



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** 03-113787

54. **TÍTULO** "Vacuna de mycoplasma bovis y metodos para reducir la neumonía en animales"

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** Pfeizer Products Inc

DOMICILIO Eastern point road, Glaston, Connecticut 06340,
Estados Unidos de America.

74. **APODERADO** Carlos E. Olarte

22. **BOGOTÁ, D. C.,** Diciembre 30, 2003

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

03 113787 00

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación : 03113787 00000000

Folios: 100

Fecha (AMB): 2003-12-31 13:29:25

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESELECCIÓN
Dependencia: 2003 DIVISION DE NUEVAS CREACIONESFORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

① SOLICITUD DE :

☒	Patente de Invención	☐	Patente de Modelo de Utilidad
☐	Capítulo I.	☒	Capítulo II.

② SOLICITANTE
(71)

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC

Dirección: Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340,
Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio:

Lugar de Constitución: ESTADOUNIDENSE

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③ REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre C, Calle 100 No. 8A-55 Piso 10.

Teléfono: 6386200

Fax: 6386201

E-Mail: filings@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Bta TP 74.295

④ INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: ROBIN LEE KEICH, DAVID ROSS McGAVIN, ROBERT JOHN YANCEY

Dirección: Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE, AUSTRALIA, ESTADOUNIDENSE.

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/IB02/02514

Fecha Junio 27, 2002

Publicación Internacional No. WO 03/004052

Fecha Enero 16, 2003

⑥ Título (84) VACUNA DE MYCOPLASMA BOVIS Y METODOS PARA REDUCIR LA NEUMONIA EN ANIMALES.

⑦ Clasificación Internacional (81)

A61K 39/02

⑧ Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Julio 2, 2001

(31) Número de Solicitud

60/302,638

⑨ Comprobante de pago No. 59624, 84514, 15, 16, 17, 18, 59652

Fecha 22-08-03, 20-11-03, 22-08-03

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

2

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ 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.
- ☒ Otras: Búsqueda Internacional

11 FIGURA CARACTERISTICA

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 de Brá T.P. 74295

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicacion : 03113787 00000000

Folios: 100

Fecha (ANO): 2003-12-31 10:23:25

Tramite : 011 PCT-PAIEN 379 FASE NDCI 431 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 59,652
FECHA : AGOSTO 22 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JORGE LUIS GOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	6127195	22/08/2003	12,950,000.

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-08 PRORROGA DE TERMINOS	31 PRORROGA DE TERMINOS	60,000.00
	TOTAL :	\$ 60,000.

SOM: SESENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

4

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicacion : 01113/07 00000000

Folios: 100

Fecha (AMH): 2003-12-31 13:29:25

Tramite : 011 PCI-PADEM/ 179 FASE MACI 411 PAS-CHAC

Dependencia: ENCH DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 84,514

FECHA : NOVIEMBRE 20 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
FREDERICK TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	13594215	20/11/2003	2,500,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
10	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
20		FOTOCOPIAS (CADA HOJA)	1,000.00
		TOTAL :	\$ 1,000.00

SON: MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

5

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00113787 (00000000) Folios: 100
Fecha (AMD): 2003-12-31 13:29:23
Tramite : 011 PCI-PROYECT 3/9 FASE NDC3 411 PRE-SENIAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 84,315
FECHA : NOVIEMBRE 20 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
FREDERICK TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	13594215	20/11/2003	2,500,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
10	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		20 FOTOCOPIAS (CADA HOJA)	1,000.00
		TOTAL :	\$ 1,000.00

GOM: MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

6

INDICACION : 03113/07 (00000000) Folio. 100
Fecha (MM): 2003-12-31 13:29:25
Tramite : 001 PCI-PATENT 375 FASE 0001 411 Presentar
Dependencia: 3030 DIVISION DE NUEVAS DISEÑACIONES.

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 84,516
FECHA : NOVIEMBRE 20 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
FREDERICK TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	13594215	20/11/2003	2,500,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
10	30005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
20		FOTOCOPIAS (CADA HOJA)	1,000.00
		TOTAL :	1,000.00

SON: NIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

7

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03113787 00000000 Folios: 100
Fecha (MM): 2003-12-31 13:29:25
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NUC1 411 PATENTING
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 84,517
FECHA : NOVIEMBRE 20 DE 2003

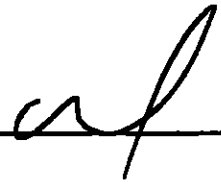
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
FREDERICK TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	13594215	20/11/2003	2,500,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
10	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
20		FOTOCOPIAS (CADA HOJA)	1,000.00
		TOTAL :	\$ 1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

8

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03112747 00000004 Folios: 100
Fecha (MM): 2003-12-31 13:29:25
Origen : 011 PCI-PAISAJE 379 FOLIOS 0001 011 PCI-PAISAJE
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS LEYALIDADES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 84,518
FECHA : NOVIEMBRE 20 DE 2003

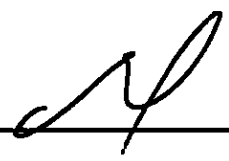
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
FREDERICK TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	13594215	20/11/2003	2,500,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
10	30005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
20		FOTOCOPIAS (CADA HOJA)	1,000.
TOTAL :			\$ 1,000.

SON: NIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

9

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicacion : 0311770/ 00000000 Folios: 14
Fecha (AMD): 2003-12-31 13:29:25
Tramite : 011 PCI-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE MARCAS Y DISEÑOS

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 59,624
FECHA : AGOSTO 22 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JORGE LUIS BOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	6127195	22/08/2003	12,950,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	85 EXAMEN DE PATENTABILIDAD DE INVEN	335,000.00
	TOTAL :	\$ 335,000.00

SON: TRESCIENTOS TREINTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : car

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
PFIZER PRODUCTS INC.**

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth Greenwood certifica que J. Trevor Lumb ejercía funciones de Vicepresidente de la Compañía Pfizer Products Inc., con sede en Groton, Connecticut, Estados Unidos.

Firma del notario

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman
Sello Notario Público en alto relieve rojo.

APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

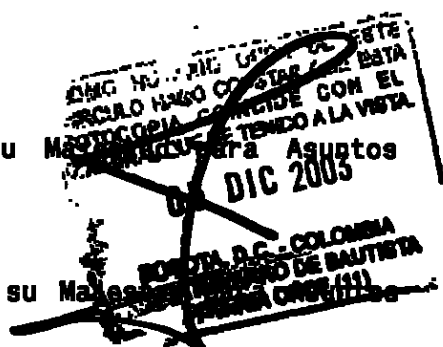
1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento Público
2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su exteriores y de la mancomunidad
8. No. G210435
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia confrontación. Bogotá 25 de julio-2003.



Archivo para
Marlén Neira C.

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340 USA

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma:

Date/Fecha: July 14, 2003

City/Country/Ciudad,País: New York, USA

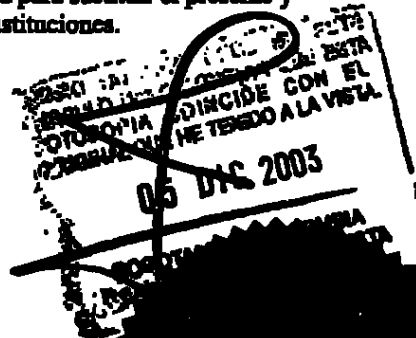
Poder

El suscrito,

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340 USA

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER — TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

12

Notarial Certification

On this date,
July 14, 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That *J. Trevor Lumb*

of legal age and domiciled in

NEW YORK, USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President of Pfizer Products Inc.

3. That Pfizer Products Inc., having its principal place of business located in Groton, Connecticut, U.S.A. is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

J. Trevor Lumb

mayor de edad y domiciliado

New York

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

4. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey

This *14*

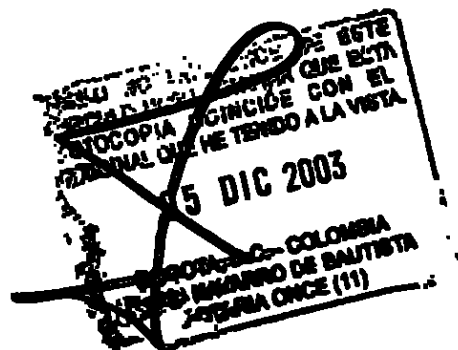
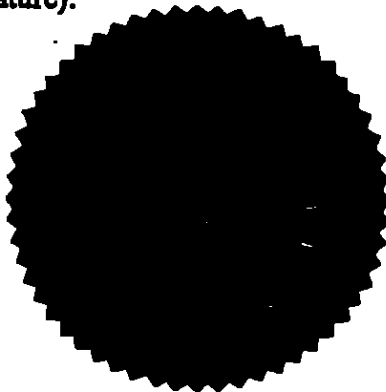
Day Of *July*

2003

KENNETH GREENWOOD

NOTARY PUBLIC

HONG KONG AND CHINA



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

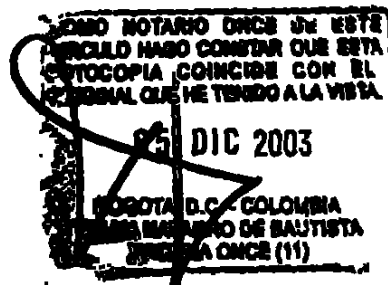
1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public
2. Has been signed by K Greerwood
a été signé par
3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de
5. at London/à Londres
6. the/le 17 July 2003
Certified/Attesté
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **G210435**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: R. Bawden



For the Secretary of State - Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country.



CESIÓN A PFIZER PRODUCTS INC.

CO-1

Por una contraprestación valiosa pagada a nosotros, por PFIZER PRODUCTS INC., una compañía organizada bajo las leyes del Estado de Connecticut, Estados Unidos de América, cuya dirección postal completa es Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América, por el presente vendemos y cedemos a la mencionada PFIZER PRODUCTS INC., todos nuestros derechos, título e interés en y referente a nuestra invención para una mejora nueva y útil en **VACUNAS BOVIS MICOPLASMA Y METODOS PARA REDUCIR LA NEUMONIA EN ANIMALES** (*Mycoplasma Bovis vaccine and methods for reducing pneumonia in animals*), en cuanto a la República de Colombia, tan totalmente como se describe en la especificación, y por el presente nosotros autorizamos y solicitamos al Comisionado de patentes de Colombia que expida tal patente a la mencionada PFIZER PRODUCTS INC., de acuerdo con esta cesión.

En testimonio de lo anterior, firmamos en estas fechas y Lugares

Robin Lee Keich Groton, Connecticut, 15 mayo - 2002
David Ross McGavin- Groton, Connecticut, 15 mayo - 2002
Robert John Yancey- Groton, Connecticut, 15 mayo - 2002

Sello notarial: Certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham
In Surrey, el 12 de junio de 2002. por el Notario Kenneth Greenwood-
Horne Engall & Freeman. Sello Notario Público en alto relieve.

En el reverso

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento Público 2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones Notario Público
4. Lleva el sello de tal Notario Público
CERTIFICADO 5. En Londres
6. El 12 de junio de 2002
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos
exteriores y de la mancomunidad.
8. No. H036109
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos
exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de S. Jireland - Por Secretario de Estado

Es traducción conforme con copia para confrontar- Bogota- 18.12.2003

Marlen Neira
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

APOSTILLE

14

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. **Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland**
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. **Has been signed by K Greenwood**
a été signé par
3. **Acting in the capacity of Notary Public**
agissant en qualité de
4. **Bears the seal/stamp of The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. **at London/à Londres**
6. **the/le 12 June 2002**
7. **by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /**
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. **Number/sous No H036109**

9. **Stamp:**
timbre:

10. **Signature: J Ireland**



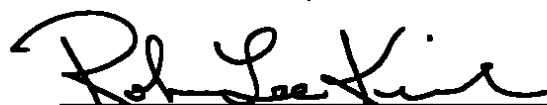
For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

170
15
H

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by PFIZER PRODUCTS INC. a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said PFIZER PRODUCTS INC., all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in MYCOPLASMA BOVIS VACCINE AND METHODS OF REDUCING PNEUMONIA IN ANIMALS so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said PFIZER PRODUCTS INC. in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

	15 May 2002
Place, date and signature - Robin Lee Keich	Groton, Connecticut, USA
	15 May 2002
Place, date and signature - David Ross McGavin	Groton, Connecticut, USA
	15 May 2002
Place, date and signature - Robert John Yancey	Groton, Connecticut, USA

EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey
This 12th Day Of June 2002
KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN

2003/000120

8710

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

PCT

(43) International Publication Date
16 January 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/004052 A1(51) International Patent Classification: A61K 39/02,
A61P 31/04, C12N 1/20 // (C12N 1/20, C12R 1:35)and Development, Eastern Point Road, Groton, CT 06340
(US).

(21) International Application Number: PCT/IB02/02514

(74) Agents: LUMB, Trevor, J. et al.; c/o Simpson, Alison,
Urquhart-Dykes & Lord, 30 Welbeck Street, London W1G
8JR (GB).

(22) International Filing Date: 27 June 2002 (27.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/302,638 2 July 2001 (02.07.2001) US

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60/302,638 (CON)
Filed on 2 July 2001 (02.07.2001)(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER
PRODUCTS INC. [US/US]; Eastern Point Road, Groton,
CT 06340 (US).

Published:

— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KEICH, Robin,
Lee [US/US]; Pfizer Global Research and Development,
Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US). MCGAVIN,
David, Ross [AU/US]; Pfizer Global Research and De-
velopment, Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).
YANCEY, Robert, John [US/US]; Pfizer Global ResearchFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MYCOPLASMA BOVIS VACCINE AND METHODS OF REDUCING PNEUMONIA IN ANIMALS

(57) Abstract: The present invention relates to Mycoplasma bovis vaccines and methods for treating or preventing a disease or disorder in an animal caused by infection by Mycoplasma bovis by administering to the animal an effective amount of a Mycoplasma bovis vaccine. The Mycoplasma bovis vaccine can be a whole or partial cell inactivated or modified live preparation, a subunit vaccine, or a nucleic acid or DNA vaccine. The Mycoplasma bovis vaccine administered in accordance with the present can be synthesized or recombinantly produced. The invention also related to combination vaccines, methods of preparing Mycoplasma bovis vaccines and kits.

WO 03/004052 A1

16
17

MYCOPLASMA BOVIS VACCINE AND METHODS
OF REDUCING PNEUMONIA IN ANIMALS

FIELD OF THE INVENTION

5 This invention relates to *Mycoplasma bovis* vaccine formulations and methods for treating or preventing a disease or disorder in an animal caused by infection by *Mycoplasma bovis*. The *Mycoplasma bovis* vaccine can be a whole or partial cell inactivated or modified live preparation, a subunit vaccine or a nucleic acid or DNA vaccine. The *Mycoplasma bovis* vaccine administered in accordance with the present invention can be synthesized or
10 recombinantly produced.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Mycoplasma bovis is an important global bovine pathogen in housed or intensively reared beef and dairy cattle. The most frequently reported clinical manifestation is
15 pneumonia of calves, which is often accompanied by arthritis, also known as pneumonia-arthritis syndrome. Its etiological role has also been associated with mastitis, otitis, and reproductive disease or disorders of cows and bulls. Significant economic losses are linked with *M. bovis* induced respiratory disease, since *M. bovis* has been associated with up to 36% of the mortality due to bovine respiratory disease (BRD). In order to reduce mortality,
20 antibiotic therapy is often used since no fully licensed vaccines are currently available. Prevention of *M. bovis* disease may also reduce predisposition of the animal to other respiratory diseases. Therefore, a *M. bovis* bacterin that is highly efficacious and safe for young calves would be very valuable to the cattle industry.

SUMMARY OF THE INVENTION

25 The present invention provides *Mycoplasma bovis* vaccines and methods of treating or preventing a disease or disorder caused by infection with *Mycoplasma bovis* by administering to an animal an effective amount of a *Mycoplasma bovis* vaccine and a pharmaceutically acceptable carrier. The vaccines of the present invention are provided in an amount sufficient to elicit or increase *Mycoplasma bovis* specific cellular or humoral primary
30 and secondary immune responses. In one aspect, the animal is a calf. The present method of vaccination provides protection to calves against challenge with *M. bovis*. Furthermore, the present method of vaccination using a *Mycoplasma bovis* vaccine provides increased immunocompetence to calves and thereby increased resistance to other BRD pathogens, e.g., decreased predisposition to infection and disease caused by, but not limited to, but not
35 limited to, bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), bovine viral diarrhea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), parainfluenza virus (PI3), *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma*

18
17

californicum, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis*, and *Manheimia haemolytica*. The present method also provides *Mycoplasma bovis* vaccines and methods of eradicating *Mycoplasma bovis* from infected herds by administering to an animal an effective amount of a *Mycoplasma bovis* vaccine and a pharmaceutically acceptable carrier.

