



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014024775-7 B1



(22) Data do Depósito: 03/04/2013

(45) Data de Concessão: 08/06/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICA TRIVALENTE E DE VACINA E SEUS USO PARA IMUNIZAÇÃO CONTRA MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE, CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E VÍRUS DA SÍNDROME REPRODUTIVA E RESPIRATÓRIA DE SUÍNO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO, BEM COMO KIT COMPREENDENDO AS DITAS COMPOSIÇÕES

(51) Int.Cl.: A61K 39/02; A61K 39/12; A61K 39/295.

(30) Prioridade Unionista: 04/04/2012 US 61/620.189.

(73) Titular(es): ZOETIS SERVICES LLC.

(72) Inventor(es): JEFFREY E. GALVIN; GREGORY P. NITZEL; JOHN KEITH GARRETT; JAMES R. KULAWIK II; TRACY L. RICKER; MEGAN MARIE SMUTZER.

(86) Pedido PCT: PCT US2013035091 de 03/04/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/152086 de 10/10/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/10/2014

(57) Resumo: VACINA COMBINADA DE PCV/MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE/PRRS. A presente invenção proporciona uma composição imunogênica trivalente incluindo uma porção solúvel de uma preparação celular total de Mycoplasma hyopneumoniae (M. hyo); um antígeno de circovírus de porcino tipo 2 (PCV2); e um antígeno do vírus PRRS, em que a porção solúvel da preparação de M. hyo é substancialmente livre de ambos (i) IgG e (ii) complexos imunes compreendidos de antígeno ligado a imunoglobulina.

“COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICA TRIVALENTE E DE VACINA E SEUS USO PARA IMUNIZAÇÃO CONTRA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*, CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E VÍRUS DA SÍNDROME REPRODUTIVA E RESPIRATÓRIA DE SUÍNO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO, BEM COMO KIT COMPREENDENDO AS DITAS COMPOSIÇÕES”

Campo da invenção

[001] A presente invenção se refere um circovírus de suíno, *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae* ou *M. hyo*), e ao vírus da síndrome reprodutiva e respiratória de suíno (PRRS). Mais particularmente, a presente invenção se refere a uma composição imunogênica trivalente incluindo uma porção solúvel de uma preparação celular total de *M. hyo*, um antígeno de PCV2, e um antígeno do vírus PRRS e o seu uso em uma vacina para a proteção de porcos contra pelo menos pneumonia enzoótica e Síndrome de Caquexia Multissistêmica Pós-desmame (PMWS).

Antecedentes da invenção

[002] Pneumonia enzoótica em suínos, também chamada de pneumonia micoplasmal, é causada por *M. hyo*. A doença é uma doença crônica, não fatal que afeta os porcos de todas as idades. Os porcos infectados apresentam apenas sintomas suaves de tosse e febre, mas a doença tem significativo impacto econômico em virtude de reduzida eficiência de alimentação e reduzido ganho de peso. A pneumonia enzoótica é transmitida de porco para porco através das passagens nasais por organismos veiculados pelo ar expelidos a partir dos pulmões dos porcos infectados. A infecção primária por *M. hyo* pode ser seguida por infecção secundária por outras espécies de micoplasma (*Mycoplasma hyorhinis* e *Mycoplasma flocculare*) assim como por outros patógenos bacterianos.

[003] *M. hyo* é um pequeno micróbio procariótico capaz de uma existência livre, embora o mesmo seja encontrado em associação com células eucarióticas pe-

lo fato de que ele tem absolutas necessidades para esteróis exógenos e ácidos graxos. As referidas necessidades em geral necessitam do desenvolvimento em meio contendo soro. *M. hyo* é ligado por uma membrana celular, mas não a parede celular.

[004] A associação física de micoplasmas com a superfície da célula hospedeira é a base para o desenvolvimento e a persistência de pneumonia enzoótica. *M. hyo* infecta o trato respiratório de suínos, colonizando a traqueia, brônquios e bronquíolos. O micoplasma produz um fator ciliostático que faz com que os cílios que revestem as passagens respiratórias parem de se movimentar. Eventualmente, os cílios se degeneram, deixando o porco propenso a infecção por patógenos secundários. Lesões características de áreas de consolidação de purpura para cinza são observadas em animais infectados. Pesquisas com animais abatidos revelou lesões em 30 a 80% dos suínos. Os resultados a partir de 37 rebanhos em 13 estados indicaram que 99% dos rebanhos tinha porcos com lesões de pneumonia típicas de pneumonia enzoótica. Portanto, a necessidade de medidas preventivas eficazes e de tratamento é grande.

[005] Antibióticos tais como tiamulina, trimetoprima, tetraciclina e lincomicina têm algum benefício, mas são antieconômicos e requerem uso prolongado. Adicionalmente, antibióticos não mostraram eliminar com eficiência a disseminação ou a reinfecção de *M. hyo*. A prevenção por se manter rebanhos livres de patógenos é algumas vezes possível, mas a reintrodução de *M. hyo* ocorre com frequência. Em virtude das sérias consequências econômicas de pneumonia em suínos, vacinas contra *M. hyo* têm sido pesquisadas. Vacinas contendo preparações de organismos micoplasmiais desenvolvidos em meio contendo soro têm sido comercializadas, mas surgem preocupações relativas às reações adversas induzidas pelos componentes do soro (tal como complexos imunes ou proteínas específicas não imunogênicas) presentes no material de imunização. Outras tentativas de proporcionar vacinas para

M. hyo têm sido bem sucedidas, mas a doença permanece disseminada.

[006] M. hyo e circovírus suíno tipo 2 (PCV2) são os dois patógenos mais preponderantes que são encontrados na indústria de suíno. Os suínos infectados com PCV2 exibem uma síndrome comumente referida como Síndrome de Caquexia Multissistêmica Pós-desmame (PMWS). A PMWS é clinicamente caracterizada por perdas, palidez da pele, *unthriftiness*, angústia respiratória, diarreia, ictero e icterícia. Além de PMWS, PCV2 esteve associada a diversas outras infecções incluindo pseudorraiva, síndrome reprodutiva e respiratória de suíno (PRRS), doença de Glasser, meningite estreptocócica, salmonelose, colibacilose pós-desmame, hepatose dietética, e broncopneumonia supurativa. M. hyo está associada com pneumonia enzoótica e está também implicado como um dos maiores cofatores no desenvolvimento de Doença Associada um circovírus Suíno (PCVAD).

[007] A síndrome reprodutiva e respiratória de suíno (PRRS) é causada por um arterivírus, que tem uma afinidade particular pelos macrófagos particularmente os encontrados no pulmão (macrófagos alveolares). Os referidos macrófagos ingerem e removem bactérias e vírus invasores, mas não no caso do vírus de PRRS (PRRSV). No caso do vírus de PRRS, o mesmo se multiplica dentro dos macrófagos produzindo mais vírus e extermina os macrófagos. Uma vez que PRRSV tenha entrado em um rebanho, ele tende a permanecer presente e ativo indefinidamente. Até 40% dos macrófagos são destruídos, o que permite que bactéria e outros vírus proliferem e façam danos. Um exemplo comum disso é o aumento notável na gravidade da pneumonia enzoótica em unidades de crescimento/abate quando os porcos se tornam infectados com PRRSV. Mais do que a metade dos porcos negativos para vírus de PRRS em idade de desmame se tornam infectados antes de ir para o mercado.

[008] O que é necessário é uma vacina trivalente para PCV2/M. hyo/PRRS contra infecção por PCV2, *mycoplasma*, e PRRSV em suínos. Seria altamente dese-

jável se proporcionar uma única dose de vacina trivalente. Preferivelmente, o componente PCV2/M. hyo da vacina seria proporcionado como uma composição líquida pronta para uso em um frasco que pode ser facilmente combinada com o componente PRRSV de modo que todos os antígenos podem ser administrados ao porco simultaneamente.

Sumário da invenção

[009] A presente invenção proporciona uma composição imunogênica trivalente incluindo uma porção solúvel de uma preparação celular total de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo); um antígeno de circovírus suíno tipo 2 (PCV2); e um antígeno de vírus da síndrome reprodutiva e respiratória de suíno (PRRS2), em que a porção solúvel da preparação de M. hyo é substancialmente livre de ambos (i) IgG e (ii) complexos imunes compreendidos de antígeno ligado a imunoglobulina. Em um aspecto, a porção solúvel da preparação de M. hyo celular total foi tratada com proteína-A ou proteína-G antes de ser adicionada a a composição imunogênica. Em a aspecto adicional, a porção solúvel da preparação de M. hyo e o antígeno PCV2 são na forma de uma composição líquida pronta para usar.

[0010] Em uma modalidade, o antígeno do vírus PRRS é um vírus vivo geneticamente modificado. Em outra modalidade, o vírus PRRS vivo geneticamente modificado é na forma de uma composição liofilizada.

[0011] Em uma modalidade, a porção solúvel da preparação de M. hyo inclui pelo menos um antígeno de proteína de M. hyo. Em outra modalidade, a porção solúvel da preparação de M. hyo inclui dois ou mais antígenos de proteína de M. hyo.

[0012] Em uma modalidade, o antígeno PCV2 é na forma de um circovírus de tipo 1 - tipo 2 quimérico, o vírus quimérico incluindo um circovírus de tipo 1 de suíno recombinante inativado que expressa a proteína ORF2 do circovírus suíno do tipo 2. Em outra modalidade, o antígeno PCV2 é na forma de uma proteína ORF2 recombinante. Em ainda outra modalidade, a proteína ORF2 recombinante é expres-

sa a partir de um vetor de baculovírus.

[0013] Em algumas modalidades, a composição trivalente da presente invenção suscita uma resposta imune de proteção contra vírus de M. hyo, PCV2 e PRRS. Em outras modalidades, a composição imunogênica da presente invenção adicionalmente inclui pelo menos um antígeno adicional. Em uma modalidade, o pelo menos um antígeno adicional é protetor contra um microorganismo que possa causar doença em porcos.

[0014] Em uma modalidade, o microorganismo inclui bactéria, vírus ou protozoários. Em outra modalidade, o microorganismo é selecionado a partir de, mas não é limitado aos a seguir: parvovírus de suíno (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, leptospira bactéria, *Lawsonia intracellularis*, vírus da influenza de suínos (SIV), antígeno da *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavírus respiratório de suíno, vírus da diarreia epidêmica de suíno (PED), rotavírus, Torque teno vírus (TTV), Citomegalovírus de suíno, Enterovírus de suíno, Vírus da encefalomiocardite, a patógeno causador de Doença de Aujeszky, Febre de suíno clássica (CSF) e a patógeno causador de Gastroenterite Transmissível de Suíno, ou combinações dos mesmos.

[0015] Em algumas modalidades, a composição da presente invenção adicionalmente inclui um adjuvante. Em uma modalidade, o adjuvante é selecionado a partir de, mas não é limitado aos a seguir: um adjuvante de óleo-em-água, um polímero e um adjuvante de água, um adjuvante de água-em-óleo, um adjuvante de hidróxido de alumínio, um adjuvante de vitamina E e combinações dos mesmos. Em outra modalidade, a composição da presente invenção adicionalmente inclui um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0016] Em determinadas modalidades, a composição da presente invenção suscita uma resposta imune de proteção contra vírus de M. hyo, PCV2 e PRRS quando administrada como uma administração de uma única dose.

[0017] A presente invenção também proporciona um método de imunizar um porco contra vírus de M. hyo, PCV2 e PRRS. O referido método inclui administrar ao porco uma composição imunogênica trivalente incluindo uma porção solúvel da preparação celular total de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo); um antígeno de circovírus suíno tipo 2 (PCV2); e um antígeno do vírus PRRS, em que a porção solúvel da preparação de M. hyo é substancialmente livre de ambos (i) IgG e (ii) complexos imunes compreendidos de antígeno ligado a imunoglobulina.

[0018] Em uma modalidade do método da presente invenção, a composição trivalente é administrada por via intramuscular, por via intradérmica, por via transdérmica, ou por via subcutânea. Em outra modalidade do método da presente invenção, a composição trivalente é administrada em uma única dose.

[0019] Em uma modalidade adicional, a composição é administrada a porcos tendo anticorpos derivados da mãe contra pelo menos um de vírus de M. hyo, PCV2 e PRRS. Em ainda outra modalidade adicional, a composição é administrada a porcos tendo anticorpos derivados da mãe contra vírus de M. hyo, PCV2 e PRRS.

[0020] Em uma modalidade, a composição é administrada a Porcos com 3 semanas de idade ou mais velhos.

[0021] A presente invenção também proporciona um método para preparar uma composição imunogênica de acordo com a presente invenção. O referido método inclui i) cultivar M. hyo em um meio adequado por períodos que variam a partir de 18-144 horas; ii) inativar subsequentemente a cultura de M. hyo; iii) coletar o fluido da cultura inativada, em que o fluido da cultura inativada compreende uma preparação celular total de M. hyo compreendendo não só uma fração líquida solúvel mas também material celular insolúvel; iv) separar a fração líquida solúvel a partir do ma-

terial celular insolúvel; v) remover substancialmente não só o IgG mas também os complexos imunes de antígeno/imunoglobulina a partir da fração líquida solúvel separada para formar uma porção solúvel da preparação de *M. hyo* celular total; e vi) combinar subsequentemente a porção solúvel da preparação de *M. hyo* celular total com um antígeno de PCV2 e um antígeno do vírus PRRS. Em uma modalidade, a etapa vi) inclui combinar uma composição líquida pronta para usar compreendendo ambos o antígeno PCV2 e a porção solúvel de *M. hyo* com um antígeno liofilizado do vírus PRRS.

[0022] Em uma modalidade, um kit de acordo com a presente invenção inclui um primeiro frasco (ou outro receptáculo adequado) compreendendo a composição incluindo ambos um antígeno de PCV2 e a porção solúvel da preparação celular total de *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*), em que a porção solúvel da preparação de *M. hyo* é substancialmente livre de ambos (i) IgG e (ii) complexos imunes de antígeno/imunoglobulina; e um segundo frasco compreendendo antígeno do vírus PRRS. Em uma modalidade, a composição no primeiro frasco é proporcionada como uma composição líquida pronta para usar. Em uma modalidade adicional, o componente antígeno do vírus PRRS do kit é na forma de uma composição liofilizada. Em outra modalidade, o kit inclui um manual de instruções com direções para combinar os conteúdos a partir do primeiro frasco com os conteúdos do segundo frasco. Em ainda outra modalidade, o manual de instruções adicionalmente inclui direções para administrar os conteúdos combinados dos primeiro e segundo frascos a um porco.

Breve Descrição dos Desenhos

[0023] A figura 1 é um gráfico que mostra a eficácia de vacinas de *M. hyo* monovalente preparadas com antígenos de *M. hyo* a partir de diferentes tratamentos (T02-T10 descritos no Exemplo 3) vs. um placebo (T01). Os resultados são apresentados como % Valores médios de quadrados mínimos de lesão do pulmão.

[0024] A figura 2 é um gráfico que mostra os resultados da potência do anti-

geno PCV2 (PCV2 antígeno ELISA) das vacinas de M. hyo em combinação com vírus quimérico de tipo 1 - tipo 2 de PCV morto. O vírus quimérico foi incluído nas composições a um nível inicial de cerca de $1,6 \leq RP$. O estado de cada amostra é expresso como potência relativa (RP).

[0025] A figura 3 é um gráfico que mostra os resultados de viremia de PCV2 (PCR Quantitativa de PCV2) observados com formulações de vacina de PCV/M. hyo que empregam diferente plataformas de adjuvantes.

[0026] A figura 4 é um gráfico que mostra os resultados sorológicos de ELISA com anticorpo para PCV2 (S/P) observado com formulações de vacina de PCV/M. hyo que empregam diferente plataformas de adjuvantes nos dias 1, 20, e 42 do desafio.

[0027] A figura 5 é um gráfico que mostra a descarga fecal de PCV2 obtida com os tratamentos T02-T04 descritos no Exemplo 7 vs. um placebo (T01). Os resultados são expressos como cópias de DNA de PCV2/mL.

[0028] A figura 6 é um gráfico que mostra a descarga nasal de PCV2 obtida com os tratamentos T02-T04 descritos no Exemplo 7 vs. o placebo (T01). Os resultados são expressos como cópias de DNA de PCV2/mL.

[0029] A figura 7 (A & B) são gráficos que mostram os resultados de um teste de interferon-gama (IFN- γ) que mede as respostas imunes mediadas celulares específicas para PCV2. Os resultados de pós-vacinação/pré-desafio são apresentados na figura 7A, e os resultados de pós-vacinação/pós-desafio são apresentados na figura 7B. A estimulação de 5×10^6 células foi considerada significativa.

[0030] A figura 8 ilustra a eficácia de M. hyo das formulações de vacina experimental PCV2/M. hyo em óleo SP. As pontuações do pulmão para as formulações que empregam tratamentos de M. hyo T02-T08 vs. um placebo (T01) são ilustradas por meio de gráficos na figura 8A. A tabela na figura 8B ilustra o Contraste dos tratamentos T02-T08 com o placebo.

[0031] A figura 9 é um gráfico de fluxo que mostra uma modalidade de um processo de fabricação usado para preparar antígeno de M. hyo tratado com proteína A compatível com PCV2.

[0032] A figura 10 é a tabela que mostra a evolução do adjuvante para a atividade virucida contra vírus de PRRS.

[0033] A figura 11 é um gráfico que mostra os resultados de viremia de PCV2 (PCR Quantitativa de PCV2) observado com Formulações experimentais de vacina PCV2/M. hyo/PRRS.

[0034] A figura 12 é um gráfico que mostra os resultados de ELISA para PCV2 observados com as formulações experimentais de vacina PCV2/M. hyo/PRRS nos dias -1,7,13, 20,28, 35 e 42 do estudo (desafio foi dia 21).

[0035] A figura 13 é um gráfico que mostra a descarga fecal de PCV2 obtida com os tratamentos T02 e T03 (Formulações experimentais de vacina PCV2/M. hyo/PRRS) descritas no Exemplo 14 vs. o placebo (T01).

Breve Descrição das Sequências

[0036] SEQ ID NO: 1 é uma modalidade de uma sequência de nucleotídeo que codifica p46 a partir da cepa de P-5722 de M. hyo;

[0037] SEQ ID NO: 2 é uma modalidade de uma sequência de amino ácido que corresponde a p46 a partir da cepa de P-5722 de M. hyo;

[0038] SEQ ID NO: 3 é uma modalidade de uma sequência de nucleotídeo que codifica p97 a partir da cepa de P-5722 de M. hyo;

[0039] SEQ ID NO: 4 é uma modalidade de uma sequência de amino ácido que corresponde a p97 a partir da cepa de P-5722 de M. hyo;

[0040] SEQ ID NO: 5 é uma modalidade de uma sequência genômica que codifica um vírus quimérico PCV1-2;

[0041] SEQ ID NO: 6 é uma modalidade de uma sequência de nucleotídeo que corresponde a ORF2 de um circovírus de suíno;

[0042] SEQ ID NO: 7 é uma modalidade de uma sequência de amino ácido que corresponde ao polipeptídeo ORF2 de um circovírus de suíno;

[0043] SEQ ID NO: 8 é uma modalidade de uma sequência genômica que codifica um vírus quimérico PCV1-2;

[0044] SEQ ID NO: 9 é uma modalidade de uma sequência de nucleotídeo que corresponde a ORF2 de um circovírus de suíno;

[0045] SEQ ID NO: 10 é uma modalidade de uma sequência de amino ácido que corresponde ao polipeptídeo ORF2 de um circovírus de suíno;

[0046] SEQ ID NO: 11 é uma modalidade de uma sequência de amino ácido que corresponde ao polipeptídeo ORF2 de um circovírus de suíno;

[0047] SEQ ID NO: 12 é uma modalidade de uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 11;

[0048] SEQ ID NO: 13 é uma modalidade de uma sequência de amino ácido que corresponde ao polipeptídeo ORF2 de um circovírus de suíno;

[0049] SEQ ID NO: 14 é uma modalidade de uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 13;

[0050] SEQ ID NO: 15 é uma modalidade de uma sequência de amino ácido que corresponde ao polipeptídeo ORF2 de um circovírus de suíno;

[0051] SEQ ID NO: 16 é uma modalidade de uma sequência genômica de uma forma não virulenta do vírus de PRRS Norte Americano isolado designado P129; e

[0052] SEQ ID NO: 17 é uma modalidade de uma sequência de nucleotídeo que corresponde de ORF2 a ORF5 do PRRSV isolado designado ISU-55.

[0053] SEQ ID NO: 18 é uma modalidade de uma sequência de nucleotídeo que corresponde a ORF6 e ORF7 do PRRSV isolado designado ISU-55.

Descrição Detalhada da invenção

[0054] A presente invenção proporciona uma composição imunogênica triva-

lente incluindo uma porção solúvel de preparação celular total de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo); um antígeno de circovírus suíno tipo 2 (PCV2), e um antígeno de vírus da síndrome reprodutiva e respiratória de suíno (PRRS2), em que a porção solúvel da preparação de M. hyo é substancialmente livre de ambos (i) IgG e (ii) complexos imunes compreendidos de antígeno ligado a imunoglobulina. Em uma modalidade, a composição trivalente suscita uma resposta imune de proteção em um porco contra PCV2, M. hyo, e vírus de PRRS.

[0055] Os requerentes surpreendentemente descobriram que a fração insolúvel da preparação de M. hyo celular total é não-imunogênica. De modo diferente, a preparação solúvel de M. hyo livre de Ig-G é imunogênica e pode ser efetivamente combinada com antígenos a partir de outros patógenos, tais como PCV2 e PRRSV, sem interferência analítica ou imunológica entre os antígenos. Isso torna a preparação de M. hyo solúvel uma plataforma eficaz para as vacinas multivalentes da presente invenção. Os requerentes também descobriram surpreendentemente que ao se remover a imunoglobulina e os resíduos de células insolúveis a partir da preparação de M. hyo se aumenta a segurança da composição imunogênica.

[0056] Como usado na especificação e nas reivindicações, a forma singular “a”, “um” “uma” e “o” incluem as referências plurais a não ser que o contexto indique claramente de outro modo. Por exemplo, o termo “um antígeno de proteína” inclui uma pluralidade de antígenos de proteína, incluindo misturas dos mesmos.

[0057] Como usado aqui, o termo “compreendendo” pretende significar que as composições e os métodos incluem os elementos recitados, mas não excluem os outros elementos.

