

(11) Número de Publicação: **PT 2027873 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/00 (2015.01) **A61P 31/00** (2015.01)

(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: **2009.02.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.09.09**
215/2015

(73) Titular(es):

ZOETIS SERVICES LLC
100 CAMPUS DRIVE, FLORHAM PARK NEW
JERSEY 07932 US

(72) Inventor(es):

ROBIN LEE KEICH US
LISA GRACE SABBADINI US

(74) Mandatário:

MARIA TERESA DELGADO
AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINAÇÃO DE DOSE ÚNICA COM MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS PARA TRATAR OU PREVENIR UMA DOENÇA OU DISTÚRBIO NUM ANIMAL, CAUSADA POR INFECÇÃO COM MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE (M. HYO) ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO AO ANIMAL AOS CERCA DE TRÊS (3) A DEZ (10) DIAS DE IDADE DE UMA QUANTIDADE EFICAZ DE UMA VACINA DE M. HYO. A VACINA DE M. HYO PODE SER UMA PREPARAÇÃO VIVA INATIVADA OU MODIFICADA DE CÉLULAS INTEIRAS OU PARCIAIS, UMA VACINA DE SUBUNIDADE, OU UMA VACINA DE ÁCIDOS NUCLEICOS OU ADN. A VACINA DE M. HYO ADMINISTRADA DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO PODE SER SINTETIZADA OU PRODUZIDA ATRAVÉS DE RECOMBINAÇÃO.

RESUMO**"VACINAÇÃO DE DOSE ÚNICA COM *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*"**

A presente invenção refere-se a métodos para tratar ou prevenir uma doença ou distúrbio num animal, causada por infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) através da administração ao animal aos cerca de três (3) a dez (10) dias de idade de uma quantidade eficaz de uma vacina de *M. hyo*. A vacina de *M. hyo* pode ser uma preparação viva inativada ou modificada de células inteiras ou parciais, uma vacina de subunidade, ou uma vacina de ácidos nucleicos ou ADN. A vacina de *M. hyo* administrada de acordo com a presente invenção pode ser sintetizada ou produzida através de recombinação.

DESCRIÇÃO

"VACINAÇÃO DE DOSE ÚNICA COM *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a vacinas para utilização no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em porcos, causada através de infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) através da administração ao animal aos três (3) dias de idade, uma dose única de uma quantidade eficaz de vacina de *M. hyo*. A vacina de *M. hyo* é uma preparação viva inativada ou modificada de células inteiras ou parciais. A vacina de *M. hyo* administrada de acordo com a presente invenção pode ser produzida de forma sintética ou recombinante.

Antecedentes da Invenção

M. hyo é um agente patogénico bacteriano que causa pneumonia enzoótica em suínos. A pneumonia enzoótica é uma doença crónica que resulta em má transformação alimentar, crescimento deficiente e predisposição a infecções pulmonares secundárias. *M. hyo* é facilmente transmitido através de secreções do trato respiratório e através de transmissão de porca a leitão, e é altamente prevalente em quintas de porcos. Aproximadamente 99% das varas de porcos nos Estados Unidos estão infetadas, custando à indústria suína cerca de 300 milhões de dólares anualmente.

A maioria das vacinas conhecidas contra *M. hyo* foram baseadas em preparações de células inteiras inativadas de *M. hyo* com adjuvante. Adicionalmente, podem ser sintetizadas ou preparadas vacinas à base de polipéptidos ou proteínas imunogénicos através de clonagem e expressão recombinante de genes de *M. hyo*. Genes de *M. hyo* capazes de expressar tais polipéptidos ou proteínas *in vivo* podem também ser utilizados como vacinas.

Exemplos de vacinas de *M. hyo* inativado de células inteiras incluem RESPISURE e STELLAMUNE, disponíveis

comercialmente da Pfizer Inc., EUA.

Adicionalmente, foram descritos vários polipéptidos e proteínas imunogénicos de *M. hyo* produzidos através de recombinação que podem ser úteis como vacinas de subunidade. A Publicação de Patente Internacional WO 96/28472 descreve seis espécies de antígeno de proteína de *M. hyo* a massas moleculares de 46-48, 52-54, 60-64, 72-75, 90-94 e 110-114 quilodaltons, e divulga sequências proteicas parciais dos antígenos de 52-54, 60-64 e 72-75 quilodaltons e as sequências de nucleótidos e de aminoácidos de comprimento completo do antígeno de 46-48 quilodaltons.

A clonagem do gene codificando 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 mostrou que o produto génico expresso *in vitro* foi útil no diagnóstico de respostas de antígenos a infecções por *M. hyo* sem reatividade cruzada com outras espécies de Mycoplasma Futo et al. 1995, J. Clin. Microbiol. 33:680-683). As sequências e utilizações diagnósticas do gene p46 descrito por Futo et al. são adicionalmente divulgadas na Publicação de Patente Internacional N.º 0 475 185 A1.