5

The *Mycoplasma bovis* vaccine administered in accordance with the present invention may include additional components, such as an adjuvant and optionally a second or more antigens for use in a combination vaccine. A second antigen is selected from the following, including but not limited to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), bovine viral diarrhea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), parainfluenza virus (PI3), *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis*, and *Manheimia haemolytica*.

The invention also provides a method for the preparation of a *Mycoplasma bovis* vaccine which comprises growing a isolate of *Mycoplasma bovis* in culture in a suitable medium; treating the *Mycoplasma bovis* with binary etheleneimine to inactivate the *Mycoplasma bovis*, and admixing the, inactivated *Mycoplasma bovis* with a suitable pharmaceutically acceptable carrier so as to formulate a bacterin.

The present invention further provides kits comprising *Mycoplasma bovis* and an adjuvant and optionally an antigen selected from the following, including but not limited to, bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), bovine viral diarrhea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), parainfluenza virus (PI3), *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis*, and *Manheimia haemolytica*.

25

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a graph showing group mean body temperature immediately prior to and following experimental *M. bovis* challenge. Calves vaccinated with two doses of the *M. bovis* bacterin (Group A) had significantly lower mean body temperatures on days 4-8, days 10-18 and day 20 when compared to the placebo vaccinated animals (Group B).

Figure 2 is a graph showing group mean body temperature immediately prior to and following experimental *M. bovis* challenge. Calves vaccinated with two doses of the *M. bovis* bacterin (Groups A, B and C) had significantly lower mean body temperatures on days 7-17 when compared to the placebo vaccinated animals (Group D).

Figure 3 is a graph showing group mean body temperature immediately prior to and following experimental *M. bovis* challenge. Calves vaccinated with two doses of the *M. bovis*

35

19 18

-3-

bacterin (Treatment Groups 2, 3, 4, and 5) had significantly lower mean body temperatures on days 5-20 when compared to the placebo vaccinated animals (Treatment Group 1).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 The present invention encompasses a vaccine and method of treating or preventing a disease or disorder in an animal caused by infection with *Mycoplasma bovis* comprising administering to the animal an effective amount of an inactivated *Mycoplasma bovis* vaccine and a pharmaceutically acceptable carrier. The invention encompasses methods of preparing *M. bovis* vaccines and *M. bovis* vaccine kits. Examples of *Mycoplasma bovis* strains are
10 ATCC 25025 (deposited by R. G. Wittler on October 8, 1968), 25523 (deposited by R. G. Wittler on October 22, 1969) and 27368 (deposited by R. G. Wittler on July 5, 1972), all of which deposits were made with the American Type Culture Collection, 1801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. In a preferred embodiment, the *Mycoplasma bovis* isolate of the bacterin comprises one or more of the following strains: 2300, 3625, 16150,
15 20518 or 5063.

 The present invention contemplates that any inactivated *Mycoplasma bovis* isolate may be formulated into an effective bacterin. In a preferred embodiment, the *Mycoplasma bovis* isolates inactivated with binary ethyleneimine (BEI), may be formulated into an effective bacterin. A deposit of the *Mycoplasma bovis* isolate strains 2300, 3625, 16150, 20518 or
20 5063 was made pursuant to the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure, with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, and designated as strains PTA-3558, -3559, -3560, -3561 and -3585, respectively.

 In certain embodiments, the vaccines used in the method of the present invention
25 comprise a partial or whole cell *M. bovis* inactivated preparation (bacterin) or modified live vaccine and a pharmaceutically acceptable carrier, or partial or whole cell *M. bovis* inactivated preparation (bacterin) or modified live vaccine and an adjuvant.

 For clarity of disclosure, and not by way of limitation, the detailed description of the invention is divided into the following subsections which describe or illustrate certain features,
30 embodiments or applications of the invention.

DEFINITIONS AND ABBREVIATIONS

 The abbreviation *M.*, preceding the name of a species, refers to the genus *Mycoplasma*.

35 The term "treating or preventing" with respect to a *Mycoplasma bovis* infection as used herein means to inhibit the replication of *Mycoplasma bovis* bacteria, to inhibit *Mycoplasma bovis* shedding or transmission, or to prevent *Mycoplasma bovis* from

establishing itself in its host, and to alleviate the symptoms of the diseases or disorders caused by *Mycoplasma bovis* infection or to accelerate the clearance of *M. bovis* from the animal. The treatment is considered therapeutic if there is a reduction in bacterial load, decrease in pulmonary infections, reduction in lung lesions, reduced rectal temperatures and/or increase in weight gain and/or growth. The method of the present invention is, for example, effective in preventing or reducing pneumonia, respiratory infections and lung lesions, reducing the level of *M. bovis* in the lung, reducing temperatures, and increasing weight gains in animals and especially cattle.

The term "*M. bovis* vaccine" as used herein refers to a vaccine useful in prevention or treating a disorder or disease caused by infection by *M. bovis*. *M. bovis* vaccine can include any vaccine effective in treating or preventing infection in cattle by virulent *M. bovis*. The *M. bovis* vaccine that may be used in the present invention can include, for example, a whole or partial *M. bovis* cell preparation, inactivated or modified live vaccines, a subunit vaccine having one or more *M. bovis* derived polypeptides or proteins, or immunogenic fragments of such proteins or polypeptides, or one or more *M. bovis* genes or nucleic acids encoding for one or more *M. bovis* derived polypeptides or proteins, or immunogenic fragments thereof, and which genes or nucleic acids are capable of being expressed *in vivo* in cattle. The *M. bovis* polypeptides, proteins, immunogenic fragments of such polypeptides and proteins, or *M. bovis* genes or nucleic acids can be synthesized or recombinantly produced using techniques known in the art. Preferably, the *M. bovis* vaccine used in the method of the present invention is a bacterin.

The term immunogenic fragment as used herein refers to a fragment of a protein from *M. bovis*, which is capable of inducing an immune response in a host animal. The immune response may comprise, without limitation, induction of cellular and/or humoral immunity.

The term "animal" as used herein refers to all non-human animals, including mammals.

The term "cattle" as used herein refers to bovine animals including but not limited to steer, bulls, cows, and calves. Preferably, the method of the present invention is applied to an animal which is a non-human mammal; most preferably, a calf.

The term "bacterin" as used herein refers to a preparation of inactivated whole or partial *M. bovis* cells suitable for use as a vaccine.

The term "immunologically effective amount" refers to an amount of *M. bovis* vaccine sufficient to elicit an immune response in the subject to which it is administered. The immune response may comprise, without limitation, induction of cellular and/or humoral immunity. An effective amount of *M. bovis* vaccine means, for example, that the bacterin prevents or reduces the severity of mycoplasmal pneumonia.

The term "adjuvant" as used herein, is a potentiator of the immune response.

21
20

The term "pharmaceutically acceptable carrier" refers to a carrier medium that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient, is chemically inert and is not toxic to the subject to whom it is administered.

Inactivated (Partial or Whole Cell) and Modified Live Vaccines

5 The invention provides a *Mycoplasma bovis* vaccine and a method for the preparation of a *Mycoplasma bovis* vaccine which comprises growing a isolate of *Mycoplasma bovis* in culture in a suitable medium; treating the *Mycoplasma bovis* with binary ethyleneimine to inactivate the *Mycoplasma bovis*, and admixing the inactivated *Mycoplasma bovis* with a suitable pharmaceutically acceptable carrier so as to formulate a bacterin. In one
10 embodiment *Mycoplasma bovis* is isolated from lung tissue. In another embodiment, *Mycoplasma bovis* is isolated from lymph node tissue. A variety of such carriers are well known in the art and include distilled or deionized water, saline, or mineral oil. In addition to inactivated bacterial isolates, a bacterin product can also include an appropriate amount of one or more commonly used adjuvants. Suitable adjuvants may include, but are not limited
15 to: mineral gels, e.g., aluminum hydroxide; surface active substances such as lysolecithin; glycosides, e.g., saponin and saponin derivatives such as Quil A or GPI-0100; cationic surfactants, e.g. DDA (quaternary hydrocarbon ammonium halogenides, pluronic polyols; polyanions and polyatomic ions; polyacrylic acids, non-ionic block polymers, e.g., Pluronic F-127 (B.A.S.F., USA); Avridine and Rantidine; peptides; recombinant mutant labile toxins, e.g.,
20 leukotoxin (LT) or cholera toxin (CT); chemically bound or close proximity molecular transporters; mineral oils, e.g. Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, France), carbopol, Amphigen (Hydronics, USA), Omaha, NE, USA, Alhydrogel, (Superfos Biosector, Frederikssund, Denmark) oil emulsions, e.g. an emulsion of mineral oil such as BayolF/Arlacel A and water, or an emulsion of vegetable oil, water and an emulsifier such as lecithin; alum, cholesterol
25 cytokines and combinations of adjuvants. Polyatomic ions can also function as dispersing, thickening and anticaking agents which allow the vaccine to be resuspended as a nondisperse suspension after a prolonged period of settling. The adjuvant combinations may be presented in aqueous, encapsulated (controlled or delayed release) or microencapsulated forms. The immunogen may also be incorporated into liposomes, or conjugated to
30 polysaccharides and/or other polymers for use in a vaccine formulation. Additional substances that can be included in a bacterin product for use in the present methods include, e.g., one or more preservatives such as disodium or tetrasodium salt of Ethylene-Diamine Tetra Acetic acid (EDTA), merthiolate, and the like. Vaccines are formulated as liquid dosage or presented in a solid dosage with the making up a soluble component or a microparticulate
35 that is resuspended in a pharmaceutically acceptable diluent prior to use. Methods of preparing soluble components or microparticulates include, but are not limited to, biacervation, congelation, spray drying, bubble srying, precipitation, supercritical

sovation/encapsulation and lyophilization. In a preferred embodiment, the *Mycoplasma bovis* isolate designated 2300 is used in formulating the bacterin. In a further preferred embodiment, the adjuvant combination of Quil A, Amphigen, and cholesterol is used in formulating the bacterin.

5 The precise conditions under which the isolate is grown may vary depending upon the precise composition of the medium and the specific isolate being grown. However the isolate is typically grown from about 24 hours to about 72 hours, measured from the time of incubation to the time of harvest. The virulent *Mycoplasma bovis* isolate so grown is then treated with binary ethyleneimine (BEI) to inactivate the *Mycoplasma bovis* as described in
10 U.S. Patent No. 5,585,205, or inactivated with formalin, glutaraldehyde, heat, irradiation, BPL or other inactivants known to the art. For example, where the isolate is treated with BEI, the culture of the isolate may be contacted with BEI at a concentration of about 2 to about 10 mM. The culture is then incubated under conditions effective to inactivate *Mycoplasma bovis* e.g., for at least about 24 hours at about 37degrees C. The BEI culture is then neutralized by
15 adding sodium thiosulfate at an effective neutralizing concentration, e.g. 2 to 10 mM.

The resulting, inactivated *Mycoplasma bovis* may be concentrated. Various methods are known in the art for concentrating such organisms. For example, the organisms may be concentrated by centrifugation, e.g. ultracentrifugation, or by filtration, e.g. ultrafiltration.

The concentrated, inactivated *Mycoplasma bovis* which result are then recovered,
20 using methods well known in the art. Finally, the resulting concentrated, inactivated *Mycoplasma bovis* so recovered is admixed with a suitable pharmaceutically acceptable carrier so as to formulate the bacterin. The bacterin may also be produced by any of several modifications to the preceding method, which are readily known to the skilled artisan.

M. bovis isolates can also be obtained directly from infected cattle lung lesions using
25 known techniques. *M. bovis* isolates can also be obtained directly from infected cattle lymph node tissue using known techniques. *M. bovis* isolates can also be obtained directly from infected cattle lymph node tissue using known techniques. The present invention also contemplates preparation of modified live *M. bovis* vaccines, such as by attenuation of virulent strains by passage, which technique is known in the art.

30 Suitable preparations of the vaccines of the present invention include injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection, may also be prepared. The preparation may also be emulsified.

Inactivated *Mycoplasma bovis* isolates can also be combined with the following bacteria and viruses, including but not limited to, bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), bovine
35 viral diarrhea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), parainfluenza virus (PI3), *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma*

agalactiae, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis*, and *Manheimia haemolytica*.

Subunit Vaccines

5 The method of the present invention can be practiced using subunit vaccines having purified *M. bovis* immunogenic proteins, polypeptides and immunogenic fragments of such proteins and polypeptides. Such proteins and polypeptides can be prepared using techniques known in the art, for example extracts prepared using surface action agents, or thermal, chemical and mechanical extracts. Further, methods which are well known to those skilled in
10 the art can be used to determine protein purity or homogeneity, such as polyacrylamide gel electrophoresis of a sample, followed by visualizing a single polypeptide band on a staining gel. Higher resolution may be determined using HPLC or other similar methods well known in the art.

In a specific embodiment, the vaccine used in the present invention comprises at
15 least one protein of *M. bovis* such as, but not limited to P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89 P97, and P175.

In other embodiments the subunit vaccine of the present invention comprises at least one other immunogenic or antigenic molecule which is not a *M. bovis* protein, polypeptide or immunogenic fragment thereof and is preferably a viral or bacterial antigen. In a preferred
20 embodiment the antigen is bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), parainfluenza virus (PI3), *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis*, or *Manheimia haemolytica*. Such a composition is beneficial as a combination vaccine. The
25 subunit vaccines and combination vaccines of the present invention can be employed in the methods of the present invention to treat or prevent diseases or disorders caused by *M. bovis* infection.

In a further specific embodiment, the immunogenic fragments of such proteins or polypeptides have a sequence comprising at least 10, at least 20, at least 30, at least 40, at
30 least 50 or at least 100 contiguous amino acids of the immunogenic proteins and polypeptides used in the method of the present invention, including but not limited to P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89 P97, and P175.

Further, the *M. bovis* proteins for use in vaccines are substantially pure or homogeneous. The method of the present invention uses proteins or polypeptides which are
35 typically purified from host cells expressing recombinant nucleotide sequences encoding these proteins. Such protein purification can be accomplished by a variety of methods well known in the art. See, for example, the techniques described in "Methods In Enzymology";

25
24

1990, Academic Press, Inc., San Diego, "Protein Purification: Principles and practice", 1982, Springer-Verlag, New York.

Purified *M. bovis* polypeptides and proteins and immunogenic fragments thereof can also be prepared using known synthetic methods.

5 *M. bovis* polypeptides and proteins and immunogenic fragments thereof can also be expressed and delivered using live recombinant viral and bacterial vectors such as adenovirus or *Salmonella*. The actual vectors are also known and readily available within the art or can be constructed by one skilled in the art using well-known methodology.

10

Gene and Nucleic Acid Vaccines

The method of the present invention can be practiced using *M. bovis* genes or nucleic acids encoding for immunogenic proteins, polypeptides and immunogenic fragments of such proteins and polypeptides. Such genes and nucleic acids can be expressed *in vivo* and can
15 be prepared using techniques known in the art.

In a specific embodiment, the vaccine used in the present invention comprises at least one gene or nucleic acid encoding for a protein of *M. bovis* such as, but not limited to, P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89 P97, and P175.

20 In a further specific embodiment, the genes or nucleic acids used in the method of the present invention encode for the immunogenic fragments of the *M. bovis* proteins or polypeptides and have a sequence comprising at least 10, at least 20, at least 30, at least 40, at least 50 or at least 100 contiguous amino acids of the immunogenic proteins and polypeptides used in the method of the present invention, including but not limited to P13,
25 P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89 P97, and P175.

In other embodiments of the method of the present invention, the gene or nucleic acids used are administered by known methods, such as, for example, by use of a gene gun or other needle-free delivery devices.

In yet other embodiments of the method of the present invention, the gene or nucleic
30 acids used are DNA vaccines. Further, the nucleic acid or genes can be present in association with liposomes or other transfection facilitating agents, as are known in the art.

Methods for the preparation and delivery of DNA vaccines are known in the art. See, for example, Krishnan, B. R, "Current Status of DNA vaccines in veterinary medicine", Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier Science (2000)

35

24
25

Dosing, Modes of Administration and Treatment

According to the present invention, at least one dose of an effective amount of a *M. bovis* vaccine administered to an animal and preferably a calf of approximately one to tens weeks of age provides effective immunity against a later challenge of *M. bovis*. Preferably, the *M. bovis* vaccine is administered at about 7 to 28 and again at about 28 to 48 days of age. The effective amount of a *M. bovis* bacterin vaccine contains about 1×10^8 to about 5×10^{10} colony forming units (CFU) per dose. Preferably, a *M. bovis* bacterin vaccine that provides effective immunity contains about 1×10^8 to about 5×10^{10} CFU/dose and more preferably, about 5×10^8 to about 5×10^{10} CFU/dose.

