

(11) Número de Publicação: **PT 1474067 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/00 (2007.10) **A61P 31/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.06.07**

(30) Prioridade(s): **2001.07.02 US 302636 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.11.10**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.10.29**
224/2008

(73) Titular(es):

PFIZER PRODUCTS INC.
EASTERN POINT ROAD GROTON,
CONNECTICUT 06340

US

(72) Inventor(es):

ROBIN LEE KEICH
LISA GRACE SABBADINI

US
US

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **VACINAÇÃO NUMA DOSE COM MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE**

(57) Resumo:

RESUMO

"VACINAÇÃO NUMA DOSE COM *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*"

O presente invento relaciona-se com métodos para o tratamento ou prevenção de uma doença ou afecção num animal causada por infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) por administração ao animal com aproximadamente três (3) a dez (10) dias de idade, de uma dose única de uma quantidade eficaz de uma vacina de *M. hyo*. A vacina de *M. hyo* pode ser uma preparação viva inactivada ou modificada de célula total ou parcial, uma vacina subunitária, ou um ácido nucleico ou vacina de ADN. A vacina de *M. hyo* administrada de acordo com o presente invento pode ser sintetizada ou produzida de um modo recombinante.

DESCRIÇÃO**"VACINAÇÃO NUMA DOSE COM *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*"**Campo do Invento

O presente invento relaciona-se com a utilização de uma bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* no fabrico de uma vacina para o tratamento ou prevenção de uma doença ou afecção num animal causado por infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) por administração ao animal com aproximadamente três (3) a dez (10) dias de idade, de uma dose única de uma quantidade eficaz de uma vacina de *M. Hyo*. A vacina de *M. hyo* é uma preparação viva inactivada ou modificada de células totais ou parciais. A vacina de *M. hyo* administrada de acordo com o presente invento pode ser produzida de um modo sintético ou recombinante.

Fundamentos do Invento

M. hyo é um agente patogénico bacteriano que causa pneumonia enzoótica em porcos. A pneumonia enzoótica é uma doença crónica que origina fraca conversão alimentar, crescimento enfezado e predisposição para infecções pulmonares secundárias. *M. hyo* é facilmente transmitida através das secreções do tracto respiratório e por transmissão porca-a-porquinho, e é altamente prevalente nas

quintas de criação de porcos. Aproximadamente 99% de manadas de porcos encontram-se infectadas, custando à industria porcina cerca de 300 milhões de dolares por ano.

A maior parte de vacinas conhecidas contra *M. hyo* têm sido baseadas em preparações de células totais inactivadas adjuvantes de *M. hyo*. Além disso, vacinas à base de polipeptídeos ou de proteínas imunogénicos podem ser sintetizadas ou preparadas por clonagem e expressão recombinante de genes de *M. hyo*. Genes de *M. hyo* capazes de expressar esses polipeptídeos ou proteínas *in vivo* podem também ser usados como vacinas.

Exemplos de vacinas de *M. hyo*. inactivado de células totais incluem RESPISURE e STELLAMUNE, comercialmente disponíveis a partir de Pfizer Inc., USA.

Além disso, foram descritos vários polipeptídeos e proteínas de *M. hyo* imunogénicos produzidos de um modo recombinante que podem ser úteis como vacinas subunitárias. A Publicação da Patente Internacional WO 96/28472 descreve seis espécies de抗原蛋白 de *M. hyo* com pesos moleculares de 46-48, 52-54, 60-64, 72-75, 90-94 e 110-114 kilodaltons, e apresenta sequências proteicas parciais dos抗原蛋白 52-54, 60-64 e 72-75 kilodaltons e as sequências de nucleótido e amino ácido de comprimento completo do抗原蛋白 46-48 kilodaltons.

A clonagem do gene que codifica a proteína P46 de

M. hyo, isto é p46, foi também descrita por Futo *et al.* (1995; *J. Bacteriol.* **177**:1915-1917). O mesmo grupo revelou que o produto gene expresso *in vitro* era útil em respostas de anticorpo diagnósticas a infecções por *M. hyo* sem reactividade cruzada a outras espécies de *Mycoplasma* (Futo *et al.*, 1995, *J. Clin. Microbiol.* **33**:680-683). As sequências e utilizações diagnósticas do gene *p46* descritas por Futo *et al.* são ainda apresentados na Publicação de Patente Europeia No. 0 475 185 A1.

Wise and Kim (1987, *J. Bacteriol.*, **169**:5546-5555) referem que existem quatro espécies de proteína de membrana integral em *M. hyo*, denominado p70, p65 (*P65, supra*), p50 e p44, e que as últimas três são modificadas por ligações lipídicas covalentes e induzem uma forte resposta imunitária humoral. Não foram investigados os efeitos protectores da resposta imunitária. Codificando o gene a proteína P65 foi clonada, e as suas sequências e utilizações em vacinas e diagnósticos são descritas na Patente dos E.U.A. No. 5.788,962.

A Publicação da Patente Internacional WO 91/15593 descreve cinco proteínas de *M. hyo* com pesos moleculares aparentes de 105, 90, 85, 70 e 43 kilodaltons. Foi proporcionada uma sequência de comprimento completo da proteína com 85 kilodaltons que codifica o gene (proteína C) assim como sequências parciais que codificam as outras quatro proteínas.

A Patente dos E.U.A. No. 5.252.328 de Faulds apresenta sequencias terminais amino de proteínas de *M. hyo* imunoreactivas, cujos pesos moleculares são de 36, 41, 44, 48, 64, 68, 74,5, 79, 88,5, 96 e 121 kilodaltons. Outras proteínas identificadas com base nas mobilidades electroforéticas mas para as quais não foram apresentadas sequências proteicas apresentavam pesos moleculares aparentes de 22,5, 34 e 52 kilodaltons. Embora a Patente dos E.U.A. No. 5.252.328 tenha proposto a utilização dessas proteínas em formulações de vacinas, não foram referidos resultados de ensaios com vacinas.