Wise e Kim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555) relatam que existem quatro espécies de proteínas de membrana integrais em *M. hyo*, denominadas p70, p65 (P65, supra), p50 e p44, e que as três últimas são modificadas através de uniões lipídicas covalentes e induzem uma forte resposta imune humorai. Os efeitos de proteção da resposta imune não foram investigados. O gene que codifica a proteína P65 foi clonado, e as suas sequências e utilizações em vacinas e diagnósticos são descritas no Documento de Patente U.S. N.º 5.788.962.

A Publicação de Patente Internacional WO 91/15593 descreve cinco proteínas de *M. hyo* de massas moleculares aparentes de 105, 90, 85, 70 e 43 quilodaltons. Foi proporcionada uma sequência de comprimento completo do gene codificando a proteína de 85 quilodaltons (proteína C), bem

como sequências de nucleótidos parciais codificando as outras quatro proteínas.

A Patente U.S. N.º 5.252.328 para Faulds divulga sequências de terminais amino de proteínas de *M. hyo* imunorreativas, cujas massas moleculares são 36, 41, 44, 48, 64, 68, 74, 5, 79, 88, 5, 96 e 121 quilodaltons. Outras proteínas identificadas com base nas mobilidades eletroforéticas mas para as quais não foram divulgadas sequências proteicas tiveram massas moleculares aparentes de 22, 5, 34 e 52 quilodaltons. Enquanto o Documento de Patente U.S. N.º 5.252.328 propôs a utilização destas proteínas em formulações de vacinas, não foram relatados resultados de ensaios de vacinas.

A Publicação de Patente Internacional WO 95/09870 divulga métodos bioquímicos para a purificação de adesinas de *M. hyo*, as proteínas de membrana integrais micoplásmicas responsáveis pela adesão aos cílios do epitélio respiratório superior do hospedeiro. O documento WO 95/09870 também propõe ensaios e utilizações para estas proteínas, por exemplo em vacinas e diagnósticos.

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

Uma variante de 94 quilodaltons de P97 foi identificada por Wilton et al. (1998 Microbiology 144:1931-1943). Adicionalmente, o gene p97 foi mostrado como sendo parte de um operão que também codifica uma segunda proteína, denominada P102, de uma massa molecular prevista de aproximadamente 102 quilodaltons (Hsu et al., 1998, Gene 214:13-23). Minion e Hsu sugerem a utilização de P102 em vacinas na Publicação de Patente Internacional WO 99/26664 mas não relatam ensaios de vacinas.

O documento WO 94/07531 divulga administração de dose única de uma vacina de bacterina de *Mycobacterium hyopneumoniae* a leitões de uma semana de idade. No entanto, nenhuma das vacinas de *M. hyo* conhecidas foi descrita como sendo eficaz num tratamento de dose única de leitões aos 3 dias de idade. Uma

tal vacina eliminaria a necessidade de dosagem múltipla e como tal reduziria significativamente os custos e o trabalho associados à vacinação massiva a nível global de varas suínas. Como tal, existe uma necessidade de uma vacina de *M. hyo* eficaz que pode ser administrada a suínos numa vacinação de dose única aos 3 dias de idade para proteger e prevenir doenças ou distúrbios causados por parte de *M. hyo*.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona uma vacina contendo uma bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para utilização no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em porcos causada por infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* compreendendo administração ao porco aos três (3) dias de idade, de uma quantidade eficaz de uma dose única de uma vacina de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

A vacina da presente invenção elimina a necessidade de doses adicionais de forma a gerar e/ou manter a imunidade contra *M. hyo*. A vacinação de dose única (uma) proporciona proteção tanto a porcos seronegativos como seropositivos contra desafio com *M. hyo* virulento. A vacina da presente invenção é eficaz no tratamento ou prevenção dos sintomas causados pela infecção por *M. hyo*, incluindo, por exemplo, prevenção e redução das lesões pulmonares em suínos.

A utilização da presente invenção engloba a administração a suínos de uma quantidade eficaz de uma dose única de uma vacina de *M. hyo*, em que a vacina de *M. hyo* compreende uma preparação de células inteiras ou parciais, tal como uma bacterina.

A vacina de *M. hyo* administrada de acordo com a presente invenção pode incluir componentes adicionais, tais como um adjuvante. Vários adjuvantes que podem ser utilizados incluem os descritos no presente documento e os conhecidos na técnica.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção proporciona uma vacina contendo uma bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para utilização no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em porcos

causada por infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* compreendendo administração ao animal aos três (3) dias de idade, de uma quantidade eficaz de uma dose única de uma vacina de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

A vacinação de dose única da presente invenção elimina a necessidade de administração de doses adicionais a suínos de forma a gerar e/ou manter a imunidade contra *M. hyo*.

Para clareza da divulgação, e não por meio de limitação, a descrição detalhada da invenção é dividida nas seguintes subseções que descrevem ou ilustram determinadas características, formas de realização ou aplicações da invenção.

