transformaciones logarítmicas de los títulos de anticuerpo para satisfacer las suposiciones de normalidad requeridas para los ensayos
10 paramétricos. Las evaluaciones basales para evaluar la comparabilidad de grupos por camada y sala se realizarán mediante chi-cuadrado. La gravedad de las lesiones pulmonares se comparó entre cada grupo vacunado y el grupo de control por ensayo de suma de rangos de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY) con puntuación de lesión pulmonar como variable dependiente y tratamiento incluido como variable
15 independiente. PROC NPAR1WAY, que realiza ensayos no paramétricos para la localización y diferencias de escala a través de una clasificación de una vía; PROC NPAR1WAY también proporciona un análisis convencional de varianza sobre los datos de partida y los parámetros estadísticos basándose en la función de distribución empírica. (SAS Institute Inc., Cary NC).

20 Todos los análisis estadísticos se realizarán usando el sistema SAS. En casos en los que la transformación no mejora la distribución de los residuos para ninguna variable transformada como se determina por el ensayo W para normalidad, se emplearon ensayos no paramétricos cuando fue necesario. El nivel de significados establecerá a $p < 0,05$.

25 El día de la necropsia todos los cerdos se sacrificaron, se puntuaron las lesiones pulmonares y se recogieron muestras de torunda para el aislamiento de bacterias. También se recogieron lavados bronquioalveolares (BAL). Las bacterias aisladas a partir de las torundas consistían en las siguientes: *Actinobacillus species*, *Moraxella osloensis*, *Streptococcus sanguinis*, *A. pyogenes* y *Bordetella*
30 *bronchiseptica*. Las muestras de BAL se ensayaron con respecto a MH por la metodología de PCR; dos muestras del grupo de control ambiental con lesiones registradas y dos muestras con puntuaciones de lesión bajas en el grupo vacunado y de control. Las muestras de BAL para los dos cerdos del grupo de control ambiental con lesiones fueron negativas y los cerdos con bajas puntuaciones de
35 lesiones en el grupo vacunado fueron positivas. El análisis estadístico para las

90

puntuaciones de lesión pulmonar se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Grupo	Relación de protección	Ajustado por Camada MF	MF nivel de confianza menor	Puntuación de lesión pulmonar en porcentaje ajustada por camada	Puntuación de lesión pulmonar LCL	Desviación típica de lesión pulmonar	Percentil medio para lesiones
Vacunado IM una sola dosis	1/23	58,4%	31%	8,84%	6,68%	4,99	0,38
Vacunado IM doble dosis	4/19	71,2%	48,7%	6,62%	4,37%	4,67	0,3
Control	0/23	NA	NA	19,27%	14,62%	10,76	0,69

LCL = Nivel de Confianza Menor

MF = Fracción Mitigada

- 5
- El análisis estadístico de los datos satisface los criterios de la fracción mitigada (<50%, con LCL >30%) para la reducción en las lesiones pulmonares. La vacuna se considera eficaz para la fracción de MH con una dosis de 2 ml administrada IM, como una sola dosis o una dosis doble, a $2,09 \times 10^8$ CFU/ml. Además la vacuna se considera segura debido a la ausencia de signos clínicos relacionados con MH o PCV después de la vacunación.
- 10

TABLA 9

RESULTADOS DE SEROLOGÍA PARA EL EJEMPLO 2

Cerdo ID	Grupo	ODPV1	ODPV2	ODPC	Necropsia	Puntuación pulmonar
730	1	<50	100	400	400	9,5
733	1	<50	<50	100	>400	35,5
735	1	<50	<50	100	200	5,5
740	1	<50	<50	200	400	5,5
742	1	<50	<50	200	200	0,5
745	1	<50	<50	200	100	0,9
754	1	<50	<50	400	400	6,8