A Publicação da Patente Internacional WO 95/09870 apresenta métodos bioquímicos para a purificação de adesinas de *M. hyo*, as proteínas de membrana integral do mycoplasma responsáveis pela adesão aos cílios do epitélio do tracto respiratório superior do hospedeiro. WO 95/09870 também propõe ensaios e utilizações para essas proteínas, por exemplo em vacinas e diagnósticos.

Um artigo de pesquisa por King et al. (1997; Vaccine 15:25-35) apresentou Mhp1, uma adesina com 124 kilodaltons que é uma variante da estirpe de P97.

Uma variante de 94 kilodaltons de P97 foi identificada por Wilton et al. (1998, Microbiology 144:1931-1943). Adicionalmente, verificou-se que o gene *p97* era parte de um operon que também codifica uma segunda proteína, denominada P102, com um peso molecular previsto de aproxi-

madamente 102 kilodaltons (Hsu *et al.*, 1998, Gene 214:13-23). Minion and Hsu sugerem a utilização de P102 em vacinas na publicação da patente internacional WO 99/26664 mas não referem ensaios com vacinas.

Lloyd L.C. *et al* (1989; Australian Veterinary Journal, vol. 66, nº.1, páginas 9-12) revela um método para o tratamento ou prevenção de uma doença em porcos causada por infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae*. A idade média dos animais tratados era de 75,6 dias.

Nenhuma das vacinas de *M. hyo* conhecidas foi descrita como sendo eficaz num tratamento com uma única dose a aproximadamente os 3 a 10 dias de idade. Uma tal vacina iria eliminar a necessidade de administração múltipla e desse modo iria diminuir de um modo significativo os custos e trabalho associado à vacinação massiva em todo o mundo de varas de porcos. Assim, existe uma necessidade de encontrar uma vacina de *M. hyo* eficaz que possa ser administrada a porcos numa vacinação numa única dose aos de cerca de 3 a cerca de 10 dias de idade para proteção e prevenção de doenças ou afecções causadas por *M. hyo*.

Sumário do Invento

O presente invento proporciona a utilização de uma bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* no fabrico de uma vacina para o tratamento ou prevenção de uma doença ou

afecção num animal causada por infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* compreendendo a administração ao animal aos 3 a 10 dias de idade, de uma quantidade eficaz de uma única dose de uma vacina de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

A utilização do presente invento elimina a necessidade de doses adicionais a fim de dar origem e/ou manter imunidade contra *M. hyo*. A presente utilização de uma vacinação com uma dose única (uma) proporciona proteção a porcos tanto seronegativos como seropositivos contra o desafio com *M. hyo* virulento. A utilização do presente invento é eficaz no tratamento ou prevenção dos sintomas causados por infecção por *M. hyo*, incluindo, por exemplo, a prevenção e redução de lesões pulmonares em porcos.

A vacina de *M. hyo* administrada de acordo com o presente invento pode incluir componentes adicionais, tais como um adjuvante. Vários adjuvantes que podem ser usados incluem os aqui descritos e os conhecidos nesta técnica.

Descrição Detalhada do Inven

O presente invento abrange a utilização de uma bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* no fabrico de uma vacina para tratamento ou prevenção de uma doença ou afecção num animal causado por infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* compreendendo a administração ao animal a de cerca de 3 a cerca de 10 dias de idade, de uma quantidade eficaz de uma dose única de uma vacina de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

A vacinação com uma dose única do presente invento elimina a necessidade de administração de doses adicionais a porcos a fim de dar origem e/ou manter imunidade contra *M. hyo*.

Para esclarecimento da apresentação, e não a título limitativo, a descrição detalhada do invento é dividida nas seguintes subsecções que descrevem ou ilustram certos aspectos, apresentações ou aplicações do invento.

Em certas apresentações, as vacinas usadas na utilização do presente invento compreendem uma preparação inactivada de *M. hyo* com células parciais ou totais (bacterina) ou vacina viva modificada e um veículo farmacêuticamente aceitável, ou preparação inactivada de *M. hyo* com células parciais ou totais (bacterina) ou vacina viva modificada e um adjuvante.

Definições e Abreviaturas

O termo "tratamento ou prevenção" no que se refere a uma infecção por *M. hyopneumoniae* tal como é aqui usado significa inibir a replicação de bactérias *M. hyopneumoniae*, inibir a transmissão de *M. hyipneumoniae*, ou evitar que *M. hyopneumoniae* se estabeleça no seu hospedeiro, e aliviar os sintomas da doença ou afecção causada por infecção com *M. hyopneumoniae*. O tratamento é considerado terapêutico se existir uma redução na carga de

bactérias, diminuição nas infecções pulmonares e/ou aumento na ingestão alimentar e/ou crescimento. O método do presente invento é, por exemplo, eficaz na prevenção ou redução de lesões pulmonares.

O termo "vacina de *M. hyo*" tal como é aqui usado refere-se a uma vacina útil na prevenção ou tratamento de uma afecção ou doença causada por infecção com *M. hyo*. A vacina de *M. hyo* pode incluir qualquer vacina eficaz no tratamento ou prevenção de infecção em porcos por *M. hyo*. A vacina de *M. hyo* que pode ser usada no presente invento pode incluir, por exemplo, uma preparação celular de *M. hyo* total ou parcial, vacinas vivas inactivadas ou modificadas, uma vacina subunitária tendo um ou mais polipeptídeos ou proteínas derivados de *M. hyo*, ou fragmentos imunogénicos dessas proteínas ou polipeptídeos, ou um ou mais genes *M. hyo* ou ácidos nucleicos codificando um ou mais polipeptídeos ou proteínas *M. hyo*, ou seus fragmentos imunogénicos, e genes ou ácidos nucleicos esses que são capazes de ser expressos *in vivo* em porcos. Os polipeptídeos, proteínas de *M. hyo*, fragmentos imunogénicos desses polipeptídeos e proteínas, ou genes ou ácidos nucleicos de *M. hyo* podem ser sintetizados ou produzidos de um modo recombinante usando técnicas conhecidas nesta técnica. De preferência, a vacina de *M. hyo* usada no método do presente invento é um bacterina.