According to the present invention, the effective amount of *M. bovis* bacterin vaccine for administration is about 0.5 to about 5.0 ml, preferably about 1.5 ml to about 2.5 ml, and more preferably, about 2 ml.

The amount of a *M. bovis* vaccine which is a subunit vaccine comprising one or more proteins or polypeptides or immunogenic fragments of such proteins or polypeptides effective in the method of the present invention is from about 0.01 μ g to about 200 μ g.

The amount of a *M. bovis* vaccine which is a vaccine comprising one or more *M. bovis* genes or nucleic acids (preferably, DNA) encoding for immunogenic proteins or polypeptides or immunogenic fragments of such proteins or polypeptides effective in the method of the present invention is from about 0.1 μ g to about 200 mg. In accordance with the present invention, administration can be achieved by known routes, including the oral, intranasal, mucosal, topical, transdermal, and parenteral (e.g., intravenous, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous or intramuscular). Administration can also be achieved using needle-free delivery devices. Administration can be achieved using a combination of routes, e.g., first administration using a parental route and subsequent administration using a mucosal route. A preferred route of administration is subcutaneous or intramuscular administration.

The present invention also contemplates a single dose vaccination method, which eliminates the necessity of administration of additional doses to calves in order to generate and/or maintain immunity against *M. bovis*.

According to the present invention, the administration of an effective amount of a *Mycoplasma bovis* bacterin administered to calves at approximately three and six weeks of age provides effective immunity against respiratory infections, including pneumonia, reduces lung lesions, reduces the level of *M. bovis* in the lung, reduces temperatures, and increases weight gains.

The present invention provides a method of immunizing a calf against infection by *Mycoplasma bovis* comprising administering to the calf at least one dose, and preferably two doses of the bacterin so as to immunize the calf against *Mycoplasma bovis* infection. In a

23.26

-10-

preferred embodiment, the bacterin is administered subcutaneously. Moreover, it is preferred that the bacterin dose comprise about 2ml of the bacterin, each ml containing about 2.5×10^8 *Mycoplasma bovis* colony forming units. The bacterin is desirably administered twice to the calf; once at about three weeks, and once at about six weeks, after the birth of the calf.

5 The present invention also contemplates that the administration of an effective amount of a *Mycoplasma bovis* bacterin administered to animals, and preferably cattle to treat or prevent disorders including pneumonia, arthritis, mastitis, otitis and reproductive disorders in such animals.

VACCINE KITS

10 The invention also provides a pharmaceutical kit comprising one or more containers comprising one or more of the ingredients of the vaccine formulations of the invention. The present invention thus provides a method of immunizing an animal, or treating or preventing various diseases or disorders in an animal, comprising administering to the animal an effective immunizing dose of a vaccine of the present invention. In a preferred embodiment
15 the kit comprises in a container a inactivated *Mycoplasma bovis* isolate and an adjuvant selected from Quil A or GPI-0100, DDA, saponin, cholesterol, aluminum gel, carbopol, Amphigen, Alhydrogel, oil in water, water in oil, cytokines, or combinations of adjuvants. In another embodiment, the kit of the present invention optionally comprises, in the same container or in a second container, antigens selected from the following, including but not
20 limited to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), bovine viral diarrhea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), parainfluenza virus (PI3), *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis*, or *Mannheimia haemolytica*.

PACKAGING

25 The vaccine compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device, which may contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient. The pack may for example comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration. Compositions
30 comprising a compound of the invention formulated in a compatible pharmaceutical carrier may also be prepared, placed in an appropriate container, and labeled for treatment of an indicated condition.

The present invention is further illustrated by the following examples.

EXAMPLE 1

MATERIALS AND METHODS

35

Animals

95
2X

Healthy crossbred dairy calves at approximately fourteen days of age were obtained for vaccination. Calves were acclimatized for seven days prior to the initiation of the study. All calves received a concentrated non-medicated diet daily, free of any known contaminants or pesticides and had free access to water.

5

Vaccines

The bacterins contained a BEI inactivated whole cell *M. bovis* bacteria at an appropriate concentration per dose. In addition, each vaccine preparation contained phosphate buffered saline (PBS) and an appropriate adjuvant. The placebo contained either PBS or PBS and an oil in water adjuvant.

10

Challenge Method

Each calf received either 10 or 12 ml of a fresh *M. bovis* culture [approximately 1×10^8 to 1×10^{10} colony forming units (CFU/ml)] by the intranasal route on three consecutive days. A viable count (CFU/ml) of the challenge inoculum was determined shortly after the completion of each experimental challenge.

15

20 Experimental Procedure

A unique ear tag number identified each calf. Animals were randomly assigned by age into pens and treatment groups.

Animals were vaccinated with 2 ml of the appropriate vaccine or placebo by the subcutaneous route on day 0 (left neck) and on day 21 (right neck).

25

All animals were weighed at 1 day prior to challenge, 7 days following challenge, 14 days following challenge, and at approximately 3 weeks following challenge.

Rectal temperatures were measured each morning 1 day prior to challenge, immediately prior to challenge, and for 20 days following challenge.

30

A blood sample was collected from each calf from the jugular vein. Calves were bled at approximately 1 day prior to first vaccination, 1 day prior to second vaccination, 1 day prior to challenge (approximately 3 weeks post-second vaccination), 7 days following challenge, 14 days following challenge, and at necropsy (approximately 3 weeks post-challenge). Serum from each blood sample was stored at -20°C until evaluated by a *M. bovis* ELISA kit (Chekit *M. bovis* Sero) prepared by Bommeli AG (Hoechst Roussel Vet Diagnostics, Liebefeld-Bern, Switzerland). The ELISA plates were read using a Multiscan reader at a wavelength of 405 nm. Optical density (OD) values were translated to a percentage relating to the OD value of the positive control serum, using the following formula: percentage = (Sample OD - Negative serum OD) / (positive serum OD - Negative serum OD) * 100. Values lower than 60% were

35

27
28

considered negative. Sera having percentages between 60 and 80% were considered suspect, while sera showing OD greater than 80% were accepted as positive.

5 All animals were necropsied at approximately 3 weeks following the experimental *M. bovis* challenge. Calves were euthanized and all major organs, excluding the central nervous system, were examined grossly.

Lungs were removed and evaluated grossly for characteristic lesions attributable to a *M. bovis* infection. Lesions were sketched on a standard lung diagram. Percent gross involvement per each lung lobe was weighted using the following ratios of individual lung lobes to total lung mass.

Lung Lobe	Percentage of Lung
Left Apical	5
Right Apical	6
Middle	5
Left Cardiac	6
Right Cardiac	7
Accessory	4
Left Diaphragmatic	32
Right Diaphragmatic	35

10 The weighted lung lobe values were then summed in order to determine the percentage of total lung with gross lesions (Pointon et al, 1992). In addition the following formula was used to calculate the percent reduction:

15
$$100 - \frac{\text{Mean Percent Lung Damage of Treatment Group}}{\text{Mean Percent Lung Damage of Control Group}} = \text{Percent Reduction}$$

In addition, each lung was lavaged with 50 ml of PBS. Attempts were made to isolate and determine the viable *M. bovis* counts from the bronchial lavage fluid. The *M. bovis* viable count (CFU/ml) was determined by preparing appropriate serial dilutions of bronchial lavage fluid and plating samples onto an appropriate agar medium.

EXAMPLE 2

In this example, the efficacy of a *M. bovis* bacterin was evaluated in young calves. Twenty-four, healthy crossbred calves, were randomly assigned by age.

25 Animals were vaccinated with 2 ml of either the vaccine or placebo, by the subcutaneous route on day 0 (left neck) and on day 21 (right neck). The experimental treatment groups and vaccines used are shown in Table 1.

Table 1.
Experimental Treatment Groups

Treatment Group	Experimental Vaccines (2 ml dose)	Number of Animals
A	<i>M. bovis</i> (5 X 10 ⁸ CFU) + Amphigen	11
B	Placebo (PBS + Amphigen)	13

5 Calves were challenged as described above at 3 weeks following second vaccination. Each calf received 10 ml of a fresh *M. bovis* culture by the intranasal route on three consecutive days.

A viable count (CFU/ml) of each challenge inoculum was determined within one hour after the completion of the *M. bovis* experimental challenge. Results are shown in Table 2.

10

Table 2.
Viable Count (CFU/ml) of *Mycoplasma bovis* Challenge Inoculum

Challenge Culture	CFU/ml
Day 1	5.0 X 10 ⁸
Day 2	1.0 X 10 ⁹
Day 3	1.2 X 10 ⁹

15 All animals were weighed at 1 day prior to challenge, 7 days following challenge, 14 days following challenge, and approximately 3 weeks following experimental *M. bovis* challenge. Results are summarized in Table 3. Calves that were administered the experimental *M. bovis* bacterin (Treatment Group A) had increased weight gains when compared to the placebo vaccinated group (Treatment Group B).

20

Table 3.
Summary of Body Weights Following Experimental *Mycoplasma bovis* Challenge
Mean Body Weight (kg) ± Standard Deviation

Treatment Group	Prior to Challenge	1 Week Post-Challenge	2 Weeks Post-Challenge	3 Weeks Post-Challenge	Weight Gain
A	94.8 ± 12.9	98.7 ± 13.9	107.3 ± 13.6	114.6 ± 12.9	19.8
B	104.0 ± 15.6	106.8 ± 14.7	109.9 ± 14.1	113.0 ± 14.7	9.0

Rectal temperatures were measured each morning 1-day prior to challenge, immediately prior to challenge, and for 20 days following experimental *M. bovis* challenge. Results are summarized in Figure 1. Calves vaccinated with the *M. bovis* bacterin (Treatment Group A) had lower mean body temperatures on days 4 through 8, days 10 through 18 and day 20 when compared to the placebo vaccinated animals (Treatment Group B).

M. bovis specific serum antibody responses (IgG) are summarized in Table 4. Serum samples with mean percentage optical density (OD) values > 80% of the positive control serum were considered positive for *M. bovis*. All calves were *M. bovis* negative prior to vaccination. Calves that received the experimental *M. bovis* bacterin (Treatment Group A) were seropositive to *M. bovis* prior to second vaccination and remained seropositive throughout the study. Animals in Treatment Group B (placebo vaccinated animals) were seronegative until 2 weeks following the experimental *M. bovis* challenge.

15

Table 4.
Summary of *Mycoplasma bovis* Serum Antibody (IgG)
Mean Percentage of Optical Density Values to Positive Control Serum
± Standard Deviation

Treatment Group	Pre-Vaccination	Prior to Second Vaccination	Prior to Challenge	1 Week Post-Challenge	2 Weeks Post-Challenge	3 Weeks Post-Challenge
A	28.4 ± 29.1	210.2 ± 79.5	94.6	342.6 ± 12.6	392.5 ± 11.3	385.4 ± 13.2
B	29.9 ± 39.5	71.4 ± 64.8	24.9 ± 42.2	77.5 ± 55.5	250.7 79.7	326.6 ± 50.0

20

All animals were necropsied at approximately 3 weeks following the experimental *M. bovis* challenge. Lungs were removed and evaluated grossly for characteristic lesions attributable to a *M. bovis* infection. Percent lung damage scores and percent reduction of lung lesions are summarized in Table 5. Calves that were administered the experimental *M. bovis* bacterin (Treatment Group A) had a 71.2 percent reduction in lung damage scores when compared to the placebo vaccinated animals (Treatment Group B). These results demonstrate that two doses of the experimental *M. bovis* bacterin was capable of inducing protection in calves following experimental challenge.

25

30
31

Table 5.
Summary of Percent Lung Damage Scores
Mean Weighted Percentage ± Standard Deviation

Treatment Group	Percent Lung Damage	Percent Reduction
A	1.80 ± 3.04	71.2
B	6.25 ± 6.73	—

5 Each lung was lavaged with 50 ml of PBS. Results of the isolation of *M. bovis* from bronchial lavage samples approximately twenty- one days following the experimental *M. bovis* challenge are summarized in Table 6. Calves that were administered the experimental *M. bovis* bacterin (Treatment Group A) had a reduced incidence and level of viable *M. bovis* in
10 lung lavage samples when compared to the placebo vaccinated calves (Treatment Group B).

Table 6.
Summary of *Mycoplasma bovis* Isolations from Lung Lavage Fluid

Treatment Group	Number of Animals <i>M. bovis</i> Positive	CFU/ml
A	3/11	3.27 X 10 ⁴
B	13/13	2.41 X 10 ⁶

15 In conclusion, calves receiving the experimental *M. bovis* bacterin (Treatment Group A) developed less lung lesions, had reduced rectal temperatures, increased weight gain, and an approximately 4 log reduction in the level of viable *M. bovis* isolated from lung lavage samples when compared to the placebo administered animals (Treatment Group B). The
20 results show that two doses of the *M. bovis* bacterin was capable of inducing a serological response and protection from a *M. bovis* experimental challenge.

EXAMPLE 3

25 In this example, the efficacy of various *M. bovis* bacterins was evaluated in young calves. Fifty-eight, healthy crossbred calves, were randomly assigned by age.

Animals were vaccinated with 2 ml of the appropriate vaccine or placebo by the subcutaneous route on day 0 (left neck) and on day 21 (right neck). The experimental treatment groups and vaccines used are shown in Table 1.

Table 1.
Experimental Treatment Groups

Treatment Group	Experimental Vaccines (2 ml dose)	Number of Animals
A	<i>M. bovis</i> (5 X 10 ⁸ CFU) + Amphigen + Alhydrogel	14
B	<i>M. bovis</i> (5 X 10 ⁸ CFU) + Amphigen + QuilA/Cholesterol	14
C	<i>M. bovis</i> (5 X 10 ⁸ CFU) + Amphigen	15
D	Placebo (PBS)	15

5 Calves were challenged as described above at 3 weeks following second vaccination. Each calf received 12 ml of a fresh *M. bovis* culture by the intranasal route on three consecutive days.

A viable count (CFU/ml) of each challenge inoculum was determined within one hour after the completion of the *M. bovis* experimental challenge. Results are shown in Table 2.

10

Table 2.
Viable Count (CFU/ml) of *Mycoplasma bovis* Challenge Inoculum

Challenge Culture	CFU/ml
Day 1	2.2 X 10 ⁸
Day 2	3.2 X 10 ⁸
Day 3	1.7 X 10 ⁸

15 All animals were weighed at 1 day prior to challenge, 7 days following challenge, 14 days following challenge, and approximately 3 weeks following experimental *M. bovis* challenge. Results are summarized in Table 3. Calves that were administered the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups A, B, and C) had increased weight gains when compared to the placebo vaccinated group (Treatment Group D).

20

32
33

Table 3.
Summary of Body Weights Following Experimental *Mycoplasma bovis* Challenge
Mean Body Weight (kg) ± Standard Deviation

Treatment Group	Prior to Challenge	1 Week Post-Challenge	2 Weeks Post-Challenge	3 Weeks Post-Challenge	Weight Gain
A	79.79 ± 12.29	88.00 ± 13.86	98.43 ± 12.35	103.71 ± 10.76	23.92 ± 5.99
B	78.21 ± 9.50	86.93 ± 9.90	98.29 ± 8.47	105.21 ± 9.32	27.00 ± 5.23
C	78.07 ± 16.78	86.60 ± 17.11	98.00 ± 20.92	104.00 ± 21.56	25.93 ± 8.80
D	78.93 ± 19.16	88.60 ± 20.44	94.43 ± 20.01	96.93 ± 20.89	18.00

5

Rectal temperatures were measured each morning 1-day prior to challenge, immediately prior to challenge, and for 20 days following experimental *M. bovis* challenge. Results are summarized in Figure 2. Calves administered two doses of the *M. bovis* vaccines (Treatment Groups A, B, and C) had lower mean body temperatures on days 7 through 17 when compared to the placebo vaccinated animals (Treatment Group D):

M. bovis specific serum antibody responses (IgG) are summarized in Table 4. Serum samples with mean percentage optical density (OD) values > 80% of the positive control serum were considered positive for *M. bovis*. All calves were *M. bovis* negative prior to vaccination. Calves that received the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups A, B, and C) were seropositive to *M. bovis* prior to second vaccination and remained seropositive throughout the study. Animals in Treatment Group D (placebo vaccinated animals) were seronegative until 3 weeks following the experimental *M. bovis* challenge.

