

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 854**

51 Int. Cl.:

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2017 PCT/EP2017/084376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018 WO18115435**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2017 E 17828754 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022 EP 3558351**

54 Título: **Vacuna combinada para cerdos**

30 Prioridad:

23.12.2016 EP 16206789

24.02.2017 EP 17157828

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

20.04.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JANSEN, THEODORUS y
WITVLIET, MAARTEN, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 906 854 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna combinada para cerdos

5 La presente invención se refiere al campo de la vacunología veterinaria, en concreto a las vacunas combinadas para cerdos. En particular, la invención se refiere a una vacuna combinada que comprende un antígeno que no se replica de circovirus porcino tipo 2 y un virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino vivo. Asimismo, la invención se refiere a un kit de partes que incorpora la vacuna combinada y los métodos y usos de la vacuna combinada.

10 La cría intensiva de cerdos en la actualidad depende considerablemente de productos médicos veterinarios para mantener a los animales sanos y permitir una explotación económica. Junto a la optimización del pienso y de los sistemas de gestión de la granja, se utilizan regularmente varios tratamientos: los productos farmacéuticos, tales como hormonas o antibióticos y la vacunación contra patógenos bacterianos o víricos. Algunas de las enfermedades más destacadas que afectan a los cerdos desde una edad temprana están provocadas por bacterias, tales como:

15 *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Lawsonia intracellularis*; y por virus, tales como el circovirus porcino tipo 2 y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo) es el agente primario causante de la neumonía enzoótica (porcina), una enfermedad respiratoria crónica en cerdos, que se produce en todo el mundo. Los lechones jóvenes son especialmente vulnerables a esta enfermedad altamente contagiosa. La bacteria es relativamente pequeña, carece de pared celular y pertenece al grupo Mollicutes. Estas bacterias viven un estilo de vida parásito sobre o dentro de células huésped.

20

La enfermedad pulmonar de Mhyo es en gran medida una patología inmunomediada que conduce a una neumonía consolidada. La bacteria coloniza y daña el epitelio pulmonar ciliado, lo que lleva a la pérdida de la actividad ciliar. Dependiendo de las condiciones de alojamiento y del estrés ambiental, la consecuencia más problemática de esta enfermedad es que predispone a diferentes infecciones secundarias del sistema respiratorio porcino por otros patógenos bacterianos y víricos. Esto da lugar al denominado: complejo de enfermedades respiratorias porcinas (PRDC; del inglés, porcine respiratory disease complex), que muestra lesiones de pulmón graves. Junto a la incomodidad para el animal, la neumonía enzoótica y el PRDC causan importantes pérdidas económicas a la industria porcina, debido a la reducción del rendimiento en la tasa de crecimiento y la tasa de conversión alimentaria, así como a través de los costes de cuidados veterinarios y uso de antibióticos.

25

30

Lawsonia intracellularis (Lawsonia) provoca enteropatía proliferativa, también conocida como ileítis, que es una enfermedad entérica común de los cerdos posdestetados en todo el mundo. La lesión característica es una proliferación de enterocitos inmaduros en las criptas ileales intestinales, cuyas células contiene las bacterias causantes. La eliminación de las bacterias de los enterocitos conduce a la resolución de las lesiones proliferativas asociadas. Las lesiones histológicas se pueden confirmar como positivas para Lawsonia mediante la visualización de bacterias con forma vibrioide de 1,5 - 2,5 µm de largo, especialmente en los enterocitos, aunque también dentro de los macrófagos intestinales. Las bacterias pueden detectarse a través de PCR en casos clínicos o subclínicos. Los casos clínicos suelen estar presentes en el período finalizador del engorde.

35

40

Las bacterias de Lawsonia se describieron por primera vez en 1995 (McOrist *et al.*, Int. J. Syst. Bact., vol. 45, págs. 820-825). Son bacilos gramnegativos inmóviles, intracelulares obligados, de la familia Desulfobionaceae.

45 El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) está relacionado con el síndrome de debilitamiento multisistémico posdestete (PMWS; del inglés, post-weaning multisystemic wasting syndrome) observado en cerdos jóvenes. Los signos clínicos y la patología se publicaron en 1996 e incluyen debilitamiento progresivo, disnea, taquipnea y ocasionalmente, ictericia. El nuevo agente se denominó PCV2 al ser diferente del PCV conocido, que era un contaminante natural de las células PK-15.

50

PCV2 es un virus muy pequeño sin envoltura del género *Circovirus*. Contiene un genoma de ADN circular monocatenario con dos genes principales. El gen ORF2 codifica la proteína de la cápside vírica de aproximadamente 233 aminoácidos. Las proteínas ORF2 de PCV2 expresadas de forma recombinante forman partículas similares a virus que son altamente eficaces como una vacuna de subunidades.

55

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV; del inglés, porcine reproductive and respiratory syndrome virus) se notificó por primera vez en 1987 y a principios de la década de 1990, se convirtió en una pandemia. Es un virus de ARN pequeño envuelto, del género *Arterivirus*, que contiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. El virus provoca pérdidas significativas en la industria porcina debido a trastornos reproductivos y al retraso del crecimiento. Al igual que Mhyo, PRRSV juega un papel significativo en el PRDC multifactorial. Los síntomas clínicos son abortos y fetos mortinatos o momificados y cianosis del oído y la vulva. En cerdos neonatos, el virus provoca dificultad respiratoria, con una susceptibilidad a infecciones respiratorias secundarias aumentada, tal como la enfermedad de Glässer (provocada por *Haemophilus parasuis*). Sin embargo, las infecciones subclínicas también son comunes. El virus es bastante variable: junto a la variante europea (tipo 1) y la variante norteamericana (tipo 2), ahora existe un tercer genotipo: una variante altamente patógena que surgió en China en el año 2000 y que ahora está provocando una enfermedad grave en los cerdos en Asia.

60

65

Existen vacunas comerciales contra cada uno de estos patógenos:

5 Contra Mhyo existen varias vacunas comerciales y estas se utilizan de forma rutinaria en la mayoría de las explotaciones comerciales de cría de cerdos. En general, estas vacunas comprenden inmunógenos que no se replican, tales como subunidades de proteínas y/o bacterinas (es decir, bacterias muertas, intactas o no), que normalmente se administran mediante inyección parenteral. Algunos ejemplos son: RespiSure™ (Zoetis), Ingelvac™ M. hyo (Boehringer Ingelheim) y M+Pac™ (Merck Animal Health).

10 Las vacunas contra Lawsonia están disponibles comercialmente, por ejemplo, Enterisol™ Ileitis (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Estados Unidos), que es una vacuna viva atenuada y Porcilis™ Ileitis (Merck Animal Health, Estados Unidos), que es una bacterina adyuvada.

15 Una vacuna contra una infección con PCV2 puede basarse en el virus PCV2 inactivado completo, por ejemplo, Circovac™ (Merial) o el virus PCV1/PCV2 quimérico inactivado (Suvaxyn™ PCV, Zoetis). Más comunes son las vacunas de subunidades de la proteína ORF2 de PCV2 recombinante expresada, por ejemplo, a partir de un sistema de expresión basado en baculovirus-célula de insecto. Algunos ejemplos son: Porcilis™ PCV (MSD Animal Health) e Ingelvac CircoFlex™ (Boehringer Ingelheim).

20 Se han descrito vacunas contra PRRSV basadas en virus inactivados y están disponibles comercialmente. Sin embargo, las vacunas basadas en virus vivos atenuados se consideran más eficaces. Algunos ejemplos son: Porcilis™ PRRS (MSD Animal Health), Ingelvac PRRS™ MLV (Boehringer Ingelheim) y Fosterá™ PRRS (Zoetis).

Para limitar el estrés de los animales y el coste y el trabajo de los cuidadores, se han preparado algunas vacunas para cerdos como vacunas combinadas. Algunos ejemplos son: Fosterá™ PCV MH (Zoetis) y Porcilis PCV Mhyo (MSD Animal Health), que combinan antígenos de PCV2 y Mhyo.

25 La solicitud de patente WO 2013/152086 (Zoetis) describe una vacuna combinada trivalente para cerdos, que combina antígenos de PCV2 y Mhyo con PRRSV vivo, sin embargo, la vacuna descrita no se comercializa. Por consiguiente, hay interés en este campo por las vacunas combinadas eficaces para cerdos frente a enfermedades porcinas relevantes.

30 Un componente importante de las vacunas que comprenden antígenos que no se replican es un adyuvante. Esto proporciona una inmunoestimulación para el antígeno que no se replica, que de otro modo no sería inmunogénico. Esto desencadenará diferentes rutas del sistema inmunitario, los mecanismos básicos no se comprenden bien. En las vacunas veterinarias, pueden utilizarse una amplia variedad de compuestos como adyuvantes, por ejemplo: aceite mineral, por ejemplo, Bayol™ o Markol™, Montanide™ o aceite de parafina; aceite no mineral, tal como escualeno, escualano o aceites vegetales, por ejemplo, oleato de etilo; sales de aluminio, por ejemplo, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio; péptidos, tales como dimetilglicina o tuftsina; componentes de la pared celular bacteriana, tales como lípido A y muramildipéptido; polímeros (sintéticos), tales como plurónicos, dextrans, carbómeros, pirano o saponina; citocinas; y estimuladores de receptores de tipo Toll, tales como oligodesoxinucleótidos inmunoestimuladores que contienen grupos CpG no metilados; etc.

40 El principal problema que hay que superar en la fabricación de las vacunas combinadas adyuvadas, es prevenir una interacción entre los diversos componentes de la vacuna que influiría negativamente en la respuesta inmunitaria o en la seguridad o estabilidad de la vacuna. Tal interacción puede ocurrir, por ejemplo, entre los propios antígenos, por ejemplo, porque algunos son productos bastante brutos, tales como las bacterinas de Mhyo y de Lawsonia. Asimismo, el adyuvante puede interferir con o incluso dañar a un antígeno de la vacuna. Tal interacción adversa es de especial relevancia cuando la combinación comprende un microorganismo vivo. Las autoridades de registro que proporcionan autorizaciones de comercialización también reconocen esto, por ejemplo: el USDA hace cumplir la regulación 9CFR 113.35 para la detección de actividad virucida en una vacuna inactivada que comprende un virus vivo.

50 Estos problemas potenciales en el desarrollo de vacunas combinadas complejas se reconocen en general; véase, por ejemplo, una publicación de la EMEA: "Note for guidance: requirements for combined veterinary products" (EMEA, 2000, CVMP/IWP/52/97- FINAL); y una publicación del Department of Health and Human Services de Estados Unidos, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, de abril de 1997: "Guidance for Industry, for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: Production, Testing and Clinical Studies", n.º de expediente 97N-0029. Ambas publicaciones advierten sobre los efectos de las interferencias en la eficacia y la seguridad de una vacuna, cuando se combinan antígenos y adyuvantes.

60 Por tanto, es difícil desarrollar una vacuna combinada que induzca una respuesta inmunitaria eficaz contra una combinación de antígenos que no se replican y un microorganismo que se replica, especialmente para combinaciones complejas relacionadas con múltiples especies de patógenos. Además, la vacuna combinada debe ser segura para usar en animales, es decir, que no produzca reacciones secundarias significativas, tales como fiebre, hinchamiento local, pérdida de apetito, etc. Asimismo, son relevantes propiedades más prácticas: idealmente, la vacuna combinada debería ser capaz de una producción económica, ser lo suficientemente estable durante la formulación y el almacenamiento y permitir métodos de prueba de potencia para cada antígeno, en presencia de los otros antígenos.

65 Por tanto, un objetivo de la presente invención es superar una o más desventajas de la técnica anterior y acomodarse

a una necesidad en el campo, proporcionando una vacuna combinada eficaz y segura para cerdos contra la enfermedad asociada con la infección por PCV2 y PRRSV.

Desafortunadamente, no tuvo éxito una combinación sencilla de antígeno que no se replica del PCV2 y del virus PRRS vivo en una formulación adyuvante existente. Por ejemplo: una formulación adyuvante que se utiliza para algunas otras vacunas porcinas es Xsolve™ (anteriormente denominada: Microsol-Diluvac Forte™; MSD Animal Health). Esta contiene una combinación de los adyuvantes aceite mineral ligero y acetato de vitamina E, con el emulsionante Tween™ 80. Se utiliza, por ejemplo, para: Porcilis PCV (que comprende el antígeno ORF2 de PCV2), Porcilis Ileitis (que comprende bacterina de Lawsonia) y Circumvent PCV-M G2 (que comprende los antígenos de PCV2 y Mhyo)

Sin embargo, una vacuna combinada de antígenos que no se replican de Mhyo, Lawsonia y PCV2 con PRRSV vivo en Xsolve, no fue eficaz de forma coherente. Esto se debe principalmente a un efecto virucida sobre el componente del PRRSV vivo. Además, Xsolve, al igual que otros adyuvantes que contienen aceite mineral, induce reacciones de vacunación relativamente fuertes. Si bien estas se encuentran dentro de los límites aceptables, se desea una mejoría.

De forma similar, una combinación de estos 4 antígenos en un adyuvante conocido como Amphigen™ (Zoetis), también mostró un efecto virucida sobre el PRRSV. Amphigen comprende aceite mineral como adyuvante y lecitina como emulsionante.