O termo "animal" tal como é aqui usado refere-se a todos os animais não humanos, incluindo mamíferos.

O termo "porco" tal como é aqui usado refere-se a leitões, suíños, porcos, porcinos, porcas, marrãs, porcos castrados, varrascos e membros da família Suidae.

De preferência, o método do presente invento é aplicado a um animal que é um mamífero não humano; com a maior preferência, um porco.

O termo "bacterina" tal como é aqui usado refere-se a uma preparação de células de *M. hyo* totais ou parciais apropriadas para utilização como uma vacina.

O termo "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade de vacina de *M. hyo* suficiente para desencadear uma resposta imunitária no indivíduo a que seja administrada. A resposta imunitária pode compreender, sem limitação, indução de imunidade celular e/ou humoral, inata.

Vacinas Vivas Inactivadas (Célula Parcial ou Total) e
Modificadas

Métodos para a preparação de vacinas vivas convencionais inactivadas ou modificadas para utilização no método do presente invento são conhecidos nesta técnica.

Bacterinas *M. hyo* que podem ser utilizadas no presente método de vacinação com uma única dose podem ser obtidos a partir de várias fontes publicamente disponíveis.

Por exemplo, Bacterinas *M. hyo* podem ser preparadas a partir de isolados de *M. hyo*. Numerosos isolados de *M. hyo* são conhecidos dos especialistas nesta técnica e encontram-se disponíveis a partir de, por exemplo, the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Estes incluem por exemplo: ATTC nos. 25095, 25617, 25934, 27714 e 27715.

Isolados de *M. hyo* podem também ser obtidos directamente a partir de lesões pulmonares de porcos infectados naturalmente ou experimentalmente usando técnicas conhecidas.

Isolados de *M. hyo* podem ser inactivados usando uma série de métodos conhecidos, por exemplo, tratando o isolado de bactérias com etilenoimina binária (BEI) tal como é descrito na Patente dos E.U.A. No. 5.565.205, ou inactivando com, por exemplo, formalina, calor, BPL, irradiação ou glutaraldeído.

Bacterinas *M. hyo* apropriados para utilização no método do presente invento podem também ser obtidos através de várias fontes comerciais. Essas fontes incluem mas não de limitam a: RESPIFEND (Fort Dodge, American Home Products), HYORESP (Merial Ltd), M + PAC (Schering Plough), PROSYSTEM M (Intervet), INGLEVAC M (Boehringer), RESPISURE (Pfizer Inc.), e STELLAMUNE MYCOPLASMA (Pfizer Inc.).

Uma fonte preferida de bacterina *M. hyo* para

utilização no método do presente invento é RESPISURE e STELLAMUNE MYCOPLASMA.

Uma fonte particularmente preferida de bacterina de *M. hyo* para utilização no método do presente invento é RESPISURE - (Pfizer Inc.), contendo estirpe P-5722-3 (NL 1042), adquirida a partir de Purdue University, USA.

De preferência, a estirpe P-5722-3 é inactivada com BEI e é adjuvada com um adjuvante comercialmente disponível, de preferência, AMPHIGEN (Hydronics, USA). Uma dose preferida é de cerca de 2,0 ml. Agentes de conservação convencionalmente usados incluem mertiolate/EDTA. Pode ser adicionado um veículo, de preferência PBS. A preparação de vacinas vivas modificadas, tais como por atenuação de estirpes virulentas por passagem em cultura, é conhecida nesta técnica.

Formulações de Vacina

Preparações apropriadas das vacinas usadas no presente invento incluem produtos injectáveis, quer como soluções quer como suspensões líquidas; podendo também ser preparadas formas sólidas apropriadas para solução em, ou suspensão em, líquido antes da injecção. A preparação pode também ser emulsificada. Os ingredientes imunogénicos activos são frequentemente misturados com adjuvantes os quais são farmacêuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo.

Os polipeptídeos podem ser formulados na vacina sob a forma de formas neutras ou salinas. Sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com grupos amino livres do peptídeo) e que são formados com ácidos inorgânicos, tais como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou ácidos orgânicos tais como ácido acético, oxálico, tartárico, maleico, etc. Sais formados com grupos carboxilos livres podem também ser derivados de bases inorgânicas, tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio, ou férro, e bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, 2- etilamino etanol, histidina, procaina, etc.

As formulações de vacina usadas no presente invento compreendem uma quantidade imunizadora eficaz do imunogénio de *M. hyo* e um veículo farmacêuticamente aceitável. Preparações de vacina compreendem uma quantidade imunizadora eficaz de um ou mais抗énios e um veículo farmacêuticamente aceitável. Veículos farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos nesta técnica e incluem mas não se limitam a solução salina, solução salina tamponada, dextrose, água, glicerol, tampão aquoso isotónico estéril, e suas combinações. Um exemplo de um tal veículo aceitável é um meio de cultura equilibrado fisiologicamente contendo um ou mais agentes de estabilização tais como proteínas hidrolisadas, estabilizadas, lactose, etc. O veículo é de preferência estável. A formulação deve ser apropriada para o modo de administração.