15

Table 4.
Summary of *Mycoplasma bovis* Serum Antibody (IgG)
Mean Percentage of Optical Density Values to Positive Control Serum
± Standard Deviation

5

Treatment Group	Pre-Vaccination	Prior to Second Vaccination	Prior to Challenge	1 Week Post-Challenge	2 Weeks Post-Challenge	3 Weeks Post-Challenge
A	Negative	244.3 ± 66.0	314.7 ± 10.5	134.9 ± 7.4	115.5 ± 8.0	142.5 ± 8.9
B	Negative	262.1 ± 86.9	309.9 ± 33.6	139.5 ± 7.5	114.9 ± 7.5	145.0 ± 4.1
C	Negative	184.5 ± 80.6	292.2 ± 93.7	141.1 ± 9.1	118.9 ± 7.5	140.4 ± 7.7
D	Negative	36.9 ± 70.6	37.2 ± 81.0	37.4 ± 27.9	53.2 ± 39.4	100.5 ± 99.6

All animals were necropsied at approximately 3 weeks following the experimental *M. bovis* challenge. Lungs were removed and evaluated grossly for characteristic lesions attributable to a *M. bovis* infection. Percent lung damage scores and percent reduction of lung lesions are summarized in Table 5. Calves that were administered the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups A, B, and C) had lower percent lung damage scores when compared to the placebo vaccinated animals (Treatment Group D). These results demonstrate that two doses of the experimental *M. bovis* bacterins were capable of inducing protection in calves following experimental challenge.

15

Table 5.
Summary of Percent Lung Damage Scores
Mean Weighted Percentage ± Standard Deviation

Treatment Group	Percent Lung Damage	Percent Reduction
A	1.71 ± 3.03	77.5
B	1.49 ± 3.23	80.4
C	3.61 ± 6.17	52.5
D	7.60 ± 15.93	---

20

31
55

Each lung was lavaged with 50 ml of PBS. Results of the isolation of *M. bovis* from bronchial lavage samples approximately twenty- one days following the experimental *M. bovis* challenge are summarized in Table 6. Calves that were administered the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups A, B, and C) had a reduced incidence and level of viable *M. bovis* in lung lavage samples when compared to the placebo vaccinated calves (Treatment Group D).

Table 6.
Summary of *Mycoplasma bovis* Isolations from Lung Lavage Fluid

Treatment Group	Number of Animals <i>M. bovis</i> Positive	CFU/ml
A	5/14	1.93×10^4
B	1/14	42.9
C	9/15	1.34×10^5
D	12/14	4.50×10^5

In conclusion, calves receiving the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups A, B, and C) developed less lung lesions, had reduced rectal temperatures, increased weight gain, and a reduced level of viable *M. bovis* isolated from lung lavage samples when compared to the placebo administered animals (Treatment Group D). The results show that two doses of the *M. bovis* bacterins were capable of inducing a serological response and protection from a *M. bovis* experimental challenge.

EXAMPLE 4

In this example, the efficacy of various *M. bovis* bacterin formulations was evaluated in young calves following either a homologous or heterologous challenge. Eighty-three, healthy crossbred calves, were randomly assigned by age.

Animals were vaccinated with 2 ml of the appropriate vaccine or placebo by the subcutaneous route on day 0 (left neck) and on day 21 (right neck). The experimental treatment groups and vaccines used are shown in Table 1.

25
36

Table 1.
Experimental Treatment Groups

Treatment Group	Experimental Vaccines (2 ml dose)	Number of Animals
1	Placebo (PBS)	16
2	<i>M. bovis</i> strain 2300 (5 X 10 ⁸ CFU) + Amphigen + QuilA/Cholesterol	17
3	<i>M. bovis</i> strain 3625 (5 X 10 ⁸ CFU) + Amphigen + GPI-0100/Cholesterol	16
4	<i>M. bovis</i> strain 3625 (5 X 10 ⁸ CFU) + Amphigen + QuilA/Cholesterol	17
5	<i>M. bovis</i> strain 5063 (5 X 10 ⁸ CFU) + Amphigen + QuilA/Cholesterol	17

5 Calves were challenged as described above at approximately 4 weeks following second vaccination. Each calf received 12 ml (6 ml per nostril) of a fresh *M. bovis* strain 5063 culture by the intranasal route on three consecutive days.

A viable count (CFU/ml) of each challenge inoculum was determined within one hour after the completion of the *M. bovis* experimental challenge.

10 All animals were weighed at 1 day prior to challenge and approximately 3 weeks following experimental *M. bovis* challenge. Results of the average daily weight gains are summarized in Table 2. Calves that were administered the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups 2, 3, 4, and 5) had increased average daily weight gains when compared to the placebo vaccinated group (Treatment Group 1).

15

Table 2.
Summary of Average Daily Weight Gains
Following Experimental *Mycoplasma bovis* Challenge
Average Daily Weight Gain (kg)

20

Treatment Group	Average Daily Weight Gain
1	0.3
2	0.5
3	0.7
4	0.6
5	0.9

Rectal temperatures were measured each morning immediately prior to challenge (day 47) and for 20 days following experimental *M. bovis* challenge. Results are summarized in Figure 3. Calves administered two doses of the *M. bovis* vaccines (Treatment

26
37

Groups 2, 3, 4 and 5) had lower mean body temperatures on days 52 through 67 when compared to the placebo vaccinated animals (Treatment Group 1).

M. bovis specific serum antibody responses (IgG) are summarized in Table 3. Serum samples with mean percentage optical density (OD) values > 0.8080% of the positive control serum were considered positive for *M. bovis*. All calves were *M. bovis* negative prior to vaccination. Calves that received the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups 2, 3, 4, and 5) showed an antibody response following vaccination. Animals in Treatment Group 1 (placebo vaccinated animals) were seronegative until 3 weeks following the experimental *M. bovis* challenge.

10

Table 3.
Summary of *Mycoplasma bovis* Serum Antibody (IgG)
Mean Percentage of Optical Density Values to Positive Control Serum
± Standard Deviation

15

Treatment Group	Pre-Vaccination	Prior to Second Vaccination	Prior to Challenge	3 Weeks Post-Challenge
1	7.04 ± 13.69	28.14 ± 31.58	-5.33 ± 52.24	183.67 ± 51.32
2	2.77 ± 10.47	79.59 ± 71.35	49.78 ± 34.91	294.75 ± 29.32
3	7.40 ± 13.20	98.21 ± 102.30	69.77 ± 27.44	298.29 ± 21.13
4	8.34 ± 14.00	87.15 ± 56.79	65.43 ± 40.81	295.47 ± 26.59
5	5.54 ± 10.02	62.40 ± 72.18	68.31 ± 20.88	300.13 ± 22.91

All animals were necropsied at approximately 3 weeks following the experimental *M. bovis* challenge. Lungs were removed and evaluated grossly for characteristic lesions attributable to a *M. bovis* infection. Least square mean (LSM) percent lung damage scores and percent reduction of lung lesions are summarized in Table 4. Calves that were administered the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups 2, 3, 4, and 5) had lower LSM percent lung damage scores when compared to the placebo vaccinated animals (Treatment Group 1). These results demonstrate that two doses of the experimental *M. bovis* bacterins were capable of inducing protection in calves following experimental challenge.

25

Table 4.
Summary of LSM Percent Lung Damage Scores
Mean Weighted Percentage

30

27
30

Treatment Group	LSM Percent Lung Damage	Percent Reduction
1	6.5	—
2	0.7	89.23
3	0.9	86.15
4	2.8	56.92
5	2.9	55.38

Each lung was lavaged with 50 ml of PBS. Results of the presence of *M. bovis* in bronchial lavage samples by PCR approximately twenty- one days following the experimental *M. bovis* challenge are summarized in Table 5. Calves that were administered the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups 2, 3, 4, and 5) had a reduced incidence *M. bovis* in lung lavage samples by PCR when compared to the placebo vaccinated calves (Treatment Group 1).

Table 5.
Summary of the Presence of *Mycoplasma bovis* by PCR
In Lung Lavage Fluid

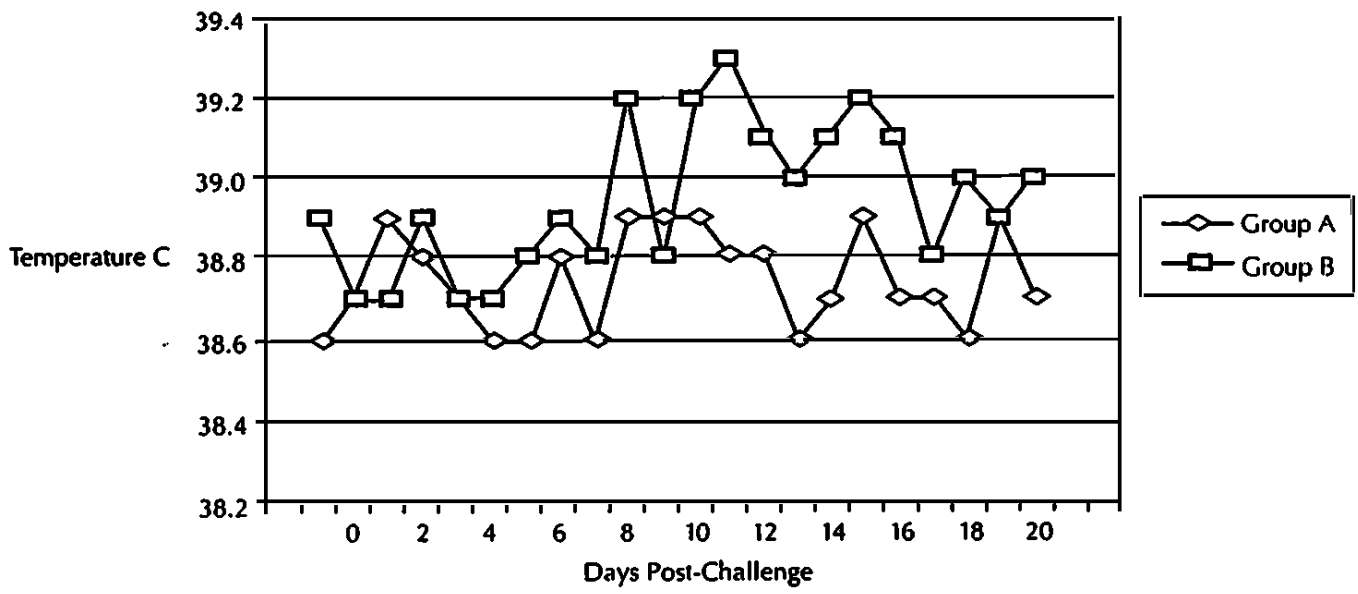
Treatment Group	Number of Animals <i>M. bovis</i> Positive	Percent Positive
1	14/18	87.5
2	0/17	0
3	4/12	25.0
4	2/15	11.8
5	1/16	5.9

In conclusion, calves receiving the experimental *M. bovis* bacterins (Treatment Groups 2, 3, 4, and 5) developed less lung lesions, had reduced rectal temperatures, increased average daily weight gain, and a reduced incidence of *M. bovis* in lung lavage samples when compared to the placebo administered animals (Treatment Group 1). The results showed that two doses of the *M. bovis* bacterins were capable of inducing a serological response and protection from a *M. bovis* experimental challenge. In addition, the results revealed a vaccine containing a single *M. bovis* strain is capable of protecting calves following experimental challenge with a distinctly different strain.

28
39**CLAIMS**

1. A vaccine formulation for immunization of an animal comprising an immunologically effective amount of an inactivated, whole or partial *Mycoplasma bovis* cell and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 5 2. The vaccine formulation according to Claim 1, further comprising an adjuvant.
3. The vaccine formulation of Claim 1, wherein the effective amount of the *M. bovis* vaccine contains from about 1×10^8 to about 5×10^{10} colony forming units (CFU) per dose.
4. The vaccine formulation according to claim 1 wherein the *Mycoplasma bovis* vaccine further comprises a viral or bacterial respiratory, enteric, or reproductive pathogen
10 antigens.
5. A method of treating or preventing a disease or disorder in an animal caused by infection with *Mycoplasma bovis*, comprising administering to the animal, an effective amount of a *Mycoplasma bovis* vaccine.
6. The method according to claim 13, wherein the effective amount of the *M. bovis* vaccine contains from about 1×10^8 to about 5×10^{10} colony forming units (CFU) per dose.
15
7. The method according to claim 13 wherein the amount of said vaccine administered is from about 0.5 to about 5.0 ml.
8. The method according to Claim 13 wherein the amount of said vaccine administered is from about 1.5 ml to about 2.5 ml.
- 20 9. The method according to claim 27 wherein about two milliliters of the vaccine are administered twice to the calf.
10. A method of preparing a *Mycoplasma bovis* vaccine comprising growing a isolate of *Mycoplasma bovis* in culture in a suitable medium; treating the *Mycoplasma bovis* with binary etheleneimine to inactivate the *Mycoplasma bovis*; and admixing the inactivated
25 *Mycoplasma bovis* with a suitable pharmaceutically acceptable carrier.
11. A kit comprising in at least one container a *Mycoplasma bovis* bacterin and an adjuvant.
12. A bacterin comprising an inactivated *Mycoplasma bovis* isolate in an amount of about 5×10^8 colony forming units per dose of bacterin, in a pharmaceutically acceptable
30 carrier.
13. The bacterin according to claim 12, further comprising an adjuvant.
adjuvants.
14. The method according to claim 13 wherein the effective amount of a *Mycoplasma bovis* vaccine is administered in a single dose.
- 35 15. A vaccine formulation for immunization of an animal comprising an immunologically effective amount of an inactivated, whole or partial *Mycoplasma bovis* cell, QuilA, Amphigen and cholesterol.

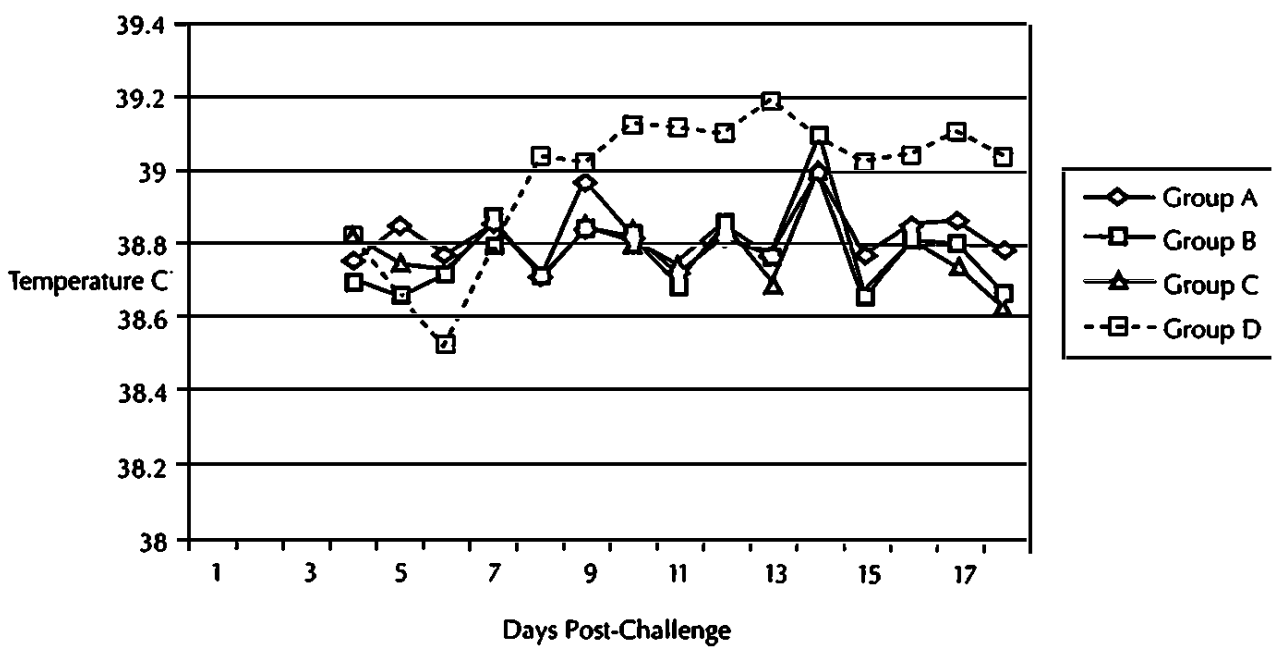
FIG. 1



1/3

29

FIG. 2

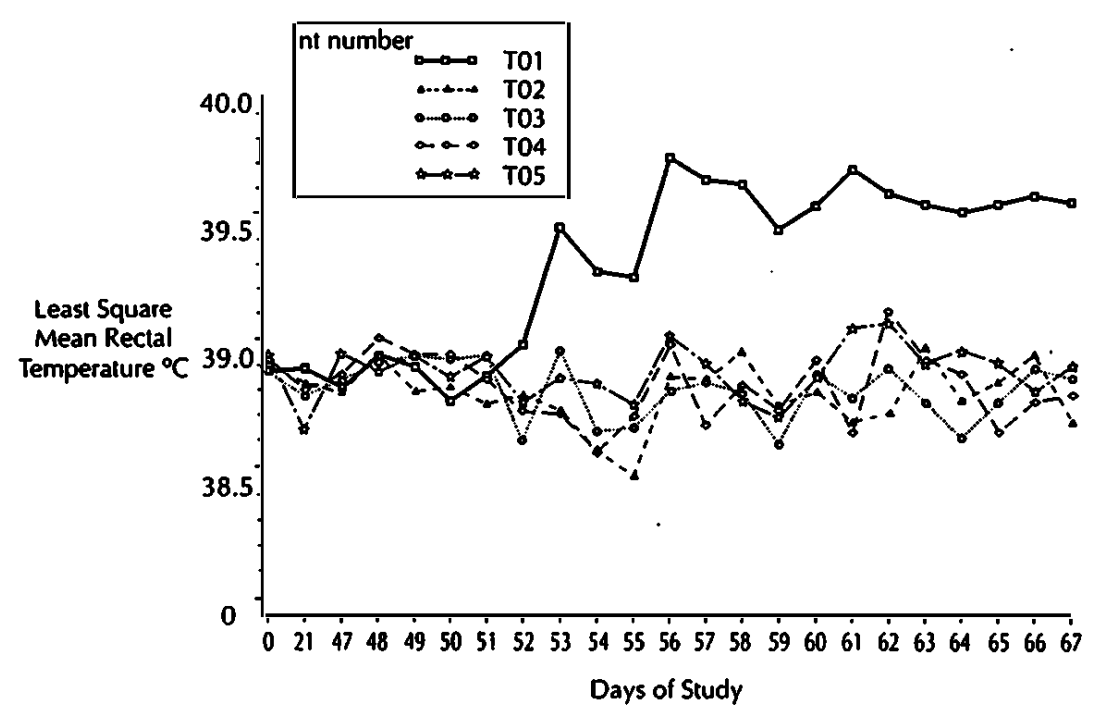


2/3

210

HT

FIG. 3



VACUNA DE MYCOPLASMA BOVIS Y MÉTODOS
PARA REDUCIR LA NEUMONÍA EN ANIMALES

Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones de
5 vacuna de Mycoplasma bovis y a los métodos para tratar o
prevenir enfermedades o desórdenes en animales causados por
infecciones por Mycoplasma bovis. La vacuna de Mycoplasma
bovis puede ser una preparación de células inactivadas o
vivas modificadas completas o parciales, una vacuna de
10 subunidades o una vacuna de ácido nucleico o ADN. La vacuna
de Mycoplasma bovis administrada de acuerdo con esta
invención se puede producir de manera sintética o
recombinante.