91

Cerdo ID	Grupo	ODPV1	ODPV2	ODPC	Necropsia	Puntuación pulmonar
755	1	<50	<50	400	>400	0,0
761	1	<50	<50	200	200	4,5
762	1	<50	<50	>400	200	0,5
763	1	<50	<50	400	200	2,7
771	1	<50	<50	>400	>400	5,5
774	1	<50	<50	>400	>400	0,0
732	2	<50	<50	<50	<50	1,8
738	2	<50	<50	<50	<50	5,9
739	2	<50	<50	<50	50	18,2
743	2	<50	<50	<50	50	19,1
747	2	<50	<50	<50	200	0,5
749	2	<50	<50	<50	50	21,4
752	2	<50	<50	<50	<50	9,5
759	2	<50	<50	<50	<50	15,9
764	2	<50	<50	<50	<50	26,4
768	2	<50	<50	<50	<50	31,8
769	2	<50	<50	<50	<50	16,8
773	2	<50	<50	<50	<50	10,0
726	3	<50	<50	<50	<50	0,0
744	3	<50	<50	<50	<50	0,0
750	3	<50	<50	<50	<50	0,0
767	3	<50	<50	<50	<50	1,4
770	3	<50	<50	<50	<50	0,5

Grupo 1: vacuna con SP Oil (vacunado y expuesto)

Grupo 2: Control/exposición (no vacunado y expuesto)

Grupo 3: Control sin exposición (no vacunado y no expuesto)

5 ODPV1 y ODPV2: Los números indican la máxima dilución que fue positiva en el ensayo ELISA después de la primera dosis de vacuna (ODPV1) o después de la segunda dosis de vacuna (ODPV2).

 ODPC: Los números indican los resultados de ELISA después de la exposición. El mayor número indica seroconversión.

10 Puntuación pulmonar El número indica el porcentaje de lesiones en los pulmones de los animales. El número superior indica un mayor número

92

de lesiones pulmonares debido a la ausencia de inmunidad protectora. El número inferior indica un cerdo más sano con menos lesiones debido a la inducción de una respuesta inmune protectora.

93

REIVINDICACIONES

1. Una composición para inducir una respuesta inmune anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* en un animal, comprendiendo dicha composición una cantidad
5 inmunológicamente eficaz de una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* y un adyuvante biológicamente aceptable.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa cuyo genoma comprende una secuencia
10 de ácido nucleico que tiene una homología de al menos aproximadamente 90% con la secuencia de ácido nucleico de una cepa J de referencia.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa que tiene una identidad polimórfica de al
15 menos aproximadamente 70% con una cepa J de referencia.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la que la cepa J de referencia es una cepa que tiene el número de acceso de la ATCC 25934
20 ó 27715.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa J designada con el número de acceso de la ATCC 25934 ó 27715.
- 25 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa J designada con el número de acceso de la ATCC 27715.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho
30 adyuvante biológicamente aceptable se selecciona entre el grupo consistente en uno o más de SL-CD, Carbopol y SP-Oil.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que dicho adyuvante biológicamente aceptable comprende SP-Oil.

9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho SP-Oil está presente a una concentración comprendida entre aproximadamente 1% y aproximadamente 25%.
- 5 10. La composición de la reivindicación 9, en la que dicho SP-Oil está presente a una concentración de aproximadamente 10%.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además una o más bacterias vivas, bacterinas y/o uno o más toxoides
- 10 purificados seleccionados entre el grupo consistente en *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y bacteria *Leptospira*.
- 15 12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además uno o más antígenos virales seleccionados entre el grupo consistente en un antígeno del virus de la gripe porcina (SIV) un antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de la viruela del mapache que expresa PRRS u otros antígenos, TGEV que expresa PRRS u otros antígenos, y un
- 20 antígeno de circovirus porcino (PCV).
13. La composición de la reivindicación 12, en la que dicho antígeno de circovirus porcino (PCV) es una quimera de Tipo 1 - Tipo 2 de Circovirus Porcino (cPCV1-2).
- 25 14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que la respuesta inmune inducida por una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* protege a un animal frente a la infección con, o reduce la gravedad de al menos un síntoma asociado con una infección por una cepa virulenta de
- 30 *Mycoplasma hyopneumoniae*.
15. Un método para proteger a un animal frente a una enfermedad asociada con una cepa virulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae*, o para prevenir o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad, comprendiendo dicho método la
- 35 etapa de administrar a dicho animal una composición de acuerdo con una