A utilização de antigénios purificados como preparações para vacinas pode ser realizada por métodos padronizadas. Por exemplo, a(s) proteína(s) purificada(s) devem ser ajustada(s) até uma concentração apropriada, formulada(s) com qualquer adjuvante apropriado de vacina e embalagem para utilização. Adjuvantes apropriados podem incluir, mas não se limitam a: geles minerais, por exemplo, hidróxido de alumínio; substâncias tensio activas tais como lisolecitina; glicósidos, por exemplo, derivados de saponina tais como Quil A ou GPI-0100; surfactantes catiónicos, por exemplo DDA (halogenetos de hidrocarboneto quaternário-amónio, polímeros plurónicos; polianiões e iões poliatómicos; ácidos poliacrílicos, polímeros de bloco não-iónicos, por exemplo, Pluronic F-127 (B.A.S.F., USA); Avridine e Rantidine; peptídeos; toxinas lábeis mutantes recombinantes, por exemplo, leucotoxina (rmLT) ou toxina da cólera (CT); agentes de transporte moleculares ligados quimicamente ou de proximidade íntima; óleos minerais, por exemplo Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, France), carbopol, Amphigen (Hydronics, USA), Omaha, NE, USA, emulsões em óleo Alhydrogel, (Superfos Biosector, Frederikssund, Denmark), por exemplo uma emulsão de óleo mineral tal como BayoIF/Arlacel A e água, ou uma emulsão de óleo vegetal, água e um emulsificador tal como lecitina; álumen, e MDP, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmítoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina; citoquinas do colesterol e combinações de adjuvantes. Os iões poli-

atómicos podem também funcionar como agentes de dispersão, de espessamento e contra a formação de massa que permitem que a vacina seja suspensa de novo sob a forma de uma suspensão monodispersa após um período de prolongamento de fixação. As combinações adjuvantes podem ser apresentadas em formas aquosas, encapsuladas (de liberação controlada ou retardada) ou microencapsuladas.

O imunogénio pode também ser incorporado em liposomas, ou conjugado para polissacarídeos e/ou outros polímeros para utilização numa formulação de vacina. No caso em que o antigénio recombinante é hapten, isto é, uma molécula que é antigénica pelo facto de poder reagir selectivamente com anticorpos cognatos, mas não imunogénicos pelo facto de não poderem desencadear uma resposta imunitária, o hapten pode ser ligado de um modo covalente a um veículo ou molécula imunogénica; por exemplo, uma proteína grande tal como albumina do soro irá conferir imunogenicidade ao hepten a ela acoplado. O veículo-hapten pode ser formulado para utilização como uma vacina.

Vacinas de Gene e de Ácido Nucleico

O método do presente invento pode ser praticado usando genes ou ácidos nucleicos de *M. hyo* codificando proteínas, polipeptídeos imunogénicos e fragmentos imunogénicos dessas proteínas e polipeptídeos. Esses genes e ácidos nucleicos podem ser expressos *in vivo* e podem ser preparados usando técnicas conhecidas nesta técnica.

Numa apresentação específica, a vacina usada no presente invento compreende pelo menos um gene ou ácido nucleico codificando uma proteína de *M. hyo* tal como, mas não se limitando a, P46, P65, P97, P102, P70, P50 e P44.

Numa outra apresentação específica, os genes ou ácidos nucleicos usados no método do presente invento codificando fragmentos imunogénicos das proteínas e polipeptídeos de *M. hyo* têm uma sequência compreendendo pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50 ou pelo menos 100 amino ácidos contíguos das proteínas e polipeptídeos imunogénicos usados no método do presente invento, incluindo mas não se limitando a P46, P65, P97, P102, P70, P50 e P44.

Noutras apresentações do método do presente invento, o gene ou ácido nucleico usados são administrados por métodos conhecidos, tais como, por exemplo, por utilização de um espingarda genética.

Ainda noutras apresentações do método do presente invento, o gene ou ácidos nucleicos usados são vacinas de ADN. Além disso, o ácido nucleico ou genes podem estar presentes em associação com liposomas ou outros agentes que facilitam a transfecção, tal como são conhecidos nesta técnica.

Métodos para a preparação e administração de vacinas de ADN são conhecidos nesta técnica. Ver, por

exemplo, Krishnan, B. R., "Current Status of DNA vaccines in veterinary medicine", Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier Science (2000).

Sistemas de Expressão

Uma série de sistemas de vector de hospedeiro-expressão pode ser utilizada para expressar as sequências de proteína antigénica do invento. Esses sistemas hospedeiro-expressão representam veículos pelos quais as sequências de codificação de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas representam também células que podem, quando transformadas ou transfetadas com as sequências de codificação de nucleótido, apresentar os produtos genéticos de *M. hyo* usados no método do presente invento *in situ*. Estes incluem mas não se limitam a microorganismos tais como bactérias (por exemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas com vectores de expressão de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plasmídeo ou ADN de cosmid contendo sequências de codificação *mhp3*; levedura (por exemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada com vectores de expressão de levedura recombinante contendo as sequências de codificação do produto genético de *M. hyo*; sistemas de células de insectos infectadas com vectores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, baculovírus) contendo as sequências de codificação de *M. hyo*; sistemas celulares de plantas infectadas com vectores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, vírus mosaico da couve flor, CaMV; vírus mosaico do tabaco, TMV) ou vectores de

expressão de plasmídio recombinante (por exemplo, plasmídio Ti) contendo sequências de codificação de *M. hyo*; ou sistemas de células de mamíferos (por exemplo, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) albergando construções de expressão recombinante contendo promotores derivados do genoma de células de mamífero (por exemplo, promotor de metalotionein) ou de vírus de mamíferos (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus; o promotor 7,5K de vírus de vaccinia). Numa apresentação preferida, o sistema de expressão é um sistema bacteriano.

Polipeptídeos e proteínas de *M. hyopneumoniae* e seus fragmentos imunogénicos podem também ser expressos e administrados usando vectores virais e bacterianos recombinantes vivos tais como adenovírus ou *Salmonella*. Os actuais vectores são também conhecidos e encontram-se rapidamente disponíveis nesta técnica ou podem ser construídos por qualquer especialista nesta técnica usando metodologia bem conhecida.