Em determinadas formas de realização, as vacinas utilizadas na presente invenção compreendem uma preparação inativada de *M. hyo* de células parciais ou inteiras (bacterina) ou vacina viva modificada e um veículo farmaceuticamente aceitável, ou preparação inativada de *M. hyo* de células parciais ou inteiras (bacterina) ou vacina viva modificada e um adjuvante.

Definições e Abreviaturas

O termo "tratamento ou prevenção" relativamente a infecção por *M. hyopneumoniae* conforme utilizado no presente documento significa inibir a replicação das bactérias *M. hyopneumoniae*, inibir a transmissão de *M. hyopneumoniae*, ou prevenir que *M. hyopneumoniae* se estabeleça no seu hospedeiro, e aliviar os sintomas da doença ou distúrbio causado pela infecção por *M. hyopneumoniae*. O tratamento é considerado terapêutico se existe redução da carga bacteriana, diminuição das infecções pulmonares e/ou aumento da assimilação de alimento e/ou do crescimento. A vacina de *M. hyo* da presente invenção é, por exemplo, eficaz na prevenção ou redução das lesões pulmonares.

O termo "vacina de *M. hyo*" conforme utilizado no presente documento refere-se a uma vacina útil na prevenção ou tratamento de um distúrbio 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 suínos por *M. hyo*. A vacina de *M. hyo* que pode ser utilizada na presente invenção pode incluir, por exemplo, uma preparação de células de *M. hyo* inteiras ou parciais, vacinas vivas inativadas ou modificadas, uma vacina de subunidade tendo um ou mais polipéptidos ou proteínas derivados de *M. hyo*, ou fragmentos imunogénicos de tais proteínas ou polipéptidos, ou um ou mais genes ou ácidos nucleicos de *M. hyo* codificando para um ou mais polipéptidos ou proteínas derivados de *M. hyo*, ou fragmentos imunogénicos dos mesmos, e cujos genes ou ácidos nucleicos são capazes de ser expressos *in vivo* em suínos. Os polipéptidos, proteínas, fragmentos imunogénicos de tais polipéptidos e proteínas, ou genes ou ácidos nucleicos de *M. hyo* podem ser sintetizados ou produzidos através de recombinação utilizando técnicas conhecidas na técnica. Preferentemente, a vacina de *M. hyo* utilizada no método da presente invenção é uma bacterina.

O termo "porco" conforme utilizado no presente documento refere-se a leitões, suínos, porcos, porcinos, porcas, marrãs, porcos castrados, javalis e membros da família dos Suídeos.

O termo "bacterina" conforme utilizado no presente documento refere-se a uma preparação de células de *M. hyo* inteiras ou parciais inativadas adequada para utilização como uma vacina.

O termo "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade de vacina de *M. hyo* suficiente para eliciar uma resposta imune no sujeito ao qual é administrada. A resposta imune pode compreender, sem limitação, indução de imunidade inata celular e/ou humorai.

Vacinas Vivas Inativadas (Células Parciais ou Inteiras) e Modificadas

São conhecidos na técnica métodos para preparar vacinas vivas inativadas ou modificadas convencionais para utilização no método de tratamento da presente invenção.

Podem ser obtidas bacterinas de *M. hyo* que podem ser empregues na presente vacinação de dose única a partir de várias

fontes publicamente disponíveis. Por exemplo, podem ser preparadas bacterinas de *M. hyo* a partir de isolados de *M. hyo*. Vários isolados de *M. hyo* são conhecidos por parte dos peritos na especialidade e encontram-se disponíveis a partir, por exemplo, da American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Estes incluem por exemplo: ATTC N.ºs 25095, 25617, 25934, 27714 e 27715.

Podem também ser obtidos isolados de *M. hyo* diretamente a partir de lesões pulmonares de porcinos infetadas naturalmente ou experimentalmente utilizando técnicas conhecidas.

Os isolados de *M. hyo* podem ser inativados utilizando uma série de métodos conhecidos, por exemplo, tratamento dos isolados bacterianos com etilenoimina binária (BEI) conforme descrito no Documento de Patente U.S. N.º 5.565.205, ou inativação com, por exemplo, formalina, calor, BPL, irradiação ou glutaraldeído.

Podem também ser obtidas bacterinas de *M. hyo* adequadas para utilização em vacinas da presente invenção através de várias fontes comerciais. Tais fontes incluem mas não estão limitadas 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 de *M. hyo* para utilização na presente invenção é RESPISURE e STELLAMUNE MYCOPLASMA.

Uma fonte particularmente preferida de bacterina de *M. hyo* para utilização na presente invenção é RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.), contendo a estirpe (NL1042), adquirida da Purdue University, EUA.