15 Antecedentes de la invención

El Mycoplasma bovis es un patógeno bovino de gran
importancia en ganado vacuno de aptitud cárnica y lechera
estabulado o criado intensivamente. La manifestación clínica
más frecuente es la neumonía de los terneros, que a veces se
20 presenta acompañada de artritis, también conocida como
síndrome de artritis neumónica. Su papel etiológico también
se ha relacionado con mastitis, otitis, enfermedades y
trastornos reproductivos de vacas y toros. La enfermedad
respiratoria inducida por el M. bovis está ligada a pérdidas
25 económicas significativas, pues se ha asociado con hasta el

13
44

36% de la mortalidad debida a enfermedades bovinas respiratorias (BRD). Para reducir la mortalidad, se han seguido con frecuencia terapias antibióticas ya que no se dispone actualmente de vacunas plenamente autorizadas. La
5 prevención de la enfermedad por M. bovis también puede reducir la predisposición del animal a otras enfermedades respiratorias. Por consiguiente, sería una vacuna muy valiosa para la industria ganadera una vacuna para el M. bovis que sea altamente eficaz y segura para los terneros jóvenes.

10 Sumario de la invención

La presente invención proporciona vacunas de Mycoplasma bovis y procedimientos de tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos causados por la infección con Mycoplasma bovis administrando al animal una cantidad
15 efectiva de una vacuna de Mycoplasma bovis y un vehículo aceptable farmacéuticamente. Las vacunas de la presente invención se proporcionan en una cantidad suficiente para obtener o aumentar la respuesta inmune específica celular o humoral, primaria y secundaria, al Mycoplasma bovis. En un
20 aspecto el animal es un ternero. El presente procedimiento de vacunación proporciona a los terneros protección frente a la exposición al M. bovis. Además, el presente procedimiento de vacunación, que utiliza una vacuna de Mycoplasma bovis proporciona una inmunocompetencia aumentada
25 a los terneros y con ello mayor resistencia a otros patógenos

HH
45

BRD, por ejemplo una menor predisposición a la infección y enfermedad causadas por, pero sin limitación, el virus del herpes bovino tipo 1 (BHV-1), virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV),
5 virus parainfluenza (PI3), Pasteurella multocida, Haemophilus somnus, Mycoplasma mycoides, Mycoplasma agalactiae, Mycoplasma californicum, Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma dispar, Mycoplasma canis y Mannheimia haemolytica. El presente procedimiento también proporciona vacunas de Mycoplasma bovis
10 y procedimientos para la erradicación del Mycoplasma bovis de los rebaños infectados administrando a los animales una cantidad efectiva de vacuna de Mycoplasma bovis y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

15 La vacuna de Mycoplasma bovis administrada de acuerdo con la presente invención puede incluir componentes adicionales, como un coadyuvante y opcionalmente un segundo o más antígenos para su uso en una vacuna de combinación. El segundo antígeno se selecciona, pero sin limitación, entre
20 virus del herpes bovino tipo 1 (BHV-1), virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus parainfluenza (PI3), Pasteurella multocida, Haemophilus somnus, Mycoplasma mycoides, Mycoplasma agalactiae, Mycoplasma californicum, Mycoplasma bovirhinis,
25 Mycoplasma dispar, Mycoplasma canis y Mannheimia haemolytica.

45
46

La invención también proporciona un procedimiento para la preparación de una vacuna de Mycoplasma bovis que comprende hacer crecer un aislado de Mycoplasma bovis en cultivo en un medio adecuado; tratar el Mycoplasma bovis con
5 una etelenimina binaria para inactivar el Mycoplasma bovis, y mezclar el Mycoplasma bovis inactivado con un vehículo aceptable farmacéuticamente para formular una bacterina.

La presente invención proporciona además kits que
10 comprenden Mycoplasma bovis y un coadyuvante y opcionalmente un antígeno seleccionado de entre los siguientes, pero sin limitación, virus del herpes bovino tipo 1 (BHV-1), virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus parainfluenza (PI3), Pasteurella
15 multocida, Haemophilus somnus, Mycoplasma mycoides, Mycoplasma agalactiae, Mycoplasma californicum, Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma dispar, Mycoplasma canis y Mannheimia haemolytica.

20 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que muestra la temperatura corporal media por grupos inmediatamente antes y después de la exposición al Mycoplasma bovis experimental. Los terneros vacunados con dos dosis de bacterina de Mycoplasma bovis
25 (Grupo A) tenían una temperatura corporal media

46
47

5

significativamente menor los días 4 - 8, los días 10 - 18 y el día 20 en comparación con los animales vacunados con placebo (Grupo B)

5 La Figura 2 es un gráfico que muestra la temperatura corporal media por grupos inmediatamente antes y después de la exposición experimental al Mycoplasma bovis. Los terneros vacunados con dos dosis de bacterina de Mycoplasma bovis (Grupos A, B y C) tenían una temperatura corporal media
10 significativamente inferior los días 7 - 17 en comparación con los animales vacunados con placebo (Grupo D).

La Figura 3 es un gráfico que muestra la temperatura corporal media por grupos inmediatamente antes y después de
15 la exposición experimental al Mycoplasma bovis. Los terneros vacunados con dos dosis de bacterina de Mycoplasma bovis (Grupos de tratamiento 2, 3, 4 y 5) tenían temperaturas corporales medias significativamente inferiores los días 5 -
20 20 en comparación con los animales vacunados con placebo (Grupo de tratamiento 1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención comprende una vacuna y un procedimiento
25 para el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos

47
48

en animales causados por la infección con Mycoplasma bovis, que comprende administrar al animal una cantidad efectiva de una vacuna de Mycoplasma bovis inactivado y un vehículo aceptable farmacéuticamente. La invención comprende
5 procedimientos para la preparación de vacunas de Mycoplasma bovis y kits de vacuna de Mycoplasma bovis. Ejemplos de cepas de Mycoplasma bovis son la ATCC 25025 (Depositada por R. G. Wittler el 8 de octubre de 1968), la 25523 (Depositada por R. G. Wittler el 22 de octubre de 1969) y la 27368
10 (Depositada por R. G. Wittler el 5 de julio de 1972), depósitos que se hicieron en the American Type Culture Collection, 1801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. En una realización preferida, el aislado de Mycoplasma bovis de la bacterina comprende una o más de las siguientes
15 cepas: 2300, 3625, 16150, 20518 o 5063.

La presente invención contempla que cualquier aislado de Mycoplasma bovis inactivado se puede formular en una bacterina efectiva. En una realización preferida, los
20 aislados de Mycoplasma bovis inactivados con etilenimina binaria (BEI) se pueden formular en una bacterina efectiva. De acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional de los depósitos de microorganismos con fines relacionados con los procedimientos de patente, se hizo un
25 depósito de un aislamiento de Mycoplasma bovis, cepas 2300,

48
49

3625, 16150, 20518 o 5063 y se designaron como cepas PTA-3558, -3559, -3560, -3561 y -3685, respectivamente.

En ciertas realizaciones, las vacunas utilizadas en el procedimiento de la presente invención comprenden una
5 preparación de células, completa o parcial, inactivadas de M. bovis (bacterina) o una vacuna de células vivas modificadas y un vehículo aceptable farmacéuticamente, o una preparación de células totales o parciales inactivadas de M. bovis (bacterina) o una vacuna de células vivas modificadas
10 y un coadyuvante.

Para claridad de la descripción, y no como medio de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertos aspectos, realizaciones o aplicaciones de
15 la invención.

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

La abreviatura M que precede al nombre de una especie, se refiere al género Mycoplasma.

20 El término "tratamiento o prevención" respecto de la infección por Mycoplasma bovis como se utiliza en el presente documento significa inhibir la replicación de la bacteria Mycoplasma bovis, inhibir la propagación o la transmisión de Mycoplasma bovis, o evitar que el Mycoplasma bovis se
25 establezca en el hospedador y aliviar los síntomas de las

44
50

enfermedades o trastornos causados por la infección con Mycoplasma bovis o acelerar la eliminación del Mycoplasma bovis en el animal. El tratamiento se considera terapéutico si hay una reducción en la carga bacteriana, un descenso de
5 infecciones pulmonares en las lesiones pulmonares, una reducción de la temperatura rectal y/o aumento de la ganancia de peso y/o del crecimiento. El procedimiento de la presente invención es, por ejemplo, efectivo en la prevención o reducción de la neumonía, de las infecciones respiratorias
10 y lesiones pulmonares, en la reducción del nivel de M. bovis en el pulmón, reducción de la temperatura y aumento de la ganancia de peso en los animales y especialmente en el ganado vacuno.

El término "vacuna de M. bovis" como se utiliza en el
15 presente documento se refiere a una vacuna útil en la prevención o tratamiento de trastornos o enfermedades causados por la infección con Mycoplasma bovis. La vacuna de Mycoplasma bovis puede contener cualquier vacuna efectiva en el tratamiento o prevención de infecciones en el ganado
20 vacuno por M. bovis virulento. La vacuna de M. bovis que se puede utilizar en la presente invención puede incluir, por ejemplo, una preparación de células de M. bovis completas o parciales, vacunas vivas inactivadas o modificadas, una vacuna de subunidades que tenga uno o más polipéptidos o
25 proteínas derivadas de M. bovis, o fragmentos inmunogénicos

50
51

de dichas proteínas o polipéptidos, o uno o más genes de M. bovis o ácidos nucleicos que codifican para uno o más polipéptidos o proteínas derivados de M. bovis, o fragmentos inmunogénicos de los mismos, y cuyos genes o ácidos nucleicos
5 son capaces de expresarse *in vivo* en el ganado. Los polipéptidos, proteínas, fragmentos inmunogénicos de dichos polipéptidos o proteínas de M. bovis, o los genes o ácidos nucleicos de M. bovis se pueden sintetizar o producir de manera recombinante utilizando técnicas conocidas en esta
10 técnica. Preferiblemente, la vacuna de M. bovis utilizada en el procedimiento de la presente invención es una bacterina.

El término fragmento inmunogénico como se utiliza en este documento, se refiere a un fragmento de una proteína de M. bovis que es capaz de inducir una respuesta inmune en
15 un animal hospedador. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral.

El término "animal" como se utiliza aquí se refiere a todo animal no humano, incluidos los mamíferos.

20 El término "ganado" como se emplea aquí se refiere a animales bóvidos incluidos, sin limitación, bueyes, toros, vacas y terneros. Preferiblemente, el procedimiento de la presente invención se aplica a animales que son mamíferos no humanos; más preferiblemente, terneros.

25 El término "bacterina" como se usa aquí, se refiere a

57
56

una preparación de células de M. bovis, completas o parciales, inactivadas adecuada para su uso como vacuna.

El término "cantidad efectiva inmunológicamente" se refiere a una cantidad de vacuna de M. bovis suficiente para
5 inducir una respuesta inmune en el sujeto al que se le suministra. La respuesta inmune puede comprender, si limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral. Una cantidad efectiva de vacuna de M. bovis significa, por ejemplo, que la bacterina evita o reduce la gravedad de la
10 neumonía por micoplasmas.

El término "coadyuvante" como se usa aquí, es un potenciador de la respuesta inmune.

El término "vehículo aceptable farmacéuticamente" se refiere a un medio vehículo, que no interfiere con la
15 efectividad de la actividad biológica del ingrediente activo, que es químicamente inerte y no es tóxico para el sujeto al que se administra.

20 Vacunas inactivadas (células parciales o totales) y vivas
modificadas

La invención proporciona una vacuna de Mycoplasma bovis y un procedimiento para la preparación de vacuna de Mycoplasma bovis que comprende hacer crecer un aislado de Mycoplasma bovis en cultivo en un medio adecuado; tratar el
25 Mycoplasma bovis con una etilelenimina binaria para inactivar

57
53

el Mycoplasma bovis y combinar el Mycoplasma bovis inactivado con un vehículo aceptable farmacéuticamente para formular una bacterina. En una realización el Mycoplasma bovis se aísla de tejidos pulmonar. En otra realización el Mycoplasma bovis se aísla de tejido de ganglio linfático. En la técnica se conocen bien diversos vehículos como los citados entre los que se incluyen agua destilada o desionizada, solución salina o aceite mineral. Además de los aislados bacterianos inactivados, un producto de bacterina también puede incluir una cantidad adecuada de uno o más de los coadyuvantes utilizados comúnmente. Los coadyuvantes adecuados pueden incluir, pero sin limitación: geles minerales, por ejemplo hidróxido de aluminio, sustancias activas superficialmente como la lisolecitina; glicósidos, como por ejemplo saponina y derivados de saponina, tales como Quil A o GPI-0100; tensioactivos catiónicos, por ejemplo DDA (halogenuros de amoníaco hidrocarburo cuaternario, polioles plurónicos; polianiones e iones poliatómicos; ácidos poliacrílicos, polímeros de bloque no iónicos, como Pluronic F-127 (B.A.S.F., EEUU); Avridina y Rantidina; péptidos; toxinas lábiles mutantes recombinantes, como la leucotoxina (LT) o la toxina del cólera (CT); transportadores moleculares de enlace químico o de estrecha proximidad; aceites minerales, como Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, Francia), carbopol, Amphigen (Hydronics EEUU), Omaha, NE, EEUU, Alhydrogel,

SB
64

(Superfos Biosector, Frederikssund, Dinamarca) emulsiones de aceite, por ejemplo una emulsión de aceite mineral como Bayolf/Arlacel A y agua, o una emulsión de aceite vegetal, agua y un emulsionante como la lecitina; alumbre, citoquinas, colesterol y combinaciones de coadyuvantes. Los iones poliatómicos también pueden funcionar como dispersantes, agentes espesantes y antiaglutinantes que permiten que la vacuna se resuspenda como una suspensión monodispersa después de un período prolongado de reposo. Las combinaciones coadyuvantes se pueden presentar en forma acuosa encapsulada a liberación controlada o en forma microencapsulada. También se puede incorporar el inmunógeno en liposomas, o conjugado con polisacáridos y/o otros polímeros para su uso en la formulación de vacunas. Otras sustancias que se pueden incluir en un producto de bacterina para su uso en los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, uno o más conservantes como la sal disódica o tetrasódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), mertiolato y similares. Las vacunas se formulan como dosificación líquida o se presentan como dosificación sólida en un diluyente aceptable farmacéuticamente antes de su uso. Los procedimientos para la preparación de los componentes solubles o microparticulados incluyen, sin limitación, la coacervación, congelación, secado por pulverización, dispersión por burbujeo, precipitación, solvatación/encapsulación

SA
95

supercrítica y liofilización. En una realización preferida, en la formulación de la bacterina se utiliza el aislamiento de Mycoplasma bovis designado como 2300. En otra realización preferida, en la formulación de la bacterina se utiliza la
5 combinación coadyuvante de Quil A, Amphigen y colesterol.