95

cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

16. El método de la reivindicación 15, en el que la etapa de administración se consigue por administración parenteral.

5

17. El método de la reivindicación 16, en el que la etapa de administración parenteral se consigue por inyección intramuscular.

18. El método de la reivindicación 15, en el que la etapa de administración se
10 consigue por administración oral.

19. El método de la reivindicación 18, en el que la etapa de administración oral se consigue por administración manual o aplicación en masa.

15 20. El método de la reivindicación 15, en el que la etapa de administración se consigue por administración nasal.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15-20, en el que el
20 dicho animal es un cerdo.

22. Un método de prevención o mejora de un brote de *Mycoplasma hyopneumoniae*, que comprende la etapa de administrar a un animal una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

25 23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que la composición es una composición inmunogénica.

24. La composición inmunogénica de la reivindicación 23, en la que dicho
30 adyuvante biológicamente aceptable se selecciona entre el grupo consistente en uno o más de SL-CD, Carbopol y SP-Oil.

25. La composición inmunogénica de la reivindicación 24, en la que dicho adyuvante biológicamente aceptable comprende SP-Oil.

35 26. La composición inmunogénica de la reivindicación 25, en la que dicho SP-

96

Oil está presente a una concentración comprendida entre aproximadamente 1% y aproximadamente 25%.

27. La composición inmunogénica de la reivindicación 26, en la que dicho SP-Oil está presente a una concentración de aproximadamente 10%.

28. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 23-27, que comprende además una o más bacterias vivas, bacterinas y/o uno o más toxoides purificados seleccionados entre el grupo consistente en *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y bacteria *Leptospira*.

29. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 23-27, que comprende además uno o más antígenos virales seleccionados entre el grupo consistente en un antígeno del virus de la gripe porcina (SIV) un antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de la viruela del mapache que expresa PRRS u otros antígenos, TGEV que expresa PRRS u otros antígenos, y un antígeno de circovirus porcino (PCV).

30. La composición inmunogénica de la reivindicación 29, en la que dicho antígeno de circovirus porcino (PCV) es una quimera de Tipo 1 - Tipo 2 de Circovirus Porcino (cPCV1-2).

31. Un método para potenciar una respuesta inmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una sola o múltiples dosis de una composición inmunogénica a un animal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23-30.

32. La composición de la reivindicación 31, en la que la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de aproximadamente 90% con la secuencia de ácido nucleico de una cepa J de referencia.

33. El método de la reivindicación 31, en la que la cepa viva avirulenta de

Mycoplasma hyopneumoniae es una cepa que tiene una identidad polimórfica de al menos aproximadamente 70% con una cepa J de referencia.

34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-33, en la que la cepa J de referencia es una cepa que tiene el número de acceso de la ATCC 25934 ó 27715.

35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 32-33, en la que la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa J a la que se le ha asignado el número de acceso de la ATCC 25934 ó 27715.

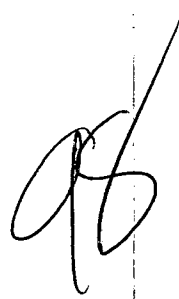
36. El método de la reivindicación 35, en la que la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa J a la que se le ha asignado el número de acceso de la ATCC 27715.

37. Un método para potenciar una respuesta inmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) en un primer momento, administrar una primera composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento con un material adyuvante biológicamente aceptable a un animal;

b) en un segundo momento, administrar una segunda composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* vivo avirulento con un material adyuvante biológicamente aceptable a un animal;

38. El método de la reivindicación 37, en el que la cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una cepa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2-10.