Preferentemente, a estirpe P-5722-3 é inativada com BEI e adjuvada com um adjuvante comercialmente disponível, preferentemente, AMPHIGEN (Hydronics, EUA). Uma dose preferida é cerca de 2,0 ml. Os conservantes utilizados convencionalmente incluem mertiolato/EDTA. Pode ser adicionado um veículo,

preferentemente, PBS. A preparação de vacinas vivas modificadas, tais como através de atenuação de estirpes virulentas por meio de passagem em cultura, é conhecida na técnica.

Formulações de Vacinas

As preparações adequadas das vacinas utilizadas na presente invenção incluem injetáveis, como soluções líquidas ou suspensões; podem também ser preparadas formas sólidas adequadas para solução, ou suspensão, em líquido anteriormente à injeção. A preparação pode também ser emulsificada. Os ingredientes imunogénicos ativos são frequentemente misturados com adjuvantes que são farmaceuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo.

Os polipéptidos podem ser formulados na vacina como formas neutras ou de sal. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais de adição ácida (formados com grupos amino livres do péptido) e que são formados com ácidos inorgânicos, tal como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou ácidos orgânicos tal como acético, oxálico, tartárico, maleico, e semelhantes. Sais formados com grupos carboxilo livres podem também ser derivados a partir de bases inorgânicas, tal como, por exemplo hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio, ou férrico, e tais bases inorgânicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína e semelhantes.

As formulações de vacinas utilizadas na presente invenção compreendem uma quantidade de imunização eficaz do imunogénio de *M. hyo* e um veículo farmaceuticamente aceitável. As preparações de vacinas compreendem uma quantidade de imunização eficaz de um ou mais抗énios e um veículo farmaceuticamente aceitável. Os veículos farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica e incluem mas não estão limitados a solução salina, solução salina tamponada, dextrose, água, glicerol, tampão aquoso isotónico estéril, e combinações dos mesmos. Um exemplo de um tal veículo aceitável

é um meio de cultura fisiologicamente equilibrado contendo um ou mais agentes estabilizantes tais como proteínas hidrolisadas estabilizadas, lactose, etc. O veículo é preferentemente estéril. A formulação deverá adaptar-se ao modo de administração.

A utilização de抗原s purificados como preparações de vacinas pode ser levada a cabo através de métodos padrão. Por exemplo, a(s) proteína(s) purificada(s) devem ser ajustadas a uma concentração adequada, formuladas com qualquer adjuvante de vacina adequado e embaladas para utilização. Adjuvantes adequados podem incluir, mas não estão limitados a: géis minerais, por exemplo, hidróxido de alumínio; substâncias tensioativas tais como lisolecitina; glicosídeos, por exemplo, saponina e derivados de saponina tais como Quill A ou GPI-0100; tensioativos catiónicos, por exemplo DDA (halogenetos de amónio de hidrocarbonetos quaternários, poilóis plurónicos; polianiões e iões poliatómicos; ácidos poliacrílicos, polímeros em bloco não iónicos, por exemplo, Pluronic F-127 (B.A.S.F., EUA); Avridine e Rantidine; péptidos; toxinas lábeis mutantes recombinantes, por exemplo, leucotoxina (rmLT) or toxina da cólera (CT); transportadores moleculares quimicamente ligados ou em estreita proximidade; óleos minerais, por exemplo Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, França), carbopol, Amphigen (Hydronics, EUA), Omaha, NE, USA, Alhydrogel, (Superfos Biosector, Frederikssund, Dinamarca), emulsões de óleo, por exemplo uma emulsão de óleo mineral tal como BayolF/Ariacel A e água, ou uma emulsão de óleo vegetal, água e um emulsionante tal como lecitina, alúmen, MDP, N-acetil-muramyl-L-treonil-D-isoglutamina (thr- MDP), N-acetil-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamina, N-acetilmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(T-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina; citoquinas de colesterol e combinações de adjuvantes. Iões poliatómicos podem também funcionar como agentes dispersantes, espessantes e

antiaglutinantes que permitem que a vacina seja ressuspensas como uma suspensão monodispersa após um período prolongado de sedimentação. As combinações de adjuvantes podem ser apresentadas em formas aquosa, encapsulada (libertaçāo controlada ou retardada) ou microencapsulada.

O imunogénio pode também ser incorporado em lipossomas, ou conjugado com polissacarídeos e/ou outros polímeros para utilização numa formulação de vacina em casos onde o antigénio recombinante é um hapteno, isto é, uma molécula que é antigénica pelo facto de que pode reagir seletivamente com anticorpos cognatos, mas não imunogénica pelo facto de que não pode eliciar uma resposta imune, o hapteno pode estar ligado covalentemente a um transportador ou molécula imunogénica; por exemplo, uma proteína grande tal como a albumina sérica irá conferir imunogenicidade ao hapteno ligado à mesma. O hapteno-transportador pode ser formulado para utilização numa vacina.

Vacinas de Genes e Ácidos Nucleicos

A presente invenção pode ser posta em prática utilizando genes ou ácidos nucleicos de *M. hyo* codificando para proteínas imunogénicas, polipéptidos e fragmentos imunogénicos de tais proteínas ou polipéptidos. Tais genes e ácidos nucleicos podem ser expressos *in vivo* e poem ser preparados utilizando técnicas conhecidas na técnica.