Las condiciones precisas en las que se hace crecer el aislado pueden variar mucho dependiendo de la composición precisa del medio y del aislado específico a crecer. Sin embargo, el aislado se hace crecer típicamente de unas 24
10 horas a unas 72 horas, medidas desde el momento de la incubación hasta el momento de la recolección. El aislado de Mycoplasma bovis virulento así crecido se trata después con una etilenimina binaria (BEI) para inactivar el Mycoplasma bovis como se describe en la Patente de Estados Unidos N°. 5.565,205, o se inactiva con formalina, glutaraldeído, calor,
15 irradiación, BPL u otros inactivantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando el aislado se trata con BEI, el cultivo del aislado puede estar en contacto con BEI a una concentración de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM.

20 El cultivo se incuba después en condiciones efectivas para inactivar el Mycoplasma bovis, por ejemplo, durante 24 horas por lo menos y a unos 37° C. El cultivo de BEI se neutraliza después añadiendo tiosulfato de sodio a una concentración neutralizante efectiva, por ejemplo, 2 a 10 mM.

25 El Mycoplasma bovis inactivado resultante se puede

SS
EP

concentrar. En la técnica se conocen varios procedimientos para concentrar dichos organismos. Por ejemplo, los organismos se pueden concentrar por centrifugación, por ejemplo, ultracentrifugación, o por filtración, por ejemplo, 5 ultrafiltración.

El Mycoplasma bovis concentrado inactivado resultante se recupera después utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Finalmente, el Mycoplasma bovis concentrado, inactivado resultante así recuperado se combina con un 10 vehículo aceptable farmacéuticamente adecuado para la formulación de la bacterina. La bacterina también se puede producir por cualquiera de las diferentes modificaciones al procedimiento precedente, que son bien conocidas por los expertos en esta técnica.

15 Los aislados de M. bovis también se pueden obtener directamente de las lesiones pulmonares del ganado infectado usando técnicas conocidas.

Los aislados de M. bovis también se pueden obtener directamente de tejido de los nódulos linfáticos del ganado 20 infectado utilizando técnicas conocidas. La presente invención también contempla la preparación de vacunas de M.bovis vivos modificados, tales como por atenuación de las cepas virulentas por pase en cultivo, una técnica que es conocida en la técnica.

25 Las preparaciones adecuadas de las vacunas de la

56
57

presente invención incluyen inyectables, tanto de soluciones líquidas como de suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en líquido antes de su inyección. La preparación también se
5 puede emulsionar.

Los aislados de Mycoplasma bovis inactivados también se pueden combinar con las siguientes bacterias y virus, incluyendo, pero sin limitación, el virus del herpes bovino tipo 1 (BHV-1, virus de la diarrea vírica bovina (BVDV),
10 virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), Virus parainfluenza (PI3), Pasteurella multocida, Haemophilus somnus, Mycoplasma mycoides, Mycoplasma agalactiae, Mycoplasma californicum, Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma dispar, Mycoplasma canis y Mannheimia haemolytica.

15

Vacunas de subunidades

El procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo empleando vacunas de subunidades que contienen
20 proteínas y polipéptidos inmunogénicos de Mycoplasma bovis purificados, y fragmentos inmunogénicos de dichas proteínas y polipéptidos. Dichas proteínas y polipéptidos se pueden preparar utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo extractos preparados utilizando agentes de superficie
25 activa, o térmicos, químicos y extractos mecánicos. Además,

5X
59

se pueden utilizar procedimientos conocidos por los expertos en la técnica para determinar la pureza de la proteína o su homogeneidad, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida, seguida de visualización de una única banda
5 de polipéptido en un gel teñido. Se puede determinar con mayor resolución empleando HPLC u otros procedimientos similares bien conocidos en la técnica.

En una realización específica, la vacuna empleada en la presente invención comprende al menos una proteína de M.
10 bovis, tal como, pero sin limitación, P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89, P97 Y P175.

En otras realizaciones la vacuna de subunidades de la presente invención comprende al menos otra molécula
15 inmunogénica o antigénica más, la cual no es una proteína de M. bovis, polipéptido o fragmento inmunogénico de los mismos y es preferiblemente un antígeno bacteriano o viral. En una realización preferida el antígeno es el virus del herpes bovino tipo 1 (BHV-1), virus de la diarrea viral bovina
20 (BVDV), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus parainfluenza (PI3), Pasteurella multocida, Haemophilus somnus, Mycoplasma mycoides, Mycoplasma agalactiae, Mycoplasma californicum, Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma dispar, Mycoplasma canis o Mannheimia haemolytica. Dicha
25 composición es beneficiosa como vacuna de combinación. Las

50
59

vacunas de subunidades y las vacunas de combinación de la presente invención se pueden emplear en los procedimientos de la presente invención para tratar o prevenir enfermedades o trastornos causados por la infección por M. bovis.

5 En otra realización específica, los fragmentos inmunogénicos de dichas proteínas o polipéptidos tienen una secuencia que comprende al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos contiguos de las proteínas y polipéptidos inmunogénicos
10 utilizados en el procedimiento de la presente invención incluyendo, pero sin limitación, P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89, P97 Y P175.

Además, las proteínas de M. bovis para uso en vacunas
15 son sustancialmente puras u homogéneas. El procedimiento de la presente invención utiliza proteínas o polipéptidos que están purificados típicamente a partir de células hospedadoras que expresan secuencias de nucleótidos recombinantes que codifican estas proteínas. La mencionada
20 purificación de proteínas se puede llevar a cabo mediante diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo las técnicas descritas en "Methods in Enzymology" 1990, Academic Press, Inc., San Diego. "Protein Purification: Principles and Practice", 1992, Springer-Verlag, Nueva York.

25 Los polipéptidos y proteínas purificados de M. bovis y

60
Sd

los fragmentos inmunogénicos de los mismos también se pueden preparar utilizando procedimientos de síntesis conocidos.

Los polipéptidos y proteínas de M. bovis y los fragmentos inmunogénicos de los mismos también se pueden
5 expresar y liberar utilizando vectores bacterianos y víricos vivos recombinantes tales como adenovirus o Salmonella. Los vectores actuales también son conocidos y están fácilmente disponibles en la técnica o se pueden construir por expertos en la técnica utilizando una metodología bien conocida.

10

Vacunas de genes y ácidos nucleicos

El procedimiento de la presente invención se puede llevar a la práctica utilizando genes o ácidos nucleicos de M. bovis que codifiquen proteínas inmunogénicas, polipéptidos
15 y fragmentos inmunogénicos de dichas proteínas o polipéptidos. Dichos genes y ácidos nucleicos se pueden expresar in vivo y se pueden preparar utilizando técnicas conocidas en esta técnica.

En una realización específica, la vacuna utilizada en
20 la presente invención comprende al menos un gen o ácido nucleico que codifica una proteína de M. bovis tal como, pero sin limitación, P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89, P97 Y P175.

En otra realización específica, los genes o ácidos
25 nucleicos utilizados en el procedimiento de la presente

60
61

invención codifican fragmentos inmunogénicos de las proteínas o polipéptidos de M. bovis y tienen una secuencia que comprende al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos contiguos de las
5 proteínas y polipéptidos inmunogénicos utilizados en el procedimiento de la presente invención, incluyendo, pero sin limitación, P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89, P97 Y P175.

En otras realizaciones del procedimiento de la presente
10 invención, los genes o ácidos nucleicos utilizados se administran por procedimientos conocidos, tales como, por ejemplo, por el uso de una pistola génica u otros dispositivos de administración sin aguja.

En otras realizaciones del procedimiento de la presente
15 invención, los genes o ácidos nucleicos utilizados son vacunas de ADN. Además, el ácido nucleico o genes pueden estar presentes asociados a liposomas u otros agentes que favorezcan la transfección, como se conoce en la técnica.

Los procedimientos para la preparación y liberación de
20 vacunas de ADN son conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Krishnan, B. R., "Current Status of DNA Vaccines in Veterinary Medicine", Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier Science (2000).

25 ***Dosificación, modos de administración y tratamiento***

67
62

De acuerdo con la presente invención, al menos una dosis de una cantidad efectiva de una vacuna de M. bovis administrada a un animal y preferiblemente a un ternero de aproximadamente una a diez semanas de edad proporciona una
5 inmunidad efectiva frente a una exposición posterior al M. bovis. Preferiblemente, la vacuna de M. bovis se administra sobre los 7 a 28 días y otra vez sobre los 28 a 48 días de edad. La cantidad efectiva de una bacterina de M. bovis contiene aproximadamente entre 1×10^6 y aproximadamente 5×10^{10}
10 unidades formadoras colonia (UFC) por dosis. Preferiblemente, una bacterina de M. bovis que proporciona inmunidad efectiva contiene aproximadamente entre 1×10^8 y aproximadamente 5×10^{10} UFC/dosis y más preferiblemente, aproximadamente entre 5×10^8 y aproximadamente 5×10^{10} UFC/dosis.

15 De acuerdo con la presente invención, la cantidad efectiva de bacterina de M. bovis para su administración es de unos 0,5 a unos 5,0 ml, preferiblemente unos 1,5 a unos 2,5 ml, y más preferiblemente, unos 2 ml.

20 La cantidad de vacuna de M. bovis que es una vacuna de subunidades que comprende una o más proteínas o polipéptidos o fragmentos inmunogénicos de dichas proteínas o polipéptidos efectivos en el procedimiento de la presente invención es de unos 0,01 microgramos a unos 200 microgramos.

25 La cantidad de vacuna de M. bovis que es una vacuna que

63
62

comprende uno o más genes o ácidos nucleicos preferiblemente ADN de M. bovis que codifican proteínas o polipéptidos inmunogénicos o fragmentos inmunogénicos de dichas proteínas o polipéptidos efectivos en el procedimiento de la presente
5 invención es de aproximadamente 0,1 microgramos a aproximadamente 200 mg. De acuerdo con la presente invención, la administración se puede conseguir por las vías conocidas, incluyendo la vía oral, intranasal, tópica, mucosa, transdérmica y parenteral (p.e., intravenosa,
10 intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular). La administración también se puede conseguir utilizando dispositivos de administración sin aguja. La administración se puede hacer utilizando una combinación de vías, p.e, la primera administración utilizando una vía parenteral y las
15 administraciones siguientes utilizando una vía mucosa. Una vía de administración preferida es la subcutánea o la administración intramuscular.

La presente invención también contempla un procedimiento
20 de vacunación de dosis única, que elimina la necesidad de administrar dosis adicionales a los terneros con el fin de generar y/o mantener la inmunidad contra el M. bovis.

De acuerdo con la presente invención, la administración de una cantidad efectiva de una bacterina de M. bovis
25 administrada a terneros de aproximadamente tres y seis

19
64

semanas de edad proporciona una inmunidad efectiva contra las infecciones respiratorias, incluida la neumonía, reduce las lesiones de pulmón, reduce el nivel de M. bovis en el pulmón, reduce la temperatura y aumenta la ganancia de peso.

5 La presente invención proporciona un procedimiento para inmunizar terneros frente a las infecciones por M. bovis que comprende la administración a los terneros de al menos una dosis, y preferiblemente dos dosis de la bacterina de tal manera que los terneros se inmunizan frente a la infección
10 por M. bovis.

En un realización preferida la bacterina se administra por vía subcutánea. Además, se prefiere que la dosis de bacterina contenga unos 2 ml de bacterina, conteniendo cada ml unas $2,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia de Mycoplasma bovis
15 formando colonia. la bacterina se administra de forma deseable al ternero dos veces; una vez a las tres semanas aproximadamente y una vez a las seis semanas aproximadamente, después del nacimiento del ternero.

La presente invención también contempla que la
20 administración de una cantidad efectiva de bacterina de Mycoplasma bovis se administre a animales, y preferiblemente a ganado vacuno para el tratamiento o prevención de trastornos que incluyen neumonía, artritis, mastitis, otitis y trastornos reproductivos en dichos animales.

62
63

KITS DE VACUNA

La invención también proporciona un kit farmacéutico que comprende uno o más envases que comprenden uno o más de los ingredientes de las formulaciones de la vacuna de la invención. Con ello la presente invención proporciona un procedimiento de inmunización del animal, o de tratamiento o de prevención, de varias enfermedades y trastornos en el animal, que comprende la administración al animal de una dosis inmunizadora efectiva de una vacuna de la presente invención. En una realización preferida el kit comprende en un envase un aislado de Mycoplasma bovis inactivado y un coadyuvante seleccionado de Quil A o GPI-0100, DDA, saponina, colesterol, gel de aluminio, carbopol, Amphigen, Alhydrogel, aceite en agua, agua en aceite, citoquinas o combinaciones de los coadyuvantes. En otra realización, el kit de la presente invención comprende opcionalmente, en el mismo envase o en un segundo envase, antígenos seleccionados de los siguientes, incluyendo pero sin limitación virus del herpes bovino tipo 1 (BHV-1), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus parainfluenza (PI3), Pasteurella multocida, Haemophilus somnus, Mycoplasma mycoides, Mycoplasma agalactiae, Mycoplasma californicum, Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma dispar, Mycoplasma canis o Mannheimia haemolytica.

65
66

EMPAQUETADO

Las composiciones de vacuna se pueden presentar, si se desea, en un paquete o en un dispositivo dispensador, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o de plástico, tal como un paquete tipo blíster. El paquete o el dispositivo dispensador puede ir acompañado de las instrucciones para la administración. También se pueden preparar composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo aceptable farmacéuticamente, colocado en un contenedor adecuado y etiquetado para el tratamiento de un estado indicado.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

20 Animales

Se obtuvieron para su vacunación terneros de leche cruzados sanos de catorce días de edad aproximadamente. Los terneros se adaptaron al ambiente siete días antes de la iniciación del estudio. Todos los terneros recibieron una dieta diaria no medicamentada concentrada, libre de

67
bb

cualquiera de los contaminantes conocidos o pesticidas y tuvieron acceso libre al agua.

Vacunas

5 Las bacterinas contenían células completas de la bacteria M.bovis inactivadas con BEI a una concentración por dosis adecuada. Además, cada preparación de vacuna contenía solución salina tamponada con fosfato (PBS) y un coadyuvante adecuado. El placebo contenía PBS o PBS con un coadyuvante
10 de aceite en agua.

Procedimiento de exposición

Cada ternero recibió 10 o 12 ml de un cultivo de M.bovis fresco (aproximadamente entre 1×10^8 y 1×10^{10} unidades
15 formadoras de colonia (UFC/ml) por vía intranasal en tres días consecutivos. Poco después de la terminación de cada exposición o experimental se hizo un recuento de viables (UFC/ml) del inóculo de exposición.

20 Procedimiento experimental

Cada ternero se identificó con un número único en el crotal de la oreja. Los animales se asignaron al azar por edad a rediles y grupos de tratamiento.

Los animales se vacunaron con 2 ml de la vacuna adecuada
25 o placebo por vía subcutánea el día 0 (lado izquierdo del

67
68

cuello) y el día 21 (lado derecho del cuello).

Todos los animales fueron pesados un día antes de la exposición, a los 7 días después de la exposición, a los 14 días después de la exposición y, aproximadamente, a las 3
5 semanas después de la exposición.

Se midieron las temperaturas rectales cada mañana 1 día antes de la exposición, inmediatamente antes de la exposición y durante los 20 días después de la exposición.

Se recogió una muestra de sangre de cada ternero de la
10 vena yugular. Se extrajo sangre a los terneros aproximadamente 1 día antes de la primera vacunación, 1 día antes de la segunda vacunación, 1 día antes de la exposición (aproximadamente 3 semanas después de la segunda vacunación), 7 días después de la exposición, 14 días después de la
15 exposición y en la necropsia (aproximadamente 3 semanas después de la exposición). Se almacenó suero de cada muestra de sangre a -20° C hasta que se evaluó mediante un kit ELISA de M. bovis (Chekit M. bovis Sero) preparado por Bommeli AG (Hoechst Roussel Vet Diagnostics, Liebefeld-Bern, Suiza). Las
20 placas de ELISA se leyeron utilizando un lector Multiscan a una longitud de onda de 405 nm. Los valores de densidad óptica (DO) se trasladaron a un porcentaje relativo al valor de DO del suero de control positivo, utilizando la siguiente fórmula: porcentaje = (DO de la muestra-DO del suero
25 negativo) / (DO del suero positivo-DO del suero negativo) * 100.