Asimismo, el adyuvante Emunade (aceite mineral + hidróxido de aluminio) fue virucida para el PRRSV vivo.

Una de las formulaciones adyuvantes descritas en el documento WO 2013/152086 ('086) supuestamente no es significativamente virucida para el PRRSV vivo: una dilución al 10 % de la formulación denominada "aceite de SP". Este adyuvante se comercializa como Metastim™. Desafortunadamente, la composición exacta de la formulación que se probó no se desvela, pero los intervalos de composición preferidos del aceite de SP se proporcionan en el párrafo que abarca las páginas 24-25 del '086. Por tanto, utilizando este aceite de SP en una dilución al 10 % en una vacuna significa que la vacuna ensayada comprendió: Pluronic™ al 0,1 - 0,3 % v/v, escualano al 0,3 - 0,6 % v/v y Tween 80 al 0,01 - 0,05 % v/v.

'086 recomienda también una serie de otros adyuvantes "adecuados" ('086, página 25, líneas 7 - 15), entre los que se encuentran Amphigen y Xsolve. Sin embargo, en la práctica estos no resultaron ser adecuados; algo que también es evidente a partir de la Figura 10 del '086.

Otro adyuvante de vacuna conocido es AS03™ (GSK), que contiene escualeno al 2,1 % p/v y vitamina E al 2,4 % p/v, con Tween 80 al 1,0 % p/v como emulsionante. Sin embargo, este adyuvante se describe para su aplicación en seres humanos y para antígenos a partir de una sola especie de patógeno, principalmente del virus de la gripe humana inactivado. Además, el uso de AS03 se ha relacionado científicamente con un riesgo aumentado de anafilaxia y con la inducción de trastornos autoinmunitarios.

Además, si bien la vacuna monovalente Porcilis™ Mhyo está formulada en un solubilizado acuoso de acetato de vitamina E, sin embargo, cuando se combina con el antígeno de PCV2, se encontró que un adyuvante y una formulación completamente diferentes resultaron óptimos: la vacuna combinada bivalente Porcilis PCV Mhyo se adyuva con Emunade™, una mezcla de aceite mineral e hidróxido de aluminio y los antígenos necesitan combinarse de una manera especial, como se describe en el documento WO 2016/091998.

La serie de vacunas ProSystem™ (Merck Animal Health) es una serie de vacunas porcinas que contienen varios antígenos que no se replican de diversas especies bacterianas. Estas vacunas son formulaciones acuosas, adyuvadas con gel de hidróxido de aluminio. Están autorizados para la resuspensión de vacunas criodesecadas para cerdos con virus vivos atenuados, tales como el virus de la gastroenteritis transmisible y Rotavirus.

De nuevo, la vacuna combinada trivalente 3Flex™ (Boehringer Ingelheim) es diferente en cuanto a la formulación y al adyuvante utilizados. Se comercializa como 3 frascos separados con antígenos que no se replican de Mhyo y PCV2, combinada con PRRSV vivo. Estos deben mezclarse en el acto para formar una composición acuosa con un adyuvante denominado Impranflex™ que contiene Carbopol.

Con esta multitud de opciones, los inventores no tuvieron indicaciones sobre qué tipo de formulación y qué tipo de adyuvante(s) utilizar para el desarrollo de una vacuna combinada que fuera segura y estable y eficaz contra la enfermedad asociada con la infección por PCV2 y PRRSV.

Sorprendentemente, se descubrió que este objetivo puede conseguirse y por consiguiente, se puede superar una o más desventajas de la técnica anterior, proporcionando una vacuna combinada para cerdos, que comprende un antígeno que no se replica de PCV2 y un PRRSV vivo, de modo que la vacuna se formula como una emulsión de aceite en agua y se adyuva con escualano y acetato de vitamina E.

Se descubrió que una vacuna combinada de este tipo y composición no fue virucida para el PRRSV vivo y que fue eficaz para proteger a los cerdos contra las infecciones con PCV2 y PRRSV. Asimismo, la vacuna fue segura para los

animales objetivo, pudo producirse económicamente, fue estable tras la formulación y el almacenamiento y permitió ensayos de potencia para todos los antígenos en la vacuna final.

5 No se sabe exactamente por qué esta formulación particular y esta selección de adyuvantes particular es tan favorable para esta combinación de antígenos. Aunque los inventores no pretenden quedar ligados a teoría alguna o modelo que pueda explicar estos hallazgos, especulan que la combinación específica de escualano y acetato de vitamina E, en una formulación de aceite en agua, proporciona justo el nivel adecuado de inmunoestimulación a partir de estos antígenos, para ser eficaces contra sus enfermedades relacionadas. Esto sin causar reacciones secundarias significativas de la vacunación y aparentemente, protegiendo al PRRSV vivo del efecto virucida significativo del adyuvante y de los otros antígenos.

15 Esto no era del todo evidente a partir de la técnica anterior, dado que no hay otra vacuna combinada que comprenda estos antígenos. Asimismo, algunos adyuvantes descritos para otras vacunas combinadas porcinas resultaron no ser útiles para esta combinación concreta.

20 Por tanto, en un aspecto la invención se refiere a una vacuna combinada que comprende un antígeno que no se replica de circovirus porcino tipo 2 (PCV2) y un virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino vivo (PRRSV), caracterizada por que la vacuna es una emulsión de aceite en agua que comprende escualano y acetato de vitamina E.

Una "vacuna combinada" es una vacuna que comprende antígenos de más de una sola especie de microorganismo.

25 Una "vacuna" es bien conocida por ser una composición que tiene un efecto médico. Una vacuna comprende un componente inmunológicamente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El "componente inmunológicamente activo" es una o más moléculas antigénicas, en este caso: antígeno que no se replica de PCV2 y PRRSV vivo. Estos se reconocen por el sistema inmunitario de un cerdo objetivo e inducen una respuesta inmunológica protectora. La respuesta puede originarse en el sistema inmunitario innato y/o adquirido del objetivo y puede ser del tipo celular y/o humoral.

30 Generalmente, una vacuna es eficaz reduciendo la gravedad de una infección, por ejemplo, reduciendo el número de patógenos o acortando la duración de la replicación del patógeno en un animal hospedador.

35 Asimismo o posiblemente como resultado de la misma, una vacuna generalmente es eficaz reduciendo o mejorando los síntomas (clínicos) de enfermedad que puede causar tal infección o replicación o por la respuesta del animal a esa infección o replicación.

40 La vacuna combinada de acuerdo con la invención induce en los cerdos objetivo una respuesta inmunitaria protectora, cuyo efecto es la prevención o la reducción de la gravedad de una infección por PCV2 y PRRSV. Asimismo, la vacuna combinada previene o reduce uno o más signos de enfermedad que están asociados con tal infección o replicación. Esto se traduce en un efecto positivo sobre parámetros económicos tales como: conversión alimentaria, aumento de peso diario promedio, calidad de la canal y tamaño y calidad de las camadas. Los efectos observados de la vacuna combinada de acuerdo con la invención son:

45 para PCV2: reducción de la carga vírica en sangre y tejidos linfáticos; en cerdos de engorde: reducción de la mortalidad y pérdida de peso corporal; y para PRRSV: Para cerdos de engorde: reducción de la enfermedad respiratoria con neumonía intersticial necrosante, conduciendo a un crecimiento y una conversión alimentaria mejorados. Para cerdos reproductores: reducción de la transferencia transplacentaria del virus y mejora de los fallos reproductivos, tales como: partos prematuros y mortinatos o lechones momificados y debilidad y enfermedad respiratoria posdestete en los lechones sobrevivientes.

55 Para infecciones con PCV2 y PRRSV, la inducción de inmunoprotección y por tanto, la potencia de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, puede detectarse serológicamente como un aumento en el nivel sérico de los anticuerpos específicos del patógeno, fácilmente detectable usando técnicas basadas en ELISA.

Una vacuna combinada de acuerdo con la invención también puede denominarse coloquialmente como una vacuna "contra" PCV2 y PRRSV; o como una vacuna de PCV2 y de PRRSV.

60 Se describirán detalles y preferencias de una vacuna combinada de acuerdo con la invención en el presente documento más adelante.

65 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" para la invención, es un líquido acuoso de un alto grado de pureza y preferiblemente estéril, por ejemplo: agua, una solución salina fisiológica o una solución salina tamponada con fosfato. El vehículo puede comprender aditivos adicionales, tales como estabilizantes o conservantes.

La expresión "que comprende" (así como las variaciones, tales como "comprenden", "comprende" y "comprendió"),

como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a todos los elementos y en cualquier combinación posible concebible para la invención, que están cubiertos por o incluidos en la sección de texto, párrafo, reivindicación, etc., en la que se aplica esta expresión, incluso si tales elementos o combinaciones no se citan explícitamente; y no a la exclusión de cualquiera de tal(es) elemento(s) o combinaciones.

5 Por tanto, cualquier sección de texto, párrafo, reivindicación, etc., también puede referirse por tanto a una o más realizaciones en donde la expresión "que comprende" (o sus variantes) se sustituye por expresiones tales como "consiste en", "que consiste en" o "consiste esencialmente en".

10 "Antígeno" se refiere a moléculas que pueden inducir una respuesta inmunológica en condiciones adecuadas. Un antígeno puede prepararse sintéticamente o derivarse a partir de una fuente biológica, por ejemplo, puede ser un microorganismo o una parte del mismo.

15 Un antígeno "que no se replica" se refiere a moléculas tales como proteínas, carbohidratos, lípidos o ácidos nucleicos o son combinaciones complejas de los mismos, más o menos puras. Cuando se prepara a partir de un microorganismo, un antígeno que no se replica puede referirse a un microorganismo intacto pero muerto (es decir, no replicante) o puede ser parte del mismo, tal como un extracto, fracción, homogeneizado o sonificado. Asimismo, un antígeno que no se replica puede ser un producto basado en ácidos nucleicos o recombinante, tal como un vector de expresión o una proteína expresada o el producto de un sistema de expresión *in vitro*. Todos estos son bien conocidos en la técnica.

20 Para la invención, el PRRSV es replicante.
 "PRRSV vivo" se refiere a PRRSV vivos que son adecuados para usar como un componente de vacuna, es decir, que tiene un nivel reducido de patogenicidad, también conocido como que está atenuado o modificado vivo.

25 "Atenuado" para la invención se define como que causa un nivel más bajo de lesiones y/o que tiene una tasa reducida de infección o de replicación. Todo, en comparación con un PRRSV no modificado o "de tipo silvestre". La atenuación de PRRSV puede obtenerse *in vitro*, por ejemplo, pasando por animales experimentales o en cultivo celular y selección o a través de tecnología de ADN recombinante, todo bien conocido en la técnica.

30 Si bien es biológicamente incorrecto referirse a un virus como "vivo", esa es la forma común de referirse a un virus que no está inactivado. Por consiguiente, para la invención, el término "vivo" en cuanto al PRRSV, se refiere a un virus de PRRS que es capaz de replicación en condiciones adecuadas, por ejemplo, en células o animales hospedadores adecuados.

35 El "circovirus porcino tipo 2" y el "virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino" son bien conocidos en la técnica como virus, perteneciendo a sus respectivos géneros y familias. Estos inducen enfermedades como se describe en libros de texto bien conocidos, tales como: "The Merck veterinary manual" (10ª ed., 2010, C.M. Kahn ed., ISBN: 091191093X) o: "Diseases of Swine", 10ª ed., Zimmerman ed., Wiley-Blackwell, Ames, IA., Estados Unidos, ISBN: 081382267X.

40 Cada uno de estos patógenos presenta los rasgos característicos de sus miembros de grupo taxonómico, tales como las características morfológicas, genómicas y bioquímicas, así como las características biológicas, tales como el comportamiento fisiológico, inmunológico o patológico.

45 Como es conocido en el campo, la clasificación de un microorganismo como una especie particular se basa en una combinación de tales rasgos. Por tanto, la invención incluye también PCV2 o PRRSV que están subclasificados a partir de los mismos de alguna forma, por ejemplo, como una subespecie, cepa, aislado, genotipo, variante, subtipo o subgrupo y similares.

50 Será evidente para un experto en la materia que, si bien un PCV2 o PRRSV particular para la invención puede asignarse actualmente a una especie específica, esa es una clasificación taxonómica que podría cambiar con el tiempo según los nuevos conocimientos puedan conducir a la reclasificación en un grupo taxonómico nuevo o diferente. Sin embargo, como esto no cambia el propio microorganismo o su repertorio antigénico, sino solo su nombre científico o clasificación, tales microorganismos reclasificados permanecen dentro del alcance de la invención.

55 PCV2 o PRRSV para usar en la invención pueden obtenerse a partir de diversas fuentes, por ejemplo, como aislado de campo de un porcino en la naturaleza o en una granja o de varios laboratorios, instituciones (de depósito) o universidades (veterinarias).

60 Una "emulsión de aceite en agua" es una composición bien conocida, que comprende una fase acuosa externa, que contiene una fase oleosa dispersa interna. Puede formarse tal emulsión mediante la selección del tipo y concentración adecuados de emulsionante(s). Los procedimientos y equipamiento para la preparación de una emulsión de aceite en agua para usar como una vacuna son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en manuales tales como: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, Estados Unidos, ISBN: 683306472) y: "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret *et al.* ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681).