RESUMEN

Se proporcionan composiciones inmunogénicas y de vacuna y métodos para su preparación y uso, siendo dichas composiciones eficaces para proteger contra, minimizar la gravedad de, prevenir y/o mejorar la infección por *M. hyopneumoniae*. La administración a un animal de una o dos dosis de una composición de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante descrita en la presente memoria es eficaz para proporcionar inmunidad al animal y protección frente a la infección con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae* reduciendo de esta manera la gravedad y/o previniendo la enfermedad producida por una o más cepas virulentas de *M. hyopneumoniae*. También se proporcionan composiciones que comprenden además uno o más antígenos tales como, por ejemplo, una o más bacterias vivas, bacterinas, toxoides y/o virus y/o antígenos virales. Se ejemplifican composiciones inmunogénicas que comprenden un *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante y composiciones que comprenden vacuna viva modificada de quimera de Tipo 1 - Tipo 2 de Circovirus Porcino (cPCV1-2) en combinación adicional con *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con adyuvante.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

99

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/JS2008/082454

International filing date (day/month/year)
05.11.2008

Priority date (day/month/year)
06.11.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/02 C07K14/30

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

See form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Gruber, Andreas

Telephone No. +31 70 340-8997



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **100**
PCT/US2008/082454

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/082454

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>2-14,16-21,24-30,32-36,38</u>
	No: Claims	<u>1,15,22,23,31,37</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-38</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-38</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No. 102

PCT/US2008/082454

The present application describes a MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE AVIRULENT - ADJUVANTED LIVE VACCINE.

The following document (D) is referred to in this communication; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

- D1: WO 02/10343 A (UNIV MINNESOTA [US]; PIJOAN CARLOS [US]) 7 February 2002 (2002-02-07)
- D2: MORROW C J ET AL: "PRODUCTION OF TEMPERATURE-SENSITIVE CLONES OF MYCOPLASMA SYNOVIAE FOR EVALUATION AS LIVE VACCINES" AVIAN DISEASES, AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS, KENNET SQ., PA, US, vol. 42, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 667-670, XP001077047 ISSN: 0005-2086
- D3: LAI W C ET AL: "BIOLOGICAL EVALUATION OF MYCOPLASMA-PULMONIS TEMPERATURE-SENSITIVE MUTANTS FOR USE AS POSSIBLE RODENT VACCINES" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, vol. 58, no. 7, 1 July 1990 (1990-07-01), pages 2289-2296, XP002200882 ISSN: 0019-9567
- D4: US-A-6 001 348 (WITVLIET MAARTEN HENDRIK [NL]) 14 December 1999 (1999-12-14)
- D5: US 2005/053627 A1 (LEONARD JOAN D [US] ET AL) 10 March 2005 (2005-03-10)
- D6: WO 2004/058142 A (WYETH CORP [US]; CHU HSIEN-JUE [US]; LI WUMIN [US]; XU ZHICHANG [US]) 15 July 2004 (2004-07-15)
- D7: JAVED MOHAMMED A ET AL: "Correlates of immune protection in chickens vaccinated with Mycoplasma gallisepticum strain GT5 following challenge with pathogenic M-gallisepticum strain R-low" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, vol. 73, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 5410-5419, XP009109315 ISSN: 0019-9567
- D8: EVANS R D ET AL: "EVALUATION OF A MYCOPLASMA-GALLISEPTICUM STRAIN EXHIBITING REDUCED VIRULENCE FOR PREVENTION AND CONTROL OF POULTRY MYCOPLASMOSIS" AVIAN DISEASES, AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS, KENNET SQ., PA, US, vol. 36, no. 2, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 197-201, XP009109309 ISSN: 0005-2086
- D9: ALESSANDRI ENRICO ET AL: "Field trials with the use of a live attenuated

103

temperature-sensitive vaccine for the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in meat-type turkeys" ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE., vol. 4, no. 3, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 282-286, XP009109332 ISSN: 1594-4077