Dosagem e Modos de Administração

De acordo com o presente invento, uma dose única de uma quantidade eficaz de uma vacina de *M. hyo* administrada a porcos com aproximadamente 3 a 10 dias de idade proporciona imunidade eficaz contra um posterior desafio de *M. hyo*. De preferência, a vacina de *M. hyo* é administrada a cerca dos seis a cerca dos oito dias de idade. Com a

maior preferência, a vacina de *M. hyo* é administrada a cerca dos sete dias de idade.

A quantidade de uma vacina de bacterina de *M. hyo* eficaz numa administração de uma dose contém cerca de 1×10^6 a cerca de 5×10^{10} unidades de modificação da cor (CCU) por dose. De preferência, uma vacina de bacterina de *M. hyo* que porporciona imunidade eficaz numa dose única contém cerca de 1×10^8 a 5×10^{10} CCU/dose e com maior preferência, cerca de 5×10^8 a 5×10^{10} CCU/dose.

De acordo com o presente invento, quando o produto bacterina preferido RESPISURE - 1 é administrado, a quantidade de RESPISURE -1 para uma administração numa dose é de cerca de 0,5 a cerca de 3,0 ml, de preferência de cerca de 1,5 ml a cerca de 2,5 ml, e com maior preferência, cerca de 2 ml.

A quantidade de vacina de *M. hyo* que é uma vacina subunitária compreendendo uma ou mais proteínas ou polipeptídeos ou fragmentos imunogénicos dessas proteínas ou polipeptídeos eficazes no método do presente invento varia entre cerca de 0,01 µg e cerca de 200 µg.

A quantidade de vacina de *M. hyo* que é uma vacina compreendendo um ou mais genes ou ácidos nucleicos de *M. hyo* (de preferência ADN) codificando proteínas ou polipeptídeos imunogénicos ou fragmentos imunogénicos dessas proteínas ou polipeptídeos eficazes no método do presente invento varia entre cerca de 0,1 µg e cerca de 200 mg.

De acordo com o presente invento, a administração pode ser conseguida por vias conhecidas, incluindo a via oral, intranasal, tópica mucosa, transdérmica, e parentérica (por exemplo, a via intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutânea ou intramuscular). A administração pode também ser realizada usando dispositivos sem agulha. A administração pode ser realizada usando uma combinação de vias de administração, por exemplo primeira administração usando uma via parentérica e subsequente administração usando uma via mucosa. Uma via preferida de administração é a administração intramuscular.

Doses eficazes (quantidade imunizantes) das vacinas do invento podem também ser extrapoladas a partir de curvas dose-esposta derivadas dos sistemas modelo do teste.

Os presentes métodos de vacinação proporcionam imunidade protectora tanto para porquinhos seropositivos como para porquinhos seronegativos para *M. hyo*. Porquinhos seropositivos refere-se a porquinhos que apresentam no soro anticorpos contra *M. hyo*. Porquinhos seronegativos refere-se aos porquinhos que não apresentam no soro, níveis detectáveis de anticorpos contra *M. hyo*.

O presente invento é ainda ilustrado, mas não se limita aos exemplos que se seguem.

Exemplo 1

Preparação de um bacterina de *M. hyo*

Etilenomina binária (BEI) é usado para inactivação da estirpe NL 1042 de *M. hyo*.

No final do período de crescimento, o pH da cultura foi elevado para $7,8 \pm 0,2$, e o pH foi mantido nesta gama durante pelo menos uma hora. Nesta altura, uma solução aquosa esterilizada por filtração de hidrobrometo de 2-bromoetilamina (BEA) foi adicionada a uma concentração final de aproximadamente 4,0 mM. Na presença do pH elevado, o BEA é quimicamente modificado para BEI. A cultura foi incubada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ com agitação constante durante pelo menos 24 horas.

Após 24 horas de incubação, uma solução aquosa de tiosulfato de sódio esterilizada por filtração foi adicionada até uma concentração final de aproximadamente 4 mM a fim de neutralizar BEI em excesso. A cultura foi incubada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ com agitação constante durante 24 horas adicionais.

A seguir a inactivação, mas antes da neutralização com tiosulfato de sódio, uma amostra representativa foi colhida e testada para completar a inactivação. Meio fresco contendo 0,0026% de vermelho de fenol foi inoculado com um inóculo a 5-20% e foi incubado a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos uma semana antes do exame para uma mudança de

cor, que é indicativa de insucesso para inactivar. Amostras a granel foram testadas quanto a esterilidade em caldo de tioglicolato a $37 \pm 2^\circ C$, e caldo de soja tripticase à temperatura ambiente. A cultura inactivada pode ser transferida para recipientes de armazenamento estéreis e armazenada a $2-8^\circ C$ até reunidos.

A potência foi determinada por um ensaio serológico in vitro a fim de quantificar antigénio no recipiente final. A potência das vacinas usadas no estudo de eficácia determina a potência mínima que deve estar presente na vacina à data de expiração.

As amostras de produto completo a granel ou do recipiente final de cada série ou primeira subsérie foi testada em relação a *M. hyo* como se segue.

O bacterina foi armazenado a $-50^\circ C$ em recipientes de 100 ml. Os recipientes foram descongelados e porções sub-alíquotas de 15 ml são armazenadas a $5+/-2^\circ C$ até utilização.

Para testar a potência de uma série reunida, uma amostra da série foi comparada com uma referência, e unidades RP são determinadas para a série. Uma série ou subsérie deveria de preferência conter pelo menos 6,33 RP no início da datação, e pelo menos 5.06 RP ao longo da datação.

RP refere-se a potência relativa. Os RPs podem ser determinados por uma quantificação relativa de抗igénio em comparação com a vacina de referência. Neste caso a referência tem um RP por definição = 1,0. O produto de dose única do presente invento tem de preferência um RP de 6,33, que é 6,33 vezes a referência.

Mertiolato é adicionado como um agente de conservação numa concentração final que não exceda 0,01% (p/v).