[0058] Como definido aqui, uma porção solúvel de uma preparação celular total de M. hyo se refere a uma fração líquida solúvel de uma preparação celular total de M. hyo após a separação do material insolúvel e a substancial remoção de IgG e complexos imunes ligados a antígeno. A porção solúvel de M. hyo pode alternati-

vamente ser referida aqui como a fração de sobrenadante, sobrenadante de cultura e semelhante. Ela inclui proteínas solúveis expressas em *M. hyo* (Antígenos de proteína *M. hyo*) que foram separadas ou isoladas a partir de proteínas insolúveis, bactéria total, e outro material celular insolúvel em *M. hyo* por meios convencionais, tal como centrifugação, filtração ou precipitação. Além de incluir proteínas solúveis específicas de *M. hyo*, a porção solúvel da preparação de *M. hyo* celular total também inclui proteínas heterólogas, tal como as contidas no meio de cultura usado para a fermentação de *M. hyo*.

[0059] O termo “antígeno” se refere a um composto, composição, ou substância imunogênica que pode estimular a produção de anticorpos ou uma resposta de célula T, ou ambos, em um animal, incluindo composições que são injetadas ou absorvidas em um animal. A resposta imune pode ser gerada na molécula total, ou a uma porção da molécula (*por exemplo*, um epítipo ou hapteno).

[0060] Como definido aqui, uma “composição imunogênica ou imunológica”, se refere a uma composição de matéria que compreende pelo menos um antígeno que suscita uma resposta imunológica no hospedeiro de um celular e ou resposta imune mediada a anticorpo para a composição ou vacina de interesse.

[0061] O termo “resposta imune” como usado aqui se refere a uma resposta suscitada em um animal. Uma resposta imune pode se referir a imunidade celular (CMI); imunidade humoral ou pode envolver ambos. A presente invenção também contempla uma resposta limitada a uma parte do sistema imune. Em geral, uma “resposta imunológica” inclui, mas não é limitada a, um ou mais dos efeitos a seguir: a produção ou a ativação de anticorpos, células B, células T de ajuda, células T supressoras, e/ou células T citotóxicas e/ou células T γδ, direcionadas especificamente a um antígeno ou antígenos incluídos na composição ou vacina de interesse. Preferivelmente, o hospedeiro irá exibir seja uma resposta imunológica terapêutica ou protetora de modo que a resistência a nova infecção será aumentada e/ou a gravidade

clínica da doença reduzida. A referida proteção será demonstrada seja por uma redução ou falta de sintomas normalmente exibidos por um hospedeiro infectado, um tempo de recuperação mais rápido e/ou uma titulação viral reduzida no hospedeiro infectado.

[0062] Como usado aqui, o termo "imunogenicidade" quer dizer capaz de produzir uma resposta imune em um animal hospedeiro contra um antígeno ou antígenos. A referida resposta imune forma a base da imunidade de proteção suscitada por uma vacina contra um organismo infeccioso específico.

[0063] Um "adjuvante" como usado aqui quer dizer uma composição compreendida de uma ou mais substâncias que aumentam a resposta imune a um antígeno(s). O mecanismo de como um adjuvante opera não é inteiramente conhecido. Acredita-se que alguns adjuvantes aumentem a resposta imune por lentamente liberar o antígeno, enquanto que outros adjuvantes são fortemente imunogênicos por direito próprio e acredita-se que funcionem sinergisticamente.

[0064] Como usado aqui, o termo "multivalente" quer dizer uma vacina contendo mais do que um antígeno seja a partir da mesma espécie (isto é, diferentes isolados de *Mycoplasma hyopneumoniae*), a partir de uma espécie diferente (isto é, isolados a partir de ambos *Pasteurella hemolytica* e *Pasteurella multocida*), ou uma vacina contendo a combinação de antígenos a partir de diferentes gêneros (por exemplo, uma vacina compreendendo antígenos a partir de *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* e *Clostridium*).

[0065] O termo "porco" ou "leitão" como usado aqui quer dizer um animal de origem de suíno, enquanto que "porca" se refere a uma fêmea de idade e capacidade de reprodução. Uma "porca nova" é uma fêmea de porco que nunca esteve prenha.

[0066] Como usado aqui, o termo "virulento" quer dizer um isolado que retém a sua capacidade de ser infeccioso em um hospedeiro animal.

[0067] "Vacina inativada" quer dizer uma composição de vacina contendo um organismo infeccioso ou patógeno que não é mais capaz de replicação ou desenvolvimento. O patógeno pode ser de origem bacteriana, viral, protozoal ou fúngico. A inativação pode ser realizada por uma variedade de métodos incluindo resfriamento por congelamento, tratamento químico (por exemplo, tratamento com timersal ou formalina), sonicação, radiação, calor ou qualquer outro meio convencional suficiente para evitar a replicação ou o desenvolvimento do organismo ao mesmo tempo em que mantém a sua imunogenicidade.

[0068] O termo "variante" como usado aqui se refere a um polipeptídeo ou uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo, que tem um ou mais variações de amino ácido consecutivo ou outras modificações menores de modo que o polipeptídeo correspondente tem função substancialmente equivalente quando comparado ao polipeptídeo de tipo selvagem.

[0069] "Variação conservadora" denota a substituição de um resíduo de amino ácido por outro resíduo biologicamente similar, ou uma substituição de um nucleotídeo em uma sequência de ácido nucleico de modo que o resíduo de amino ácido codificado não muda ou é outro resíduo biologicamente similar. Exemplos de variações conservadoras incluem a substituição de um resíduo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina para outro resíduo hidrófobo, ou a substituição de um resíduo polar, tal como a substituição de arginina por lisina, ácido glutâmico para ácido aspártico, ou glutamina para asparagina, e semelhante. O termo "variação conservadora" também inclui o uso de um amino ácido substituído no lugar de um amino ácido parente não substituído desde que os anticorpos criados para o polipeptídeo substituído também reajam imunologicamente com o polipeptídeo não substituído.

[0070] Como usado aqui, os termos "veículo farmacêuticamente aceitável" e "transportador farmacêuticamente aceitável" são intercambiáveis e se referem a um

veículo fluido contendo antígenos de vacina que podem ser injetados no hospedeiro sem efeitos adversos. Veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados conhecidos na técnica incluem, mas não são limitados a, água estéril, salina, glicose, dextrose, ou soluções tamponadas. Veículos podem incluir agentes de auxílio incluindo, mas não limitados a, diluentes, estabilizantes (isto é, açúcares e amino ácidos), conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes, agentes de tamponamento de pH, aditivos de intensificação de viscosidade, corantes e semelhante.

[0071] Como usado aqui, o termo "composição de vacina" inclui pelo menos um antígeno ou imunogênio em um veículo farmacêuticamente aceitável útil para induzir uma resposta imune em um hospedeiro. Composições de vacina podem ser administradas em dosagens e por técnicas bem conhecidos daqueles versados na técnica médica ou veterinária, levando em consideração os referidos fatores tais como idade, sexo, peso, espécie e condição do animal receptor, e a via de administração. A via de administração pode ser percutânea, via administração por mucosa (por exemplo, oral, nasal, anal, vaginal) ou via uma via parenteral (intradérmica, transdérmica, intramuscular, subcutânea, intravenosa ou intraperitoneal). As composições de vacina podem ser administradas isoladamente, ou podem ser coadministradas ou administradas em sequência com outros tratamentos ou terapias. As formas de administração podem incluir suspensões, xaropes ou elixires, e preparações para a administração parenteral, subcutânea, intradérmica, intramuscular ou intravenosa (por exemplo, administração injetável) tal como suspensões estéreis ou emulsões. As composições de vacina podem ser administradas como um pulverizador ou misturadas em alimentos e/ou água ou enviadas em mistura com um veículo, diluente, ou excipiente adequado tal como água estéril, salina fisiológica, glicose ou semelhante. As composições podem conter substâncias auxiliares tais como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes de tamponamento de pH, adjuvantes, gelificantes ou aditivos de intensificação de viscosidade, conservantes, agentes aromati-

zantes, corantes, e semelhante, dependendo da via de administração e da preparação desejada. Os textos farmacêuticos padrões, tal como "Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990 podem ser consultados para preparar preparações adequadas, sem experimentação indevida.

[0072] "vírus de PRRS Norte Americano" quer dizer qualquer vírus de PRRS tendo características genéticas associadas com um vírus de PRRS Norte Americano isolado, tal como, mas não limitado ao vírus de PRRS que foi primeiro isolado nos Estados Unidos próximo do início da década de 90 (vide, por exemplo, Collins, J. E., et al., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); North American virus of PRRS isolate MN-1b (Kwang, J. et al., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); the Quebec LAF-exp91 strain of PRRSV (Mardassi, H. et al., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); e North American virus of PRRS isolate VR 2385 (Meng, X.-J et al., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Adicional exemplos adicionais de cepas de vírus de PRRS Norte Americano são descritos aqui. As características genéticas se referem à similaridade da sequência genômica de nucleotídeo e a similaridade da sequência de amino ácido compartilhada pelas cepas dos vírus de PRRS Norte Americano. As cepas dos vírus de PRRS Chineses em geral evidenciam cerca de 80-93% de similaridade de sequência de nucleotídeo com as cepas Norte Americanas.

[0073] "vírus de PRRS Europeu" se refere a qualquer cepa de vírus de PRRS tendo as características genéticas associadas com o vírus de PRRS que foi primeiro isolado na Europa em torno de 1991 (vide, por exemplo, Wensvoort, G., et al., 1991, Vet. Q. 13:121-130). "European vírus of PRRS" é também algumas vezes referidos na técnica como "vírus de Lelystad". Exemplos adicionais de cepas de vírus de PRRS Europeu são descritos aqui.

[0074] Um vírus geneticamente modificado é "atenuado" se o mesmo é menos virulento do que a sua cepa parental não modificada. A cepa é "menos virulenta" se a mesma apresenta uma redução estatisticamente significativa em um ou mais

parâmetros que determinam a gravidade da doença. Os referidos parâmetros podem incluir o nível de viremia, febre, gravidade de angústia respiratória, gravidade dos sintomas reprodutivos, ou o número ou gravidade de lesões no pulmão, etc.

[0075] Um “clone infeccioso” é um gonema isolado ou clonado de um agente de doença (por exemplo vírus) que pode ser especificamente e propositalmente modificado em laboratório e então usado para recriar o organismo vivo geneticamente modificado. Um vírus vivo geneticamente modificado produzido a partir do clone infeccioso pode ser empregado em uma vacina de vírus vivo. Alternativamente, vacinas de vírus inativados podem ser preparadas por tratar o vírus vivo derivado a partir do clone infeccioso com agentes de inativação tais como formalina ou solventes hidrófobos, ácidos, etc., por irradiação com luz ultravioleta ou raio-X, por aquecimento, etc.

[0076] Todas as combinações atualmente disponíveis de M. hyo e M. hyo são produzidas a partir de preparações de micoplasma de célula total exterminada (bacterinas). De modo diferente, a presente invenção emprega uma porção solúvel da preparação celular total de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) para combinação com os antígenos de PCV2 e PRRSV, em que a porção solúvel da preparação de M. hyo é substancialmente livre de ambos (i) IgG e (ii) complexos imunes compreendidos de antígeno ligado a imunoglobulina.

[0077] M. hyo tem absoluta necessidade de esteróis exógenos e ácidos graxos. As referidas necessidades em geral necessitam do desenvolvimento de M. hyo em meio contendo soro, tal como soro de suíno. Separação do material insolúvel a partir de uma porção solúvel da preparação de M. hyo celular total (por exemplo, por centrifugação, filtração ou precipitação) não remove o IgG ou os complexos imunes de suíno. Em uma modalidade da presente invenção, a porção solúvel de M. hyo é tratada com proteína-A ou proteína-G de modo a substancialmente remover o IgG e os complexos imunes contidos no sobrenadante de cultura. Na referida modalidade,

é entendido que o tratamento com proteína A ocorre pós-fermentação de *M. hyo*. Isso é alternativamente referido aqui como tratamento à jusante com proteína A. Em outra modalidade, tratamento à montante com proteína A do meio de desenvolvimento (isto é, antes da fermentação de *M. hyo*) pode ser empregado. A proteína A se liga a a porção Fc de IgG. A proteína G se liga preferivelmente à porção Fc de IgG, mas pode também se ligar a à região Fab. Os métodos para purificar/remover IgG total a partir de misturas de proteína bruta, tal como sobrenadante de cultura de tecido, soro e fluido de ascite são conhecidos na técnica.

[0078] Em algumas modalidades, a porção solúvel da preparação de *M. hyo* inclui pelo menos um antígeno de proteína de *M. hyo*. Em outras modalidades, a porção solúvel da preparação de *M. hyo* inclui dois ou mais antígenos de proteína de *M. hyo*.

[0079] Em uma modalidade, a fração sobrenadante de *M. hyo* inclui um ou mais dos a seguir Antígenos de proteína específicos de *M. hyo*: proteínas *M. hyo* de aproximadamente 46kD (p46), 64kD (p64) e 97kD (p97) de pesos moleculares. Em outra modalidade, a fração de sobrenadante pelo menos inclui os antígenos de proteína de *M. hyo* p46, p64 e p97. A proteína de *M. hyo* de aproximadamente 64kD (p64) pode ser alternativamente referida aqui como o antígeno de superfície p65 a partir de *M. hyo* descrito por Kim et al. [Infect. Immun. 58(8):2637-2643 (1990)], assim como na Patente US No. 5,788,962.

[0080] Futo et al. descreveu a clonagem e a caracterização da proteína de superfície 46kD a partir de *M. hyo*, que pode ser empregado nas composições da presente invenção [J. Bact 177: 1915-1917 (1995)]. Em uma modalidade, o sobrenadante de cultura de *M. hyo* inclui a p46 cujos correspondentes nucleotídeo e sequência de amino ácidos a partir da cepa de P-5722 são determinados em SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente. É adicionalmente contemplado que variantes da referida sequências de p46 podem ser empregadas nas composições da presente inven-

ção, como descrito abaixo.

[0081] Zhang et al. descreve e caracteriza a proteína de adesão p97 de *M. hyo* [Infect. Immun. 63: 1013-1019, 1995]. Adicionalmente, King et al. descreveu a proteína 124kD denominada Mhp1 a partir da cepa de P-5722 de *M. hyo* e apresentou dados que sugerem que Mhp1 e p97 são a mesma proteína [Vaccine 15:25-35 (1997)]. As referidas proteínas p97 podem ser empregadas nas composições da presente invenção. Em uma modalidade, a sobrenadante de cultura de *M. hyo* inclui a p97 cujo correspondente nucleotídeo e sequência de amino ácidos a partir da cepa de P-5722 são determinados em SEQ ID NOs: 3 e 4, respectivamente. É adicionalmente contemplado que variantes das referidas sequências p97 podem ser empregadas nas composições da presente invenção, como descrito abaixo.

[0082] A sobrenadante de cultura de *M. hyo* pode incluir adicionalmente antígenos de proteína específicos de *M. hyo* tal como, mas não limitados a, proteínas de aproximadamente 41kD (p41), 42kD (p42), 89kD (p89), e 65kD (p65). *Vide*, Okada et al., 2000, J. Vet. Med. B 47:527-533 e Kim et al., 1990, Infect. Immun. 58(8):2637-2643. Adicionalmente, o sobrenadante de cultura de *M. hyo* pode incluir antígenos de proteína específicos de *M. hyo* de aproximadamente 102kD (p102) e 216kD (p216). *Vide*, Patente US Nos. 6,162,435 e 7,419,806 para Minnion et al.

[0083] Qualquer cepa de *M. hyo* pode ser usada como um material de partida para produzir a porção solúvel da preparação de *M. hyo* das composições da presente invenção. Cepas adequadas de *M. hyo* podem ser obtidas a partir de fontes comerciais ou acadêmicas, incluindo depositórios tais como the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va.) e the NRRL Culture Collection (Agricultural Research Service, U.S. Department de Agriculture, Peoria, Ill.). The ATCC isoladamente relaciona as seis cepas a seguir de *M. hyo* para venda: *M. hyo* ATCC 25095, *M. hyo* ATCC 25617, *M. hyo* ATCC 25934, *M. hyo* ATCC 27714, *M. hyo* ATCC 27715, e *M. hyo* ATCC 25934D. Uma cepa preferida de *M. hyo* para uso nas

modalidades da presente invenção é identified como a cepa P-5722-3, ATCC #55052, depositada em 30 de Maio de 1990 de acordo com as regras de acessibilidade necessárias para a Patente US e Trademark Office. Em vista da ampla disseminação da doença, as cepas podem também ser obtidas por se recuperar *M. hyo* a partir das secreções dos pulmões ou de tecidos a partir de suínos infectados com cepas conhecidas que causam *pneumonia micoplasma* em suínos.

[0084] É entendido por aqueles versados na técnica que variantes das sequências de *M. hyo* podem ser empregadas nas composições da presente invenção. As referidas variantes podem variar por tanto quanto 10-20% em identidade de sequência e ainda reter as características antigênicas que as tornam úteis na composição imunogênica. Preferivelmente, as variantes de *M. hyo* têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% de identidade de sequência com a sequência genômica de comprimento total da cepa de *M. hyo* de tipo selvagem. As características antigênicas de uma composição imunológica podem ser, por exemplo, estimadas pelo desafio de experimento como proporcionado nos Exemplos. Ademais, a característica antigênica de um antígeno de *M. hyo* modificado é ainda retida quando o antígeno modificado confere pelo menos 70%, preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90% da imunidade de proteção em comparação com a proteína de *M. hyo* de tipo selvagem.

[0085] Em uma modalidade, antígeno p46 solúvel de *M. hyo* é incluído nas composições da presente invenção a uma concentração final de cerca de 1,5 µg/mL a cerca de 10 µg/mL, preferivelmente e, cerca de 2 µg/mL a cerca de 6 µg/mL. É observado que p46 é a proteína usada para o teste de potência de *M. hyo* (vide seção de exemplo abaixo). Em outra modalidade, o antígeno *M. hyo* pode ser incluído nas composições a uma quantidade final de cerca de 5,5% a cerca de 35% do sobrenadante tratado com proteína A de cultura de *M. hyo* total.

[0086] A preparação de M. hyo solúvel não é só segura mas também eficaz contra M. hyo e é adequado para administração em dose única. Adicionalmente, os requerentes descobriram surpreendentemente que a preparação de M. hyo solúvel pode ser efetivamente combinada com antígenos a partir de outros patógenos, incluindo vírus PCV2 e PRRS, sem interferência imunológica entre os antígenos. Isso torna a preparação de M. hyo solúvel uma plataforma eficaz para vacinas multivalentes, incluindo a Vacina de combinação PCV2/M. hyo/PRRS da presente invenção. Os antígenos do vírus PRRS e PCV2 podem ser dados concomitantemente com a composição de M. hyo (isto é, como três vacinas únicas separadas), mas preferivelmente a preparação de M. hyo solúvel e o antígeno PCV2 são combinadas entre si na forma de uma composição líquida pronta para usar. A referida composição líquida de M. hyo/PCV2 pronta para usar pode então ser combinada com o antígeno do vírus PRRS de modo que todos os antígenos podem ser administrados simultaneamente ao porco. Em algumas modalidades, o antígeno do vírus PRRS está em um estado liofilizado e a composição líquida de M. hyo/PCV2 pode ser usada para reidratar o antígeno do vírus PRRS liofilizado, desse modo formando uma composição trivalente.

[0087] Em uma modalidade, as composições imunogênicas PCV2/M. hyo/PRRS da presente invenção incluem pelo menos um antígeno adicional. Em uma modalidade, o pelo menos um antígeno adicional é protetor contra um microorganismo que pode causar doença em porcos.

[0088] Em algumas modalidades, o pelo menos um componente antígeno adicional é protetor contra bactéria, vírus, ou protozoários que são conhecidos por infectar porcos. Exemplos dos referidos microorganismos incluem, mas não são limitados aos a seguir: parvovírus de suíno (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*,

Erysipelothrix rhusiopathiae, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, leptospira bactéria, *Lawsonia intracellularis*, vírus da influenza de suínos (SIV), *Escherichia coli* antígeno, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavírus respiratório de suíno, vírus da diarreia epidêmica de suíno (PED), rotavírus, Torque teno vírus (TTV), Citomegalovírus de suíno, Enterovírus de suíno, Vírus da encefalomiocardite, a patógeno causador de Doença de Aujeszky, Febre de suíno clássica (CSF) e a patógeno causador de Gastroenterite Transmissível de Suíno, ou combinações dos mesmos.

[0089] Em uma modalidade, o Componente PCV2/M. hyo da vacina trivalente de acordo com a presente invenção é proporcionado como uma composição líquida pronta para uso em um frasco. A referida composição pronta para uso não requer mistura das vacinas separadas monovalentes PCV2 e M. hyo, portanto não há risco de contaminação ou trabalho adicional associado com a mistura e não há necessidade de usar a mistura dentro de poucas horas. Também, o componente PCV2/M. hyo em um frasco corta o desperdício e espaço de armazenamento em refrigerador pela metade.

[0090] Em algumas modalidades, o componente de antígeno PCV2 de uma vacina de combinação PCV2/M. hyo/PRRS é na forma de um circovírus de tipo 1 - tipo 2 quimérico. O vírus quimérico inclui um circovírus de tipo 1 de suíno recombinante inativado que expressa a proteína ORF2 do circovírus suíno do tipo 2. Circovírus de suínos quiméricos e métodos para a preparação dos mesmos são descritos em WO 03/049703 A2, e também nas Patentes US Nos. 7,279,166 e 7,575,752, que são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

[0091] Em uma modalidade, a sequência de DNA de comprimento total do genoma do vírus PCV1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 5. ou variantes dos mesmos, como descrito abaixo. Em outra modalidade, o gene do capsídeo ORF2 imunogênico do vírus PCV1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 6. Em uma modalidade adicional, a sequência de amino ácido da proteína ORF2 imunogênica ex-

pressa pelo vírus PCV1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 7.

[0092] Em ainda outra modalidade, a sequência de DNA de comprimento total do genoma do vírus PCV1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 8. Em uma modalidade, o gene do capsídeo ORF2 imunogênico do vírus PCV1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 9. Em uma modalidade adicional, a sequência de amino ácido da proteína ORF2 imunogênica expressa pelo vírus PCV1-2 quimérico corresponde a SEQ ID NO: 10.

[0093] Entretanto, o DNA de PCV2 ORF2 e a proteína do vírus PCV1-2 quimérico não são limitados às sequências descritas acima uma vez que o DNA de PCV2 ORF2 e a proteína é um domínio altamente conservado dentro de PCV2 isolados.