Para la invención, la fase acuosa externa comprende el antígeno que no se replica de PCV2 y el PRRSV vivo en un vehículo farmacéuticamente aceptable; y la fase oleosa comprende escualano y acetato de vitamina E como adyuvantes.

- 5 Se encontró que la vacuna combinada de acuerdo con la invención fue muy eficaz, segura y estable, cuando se preparó como una emulsión de aceite en agua.

Se describirán realizaciones y preferencias para la fabricación de una emulsión de aceite en agua para la vacuna combinada de acuerdo con la invención más adelante.

- 10 "Escualano" se refiere al compuesto químico con el n.º CAS 111-01-3. Algunos nombres alternativos son: aceite de hígado de tiburón hidrogenado, hexametilтетраcosano o perhidroescualeno. Este no debe confundirse con el escualeno (n.º CAS 111-02-4), que es un aceite de C30 poliinsaturado y que es metabolizable como un compuesto de la ruta del colesterol. Sin embargo, el escualano es la forma completamente hidrogenada del escualeno y por tanto, no es propenso a la oxidación. Por tanto, aunque el escualano es un aceite no mineral y se transporta desde el lugar de la inyección, no es metabolizable.

- 20 Originalmente, el precursor del escualano se obtenía de hígados de tiburones, pero por preocupaciones ambientales, se ha cambiado a otras fuentes naturales, tales como el aceite de oliva o la síntesis química. Por tanto, en la definición de escualano se incluyen formas naturales, sintéticas o semisintéticas o mezclas de las mismas. El escualano se comercializa en varios grados de pureza, por ejemplo: de origen vegetal, de Worlee (Squalane, vegetal) o de Croda (Pripure Squalane); o sintético, por ejemplo, de Kuraray (Squalane-PE). Para la invención, se prefiere una alta pureza del escualano: preferentemente una pureza de más de un 75 %, más preferentemente una pureza de más de un 80, un 90 o incluso de más de un 95 %, en ese orden de preferencia.

- 25 "Acetato de vitamina E" se refiere al compuesto químico con el n.º CAS 58-95-7. Algunos nombres alternativos son: acetato de tocoferilo o acetato de alfa tocoferol. El acetato de vitamina E es un éster de acetato de vitamina E (tocoferol) y puede derivarse de materiales vegetales, tales como semillas, frutos secos, frutas u hojas o de carnes grasas, pero también puede producirse sintéticamente. Por tanto, en la definición de acetato de vitamina E se incluyen formas naturales, sintéticas o semisintéticas o mezclas de las mismas. El acetato de vitamina E se comercializa, en diferentes grados de pureza.

Para la invención, el antígeno que no se replica de PCV2 es preferentemente: la proteína ORF2.

- 35 Cada uno de los antígenos en la vacuna combinada de acuerdo con la invención puede ser de un solo tipo o puede ser de múltiples tipos, por ejemplo, de una o de más de una cepa del patógeno respectivo.

- 40 El escualano en la vacuna combinada de acuerdo con la invención está presente en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 9 % p/v de la vacuna. Más preferentemente, el escualano está presente en una cantidad de entre un 2 - 7 % p/v o incluso un 2 - 5 % p/v de la vacuna, en ese orden de preferencia.

Lo más preferido: el escualano está presente en una cantidad de aproximadamente un 3,4 % p/v de la vacuna.

- 45 Por tanto, en una realización de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, la vacuna comprende escualano en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 9 % p/v.

- 50 Para la invención "aproximadamente" indica que un número puede variar entre ± 25 % alrededor de su valor indicado. Preferentemente, "aproximadamente" significa ± 20 % alrededor de su valor, más preferentemente "aproximadamente" significa $\pm 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2$ % alrededor de su valor o incluso "aproximadamente" significa ± 1 % alrededor de su valor, en ese orden de preferencia.

- 55 El acetato de vitamina E en la vacuna combinada de acuerdo con la invención está presente en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 10 % p/v de la vacuna. Más preferentemente, el acetato de vitamina E está presente en una cantidad de entre un 2 - 8 % p/v o incluso un 3 - 5 % p/v de la vacuna, en ese orden de preferencia.

Lo más preferido: el acetato de vitamina E está presente en una cantidad de aproximadamente un 4 % p/v de la vacuna.

- 60 Por tanto, en una realización de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, la vacuna comprende acetato de vitamina E en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 10 % p/v.

- 65 Los inventores encontraron que el uso de escualano y acetato de vitamina E en estas cantidades en la vacuna combinada de acuerdo con la invención fue ventajoso para adyugar una respuesta inmunitaria contra cada uno de los patógenos: PCV2 y PRRSV y proporcionar estabilidad. Sorprendentemente, sin embargo, esto no provocó ninguna reacción secundaria significativa de la vacunación cuando se administró a los cerdos objetivo, ni causó ningún efecto virucida significativo en el PRRSV vivo.

El acetato de vitamina E para usar en la vacuna combinada de acuerdo con la invención es preferentemente acetato de DL-alfa-tocoferol, que es el racemato del producto químico con el n.º CAS: 7695-91-2.

5 En una realización de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, los antígenos son:

10 Para el antígeno que no se replica de PCV2: la proteína ORF2 se obtiene de un sistema de expresión recombinante o se suministra y expresa a través de una partícula de replicón; una partícula de replicón es una partícula de alfavirus defectuosa, como la desarrollada por AlphaVax. El PCV2 parental de la secuencia de ORF2 que se expresa puede ser de cualquiera de los serotipos a, b, c o d de PCV2 o puede ser de una quimera a partir de uno o más de estos serotipos.

15 Para PRRSV: el virus vivo atenuado es de uno o más genotipos, por ejemplo tipo 1, tipo 2 y/o tipo 3. Más preferentemente: el PRRSV vivo es una versión atenuada de la cepa DV o la cepa Nebraska.

20 En una realización de la vacuna de acuerdo con la invención, el vehículo farmacéuticamente aceptable es agua. Preferentemente, el agua es de un alto grado de pureza, tal como agua doblemente destilada, microfiltrada o de ósmosis inversa. Más preferentemente: el agua es agua para inyección y es estéril y está esencialmente libre de pirógenos.

25 Un rasgo conveniente de las vacunas basadas en emulsiones de aceite en agua, es que los antígenos suelen estar en la fase acuosa. Esto significa que la fase oleosa se puede preparar y emulsionar en agua por separado, empleando métodos y técnicas que como tales no serían compatibles con el mantenimiento de la calidad o la viabilidad de los antígenos de la vacuna. Por ejemplo, utilizando una emulsificación de alta energía a altas temperaturas. Esto genera una emulsión oleosa para la invención, que es una emulsión de aceite en agua de escualano, acetato de vitamina E y polisorbato 80 en agua.

30 Para preparar la vacuna combinada de acuerdo con la invención, la fase acuosa con los antígenos y la emulsión oleosa con los adyuvantes se combinan mediante mezcla suave a temperatura ambiente.

35 La combinación de las dos composiciones provoca una dilución de cada una de ellas. Por consiguiente, cada una debe prepararse como una composición intermedia en la que la concentración de los diversos componentes sea mayor que la que tendrá la vacuna final, por un factor igual a la dilución que se aplicará. Normalmente, la fase acuosa y la emulsión oleosa pueden mezclarse en una relación de volúmenes entre 10:90 y 90:10.

La vacuna combinada de acuerdo con la invención comprende preferentemente una fase acuosa y una emulsión oleosa (ambas como se han descrito), en una relación de volúmenes entre aproximadamente 20:80 y aproximadamente 80:20.

40 Por tanto, en una realización, la vacuna combinada de acuerdo con la invención se prepara a partir de la mezcla de una fase acuosa y de una emulsión oleosa, en una relación de volúmenes entre aproximadamente 20:80 y aproximadamente 80:20.

45 Preferentemente, la relación de volúmenes es entre aproximadamente 30:70 y aproximadamente 70:30; entre aproximadamente 40:60 y aproximadamente 60:40; o incluso la relación de volúmenes es de aproximadamente 50:50, en ese orden de preferencia.

50 Evidentemente, cuando la relación de combinación de la fase acuosa y de la emulsión oleosa es 50:50, a continuación, cada una de las dos composiciones debe comprender sus diversos componentes en una cantidad o en una concentración que es dos veces superior a la deseada en la formulación de la vacuna final que se prepara a partir de la combinación de las dos composiciones intermedias.

55 En una realización preferida, la emulsión oleosa para la invención se prepara utilizando un emulsionante con un valor de HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo; del inglés, hydrophilic-lipophilic balance) de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 20; un emulsionante preferido es el polisorbato 80.

Polisorbato 80 se refiere a un compuesto químico con el n.º CAS 9005-65-6, también denominado: monooleato de polioxietilensorbitano. Tiene un valor de HLB de 14 y se comercializa ampliamente, por ejemplo, como Tween 80.

60 Preferentemente, el polisorbato 80 está presente en la vacuna combinada de acuerdo con la invención en una cantidad de entre aproximadamente un 0,1 y aproximadamente un 5 % p/v de la vacuna. Más preferentemente, el polisorbato 80 está presente en una cantidad de entre 0,3 - 3 % p/v, 0,5 - 2,5 % o incluso 1 - 2 % p/v de la vacuna, en ese orden de preferencia.

65 Lo más preferido: el polisorbato 80 está presente en una cantidad de aproximadamente un 1,6 % p/v de la vacuna.

Por tanto, en una realización, la vacuna combinada de acuerdo con la invención comprende polisorbato 80 en una cantidad de entre aproximadamente un 0,1 y aproximadamente un 5 % p/v.

5 Puede prepararse una emulsión oleosa para la invención a cualquier escala y utilizar cualquier equipamiento de
homogeneización adecuado, tal como el de: Silverson, Ultra Turrax™ o un reactor Dispax (IKA). El experto en la
materia puede realizar y optimizar tal proceso de emulsificación para controlar el tamaño de las partículas de la fase
dispersa (en el presente documento: los adyuvantes oleosos). Junto con la elección del tipo y la concentración del (de
los) emulsionante(s), esto controla las propiedades farmacéuticas de la emulsión y también su estabilidad. Los
10 parámetros principales del proceso de emulsificación en sí son: la entrada de energía (potencia y rpm), la temperatura,
la duración y el número de ciclos repetidos. Los detalles de las realizaciones del proceso de emulsificación se
presentan más adelante.

15 El tamaño de las partículas de la fase dispersa es preferentemente bastante pequeño. Cuando el diámetro de las
partículas de la fase dispersa es inferior a aproximadamente 1 micrómetro, tales emulsiones se denominan
comúnmente "emulsiones submicrónicas".

En una realización de la emulsión de aceite en agua de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, la emulsión
es una emulsión submicrónica.

20 Los equipos para medir tamaños de partículas de 1 micrómetro o menos, están disponibles generalmente, por ejemplo,
mediante medición por difracción láser. Normalmente, el tamaño de partícula se expresa en nanómetros (nm) y como
un tamaño de partícula promedio, también conocido como la mediana del diámetro, expresada como el D50 de una
distribución de tamaños de partícula acumulada.

25 Para la invención, el tamaño de partícula se expresa en nm de D50, como se determina utilizando un Mastersizer™
(Malvern Instruments). Las mediciones del tamaño de las partículas pueden hacerse en la emulsión oleosa
(concentrada) o en la vacuna combinada; el índice de refracción de partículas de la fase oleosa de la invención es
1,48. El informe de análisis de tamaño de Malvern Mastersizer presenta D50 como D(0,50). Todo esto se conoce bien
por un experto en la materia.

30 Existen muchas maneras disponibles para producir tales emulsiones submicrónicas, normalmente mediante el uso de
un proceso de emulsificación de alta energía, por ejemplo, utilizando: homogeneizadores de alta presión, dispositivos
de rotor-estator, mezcladores, ondas ultrasónicas, membranas microporosas o dispositivos de microcanalización.

35 El proceso preferido para la emulsificación de alta energía para la invención es el uso de un homogeneizador de alta
presión, preferentemente un Microfluidiser™ (Microfluidics). Normalmente, 3 pases a una presión de entre 50.000 -
150.000 kPa (es decir, 7000 - 22000 psi) serán suficientes.

40 Las emulsiones preparadas de esta manera normalmente tienen partículas de fase dispersa con un D50 de 500 nm o
menos y tienen una distribución de tamaños estrecha; para la invención, la fase dispersa son las gotitas de los
adyuvantes oleosos.

45 Normalmente, las emulsiones con tales partículas de tamaño muy fino de la fase dispersa se preparan en varias
etapas. De esta forma, se prepara una emulsión aceitosa inicial relativamente gruesa mezclado a baja energía, seguida
de uno o más tratamientos posteriores de alta energía para lograr una reducción adicional del tamaño de partícula.

50 Después, la emulsión oleosa "microfluidificada", que comprende los adyuvantes y el emulsionante en agua, a
continuación, se combina con la fase acuosa que comprende los antígenos, para preparar la vacuna combinada de
acuerdo con la invención.

Por tanto, en una realización de la emulsión submicrónica de aceite en agua de la vacuna combinada de acuerdo con
la invención, las gotitas de aceite tienen un D50 de 500 nm o menos; preferentemente D50 es 250 nm o menos. Más
preferentemente: D50 es 150 nm o menos.