Solução de ácido etileno-diamino-Tetra-acético a 10% (EDTA, sal dissódico ou tetrassódico) é adicionada como um agente de conservação numa concentração final de aproximadamente 0,07% (p/v).

Exemplo 2

Animais

Porcos com aproximadamente uma semana de idade foram seleccionados para vacinação. O estado serológico para *M. hyo* foi avaliado num ensaio ELISA. Porcos com um valor de ELISA $\leq 0,50$ foram considerados *M. hyo* negativos. Porcos com um valor de ELISA superior a 0,50 foram considerados serologicamente positivos para *M. hyo*.

Vacinas

Bacterina *M. hyo* RESPISURE - (Pfizer Inc.), foi usada para vacinar porcos. A potência da vacina foi determinada antes da sua utilização por quantificações relativa de antigénio em comparação com um bacterina de *M. hyo* de referência. A vacina de rerefência (RP = 1,0) continha cerca de 8.000 unidades de antigénio (cerca de 1 a 2×10^8 CCU de células viávies colhidas antes da inactivação) por dose, determinadas por um imunoensaio de fase sólida que mediu a quantidade de antigénio de *M. hyo* na vacina.

O mesmo adjuvante líquido (AMPHIGEN) usado na formulação RESPISURE - 1 foi usado como placebo (isto é, sem células bacterianas).

Inóculo de Desafio

O inóculo de desafio, foi proporcionado sob a forma de porções alíquotas de 10 ml de homogenato de pulmão, foi congelado a -70° C, e foi identificado como um derivado da estirpe 11 de *M. hyo* (L1 36). O inóculo foi descongelado e em seguida diluido em Friis Mycoplasma Broth para se conseguir uma diluição de 1:25, e foi mantido em gelo até à sua administração. Cada porco recebeu uma dose intranasal de 5 ml (2,5 ml por narina) da suspensão 1:25 em dias especificados em cada um dos exemplos que se seguem. Em cada dia do desafio, uma porção alíquota do inóculo do

pulmão foi cultivado de modo a confirmar a ausencia de contaminação bacteriana. Uma segunda porção aliquota foi titulada de novo em cada um dos 3 dias, e os resultados indicaram que o inóculo continha aproximadamente 10^6 - 10^7 unidades de modificação da cor (CCU)/ml de *M. hyo*.

Processo Experimental

Porcos foram identificados com etiquetas nas orelhas enquanto se encontravam ainda na porca [Dia (-1)]. Os porcos foram distribuidos por currais e por grupos de tratamento de acordo com um esquema de bloco aleatório generalizado. Os porcos foram bloqueados tendo como base currais de ninhadas e de porquinhos desmamados.

No dia 0, porcos foram vacinados com quer uma dose intramuscular de 2 ml de bacterin de *M. hyo* RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.), quer com uma dose intramuscular de placebo. Cada porco recebeu uma dose intranasal de 5 ml da suspensão 1:25 do inóculo de desafio em dias especificados em cada um dos exemplos que se seguem. Todos os porcos foram monitorizados e avaliados diariamente quanto a sinais clínicos de doença.

Num tempo especificado após o primeiro dia de desafio, todos os porcos foram submetidos a eutanásia e foram autopsiados. Os pulmões foram removidos e avaliados. O exame post-mortem uncluiu uma estimativa da extensão da patologia associada à doença respiratória micoplasmal. Cada

lobo pulmonar foi examinado, e as lesões foram esboçadas a fim de avaliar a percentagem de envolvimento de cada lobo. Foi registado o grau de lesões grosseiras.

Análise dos Dados

A eficácia foi avaliada tendo como base a percentagem de lesões pulmonares típicas de uma infecção por *M. hyo*. Foi determinado que porcos num grupo de tratamento (vacinados) tinham uma percentagem de pulmão total com lesões que era significativamente menor ($P \geq 0,05$) do que no grupo placebo.

Percentagem do Pulmão Total com Lesões

O envolvimento grosseiro percentual para cada lobo pulmonar foi pesado usando os rácios que se seguem entre lobos individuais do pulmão e a massa total do pulmão; crâniano esquerdo 10%, medio esquerdo 10%, caudal esquerdo 25%. crâniano direito; 10%, médio direito 10%, caudal direito 25%, e acessório 10%. Os valores pesados do lobo do pulmão foram então somados através de lobos para proporcionar a Percentagem de Pulmão Total com Lesões (Pointon et al., 1992).

Exemplo 3

A protecção contra desafio com *M. hyo* virulento foi avaliada em porcos serologicamente positivos para *M.*

hyo usando uma dose única de bacterina *M. hyo* RESPISURE - 1 (pfizer Inc), administrada a porcos aos 3 a 8 dias de idade.

Cinco ensaios replicados de potência para RESPISURE - 1 foram conduzidos a ou à volta do tempo de vacinação. A potência relativa (RP) foi determinada por quantificação relativa de antigénio em comparação com uma vacina de referência. A vacina de referência, tendo um RP = 1,0, continha cerca de 8.000 unidades de antigénio de *M. hyo*. Os RPs destes cinco ensaios foram de 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 e 4,36, respectivamente.

No dia 0, porcos no Grupo de Tratamento T02 (ver Quadro 1 mais abaixo) foram vacinados com uma dose intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.). Porcos no Grupo T01 foram vacinados por via intramuscular com 2 ml de um placebo. Cada porco recebeu uma dose intranasal de 5 ml da suspensão 1:25 do inóculo de desafio nos Dias 178, 179 e 180. Em cada um dos 3 dias, uma porção alíquota do material de desafio foi cultivada na altura da inoculação a fim de confirmar a ausencia de contaminação bacteriana. Uma segunda porção alíquota foi titulada de novo a fim de confirmar que o stock de desafio continha aproximadamente 10^7 CCU/ml de *M. hyo*. Todos os porcos foram monitorizados e avaliados diariamente quanto a sinais de doença clínica.