[0094] Em algumas modalidades, o componente de antígeno PCV2 de uma Vacina de combinação de M. hyo/PCV2/PRRS é na forma de uma proteína ORF2 recombinante. Em uma modalidade, a proteína ORF2 recombinante é expressa a partir de um vetor de baculovírus. Alternativamente, outros vetores de expressão conhecidos podem ser usados, tais como incluindo, mas não limitado aos vetores parapox.

[0095] Em uma modalidade, a proteína PCV2 ORF2 recombinante é aquela da SEQ ID NO: 11, que é codificada por SEQ ID NO: 12 (Acesso ao GenBank No. AF086834). Em outra modalidade, a proteína ORF2 recombinante é aquela de SEQ ID NO: 13, que é codificada por SEQ ID NO: 14. Em ainda outra modalidade, a proteína ORF2 recombinante corresponde a SEQ ID NO: 15. Em ainda outra modalidade, a proteína PCV2 ORF2 recombinante corresponde a SEQ ID NO: 7. Em ainda outra modalidade adicional, a proteína PCV2 ORF2 recombinante corresponde a SEQ ID NO: 10.

[0096] Entretanto, a presente invenção não é limitada ao ORF2 DNA particular e sequências de proteína descritas acima. Uma vez que PCV2 ORF2 DNA e pro-

teína é um domínio altamente conservado dentro de PCV2 isolados, qualquer PCV2 ORF2 é altamente provável de ser eficaz como uma fonte de DNA de PCV2 ORF2 e/ou polipeptídeo como usado no vírus PCV1-2 quimérico ou na proteína PCV2 recombinante.

[0097] Um exemplo de um PCV2 isolado adequado a partir do qual o DNA de PCV2 ORF2 e as sequências de proteína podem ser derivadas é PCV2 isolado número 40895 (depositado no ATCC on 7 de dezembro de 2001 e atribuído uma designação de depósito de patente ATCC PTA-3914). A sequência genômica (nucleotídeo) do PCV2 isolado número 40895 está disponível no Acesso ao GenBank número AF264042. Outros exemplos de PCV2 isolado adequado a partir do qual o DNA de PCV2 ORF2 e as sequências de proteína podem ser derivadas incluem, mas não são limitados aos a seguir: Imp.999, Imp.1010-Stoon, Imp.1011-48121, e Imp.1011-48285. Os Números de Acesso ao GenBank das sequências genômicas que correspondem aos referidos PCV2 isolados são AF055391, AF055392, AF055393 e AF055394, respectivamente.

[0098] Em algumas formas, as porções imunogênicas da proteína PCV2 ORF2 são usadas como o componente antigênico em uma composição. Por exemplo, as formas ou fragmentos truncados e/ou substituídos da proteína PCV2 ORF2 podem ser empregados nas composições da presente invenção.

[0099] É entendido por aqueles versados na técnica que variantes das sequências de PCV2 podem ser empregadas nas composições da presente invenção. As referidas variantes podem variar por tanto quanto 10-20% em identidade de sequência e ainda retêm as características antigênicas que as tornam úteis nas composições imunogênicas. Preferivelmente, as variantes de PCV2 têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% de identidade de sequência com a sequência genômica de comprimento total do PCV2 isolado de tipo selvagem. As característi-

cas antigênicas de uma composição imunológica podem ser, por exemplo, estimadas pelo experimento de desafio como s proporcionado nos Exemplos. Ademais, a característica antigênica de um antígeno de PCV2 modificado é ainda retida quando o antígeno modificado confere pelo menos 70%, preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90% da imunidade de proteção em comparação com a proteína PCV2 ORF2 de tipo selvagem.

[00100] O componente de antígeno PCV2 é proporcionado na composição imunogênica a um nível de inclusão de antígeno z para induzir a resposta imune desejada, ou seja, reduzir a incidência de ou reduzir a gravidade dos sinais clínicos que resultam a partir de infecção por PCV2.

[00101] Em uma modalidade, um vírus quimérico PCV1-2 é incluído nas composições trivalentes da presente invenção a um nível de pelo menos $1,0 \leq RP \leq 5,0$, em que RP é a unidade de Potência relativa determinada por quantificação de antígeno ELISA (teste de potência in vitro) comparado a uma vacina de referência. Em outra modalidade, um vírus quimérico PCV1-2 é incluído na composição da presente invenção a uma concentração final de cerca de 0,5% a cerca de 5% de 20 vezes (20 X) o volume concentrado de antígeno de PCV1-2.

[00102] Em outra modalidade, a proteína recombinante PCV2 ORF2 é incluída nas composições trivalentes da presente invenção a um nível de pelo menos 0,2 µg antígeno/mL da composição imunogênica final (µg/mL). Em uma modalidade adicional, o nível de inclusão da proteína recombinante PCV2 ORF2 é a partir de cerca de 0,2 a cerca de 400 µg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de inclusão da proteína recombinante PCV2 ORF2 é a partir de cerca de 0,3 a cerca de 200 µg/mL. Em ainda outra modalidade adicional, o nível de inclusão da proteína recombinante PCV2 ORF2 é a partir de cerca de 0,35 a cerca de 100 µg/mL. Em ainda outra modalidade, o nível de inclusão da proteína recombinante PCV2 ORF2 é a partir de cerca de 0,4 a cerca de 50 µg/mL.

[00103] Em uma modalidade, uma composição imunogênica trivalente da presente invenção inclui a combinação da presente invenção de pelo menos um antígeno M. hyo solúvel (por exemplo, dois ou mais), um antígeno de circovírus suíno tipo 2 (PCV2), e um antígeno do vírus PRRS. Em outra modalidade, a composição suscita uma resposta imune de proteção em um porco contra vírus de M. hyo, PCV2 e PRRS.

[00104] Em uma modalidade, a vacina de combinação de PCV2/M. hyo/PRRS é proporcionada como uma vacina de 2 frascos e uma única dose. Por exemplo, em algumas modalidades, a combinação PCV2/M. hyo é proporcionada como uma composição líquida estável em um primeiro frasco e um vírus de PRRS é proporcionado em um estado liofilizado em um segundo frasco. Em algumas modalidades, antígenos de suíno adicionais podem ser adicionados seja ao primeiro ou ao segundo frasco.

[00105] Em uma modalidade, o componente de vírus de PRRS é proporcionada como um vírus vivo geneticamente modificado liofilizado. Antes da administração, a PCV2/M. hyo líquida a partir de um primeiro frasco pode ser usada para reidratar o vírus de PRRS em um segundo frasco de modo que todos os três antígenos podem ser administrados ao animal em uma única dose. É observado que embora a vacina de combinação PCV2/M. hyo/PRRSs exista atualmente, ela não é proporcionada como uma única dose, a vacina de três frascos que requer a simultânea administração de três vacinas separadas (por exemplo, Ingelvac CircoFLEX®, Ingelvac MycoFLEX® e Ingelvac®PRRS MLV).

[00106] O agente etiológico PRRS foi isolado pela primeira vez em The Netherlands, e nomeado como vírus Lelystad. O referido vírus foi descrito em WO 92/21375 (Stichting Centraal Diegeneeskundig Instituut). Um isolado do vírus de PRRS Europeu foi depositado no Institut Pasteur de Paris, número I-1102. O tipo Norte americano foi isolado quase simultaneamente com o isolamento do vírus do

tipo Europeu, e é descrito em WO-93/03760 (Collins et al.) um isolado do vírus do tipo Norte Americano foi depositado no American Type Culture Collection (ATCC), número VR-2332.

[00107] Diferentes cepas foram isoladas a partir de ambos os tipos de vírus he Europeu e Norte Americano. WO 93/07898 (Akzo) descreve a Cepa Europeia, e as vacinas derivadas a partir da mesma, depositadas em CNCM (Institut Pasteur), número I-1140. Também, WO 93/14196 (Rhone-Merieux) descreve uam nova cepa isolada na França, depositada em CNCM (Institut Pasteur), número I-1153. Adicionalmentemore, EP0595436 B1(Solvay) descreve uma nova cepa do tipo Norte Americano, mais virulenta do que a inicialmente descrita, e vacinas dos mesmos. A referida cepa foi depositada em ATCC, mas o número de depósito não é detalhado no pedido de patente. Adicionalmente, ES2074950 BA (Cyanamid Iberica) e sua contraparte GB2282811 B2 descreve a assimchamada "cepa Espanhola", que é diferente a partir das outras cepas Europeia e Norte Americana. A referida "cepa Espanhola" foi depositada em Europeum animal Cell Culture Collection (EACCC), número V93070108.

[00108] Adequado antígeno do vírus PRRSs para uso nas composições PCV2/M. hyo/PRRS da presente invenção incluem vírus de PRRS Norte Americano isolados, cepas de vírus de PRRS Chineses, e cepas de vírus de PRRS Europeu, assim como as versões geneticamente modificadas dos referidos isolados/cepas. Em uma modalidade, o componente antígeno do vírus PRRS empregado nas composições de acordo com a presente invenção é um vírus de PRRS Norte Americano.

[00109] Em algumas modalidades, o componente antígeno do vírus PRRS empregado nas composições da presente invenção é o vírus de PRRS Norte Americano isolado designado P129 ou uma versão viva geneticamente modificada dos mesmos. Preferivelmente, o vírus de PRRS geneticamente modificado é incapaz de produzir uma infecção patogênica ainda que seja capaz de suscitar uma resposta de

proteção imune eficaz contra infecção pelo vírus de PRRS de tipo selvagem.

[00110] Um vírus de PRRS geneticamente modificado para uso nas composições da presente invenção pode ser produzido a partir de um clone infeccioso. A preparação de um clone de cDNA infeccioso do vírus de PRRS Norte Americano isolado designado P129 é descrita na Patente US No. 6,500,662 que está aqui incorporada por referência em sua totalidade. A sequência de P129 cDNA é descrita em Acesso ao GenBank Número AF494042 e na Patente US No. 6,500,662.

[00111] Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeo de uma forma não virulenta de P129 para uso nas composições da presente invenção é reapresentada por SEQ ID NO: 16. Entretanto, a presente invenção não é limitada à referida sequência. A referida sequência e as sequências de outras formas não virulentas de P129 são descritas no Pedido Internacional No. PCT/IB2011/055003, depositado em 9 de Novembro de 2011, os conteúdos do qual (incluindo qualquer depósito US de Fase Nacional com base no presente Pedido Internacional) estão incorporados aqui por referência em sua totalidade. Preferivelmente, o vírus de PRRS é modificado para impedir a regulação para menos da função mediada por interferon.

[00112] Em outras modalidades, o componente antígeno do vírus PRRS empregado nas composições da presente invenção é o vírus de PRRS isolado designado ISU-55. O ISU-55 isolado foi depositado na American Type Culture Collection (ATCC), sob o número de acesso VR2430. A sequência de nucleotídeo dos genes ORF2 a ORF5 do ISU-55 isolado é reapresentada por SEQ ID NO:17. A sequência de nucleotídeo dos genes ORF6 e ORF7 do ISU-55 isolado é reapresentada por SEQ ID NO: 18.

[00113] Outro vírus de PRRS Norte Americano isolado adequado que pode ser usado nas composições é ISU-12, que foi depositado no ATCC sob os números de acesso VR2385 [placa purificada 3 x] e VR2386 [placa não purificada]. Ainda outro vírus de PRRS Norte Americano isolado adequado que pode ser empregado nas

composições da presente invenção são os a seguir: ISU-51, ISU-3927, ISU-1894, ISU-22 e ISU-79, que foram depositados no ATCC sob os números de acesso VR2498, VR2431, VR2475, VR2429 e VR2474, respectivamente. As versões geneticamente modificadas de qualquer um dos referidos ISU isolados podem ser empregadas nas composições da presente invenção. Os referidos ISU isolados e o ISU-55 isolado são descritos em detalhes nas Patentes US a seguir para Paul, et al: US 5,695,766, 6,110,467, 6,251,397, 6,251,404, 6,380,376, 6,592,873, 6,773,908, 6,977,078, 7,223,854, 7,264,802, 7,264,957, e 7,517,976, todas as quais estão aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

[00114] Em ainda outras modalidades, o componente antígeno do vírus PRRS empregado nas composições de acordo com a presente invenção é o tipo Norte Americano depositado na American Type Culture Collection (ATCC), número VR-2332 ou uma versão geneticamente modificada dos mesmos. Por exemplo, o vírus de PRRS pode ser um vírus vivo modificado com base no isolado identificado como ATCC VR2332, que é empregado em INGELVAC® PRRS ATP e INGELVAC® PRRS MLV, pela Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

[00115] Em ainda outras modalidades, o componente antígeno do vírus PRRS empregado nas composições da presente invenção é um vírus de PRRS Europeu isolado ou vírus Lelystad ou a versão geneticamente modificada dos mesmos. Um exemplo de uma cepa do vírus de PRRS adequada é identificada como depósito No. I-1102, descrito acima. O nucleotídeo e a sequência de amino ácidos que correspondem ao depósito I-1102 são descritos na Patente US no. 5,620,691 para Wensvoort et al, a qual se encontra aqui incorporada por referência em sua totalidade. A preparação de um clone infeccioso de um vírus de PRRS Europeu isolado ou vírus Lelystad é descrita na Patente US No. 6,268,199 a qual se encontra aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[00116] Outros exemplos de vírus de PRRS isolados adequados incluem,

mas não são limitados aos descritos acima. Também, a versão viva geneticamente modificada do vírus de PRRS isolado pode ser empregada nas composições da presente invenção. Um clone infeccioso pode ser usado para recriar os referidos organismos vivos geneticamente modificados.

[00117] É entendido por aqueles versados na técnica que variantes das sequências dos vírus de PRRS podem ser empregadas nas composições da presente invenção. As referidas variantes podem variar por tanto quanto 10-20% em identidade de sequência e ainda reterem as características antigênicas que as tornam úteis em composições imunogênicas. Preferivelmente, as variantes do vírus de PRRS têm pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% de identidade de sequência com a sequência genômica de comprimento total do PRRS vírus de tipo selvagem isolado. As características antigênicas de uma composição imunológica podem ser, por exemplo, estimadas por desafio experiments. Ademais, a característica antigênica de um antígeno do vírus PRRS modificado é ainda mantida quando o antígeno modificado confere pelo menos 70%, preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90% de imunidade de proteção em comparação com o antígeno do vírus PRRS de tipo selvagem.

[00118] Em uma modalidade, o componente antígeno do vírus PRRS é um vírus vivo geneticamente modificado que é incluído nas composições da presente invenção a um nível de pelo menos $2,1 \leq \text{TCID}_{50} \leq 5,2$, em que TCID_{50} é a dose de cultura de tecido infeccioso 50% determinada por quantificação de antígeno (teste de potência in vitro)

[00119] O componente de antígeno PCV2 das composições de PCV2/M. hyo/PRRS da presente invenção pode ser na forma de um circovírus de tipo 1 - tipo 2 quimérico, o vírus quimérico incluindo um circovírus de tipo 1 de suíno recombinante inativado que expressa a proteína ORF2 do circovírus suíno do tipo 2. Em ou-

tra modalidade, o componente de antígeno PCV2 das composições de PCV2/M. hyo/PRRS da presente invenção é na forma de uma proteína ORF2 recombinante.

[00120] Antígenos PCV2 adequados para uso nas composições de PCV2/M. hyo/PRRS podem ser derivados a partir de qualquer um dos PCV2 isolados descritos acima, assim como de outros PCV2 isolados. Antígenos PCV2 adequados a serem empregados nas composições da presente invenção incluem, mas não são limitados às sequências de PCV2 descritas acima e as variantes dos mesmos.

[00121] As vacinas da presente invenção podem ser formuladas seguindo a convenção aceita para incluir veículos aceitáveis para animais, incluindo seres humanos (se aplicável), tal como tampões, estabilizantes, diluentes, conservantes, e/ou solubilizantes padrões, e podem também ser formuladas para facilitar a liberação sustentada. Diluentes incluem água, salina, dextrose, etanol, glicerol e semelhante. Aditivos para isotonicidade incluem cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol, e lactose, entre outros. Os estabilizantes incluem albumina, entre outros. Outros veículos e aditivos de vacina adequados, incluindo os que são particularmente úteis na formulação de vacinas vivas modificadas, são conhecidos ou serão aparentes daqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., 1990, Mack Publishing, que está incorporado aqui por referência.

[00122] As vacinas da presente invenção podem adicionalmente compreender um ou mais componentes imunomodulatórios adicionais tais como, por exemplo, um adjuvante ou citocina, entre outros. Tipos de adjuvantes adequados para uso nas composições da presente invenção incluem os a seguir: um adjuvante de óleo-em-água, um polímero e um adjuvante de água, um adjuvante de água-em-óleo, um adjuvante de hidróxido de alumínio, um adjuvante de vitamina E e combinações dos mesmos. Alguns exemplos específicos de adjuvantes incluem, mas não são limitado a, adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund, *Corynebacterium parvum*, *Bacillus Calmette Guerin*, gel de hidróxido de alumínio, glucano, sulfato de

dextrano, óxido de ferro, alginato de sódio, Bacto-Adjuvante, determinados polímeros sintéticos tais como poli amino ácidos e co-polímeros de amino ácidos, copolímero de bloco (CytRx, Atlanta, Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN® adjuvante, saponina, Quil A ou outra fração de saponina, lipídeo A monofosforila, e adjuvante avridina lipídeo-amina (N,N-dioctadecil-N',N'-- bis(2-hidroxietil)-propanediamina), "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), óleo de parafina, sistema adjuvante de RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), dipeptídeo muramila e semelhante.

[00123] Exemplos não limitantes de emulsões de óleo-em-água úteis para a vacina da presente invenção incluem formulações de SEAM62 modificado e SEAM 1/2. SEAM62 modificado é uma emulsão de óleo-em-água contendo 5% (volume em volume) de esqualeno (Sigma), 1% (volume em volume) de detergente SPAN® 85 (ICI Surfactants), 0,7% (volume em volume) de detergente TWEEN® 80 (ICI Surfactants), 2,5% (volume em volume) de etanol, 200 µg/mL de Quil A, 100 µg/mL de colesterol, e 0,5% (volume em volume) de lecitina. SEAM 1/2 modificado é uma emulsão de óleo-em-água compreendendo 5% (volume em volume) de esqualeno, 1% (volume em volume) de detergente SPAN® 85, 0,7% (volume em volume) de detergente Tween 80, 2,5% (volume em volume) de etanol, 100 µg/mL de Quil A, e 50 µg/mL de colesterol.

[00124] Outro exemplo de um adjuvante útil nas composições da presente invenção é óleo SP. Como usado na especificação e nas reivindicações, o termo "SP óleo" designa uma emulsão de óleo compreendendo um copolímero de bloco de polioxietileno-polioxipropileno, esqualeno, monooleato de sorbitano de polioxietileno e uma solução salina tamponada. Copolímero de bloco de polioxietileno-polioxipropilenos são tensoativos que ajudam na suspensão de componentes sólidos e líquidos. Os referidos tensoativos são oferecidos comercialmente como polímeros sob a marca registrada Pluronic®. O tensoativo preferido é poloxâmero 401 que é

oferecido comercialmente sob a marca registrada Pluronic® L-121. Em geral, a emulsão SP de óleo é uma mistura de adjuvante imunoestimulatório que irá compreender cerca de 1 a 3% volume em volume de copolímero de bloco, cerca de 2 a 6% volume em volume de esqualeno, mais particularmente cerca de 3 a 6% de esqualeno, e cerca de 0,1 a 0,5% volume em volume de monooleato de sorbitano de polioxietileno, com o restante sendo a solução salina tamponada. Em uma modalidade, a emulsão de óleo SP está presente na composição final em quantidades de volume em volume de cerca de 1% a 25%, preferivelmente cerca de 2% a 15%, mais preferivelmente cerca de 5% a 12% volume em volume.

[00125] Ainda outro exemplo de um adjuvante adequado para uso nas composições da presente invenção é o adjuvante AMPHIGEN™ que consiste de lecitina de-oleada dissolvida em um óleo, em geral parafina líquida leve.

[00126] Outros exemplos de adjuvantes úteis nas composições da presente invenção são os adjuvantes proprietários a seguir: Microsol Diluvac Forte® sistema de emulsão adjuvante dual, adjuvante Emunade, e adjuvante Xsolve. Ambos os adjuvantes Emunade e Xsolve são emulsões de óleo mineral em água leve, mas Emunade também contém alhidrogel, e acetato de D,L- α -tocoferil é parte do adjuvante XSolve. Ainda um exemplo adicional de um adjuvante adequado para uso nas composições da presente invenção é o adjuvante ImpranFLEX™ (um adjuvante de água-em-óleo). Ainda um exemplo adicional de um adjuvante adequado é um adjuvante com base em Carbômero (Carbopol®). Adjuvantes Carbopol® preferidos incluem o polímero Carbopol® 934 e o polímero Carbopol®941.

[00127] Em uma modalidade, o adjuvante ou mistura de adjuvantes é adicionado em uma quantidade de cerca de 100 μ g a cerca de 10 mg por dose. Em outra modalidade, o adjuvante/mistura de adjuvantes é adicionado em uma quantidade de cerca de 200 μ g a cerca de 5 mg por dose. Em ainda outra modalidade, o adjuvante/mistura de adjuvantes é adicionado em uma quantidade de cerca de 300 μ g a

cerca de 1 mg/dose.

[00128] O adjuvante ou mistura de adjuvantes é tipicamente presente na composição de vacina da presente invenção em quantidades de volume em volume de cerca de 1% a 25%, preferivelmente cerca de 2% a 15%, mais preferivelmente cerca de 5% a 12% volume em volume.

[00129] Outros "imunomoduladores" que podem ser incluídos na vacina incluem, por exemplo, uma ou mais interleucinas, interferons, ou outras conhecidas citocinas. Em uma modalidade, o adjuvante pode ser um derivado de ciclodextrina ou um polímero polianiónico, tal como os descritos nas Patentes US Nos. 6,165,995 e 6,610,310, respectivamente.