55 Por razones de consistencia y calidad del producto, no solo puede supervisarse y controlarse ventajosamente la
mediana del diámetro de partícula, sino también la dispersión en el tamaño de partícula, también conocida como
distribución de tamaños. La distribución de tamaños de las gotitas de aceite en la emulsión submicrónica de aceite en
agua de la vacuna combinada de acuerdo con la invención es preferentemente relativamente estrecha. Un indicador
de la distribución de tamaños de las partículas es el D90 de una distribución de tamaños de partícula acumulada.

60 Por tanto, en una realización de la emulsión submicrónica de aceite en agua de la vacuna combinada de acuerdo con
la invención, las gotitas de aceite tienen un D90 por debajo de 900 nm, más preferentemente, D90 está por debajo de
500 nm, 400 nm o incluso por debajo de 300 nm, en ese orden de preferencia. Lo más preferido: D90 es
aproximadamente 250 nm.

65 Una de las ventajas de la emulsión que tiene un tamaño y una distribución de partícula tan pequeños, es que a

continuación, esta puede esterilizarse mediante filtración, sin pérdida significativa de material. Esto se debe a que los filtros de esterilización típicos tienen un tamaño de poro de aproximadamente 0,2 micrómetros. Tal esterilización por filtro supera la necesidad de otros métodos de esterilización que pueden dañar la calidad de los componentes de la emulsión oleosa, tales como mediante: calentamiento, productos químicos o irradiación.

5 Dependiendo de las circunstancias del uso previsto de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, por ejemplo, condiciones de campo o específicas de las especies objetivo, puede preferirse optimizar la vacuna. Esto está dentro de las capacidades de un experto en la materia y generalmente implica el ajuste fino de la eficacia, de la seguridad o de la estabilidad de la vacuna.

10 Una vacuna combinada de acuerdo con la invención comprende el antígeno que no se replica de PCV2 y el PRRSV vivo, en cantidades que son capaces de inducir en el objetivo porcino una respuesta inmunitaria protectora contra sus enfermedades asociadas, como se ha descrito anteriormente.

15 Un experto en la materia en el campo de la invención será más capaz de determinar la eficacia de una vacuna combinada de acuerdo con la invención, por ejemplo, supervisando la respuesta inmunológica tras la vacunación o después de una infección de desafío, por ejemplo, mediante la supervisión de los signos de enfermedad de los objetivos, las puntuaciones clínicas o mediante reaislamiento del patógeno y comparando estos resultados con una respuesta de desafío a la vacunación observada en animales vacunados de forma simulada.

20 Como una indicación, las cantidades de los antígenos a utilizar en la vacuna combinada de acuerdo con la invención pueden basarse en las utilizadas en las respectivas vacunas monovalentes o combinadas con estos antígenos. Por ejemplo, la vacuna combinada de acuerdo con la invención puede comprender por mililitro: de PCV2: 1 - 50 µg ORF2; y de PRRSV: 10^3 - 10^6 TCID₅₀. Los métodos para cuantificar estos antígenos son bien conocidos en la técnica y también pueden basarse en la cuantificación basada en ELISA frente a estándares específicos.

25 La vacuna combinada de acuerdo con la invención puede combinarse ventajosamente con uno o más antígenos adicionales, replicativos o no replicativos, completos o alterados. Sin embargo, la combinación se hace preferentemente con cuidado para salvaguardar la estabilidad y eficacia de la vacuna combinada global y la viabilidad de los componentes replicativos de la vacuna. Tales elecciones están dentro de las capacidades rutinarias del experto en la materia.

30 Por tanto, en una realización, la vacuna combinada de acuerdo con la invención comprende al menos un antígeno adicional.

35 El antígeno adicional es una forma atenuada de un microorganismo que es patógeno para cerdos o es un antígeno que no se replica derivado de un microorganismo patógeno para los cerdos. El microorganismo puede ser cualquier virus, bacteria, parásito, hongo, rickettsia, protozoo y/o parásito que es patógeno para cerdos.

40 Los ejemplos de tales microorganismos patógenos para cerdos son: virus de la pseudorabia, parvovirus porcino, virus de la fiebre porcina clásica, virus de la gripe porcina, virus de la fiebre aftosa, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus respiratorio porcino, virus de la estomatitis vesicular, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Brachyspira*, *E. coli*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, Clostridia, *Pasteurella*, *Erysipelothrix*, *Leptospira*, *Bordetella*, *Toxoplasma*, *Isospora* y *Trichinella*.

Los antígenos adicionales preferidos son uno o más de: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Brachyspira hyodysenteriae* y virus de la gripe porcina.

50 Por tanto, en una realización preferida, la vacuna combinada de acuerdo con la invención también comprende un antígeno que no se replica de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo).

En una realización preferida alternativa, la vacuna combinada de acuerdo con la invención también comprende un antígeno que no se replica de *Lawsonia intracellularis* (Lawsonia).

55 Los antígenos que no se replican de Mhyo y Lawsonia son preferentemente una bacterina.

60 Para la invención, una "bacterina" es una composición que comprende bacterias inactivadas (muertas), de modo que las bacterias inactivadas pueden ser células enteras intactas o que pueden haberse llegado a dañar en cierta medida por la inactivación o una mezcla de las mismas, por ejemplo, como en un cultivo inactivado completo.

La bacterina de Mhyo o de Lawsonia preferentemente es un cultivo de células enteras muertas. La bacterina de Mhyo es preferentemente de la cepa 11 o de la cepa J. NB: Mhyo anteriormente se llamaba *M. suis pneumoniae*.

65 Las cantidades de los antígenos a utilizar en la vacuna combinada de acuerdo con la invención pueden ser: de Mhyo: 2 - 20 % p/v de un cultivo de Mhyo concentrado inactivado; y/o de Lawsonia: células enteras inactivadas entre 1×10^7

y 1×10^{10} células.

Los efectos observados de la vacuna combinada de acuerdo con la invención son:

5 para Mhyo: prevención o reducción de lesiones de pulmón causadas por Mhyo, tales como neumonía consolidada y enfermedad respiratoria crónica;
para Lawsonia: reducción de la colonización y eliminación fecal por Lawsonia y reducción de los signos de ileítis con hiperplasia intestinal, enteropatía hemorrágica porcina o adenomatosis intestinal porcina;

10 Para Lawsonia, la potencia de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, puede detectarse serológicamente como un aumento en el nivel sérico de los anticuerpos específicos de Lawsonia, fácilmente detectable usando técnicas basadas en ELISA.

15 Para Mhyo, la medida más fiable de la potencia de la vacuna es la reducción de las puntuaciones de lesión de pulmón después de la infección por desafío de Mhyo. Tales lesiones se puntúan normalmente durante la necropsia mediante evaluación macroscópica de la consolidación del pulmón, basada en la escala de Goodwin (Goodwin *et al.*, 1969, J. Hyg. Camb., vol. 67, págs. 465-476); esta escala va desde cero hasta un máximo de 55 puntos/animal para pulmones totalmente afectados.

20 Una vacuna combinada de acuerdo con la invención puede combinarse ventajosamente con un compuesto farmacéutico, tal como un antibiótico, una hormona y/o un fármaco antiinflamatorio.

25 Una vacuna combinada de acuerdo con la invención puede comprender otros excipientes, para optimizar la eficacia o la estabilidad de la vacuna, tales como estabilizantes o conservantes. Los ejemplos de estabilizantes son: polvo de leche, gelatina, albúmina sérica, sorbitol, trehalosa, aminoácidos, espermidina, dextrano o polivinilpirrolidona. Los ejemplos de conservantes son: timerosal, mertiolato, compuestos fenólicos o gentamicina.

30 Cuando los antígenos utilizados en la vacuna combinada de acuerdo con la invención se seleccionan especialmente, la vacuna combinada puede utilizarse como la denominada vacuna marcadora. Esto significa que la inmunidad provocada por la vacuna contra uno de los patógenos, puede diferenciarse mediante algún método de detección de la respuesta inmunitaria que se produciría tras una infección de un objetivo con el patógeno de tipo silvestre. Esto también se conoce como DIVA: "diferenciación de animales infectados de vacunados" (del inglés, differentiation of infected from vaccinated animals). Por tanto, la vacuna tiene un "marcador" positivo o negativo, en comparación con una infección de tipo silvestre.

35 Por tanto, en una realización, la vacuna combinada de acuerdo con la invención es una vacuna marcadora.

En una realización, la vacuna combinada es para cerdos.

40 El término "cerdo" se refiere a animales de la familia Suidae y preferentemente a animales del género *Sus*, que también se denominan animales porcinos. Algunos ejemplos son: un cerdo silvestre o doméstico, puerco, jabalí, babirusa o facocero. Esto también incluye cerdos indicados por un nombre arbitrario, por ejemplo, en referencia a su sexo o edad, como: cerda, puerca, verraco, cerdo castrado, puerco, lechona, cerda primeriza o lechón.

45 Además, el término cerdo se refiere a animales porcinos de cualquier tipo, tales como de tipo reproductor o de engorde y a líneas parentales de cualquiera de estos tipos.

50 Son concebibles más realizaciones o realizaciones adicionales de la vacuna combinada de acuerdo con la invención y son perfectamente alcanzables por un experto en la materia. Asimismo, estas realizaciones adicionales pueden aplicarse en una o más combinaciones a las realizaciones ya descritas.

Por tanto, en una realización de una vacuna combinada de acuerdo con la invención, una, más o todas las condiciones se aplican, seleccionadas del grupo que consiste en:

- 55 - la vacuna combinada comprende escualano en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 9 % p/v; preferentemente el escualano está comprendido en una cantidad de entre 2 - 5 % p/v;
- la vacuna combinada comprende acetato de vitamina E en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 10 % p/v; preferentemente el acetato de vitamina E está comprendido en una cantidad de entre 3 - 5 % p/v;
- 60 - el acetato de vitamina E es preferentemente acetato de DL-alfa-tocoferol;
- la vacuna combinada se prepara a partir de la mezcla de una fase acuosa y de una emulsión oleosa, en una relación de volúmenes entre aproximadamente 20:80 y aproximadamente 80:20;
- la vacuna combinada comprende polisorbato 80 en una cantidad de entre aproximadamente un 0,1 y aproximadamente un 5 % p/v; preferentemente el polisorbato 80 está comprendido en una cantidad de entre 1 -
- 65 2 % p/v;
- la emulsión de aceite en agua es una emulsión submicrónica; más preferentemente las gotitas de aceite tienen un

D50 de 500 nm o menos.

- la vacuna combinada comprende al menos un antígeno adicional; preferentemente, uno o más antígenos de: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Brachyspira hyodysenteriae* y virus de la gripe porcina;
- la vacuna combinada también comprende un antígeno que no se replica de *Mycoplasma hyopneumoniae*;
- 5 - la vacuna combinada también comprende un antígeno que no se replica de *Lawsonia intracellularis*;
- la vacuna combinada es una vacuna marcadora; y
- la vacuna combinada es para cerdos.

10 En una realización de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, la vacuna comprende escualano en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 9 % p/v; la vacuna comprende acetato de vitamina E en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 10 % p/v; el acetato de vitamina E es DL-alfa-tocoferol; la vacuna se prepara a partir de la mezcla de una fase acuosa y de una emulsión oleosa, en una relación de volúmenes entre aproximadamente 20:80 y aproximadamente 80:20; la vacuna comprende polisorbato 80 en una cantidad de entre aproximadamente un 0,1 y aproximadamente un 5 % p/v; la emulsión de aceite en agua es una emulsión submicrónica; y la vacuna es para cerdos.

15 La vacuna combinada de acuerdo con la invención puede componerse de diferentes maneras, como se describe en el presente documento.

20 Una forma ventajosa de preparar la vacuna combinada, de acuerdo con la invención, es mediante la reconstitución de una preparación criodesecada de PRRSV vivo. Por ejemplo, una versión incompleta de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, que no contiene todavía PRRSV, puede utilizarse como diluyente para una preparación criodesecada de un PRRSV vivo atenuado, de forma conveniente: una vacuna de PRRSV criodesecada viva existente, tal como por ejemplo, Porcilis PRRSV o Prime Pac™ PRRS+.

25 Por consiguiente, la vacuna combinada de acuerdo con la invención puede producirse a partir de un kit de partes, comprendiendo al menos dos envases: un envase que comprende todos los componentes de la vacuna combinada de acuerdo con la invención excepto el virus PRRSV vivo; y un envase que comprende PRRSV vivo atenuado en forma criodesecada. Los elementos del kit de partes constituyen conjuntamente, a continuación, la vacuna combinada de acuerdo con la invención.

30 Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit de partes que comprende al menos dos envases: un envase que comprende un antígeno que no se replica de PCV2 en una emulsión de aceite en agua que comprende escualano y acetato de vitamina E; y un envase que comprende PRRSV vivo en forma criodesecada.

35 Tras la reconstitución del PRRSV vivo, se forma la vacuna combinada completa de acuerdo con la invención. Esto también se conoce como mezclar la vacuna "en el acto" o mezcla "de campo".

40 Aunque la vacuna combinada no es virucida para el PRRSV, se prefiere hacer la reconstitución poco antes de la administración de la vacuna, para asegurar la mejor calidad de la vacuna.