68
69

Los valores inferiores al 60% se consideraron negativos. Los sueros con porcentajes entre 60 y 80% se consideraron sospechosos, mientras que los sueros con una DO mayor que el 80% se aceptaron como positivos.

5 Todos los animales se sometieron a la necropsia aproximadamente a las 3 semanas de la exposición experimental al M. bovis. Los terneros fueron sacrificados y todos los órganos principales, excepto el sistema nervioso central, se examinaron macroscópicamente.

10 Se extrajeron los pulmones y se evaluaron macroscópicamente las lesiones características atribuibles a la infección por M. bovis. Las lesiones se representaron en un diagrama de pulmón estándar. El porcentaje bruto de afectación por cada lóbulo pulmonar se pesó utilizando las
15 siguientes proporciones entre los lóbulos individuales y la masa pulmonar total.

20

Lóbulo pulmonar	Porcentaje del pulmón
Apical izquierdo	5
Apical derecho	6
Medio	5
Cardíaco izquierdo	6
Cardíaco derecho	7
Accesorio	4
Diafragmático izquierdo	32

6A
20

Diafragmático derecho	35
-----------------------	----

Los valores de los lóbulos pulmonares pesados se sumaron después con el fin de determinar el porcentaje de peso pulmonar total con lesiones macroscópicas (Pointon et al., 1992). Además se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de reducción

$$100 - (\text{porcentaje medio de pulmón dañado del grupo de tratamiento})/(\text{porcentaje medio de pulmón dañado del grupo de control}) = \text{porcentaje de reducción}$$

Además, cada pulmón se lavó con 50 ml de PBS. Se intentó aislar y determinar el recuento de M. bovis viables a partir del fluido del lavado bronquial. Se determinó el recuento de viables (UFC/ml) de M. bovis preparando series de disoluciones del fluido del lavado bronquial y disponiendo las muestras en placas en un medio de agar adecuado.

EJEMPLO 2

En este ejemplo se evaluó en terneros jóvenes la eficacia de la bacterina de M. bovis. Se asignaron al azar por edad 24 terneros cruzados sanos.

Los animales fueron vacunados con 2 ml de vacuna o de placebo por vía subcutánea el día 0 (lado izquierdo del cuello) y el día 21 (lado derecho del cuello). Los grupos de tratamiento experimental y las vacunas utilizadas se muestran en la tabla 1.

20
21

Tabla 1

Grupos de tratamiento experimental

5

Grupo de tratamiento	Vacunas experimentales (dosis de 2 ml)	N° de animales
A	M.bovis (5x10 ⁸ UFC) + Amphigen	11
B	Placebo (PBS + Amphigen)	13

Los terneros fueron expuestos como se describió anteriormente después de 3 semanas de la segunda vacunación.
10 Cada ternero recibió 10 ml de un cultivo fresco de M.bovis por vía intranasal en tres días consecutivos.

Se determinó un recuento de viables (UFC/ml) de cada inóculo de exposición una hora después de terminar la exposición experimental al M. bovis. Los resultados se
15 muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Recuento de viables (UFC/ml) del inóculo de exposición a Mycoplasma bovis

20

Cultivo de la exposición	UFC/ml
Día 1	5,0 x 10 ⁹
Día 2	1,0 x 10 ⁹
Día 3	1,2 x 10 ⁹

22

Todos los animales fueron pesados el día 1 antes de la exposición, 7 días después de la exposición, 14 días después de la exposición y aproximadamente 3 semanas después de la exposición experimental al M. bovis. Los resultados se resumen en la Tabla 3. Los terneros a los que se administró la bacterina de M. bovis experimental (Grupo de tratamiento A) habían incrementado las ganancias de peso en comparación con el grupo vacunado con placebo (Grupo de tratamiento B)

Tabla 3

Resumen de pesos corporales después de la exposición experimental al Mycoplasma bovis
Peso corporal medio (Kg) ± desviación estándar

Grupo de tratamiento	Antes de la exposición	1 semana después de la exposición	2 semanas después de la exposición	3 semanas después de la exposición	ganancia de peso
A	94,8 ± 12,9	98,7 ± 13,9	107,3 ± 13,6	114,6 ± 12,9	19,8
B	104,0 ± 15,6	106,8 ± 14,7	109,9 ± 14,1	113,0 ± 14,7	9,0

Cada mañana se midieron las temperaturas rectales 1 día antes de la exposición, inmediatamente antes de la exposición y 20 días después de la exposición experimental al M. bovis.

22
23

Los resultados se resumen en la Figura 1. Los terneros vacunados con bacterina de M.bovis (Grupo de tratamiento A) tuvieron menores temperaturas corporales medias en los días 4 al 8, los días 10 al 18 y el día 20 en comparación con los 5 animales vacunados con placebo (Grupo de tratamiento B).

Las respuestas de anticuerpos séricos específicos de M. bovis (IgG) se resumen en la Tabla 4. Las muestras de suero con valores de densidad óptica (DO) en porcentaje medio > 80% del suero control positivo se consideraron positivas para M. bovis. 10 Todos los terneros fueron M. bovis negativo antes de la vacunación. Los terneros que recibieron la bacterina de M. bovis experimental (Grupo de tratamiento A) fueron seropositivos al M. bovis antes de la segunda vacunación y siguieron siendo seropositivos durante todo el estudio. Los 15 animales del Grupo de tratamiento B (animales vacunados con placebo) fueron seronegativos hasta 2 semanas después de la exposición experimental al M. bovis.

73
14

Tabla 4

Resumen de anticuerpos séricos de M. bovis (IgG)
Porcentaje medio de valores de densidad óptica respecto al
suero control positivo $\pm$ desviación estándar

5	Grupo de Trat.	Antes de la vacun.	Antes de la 2ª vacun.	Antes de la exposic.	1 sem. después de exposic.	2 sem. después de la exposic.	3 sem. después de la exposic.
	A	26,4 $\pm 29,1$	210,2 $\pm 79,5$	94,6	342,6 $\pm 12,6$	392,5 $\pm 11,3$	385,4 $\pm 13,2$
	B	29,9 $\pm 39,5$	71,4 $\pm 64,8$	24,9 $\pm 42,2$	77,5 $\pm 55,5$	250,7 79,7	326,6 $\pm 90,0$

10 Se hizo la necropsia a todos los animales
aproximadamente 3 semanas después de la exposición
experimental al M. bovis. Se extrajeron los pulmones y se
evaluaron macroscópicamente las lesiones características
atribuibles a la infección por M. bovis. El porcentaje de
15 daño pulmonar y el porcentaje de reducción de las lesiones
pulmonares se resumen en la Tabla 5. Los terneros a los que
se administró la bacterina de M. bovis experimental (Grupo
de tratamiento A) tuvieron un porcentaje de reducción de daño
pulmonar del 71,2 % en comparación con los animales vacunados
20 con placebo (Grupo de tratamiento B). Estos resultados
demuestran que dos dosis de la vacuna bacteriana de M. bovis
experimental fueron capaces de inducir protección en los

24/5

terneros después de la exposición experimental.

Tabla 5

Resumen de grados de daño en los pulmones en porcentaje
Porcentajes de pesos medios $\pm$ desviación estándar

5	Grupo de tratamiento	Porcentaje de daño pulmonar	porcentaje de reducción
	A	1,80 $\pm$ 3,04	71,2
	B	6,25 $\pm$ 6,73	---

10 Cada pulmón fue lavado con 50 ml de PBS. Los resultados
del aislamiento del M. bovis de las muestras de lavado
bronquial aproximadamente 21 días después de la exposición
experimental al M. bovis se resumen en la Tabla 6. Los
terneros a los que se administró la bacterina de M. bovis
15 (Grupo de tratamiento A) tuvieron una incidencia y nivel
reducidos de M. bovis viables en las muestras del lavado del
pulmón en comparación con los terneros vacunados con placebo
(Grupo de tratamiento B).

20

Tabla 6

Resumen de aislamientos de M. bovis del fluido del lavado
de pulmón

25
x6

Grupo de tratamiento	Número de animales positivos al <u>M. bovis</u>	UFC/ml
A	3/11	$3,27 \times 10^3$
B	13/13	$2,41 \times 10^6$

5

En conclusión, los terneros que recibieron la bacterina de M. bovis experimental (Grupo de tratamiento A) desarrollaron menos lesiones pulmonares, tuvieron temperaturas rectales reducidas, aumentaron su ganancia de peso y una reducción de aproximadamente 4 log en el nivel de M. bovis viables aislados de las muestras del lavado de pulmón en comparación con los animales a los que se administró placebo (Grupo de tratamiento B). Los resultados muestran que dos dosis de bacterina de M. bovis fueron capaces de inducir una respuesta serológica y una protección frente a la exposición experimental a M. bovis.

EJEMPLO 3

En este ejemplo se evaluó la eficacia de varias bacterinas de M. bovis en terneros jóvenes. Se asignaron al azar por edad cincuenta y ocho becerros cruzados sanos.

Los animales se vacunaron con 2 ml de la vacuna adecuada o con placebo por vía subcutánea el día 0 (lado izquierdo del

20

26
27

cuello) y el día 21 (lado derecho del cuello) . Los grupos de tratamiento experimental y las vacunas utilizadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

5 Grupos de tratamiento experimental

Grupo de tratamiento	Vacunas experimentales (dosis de 2 ml)	Número de animales
A	M.bovis (5x10 ⁸ UFC)+Amphigen+Alhy drogel	14
B	M.bovis (5x10 ⁸ UFC)+Amphigen+Quil A/colesterol	14
C	M.bovis (5x10 ⁸ UFC)+Amphigen	15
D	Placebo (PBS)	15

10

Los terneros fueron expuestos como se describió anteriormente tres semanas después de la segunda vacunación.

15 Cada ternero recibió 12 ml de un cultivo fresco de M.bovis por vía intranasal en tres días consecutivos.

En cada inóculo de exposición se determinó un recuento

27
20

de viables (UFC/ml) una hora después de terminar la exposición experimental al M. bovis. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

5

Tabla 2

Recuento de viables (UFC/ml) del inóculo de exposición al Mycoplasma bovis

10

Cultivo de exposición	UFC/ml
Día 1	2,2x10 ⁹
Día 2	3,2x10 ⁹
Día 3	1,7x10 ⁹

Todos los animales se pesaron 1 día antes de la exposición, 7 días después de la exposición, 14 días después de la exposición y aproximadamente 3 semanas después de la exposición experimental al M.bovis. Los resultados se resumen en la tabla 3. Los terneros a los que se administraron las bacterinas de M. bovis experimentales (Grupos de tratamiento A, B y C) habían aumentado su ganancia de peso en comparación con el grupo vacunado con placebo (Grupo de tratamiento D).

Tabla 3

Resumen de pesos corporales después de la exposición experimental al Mycoplasma bovis

28
29

Pesos corporales medios (Kg) $\pm$ Desviación estándar

5

Grupo de tratamiento	Antes de la exposic.	1 semana después de la exposición	2 semanas después de la exposición	3 semanas después de la exposición	Ganancia de peso
A	79,79 $\pm$ 12,29	88,00 $\pm$ 13,86	98,43 $\pm$ 12,35	103,71 $\pm$ 10,76	23,92 $\pm$ 5,99
B	78,21 $\pm$ 9,50	86,93 $\pm$ 9,90	98,29 $\pm$ 8,47	105,21 $\pm$ 9,32	27,00 $\pm$ 5,23
C	78,07 $\pm$ 16,78	86,60 $\pm$ 17,11	98,00 $\pm$ 20,92	104,00 $\pm$ 21,56	25,93 $\pm$ 8,80
D	78,93 $\pm$ 19,16	88,60 $\pm$ 20,44	94,43 $\pm$ 20,01	96,93 $\pm$ 20,89	18,00

Se midieron las temperaturas rectales cada mañana 1 día
10 antes de la exposición, inmediatamente antes de la
exposición, y 20 días después de la exposición experimental
al M. bovis. Los resultados se resumen en la Tabla 2. Los
terneros a los que se administraron dos dosis de vacuna de
M. bovis (Grupos de tratamiento A, B y C) tuvieron menores
15 temperaturas corporales medias los días 7 al 17 en
comparación con los animales vacunados con placebo (Grupo de
tratamiento D).

Las respuestas de anticuerpos séricos específicos de M.
bovis (IgG) se resumen en la Tabla 4. Las muestras de suero
20 con valores de densidad óptica (DO) en porcentaje medio > 80%
del suero de control positivo se consideraron positivas al
M. bovis. Todos los terneros fueron M.bovis negativos antes

de la vacunación. Los terneros que recibieron las bacterinas de M. bovis experimentales (Grupos de tratamiento A, B y C) fueron seropositivos al M.bovis antes de la segunda vacunación y siguieron siendo seropositivos durante todo el
5 estudio. Los animales del Grupo de tratamiento D (animales vacunados con placebo) fueron seronegativos hasta 3 semanas después de la exposición experimental al M.bovis.

480
81

Tabla 4

Resumen de anticuerpos séricos (IgG) de Mycoplasma bovis
Porcentaje medio de los valores de densidad óptica
respecto al suero de control positivo $\pm$ desviación
estándar

5

G. Trat.	Antes de vacunac.	Antes de 2 ^a vacunac.	Antes de exposic.	1 semana después exposic.	2 semanas después exposic.	3 semanas después exposic.
A	Negativo	244,3 $\pm$ 66,0	314,7 $\pm$ 10,5	134,9 $\pm$ 7,4	115,5 $\pm$ 8,0	142,5 $\pm$ 6,9
B	Negativo	262,1 $\pm$ 86,9	309,9 $\pm$ 33,6	139,5 $\pm$ 7,5	114,9 $\pm$ 7,5	145,0 $\pm$ 4,1
C	Negativo	184,5 $\pm$ 60,6	292,2 $\pm$ 93,7	141,1 $\pm$ 9,1	118,9 $\pm$ 7,5	140,4 $\pm$ 7,7
D	Negativo	36,9 $\pm$ 70,6	37,2 $\pm$ 81,0	37,4 $\pm$ 27,9	53,2 $\pm$ 39,4	100,5 $\pm$ 99,6

10

Se hizo la necropsia a todos los animales
aproximadamente 3 semanas después de la exposición
experimental al M. bovis. Se extrajeron los pulmones y se
evaluaron macroscópicamente las lesiones características
atribuibles a la infección de M. bovis. El porcentaje de daño

15

32
81

pulmonar y el porcentaje de reducci3n de las lesiones pulmonares se resumen en la Tabla 5. Los terneros a los que se administraron las bacterinas de M. bovis experimentales (Grupos de tratamiento A, B y C) tenían un porcentaje menor de daño pulmonar en comparaci3n con los animales vacunados con placebo (Grupo de tratamiento D). Estos resultados demuestran que dos dosis de las bacterinas experimentales de M. bovis fueron capaces de inducir protecci3n en los terneros despu3s de su exposici3n experimental.

10

Tabla 5

Resumen de porcentajes de daño pulmonar
Porcentaje pesado medio ± desviaci3n estandar

15

Grupo de tratamiento	Porcentaje de daño pulmonar	Porcentaje de reducci3n
A	1,71 ± 3,03	77,5
B	1,49 ± 3,23	80,4
C	3,61 ± 6,17	52,5
D	7,60 ± 15,93	-----

20

Cada pulm3n se lav3 con 50 ml de PBS. Los resultados del aislamiento de M. bovis a partir de las muestras del lavado bronquial aproximadamente veintiún días despu3s de la exposici3n experimental al M. bovis se resumen en la Tabla

48
23

6. Los terneros a los que se administraron las bacterinas de M. bovis experimentales (Grupos de tratamiento A, B y C) tuvieron una incidencia y nivel de M.bovis viables reducidos en las muestras de lavado pulmonar en comparación con los
5 terneros vacunados con placebo (Grupo de tratamiento D).

Tabla 6

Resumen de aislamientos de Mycoplasma bovis del fluido de lavado pulmonar

10	Grupo de tratamiento	Número de animales positivos al M. bovis	UFC/ml
	A	5/14	1,93x10 ²
	B	1/14	42,9
	C	9/15	1,34x10 ⁶
15	D	12/14	4,50x10 ⁶

En conclusión, los terneros que recibieron las bacterinas de M. bovis experimentales (Grupos de tratamiento A, B y C) desarrollaron menos lesiones pulmonares, tuvieron
20 temperaturas rectales reducidas, aumentaron la ganancia de peso y tuvieron un nivel reducido de M. bovis de viables aislados de las muestras de lavado pulmonar en comparación

83
84

con los animales vacunados con placebo (Grupo de tratamiento D). Los resultados muestran que dos dosis de bacterinas de M. bovis fueron capaces de inducir una respuesta sérica y una protección frente a la exposición experimental al M. bovis.