[00130] Um aspecto adicional se refere a um método para preparar uma composição imunogênica de acordo com a presente invenção. O referido método compreende i) cultivar *M. hyo* em um meio adequado por períodos que variam a partir de 18-144 horas; ii) inativar subsequentemente a cultura de *M. hyo*; iii) coletar o fluido da cultura inativada, em que o fluido da cultura inativada compreende uma preparação celular total de *M. hyo* compreendendo não só uma fração líquida solúvel mas também material celular insolúvel; iv) separar a fração líquida solúvel a partir do material celular insolúvel; v) remover substancialmente não só o IgG mas também os complexos imunes de antígeno/imunoglobulina a partir da fração líquida solúvel separada para formar uma porção solúvel da preparação de *M. hyo* celular total; e vi) combinar subsequentemente a porção solúvel da preparação de *M. hyo* celular total com um antígeno de PCV2 e um antígeno do vírus PRRS. Em algumas modalidades, a etapa vi) inclui combinar uma composição líquida pronta para usar incluindo ambos o antígeno PCV2 e a porção solúvel de *M. hyo* com um antígeno liofilizado do vírus PRRS.

[00131] Um exemplo de um meio adequado para cultivar *M. hyo* é o Caldo PPLO (base de caldo de *Mycoplasma*), que quando suplementado com elementos

de enriquecimento nutritivos, é usado para o isolamento e o cultivo de *Mycoplasma*.

[00132] Em algumas modalidades, a cultura de *M. hyo* é desenvolvida até a tardia fase de desenvolvimento, após o que a cultura é inativada. Em algumas outras modalidades, a cultura é inativada ao se elevar o pH (por exemplo, a cerca de 7,8). Isso ocorre ao se expor a produção cultura a um agente de inativação, tal como a etilenoimina binária (BEI). A BEI é gerada em situ durante a incubação de hidrobrometo de L-bromoetilamina (BEA) em uma cultura de produção. Subsequentemente, o pH da cultura inativada é neutralizado, tal como por se adicionar uma quantidade equivalente de um agente que neutraliza o agente de inativação dentro da solução. Em algumas modalidades, o agente de inativação é BEI e o agente de neutralização é tiosulfato de sódio. Em uma modalidade, o pH da cultura inativada é ajustado a cerca de 7,4 ao se adicionar tiosulfato de sódio.

[00133] Em algumas modalidades, a fração líquida solúvel da preparação de *M. hyo* celular total é separada a partir do material celular insolúvel usando métodos convencionais. Em uma modalidade, da separação é por uma etapa de filtragem. Em outra modalidade, a referida separação é por uma etapa de centrifugação. Em ainda outra modalidade, a separação é por uma etapa de precipitação.

[00134] Em uma modalidade, a fração líquida solúvel de uma preparação celular total de *M. hyo* neutralizada inativada é tratada com resina de Proteína A para substancialmente remover ambos o IgG e os complexos imunes de antígeno/imunoglobulina na mesma. Em outras modalidades, a resina de Proteína G pode ser usada para substancialmente remover ambos o IgG e os complexos imunes de antígeno/imunoglobulina contidos na fração líquida solúvel. Métodos para remover não só o IgG mas também os complexos imunes de antígeno/imunoglobulina seja com as resinas de Proteína A ou com Proteína G são bem conhecidos na técnica.

[00135] De acordo com um aspecto adicional, o método para preparar uma composição imunogênica trivalente de acordo com a presente invenção compreende

preparar o antígeno M. hyo solúvel como descrito acima e misturar o referido com um antígeno de PCV2, um antígeno do vírus PRRS, um adjuvante adequado, e um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis. O referido método opcionalmente inclui combinar o antígeno PCV2 e o antígeno M. hyo solúvel para formar uma composição divalente e subsequentemente adicionar a referida composição divalente a um antígeno monovalente da composição de vírus PRRS para formar uma composição trivalente.

[00136] Um aspecto adicional da presente invenção se refere a um kit. Um “kit” se refere a uma pluralidade de componentes que são agrupados. Em uma modalidade, um kit de acordo com a presente invenção inclui um primeiro frasco (ou outro receptáculo adequado) compreendendo a composição incluindo ambos um antígeno de PCV2 e a porção solúvel da preparação celular total de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), em que a porção solúvel da preparação de M. hyo é substancialmente livre de ambos (i) IgG e (ii) complexos imunes de antígeno/imunoglobulina; e um segundo frasco compreendendo antígeno do vírus PRRS. Em uma modalidade, o kit adicionalmente inclui um manual de instruções.

[00137] Em algumas modalidades, a combinação de PCV2/M. hyo no primeiro frasco do kit é proporcionada como uma composição líquida pronta para usar. Em modalidades adicionais, o antígeno do vírus PRRS é na forma de a vírus vivo geneticamente modificado que é proporcionado em um estado liofilizado. Em referidos casos, o manual de instruções irá incluir as direções para a reidratação do componente vírus de PRRS no segundo frasco com o conteúdo líquido a partir do primeiro frasco contendo a combinação de PCV2/M. hyo. O manual de instruções também preferivelmente irá incluir as direções para administrar os conteúdos combinados a partir dos primeiro e segundo frascos ao porco.

[00138] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica de acordo com a presente invenção é administrada a porcos tendo anticorpos derivados da

mãe contra pelo menos um de vírus de M. hyo, PCV2 e PRRS. Em outras modalidades, uma composição imunogênica da presente invenção é administrada a porcos tendo anticorpos derivados da mãe contra vírus de M. hyo, PCV2 e PRRS.

[00139] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica trivalente de acordo com a presente invenção é administrada a um leitão de idade de 3 semanas ou mais velhos. Entretanto, é contemplado que a composição de vacina trivalente de acordo com a presente invenção pode também ser usada para revacinar porcas novas pré-desmame. Como é conhecido na técnica, uma porca nova é um porco fêmea que nunca esteve prenha. As porcas novas vacinadas passarão os anticorpos derivados da mãe a seus recém-nascidos que estão mamando por meio do colostro.

[00140] É adicionalmente contemplado que a vacina trivalente de acordo com a presente invenção pode ser usada para anualmente revacinar a criação de rebanhos. Preferivelmente, a vacina trivalente de acordo com a presente invenção é administrada a porcos (por exemplo, leitões ou porcas novas) em uma dose. Em uma modalidade, a vacina multivalente de acordo com a presente invenção não requer a mistura das vacinas monovalentes separadas PCV2 e de M. hyo antes da administração, isto é, o componente PCV2/M. hyo é proporcionado como uma formulação pronta para uso contida em um frasco. Em outra modalidade, a formulação multivalente requer a mistura de uma vacina PCV2/M. hyo divalente contida em um primeiro frasco com a vacina monovalente de PRRS contida em um segundo frasco. Opcionalmente, antígenos adicionais podem ser adicionados a qualquer um dos referidos frascos.

[00141] Em algumas modalidades, o início da imunidade é a partir de 2-3 semanas pós-vacinação com a composição de vacina trivalente de acordo com a presente invenção. Em outras modalidades, a duração da imunidade é cerca de 17-23 semanas pós-vacinação com a composição de vacina trivalente de acordo com a

presente invenção.

[00142] A seguir exemplos de determinados materiais prefridos e de procedimentos de acordo com a presente invenção. Entretanto, deve ser entendido que os referidos exemplos são proporcionados apenas por meio de ilustração, e nada nos mesmos deve ser considerado uma limitação do âmbito geral da presente invenção.

Exemplos

Exemplo 1: Métodos de produção de *Mycoplasma hyopneumoniae* para antígeno de *M. hyo* combinável com PCV2

Fermentação e Inativação de *M. hyo*

[00143] Meio para semear em escala e produção de antígeno foi preparado como a seguir. Caldo de Organismo similar a Pleuropneumonia derivado de coração de suíno (PPLO) (BD Biosciences catálogo No. 21498) foi produzido de acordo com as direções do fabricante (isto é, 21g/L) e solução de extrato de levedura foi produzida a 21g/L em USP. A solução de extrato de levedura foi então adicionada ao PPLO a 6,25% e a mistura foi esterilizada por aquecimento a 121°C por ≥ 30 minutos. Hidrocloreto de cisteína foi preparado a 90g/L e esterilizada por filtração. Uma solução de dextrose foi produzida ao se adicionar 450 g de dextrose por litro de água USP seguido por esterilização a calor. Para preparar o meio final, soro de suíno foi adicionado ao meio de base a 10% seguido por cisteína a 0,01% e dextrose a 1,0%. O meio foi inoculado com a 10% volume em volume de uma cultura de fase de log de *M. hyopneumoniae* (cepa P-5722-3). A cultura foi mantida a 37°C e pH e dO foram mantidos a 7,0 e 25%, respectivamente. No desenvolvimento de fase de log tardia, a cultura foi inativada por etilenoimina binária (BEI), um composto aziridina, produzido a partir de hidrobrometo de 2-bromoetilamina. Especificamente, a inativação ocorreu ao se elevar o pH a 7,8 ao se adicionar hidrobrometo de 2-bromoetilamina (BEA) a uma concentração final de 4 mM e incubação por 24 horas.

A BEI foi neutralizada pela adição de tiosulfato de sódio a uma proporção molar de 1:1 seguida por mais 24 horas adicionais de incubação. O fluido da cultura inativada foi mantido a 2-8°C até processamento adicional.

Exemplo 2: Métodos de Produção de Circovírus suíno (cPCV)1-2 Quimérico

[00144] O cPCV1-2 foi construído por clonagem do gene de capsídeo imunogênico do circovírus patogênico de suíno tipo 2 (PCV2) na estrutura genômica do circovírus não patogênico de suíno tipo 1 (PCV1). O procedimento para a construção do clone de DNA quimérico é descrito, por exemplo, na Patente US No. 7,279,166, que está aqui incorporada por referência em sua totalidade. Um estoque infeccioso do vírus quimérico foi adquirido da Dr. X. J. Meng, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, e foi usado para infectar 15 células (PK) de rim de suíno desenvolvidas em meio Essencial Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 0,05% de hidrolisado de lactalbumina (LAH), 30 µg/mL de sulfato de gentamicina, e 5% de soro bovino fetal. As 15 células PK infectadas por cPCV1-2 resultantes foram adicionalmente expandidas por passar em série mais quatro vezes usando o mesmo meio de desenvolvimento exceto com 2-3% de soro bovino fetal. A quinta passagem foi congelada, rapidamente resfriada e filtrada, e os lisados resultantes foram usados para preparar uma semente pré-master e a subsequente semente master.

[00145] O meio que foi usado para produzir sementes de vírus foi o mesmo que o usado na produção do estoque de vírus. Para o meio de desenvolvimento, MEM, OptiMEM, ou equivalente é o meio basal que pode ser usado para a plantação da linhagem celular PK-15 para desenvolvimento. O meio de desenvolvimento pode ser suplementado com até 10% de soro bovino, até 0,5% de hidrolisado de lactalbumina, até 0,5% de albumina de soro bovino, e até 30 µg/mL de gentamicina. Para o meio de propagação do vírus, MEM, OptiMEM, ou equivalente é usado. O meio de propagação do vírus pode ser suplementado com até 0,5% de hidrolisado de lactal-

bumina, até 2% de soro bovino, até 0,5% de albumina de soro bovino, e até 30 µg/mL de gentamicina. Até 5 g/L de glicose e até 5 mmol/L de L-glutamina pode ser adicionada a the meio de desenvolvimento e/ou o meio de propagação do vírus conforme necessário para sustentar as células.

[00146] O vírus semente cPCV1-2 master são adicionados a uma suspensão celular de 15 células-PK e adsorvido por até 3 horas. O vírus semente é diluído em meio de desenvolvimento basal para proporcionar uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 - 0,0001.

[00147] As culturas de 15 células-PK são inicialmente inoculadas ao se trabalhar o vírus semente no momento de plantação da célula, ou quando as células alcançam aproximadamente 20% a 50% de confluência. A referida passagem inicial pode ser referida como “Método de infecção em uma etapa” para a produção de estoque de antígeno, ou pode ser adicionalmente usado para passagens em série. Para as passagens em série, as 15 células-PK infectadas com cPCV1-2 são adicionalmente expandidas até a passagem 7 por divisões em série a uma proporção de 1:5 - 20 para a propagação do vírus. O meio de cultura contendo uma suspensão celular infectada a partir da passagem anterior serve como material de semente para a próxima passagem. As células infectadas com cPCV1-2 são incubadas por três (3) a 14 dias para cada passagem a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ quando as células alcançam $\geq 90\%$ de confluência. O vírus cPCV1-2 causa mudanças citopáticas capazes de serem observadas durante a replicação viral. Na coleta, o arredondamento das células e resíduos consideráveis flutuando são observados. As culturas são também observadas evidência visual de contaminação bacteriana ou fúngica. O tempo de incubação entre as coletas para o antígeno cPCV é proporcionado na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1 Tempos mínimo e máximo para Coletar Antígeno cPCV

Método	Mínimo / Máximo Time	Faixa de temperatura
Infecção em uma etapa	5 a 16 dias	$36 \pm 2^\circ\text{C}$
Passagem em série (MSV + 3 a MSV + 7)	16 a 36 dias	$36 \pm 2^\circ\text{C}$

[00148] Os fluidos de cultura de cPCV1-2 são coletados em frascos estéreis

e são amostrados para teste de micoplasma usando métodos conhecidos. Múltiplas coletas podem ser conduzidas a partir de frascos de rolo, bioreatores e frascos de perfusão.

[00149] Antes da inativação dos vírus cPCV1-2 coletados, um ou mais lotes de antígeno podem ser concentrados (por exemplo, até 60X) por ultrafiltração. Os concentrados podem ser lavados com solução salina equilibrada para reduzir as proteínas do soro.

[00150] O método de inativação, atenuação, ou desintoxicação do vírus cPCV1-2 será agora descrito. Após a concentração do antígeno cPCV, *Beta*-propiolactona (BPL) é adicionada ao material agrupado cPCV1-2 viral para se obter uma concentração aproximada de 0,2% volume em volume. Os fluidos virais agrupados são então agitados por um mínimo de 15 minutos e então o volume de fluidos de antígeno de inativação é transferido a um segundo frasco estéril. Os fluidos de antígeno transferidos são mantidos a 2 - 7°C, com constante agitação, por um mínimo de 24 horas. Após um mínimo de 24 horas, uma segunda adição de 0,2% de volume em volume de BPL é adicionada à suspensão agrupada. Os conteúdos são subsequentemente agitados, transferidos a um terceiro frasco, e mantidos a 2 - 7°C, com constante agitação, por um tempo adicional de não menos do que 84 horas. Em geral, o tempo de inativação total não é menos do que 108 horas e não mais do que 120 horas. Um método de inativação é resumido na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 Método de Inativação

Inativante	Concentração Final	Faixa de temperatura	Tempo em Hora (Min/Max)
<i>Beta</i> -propiolactona (BPL)	0,4% volume em volume (adição de 2 x 0,2% volume em volume)	2 – 7°C (w/Agitação)	108 - 120

[00151] A inativação é terminada pela adição de uma concentração final de não mais do que 0,1 M de solução de tiosulfato de sódio. O pH do estoque de antígeno inativado é ajustado a cerca de 6.8 usando NaOH ou HCl. Em seguida da inativação, uma amostra representativa é obtida a partir do grupo e testada para a con-

clusão da inativação. O produto de antígeno cPCV1-2 inativado é padronizado por ir de encontro a um alvo maior do que 1,0 RP como medido via potência de ELISA.

Exemplo 3: Processamento à jusante de antígenos de M. hyo e Teste Analítico dos referidos Antígenos Processados

Processamento à jusante de antígenos M. hyo:

[00152] Fluido de fermentação inativado (preparado como descrito acima no Exemplo 1) foi tratado para cada grupo indicado como a seguir. Os referidos antígenos de M. hyo processados foram empregados no Exemplo 4 abaixo.

[00153] T02: (Volume total) Não processado.

[00154] T03: (10X UF concentrado) Concentrado via filtração de fluxo tangencial via uma membrana de corte de peso molecular 100 KDa (fibra oca). Redução de volume final foi igual a 10X.

[00155] T04 & T05: (10X UF concentrado & centrifugado) Células de micoplasma concentrado (a partir de T03) foram coletadas e lavadas uma vez com PBS por meio de centrifugação a ~20,000 xg (Sorvall model RC5B).

[00156] T06 & T07: (10X centrifugado) O fluido de fermentação inativado foi centrifugado a ~20,000 xg (Sorvall RC5B) e lavado uma vez por resuspensão das células em PBS seguido por uma centrifugação adicional. A redução de volume final foi igual a 10X.

[00157] T08: (10X centrifugado & Aquecido) As células de micoplasma foram concentradas e lavadas por T06 e aquecidas a 65°C por 10 minutos.

[00158] T09: (Sobrenadante livre de células) Sobrenadante coletado a partir da primeira centrifugação como descrito para T06 foi esterilizado por filtração através de um filtro de 0,2 micron (Nalgene).

[00159] T10: (Sobrenadante livre de células-Proteína-A tratada) Sobrenadante estéril (preparado por T09) foi misturado com resina de Proteína A (Proteína A Sepharose, Pharmacia Inc) a uma proporção de volume de 10:1 por 4 horas. A resi-

na foi removida por filtração estéril e o fluido filtrado foi armazenado a 2-8°C. O referido processo usa tratamento “à jusante” pós fermentação com a proteína A para remover anticorpos e complexos imunes. Embora a presente invenção não evite o tratamento à montante com proteína A, os presentes inventores observaram que no caso de M. hyo, o tratamento à montante com proteína A do meio de desenvolvimento conduziu a resultados de p46 que foram mais baixos e inconsistentes em comparação com o meio não tratado (dados não mostrados).

Teste Analítico de Antígenos de M. hyo Processados à jusante

[00160] As preparações de antígenos de M. hyo processados à jusante (preparadas como descrito acima) foram testadas quanto a recuperação de antígeno p46 específico de M. hyo, e quanto a presença de anticorpo de PCV2. Adicionalmente, as referidas preparações de antígenos de M. hyo foram testadas quanto a presença de Torque Teno Vírus (TTV), incluindo genótipo 1 (g1TTV) e genótipo 2 (g2TTV). Os resultados são apresentados abaixo na Tabela 3.

Tabela 3 Caracterização de Antígenos M. hyo Processados à jusante

Tratamento	Volume de M. hyo	PCV2 ab	qPCR DNA	
	p46 RU/mL	Relação de S/P	g1TTV	g2TTV
Volume total	809	0,248	1,00E + 03	1,78E + 03
10x UF concentrado	6666	0,819	1,00E + 03	9,94E + 03
10x UF conc. + Centrifugado	614	0,019	0	0
10x Centrifugado	763	-0,015	1,90E + 02	1,91E + 02
10x Centrifugado + Aquecido	690	-0,012	0	2,07E + 02
Sobrenadante livre de células	719	0,242	4,20E + 02	3,23E + 03
Sobrenadante livre de células (Prot A)	826	-0,014	0	2,06E + 03

[00161] Com referência to tabela 3 acima, a recuperação do antígeno p46 específico de M. hyo foi demonstrada para cada uma das preparações de antígenos processadas à jusante de M. hyo. Adicionalmente, os tratamentos a seguir removeram com sucesso o anticorpo de PCV2: 10X UF concentrado & centrifugado, 10x centrifugado, 10X centrifugado & aquecido e Sobrenadante livre de células (Proteína-A tratada). Com relação a TTV, os tratamentos a seguir removeram com su-

cesso g1TTV: 10X UF concentrado & centrifugado, 10x centrifugado & aquecido e Sobrenadante livre de células (Proteína-A tratada). Apenas o tratamento designado 10X UF concentrado & centrifugado removeu g2TTV. Torque teno vírus isolados, incluindo genótipos 1 e 2 são descritos em US 20110150913, que está aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[00162] Uma vez que é conhecido na técnica que a Proteína A se liga a IgG, é entendido por aqueles versados na técnica que não só o anticorpo de PCV2, mas outros anticorpos de suínos, incluindo anticorpo de PRRS, anticorpo de HPS, e anticorpo de SIV serão efetivamente removidos pelo tratamento com Proteína-A. Isso torna o sobrenadante de M. hyo tratado com Proteína-A livre de células da presente invenção compatível não só com antígeno de PCV2, mas também com outros antígenos de suíno em virtude da falta de interferência imunológica entre os antígenos. Adicionalmente, a remoção dos resíduos de células não protetores e a remoção de imunoglobulina e complexos de antígeno/imunoglobulina é razoavelmente esperada para tornar uma vacina mais segura.

Exemplo 4: Preparação de formulações experimentais de vacina de M. hyo

[00163] Todas as vacinas de M. hyo experimentais foram formuladas com uma concentração final de 5% de adjuvante Amphigen. Adicionalmente, todas as vacinas foram padronizadas com a p46 ELISA e preservadas com timerosol. As formulações experimentais de vacina foram preparadas com antígenos de M. hyo processados de acordo com os tratamentos T02-T10 acima. Adicionalmente, o Tratamento T01 corresponde a um placebo (em antígeno de M. hyo, apenas 5% de adjuvante Amphigen) enquanto que o Tratamento T11 é um controle positivo que corresponde a uma vacina de M. hyo com base bacteriana expirada (RespiSure-ONE®, Pfizer Animal Health). As referidas formulações são descritas na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4 Formulações experimentais de vacina de M. hyo

Tratamento	IVP Serial*	Unidades p46 alvo/ds	Antígeno M. hyo (mL)	Adjuvante (mL)	Formulação Vol. (mL)
T01	123639 (Placebo)	5% de Amphigen apenas, Nenhum Antígeno			
T02	L100211A	452	279,36	250	1000
T03	L100211B	452	6,78	50	200
T04	L100211C	452	73,62	50	200
T05	L100211D	816	132,90	50	200
T06	L100211E	452	59,24	50	200
T07	L100211F	816	106,95	50	200
T08	L100211G	452	65,51	50	200
T09	L100211H	452	62,87	50	200
T10	L100211J	452	54,72	50	200
T11	A827870	Expired "RespiSure" vacina			

Produto Veterinário em Investigação (IVP) Serial

Exemplo 5: Avaliação da eficácia in vivo das vacinas de M. hyo com antígenos de M. hyo a partir de diferentes processos à jusante

[0164] O referido estudo foi conduzido para avaliar a eficácia in vivo das vacinas de *Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo) com antígenos de M. hyo a partir de diferentes processos à jusante (DSP). Porcos com 3 semanas de idade foram inoculados por via intramuscular com uma única dose das diferentes formulações de vacina descrita na Tabela 4 acima. Dezeses animais foram incluídos em cada um dos grupos de tratamento. Os animais foram desafiados 21 dias após a vacinação com um M. hyo virulento isolado em campo. Os animais foram necropsiados 28 dias após o desafio e os pulmões foram removidos e pontuados para consolidação consistente com infecção por M. hyo. O principal critério para proteção contra o desafio de M. hyo foi as pontuações de consolidação do pulmão. É em geral aceite que há uma relação entre o tamanho das lesões no pulmão causadas por pneumonia enzoótica e um efeito adverso no coeficiente de desenvolvimento. A tabela 5 abaixo contém as pontuações de lesão do pulmão para os respectivos grupos de tratamento. A significância estatística foi determinada por Análise de Modelo Misturada das pontuações do pulmão para cada grupo.