Preferentemente, la reconstitución se realiza en el plazo de 8 horas de la administración, más preferentemente en el plazo de 6, 5, 4, 3 o incluso en el plazo de 2 horas antes de la administración, en este orden de preferencia.

45 El kit de partes de acuerdo con la invención y sus elementos, puede comprender cualesquiera de las realizaciones (preferidas o no) como se describen en el presente documento para la vacuna combinada de acuerdo con la invención o cualquier combinación de dos o más de esas realizaciones de la vacuna combinada de acuerdo con la invención.

50 Otra utilidad ventajosa del kit de partes de acuerdo con la invención, es una en donde tanto el antígeno que no se replica de *Lawsonia* como el PRRSV vivo se incorporan a la vacuna combinada de acuerdo con la invención, mediante la reconstitución de una preparación criodesecada.

55 Por tanto, en una realización, el kit de partes de acuerdo con la invención comprende al menos tres envases: un envase que comprende antígeno que no se replica de PCV2, en una emulsión de aceite en agua que comprende escualano y acetato de vitamina E; un envase que comprende PRRSV vivo en forma criodesecada; y un envase que comprende antígeno que no se replica de *Lawsonia* en forma criodesecada.

60 En una realización preferida del kit de partes de acuerdo con la invención que comprende al menos tres envases, el envase que comprende el antígeno que no se replica de PCV2 en una emulsión de aceite en agua que comprende escualano y acetato de vitamina E, también comprende un antígeno que no se replica de Mhyo.

La forma criodesecada puede ser una torta criodesecada en un envase, por ejemplo, una botella, pero también puede ser una lioesfera como la aplicada en la tecnología Spheron™.

65 Debido a la naturaleza de un cuerpo criodesecado, su reconstitución no cambia significativamente (es decir, menos de aproximadamente un 5 %; más preferentemente: menos de aproximadamente un 1 %) el volumen del diluyente

utilizado. Por consiguiente, las preparaciones de la vacuna combinada de acuerdo con la invención con todos los componentes excepto el PRRSV vivo o con todos los componentes excepto el PRRSV vivo y el antígeno que no se replica de Lawsonia, que deben proporcionarse en el kit de partes de acuerdo con la invención, pueden proporcionarse esencialmente con sus otros componentes en las cantidades finales o en sus concentraciones finales.

5 La vacuna combinada de acuerdo con la invención puede prepararse a partir de los antígenos y excipientes respectivos, por métodos que son bien conocidos en la técnica y que están dentro de las capacidades rutinarias de un experto en la materia. Por ejemplo: ORF2 de PCV2 puede expresarse mediante un baculovirus recombinante en un cultivo de células de insecto y recogerse; alternativamente, la proteína ORF2 de PCV2 puede administrarse y expresarse usando una partícula de replicón (anteriormente citado). El PRRSV puede cultivarse en células hospedoras adecuadas, por ejemplo, macrófagos primarios de cerdo o una línea celular, tal como Marc-145 o MA104.

15 Estos antígenos se cuantifican y se recogen en una fase acuosa en las cantidades requeridas. Esto puede ser con o sin los antígenos que no se replican de Mhyo, Lawsonia y/o el PRRSV vivo; en este caso la vacuna combinada de acuerdo con la invención es para comercializarse como un kit de partes de acuerdo con la invención.

20 Por separado, la emulsión oleosa con adyuvantes y emulsionante en agua, se prepara mediante un proceso de emulsificación. Después, esta se mezcla con la fase acuosa con los antígenos, en una relación de volúmenes deseada.

25 Las diversas etapas del proceso de fabricación se supervisan mediante pruebas adecuadas, por ejemplo, mediante pruebas microbiológicas e inmunológicas para la calidad y cantidad de bacterias y virus o cualesquier otros antígenos; mediante pruebas para la ausencia de agentes extraños; pruebas para la estabilidad química y biológica; y finalmente mediante experimentos *in vitro* o *in vivo* para determinar la eficacia y seguridad de la vacuna. Todas estas son bien conocidas por un experto en la materia y están prescritas en regulaciones gubernamentales, tales como la Farmacopea y en manuales tales como: Remington y Pastoret (ambos citados anteriormente).

30 Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la preparación de una vacuna combinada de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de:

- preparar una fase acuosa que comprende un antígeno que no se replica de PCV2 y un PRRSV vivo y
- mezclar dicha fase acuosa con una emulsión oleosa que comprende escualano y acetato de vitamina E.

35 Como se describe, el método para la preparación de una vacuna combinada de acuerdo con la invención puede adaptarse ventajosamente para incorporar un antígeno de Mhyo o de Lawsonia y/o de PRRSV vivo en una etapa posterior, por ejemplo mediante la reconstitución de preparaciones criodesecadas separadas de estos antígenos.

40 Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la preparación de una vacuna combinada de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de:

- preparar el PRRSV vivo en una forma criodesecada,
- preparar una fase acuosa que comprende un antígeno que no se replica de PCV2,
- mezclar dicha fase acuosa con una emulsión oleosa que comprende escualano y acetato de vitamina E y
- 45 - reconstituir dicho PRRSV vivo criodesecado con dicha mezcla de fase acuosa y emulsión oleosa.

La fase acuosa que comprende el antígeno que no se replica de PCV2 comprende opcionalmente el antígeno que no se replica de Mhyo.

50 De forma similar, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la preparación de una vacuna combinada de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de:

- preparar el PRRSV vivo en una forma criodesecada,
- preparar el antígeno de Lawsonia que no se replica en una forma criodesecada,
- 55 - preparar una fase acuosa que comprende un antígeno que no se replica de PCV2,
- mezclar dicha fase acuosa con una emulsión oleosa que comprende escualano y acetato de vitamina E y
- reconstituir dicho PRRSV vivo criodesecado y dicho antígeno de Lawsonia que no se replica con dicha mezcla de fase acuosa y emulsión oleosa.

60 La fase acuosa que comprende el antígeno que no se replica de PCV2 comprende opcionalmente el antígeno que no se replica de Mhyo.

O en una realización similar: la invención se refiere a un método para la preparación de una vacuna combinada de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de:

- 65 - preparar una mezcla de una fase acuosa que comprende un antígeno que no se replica de PCV2 y de una emulsión

- oleosa que comprende escualano y acetato de vitamina E y reconstituir el PRRSV vivo en una forma criodesecada con dicha mezcla.

5 La fase acuosa que comprende el antígeno que no se replica de PCV2 comprende opcionalmente el antígeno que no se replica de Mhyo.

10 En diferentes puntos de estos métodos, pueden añadirse etapas adicionales, por ejemplo, para tratamientos adicionales, tales como purificación o almacenamiento. Asimismo, el método para la preparación puede implicar la mezcla con un antígeno adicional o excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como estabilizantes o conservantes.

Estas variaciones y opcionalmente muchas más, pueden incorporarse como una etapa adicional en un punto adecuado en el método de preparación de acuerdo con la invención.

15 Por tanto, los métodos para la preparación de acuerdo con la invención pueden comprender cualquiera de las realizaciones (preferidas o no) como se describe en el presente documento para la vacuna combinada de acuerdo con la invención o cualquier combinación de dos o más de esas realizaciones de la vacuna combinada de acuerdo con la invención. Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas, vacunas y medicamentos de la presente invención para usar en un método para el tratamiento del cuerpo animal mediante terapia.

25 Como se describe, la vacuna combinada de acuerdo con la invención, que puede prepararse mediante un método de acuerdo con la invención, puede utilizarse ventajosamente para la administración a cerdos, para proteger frente a la infección y/o enfermedad asociada a una infección por PCV2 y PRRSV.

30 Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una emulsión de aceite en agua que comprende escualano y acetato de vitamina E, antígeno no replicante de PCV2 y PRRSV vivo, para usar en la vacunación de cerdos contra el PCV2 y el PRRSV.

35 Como alternativa:
En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un antígeno no replicante de PCV2 y de PRRSV vivo, para la fabricación de una vacuna combinada para cerdos, caracterizada por que la vacuna es una emulsión de aceite en agua que comprende escualano y acetato de vitamina E.

40 La vacuna combinada de acuerdo con la invención puede aplicarse para la vacunación de cerdos contra PCV2 y PRRSV.

45 Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la vacunación de cerdos contra PCV2 y PRRSV, mediante la administración a dichos cerdos de una emulsión de aceite en agua, que comprende escualano y acetato de vitamina E, antígeno no replicante de PCV2 y PRRSV vivo.

O en una realización similar: la invención se refiere a un método para la vacunación de cerdos contra PCV2 y PRRSV, mediante la administración a dichos cerdos de una vacuna combinada de acuerdo con la invención.

50 Una emulsión de aceite en agua, tal como la vacuna combinada de acuerdo con la invención, se administra preferentemente por alguna vía de administración parenteral, por ejemplo, a través de todas las vías de inyección en o a través de la piel: por ejemplo, inyección o infusión intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, submucosa o subcutánea. Esto puede lograrse de maneras diferentes, por ejemplo, utilizando una jeringuilla clásica y una aguja hipodérmica.

55 Como alternativa, la administración parenteral puede hacerse por algún método de inyección sin aguja, suministrando la vacuna mediante un aplicador intradérmico o transdérmico, tal como el IDAL™.

En una realización del método de vacunación de acuerdo con la invención, la administración se aplica por vía intramuscular.

60 El volumen de una dosis animal de la vacuna combinada de acuerdo con la invención no es crítico, siempre que se obtenga una protección inmunológica eficaz. Esto puede ser diferente para las diferentes vías de administración tales como: intramuscular, subcutánea o intradérmica. Preferentemente, el volumen de una dosis animal está entre aproximadamente 0,1 y 10 ml por animal; más preferentemente entre 0,2 y 5 ml, 0,5 y 3 o incluso entre 0,5 y 2 ml por dosis animal, en ese orden de preferencia.

65 Por tanto, en una realización del método para la administración de acuerdo con la invención, la vacuna combinada de acuerdo con la invención se administra en una dosis de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml por animal.

El régimen de administración para un método de vacunación de acuerdo con la invención, a un cerdo objetivo puede ser en dosis únicas o múltiples o de una manera compatible con los aspectos prácticos de la cría de cerdos.

5 Cuando se necesite, un objetivo porcino puede recibir una segunda o más administraciones de la combinación de acuerdo con la invención, más tarde en la vida, las denominadas vacunas de refuerzo. Sin embargo, la vacuna combinada de acuerdo con la invención se optimiza de tal manera que una sola dosis de vacunación generalmente será suficiente para proporcionar una protección inmunológica durante el período relevante de la vida de los cerdos, por ejemplo, durante la etapa de engorde de los cerdos hasta los 6 meses de edad.

10 Por tanto, en una realización preferida, la vacuna combinada de acuerdo con la invención se administra solo una vez por objetivo porcino, es decir, es una vacuna de dosis única.

15 Preferentemente, el régimen para el método de vacunación se integra en los programas de vacunación existentes de otras vacunas que los cerdos objetivo puedan requerir, con el fin de reducir además el estrés de los animales y reducir los costes de mano de obra. Estas otras vacunas pueden administrarse de forma simultánea, concurrente o secuencial, de una manera compatible con su uso registrado.

20 Por tanto, en una realización del método de vacunación de cerdos de acuerdo con la invención, la vacuna combinada de acuerdo con la invención se administra en una combinación con otra vacuna porcina.

Los cerdos objetivo para una vacunación para la invención pueden ser de cualquier edad en la que sean susceptibles de la vacunación y/o sean susceptibles de la enfermedad o de la infección contra la que protege la vacuna.

25 Además el peso, el sexo, el estado inmunológico, etc. del cerdo objetivo para una vacunación de acuerdo con la invención, no son críticos, aunque es favorable vacunar objetivos sanos y vacunar tan pronto como sea posible para prevenir (las consecuencias de) una infección temprana con Mhyo, Lawsonia, PCV2 o PRRSV.

30 Por tanto, en una realización del método de vacunación de cerdos de acuerdo con la invención, la vacuna combinada de acuerdo con la invención se administra a cerdos jóvenes.

Para la invención, "cerdos jóvenes" son cerdos de aproximadamente 2 meses de edad.

35 Debido a la alta prevalencia de Mhyo, Lawsonia, PCV2 y PRRSV y debido al uso generalizado de vacunas contra uno o más de estos patógenos, muchas cerdas serán seropositivas para anticuerpos contra uno o más de Mhyo, Lawsonia, PCV2 y PRRSV. Por consiguiente, los cerdos jóvenes que consuman calostro de dichas cerdas, serán MDA+ (anticuerpo derivado de forma materna positivo). Esto no es un impedimento para la eficacia de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, dado que también es eficaz en cerdos MDA+.

40 Por tanto, en una realización del método para la vacunación de acuerdo con la invención, la vacuna combinada de acuerdo con la invención se administra a cerdos MDA+.

PRRSV induce específicamente enfermedades respiratorias en cerdos adultos.

45 Por tanto, en una realización del método de vacunación de cerdos de acuerdo con la invención, la vacuna combinada de acuerdo con la invención se administra a cerdos adultos.

Para la invención, "cerdos adultos" son cerdos de aproximadamente 6 meses de edad.