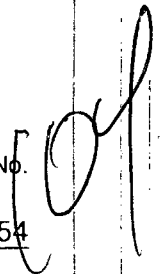
- D10: VASCONCELOS ANA TEREZA R ET AL: "Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*." JOURNAL OF BACTERIOLOGY AUG 2005, vol. 187, no. 16, August 2005 (2005-08), pages 5568-5577, XP002513991 ISSN: 0021-9193

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. The document D1 discloses (the references in parentheses applying to this document) a vaccine preparation comprising a live temperature-sensitive *Mycoplasma hyopneumoniae* in combination with an adjuvant which is administered in one or more doses, for example in 2 doses (the whole document, e.g. claims 1-5, 8-12; example 3).
Thus, the subject-matter of claims 1, 15, 22, 23, 31, 37 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.
2. Dependent claims 2-14, 16-21, 24-30, 32-36, 38 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of novelty (Article 33(2) PCT) and/or inventive step (Article 33(3) PCT), since they are merely one of several straightforward possibilities from which the skilled person would select, in accordance with circumstances, without the exercise of inventive skill, in order to solve the problem posed.
Regarding the use of specific strains (e.g. claim 4), to use live attenuated *Mycoplasma* as vaccine was a standard procedure in the prior art (e.g. D1 to D9), and in this context the use of a *Mycoplasma* strain known from the prior art to be avirulent (ATCC25934: D10: the whole document, e.g. abstract; page 5569, left-hand column, penultimate paragraph) for vaccine purposes would be a standard option for the skilled person and does therefore not involve an inventive step (Art. 33(3) PCT).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No. 

PCT/US2008/082454

3. The subject-matter of claims 1-38 is susceptible of industrial application (Article 33(4) PCT).

4. Claims 25-22,31-38 relate to a subject-matter considered by this Authority to be covered by the provision of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for in a first or further medical treatment.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MALLON, Veronica
Wyeth LLC
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 04 February 2010 (04.02.2010)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference AM102448	
International application No. PCT/US2008/082454	International filing date (day/month/year) 05 November 2008 (05.11.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address WYETH Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address WYETH LLC Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: The above change is to be recorded also in respect of the agent, as indicated in the addressee box at the top of this form.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Blanc Veronique e-mail PT06.PCT@WIPO.INT Telephone No. +41 22 338 74 06
---	---

Facsimile No. +41 22 338 82 70

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/082454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/02 C07K14/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/10343 A (UNIV MINNESOTA [US]; PIJOAN CARLOS [US]) 7 February 2002 (2002-02-07) the whole document	1-38
A	MORROW C J ET AL: "PRODUCTION OF TEMPERATURE-SENSITIVE CLONES OF MYCOPLASMA SYNOVIAE FOR EVALUATION AS LIVE VACCINES" AVIAN DISEASES, AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS, KENNET SQ., PA, US, vol. 42, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 667-670, XP001077047 ISSN: 0005-2086 the whole document	1-38



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 2009

Date of mailing of the international search report

23/02/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gruber, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/082454

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAI W.C ET AL: "BIOLOGICAL EVALUATION OF MYCOPLASMA-PULMONIS TEMPERATURE-SENSITIVE MUTANTS FOR USE AS POSSIBLE RODENT VACCINES" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, vol. 58, no. 7, 1 July 1990 (1990-07-01), pages 2289-2296, XP002200882 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-38
A	US 6 001 348 A (WITVLIET MAARTEN HENDRIK [NL]) 14 December 1999 (1999-12-14) the whole document	1-38
A	US 2005/053627 A1 (LEONARD JOAN D [US] ET AL) 10 March 2005 (2005-03-10) the whole document	1-38
A	WO 2004/058142 A (WYETH CORP [US]; CHU HSIEN-JUE [US]; LI WUMIN [US]; XU ZHICHANG [US]) 15 July 2004 (2004-07-15) the whole document	1-38
A	JAVED MOHAMMED A ET AL: "Correlates of immune protection in chickens vaccinated with Mycoplasma gallisepticum strain GT5 following challenge with pathogenic M-gallisepticum strain R-low" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, vol. 73, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 5410-5419, XP009109315 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-38
A	EVANS R D ET AL: "EVALUATION OF A MYCOPLASMA-GALLISEPTICUM STRAIN EXHIBITING REDUCED VIRULENCE FOR PREVENTION AND CONTROL OF POULTRY MYCOPLASMOSIS" AVIAN DISEASES, AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS, KENNET SQ., PA, US, vol. 36, no. 2, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 197-201, XP009109309 ISSN: 0005-2086 the whole document	1-38