Tabela 5 Resultados da Lesão no Pulmão

Tratamento	Descrição	p46 RP Alvo/ Observado	% Lesões no pulmão Transformadas de volta Meio LS	Faixa % de Pulmão com	Contraste	valor-P	Significante
------------	-----------	------------------------	---------------------------------------------------	-----------------------	-----------	---------	--------------

				Lesões			
T01	Placebo (5% de Amphigen)	N/A	11,7	1,2 – 44,3	N/A	N/A	N/A
T02	Volume total	13/15,6	1,2	0,1 – 18,5	T01 vs 02	0	Sim
T03	Volume total UF 10x	13/11,9	0,3	0,0 – 2,8	T01 vs 03	0	Sim
T04	UF 10x + Centrifugado	13/28,1	5,9	0,0 – 40,5	T01 vs 04	0,1589	Não
T05	UF 10x + Centrifugado	24/48,2	3,7	0,0 – 42,3	T01 vs T05	0,0309	Sim
T06	10x Centrifugado	13/30,4	4,7	0,0 – 23,6	T01 vs 06	0,0388	Sim
T07	10x Centrifugado	24/57,4	4,6	0,3 – 37,3	T01 vs T07	0,0323	Sim
T08	10x Centrifugado + Calor	13/17,7	4,5	0,3 – 21,7	T01 vs T08	0,0137	Sim
T09	Sobrenadante (no células)	13/14,1	1,4	0,0 – 33,0	T01 vs T09	0,0004	Sim
T10	Sobrenadante + Prot A	13/12,1	3,1	0,0 – 25,8	T01 vs T10	0,0094	Sim
T11	RSO Expirado	13/12,5	2,2	0,1 – 32,1	T01 vs T11	0,0009	Sim

[0165] Com referência à tabela 5 acima, os resultados com antígenos de *M. hyo* a partir de diferentes processos à jusante indicaram que todas as vacinas experimentais, exceto por T04, diferiram de modo significativo a partir do placebo. Os referidos resultados de lesão de *M. hyo* são ilustrados por meio dos gráficos na figura 1. Como mostrado na figura 1, T04 proporcionou resultados inaceitáveis. Todos os outros tratamentos diferiram de modo significativo a partir do placebo (T01). As pontuações de consolidação do pulmão indicaram que T02, T03 e T09-T11 proporcionaram a proteção mais eficaz contra o desafio de *M. hyo*.

[0166] A potência relativa de p46 das vacinas experimentais foi avaliada ao se usar um teste de imunoabsorção ligado a enzima de sanduiche de duplo anticorpo (DAS ELISA). Os resultados de DAS ELISA para p46 apresentados na Tabela 5 acima indicam que todas as vacinas experimentais excederam a potência alvo. Adicionalmente, a potência relativa de p46 foi ou mantida ou aumentada durante o armazenamento das vacinas por um período de um mês (dados não mostrados). Um aumento percebido na potência com o tempo foi observado em antígenos centrifugados com excessão dos antígenos que foram submetidos a calor. Embora não se tenha a intensão de estar atrelado a qualquer teoria, é provável que as “carcaças” das

células estejam se rompendo com o tempo e liberaram mais do antígeno p46 ligado a membrana no caso dos antígenos centrifugados.

Exemplo 6: Avaliação da compatibilidade das vacinas M. hyo experimentais com antígeno de PCV2

[0167] O presente estudo foi conduzido para avaliar a compatibilidade das vacinas experimentais de M. hyo com antígenos de M. hyo a partir de diferentes processos à jusante com antígeno de PCV2. As formulações experimentais de vacina de M. hyo são descritas nas Tabelas 4 e 5 acima. As potências relativas do p46 observadas para as referidas vacinas são descritas na Tabela 5 acima. As referidas vacinas experimentais de M. hyo foram cada uma das quais combinadas com o antígeno de PCV2. No referido exemplo, o antígeno PCV2 foi um vírus quimérico PCV Tipo 1-Tipo 2 (Fostera PCV) preparado como descrito acima no Exemplo 2. O vírus quimérico foi incluído nas composições a um nível inicial de cerca de $1,6 \leq RP$, em que a RP é a unidade de Potência relativa determinada por PCV2 quantificação de antígeno ELISA (teste de potência in vitro) comparado a uma vacina eficaz de referência.

[0168] As formulações de combinação de M. hyo/PCV2 experimentais foram avaliadas por PCV2 ELISA. Os resultados são apresentados na figura 2. Como mostrado na figura 2, apenas as preparações de antígeno M. hyo a partir dos processos à jusante a seguir foram compatíveis com o antígeno de PCV2: Ultrafiltração & Centrifugação (T04 & T05), Centrifugação (T06 & T07), Centrifugação mais calor (T08) e Sobrenadante tratado com Proteína A (T10). Dos referidos, o sobrenadante tratado com Proteína A de M. hyo foi o mais compatível com o antígeno de PCV2 quando comparado ao placebo de controle que incluiu o vírus quimérico e adjuvante Amphigen, mas nenhum antígeno de M. hyo. O nível de vírus PVC quimérico no sobrenadante tratado com Proteína A foi 1,5 RP em comparação com 1,69 RP para o placebo. Foi, portanto, concluído que não há nenhuma ou mínima interferência imunológica entre a preparação solúvel de antígeno de M. hyo tratado com proteína A e o an-

tígeno de PCV2 do vírus quimérico.

[0169] A eficácia *in vivo* do Sobrenadante de *M. hyo* tratado com proteína A demonstrada no Exemplo 5 acima junto com os resultados descritos no presente exemplo indicaram que o sobrenadante tratado com Proteína A foi uma plataforma potencialmente eficaz para as combinações de *M. hyo*-PCV2.

Exemplo 7: Avaliação da eficácia de PCV2 da vacina de combinação em 1-Frasco de PCV2/*M. hyo* em Diferentes formulações adjuvantes

[0170] O presente estudo foi projetado para avaliar a eficácia de PCV2 em uma vacina de combinação em 1-frasco de PCV2/*M. hyo* em diferentes formulações de adjuvante. No referido exemplo, o antígeno PCV2 foi um vírus quimérico PCV Tipo 1-Tipo 2 (Fostera PCV). O vírus quimérico foi combinado com uma preparação solúvel de antígeno *M. hyo* que foi substancialmente livre de IgG (isto é, Sobrenadante tratado com Proteína A).

Processamento dos fluidos:

[0171] A fermentação inativada de fluido de *M. hyo* (descrito acima no Exemplo 1) foi tratada para cada grupo indicado como a seguir.

[0172] T02-T04: Fluido de fermentação total contendo células vivas de *M. hyopneumoniae* (descrito acima) foi centrifugado a ~20,000 xg (Sorvall RC5B) e o sobrenadante coletado e esterilizado através de um filtro de 0,2 µM. rProtein A Sepharose (número da peça 17-5199-03, GE Healthcare) foi embalada em uma coluna de cromatografia de 1L. Após a remoção do tampão de armazenamento e o tratamento com 2 volumes de coluna de 1M de ácido acético, a resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna de 50 mM de NaPO₄/1M tampão de NaCl, pH 7,04. Aproximadamente 2 litros do antígeno *M. hyopneumoniae* clarificado/filtrado contendo fluidos foram passados através da resina de proteína A resina a um coeficiente de fluxo de 100 cm/hr. O fluxo através foi coletado e esterilizado por meio de um filtro de 0,2 µM.

[0173] T05: Esse é um controle positivo que corresponde à formulação similar a

Fostera PCV- (nenhum antígeno de M. hyo). O nível do vírus quimérico na referida formulação similar a Fostera PCV foi de aproximadamente nos níveis de formulação de dose de imunização mínima (MID). O vírus quimérico foi incluído nas Vacinas experimentais de PCV2/M. hyo em níveis de formulação similares.

[0174] Todas as vacinas experimentais PCV2/M. hyo foram formuladas com diferentes formulações de adjuvante. As formulações experimentais de vacina foram preparadas com antígenos de M. hyo processados de acordo com os tratamentos T02-T04 acima. Adicionalmente, o Tratamento T01 correspondeu a um placebo (salina estéril).

[0175] Todas as vacinas foram padronizadas com a p46 ELISA e preservadas com timerosol.

[0176] As referidas formulações experimentais são descritas na Tabela 6 abaixo, em que o símbolo * indica o antígeno M. hyo a partir de semente M. hyo global, Sobrenadante tratado com Proteína A e o símbolo ** indica Produto Veterinário em Investigação (IVP) serial.

Tabela 6 Formulações experimentais de vacina PCV2/M. hyo usadas para o estudo de eficácia de PCV2

Tratamento	IVP Serial**	PCV1-2 Ag	M Hyo* Ag	Adjuvante	Outro
T01	87-244-DK (Placebo)	NA			Salina estéril
T02	L0411RK08	1,6 RP	7,5 RP	10% de óleo SP	NA
T03	L0411RK09			5% de Amphigen	
T04	L0611RK03			5% de Amphigen + 5% de SLCD	
T05	L0611RK04		NA	20% de SLCD	

[0177] Porcos com 3 semanas de idade foram inoculados por via intramuscular com uma única dose das diferentes formulações de vacina descrita na Tabela 6 acima. Dezeses animais foram incluídos em cada um dos grupos de tratamento. Os animais foram desafiados 21 dias após a vacinação com um PCV2 virulento isolado em campo.

[0178] A figura 3 é um gráfico que mostra os resultados de viremia de PCV2 (PCR Quantitativa de PCV2) observada com as diferentes plataformas de adjuvantes. É observado que viremia de PCV2 foi usada como a variável de eficácia principal. Os resultados de viremia de PCV2 são apresentados como cópias de DNA/mL. Como mostrado na figura 3, todos os tratamentos tinham significativamente menos viremia comparado ao placebo nos dias 28, 35 e 42 (desafio foi dia 21). Os 10% de óleo SP adjuvante tinham significativamente menos viremia comparado a 5% de Amphigen nos dias 28 e 35. Os 5% de Amphigen mais 5% de adjuvante SLCD tinham significativamente menos viremia comparado aos 5% de Amphigen nos dias 28 e 35. Os 20% da plataforma de adjuvante SLCD tinham significativamente menos viremia comparado aos 5% de Amphigen nos dias 28, 35 e 42.

[0179] A sorologia de PCV2, descarga fecal de PCV2, descarga nasal de PCV2, Respostas imunes Mediadas a Célula (CMI), depleção linfóide, e Imunohistoquímica (IHC) foram também monitorados como as variáveis de eficácia secundária. Os referidos resultados serão agora descritos abaixo.

[0180] A figura 4 é um gráfico que mostra os resultados de ELISA para PCV2 nos dias 1, 20 e 42 do estudo (desafio foi dia 21). O estado de cada amostra foi expresso como a amostra para a relação positiva (S/P). Como mostrado na figura 4, 20% de SLCD foi apenas o tratamento que foi significativamente diferente a partir do placebo (T01) em ambos o dia 20 e o dia 42. Também, 5% de Amphigen foi apenas o tratamento não significativamente diferente a partir do placebo no dia 20.

[0181] A figura 5 é um gráfico que mostra a descarga fecal de PCV2 obtida com os tratamentos T02-T04 vs. o placebo (T01). Os referidos resultados são expressos como cópias de DNA de PCV2/mL. Os resultados na figura 5 indicam que todos os tratamentos tinham significativamente menos descarga fecal quando comparados ao placebo no dia 42. Adicionalmente, 5% de Amphigen & 5% de SLCD (T04) tinham significativamente menos descarga fecal em comparação com 5% de Amphigen

(T03) no dia 42. No outro tratamento diferenças foram notadas.

[0182] A figura 6 é um gráfico que mostra a descarga nasal de PCV2 obtida com os tratamentos T02-T04 vs. o placebo (T01). Os referidos resultados são expressos como cópias de DNA de PCV2/mL. Os resultados na figura 6 indicam que todos os tratamentos tinham significativamente menos descarga nasal quando comparados ao placebo no dia 42. Adicionalmente, 20% de SLCD (T05) tinham significativamente menos descarga nasal comparado aos 5% de Amphigen (T03) no dia 42. No outro tratamento diferenças foram observadas.

[0183] A figura 7 (A & B) são de dois gráficos que mostram os resultados de um teste de interferon-gama (IFN- γ) que mede as respostas imunes mediadas celulares específicas para PCV2. Os resultados de CMI são mostrados pós-vacinação/pré-desafio (figura 7A), e pós-vacinação/pós-desafio (figura 7B). Nos referidos gráficos, a estimulação de 5×10^6 células foi considerada significativa (...). Todas as vacinas experimentais PCV2/M. hyo deram uma resposta detectável IFN- γ pós-vacinação. Os 10% de óleo SP (T02) orientaram a respota mais forte IFN- γ pós-vacinação. Os 20% de SLCD (T05) induziram uma resposta mais precoce, mas a resposta mais baixa no dia 20. Houve uam grande resposta em pós-desafio, especialmente observada no grupo de placebo. Adicionalmente, a resposta pós-desafio foi mais baixa nos grupos de tratamento de porco vacinado em comparação com o grupo de placebo.

[0184] A Tabela 7 abaixo mostra a depleção linfóide obtida com os tratamentos experimentais contrastados ao placebo.

Tabela 7 PCV2 Histopatologia (Depleção linfóide)

Tratamento	Depleção linfóide			Contrastado ao Placebo	
	Positivo	Negativo	% Ever Pos.	Valor-P	Significante
Placebo	9	7	56%	NA	NA
10% de óleo SP	1	15	6%	0,0059	Sim
5% de Amphigen	1	15	6%	0,0059	Sim
5% de Amph + 5% de SLCD	0	16	0%	0,0008	Sim
20% de SLCD	1	15	6%	0,0059	Sim

Os resultados apresentados na Tabela 7 acima mostram que todas as vacinas proporcionaram uma forte proteção contra depleção linfóide. Também, nenhum contraste com tratamento de vacina estatisticamente significativa foi observado.

[0185] A Tabela 8 abaixo mostra a imunohistoquímica obtida com os tratamentos experimentais contrastados ao placebo.

Tabela 8 PCV2 Histopatologia (Imunohistoquímica)

Tratamento	Imunohistoquímica			Contrastados ao placebo	
	Positivo	Negativo	% Ever Pos.	Valor-P	Significante
Placebo	12	4	75%	NA	NA
10% de óleo SP	0	16	0%	0,0001	Sim
5% de Amphigen	1	15	6%	0,0002	Sim
5% de Amph + 5% de SLCD	0	16	0%	0,0001	Sim
20% de SLCD	0	16	6%	0,0001	Sim

[0186] Os resultados apresentados na Tabela 8 acima mostram que todas as vacinas proporcionaram forte proteção contra colonização de PCV2 como evidenciado por imunohistoquímica. Também, nenhum contraste com tratamento de vacina estatisticamente significativa foi observado.

[0187] Em conclusão, os resultados apresentados no referido exemplo demonstram que a preparação solúvel de antígeno M. hyo não interfere com a eficácia de PCV2. Os resultados também mostram que todas as formulações experimentais de vacina PCV/M. hyo proporcionam eficácia contra desafio com PCV2. Adicionalmente, os resultados indicam que there há alguma diferença estatística e numérica obtida com as diferentes formulações de adjuvante, com 10% de óleo SP produzindo a eficácia mais forte.

Exemplo 8: Avaliação de M. hyo Eficácia de a combinação de vacina em 1 frasco de PCV2/M. hyo em com Diferentes formulações de adjuvante

[0188] O presente estudo foi projetado para avaliar a eficácia de M. hyo de uma combinação de vacina em 1 frasco de PCV2/M. hyo com diferentes formulações de adjuvante. O antígeno M. hyo foi combinado com Circovírus suíno (Tipo 1-Tipo 2 quimérico, ou PCV1-2, vírus exterminado) em um frasco.

Processamento de fluidos:

[0189] A fermentação inativada de fluido de M. hyo (descrito acima no Exemplo 1) foi tratada para cada grupo indicado como a seguir.

[0190] T02-T04: Os referidos tratamentos foram os mesmos que os descritos para os grupos de tratamento T02-T04 no Exemplo 7 acima.

[0191] T05: o referido foi formulado com células inativadas de M. hyo (M. hyo bacterina) como descrito no Exemplo 1 acima sob o cabeçalho de “Fermentação e Inativação”.

[0192] Todas as vacinas experimentais PCV2/M. hyo foram formuladas com diferentes formulações de adjuvante. As formulações experimentais de vacina foram preparadas com antígenos de M. hyo processados de acordo com os tratamentos T02-T04. Adicionalmente, o Tratamento T01 correspondeu a um placebo (salina estéril). O Tratamento T05 é um controle positivo que corresponde a uma vacina expirada RespiSure®, que é uma vacina com base bacteriana de M. hyo (Pfizer Animal Health).

[0193] As referidas formulações experimentais são descritas na Tabela 9 abaixo, em que o símbolo * indica o antígeno M. hyo a partir de semente M. hyo global, Sobrenadante tratado com Proteína A e o símbolo ** indica Produto Veterinário em Investigação (IVP) serial.

Tabela 9 Formulações experimentais de vacina PCV2/M. hyo usada Estudod e eficácia de M. hyo em Diferentes formulações de adjuvante

Tratamento	IVP Serial **	PCV1-2 Ag	M Hyo* Ag	Adjuvante	Outro
T01	87-244-DK (Pla- cebo)	NA			Salina estéril
T02	L0411RK08	1,6 RP	7,5 RP	10% de óleo SP	NA
T03	L0411RK09			5% de Amphigen	
T04	L0611RK03			5% de Amphigen + 5% de SLCD	
T05	A827870	Vacina Expirada “RespiSure”			

[0194] Porcos de 3 semanas de idade foram inoculados por via intramuscular com uma única dose das diferentes formulações de vacina descritas na Tabela 9 acima.

Quatorze animais foram incluídos em ambos os grupos de placebo e de 10% de óleo SP, treze animais foram incluídos no grupo de controle positivo, e dezesseis animais foram incluídos em ambos os grupos de 5% de Amphigen e 5% de Amphigen + 5% de SLCD.

[0195] Os animais foram desafiados 21 dias após a vacinação com a M. hyo virulento isolado em campo. Os animais foram necropsiados 28 dias após o desafio e os pulmões foram removidos e pontuados para consolidação consistente com infecção por M. hyo. A tabela 10 abaixo contém a pontuação de lesão do pulmão para os respectivos grupos de tratamento. A significância estatística foi determinada pela Análise de Modelo Misturada das pontuações do pulmão para cada grupo.

Tabela 10 Lesões no pulmão por M. hyo

Tratamento	# Animal	LS Média de Lesão no Pulmão	Faixa de % de Lesão no pulmão
Placebo (T01)	14	13,1%	0,1 – 50,5
10% de óleo SP (T02)	14	4,3%	0,0 – 50,8
5% de Amphigen (T03)	16	4,7%	0,0 – 38,5
5% de Amph + 5% de SLCD (T04)	16	12,0%	0,1 – 55,8
RSO Expirado (T05)	13	2,28%	0,0 – 34,5

[0196] Como indicadona Tabela 10 acima, o grupo de placebo tinha uma pontuação média de lesão no pulmão de 13,1%, em comparação com os 10% de óleo SP e 5% de Amphigen nos grupos de tratamento que tinham pontuações médias de pulmão de 4,3% e 4,7%, respectivamente. Ambos as formulações de 10% de óleo SP e de 5% de Amphigen reduziram e/ou evitaram as lesões no pulmão. Assim, as vacinas experimentais PCV/M. hyo formuladas com 10% de óleo SP ou 5% de Amphigen foram consideradas eficazes. O antígeno PCV2 pareceu não interferir com a eficácia de M. hyo das referidas formulações.

[0197] De modo diferente, o grupo de 5% de Amphigen + 5% de SLCD teve uma pontuação média de lesão no pulmão de 12,0%. O que foi um resultado inaceitável no sentido de que não foi diferente em comparação com o placebo. Consequentemente, a vacina experimental de PCV/M. hyo formulada com 5% de Amphigen + 5% de SLCD não foi considerada tão eficaz.

[0198] É observado que em virtude do reduzido número de animais e da alta variabilidade na pontuação de lesão no pulmão, nenhum efeito de tratamento estatístico pode ser conclusivamente demonstrado no referido estudo. Por essa razão, foi decidido que outro estudo seria projetado para testar a eficácia de M. hyo das formulações experimentais de PCV/M. hyo em 10% de óleo SP. Esse estudo repetido é apresentado no Exemplo 9 abaixo.

Exemplo 9: Avaliação de Eficácia de M. hyo da combinação de vacina em 1 frasco de PCV2/M. hyo em 10% de óleo SP

[0199] O presente estudo é uma prova de conceito projetado para avaliar a eficácia da fração M. hyo de quatro vacinas experimentais PCV2/M. hyo (Serials L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 e L0711RK14 na Tabela 11 abaixo) preparadas por diferentes processos de fabricação M. hyo que utilizam Proteína A para a remoção de IgG comparado às vacinas de controle preparadas com o processo de fabricação padrão de M. hyo. Cada uma das referidas quatro vacinas experimentais PCV2/M. hyo incluiu 10% de óleo SP como o adjuvante.

Processamento de fluidos:

[0200] T02: Antígeno de *M. hyopneumoniae* inativado como descrito em “Fermentação e Inativação” no Exemplo 1 acima.

[0201] T03 e T04: Formuladas com células inativadas de *M. hyopneumoniae* como descrito em “Fermentação e Inativação” no Exemplo 1 acima.