50 La administración de una vacuna combinada de acuerdo con la invención puede aplicarse como un tratamiento profiláctico o terapéutico o ambos, dado que interfiere tanto con el establecimiento como con la progresión de una infección por Mhyo, Lawsonia, PCV2 y PRRSV.

55 El uso de la vacuna combinada de acuerdo con la invención ayudará a reducir la infección por uno o todos de Mhyo, Lawsonia, PCV2 y PRRSV, en una piara de cerdos, en una granja o en cerdos en un área geográfica.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la reducción de una infección con Mhyo, Lawsonia, PCV2 o PRRSV o de signos asociados de enfermedad en cerdos, caracterizado por que el método comprende la administración a dichos cerdos de una vacuna combinada de acuerdo con la invención.

60 La invención se describirá adicionalmente a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

1. Preparación de la vacuna combinada

La vacuna combinada de acuerdo con la invención se preparó de la forma siguiente:

La emulsión oleosa en concentración 2x contiene por 100 g:

Polisorbato 80 (Tween 80):	3,24 g;
Escualano:	6,75 g;
Acetato de DL-alfa-tocoferol:	7,94 g;
agua para inyección:	82,07 g

Esta emulsión oleosa se preparó de acuerdo con las siguientes etapas del proceso posteriores:

- 5 - se pesaron las cantidades requeridas de Tween 80 y escualano y se combinaron en un vaso de precipitados
- a mezcla de Tween 80/escualano se homogeneizó mediante mezcla de baja energía (agitador magnético), a temperatura ambiente,
- 10 - se pesó la cantidad requerida de acetato de DL-alfa-tocoferol y se añadió a la mezcla homogeneizada de Tween 80/escualano
- la mezcla combinada se homogeneizó de nuevo, mediante mezcla de baja energía a temperatura ambiente,
- la mezcla se calentó a 65 - 75 °C
- el agua para inyección se calentó a 65 - 75 °C
- 15 - la fase oleosa calentada y el agua se premezclaron usando una mezcla de alta energía mediante un Ultra Turrax con una varilla N18, durante 5 - 15 minutos; la temperatura disminuyó de 65 a 55 °C.
- a la premezcla se le dio 3 pases a través de un Microfluidizer a 800 bar; la temperatura se mantuvo por debajo de 50 °C con una espiral de enfriamiento.
- la emulsión oleosa microfluidificada se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros (Pall, Ultipor™ N66); el filtro se había precalentado a 55 - 75 °C a través de su pared doble.

20 De la emulsión oleosa final (en concentrado 2x), la integridad y el nivel de homogeneización se comprobaron mediante microscopía óptica. Además, se comprobaron también el pH (7,34) y la osmolalidad (221 mOsm/kg). Las mediciones del tamaño de partícula revelaron: D100= 300 nm; D99= 250 nm; D90 = 200 nm y D50 = 130 nm.

25 La fase acuosa (en concentración 2x) se preparó tomando la cantidad requerida de cada uno de los antígenos que no se replican: Mhyo: 6 % v/v de un cultivo inactivado concentrado 10x; Lawsonia: 2 x 10⁹ células inactivadas; y PCV: 50 µg ORF2.

30 Después, ambas composiciones concentradas (emulsión oleosa con adyuvantes y fase acuosa con antígenos) se combinaron en una relación de volúmenes de 50:50, mediante mezcla de baja energía a temperatura ambiente.

Esta mezcla de vacunas se utilizó para resuspender ampollas de Porcilis PRRS, con el volumen necesario para alcanzar una dosis completa de PRRSV (10⁵ TCID₅₀) por 2 ml de la vacuna combinada.

35 La vacuna combinada final contenía: escualano al 3,375 % p/v; acetato de vitamina E al 3,97 % p/v y Tween 80 al 1,62 % p/v y tenía una densidad de 0,9913 g/ml. Los productos se almacenaron a 2 - 8 °C.

2. Prueba para el efecto virucida

40 La emulsión oleosa de la invención se incubó con una muestra de PRRSV vivo, para determinar si se produciría algún efecto virucida.

45 En resumen: se reconstituyó una ampolla de Porcilis PRRSV en PBS hasta un volumen final de 7 ml, para alcanzar un título de 6 Log₁₀ TCID₅₀/ml. Una muestra de 50 µl de esta suspensión de virus se combinó con 450 µl de una vacuna combinada sin PRRSV vivo, preparada como en el Ejemplo 1 y que comprende: escualano, acetato de vitamina E y polisorbato 80, microfluidificada en agua, con antígenos que no se replican de Mhyo, Lawsonia y PCV2. Se mezcló una muestra de control de PRRSV con 450 µl de PBS. Ambas muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las muestras incubadas se titularon para determinar el título restante de PRRSV.

50 La titulación se realizó en monocapas de 1 día de antigüedad de células MA104. Las 10 filas de pocillos iniciales recibieron 25 µl de muestra de virus incubado, esto se diluyó 1:10 a través de los 7 pocillos posteriores. 2 columnas de células sin tratar sirvieron como controles negativos. Esto se hizo por duplicado. A continuación, las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Finalmente, la replicación vírica del PRRSV se detectó mediante inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo monoclonal antiPRRSV y un anticuerpo de detección marcado fluorescentemente. Los títulos se calcularon utilizando el algoritmo de Spearman-Kaerber.

Muestra	Título ⁽¹⁾ (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)
vacuna combinada (0,9x)	4,6
control	4,8
(1) El título es el promedio de dos determinaciones	

Con una dispersión en los valores de titulación encontrados de $\pm 0,2 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}$, los resultados demostraron que las muestras de PRRSV vivo incubadas en una vacuna combinada concentrada 0,9x de acuerdo con la invención, no experimentaron una reducción significativa del título.

5 3. Experimento de desafío de vacunación

3.1. Introducción

10 Se ensayó en animales una vacuna combinada sin PRRSV vivo, preparada como en el Ejemplo 1 y que comprende: escualano, acetato de vitamina E y polisorbato 80, microfluidificada en agua, con antígenos que no se replican de Mhyo, Lawsonia y PCV2. La vacunación se administró en una dosis única, por vía intramuscular, a las 3 semanas de edad. La eficacia de Mhyo se ensayó mediante infección de desafío, a las 4 semanas tras la vacunación. Se compararon varios otros adyuvantes.

15 3.2. Diseño del estudio

Para este estudio se utilizaron 84 lechones SPF. Se vacunaron 6 grupos de 12 animales, una vez por vía intramuscular a la edad de tres semanas (+/- tres días). Un grupo de 12 cerdos se dejó sin vacunar y sirvió como grupo de control de desafío. Antes de la vacunación y dos días después de la vacunación se midieron las temperaturas rectales. 20 Además, para el grupo de SVEA, los sitios de inyección se palparon semanalmente en cuanto a reacciones locales. Cuatro semanas después de la vacunación, todos los animales se infectaron con una cepa de Mhyo virulenta. Tres semanas después del desafío, se sacrificó a todos los animales y se investigaron *post mortem* en cuanto a lesiones de pulmón. De todos los animales, se tomaron muestras de sangre: antes de la vacunación, antes de la exposición y *post mortem*.

25

Tabla 1: Esquema de tratamiento del Ejemplo 3

Grupo	Adyuvante de vacuna
1	Amphigen
2	SVEA
3	SVEA + Al(OH) ₃
4	MF59 + DDA
5	Aceite de SP (Metastim)
6	Vaxliant S5
7	sin vacuna

3.3. Adyuvantes ensayados

30 Se ensayaron varias formulaciones de vacunas, que diferían solo en cuanto al tipo de formulación y al adyuvante utilizado; el contenido de antígeno era el mismo. Se ensayaron los siguientes adyuvantes:

- Amphigen: aceite en agua de aceite mineral con lecitina
- SVEA: emulsión de aceite en agua microfluidificada con escualano, acetato de vitamina E y Tween 80
- 35 • SVEA + Al(OH)₃: SVEA con de hidróxido de aluminio al 0,2 % p/v (igual que en Porcilis PCV Mhyo)
- MF59+ DDA: MF59 es una emulsión de aceite en agua con escualano, polisorbato 80 y Span 85; DDA es un lípido catiónico: dimetildioctadecilamonio.
- Aceite de SP: Pluronic, escualano y Tween, como se describe en el documento WO 2013/152086.
- Vaxliant™ S5: adyuvante patentado de composición desconocida

40

3.4. Métodos y materiales

Desafío:

45 El material de desafío fue Mhyo, cepa de campo virulenta, cultivo fresco de 3 días en medio FRIIS con suero porcino. Se administraron 10 ml de cultivo que contenían 9 CCU, por vía intratraqueal por animal, en dos días consecutivos. Todos los animales estuvieron bajo supervisión veterinaria regular

Vacunación:

50

La vacunación fue a las tres semanas, si bien los animales aún estaban con su cerda. La dosis fue de 3 ml, dada por vía intramuscular, en el lado derecho del cuello. El destete fue a las 4 semanas de edad. Una semana antes de la exposición, los cerdos se transfirieron a instalaciones de desafío.

55 **Serología:**

Se tomaron muestras de sangre (de la vena yugular) justo antes de la vacunación (T=0), justo antes del desafío (T=4)

y *post mortem* (T=7). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, hasta que se extrajo el suero. La presencia de anticuerpos relevantes en muestras de suero para PCV2 (a través de Elisa) o para Lawsonia, se determinó de acuerdo con procedimientos convencionales.

5 **Palpación**

Se inspeccionaron los sitios de inyección del grupo de SVEA en cuanto a las reacciones locales: justo antes de la vacunación, cuatro horas después de la vacunación, diariamente durante dos días y semanalmente durante cinco semanas después de la vacunación. Los animales que todavía mostraban reacciones locales cinco semanas después de la vacunación se palparon individualmente semanalmente hasta que desaparecieran las reacciones locales.

Temperaturas rectales y observaciones clínicas

Se midieron las temperaturas rectales y se realizaron observaciones clínicas (0= Normal; 1= menos activo; 2= vomitando; 3= tumbado) un día antes y justo antes de la vacunación, cuatro horas y uno y dos días después de la vacunación.

Examinación *post mortem*:

Al final de este experimento, 3 semanas después del desafío, se sacrificó a todos los cerdos. Se investigaron los sitios de inyección en cuanto a reacciones locales en animales individuales. Se registró el porcentaje de la puntuación de lesión de pulmón para cada cerdo individualmente, de acuerdo con la puntuación de Goodwin y Whittlestone.

3.5. Resultados

Tabla 2: Resultados del Ejemplo 3

Grupo	Adyuvante de vacuna	Mhyo LLS ⁽¹⁾	Título de Ac de PCV2 ⁽²⁾ en x semanas p.v.			Título de Ac de Lawsonia en x semanas p.v.		
			0	4	7	0	4	7
1	Amphigen	1,5	8,2	8,1	< 6,7	< 4,2	< 5,7	< 6,8
2	SVEA	0,75	8,2	9,3	8,9	< 4,1	7,3	9,1
3	SVEA + Al(OH) ₃	2	8,1	8,7	< 7,6	< 4,2	7,6	9,6
4	MF59 + DDA	0,5	< 7,9	7,7	< 6,4	< 4,2	< 4,7	< 4,6
5	Aceite de SP (Metastim)	0	8,6	8,0	< 6,9	< 4,2	6,7	8,4
6	Vaxliant S5	0	7,5	< 7,1	< 6,3	< 4,0	< 4,6	< 6,1
7	sin vacuna	3,5	8,0	< 6,4	< 4,8	< 4,1	< 4,1	< 3,9

(1) Mhyo LLS = mediana de la puntuación de lesión de pulmón (del inglés, lung lesion score)

Resultados de las palpaciones y temperatura:

El grupo supervisado mediante palpación del sitio de vacunación y controlado en cuanto a la temperatura fue el grupo que recibió la vacuna adyuvada con SVEA (grupo 2). Estos mostraron que no se observó hinchazón local detectable, ni aumento de la temperatura durante todo el período de supervisión.

3.6. Conclusiones

La Tabla 2 demuestra que es difícil lograr una eficacia amplia para una vacuna combinada; varios de los compuestos ensayados, indujeron una inmunidad para uno o incluso dos de los patógenos que podría asignarse como protectora; esto en términos de una puntuación baja de lesión de pulmón de Mhyo o como un título de anticuerpos específicos suficientemente alto para PCV2 y Lawsonia. Sin embargo, solo para la vacuna con adyuvante de SVEA, la protección fue de suficiente a buena para los tres patógenos. Ninguno de los otros adyuvantes llegó a ese nivel de eficacia amplia.

Los datos del Ejemplo 2, sobre la falta de efecto virucida de la vacuna combinada con adyuvante de SVEA para PRRSV vivo, predicen que una vacuna combinada con adyuvante de SVEA también será eficaz contra PRRSV.

Todo junto, esto demuestra que una vacuna combinada de acuerdo con la invención es inmunológicamente eficaz contra cada uno de los patógenos Mhyo, Lawsonia, PCV2 y PRRSV. Además, es segura para los cerdos.

4. Experimentos de desafío de vacunación de cuatro vías

Se realizaron experimentos adicionales de desafío de vacunación, de modo que se vacunaron cerdos con la vacuna combinada de cuatro vías de acuerdo con la invención y en 4 experimentos separados se probó la eficacia de esta vacuna de los 4 componentes: Mhyo, Lawsonia, PCV y PRRSV.