Numa forma de realização específica, a vacina utilizada na presente invenção compreende pelo menos um gene ou ácido nucleico codificando para uma proteína de *M. hyo* tal como, mas não limitada a, P46, P65, P97, P102, P70, P50 e P44.

Numa forma de realização específica adicional, os genes ou ácidos nucleicos utilizados no método de tratamento da presente invenção codificam para os fragmentos imunogénicos das proteínas ou polipéptidos 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 aminoácidos contíguos das proteínas e polipéptidos imunogénicos utilizados no método

de tratamento da presente invenção, incluindo mas não limitados a P46, P65, P97, P102, P70, P50 e P44.

Noutras formas de realização da presente invenção, os genes ou ácidos nucleicos utilizados são administrados através de métodos conhecidos, tal como, por exemplo, através da utilização de biobalística.

Ainda noutras formas de realização da presente invenção, os genes ou ácidos nucleicos utilizados são vacinas de ADN. Além disso, os genes ou ácidos nucleicos podem estar presentes em associação com lipossomas ou outros agentes de facilitação da transfeção, como são conhecidos na técnica.

Métodos para a preparação e administração de vacinas de ADN são conhecidos na técnica. Veja-se, por exemplo, Krishnan, B. M., "Current Status of DNA vaccines in veterinary medicine", Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier Science (2000).

Sistemas de Expressão

Pode ser utilizada uma série de sistemas de hospedeiro-vetor de expressão para expressar as sequências proteicas antigénicas da invenção. Tais sistemas de expressão em hospedeiros representam veículos através dos quais as sequências codificantes de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas representam também células que podem, quando transformadas ou transfetadas com as sequências codificantes de nucleótidos adequadas, exibir os produtos génicos de *M. hyo* utilizados no método da presente invenção *in situ*. Estes incluem mas não estão limitados a microrganismos tais como bactérias (por exemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas com ADN bacteriófago recombinante, vetores de expressão de ADN de plasmídeo ou ADN de cosmídeo contendo sequências codificantes *mhp3*; leveduras (por exemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas com vetores de expressão de leveduras recombinantes contendo as sequências génicas dos produtos de *M. hyo*; sistemas de células de insetos com vetores de expressão virais recombinantes (por exemplo, baculovírus) contendo as sequências codificantes de *M. hyo*; sistemas de

células vegetais com vetores de expressão virais recombinantes (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformadas com vetores de expressão vegetais recombinantes (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo sequências codificantes de *M. hyo*; ou sistemas de células de mamíferos (por exemplo, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) albergando construções de expressão recombinantes contendo promotores derivados a partir do genoma de células de mamíferos (por exemplo, promotor de metalotioneína) ou a partir de vírus de mamíferos (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus; o promotor 7,5K do vírus vaccinia). Numa forma de realização preferida, o sistema de expressão é um sistema bacteriano.

Os polipéptidos e proteínas de *M. hyopneumoniae* e fragmentos imunogénicos dos mesmos podem também ser expressos e administrados utilizando vetores bacterianos e virais recombinantes vivos tais como adenovírus ou *Salmonella*. Os vetores reais são também conhecidos e encontram-se prontamente disponíveis dentro da técnica ou podem ser construídos por parte de um perito na especialidade utilizando metodologia bem conhecida.

Dosagem e Modos de Administração

De acordo com a presente invenção, uma dose única de uma quantidade eficaz de uma vacina de *M. hyo* administrada a porcos de 3 dias de idade proporciona imunidade eficaz contra um posterior desafio de *M. hyo*.

A quantidade de uma vacina de bacterina de *M. hyo* eficaz em administração de uma dose contém cerca de 1×10^6 a 5×10^{10} unidades de alteração de cor (CCU) por dose. Preferentemente, uma vacina de bacterina de *M. hyo* que proporciona imunidade eficaz numa dose única contém cerca de 1×10^8 a 5×10^{10} CCU/dose e mais preferentemente, cerca de 5×10^8 a 5×10^{10} CCU/dose.

De acordo com a presente invenção, quando é administrado o produto de bacterina preferido RESPISURE - 1, a quantidade de RESPISURE - 1 para administração de uma dose é cerca de 0,5 a cerca de 3,0 ml, preferentemente cerca de 1,5 mg até cerca

de 2,5 mg, e mais preferentemente, cerca de 2 ml.

A quantidade de uma vacina de *M. hyo* que é uma vacina de subunidade compreendendo uma ou mais proteínas ou polipéptidos ou fragmentos imunogénicos de tais proteínas ou polipéptidos eficazes para a utilização no método da presente invenção é de cerca de 0,01 uug a cerca de 200 uug.