[0202] T05: Tratamento com proteína A de meio usado para desenvolver *M. hyopneumoniae*. PPLO (derivado de coração de suíno) foi produzido de acordo com as direções do fabricante (isto é, 21g/L) e solução de extrato de levedura foi produzida a 21g/L em USP. Solução de extrato de levedura foi adicionada ao PPLO a 6,25% e a mistura foi esterilizada por aquecimento a 121°C por \geq 30 minutos. Hidroclorato de cisteína foi preparado a 90g/L e esterilizado por filtração. Solução de dextrose foi produzida ao se adicionar 450 g de dextrose por litro de água USP seguida por este-

rilização a calor. Para preparar o meio final, soro de suíno foi adicionado ao meio de base a 10% seguido por cisteína a 0,01% e dextrose a 1,0%. Os anticorpos no meio PPLO completo foram removidos por tratamento com proteína A. Em suma, um litro de rProtein A Sepharose (número da peça 17-5199-03 GE Healthcare) foi embalado em uma coluna de vidro (10 X 11,5 cm). Após a remoção do tampão de armazenamento, a coluna foi tratada com 2 volumes de coluna de 1M de ácido acético. A resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna de 50 mM de NaPO₄, 1M de tampão de NaCl (pH 7,0). Quinze litros de meio PPLO completo foi abastecido na resina a um coeficiente de fluxo linear de 140 cm/hora. Um fluxo de coluna foi coletado e esterilizado por filtração através de um filtro de 0,2 micron (Sartorius). O meio tratado foi usado para propagar células de *M. hyopneumoniae* como descrito em “Fermentação e Inativação” acima. A cultura total inativada (incluindo células) foi formulada na vacina final.

[0203] T06: Células inativadas de *M. hyopneumoniae* foram preparadas como descrito em “Fermentação e Inativação” no Exemplo 1 acima. O fluido de fermentação inativado foi centrifugado a ~20,000 xg (Sorvall RC5B) por 30 min. e o sobrenadante foi esterilizado por meio de 0,2 µM de filtração. Cento e quinze mls de resina de rProteína A (número da peça 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) foi embalada em uma coluna de cromatografia (5 x 6 cm). Após a remoção do tampão de armazenamento e o tratamento com 2 volumes de coluna de 1M de ácido acético, a resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna de 50 mM de NaPO₄/1M de tampão de NaCl, pH 7,01. Aproximadamente 1,2 litros de the antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificado/filtrado contendo fluidos foram passados através da resina a um coeficiente de fluxo de 120 cm/hr. O fluxo através foi coletado e esterilizado por meio de um filtro de 0,2 µM.

[0204] T07: células inativadas de *M. hyopneumoniae* foram preparadas como descrito em “Fermentação e Inativação” no Exemplo 1 acima. O fluido de fermentação

inativado foi clarificado por filtração de fluxo tangencial. Em suma, um filtro de poliéter sulfona (GE HealthCare, número da peça 56-4102-71) com tamanho de poro nominal de 0,2 µm foi sanitizado com 0,5N de solução de hidróxido de sódio seguido por extenso enxágue com água USP estéril. Fluido de cultura de micoplasma inativado foi introduzido ao aparelho a um coeficiente de recirculação direcionado a 14,6L/minuto e uma pressão de transmembrana de 2-3,4 PSI. A clarificação foi realizada a temperatura ambiente. O permeado do filtro foi coletado e armazenado a 2-8°C até processamento adicional. Cento e quinze mls de resina de rProtein A (número da peça 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) foi embalada em uma coluna de cromatografia (5 x 6 cm). Após a remoção do tampão de armazenamento e do tratamento com 2 volumes de coluna de 1M de ácido acético, a resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna de 50 mM de NaPO₄/1M tampão de NaCl, pH 7,01. Aproximadamente 2,3 litros de antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificado/filtrado contendo fluidos foram passados através de uma resina a um coeficiente de fluxo de 120 cm/hr. O fluxo através foi coletado e esterilizado por meio de um filtro de 0,2 µm.

[0205] T08: Células inativadas de *M. hyopneumoniae* foram preparadas como descrito em “Fermentação e Inativação” acima. O fluido de fermentação inativado foi centrifugado a ~20,000 xg (Sorvall RC5B) por 30 min. e o sobrenadante foi esterilizado via 0,2 µm de filtração. Cento e quinze mls de rProtein A Sepharose (número da peça 17-5199-03 GE Healthcare) foi embalada em uma coluna de cromatografia (5 x 6 cm). Após a remoção do tampão de armazenamento e do tratamento com 2 volumes de coluna de 1M de ácido acético, a resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna de 50 mM de NaPO₄/1M tampão de NaCl, pH 7,01. Aproximadamente 1,2 litros do antígeno de *M. hyopneumoniae* clarificado/filtrado contendo fluidos foram passados através da resina a um coeficiente de fluxo de 120 cm/hr. O fluxo através foi coletado e esterilizado por meio de um filtro de 0,2 µm.

[0206] As formulações experimentais de vacina foram preparadas com antígenos

de *M. hyo* processados de acordo com os tratamentos T02-T08 acima. T02, T03 e T04 correspondem aos controles positivos. Adicionalmente, o Tratamento T01 corresponde a um placebo (salina estéril).

[0207] As referidas formulações experimentais são descritas na Tabela 11 abaixo. O antígeno *M. hyo* corresponde ao antígeno *M. hyo* a partir da semente global *M. hyo*, sobrenadante tratado com Proteína A. A informação na coluna de “Tratamento com proteína A” indica se o sobrenadante de *M. Hyo* foi tratado com Proteína A seja antes ou após a fermentação.

Tabela 11 Formulações experimentais de vacina PCV2/*M. hyo* usadas para o estudo de eficácia de *M. hyo* em óleo SP Adjuvante

Tratamen- to	No. De série	PCV1-2 Aq	M. hyo Aq	Trata- mento com pro- teína A	Método de Clarificação do Sobrena- dante	Proteína A Brand	Adju- vante	Outro
T01	L0311AS1 1	NA						Salina estéril
T02	A828718	NA	13	RespiSure Expired One			Amphi- gen	NA
T03	L0711RK0 9	1,5 RP	7,5 RP	M. hyo sem Tratamento com proteína A e com PCV-2			10% de óleo SP	
T04	L0711RK1 0	NA		M. hyo sem Tratamento com proteína A e sem PCV-2				
T05	L0711RK1 1	1,5 RP		Antes	NA	Sepharose		
T06	L0711RK1 2			Após	Centrifuga	MABSelect		
T07	L0711RK1 3			Após	Filter	MABSelect		
T08	L0711RK1 4			Após	Centrifuga	Sepharose		

[0208] Porcos com 3 semanas de idade foram inoculados por via intramuscular com uma única dose das diferentes formulações de vacina descritos na Tabela 11 acima. Houveram 18 porcos incluídos em cada grupo de tratamento.

[0209] Os animais foram desafiados 21 dias após a vacinação com a *M. hyo* virulento isolado em campo. Os animais foram necropsiados 28 dias após desafio e os pulmões foram removidos e pontuados para consolidação consistente com infecção por *M. hyo*. A figura 8 (A & B) mostram a pontuação de lesão do pulmão para os

respectivos grupos de tratamento. A significância estatística foi determinada pela Análise de Modelo Misturada das pontuações do pulmão para cada grupo.

[0210] Os resultados de lesão no pulmão ilustrados nas Figures 8A e 8B indicam que de todos os tratamentos, apenas dois (T07 e T08) tinham 100% de porcos na categoria de <5% de lesão no pulmão. É observado que uma forte diferença estatística foi observada no referido estudo.

[0211] Os resultados no presente exemplo demonstram uma significativa eficácia de M. hyo na formulação experimental em 1 frasco de PCV2/M. hyo que emprega o sobrenadante de M. hyo tratado com proteína A e utilizando óleo SP como o adjuvante. Adicionalmente, Exemplo 7 acima demonstrou a eficácia de PCV2 em uma formulação em 1 frasco de PCV2/M. hyo que emprega o sobrenadante de M. hyo tratado com proteína A e utilizando óleo SP como o adjuvante. Juntas, ambas as eficácias de M. hyo e PCV2 foram demonstradas na combinação em 1 frasco de PCV2/M. hyo que emprega o sobrenadante de M. hyo tratado com proteína A.

Exemplo 10: Segurança in vivo de Vacinas experimentais de PCV2/M. hyo

[0212] O presente estudo foi conduzido para avaliar a segurança *in vivo* das vacinas experimentais PCV2-M. hyo formuladas em máxima dose de antígeno em várias formulações adjuvantes no hospedeiro animal quando dadas na idade bem jovem (3 semanas de idade). Diferentes plataformas de adjuvantes foram avaliadas de modo a determinar quais das referidas platforms proporciona um perfil de segurança aceitável com base em temperatura, reações do campo de injeção e observações clínicas. A formulação de 20% de SLCD/10% de óleo SP foi usada como o controle positivo (“não seguro”) em virtude dos itens históricos com as reações do campo de injeção observados pelo referido grupo investigativo e outros.

Processamento de fluidos:

[0213] Todas as vacinas foram preparadas com antígeno de *M. hyopneumoniae* inativado como descrito em “Fermentação e Inativação” no Exemplo 1. O volume de

antígeno M. hyo foi usado uma vez que o mesmo foi conhecido por conter antígeno solúvel e insolúvel de M. hyos, além das imunoglobulinas e dos complexos imunes que seriam removidos com tratamento com proteína A. É razoável se concluir que a remoção de resíduos de célula insolúvel e imunoglobulinas e complexos imunes apenas adicionalmente aumentarão a segurança das formulações de vacina. A intensão do presente estudo foi de testar rigorosamente a segurança das várias formulações de adjuvante contendo antígeno de PCV2 e antígeno de M. hyo. The PCV2 e antígenos de M. hyo foram formuladas em máximos níveis de liberação para adicionalmente avaliar a segurança. As referidas formulações experimentais são descritas na Tabela 12 abaixo. IVP indica Produto Veterinário em Investigação (IVP).

Tabela 12 Formulações experimentais de vacina PCV2/M. hyo usada para estudo de segurança

IVP Serial	PCV1-2 Ag	M Hyo* Ag	Adjuvante	Outro	Mínimo vacina Vol. (mL)
87-244-DK (Placebo)	NA			Salina estéril	NA
L0411RK15	7.8 RP	13 RP	10% de Óleo SP	NA	200
L0411RK16			5% de Amphigen		200
L0611RK05			5% de Amphigen + 5% de SLCD		200
L0611RK06			20% de SLCD + 10% de Óleo SP		200

* M hyo antígeno = a partir de semente M. hyo global (volume total antígeno).

[0214] Os parâmetros de segurança empregados no presente estudo foram o perfil de temperatura retal e a reação do campo de injeção. Os resultados do presente estudo indicaram que todas as plataformas candidatas de adjuvantes proporcionaram um perfil de segurança aceitável em termos de perfil de temperatura retal e observações clínicas (resultados não mostrados). Apenas os 20% de SLCD + 10% de óleo SP (isto é, controle positivo) foi significativamente diferente do que a vacina de placebo e teve um número de reação severa do campo de injeções (resultados não mostrados).

Exemplo 11: Preparação de antígeno de M. hyo Tratado com Proteína A para estu-

dos pivotaís

[0215] A figura 9 é um gráfico de fluxo que mostra uma modalidade de um processo de fabricação usado para preparar Antígeno de *M. hyo* tratado com proteína A compatível com PCV2. Culturas totais inativadas de *M. hyo* foram clarificadas de células por meio de filtração de fluxo tangencial. Em suma, um filtro de poliéter sulfona (GE Healthcare, número da peça 56-4102-49) com tamanho de poro nominal de 0,45 µm foi sanitizado com 0,5N de solução de hidróxido de sódio seguido por extenso enxágue com água USP estéril. Fluido de cultura de micoplasma inativado foi introduzido no aparelho a um coeficiente de recirculação direcionado a 11,0 L/minuto e uma pressão de transmembrana de ~5 PSI. A clarificação foi realizada a temperatura ambiente. Permeado do filtro foi coletado e armazenado a 2-8°C até processamento adicional.

[0216] Em seguida da clarificação, antígeno contendo fluidos foi tratado com resina de proteína A para reduzir os níveis de anticorpo. Em suma, a resina de proteína A MAbSelect (GE Healthcare) foi embalada em uma coluna de vidro a uma altura de 12 cm. A resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna de 50 mM de fosfato de sódio, 250 mM de tampão de NaCl (pH 7,0). Antígeno contendo fluido, equivalente a 10 volumes de coluna, foi abastecido na resina a um coeficiente de fluxo linear de 100 cm/hora. O fluxo de coluna foi coletado e esterilizado por filtração através de um filtro de 0,2 micron. A regeneração da coluna foi alcançada por fluir 3 volumes de coluna de 25 mM de solução de acetato a pH 3,7 seguido por 4 volumes de coluna de 1M de solução de ácido acético. Anticorpos Anti-PCV2 e os níveis de antígeno de *M. hyopneumoniae* foram medidos no fluido de antígeno final por meio de anticorpo ELISA específico para PCV2 e p46 quantificação de antígeno ELISA, respectivamente.

Exemplo 12: Avaliação de atividade virucida contra vírus de PRRS

[0217] Os estudos apresentados no referido exemplo foram projetados para avaliar

as várias plataformas de adjuvantes para a atividade virucida contra vírus de PRRS. Os experimentos iniciais se focalizaram no adjuvante isoladamente (isto é, as formulações não contêm PCV ou antígeno de M. hyos). A evolução do adjuvante para a atividade virucida PRRS é apresentada na figura 10. A avaliação preliminar virucida indicou que 10% de óleo SP, 0,2% de Carbopol e 2,5% de Amphigen não são virucidas para o vírus de PRRS. De modo diferente, os 20% de adjuvante SLCD pareceram ser virucidas ao vírus de PRRS.

[0218] Estudos adicionais foram realizados para avaliar se as formulações de PCV/M. hyo com adjuvante com as diferentes plataformas de adjuvantes não foram virucidas ao vírus de PRRS. Os referidos resultados são apresentados na Tabela 13 abaixo, em que o símbolo * indica as vacinas seriais que foram virucidas ao vírus de PRRS.

Tabela 13 Resultados do teste de PRRS Virucida com Diferentes formulações

Vacina Serial usada em estudos dos Exemplos 7, 8, 10		Serial #	Potência		PRRS Virucida	
Estudo	Descrição		p46 RP (ru/ds)	PCV2 NVSL RP	A	B
Exemplos 7, 8, 10	Salina estéril (0,9% Cloreto de sódio)	87-244-DK (Placebo)				
Exemplos 7, 8	cPCV (RP 1,6) + M Hyo Prot A tratada (RP 7,5) em 10% de óleo SP	L0411RK08	7.1	1,29	-0,10	-0,13
Exemplos 7, 8	cPCV (RP 1,6) + M Hyo Prot A tratada (RP 7,5) em 5% de Amphigen	L0411RK09	7.3	1.33	-0,10	+ 0,14
Exemplos 7, 8	cPCV (RP 1,6) + M Hyo Prot A tratada (RP 7,5) em 5% de Amph + 5% de SLCD	L0611RK03	6.9	1.15	-0,36	-0,33
Exemplo 7	cPCV (RP 1,6) monovalent em 20% de SLCD	L0611RK04		1,50	-1.86*	-0,50
Exemplo 8	RespiSure expiradom serial	A827870	12.6			
Exemplo 10	cPCV (RP 7,8) + M Hyo Volume total (RP 13,3) em 10% de óleo SP	L0411RK15	14	1,03	-0,32	-0,03
Exemplo 10	cPCV (RP 7,8) + M Hyo Volume total (RP 13,3) em 5% de Amphigen	L0411RK16	15,5	1.12	-0,36	-0,53
Exemplo 10	cPCV (RP 7,8) + M Hyo Volume total (RP 13,3) em 5% de Amph + 5% de SLCD	L0611RK05	17,5	1,50	-0,54	-0,33
Exemplo 10	cPCV (RP 7,8) + M Hyo Volume total (RP 13,3) em 20%	L0611RK06	15.9	1.13	-1.93*	-0,99*

	de SLCD + 10% de óleo SP					
--	--------------------------	--	--	--	--	--

*Indica Virucida (> 0,7 log de perda)

A – Controle GMT de teste virucida ~5,53 log/mL

B – Controle GMT de teste virucida ~6.42 log/mL

[0219] Os resultados apresentados na Tabela 13 acima indicam que 10% de óleo SP é não virucida ao vírus de PRRS. Adicionalmente os seriais de vacina PCV/M. hyo foram preparados usando 10% de óleo SP como o adjuvante (Tabela 14). Os resultados mostrados na Tabela 14 abaixo adicionalmente demonstram que 10% de óleo SP é não virucida ao vírus de PRRS. Os valores da amostra de teste na Tabela 14 foram cada um dos quais mais alto (+ sinal) do que o controle de teste virucida, que teve uma titulação média geométrica (GMT) de cerca de $5,9 \pm 0,5$ log/mL.

Tabela 14 Resultados do Teste Virucida com Diferentes formulações de PCV/M. hyo com Adjuvante com 10% de óleo SP

Vacina Serial usado		Potência		PRRS Virucida
Descrição	Serial #	p46 RP (ru/ds) Referência L1211RK15	PCV2 NVSL Referência L1211RK15	log10 TCID50/mL
Diluyente estéril (água estéril)	1949122	na	na	
cPCV + M Hyo Prot A tratada em 10% de óleo SP	L0912RK12	1,62	2.60	+ 0,58
cPCV + M Hyo Prot A tratada em 10% de óleo SP	L0912RK10	0.88	1,23	+ 0,58
cPCV + M Hyo Prot A tratada em 10% de óleo SP	L0912RK11	1,24	2.62	+ 0,58
cPCV + M Hyo Prot A tratada em 10% de óleo SP	L0912RK08	1,08	1,03	+ 0,91
cPCV + M Hyo Prot A tratada em 10% de óleo SP	L0912RK09	1,65	2.06	+ 0,50

Controle GMT de teste virucida ~ $5.9 \pm 0,5$ log/mL

[0220] Os resultados apresentados no referido exemplo demonstram que 10% de óleo SP é não virucida ao vírus de PRRS. Os resultados apresentados no referido exemplo adicionalmente demonstram que a formulação de PCV/M. hyo com adjuvante com 10% de óleo SP esteve entre os seriais de vacina que foram considerados não virucida ao vírus de PRRS (Tabela 13 e tabela 14). Em conclusão, a formulação de PCV/M. hyo com adjuvante com 10% de óleo SP foi considerada uma pla-

taforma eficaz na qual uma combinação na qual se basear uma trivalente incluindo PCV, M. hyo, e vírus de PRRS.

Exemplo 13: Preparação de uma vacina de combinação de PCV/M. hyo/PRRS

[0221] A formulação de PCV/M. hyo com adjuvante com uma plataforma de adjuvante que é não virucida ao vírus de PRRS (vide tabela 13 e tabela 14 acima), é proporcionada como uma composição líquida em um frasco pronta para uso. A referida formulação em 1 frasco de PCV/M. hyo emprega o sobrenadante de M. hyo tratado com proteína A. A eficácia de ambos M. hyo e PCV2 foi demonstrada nas referidas formulações de PCV2/M. hyo que empregam o sobrenadante de M. hyo tratado com Proteína A (vide Exemplos 7-9). No presente exemplo, a referida formulação divalente de PCV2/M. hyo é combinada com um antígeno monovalente do vírus PRRS.

[0222] Em uma modalidade, a combinação de PCV/M. Hyo em 10% de óleo SP e que corresponde a uma das vacinas seriais L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 e L0711RK14 na Tabela 11 acima é proporcionada como uma composição líquida em um frasco pronta para uso. Os resultados apresentados no Exemplo 12 acima demonstraram que 10% de óleo SP é não virucida ao vírus de PRRS. O Exemplo 12 também demonstra que as formulações de PCV2/M. hyo com adjuvante com 10% de óleo SP estiveram entre as vacinas seriais que foram consideradas não virucida ao vírus de PRRS. No presente Exemplo, a referida composição líquida em 1 frasco de PCV2/M. hyo é usada para reidratar a composição de vírus vivo de PRRS liofilizada geneticamente modificada contida em um segundo frasco, de modo que todos os antígenos são contidos em um único frasco antes de ser administrada a um porco de uma idade adequada (por exemplo, com 3 semanas de idade ou mais velhos).

[0223] Em uma modalidade, o vírus de PRRS tem uma sequência genômica que corresponde a SEQ ID NO: 16 ou uma variante dos mesmos. Em outra modalidade, o vírus de PRRS empregado na composição trivalente é o vírus de PRRS isolado

designado ISU-55, que foi depositado no ATCC sob o número de acesso VR 2430. Quantidades adequadas dos respectivos antígenos são descritos aqui. De modo desejável, todos os antígenos são administrados em uma única dose ao porco.

Exemplo 14: Avaliação da eficácia de PCV2 da Vacina de combinação PCV2/M. hyo/PRRS seguida por um desafio com PCV2

[0224] O presente estudo foi projetado para avaliar a eficácia da fração exterminada do vírus PCV1-2 quimerico de uma vacina de combinação experimental de PCV2/M. hyo/PRRS, administrada por via intramuscular uma vez a porcos com 3 semanas de idade e desafiados com um PCV2 virulento isolado três semanas pós vacinação. As referidas vacinas trivalentes incluíram Circovírus suíno Tipo 1- Tipo 2 quimerico, vírus exterminado, Vacina de síndrome respiratória e reprodutiva, Forma respiratória, Vírus vivo modificado, e extrato bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

[0225] A referida combinação trivalente foi preparada por reidratar o vírus vivo geneticamente modificado de PRRS liofilizado (PRRS-MLV) com uma formulação líquida em um frasco incluindo a combinação de circovírus suíno Type1-Tipo 2 quimérico, vírus exterminado e M. hyo bacterial extract (PCV2/M. hyo), que é adjuvanted usando 10% de óleo SP (vide Exemplo 13 acima). As formulações experimentais administradas através do curso do presente estudo são descritas na Tabela 15 abaixo.

Tabela 15 Formulações experimentais de vacina PCV2/M. hyo/PRRS usada para o estudo de eficácia de PCV2

Grupo	N	CP ou IVP	Serial No.	Entrada de Antígeno ¹	Dias de estudo		
					Vacinação	Desafio	Necropsia
T01	24	M hyo	L1012RK10	≥ 153 RU/mL	Dia 0 2 mL IM Pescoço esquerdo	Dia 21 1 mL IM 2 mL EM 40895	Dia 42 ± 3 dias
		PRRSV MLV	L1011CM14	4,5 log ₁₀ TCID ₅₀			
T02	24	PCV2 M hyo	L0912RK08	0,688% 102 RU/mL			
		PRRSV	L1011CM14	4,5 log ₁₀			

		MLV		TCID50			
T03	24	PCV2 M hyo	L0912RK09	1,375% 153 RU/mL			
		PRRSV MLV	L1011CM14	4,5 log ₁₀ TCID50			

IVP = Produto veterinário em investigação

CP = Produto de controle

IM = Por via intramuscular

EM = Intranasal

¹ % = antígeno PCV2, RU/mL = antígeno M hyo, log₁₀ TCID50 = antígeno PRRSV

[0226] Porcos com 3 semanas de idade foram inoculados por via intramuscular com uma única dose das diferentes formulações de vacina descritas na Tabela 15 acima. Vinte e quatro animais foram incluídos em cada um dos grupos de tratamento. Os animais foram desafiados 21 dias após a vacinação com um PCV2 virulento isolado.