5 Específicamente, se preparó una vacuna combinada de 3 vías como se describe en los Ejemplos 1 y 3, conteniendo una emulsión submicrónica de escualano, acetato de vitamina E y Tween 8, mezclada 1:1 con una fase acuosa comprendiendo los antígenos inactivados de Mhyo y Lawsonia y el producto de expresión recombinante de Orf2 de PCV2. Posteriormente y poco antes de la vacunación de los cerdos, esta vacuna de 3 vías se utilizó para disolver una ampolla de vacuna del PRRS comercial criodesecada, utilizando el volumen requerido para alcanzar una dosis completa de PRRSV de 10^5 TCID₅₀, por dosis animal de 2 ml de la vacuna combinada de 4 vías. La vacunación se dio como una dosis única, por vía intramuscular, a los cerdos a las 3 semanas de edad.

15 El análisis posterior de la eficacia de la vacuna de cada uno de los cuatro antígenos de la vacuna se realizó en experimentos separados, mediante infección de desafío de los vacunados y de los controles, para permitir centrarse en los síntomas específicos de infección y enfermedad para estas condiciones diferentes.

20 Sin embargo, no se esperaban diferencias en el resultado de la eficacia de la vacunación contra ninguna de estas infecciones de desafío, en comparación con los resultados descritos en el Ejemplo 3 anterior; era altamente improbable que hubiera algún efecto diferente del uso de una vacuna de 3 vías en comparación con una vacuna de 4 vías, con respecto a la protección contra los antígenos inactivados. En otras palabras, no podía esperarse que la presencia del virus PRRSV en la vacuna combinada de 4 vías afectara a la eficacia de esa vacuna combinada contra una cualquiera de las infecciones de desafío de Mhyo, Lawsonia o PCV. Además, no se esperaba ningún efecto sobre la viabilidad y la eficacia del componente PRRSV vivo, dado que los experimentos previos habían indicado ya que no había un efecto significativo de la vacuna de 3 vías en adyuvante de SVEA sobre la viabilidad del virus PRRS. Por consiguiente, dado que el virus PRRS no se destruyó ni se dañó su infectividad al mezclarse en la vacuna de 3 vías, no había ninguna razón por la que no fuera capaz de inducir una protección eficaz.

30 Estas expectativas se confirmaron mediante los resultados de los 4 experimentos de desafío descritos más adelante: se encontró que la vacuna combinada de 4 vías de acuerdo con la invención induce una protección inmunitaria eficaz contra la infección y los signos de enfermedad inducidos por una infección de desafío con un patógeno de cada uno de sus 4 componentes. Asimismo, no hubo ningún efecto negativo o interferencia de su combinación.

4.1. Eficacia de *M. hyopneumoniae*

35 La vacuna combinada de 4 vías se preparó como se ha descrito anteriormente, utilizando la vacuna criodesecada Porcilis PRRS.

Esquema experimental

40 Para este estudio se utilizaron 24 lechones SPF. Se vacunó 1 grupo de 12 animales, una vez por vía intramuscular a la edad de aproximadamente tres semanas. Un grupo de 12 cerdos se dejó sin vacunar y sirvió como grupo de control de desafío. Cuatro semanas después de la vacunación, todos los animales se infectaron de desafío con una cepa de Mhyo virulenta. Tres semanas después del desafío, se sacrificó a todos los animales y se investigaron *post mortem* en cuanto a lesiones de pulmón. De todos los animales, se tomaron muestras de sangre: antes de la vacunación, antes de la exposición y *post mortem*.

Detalles del experimento

50 El material de exposición fue de una cepa de Mhyo virulenta de campo, como cultivo fresco de 3 días en medio FRIIS con suero porcino. Se administraron 10 ml de cultivo que contenían 10 y 9 CCU, respectivamente, por vía intratraqueal por animal, en dos días consecutivos. Todos los animales estuvieron bajo supervisión veterinaria regular

55 La vacunación fue a las tres semanas de edad, si bien los animales aún estaban con su cerda. La dosis fue de 2 ml, dada por vía intramuscular, en el lado derecho del cuello. El destete fue a las 4 semanas de edad. Una semana antes de la exposición, los cerdos se transfirieron a instalaciones de desafío.

60 Se tomaron muestras de sangre (de la vena yugular) justo antes de la vacunación (T=0 semanas), justo antes del desafío (T=4 semanas) y *post mortem* (T=7 semanas). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, hasta que se extrajo el suero. La presencia de anticuerpos relevantes en muestras de suero para PCV2 o para Lawsonia, se determinó mediante ELISA de acuerdo con procedimientos convencionales.

Análisis de datos:

65 Al final de este experimento, 3 semanas después del desafío, se sacrificó a todos los cerdos. Se registró el porcentaje de la puntuación de lesión de pulmón para cada cerdo individualmente, de acuerdo con la puntuación de Goodwin y

Whittlestone (citado anteriormente).

Resultados

5 Tabla 3: Resultados de Mhyo y datos de serología del Ejemplo 4.1

Grupo	Vacunación	Mhyo LLS ⁽¹⁾	Título de Ac de PCV2 en 7 semanas p.v.			Título de Ac de Lawsonia en 7 semanas p.v.		
			0	4	7	0	4	7
1	4 vías en SVEA	8,0	< 4,8	10,6	9,9	< 3,9	< 6,6	9,2
2	sin vacuna	12,7	5,4	< 4,8	< 4,3	< 3,9	< 3,9	< 3,9

(1) Mhyo LLS = mediana de las puntuaciones de lesión de pulmón

Conclusión:

10 La vacunación de cerdos con la vacuna combinada de 4 vías de acuerdo con la invención, fue eficaz en la protección contra la infección y los signos de enfermedad inducidos por una infección de desafío de Mhyo. Asimismo, hubo un buen desarrollo de la protección contra Lawsonia y PCV2, como se midió mediante la serología.

4.2. Eficacia del PCV2

15 La vacuna combinada de 4 vías se preparó como se ha descrito anteriormente, utilizando la vacuna criodesecada Porcillus PRRS.

Esquema experimental y detalles del experimento

20 Los lechones se asignaron a grupos de tratamiento de 10 lechones cada uno. Se vacunó a los lechones por vía intradérmica o intramuscular cuando tenían aproximadamente cinco semanas de edad:

- se vacunó a un grupo por vía intramuscular con la vacuna combinada de 4 vías en adyuvante de SVEA: una dosis única de 2 ml de vacuna formulada con Orf2 de PCV2 (2500 AU/ml), Mhyo (1,0 PCVU/ml), Lawsonia (5000 Au/ml) y PRRSV a 10⁵ TCID₅₀/dosis. El tiempo entre la disolución de la vacuna de PRRS y la vacunación fue 1 hora.
- 25 - el grupo 2 fue el control positivo y se vacunó a este utilizando las vacunas comerciales Porcillus PCV ID y Porcillus PRRS ID, ambas por vía intradérmica, pero sin mezclar y puestas en diferentes sitios del lomo de los cerdos.
- no se vacunó a los lechones del tercer grupo (grupo de control negativo), sino que se desafiaron.

30 A las tres semanas tras la vacunación (8 semanas de edad, 3 semanas tras la vacunación, fecha de la muestra [SD; del inglés, sample date] 22 días), todos los animales se desafiaron usando 5,0 log₁₀ TCID₅₀/ml de virus de desafío de PCV2b de tipo silvestre, cepa I12/11, que se inoculó por vía intranasal, a 3 ml por orificio nasal.

35 Tres semanas tras el desafío, se realizó la necropsia de todos los animales y se tomaron muestras de ganglio linfático inguinal, ganglio linfático mesentérico, amígdala y pulmón para la detección de PCV2, mediante qPCR y por inmunohistoquímica.

40 Se observaron todos los lechones diariamente después de la vacunación en cuanto a signos clínicos. Las temperaturas se tomaron en SD-1, SD0, SD0+4 horas y SD1.

Las muestras de suero se recogieron de todos los animales, se analizaron en cuanto a los anticuerpos contra PCV2, PRRSV y Lawsonia.

45 Se recogieron muestras de suero, tejido y frotis nasales y fecales de todos los animales y se examinaron en cuanto a ácido nucleico de PCV mediante qPCR.

Análisis de datos y resultados:

50 Las lecturas de temperatura no mostraron resultados significativos.
Los resultados serológicos combinados se representan en la Tabla 4 más adelante.

Serología de PCV2:

55 Todos los lechones de los dos grupos vacunados alcanzaron un 100 % de seroconversión para los anticuerpos antiPCV2 ya en la fecha de la muestra 22 (3 semanas p.v.). Los títulos reales aumentaron un poco más después de eso y alcanzaron una meseta a partir de la SD35. Los controles sin vacunar solo se seroconvirtieron después del desafío, pero nunca alcanzaron más de un 20 % de seroconversión.

PCV2IHC y qPCR:

5 Se realizó una selección inmunohistológica y una puntuación en cuanto a signos de PCV en ganglios linfáticos y amígdalas. Los resultados mostraron que en ambos grupos vacunados las puntuaciones fueron 0,3 de promedio, al tiempo que en las puntuaciones de IHC del grupo de control desafiado sin vacunar fueron 1,6 de promedio.

10 Los resultados de qPCR mostraron que en ambos grupos vacunados, los cerdos tenían muy poco PCV2 presente en muestras de suero, hisopos nasales o fecales o de tejido (ganglios linfáticos, amígdalas y pulmones). Sin embargo, el grupo de control se volvió fuertemente positivo en cuanto a los ácidos nucleicos de PCV2 después del desafío.

Serología de Lawsonia

15 La serología de Lawsonia para el grupo 1 mostró un aumento en el título a partir de la SD22, al tiempo que en el grupo de control, el título de Lawsonia mostró una disminución continua.

Serología de PRRSV

20 Los resultados serológicos para PRRSV normalmente se expresan como una relación de SP (muestra a positivo; del inglés, sample to positive). Cuando esta relación está por encima de 0,4, una muestra se considera positiva para la seroconversión de PRRSV. La sección de la Tabla 4 para PRRSV representa estos valores de SP. Muestran que los animales en el grupo de control positivo 2 (vacuna de PRRSV por vía id) fueron fuertemente positivos para la seroconversión de PRRSV; no obstante, los animales en el grupo 1 (vacuna combinada de 4 vías por vía im) también alcanzaron buenas tasas de seroconversión. Los controles sin vacunar apenas mostraron seroconversión para PRRSV, dado que no se encontraron relaciones de SP por encima de 0,05.

Tabla 4: Resultados serológicos combinados del Ejemplo 4.2

Serología por grupo		SD0	SD22	SD28	SD35	SD43
PCV						
	1. vacuna de 4 vías, im	3,7	7,2	7,7	10,0	10,4
	2. Porcillis PCV ID + Porcillis PRRS ID	3,7	7,0	8,1	9,5	9,9
	3. controles sin vacunar	4,2	2,3	2,1	3,5	5,7
Lawsonia						
	1. vacuna de 4 vías, im	4,7	4,3	5,0	5,7	6,3
	3. controles sin vacunar	3,3	3,3	3,3	2,9	2,9
PRRSV (relaciones de SP)						
	1. vacuna de 4 vías, im	0,0	0,9	1,3	1,3	1,4
	2. Porcillis PCV ID + Porcillis PRRS ID	0,0	1,6	1,8	2,1	2,3
	3. controles sin vacunar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Conclusiones:

30 La vacunación de cerdos con la vacuna combinada de 4 vías de acuerdo con la invención, fue eficaz en la protección contra la infección y los signos de enfermedad inducidos por una infección de desafío de PCV2. Asimismo, hubo un buen desarrollo de la protección contra Lawsonia y PRRSV, como se midió mediante la serología.

35 4.3. Eficacia de Lawsonia

La vacuna combinada de 4 vías se preparó como se ha descrito anteriormente, utilizando la vacuna criodesecada Prime Pac PRRS.

40 Esquema experimental

Se vacunaron tres grupos de cerdos de tres semanas de edad con la vacuna combinada de 4 vías y se les proporcionó

una infección de desafío con la bacteria virulenta de Lawsonia 5 semanas después. Un grupo recibió la vacuna completa de 4 vías, otro grupo recibió una vacuna de control que comprendía los mismos ingredientes, excepto el antígeno de Lawsonia. El tercer grupo recibió la vacuna de control, pero no el desafío, dado que se les realizó una necropsia en el momento del desafío para confirmar la ausencia de infección por Lawsonia en la pira antes del desafío.

Los grupos se compararon para determinar la eficacia de una dosis única de la vacuna combinada contra la enfermedad causada por el desafío de Lawsonia: ileítis, colonización del íleon por Lawsonia, eliminación y efecto sobre el aumento de peso.

Todos los cerdos fueron evaluados cada dos días en cuanto a reacciones locales y sistémicas durante 21 días después de la vacunación o hasta la resolución. Se recogieron muestras fecales para confirmar la ausencia de infección de campo por Lawsonia antes del desafío. Se recogieron muestras de sangre a lo largo del estudio para evaluar las respuestas de anticuerpos a la vacunación y al desafío, también se recogieron muestras fecales para la qPCR de Lawsonia y se registraron los datos del peso corporal.