Trinta dias após o primeiro dia de desafio, todos os porcos foram submetidos a eutanásia e foram autopsiados. Os pulmões foram removidos e avaliados. O exame post-mortem incluiu uma estimativa da extensão da patologia associada a doença respiratoria micoplasmal. Cada lobo do pulmão foi examinado, e as lesões foram esboçadas para avaliar a percentagem de envolvimento de cada lobo. Foi registado o grau de lesões grosseiras presentes.

Quadro 1

Grupo de Tratamento	Composto Vacinação	Número	Vacinados Dia 0	Desafio Dia 178 ¹	Desafio Dia 179 ¹	Desafio Dia 180 ¹
T01	Placebo	26	26	26	26	26
T02	Vacina	26	26	24 ²	22 ³	22 ³

¹ Inóculo de *M. hyo* virulento

² Porcos 71 e 73 foram removidos do estudo antes do desafio porque ambos os animais perderam todas as etiquetas das orelhas e assim não foi possível a identificação de cada animal.

³ O porco 36 foi encontrado morto no Dia 178 devido a complicações da anestesia. O porco 31 foi encontrado morto no Dia 179 devido a complicações da anestesia.

Os resultados das lesões do pulmão são resumidos no Quadro 2. Os resultados indicaram que porcos vacinados (T02) apresentavam uma percentagem média de mínimos quadrados significativamente mais baixa ($P=0,0385$) de lesões pulmonares pneumónicas do que porcos placebo (T01) (2,0 vs. 4,5%).

Quadro 2. Resumo de Percentagem de Lesões Toatais Pulmonares

Tratamento	Composto	Número de Porcos	Média de LS	Variação
T01	Placebo	26	4,5 ^a	0 a 36,75
T02	Vacina	22	2,0 ^b	0 a 13,75

^{a,b} Valores com um índice superior diferente são estatisticamente significativos ($P=0,0385$)

Os resultados indicam que a vacinação em dose única de porcos com aproximadamente uma semana de idade com bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1, induziu proteção contra um subsequente desafio com *M. hyo* virulento.

Exemplo 4

A proteção contra desafio com *M. hyo* virulento foi avaliada em porcos serologicamente negativos em relação a *M. hyo* usando uma única dose de bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1, administrada a porcos aos 3 a 8 dias de idade.

Cinco ensaios de potência replicada para a vacina foram conduzidos mais ou menos na altura da vacinação. O RP foi determinado por uma quantificação relativa de抗原 em comparação com uma vacina de referência. A vacina de referência, tendo um RP = 1,0, continha cerca de 8.000 unidades de抗原 de *M. hyo*. Os RPs destes cinco ensaios foram de 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 e 4,36 respectivamente.

No Dia 0, porcos no Grupo de Tratamento T02 foram vacinados com uma dose intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1.. Porcos no Grupo T01 foram vacinados por via intramuscular com 2 ml de placebo. Cada porco recebeu uma dose intranasal de 5 ml da suspensão 1:25 do inóculo de desafio nos Dias 173, 174 e 175. Em cada um dos 3 dias, uma porção alíquota do material de desafio foi cultivado na altura da inoculação para confirmar a ausencia de contaminação bacteriana. Uma segunda porção alíquota foi titulada de novo para confirmar que o stock de desafio continha aproximadamente 10^6 CCU/ml de *M. hyo*. Todos os porcos foram monitorizados e avaliados diariamente quanto a sinais de doença clínica.

Vinte e nove dias após o primeiro dia de desafio, todos os porcos foram submetidos a eutanásia e foram autopsiados. Os pulmões foram removidos e avaliados. O exame post-mortem incluiu uma estimativa da extensão da patologia associada a doença respiratória induzida por *M. hyo*. Cada lobo do pulmão foi examinado, e as lesões foram esboçadas a fim de avaliar a consolidação percentual em cada lobo. Foi registado o grau de lesões grosseiras presentes.

O Quadro 3 resume o esquema experimental.

Quadro 3

Tratamento	Vacinação	Número	Vacinados	Desafio	Desafio	Desafio
Grupo	Composto			Dia 0	Dia 173 ¹	Dia 174 ¹
T01	Placebo	26	26	25 ²	24 ⁴	24
T02	Vacina	26	26	23 ³	20 ⁵	20

¹ *N. hyo* Virulento.² O porco 123 foi submetido a eutanásia no Dia 19 devido a poliartrite séptica crónica.³ O porco 222 foi encontrado morto no Dia 40. A autópsia revelou uma grande quantidade de líquido pericárdico e hemorragia no epicárdio. O porco 102 foi submetido a eutanásia no Dia 95 devido a um prolapso rectal. O porco 204 foi encontrado morto no Dia 145. Não foi realizada autopsia devido a decomposição avançada da carcaça.⁴ O porco 244 foi encontrado morto no Dia 174 a seguir ao primeiro dia de desafio devido a complicações da anestesia.⁵ NEEA para avaliação de 3 porcos.

Os resultados da lesão pulmonar são resumidos no Quadro 4. A análise global indicou que porcos vacinados (T02) apresentavam uma percentagem média least squares significativamente mais baixa ($P=0,0001$) de lesões pneumáticas do pulmão do que porcos placebo (T01) (0,3 vs. 5,9%).

Quadro 4. Resumo de Percentagem de Lesões Pulmonares TotaisPercentagem de Pulmão com Lesão

Tratamento	Composto	Número de Porcos	LS Médio	Variação
T01	Placebo	24	5,9a	0 a 36
T02	Vacina	20	0,3b	0 a 6

^{a,b} Valores com um índice superior diferente são estatisticamente diferentes ($P=0,0001$).

Os resultados deste estudo indicam que a vacinação numa dose única de porcos com bacterina de *M. hyo* RESIPURE ONE induziu protecção contra um subsequente desafio experimental com *M. hyo* virulento.