A quantidade de uma vacina de *M. hyo* que é uma vacina compreendendo um ou mais genes ou ácidos nucleicos de *M. hyo* (preferentemente ADN) codificando para proteínas imunogénicas ou polipéptidos ou fragmentos imunogénicos de tais proteínas ou polipéptidos eficazes no método de tratamento da presente invenção é de cerca de 0,1 uug a cerca de 200 mg.

De acordo com a presente invenção, a administração pode ser alcançada através de vias conhecidas, incluindo oral, intranasal, mucosa tópica, transdérmica, e parentérica (por exemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutânea ou intramuscular). A administração também pode ser alcançada utilizando dispositivos de administração isentos de agulhas. A administração pode ser alcançada utilizando uma combinação de vias, por exemplo, primeira administração utilizando uma via parentérica e administração subsequente utilizando uma via mucosa. Uma via de administração preferida é a administração intramuscular.

Podem também ser extrapoladas doses eficazes (quantidades imunizantes) das vacinas da invenção a partir de curvas de resposta à dose derivadas a partir de sistemas de testes modelo.

As vacinas para utilização na presente invenção proporcionam imunidade protetora tanto para leitões seropositivos como para leitões seronegativos para *M. hyo*. Leitões seropositivos referem-se àqueles leitões que têm no soro, anticorpos contra *M. hyo*. Leitões seropositivos referem-se àqueles leitões que não têm no soro, níveis detetáveis de anticorpos contra *M. hyo*.

A presente invenção é adicionalmente ilustrada, mas não limitada por parte dos seguintes exemplos.

Exemplo 1Preparação de uma bacterina de *M. hyo*

É utilizada etilenoimina binária (BEI) para a inativação da estirpe de *M. hyo* NL1042.

No final do período de crescimento, o pH da cultura foi aumentado a 7,8 +/- 0,2, e o pH foi mantido dentro deste intervalo durante pelo menos uma hora. Neste momento, foi adicionada uma solução aquosa esterilizada por filtro de 2-BromoEtiAminoidrobrometo (BEA) até uma concentração final de aproximadamente 4,0 mM. Em presença de um solvente adequado, o BEA é BEI alterado quimicamente. A cultura foi incubada a 37 °C +/- 2 °C com agitação constante durante pelo menos 24 horas.

Após a incubação de 24 horas, foi adicionada uma solução aquosa esterilizada por filtro de tiossulfato de sódio até uma concentração final de aproximadamente 4 mM para neutralizar o BEI em excesso. A cultura foi incubada a 37 °C +/- 2 °C com agitação constante durante 24 horas adicionais.

Após a inativação, mas anteriormente à neutralização com tiossulfato de sódio, foi tomada uma amostra representativa e testada para a finalização da inativação. Foi reinoculado meio fresco contendo vermelho fenol a 0.0026% com um inóculo a 5-20% e incubado a 37 °C +/- 2 °C durante pelo menos uma semana anteriormente a exame para alteração da cor, que indica falha da inativação. Foram testadas amostras em bruto para a esterilidade em caldo de tioglicolato a 37 °C +/- 2 °C, e caldo de soja tripticase à temperatura ambiente. A cultura inativada pode ser transferida a recipientes de armazenamento estéreis e armazenada a 2-8 °C até à montagem.

A potência foi determinada através de um ensaio serológico *in vitro* para quantificar o antígeno no recipiente final. A potência das vacinas utilizadas no estudo de eficácia determina a potência mínima que deve estar presente na vacina na data de expiração.

Foram testadas amostras de produto em bruto ou de recipiente final de produto completo de cada série ou subsérie

para *M. hyo* conforme segue.

A bacterina foi armazenada a -50 °C em frascos de 100 ml. Os frascos foram descongelados e foram armazenadas subalíquotas de 15 ml a 5 °C +/- 2 °C até à utilização.

Para testar a potência de uma série montada, uma amostra da série foi comparada com uma referência, e foram determinadas unidades RP para a série. Uma série ou subsérie deve preferentemente 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. As RPs podem ser determinadas através de uma quantificação de抗igénio relativo conforme comparado com uma vacina de referência. Neste caso a referência tem uma RP por definição = 1,0. O produto de dose única da presente invenção tem preferentemente uma RP de 6,33, que é 6,33 vezes a referência.

É adicionado mertiolato como um conservante numa concentração final a não exceder 0,01% (p/v).

É adicionada solução de ácido Etileno-Diamina Tetra Acético (EDTA, Dissódio ou sal de tetrassódio) como um conservante numa concentração de aproximadamente 0,07% (p/v).

Exemplo 2

Animais

Foram selecionados porcos de aproximadamente uma semana de idade para vacinação. Foram avaliados os estados serológicos para *M. hyo* num ensaio ELISA. Porcos com um valor de ELISA <0,50 foram considerados negativos para *M. hyo*. Porcos com um valor de ELISA superior a 0,50 foram considerados serologicamente positivos para *M. hyo*.