A las tres semanas tras el desafío (11 semanas de edad) se realizó la necropsia de todos los animales restantes y se determinaron las puntuaciones de las lesiones macroscópicas del íleon y se recogieron raspados de la mucosa para la PCR cuantitativa de Lawsonia (qPCR). Asimismo, se recogió una sección del íleon para la inmunohistoquímica (IHC; del inglés, immunohistochemistry) e histopatología.

Detalles del experimento

Los cerdos fueron de sexo mixto y de una variedad mixta de American Yorkshire-Landrace-Duroc. Se proporcionaron agua y alimento adecuados a la edad a discreción.

La vacuna de 4 vías completa comprendió por dosis animal de 2 ml: 2,0 RP de antígeno de Mhyo; 6000 unidades de Elisa de antígeno de Lawsonia/ml; 5,7 µg/ml de antígeno ORF2 de PCV2; y 10⁵ TCID50 de PRRSV.

Justo antes del desafío, se realizó una necropsia a 2 cerdos vacunados con la vacuna de control, para verificar la ausencia de cualquier infección de Lawsonia antes del desafío.

El desafío de Lawsonia se administró por vía oral, 5 semanas tras la vacunación (aproximadamente 8 semanas de edad), con un inóculo de 4,6 10 Log TCID50 de Lawsonia virulenta viva por animal.

La puntuación de la lesión del íleon se hizo sobre una sección de 2,5 cm del íleon, se escindió y se recogió en formalina tamponada al 10%, que se utilizó para el examen histopatológico y para la presencia de Lawsonia por inmunohistoquímica.

Se abrió el resto del íleon y se examinó visualmente la superficie de la mucosa en cuanto a la presencia de lesiones de ileítis asociadas a Lawsonia (también denominada enteritis proliferativa porcina o EPP; en inglés, PPE), incluyendo proliferación de la mucosa con engrosamiento de la pared intestinal, edema, hiperemia, congestión, necrosis y hemorragia. A las lesiones macroscópicas se les dio una puntuación que varía de 0 (mucosa normal) a 5 (EPP grave con hemorragia y/o necrosis). Asimismo, se recogieron raspados de íleon y se congelaron hasta su análisis.

Análisis de datos:

La puntuación de la ileítis se basó en la puntuación de la lesión microscópica de la ileítis por histopatología y la puntuación de lesión macroscópica del íleon.

La infección por Lawsonia (colonización) se determinó basándose en la puntuación IHC microscópica. Se utilizó qPCR para evaluar la presencia de Lawsonia en hisopos rectales y en raspados de mucosa intestinal y para la eliminación en heces.

Resultados

Eliminación fecal:

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos a los 14 días tras el desafío (dtd). Sin embargo, los resultados de la eliminación fecal a los 20 dtd mostraron que los cerdos vacunados eliminaron significativamente menos Lawsonia que el grupo de placebo en este momento ($p = 0,0134$), indicando una recuperación más temprana para los vacunados.

Colonización:

La qPCR de raspados ileales recogidos a los 20 dtd mostró significativamente más colonización por Lawsonia en el

grupo que recibió la vacuna placebo ($p = 0,0094$).

Aumento de peso diario:

- 5 Después del desafío, el aumento de peso diario también mejoró significativamente en los cerdos vacunados de 4 vías, en comparación con el grupo que recibió la vacuna de placebo ($p = 0,0337$).

Conclusión:

- 10 La vacunación de cerdos con la vacuna combinada de 4 vías de acuerdo con la invención, fue eficaz en la protección contra la infección y los signos de enfermedad inducidos por una infección de desafío de Lawsonia.

4.4. Eficacia del PRRSV

- 15 La vacuna combinada de 4 vías se preparó como se ha descrito anteriormente y comprendió PRRSV a partir de la reconstitución de una ampolla de vacuna PrimePac™ PRRS, poco antes de la vacunación.

Esquema experimental

- 20 El objetivo de este estudio fue evaluar la inmunogenicidad de la fracción de PRRS de la vacuna combinada de acuerdo con la invención, mediante la vacunación de cerdos de tres semanas de edad y desafío con PRRSV virulento 4,5 semanas después.

- 25 Se vacunó a dos grupos de 25 cerdos sanos cada uno, negativos para anticuerpos antiPRRSV y viremia de PCV2, a las tres semanas de edad por vía intramuscular con una dosis de 2 ml de la vacuna combinada de 4 vías o con una vacuna de placebo (3 vías) que no comprende PRRSV. Todos los antígenos estuvieron presentes en los niveles de dosis de campo estimados.

- 30 Aproximadamente a las 7,5 semanas de edad, los cerdos se desafiaron por vía intranasal con la cepa NADC-20 del virus PRRS. A lo largo del período tras el desafío, los cerdos se evaluaron en cuanto a observaciones clínicas y puntuaciones clínicas y se recogieron muestras de sangre e hisopos nasales. A los 14 días tras el desafío, se sacrificó a todos los cerdos y se les realizó una necropsia. Se puntuaron las lesiones macroscópicas del pulmón y se recogieron secciones de pulmón y ganglios linfáticos para histopatología e inmunohistoquímica (IHC). Los resultados se evaluaron para determinar la eficacia de una dosis única de vacuna combinada para la reducción de enfermedad respiratoria, viremia y/o excreción de PRRSV después de una infección de desafío.

- 35 Los pesos corporales se registraron en el momento de la vacunación, en el desafío y al final de la prueba.

Detalles del experimento

- 40 El desafío de PRRSV se administró por vía intranasal con 2 ml por orificio nasal de material de desafío diluido. El virus de desafío se preparó poco antes de la administración y se mantuvo en hielo antes y durante el uso. La dosis de desafío total fue de aproximadamente $4,2 \log_{10}$ TCID₅₀ p por animal.

- 45 La vacuna de 4 vías completa comprendió por dosis animal de 2 ml: 2,0 RP de antígeno de Mhyo; 7000 unidades de Elisa de antígeno de Lawsonia/ml; 5,7 µg/ml de antígeno ORF2 de PCV2; y 10^5 TCID₅₀ de PRRSV.

Análisis de los datos

- 50 Las observaciones clínicas de dificultad respiratoria y de letargo se registraron inmediatamente antes y posteriormente después del desafío. Se indicaron puntuaciones clínicas que varían desde 0: normal, a 3: disnea severa y/o taquipnea y/o respiración abdominal prominente cuando al estresarse, de modo que el estrés se indujo provocando un movimiento rápido del cerdo brevemente.

- 55 La puntuación de pulmón se aplicó según Halbur et.al. (1995, Vet. Pathol., vol. 32, págs. 648-660 [Apéndice 7, Ref. 1]). A las lesiones de pulmón macroscópicas se les dio una puntuación para estimar el porcentaje del pulmón afectado por neumonía. A cada lóbulo pulmonar se le dio un número de puntos para reflejar el porcentaje de volumen aproximado del pulmón completo representado por ese lóbulo. Se asignaron diez puntos posibles (5 para dorsal, 5 para ventral) a cada uno del lóbulo anterior derecho, lóbulo medio derecho, parte anterior del lóbulo anterior izquierdo y parte caudal del lóbulo anterior izquierdo. Al lóbulo accesorio se le asignaron 5 puntos posibles y se asignaron 27,5 puntos posibles (15 para dorsal y 12,5 para ventral) a cada uno de los lóbulos caudales derecho e izquierdo para alcanzar un total de 100 puntos posibles. Las puntuaciones de lesión de pulmón macroscópica se registraron como el número de puntos que reflejan el porcentaje de volumen aproximado de ese lóbulo afectado por neumonía asociada a PRRS. La puntuación de lesión de pulmón total para cada pulmón se calculó como la suma de las puntuaciones de lesión de pulmón macroscópica de todos los lóbulos.

- 65

Se tomaron muestras de pulmón de cada cerdo para el examen histopatológico, específicamente: la punta del lóbulo medio izquierdo, un trozo del lóbulo accesorio y la parte anterior del lóbulo caudal derecho. Además, se tomaron secciones de ganglios linfáticos mediastínicos y bronquiales. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% para histopatología e IHC.

5 Otras colecciones fueron muestras de suero, para la detección de anticuerpos antiPRRSV; hisopos nasales, para la detección de ácido nucleico de PRRSV mediante una RT-PCR cuantitativa; y muestras de tejido, para el análisis microscópico e IHC.

10 Las muestras de PRRSV se titularon sobre la línea celular MARC145. Para cada réplica, se añadieron diluciones seriadas de 10 veces a diez pocillos en una placa de 96 pocillos que contenía monocapas de células preformadas y las placas se incubaron con CO₂ al 5 % a 35-39 °C durante cinco días. A continuación, las placas se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo fluorescente antiPRRSV y se puntuaron mediante IFT.

15 Las variables de resultado para la eficacia de la vacunación se evaluaron mediante el análisis de las observaciones clínicas y las puntuaciones clínicas del período tras el desafío, temperatura corporal, pesos corporales, excreción nasal y viremia como se determinó por PCR, así como mediante el análisis macroscópico y microscópico de las lesiones de pulmón a los 14 días tras el desafío. La enfermedad respiratoria se evaluó mediante las puntuaciones de lesión de pulmón macroscópica.

20 Variables secundarias de eficacia mediante análisis de tejidos por histopatología e IHQ, cantidad máxima de viremia, cantidad máxima de eliminación, aumento de peso después del desafío, observaciones clínicas después del desafío y puntuaciones clínicas respiratorias después del desafío.

25 Resultados

La mediana de las puntuaciones de lesión de pulmón, en % del pulmón afectado, fue: 20 % para el grupo de vacuna de placebo, frente a un 7 % para el grupo de vacuna de 4 vías ($p = 0,0014$).

30 La histopatología de las tres muestras de pulmón recogidas se puntuó en una escala de 0 (normal) a 4 (neumonía intersticial grave). Las puntuaciones máximas fueron: 3 para el grupo de vacuna de placebo, frente a 2 para el grupo de vacuna de 4 vías ($p = 0,0010$).

35 La inmunohistoquímica de la muestra de pulmón se puntuó en una escala de 0 (sin células positivas para el antígeno de PRRSV) a 4 (> 100 células positivas por sección de tejido). El valor máximo de las puntuaciones de las tres muestras de pulmón recogidas fue de 2 para el grupo de vacuna de placebo, frente a 1 para el grupo de vacuna de 4 vías ($p = 0,0006$).

40 Conclusión:

La vacunación de cerdos con la vacuna combinada de 4 vías de acuerdo con la invención, fue eficaz en la protección contra la infección y los signos de enfermedad inducidos por una infección de desafío de PRRSV.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna combinada que comprende un antígeno que no se replica de circovirus porcino tipo 2 (PCV2) y un virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino vivo (PRRSV), **caracterizada por que** la vacuna es una emulsión de aceite en agua que comprende escualano y acetato de vitamina E.
2. Una vacuna combinada de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo la vacuna escualano en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 9 % p/v.
- 10 3. Una vacuna combinada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, comprendiendo la vacuna acetato de vitamina E en una cantidad de entre aproximadamente un 1 y aproximadamente un 10 % p/v.
- 15 4. Una vacuna combinada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde la emulsión de aceite en agua es una emulsión submicrónica.
5. Una vacuna combinada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, comprendiendo también la vacuna un antígeno que no se replica de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Myho).
- 20 6. Una vacuna combinada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, comprendiendo también la vacuna un antígeno que no se replica de *Lawsonia intracellularis* (Lawsonia).
- 25 7. Un kit de partes que comprende al menos dos envases: un envase que comprende un antígeno que no se replica de PCV2 en una emulsión de aceite en agua que comprende escualano y acetato de vitamina E; y un envase que comprende PRRSV vivo en forma criodesecada.
- 30 8. Un método para la preparación de una vacuna combinada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, que comprende las etapas de:
- preparar una fase acuosa que comprende un antígeno que no se replica de PCV2 y un PRRSV vivo y
 - mezclar dicha fase acuosa con una emulsión oleosa que comprende escualano y acetato de vitamina E.
- 35 9. Un método para la preparación de una vacuna combinada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, que comprende las etapas de:
- preparar el PRRSV vivo en una forma criodesecada,
 - preparar una fase acuosa que comprende un antígeno que no se replica de PCV2,
 - mezclar dicha fase acuosa con una emulsión oleosa que comprende escualano y acetato de vitamina E y
 - reconstituir dicho PRRSV vivo criodesecado con dicha mezcla de fase acuosa y emulsión oleosa.
- 40 10. Un método para la preparación de una vacuna combinada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, que comprende las etapas de:
- preparar una mezcla de una fase acuosa que comprende un antígeno que no se replica de PCV2 y de una emulsión oleosa que comprende escualano y acetato de vitamina E y
 - 45 - reconstituir el PRRSV vivo en una forma criodesecada con dicha mezcla.
- 50 11. Una emulsión de aceite en agua que comprende escualano y acetato de vitamina E, antígeno no replicante de PCV2 y PRRSV vivo, para usar en la vacunación de cerdos contra el PCV2 y el PRRSV.
12. Una vacuna combinada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para usar en la vacunación de cerdos contra el PCV2 y el PRRSV.