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/082454

108

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALESSANDRI ENRICO ET AL: "Field trials with the use of a live attenuated temperature-sensitive vaccine for the control of Mycoplasma gallisepticum infection in meat-type turkeys" ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE,, vol. 4, no. 3, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 282-286, XP009109332 ISSN: 1594-4077 the whole document	1-38
A	VASCONCELOS ANA TEREZA R ET AL: "Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of Mycoplasma hyopneumoniae and a strain of Mycoplasma synoviae." JOURNAL OF BACTERIOLOGY AUG 2005, vol. 187, no. 16, August 2005 (2005-08), pages 5568-5577, XP002513991 ISSN: 0021-9193 the whole document	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/082454

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0210343	A	07-02-2002	AU 7720701 A BR 0112792 A CA 2417482 A1 CN 1461338 A EP 1307540 A2 HU 0301634 A2 JP 2004505096 T MX PA03000826 A NO 20030423 A NZ 524035 A PL 361232 A1 US 6585981 B1	13-02-2002 24-06-2003 07-02-2002 10-12-2003 07-05-2003 28-08-2003 19-02-2004 10-09-2003 12-03-2003 24-09-2004 04-10-2004 01-07-2003
US 6001348	A	14-12-1999	AT 268606 T AU 717062 B2 AU 4684397 A BR 9706133 A CA 2222482 A1 DE 69729425 D1 DE 69729425 T2 ES 2222497 T3 HU 9702355 A2 IL 122587 A JP 3945885 B2 JP 10179144 A PT 846468 T ZA 9710606 A	15-06-2004 16-03-2000 11-06-1998 27-04-1999 05-06-1998 15-07-2004 09-06-2005 01-02-2005 28-09-1998 13-08-2000 18-07-2007 07-07-1998 30-09-2004 12-06-1998
US 2005053627	A1	10-03-2005	US 2007077260 A1 US 2008226671 A1	05-04-2007 18-09-2008
WO 2004058142	A	15-07-2004	AU 2003303129 A1 BR PI0310082 A CN 1652817 A EP 1506006 A2 HR 20041068 A2 JP 2006515304 T MX PA04011218 A YU 99704 A	22-07-2004 10-04-2007 10-08-2005 16-02-2005 31-12-2004 25-05-2006 14-02-2005 15-12-2006



No: 10-054267- -00000-0000

Fecha: 2010-05-06 16:36:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 109

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH LLC

REFERENCIA	Radicación No.	10 054267
	Solicitud internacional	PCT/US2008/082454
	Fecha inicio fase nacional	06/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	009479

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

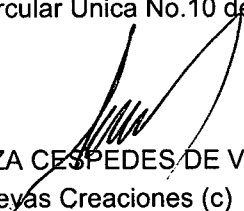
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 054267

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11

30 JUL 2010



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH LLC

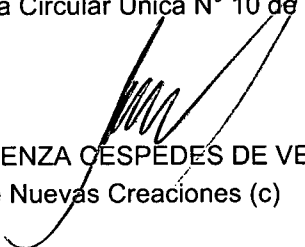
REFERENCIA	Radicación No.	10 054267
	Solicitud internacional	PCT/US2008/082454
	Fecha inicio fase nacional	06/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

09480

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPÉDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

30 JUL 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11