Vacinas

Foi utilizada bacterina de *M. hyo* RESPISURE -1 (Pfizer Inc.), para vacinar porcos. A potência da vacina foi determinada anteriormente à utilização através de quantificação de抗igénio relativo conforme comparado com uma bacterina de *M. hyo* de referência. A vacina de referência (RP

= 1,0) conteve cerca de 8000 unidades de antigénio (cerca de 1 a 2 x 10⁸ CCU de células viáveis colhidas anteriormente à inativação) por dose, determinadas através de um imunoensaio de fase sólida que mediou a quantidade de antigénio de *M. hyo* na vacina.

Foi utilizado o mesmo adjuvante líquido (AMPHIGEN) utilizado na formulação de RESPISURE -1 como placebo (isto é, sem células bacterianas).

Inóculo de Desafio

O inóculo de desafio foi proporcionado como alíquotas de 10 ml de homogenato de pulmão, congelado a -70 °C, e foi identificado como um derivado da estirpe 11 de *M. hyo* (L1 36). O inóculo foi descongelado e posteriormente diluído em Friis Mycoplasma Broth para alcançar uma diluição de 1:25, e mantido em gelo até à administração. Cada porco recebeu uma dose intranasal de 5 ml (2,5 ml por narina) da suspensão 1:25 nos dias especificados em cada um dos seguintes exemplos. Em cada dia do desafio, foi cultivada uma alíquota do inóculo de pulmão para confirmar a ausência de contaminação bacteriana. Foi titulada por retorno em cada um dos 3 dias, os resultados indicaram que o inóculo continha aproximadamente 10⁶-10⁷ unidades de alteração de cor (CCU)/ml de *M. hyo*.

Procedimento Experimental

Os porcos foram identificados com marcas auriculares enquanto ainda se encontravam na porca [Dia (-1)]. Os porcos foram distribuídos em pocilgas e grupos de tratamento de acordo com um desenho em bloco aleatório generalizado. Os porcos foram agrupados com base na ninhada e pocilga após o desmame.

No Dia 0, os porcos foram vacinados com uma dose intramuscular de 2 ml da bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.), ou com uma dose intramuscular de 2 ml de placebo. Cada porco recebeu uma dose intranasal de 5 ml da suspensão 1:25 do inóculo de desafio nos dias especificados em cada um dos seguintes exemplos. Todos os porcos foram monitorizados e verificados em relação a sinais de doença clínica diariamente.

A um momento determinado após o primeiro dia do desafio, todos os porcos foram submetidos a eutanásia e a necropsia. Os pulmões foram removidos e avaliados. A examinação pós-morte incluiu uma estimativa do grau de patologia associada à doença respiratória micoplasmica. Cada lobo pulmonar foi examinado, e foram traçadas lesões para estimar a percentagem de envolvimento de cada lobo. Foi registado o grau de lesões macroscópicas.

Análise dos Dados

Foi avaliada a eficácia com base na percentagem de lesões pulmonares típicas de uma infecção por *M. hyo*. Os porcos num grupo de tratamento (vacinados) foram determinados como tendo uma percentagem de lesões pulmonares totais que foi significativamente ($P<0,05$) menor do que os porcos no grupo de placebo.

Percentagem de Pulmão com Lesões Total

A percentagem de envolvimento bruto por cada lobo pulmonar foi ponderada utilizando as seguintes razões entre lobos pulmonares individuais e massa pulmonar total: cranial esquerdo 10%, médio esquerdo 10%, caudal esquerdo 25%, cranial direito 10%, médio direito 10%, caudal direito 25%, e acessório 10%. Os valores de lobos pulmonares ponderados foram posteriormente somados ao longo dos lobos para proporcionar a Percentagem de Pulmão com Lesões Total (Pointon et al, 1992).

Exemplo 3

Foi avaliada a proteção contra o desafio com *M. hyo* virulento em porcos serologicamente positivos para *M. hyo* utilizando uma dose única da bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 (Pfizer Inc), administrada a porcos aos 3 a 8 dias de idade.

Foram levados a cabo cinco ensaios de potência replicados para RESPISURE - 1 em ou cerca do momento da vacinação. A potência relativa (RP) foi determinada através da quantificação de antigénio relativo conforme comparado com uma vacina de referência. A vacina de referência, tendo um RP = 1,0, conteve cerca de 8000 unidades de antigénio de *M. hyo*. As RPs

a partir destes cinco ensaios foram 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 e 4,36, respectivamente.

No Dia 0, os porcos no Grupo de Tratamento T02 (veja-se o Quadro 1 abaixo) foram vacinados com uma dose intramuscular de 2 ml da bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 (Pfizer Inc). Os 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, foi cultivada uma alíquota do material de desafio no momento da inoculação para confirmar a ausência de contaminação bacteriana. Uma segunda alíquota foi titulada por retorno para confirmar que a solução-mãe de desafio continha aproximadamente 10^7 CCU/ml de *M. hyo*. Todos os porcos foram monitorizados e verificados em relação a sinais de doença clínica diariamente.