[0227] Os resultados da viremia de PCV2 (PCR Quantitativa de PCV2) observada no presente estudo são apresentados na figura 11. É observado que a viremia de PCV2 foi usada como a variável de eficácia principal. Os resultados de viremia de PCV2 são apresentados como cópias de DNA/mL. Como mostrado na figura 11, todos os tratamentos tinham significativamente menos viremia ($P < 0,001$) comparado ao placebo nos dias 28, 35 e 42 (desafio foi dia 21).

[0228] A sorologia de PCV2, descarga fecal de PCV2, depleção linfóide, e Imunohistoquímica (IHC) foram também monitorados como as variáveis de eficácia secundária no presente estudo. Os referidos resultados são descritos abaixo.

[0229] Os resultados da sorologia de PCV2 são apresentados na figura 12, que mostra os resultados de ELISA para PCV2 nos dias -1, 7, 13, 20, 28, 35 e 42 do estudo (o desafio foi no dia 21). O estado de cada amostra foi expresso como a proporção de amostra para positivo (S/P). Os referidos resultados mostram que comparado ao grupo de placebo, ambos os grupos de tratamento tinham significativamente maiores titulações de anticorpo de PCV2 pós-desafio ($P < 0,0345$)

[0230] A descarga fecal de PCV2 obtida com os tratamentos T02 e T03 vs. o placebo (T01) é apresentada na figura 13. Os referidos resultados são expressos como

cópias de DNA de PCV2/mL. Os resultados na figura 13 indicam que ambos os tratamentos T02 e T03 tinham significativamente menos descarga fecal ($P < .0001$) quando comparado ao placebo nos dias 35 e 42.

[0231] A Tabela 16 abaixo mostra a significativa proteção contra depleção linfóide obtida com o tratamento experimental (T02) contrastados ao placebo.

Tabela 16 PCV2 Histopatologia (Depleção linfóide)

Tratamento	Depleção linfóide			Contrastados ao placebo	
	Positivo	Negativo	% Ever Pos.	Valor-P	Significante
Placebo	13	8	61,9%	NA	NA
T02	3	17	15%	0,047	Sim
T03	7	13	35%	0,0780	Não

[0232] Os resultados apresentados na Tabela 17 abaixo mostram a significativa proteção contra Substituição Histiocítica obtida com o tratamento experimental (T02) contrastados ao placebo.

Tabela 17 PCV2 Histopatologia (Substituição histiocítica)

Tratamento	Substituição histiocítica			Contrastados ao placebo	
	Positivo	Negativo	% Ever Pos.	Valor-P	Significante
Placebo	11	10	52.4%	NA	NA
T02	2	18	10%	0,0105	Sim
T03	6	14	30%	0,1566	Não

[0233] A Tabela 18 abaixo mostra a imunohistoquímica obtida com os tratamentos experimentais contrastados ao placebo. Ambas as vacinas (T02 e T03) mostraram significativa proteção ($P < 0,0059$) contra a colonização de antígeno de PCV2 em tecidos linfóides.

Tabela 18 PCV2 Histopatologia (Imunohistoquímica)

Tratamento	Imunohistoquímica			Contrastados ao placebo	
	Positivo	Negativo	% Ever Pos.	Valor-P	Significante
Placebo	14	7	66.7%	NA	NA
T02	3	17	15%	0,0030	Sim
T03	4	16	20%	0,0059	Sim

[0234] Em conclusão, os resultados apresentados no referido exemplo demonstram que as vacinas experimentais usadas no presente estudo proporcionaram eficácia contra um desafio com PCV2. Ambos os níveis de potência das vacinas proporcionaram significativa proteção contra a variável primária assim como a colonização de PCV2. Entretanto, o grupo T02 também proporcionou significativa proteção

contra lesões de PCV2 (depleção linfóide e substituição histiocítica).

Exemplo 15: Avaliação da eficácia de M. hyo da Vacina de combinação PCV2/M. hyo/PPRS seguida por desafio de M. hyo

[0235] O presente estudo foi projetado para avaliar a eficácia da fração M. hyo de uma vacina de combinação experimental de PCV2/M. hyo/PPRS, administrada por via intramuscular em porcos com 3 semanas de idade susceptíveis e desafiados com um *Mycoplasma hyopneumoniae* virulento isolado três semanas pós vacinação. As referidas vacinas trivalentes incluíram Circovírus suíno Tipo 1- Tipo 2 quimérico, vírus exterminado, Vacina de síndrome respiratória e reprodutiva, Forma respiratória, Vírus vivo modificado, e extrato bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Processamento de fluidos:

[0236] Fluido de fermentação de M. hyo Inativado, clarificado (descritos acima no Exemplo 11) foi usado para cada um dos grupos de tratamento como a seguir.

[0237] T01: Um tratamento com controle negativo que consiste de vacina PCV1-2 sem o antígeno de *M. hyopneumoniae* que foi usado como diluente na vacina viva liofilizada de PRRSV modificado.

[0238] T02: Antígeno inativado de *M. hyopneumoniae* foi combinado com Circovírus suíno (Tipo 1-Tipo 2 quimérico, ou PCV1-2, vírus exterminado) em um frasco. A combinação de PCV1-2/ M. hyo foi usada como o diluente em uma vacina viva liofilizada de PRRSV modificado.

[0239] T03: Antígeno inativado de *M. hyopneumoniae* como descrito acima no Exemplo 11 com uma etapa adicional para concentrar o antígeno 20X por filtração molecular foi combinada com Circovírus suíno (Tipo 1-Tipo 2 quimérico, ou PCV1-2, vírus exterminado) em um frasco. A combinação de PCV1-2/ M. hyo foi usada como o diluente em uma vacina viva liofilizada de PRRSV modificado.

[0240] As referidas formulações experimentais são descritas na Tabela 19 abaixo. Na Tabela 19, CP é o produto de controle e IVP é Produto veterinário em investiga-

ção. O antígeno M. hyo corresponde ao antígeno M. hyo a partir da semente global de M. hyo, Sobrenadante tratado com Proteína A.

Tabela 19 Formulações experimentais de vacina PCV2/M. hyo/PRRS usada para o estudo de eficácia de M. hyo

Grupo	N	CP ou IVP	Serial No.	Potência
NTX	5	Sentinel		
T01	25	PCV2	L0412RK13	4,3 Unidades de potência relativa
		PRRSV MLV	L1011CM14	4,5 +/- 0,5 LOG10 FAID ₅₀ /mL
T02	25	PCV2 M hyo	L1211RK12	4,5 Unidades de potência relativa 2,7 Unidades de potência relativa
		PRRSV MLV	L1011CM14	4,5 +/- 0,5 LOG10 FAID ₅₀ /mL
T03	25	PCV2 M hyo – filtro concentrado	L0712RK33	3,4 Unidades de potência relativa 2,7 Unidades de potência relativa
		PRRSV MLV	L1011CM14	4,5 +/- 0,5 LOG10 FAID ₅₀ /mL

[0241] Porcos com 3 semanas de idade foram inoculados por via intramuscular com uma única dose das diferentes formulações de vacina descritas na Tabela 19 acima. Os animais foram desafiados 20 dias após a vacinação com um M. hyo virulento isolado em campo. Vinte e cinco animais completaram o estudo em grupo T01 e T03, e 24 completaram o estudo no grupo T02. Os animais foram necropsiados 28 dias após o desafio e os pulmões foram removidos e pontuados para consolidação consistente com infecção por M. hyo. A tabela 20 abaixo contém a pontuação de lesão do pulmão para os respectivos grupos de tratamento. A significância estatística foi determinada pela Análise de Modelo Misturada das pontuações do pulmão para cada grupo.

Tabela 20 Lesões de M. hyo no pulmão

Tratamento	# Animal	LS Lesão media no pulmão	Faixa % de Lesão no pulmão
T01: PCV1-2, PRRSV MVL	25	7,65%	0,00 a 44,75
T02: PCV1-2/M. hyo, PRRSV MVL	24	4,38%	0,10 a 20,95
T03: PCV/Mhyo– filtro concentrado, PRRSV MVL	25	2,23%	0,00 a 17,95

[0242] Comparado ao grupo de controle negativo (T01), o grupo de tratamento T03 demonstrou uma significativa redução ($P \leq 0,05$) no percentual de pulmão com lesão comparado a T01. O percentual de lesões no pulmão para T02 não foi significativa-

mente diferente a partir seja de T01 ou de T03.

[0243] Os resultados no presente Exemplo demonstram que uma formulação trivalente de vacina experimental (T03 tratamento) usada no presente estudo proporcionou significativa eficácia contra desafio de *M. hyo*.

[0244] Exemplo 16: Avaliação da eficácia de PRRSV de uma vacina e combinação de PCV/*M. hyo*/PRRS

[0245] O presente estudo foi projetado para avaliar a eficácia da fração PRRSV de uma vacina de combinação experimental de PCV2/*M. hyo*/PRRS.

Sumário do Estudo:

[0246] No dia 0, aproximadamente 102 porcos clinicamente saudáveis, com três semanas de idade, soro-negativos para PRRSV, SIV e *M. hyopneumoniae* e livre de viremia PCV por PCR, são selecionados e alocados (bloqueados por ninhada) a um dos quatro grupos de tratamento (24 por grupo) ou um grupo sentinela (NTX) (6). Os porcos são administrados com uma dose única de 2 mL por via intramuscular (IM) de um Circovírus suíno Tipo 1 – Tipo 2 quimérico experimental, vacina de vírus exterminado - extrato bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (T01), ou um Circovírus suíno Tipo 1- 2 quimérico experimental - Vacina de síndrome respiratória e reprodutiva, Forma respiratória, Vírus vivo modificado e exterminado - extrato bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (T02, T03 e T04). Os animais do grupo NTX são alojados em um local separado dos grupos de tratamento durante a fase de vacinação do estudo. Quatro semanas após a vacinação os porcos NTX são eutanizados e necropsiados, antes do realojamento aos grupos de tratamento, para conformar a ausência de lesões PRRSV no pulmão. Todos os porcos tratados são desafiados com uma cepa virulenta de desafio de PRRSV (NADC20). Todos os porcos restantes são eutanasiados e necropsiados dez (10) dias após o desafio. Na necropsia, o percentual de consolidação para cada lobo do pulmão (cranial esquerdo, médio esquerdo, esquerdo caudal, direito cranial, médio direito, direito caudal, e acessório) é pontua-

do e registrado como o percentual do lobo observado com lesões. O status de PRRSV negativo de T01 dos porcos é testado (IDEXX ELISA) antes do desafio. As observações clínicas são registradas uma vez ao dia pela duração do estudo e os pesos corporais são obtidos antes do desafio e na necropsia.

[0247] As formulações experimentais são descritas abaixo e na Tabela 21. O lote de controle de antígeno M. hyo é preparado como descrito no Exemplo 11 acima. O antígeno PCV2 é um antígeno exterminado de cPCV1-2 preparado como descrito no Exemplo 2 acima. Antes da inativação do vírus quimérico, o lote de antígeno PCV2 foi concentrado 20X e os concentrados foram lavados com uma solução salina equilibrada. A formulação em um frasco de PCV/M. hyo (com adjuvante em 10% de óleo SP) é usada para reidratar PRRSV vivo modificado liofilizado.

[0248] T01: Preparação experimental de alta passagem Circovírus suíno Tipo 1 – Tipo 2 quimérico, vírus exterminado (1,65% de lote de antígeno concentrado 20X) e extrato bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dose-9.0 RP; 153 RU/mL). T01 preparação corresponde ao número de série L0912RK12 (PCV/M. hyo) e é um controle negativo (nenhum antígeno PRRSV).

[0249] T02: Preparação experimental de alta passagem Circovírus suíno vacina Tipo 1 – Tipo 2 quimérico, vírus exterminado (1,65% de lote de antígeno concentrado 20X) e extrato bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dose – 9.0 RP; 153 RU/mL) e Preparação experimental de alta passagem de vacina de síndrome Reprodutiva & Respiratória de suíno, Forma respiratória, Vírus vivo modificado (MID (\leq 2,5 logs). T02 preparação corresponde ao número de série L0912RK12 (PCV/M. hyo) + (PPRS MLV at MID \leq 2,5 logs).

[0250] T03: Preparação experimental de alta passagem Circovírus suíno vacina Tipo 1 – Tipo 2 quimérico, vírus exterminado (1,65% de lote de antígeno concentrado 20X) e extrato bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dose – 9.0 RP; 153 RU/mL) e Preparação experimental de alta passagem de vacina de síndrome Re-

produtiva & Respiratória de suíno Forma respiratória, Vírus vivo modificado (MID (\leq 3.0 logs). A preparação T03 corresponde ao número de série L0912RK12 (PCV/M. hyo) + (PPRS MLV at MID \leq 3.0 logs).

[0251] T04: Preparação experimental de alta passagem Circovírus suíno vacina Tipo 1 – Tipo 2 quimérico, vírus exterminado (1,65% de lote de antígeno concentrado 20X) e extrato bacteriano de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dose – 9.0 RP; 153 RU/mL) e Preparação experimental de alta passagem de vacina de síndrome Reprodutiva & Respiratória de suíno Forma respiratória, Vírus vivo modificado (MID (\leq 3.5 logs). A preparação T04 corresponde ao número de série L0912RK12 (PCV/M. hyo) + (PPRS MLV at MID \leq 3.5 logs).

[0252] As referidas formulações experimentais são descritas na Tabela 21 abaixo. O antígeno M. hyo corresponde ao antígeno M. hyo a partir de semente global M. hyo, Sobrenadante tratado com Proteína A. Os números de série para as preparações de PRRSV devem ainda ser determinados (TBD).

Tabela 21 Configuração do estudo

Grupo	N	CP ou IVP ¹	Lote No.	Dias de estudo		
				Vacinação	Desafio	Necropsia
NTX	6	Sentinel	NA			Pontuação dos Pulmões em realojamento
T01	24	PCV2 / M. hyo	L0912RK12	Dia 0 2 mL IM Pescoço direito	Dia 28 4 mL (1 mL por narina + 2 mL por injeção IM) pescoço esquerdo	Dia 38 Pontuações do pulmão
T02	24	PCV2/ M. hyo + PRRSV	L0912RK12 + TBD			
T03	24	PCV2/ M. hyo + PRRSV	L0912RK12 + TBD			
T04	24	PCV2/ M. hyo + PRRSV	L0912RK12 + TBD			

Grupo	N	CP ou IVP ¹	Lote No.	Dias de estudo		
				Vacinação	Desafio	Necropsia

¹ Produto Veterinário em Investigação (IVP) = Circovírus suíno Tipo 1–2 quimérico (PCV2), Vírus exterminado vacina-*Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo) extrato bacteriano com adjuvante com 10% de óleo SP (diluyente) – Vacina de síndrome Reprodutiva & Respiratória de suíno, Forma respiratória, Vírus vivo modificado (PRRSV)

Produto de controle (CP) = Circovírus suíno Tipo 1– 2 quimérico (PCV2), Vírus exterminado vacina-*Mycoplasma hyopneumoniae* (M hyo) extrato bacteriano sem a fração da Vacina de síndrome Reprodutiva & Respiratória de suíno; com Adjuvante com 10% de óleo SP

IM = Intramuscular

NA = Não Aplicável

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica trivalente **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma porção solúvel de uma preparação celular total de *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*); um antígeno de circovírus suíno tipo 2 (PCV2); e um antígeno de vírus da síndrome reprodutiva e respiratória de suíno (PRRS), em que a porção solúvel da preparação de *M. hyo* compreende antígenos de proteína solúvel específicos para *M. hyo* e é separada do material celular insolúvel e substancialmente livre de ambos IgG e imunocomplexos antígeno/imunoglobulina.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção solúvel da preparação de *M. hyo* foi tratada com proteína A ou proteína G antes de ser adicionada à composição imunogênica.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o antígeno do vírus PRRS é um vírus vivo geneticamente modificado.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção solúvel da preparação de *M. hyo* foi tratada com proteína A antes de ser adicionada à composição imunogênica.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o antígeno do PCV2 está na forma de um circovírus tipo 1-tipo 2 quimérico, em que o referido vírus quimérico compreende um circovírus suíno tipo 1 recombinante inativado que expressa a proteína ORF2 do circovírus suíno tipo 2.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o antígeno do PCV2 está na forma de uma proteína ORF2 recombinante.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína ORF2 recombinante é expressa de um vetor de Baculovírus.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição compreende ainda um adjuvante.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o adjuvante é selecionado dentre o grupo que consiste em um adjuvante óleo em água, um adjuvante polímero e água, um adjuvante água em óleo, um adjuvante de hidróxido de alumínio, um adjuvante de vitamina E e combinações destes.

10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição induz uma resposta imune protetora contra vírus de *M. hyo*, PCV2 e PRRS, em que a composição é formulada para ser administrada em uma dose única.

11. Uso de uma composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para imunizar um suíno contra vírus de *M. hyo*, PCV2 e PRRS.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o medicamento é formulado para ser administrado em uma dose única.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o medicamento é formulado para ser administrado em suínos que tenham anticorpos derivados maternalmente contra pelo menos um de um vírus de *M. hyo*, PCV2 e PRRS.

14. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o medicamento é formulado para ser administrado em suínos com 3 semanas ou mais de idade.

15. Composição de vacina **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma composição imunogênica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a composição compreende ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

16. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para uso na proteção de suínos contra pneumonia enzoótica, Síndrome de Caquexia Multissistêmica Pós-desmame (PMWS), Doença Associada um circovírus Suíno (PCVAD) e síndrome respiratória e reprodutiva de suíno.

17. Kit **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma composição de vacina ou composição imunogênica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que um primeiro frasco compreende ambos um antígeno de PCV2 e a porção solúvel de uma preparação celular total de *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*), em que a porção solúvel da preparação de *M. hyo* compreende antígenos de proteína solúvel específicos para *M. hyo* e é separada do material celular insolúvel e substancialmente livre de ambos IgG e imunocomplexos antígeno/imunoglobulina, e um segundo frasco compreende antígeno do vírus PRRS, e opcionalmente incluindo ainda um manual de instruções com direções para combinar os conteúdos do primeiro frasco com os conteúdos do segundo frasco e para administrar os conteúdos combinados dos primeiro e segundo frascos a um suíno.

18. Método para preparar uma composição de vacina ou composição imunogênica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende:

i) cultivar *M. hyo* em um meio adequado por períodos que variam de 18-144 horas;

ii) inativar subsequentemente a cultura de *M. hyo*;

iii) coletar o fluido da cultura inativada, em que o fluido da cultura inativada compreende uma preparação celular total de *M. hyo* compreendendo ambos, uma fração líquida solúvel e um material celular insolúvel, em que a fração líquida solúvel compreende antígenos de proteína solúvel específicos para *M. hyo*;

iv) separar a fração líquida solúvel a partir do material celular insolúvel;

v) remover substancialmente ambos IgG e imunocomplexos antígeno/imunoglobulina a partir da fração líquida solúvel separada para formar uma porção solúvel da preparação celular total de *M. hyo*; e

vi) combinar subsequentemente a porção solúvel da preparação celular total de *M. hyo* com um antígeno de PCV2 e antígeno do vírus PRRS.