Exemplo 5

A protecção contra desafio com *M. hyo* virulento foi avaliada em porcos serologicamente negativos para *M. hyo* usando uma dose única de bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 administrado a porcos aos 3 a 8 dias de idade.

Cinco ensaios de potência replicados para o bacterina foram conduzidos a ou à volta da altura da vacinação. O RP foi determinado por uma quantificação relativa de抗igénio em comparação com uma vacina de referência. A vacina de referência, tendo um RP = 1,0, continha cerca de 8.000 unidades de抗igénio de *M. hyo*. Os RPs destes cinco ensaios foram de 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 e 4,36, respectivamente.

No Dia 0, porcos no Grupo de Tratamento T02 foram vacinados com uma dose intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo*. Porcos no Grupo T01 foram vacinados por via intramuscular com 2 ml de placebo. Cada porco recebeu uma dose intranasal de 5 ml (2,5 ml por narina) da suspensão 1:25 do inóculo de desafio nos Dias 76, 77 e 78. Em cada um dos 3 dias, uma porção aliquota do material de desafio foi cultivada na altura da inoculação para confirmar a ausencia de contaminação bacteriana. Uma segunda porção aliquota foi

titulada de novo para confirmar que o stock de desafio continha aproximadamente 10^6 CCU/ml de *M. hyo*. Todos os porcos foram monitorizados e avaliados diariamente quanto a sinais de doença clínica.

Vinte e nove dias após o primeiro dia de desafio, todos os porcos foram submetidos a eutanásia e foram autopsiados. Os pulmões foram removidos e avaliados. O exame post-mortem incluiu uma estimativa da extensão de patologia associada a doença respiratória induzida por *M. hyo*. Cada lobo do pulmão foi examinado, e as lesões foram esboçadas para avaliar o envolvimento percentual em cada lobo. Foi registado o grau de consolidação presente.

O Quadro 5 resume o esquema experimental.

Quadro 5

Grupo de Tratamento	Composto de Vacinação	Número	Vacinados	Desafio Dia 176 ¹	Desafio Dia 177 ¹	Desafio Dia 178 ¹
			Dia 0			
T01	Placebo	26	26	23 ²	23	23
T02	Vacina	26	26	21 ³	21	21

¹ Inóculo de *M. hyo* Virulento

² Porcos 237 e 239 com teste positivo no Dia - 1 para pneumonia *M. hyo*. Estes porquinhos foram removidos a partir do estudo no Dia 14 e foram submetidos a eutanásia. O porco 220 foi encontrado morto no Dia 3 devido a ter sido esmagado pela porca.

³ Porcos 238, 240 e 277 com teste positivo no Dia - 1 para pneumonia *M. hyo*. Estes porquinhos foram removidos a partir do estudo no Dia 14 e foram submetidos a eutanásia. O porco 280 foi submetido a eutanásia no Dia 7 depois de ter sido anoréxico e perdulário. O porco 177 foi submetido a eutanásia no Dia 40 devido a síndrome de enfraquecimento crónico.

As lesões pulmonares resultantes são resumidas no Quadro 6. A análise global indicou que porcos vacinados (T02) apresentavam uma percentagem média de mínimos quadrados significativamente mais baixa ($P=0,0001$) de lesões pulmonares pneumónicas do que porcos placebo (T01) (0,5 vs. 9,9%).

Quadro 6. Resumo de Percentagem de Lesões do Pulmão Total

Percentagem de Pulmão com Lesão				
Tratamento	Composto	Número de Porcos	LS Médio	Variação
T01	Placebo	23	9,9a	0 a 40,5
T02	Vacina	21	0,5b	0 a 5

^{a,b} Valores com diferentes índices superiores são estatisticamente diferentes ($P=0,0001$).

Lisboa, 4 de Novembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de bacterina *Mycoplasma hyopneumoniae* no fabrico de uma vacina para o tratamento ou prevenção de uma doença ou afecção num animal causado por infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* para administração ao animal com 3 a 10 dias de idade, de uma quantidade eficaz de uma dose única da vacina de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

2. Utilização da reivindicação 1, em que a dose única de vacina de *M. hyopneumoniae* contém de 1×10^6 a 5×10^{10} unidades que modificam a cor (CCU) por dose.

3. Utilização da reivindicação 1, em que a quantidade da referida vacina administrada varia entre 0,5 e 3,0 ml.

4. Utilização da reivindicação 1, em que a bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* contém estirpe P-5722-3.

5. Utilização da reivindicação 1, em que a vacina de *Mycoplasma hyopneumoniae* comprehende ainda um antigénio viral ou bacteriano diferente de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

6. Utilização da reivindicação 5, em que os referidos antigénios virais ou bacterianos são seleccio-

nados de entre vírus de influenza dos porcos (SIV), vírus da doença porcina reprodutiva e respiratória (PRRS ou doença porcina misteriosa), diarreia após o desmame (PWD) e enterite porcina proliferativa (PPE).

7. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a referida preparação de *Mycoplasma hyopneumoniae* é para administração intramuscular.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos suínos são protegidos até 25 semanas a seguir à vacinação.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a vacina de *Mycoplasma hyopneumoniae* comprehende ainda um adjuvante.

Lisboa, 4 de Novembro de 2008

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 8628472 A
- EP 0475185 A1
- US 5788962 A
- WO 9115593 A
- US 5252328 A, Faulds
- WO 9509878 A
- WO 9928664 A
- US 5585205 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- FUTO et al. *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, 1915-1917
- FUTO et al. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, 680-683
- WISE ; KIM. *J. Bacteriol.*, 1987, vol. 169, 5546-5555
- KING et al. *Vaccine*, 1997, vol. 15, 25-35
- WILTON et al. *Microbiology*, 1998, vol. 144, 1931-1943
- HSU et al. *Gene*, 1998, vol. 214, 13-23
- LLOYD L.C. et al. *Australian Veterinary Journal*, 1989, vol. 66 (1), 9-12