5

EJEMPLO 4

En este ejemplo se evaluó la eficacia de diversas formulaciones de bacterina de M. bovis en terneros jóvenes después de una exposición homóloga o heteróloga. Se asignaron al azar por edad ochenta y tres terneros jóvenes cruzados sanos.

Los animales se vacunaron con 2 ml de la vacuna adecuada o con placebo por vía subcutánea el día 0 (a la izquierda del cuello) y el día 21 (a la derecha del cuello). Los grupos de tratamiento experimental y las vacunas utilizadas se muestran en la Tabla 1.

85

Tabla 1

Grupos de tratamiento experimental

Grupo de tratamiento	Vacunas experimentales (dosis de 2 ml)	Número de animales
1	Placebo (PBS)	16
2	Cepa de <i>M. bovis</i> 2300 (5×10^8 UFC) + Amphigen + Quila/Colesterol	17
3	Cepa de <i>M. bovis</i> 3625 (5×10^8 UFC) + Amphigen + GPI- 0100/Colesterol	16
4	Cepa de <i>M. bovis</i> 3625 (5×10^8 UFC) + Amphigen + Quila/Colesterol	17
5	Cepa de <i>M. bovis</i> 5063 (5×10^8 UFC) + Amphigen + Quila/Colesterol	17

Los becerros fueron expuestos como se describió anteriormente aproximadamente cuatro semanas después de la segunda vacunación. Cada ternero recibió 12 ml (6 ml en cada orificio nasal) de cultivo fresco de la cepa 5063 de *M. bovis* por vía intranasal en tres días consecutivos.

86 49

Se determinó el recuento de viables (UFC/ml) de cada inóculo de exposición de M. bovis una hora después de terminar la exposición experimental al M. bovis.

Todos los animales se pesaron un día antes de la
5 exposición y aproximadamente 3 semanas después de la
exposición experimental al M. bovis. Los resultados de las
ganancias de peso diarias medias se resumen en la Tabla 2.
Los terneros a los que se administraron las bacterinas de M.
bovis experimentales (Grupos de tratamiento 2, 3, 4 y 5)
10 habían aumentado la ganancia de peso diaria media en
comparación con el grupo vacunado con placebo (Grupo de
tratamiento 1).

Tabla 2

Resumen de las ganancias medias de peso diario
15 Después de la exposición experimental al M. bovis
Ganancia media de peso diario (Kg)

	Grupo de tratamiento	Ganancia media de peso diario
	1	0,3
	2	0,5
20	3	0,7
	4	0,6
	5	0,9

Se midieron las temperaturas rectales todas las mañanas
25 inmediatamente antes de la exposición (día 47) y durante los

86
87

20 días que siguieron a la exposición experimental al M. bovis. Los resultados se resumen en la Figura 3. Los terneros a los que se administraron dos dosis de vacuna de M. bovis (Grupos de tratamiento 2, 3, 4 y 5) tenían menores 5 temperaturas corporales medias los días 52 al 67 en comparación con los animales vacunados con placebo (Grupo de tratamiento 1).

Las respuestas (IgG) de anticuerpos séricos específicos de M. bovis se resumen en la tabla 3. Las muestras de suero 10 con valores de densidades ópticas (DO) en porcentaje medio > 80% respecto al suero de control positivo se consideraron positivas al M. bovis. Todos los terneros fueron negativos al M. bovis antes de la vacunación. Los terneros que recibieron las bacterinas de M. bovis experimentales (Grupos 15 de tratamiento 2, 3, 4 y 5) mostraron una respuesta de anticuerpos después de la vacunación. Los animales del Grupo de tratamiento 1 (Animales vacunados con placebo) fueron seronegativos hasta 3 semanas después de la exposición experimental al M. bovis.

83
67

Tabla 3

Resumen de anticuerpos (IgG) séricos de Mycoplasma bovis
Porcentaje medio de valores de densidad óptica respecto al
suero de control positivo $\pm$ desviación estándar

5

Grupos de trat.	Antes de la vacunación	Antes de la 2ª vacunación	Antes de la exposición	3 semanas después de la exposición
1	7,04 $\pm$ 13,69	28,14 $\pm$ 31,58	-5,33 $\pm$ 52,24	183,67 $\pm$ 51,32
2	2,77 $\pm$ 10,47	79,59 $\pm$ 71,35	49,78 $\pm$ 34,91	294,75 $\pm$ 29,32
3	7,40 $\pm$ 13,20	98,21 $\pm$ 102,30	69,77 $\pm$ 27,44	298,29 $\pm$ 21,13
4	8,34 $\pm$ 14,00	87,15 $\pm$ 56,79	65,43 $\pm$ 40,81	295,47 $\pm$ 26,59
5	5,54 $\pm$ 10,02	62,40 $\pm$ 72,18	68,31 $\pm$ 20,88	300,13 $\pm$ 22,91

10

89
98

Se practicó la necropsia a todos los animales aproximadamente 3 semanas después de la exposición experimental al M. bovis experimental. Se extrajeron los pulmones y se evaluaron macroplásticamente las lesiones características atribuibles a la infección por M. bovis. El porcentaje medio obtenido por mínimos cuadrados (LSM) de los daños pulmonares y el porcentaje de reducción de las lesiones pulmonares se resumen en la Tabla 4. Los terneros a los que se administraron las vacunas de M. bovis experimentales (Grupos de tratamiento 2, 3, 4 y 5) tenían un porcentaje LSM de daño pulmonar menor en comparación con los animales vacunados con placebo (Grupo de tratamiento 1). Estos resultados demuestran que dos dosis de la bacterina de M. bovis experimental fueron capaces de inducir protección en los terneros después de la exposición experimental.

Tabla 4
Resumen de porcentajes LSM de daños pulmonares
Porcentaje pesado medio

Grupo de tratamiento	Porcentaje LSM de daño pulmonar	Porcentaje de reducción
1	6,5	-----
2	0,7	89,23
3	0,9	86,15
4	2,8	56,92
5	2,9	55,38

90
49

Cada pulmón se lavó con 50 ml de PBS. Los resultados de la presencia de M. bovis en las muestras de lavado bronquial por PCR aproximadamente veintiun días después de la exposición experimental al M. bovis se resumen en la Tabla 5. Los 5 terneros a los que se administraron las bacterinas de M. bovis experimentales (Grupos de tratamiento 2, 3, 4 y 5) tenían una incidencia reducida de M. bovis en las muestras de lavado pulmonar por PCR en comparación con los terneros vacunados con placebo (Grupo de tratamiento 1).

10

Tabla 5

Resumen de la presencia de Mycoplasma bovis por PCR en el fluido de lavado pulmonar

15

Grupos de tratamiento	Número de animales M. bovis positivos	Porcentaje de positivos
1	14/16	87,5
2	0/17	0
3	4/12	25,0
4	2/15	11,8
5	1/16	5,9

20

91 90

En conclusión, los terneros que recibieron las bacterinas de M. bovis experimentales (Grupos de tratamiento 2, 3, 4 y 5) desarrollaron menos lesiones pulmonares, tuvieron temperaturas rectales reducidas, aumentaron la ganancia de peso diario y tuvieron una incidencia reducida de M. bovis en las muestras de lavado pulmonar cuando se compararon con los animales a los que se administró placebo. Los resultados mostraron que dos dosis de las bacterinas de M. bovis fueron capaces de inducir una respuesta serológica y una protección frente a la exposición experimental al M. bovis. Además, los resultados revelaron que una vacuna que contiene una sola cepa de M. bovis puede proteger a los terneros después de la exposición experimental a una cepa claramente diferente.

92
91

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de vacuna para la inmunización de un
5 animal que comprende una cantidad efectiva inmunológicamente de células inactivadas de Mycoplasma bovis completas o parciales y un vehículo aceptable farmacéuticamente.
2. La formulación de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un coadyuvante.
- 10 3. La formulación de vacuna de la reivindicación 1 en la que la cantidad efectiva de vacuna de M. bovis contiene de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 5×10^{10} unidades formadoras de colonia (UFC) por dosis.
4. La formulación de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la vacuna de Mycoplasma bovis comprende
15 además antígenos de un patógeno viral o bacteriano respiratorio, intestinal o reproductivo.
5. Un procedimiento de tratamiento o de prevención de una enfermedad o trastorno en un animal causados por infección
20 con Mycoplasma bovis, que comprende la administración al animal de una cantidad efectiva de una vacuna de Mycoplasma bovis.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la cantidad efectiva de vacuna de M. bovis contiene
25 de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 5×10^{10} unidades

93 92

formadoras de colonia (UFC) por dosis.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la cantidad de dicha vacuna administrada es de unos 0,5 a unos 5,0 ml.
- 5 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la cantidad de dicha vacuna administrada es de unos 1,5 ml a unos 2,5 ml
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27 en el que se administran dos veces al ternero unos 2 ml de
10 vacuna.
10. Un procedimiento para la preparación de vacuna de Mycoplasma bovis que comprende hacer crecer un aislado de Mycoplasma bovis en cultivo en un medio adecuado; tratar al Mycoplasma bovis con una etilenimina binaria para inactivar
15 el Mycoplasma bovis, y mezclar el Mycoplasma bovis inactivado con un vehículo adecuado aceptable farmacéuticamente.
11. Un kit que comprende al menos un envase de una bacterina de Mycoplasma bovis y un coadyuvante.
12. Una bacterina que comprende un aislado de Mycoplasma
20 bovis inactivado en una cantidad de unas 5×10^8 unidades formadoras de colonia por dosis de bacterina, en un vehículo aceptable farmacéuticamente.
13. La bacterina de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende además un coadyuvante.
- 25 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 en

94 93

el que la cantidad efectiva de una vacuna de Mycoplasma bovis se administra en una sola dosis.

15. Una formulación de vacuna para la inmunización de un animal que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva
5 de células inactivadas de Mycoplasma bovis, totales o parciales, Quil A, Amphigen y colesterol.

95
24

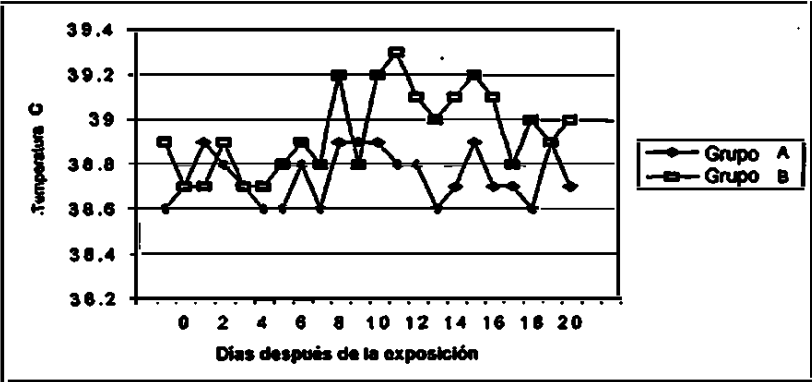
RESUMEN

La presente invención se refiere a vacunas de Mycoplasma bovis y a procedimientos para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un animal causados por la
5 infección con Mycoplasma bovis, administrando al animal una cantidad efectiva de una vacuna de Mycoplasma bovis. La vacuna de Mycoplasma bovis puede ser una preparación de células totales o parciales inactivadas o vivas modificadas, una vacuna de subunidades, o una vacuna de ácido nucleico o
10 ADN. La vacuna de Mycoplasma bovis administrada de acuerdo con la presente se puede producir por síntesis o de manera recombinante. La invención también se refiere a vacunas de combinación, procedimientos para la preparación de vacunas de Mycoplasma bovis y kits.

96

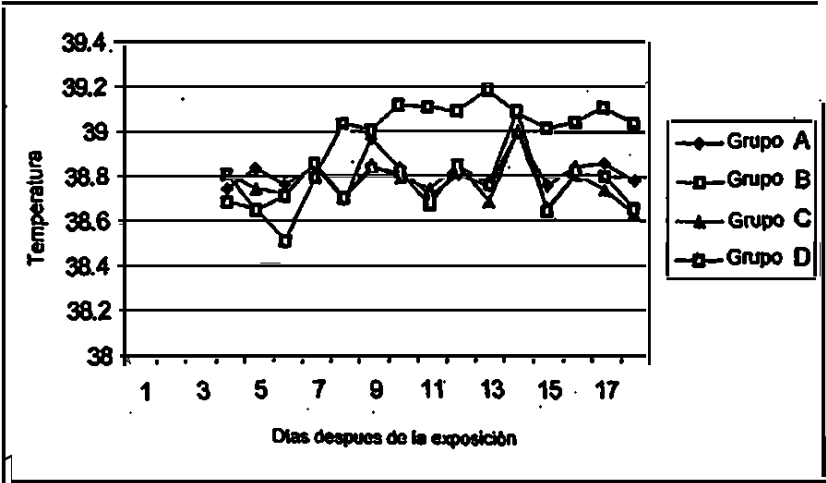
Figura 1

Temperaturas corporales del grupo después de la exposición al M. bovis experimental



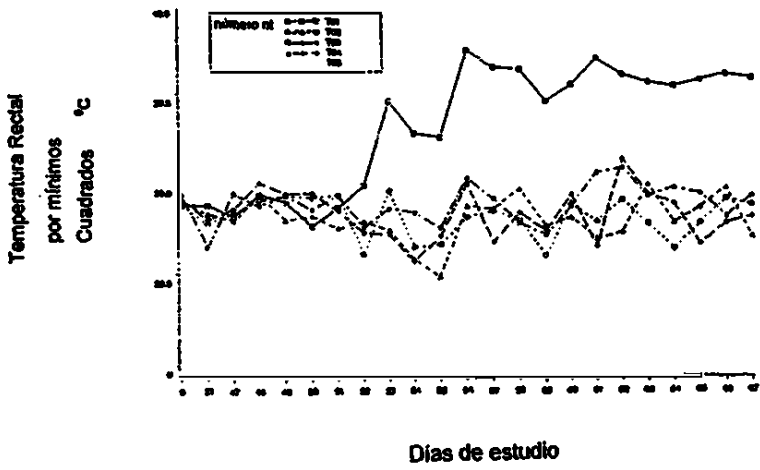
GP

Figura 2
Temperaturas corporales del grupo después de la exposición al M. bovis experimental



97

FIGURA 3



28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/IB 02/02514

100 001

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 565 205 A (PETERSEN G.R. ET AL) 15 October 1996 (1996-10-15) the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/IB 02/02514

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0134189	A	17-05-2001	AU 2622501 A	06-06-2001
			BR 0015398 A	25-06-2002
			EP 1229929 A2	14-08-2002
			WO 0134189 A2	17-05-2001
DE 29921392	U	16-03-2000	DE 29921392 U1	16-03-2000
US 5565205	A	15-10-1996	AT 151990 T	15-05-1997
			AU 643829 B2	25-11-1993
			AU 8492391 A	17-03-1992
			BR 9106748 A	24-08-1993
			CA 2089552 A1	17-02-1992
			DE 69125842 D1	28-05-1997
			DE 69125842 T2	28-05-1998
			DK 550477 T3	27-10-1997
			EP 0550477 A1	14-07-1993
			ES 2103827 T3	01-10-1997
			GR 3024214 T3	31-10-1997
			JP 3040467 B2	15-05-2000
			JP 6503708 T	28-04-1994
			WO 9203157 A1	05-03-1992

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESEN TRAMITE

SECRETARIA Y COMISIA
Radicacion : 0311747 00000000
Fecha (MM/AA) 2003-12-31 15:21:03
Tramite 011 DCI-PATENT 379 FOLIO 001 911 PRO-PA-1-0
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREATIVIDADES

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

USUARIO RADICADOR

() ()
() ()
() ()
() ()
() ()

- Indicacion de que se solicita la concesion de una patente
- Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud
- Descripcion de la invencion
- Dibujos de ser estos pertinentes
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas

COMPLETA

()

INCOMPLETA

() ()

DISEÑO INDUSTRIAL

- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Representacion grafica y fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño
- Comprobante de pago de las tasas establecidas

() ()
() ()
() ()
() ()

COMPLETA

()

INCOMPLETA

() ()

ESQUEMA DE TRAZADO

- Indicacion de que solicita el registro de un Esquema de trazado
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Representacion grafica del esquema de trazado
- Comprobante de pago de las tasas establecidas

() ()
() ()
() ()
() ()

COMPLETA

()

INCOMPLETA

() ()

Firma Responsable



Fecha

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
CARLOS R. OLARTE.
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación N°	03-113787
	Solicitud internacional	PCT/IB02/2514
	Fecha inicio fase nacional	25/01/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio N°	641
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486, de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la oficina de comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la Decisión 486.

Cúmplase
Dado en Bogotá D C, 10 MAYO 2004


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe División de Nuevas Creaciones.

202051