FIG.1

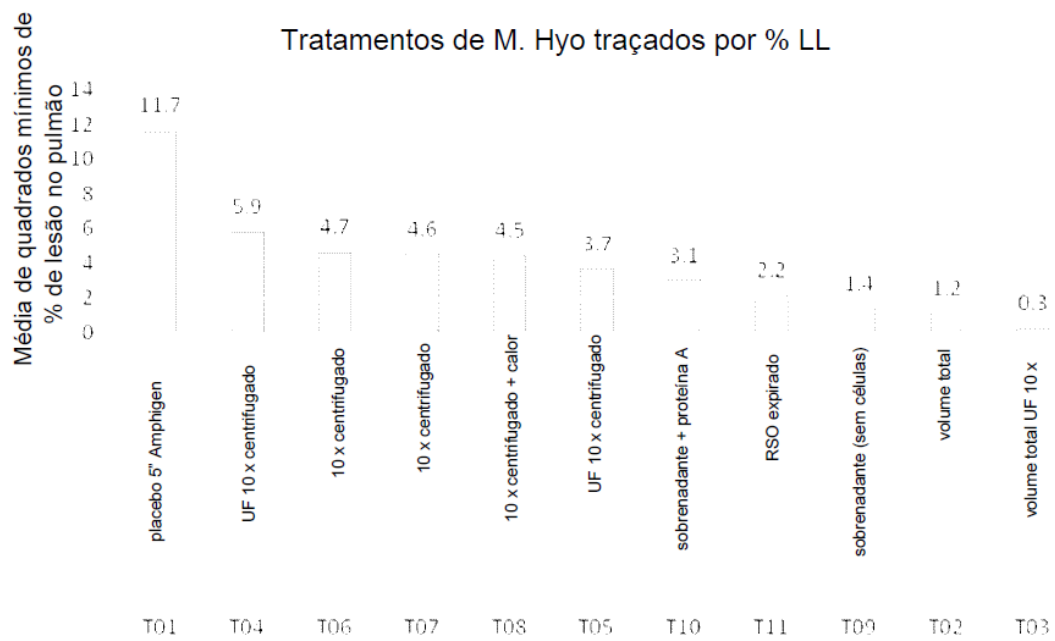


FIG.2

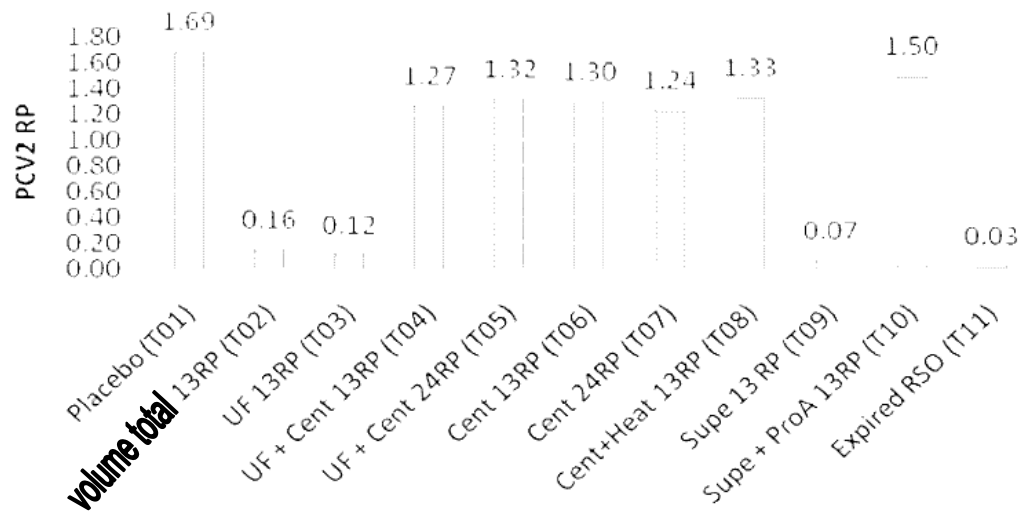


FIG.3

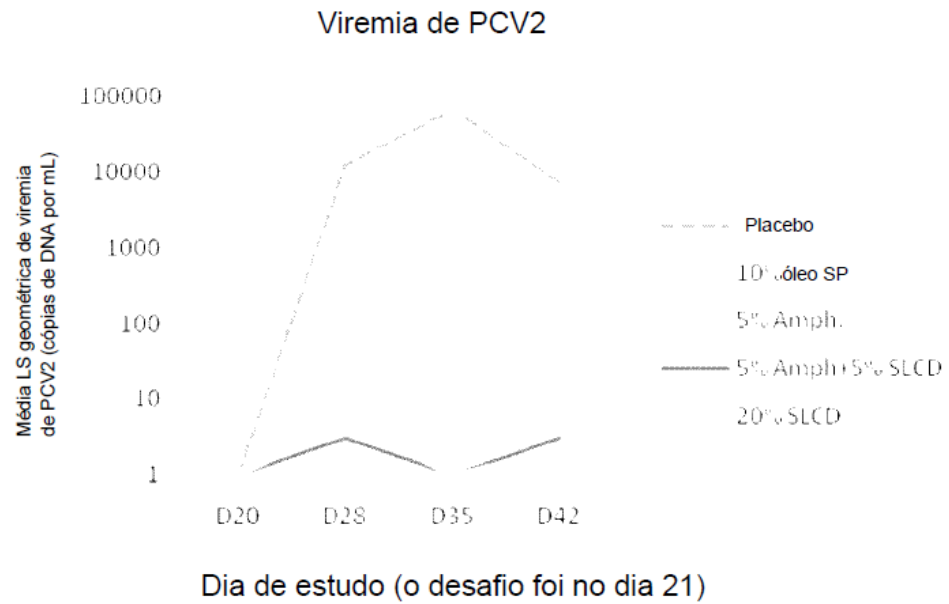


FIG.4

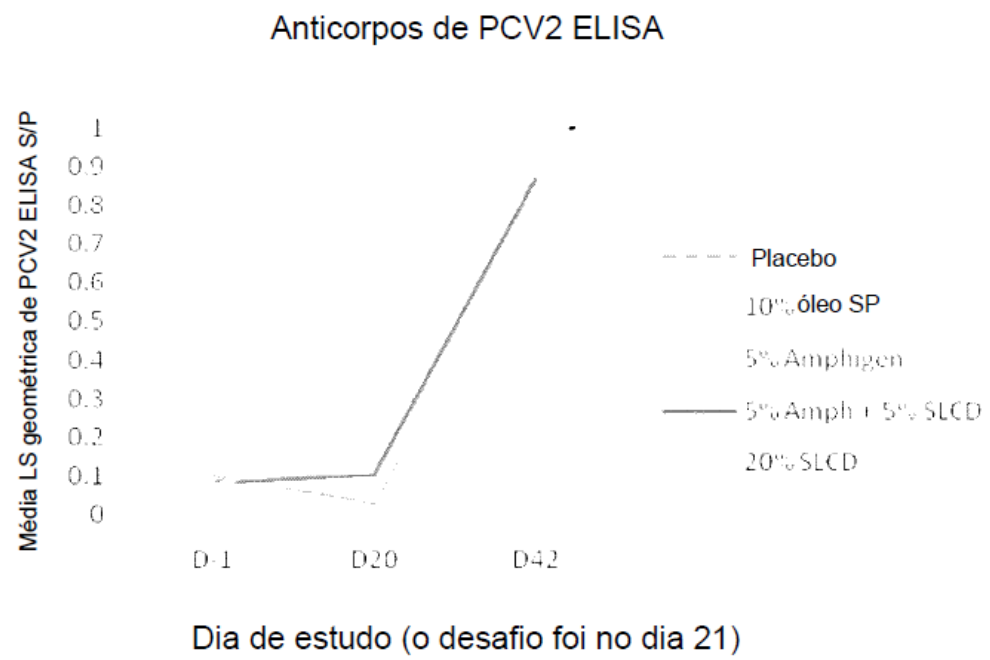


FIG.5

Descarga fecal de PCV2

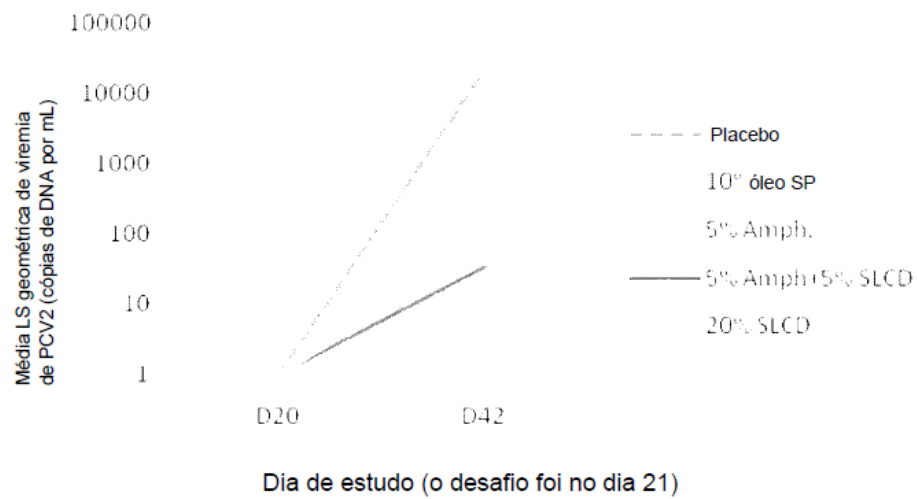


FIG.6

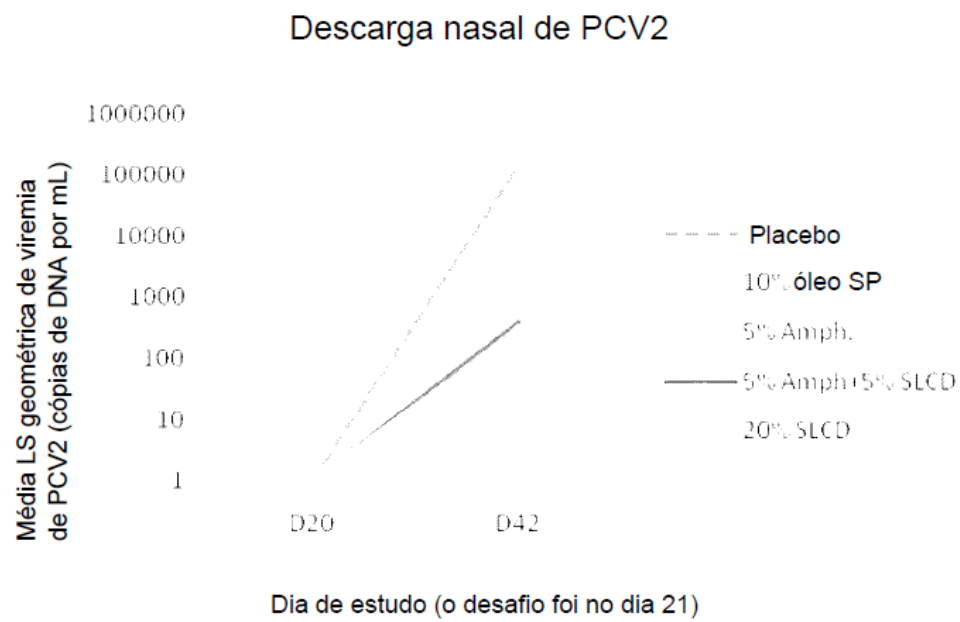


FIG.7A

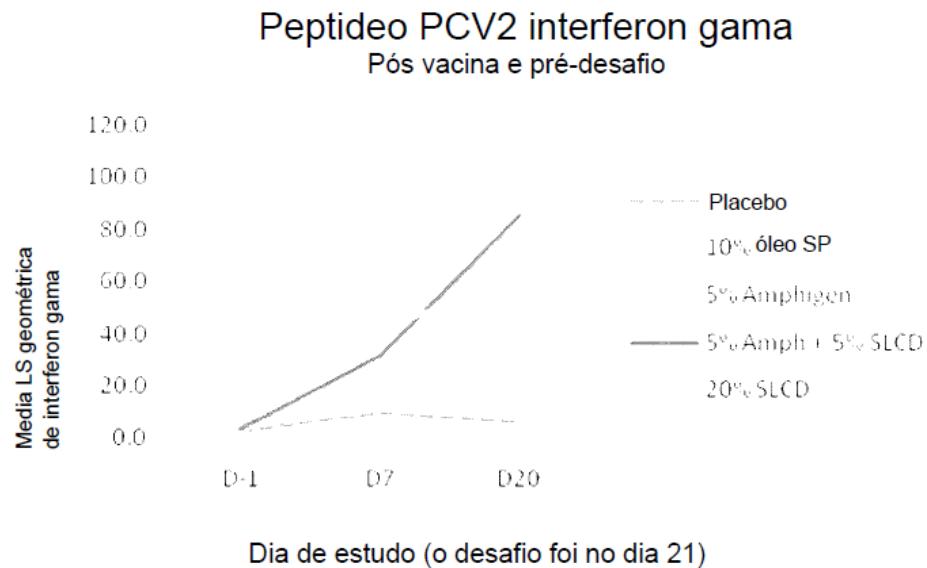


FIG.7B

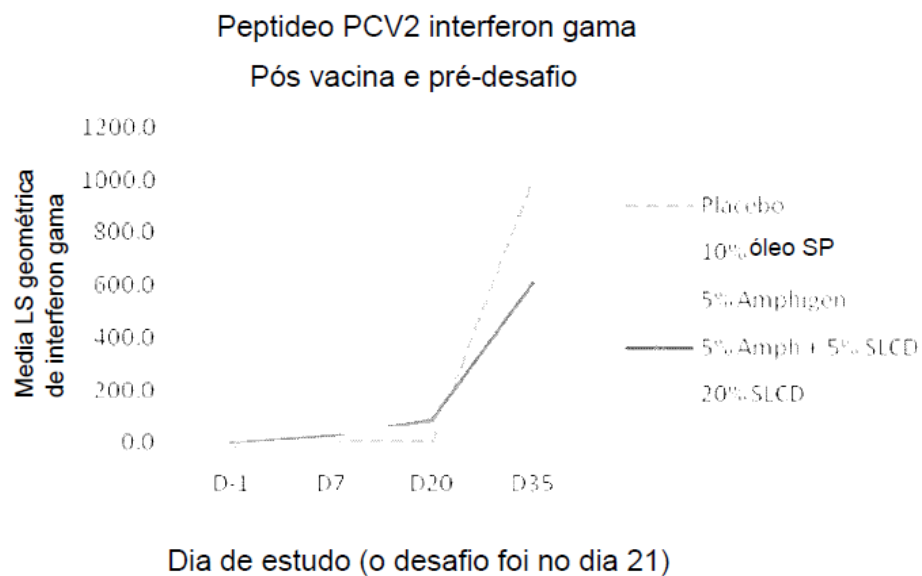


FIG.8A

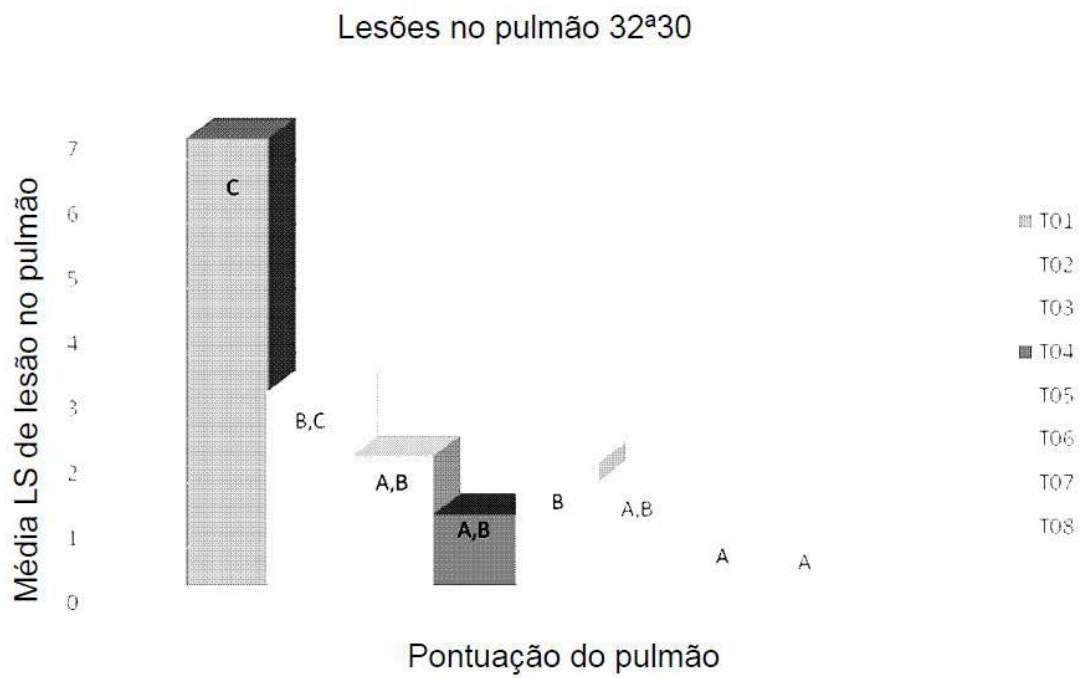


FIG.8B

Contraste	Fração mitigada	95% de intervalo de confiança
T01 vs T02	41.2	-5.9 to 76.5
T01 vs T03	64.7	29.4 to 100
T01 vs T04	76.5	41.2 to 100
T01 vs T05	73.3	33.3 to 100
T01 vs T06	62.5	25 to 100
T01 vs T07	87.5	62.5 to 100
T01 vs T08	88.2	64.7 to 100

FIG.9

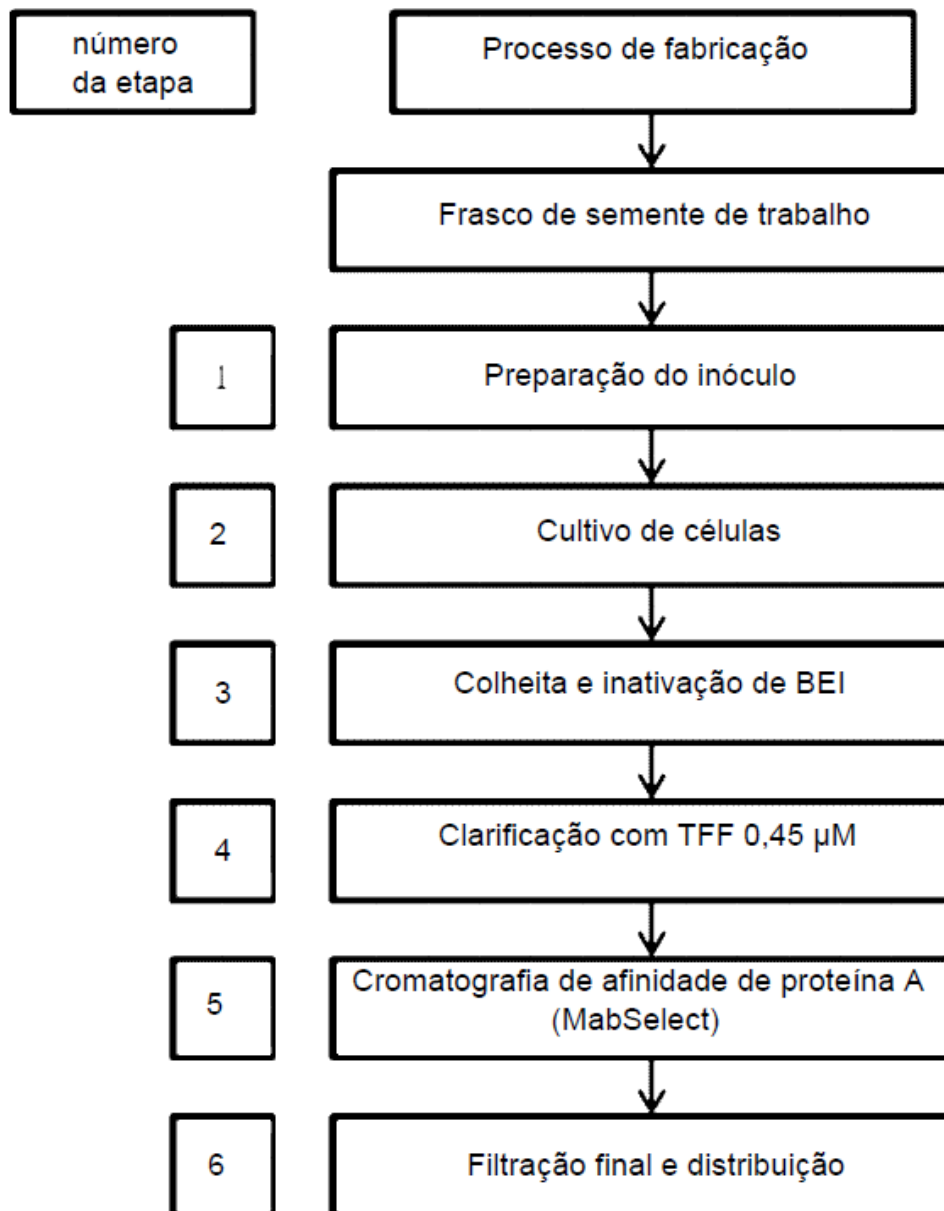


FIG.10

Atividade viricida preliminar	Diferença a partir da água			
	100% de reidratação	90/10	90/10	Atividade viricida média
	Titulação liofilizada	Liq. (DMEM) 90/10	Liq. (ULTRA) 90/10	
20% SLCD	0.8	0.7	2.0	1.3
0.2% de Carbopol	0.3	-0.3	0.2	-0.1
10% de óleo SP	0.2	0.0	0.0	0.0
10% de óleo SP + 2% de carbopol	0.3	-0.2	0.0	-0.1
20% de SLCD + 10% de óleo SP	1.0	0.3	0.7	0.5
20% de SLCD + 10% de óleo SP + 0,2% de carbopol	0.2	0.0	0.5	0.3
5% Amphigen (a partir de 40% do estoque)	1.0	0.7	1.5	1.1
2.5% Amphigen (a partir de 40% do estoque)	NA	-0.2	NA	-0.2
5% Amphigen (a partir de 20% do estoque)	NA	0.8	NA	0.8
2.5% Amphigen (a partir de 20% do estoque)	NA	0.2	NA	0.2
5% Amphigen (a partir de 40% do estoque)	NA	1.3	NA	1.3
2.5% Amphigen (a partir de 40% do estoque)	NA	0.8	NA	0.8
	Indica atividade viricida potencial			

FIG.11

Viremia de PCV2

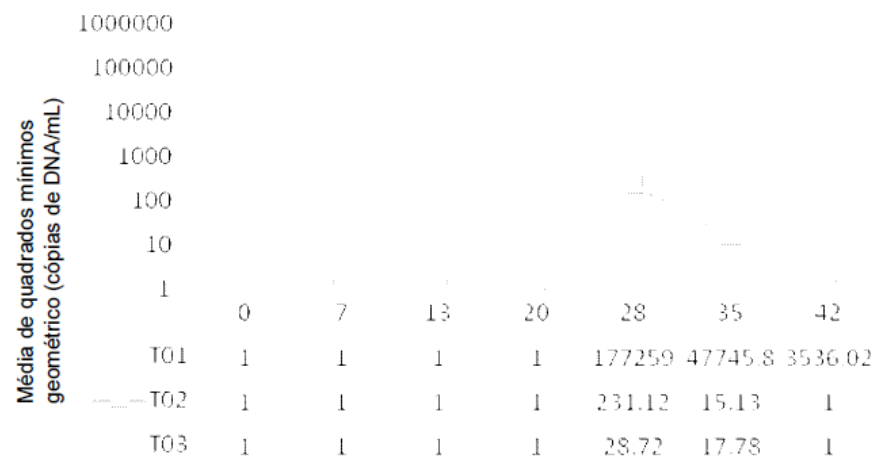


FIG.12

Anticorpos de PCV2

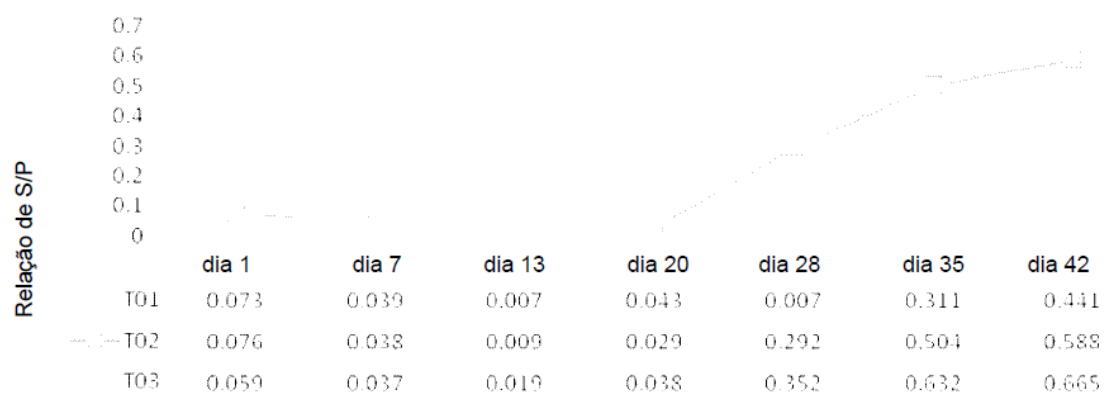


FIG.13

Descarga de PCV2