Trinta dias após o primeiro dia do desafio, todos os porcos foram submetidos a eutanásia e a necropsia. Os pulmões foram removidos e avaliados. A exameação pós-morte incluiu uma estimativa do grau de patologia associada com a doença respiratória micoplásica.

Cada lobo pulmonar foi examinado, e foram traçadas lesões para estimar a percentagem de envolvimento de cada lobo. Foi registado o grau de lesões macroscópicas.

Quadro 1

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

¹Inóculo de *M. hyo* virulento

²Os porcos 71 e 73 foram removidos do estudo anteriormente ao desafio devido a que ambos animais perderam todas as marcas auriculares e como tal não pôde ser determinada a identidade de cada animal.

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

Os resultados das lesões pulmonares encontram-se resumidos no Quadro 2. Os resultados indicaram que os porcos vacinados (T02) tiveram significativamente ($P=0,0385$) menor percentagem média por mínimos quadrados de lesões pulmonares pneumónicas que os porcos com placebo (T01) (2,0 frente a 4,5%).

Quadro 2. Resumo de Percentagem de Lesões Pulmonares Totais

Tratamento	Composto	Número de Porcos	Média MQ	Intervalo
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 são estatisticamente significativos ($P=0,0385$)

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

Exemplo 4

Foi avaliada a proteção contra o desafio com *M. hyo* virulento em porcos sorologicamente negativos para *M. hyo* utilizando uma dose única da bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1, administrada a porcos aos 3 a 8 dias de idade.

Foram levados a cabo cinco ensaios de potência replicados para a vacina em ou cerca do momento da vacinação. A RP foi determinada através da quantificação de antígeno relativo conforme comparado com uma vacina de referência. A vacina de referência, tendo um RP = 1,0, conteve cerca de 8000 unidades de antígeno de *M. hyo*. As RPs destes cinco ensaios foram 5,42,

3, 96, 4, 71, 5, 49 e 4, 36, respetivamente.

No Dia 0, os porcos no Grupo de Tratamento T02 foram vacinados com uma dose intramuscular de 2ml da bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1. Os 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 173, 174 e 175. Em cada um dos 3 dias, foi cultivada uma alíquota do material de desafio no momento da inoculação para confirmar a ausência de contaminação bacteriana. Uma segunda alíquota foi titulada por retorno para confirmar que a solução-mãe de desafio continha aproximadamente 10^6 CCU/ml de *M. hyo*. Todos os porcos foram monitorizados e verificados em relação a sinais de doença clínica diariamente.

Vinte e nove dias após o primeiro dia do desafio, todos os porcos foram submetidos a eutanásia e a necropsia. Os pulmões foram removidos e avaliados. A exameinação pós-morte incluiu uma estimativa do grau de patologia associada com a doença respiratória induzida por *M. hyo*. Cada lobo pulmonar foi examinado, e foram traçadas lesões para estimar a percentagem de consolidação em cada lobo. Foi registado o grau de lesões macroscópicas.

O Quadro 3 resume o desenho experimental.

Quadro 3

Grupo de Tratamento	Composto de Vacinação	Número	Vacinado Dia 0	Dia de Desafio 173 ¹	Dia de Desafio 174 ¹	Dia de Desafio 175 ¹
T01	Placebo	26	26	25 ²	24 ⁴	24
T02	Vacina	26	26	23 ³	20 ⁵	20

¹*M. hyo* virulento

²O porco 123 foi submetido a eutanásia no Dia 19 devido a poliartrite séptica crónica.

³O porco 222 foi encontrado morto no dia 40. A necropsia revelou uma grande quantidade de fluido pericárdico e hemorragia no epicárdio. O porco 102 foi submetido a eutanásia no Dia 95 devido a um prolapsos retal. O porco 204 foi encontrado morto no dia 145. Não foi realizada necropsia devido à avançada decomposição do cadáver.

⁴O porco 244 encontrado morto no Dia 174 após o primeiro dia do desafio devido a complicações anestésicas.

⁵NEEA para contabilizar os 3 porcos.

Os resultados das lesões pulmonares encontram-se resumidos no Quadro 4. A análise geral indicou que os porcos vacinados (T02) tiveram uma percentagem média por mínimos quadrados significativamente menor ($P=0,0001$) de lesões pulmonares pneumónicas que os porcos com placebo (T01) (0,3 frente a 5,9%).

Quadro 4. Resumo de Percentagem de Lesões Pulmonares Totais

Tratamento	Composto	Percentagem de Pulmão com Lesões		
		Número de Porcos	Média MQ	Intervalo
T01	Placebo	24	5,9 ^a	0 a 36
T02	Vacina	20	0,3 ^b	0 a 6

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

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

Exemplo 5

Foi avaliada a proteção contra o desafio com *M. hyo* virulento em porcos serologicamente negativos para *M. hyo* utilizando uma dose única da bacterina de *M. hyo* RESPISURE - 1 administrada a porcos de 3 a 8 dias de idade.

Foram levados a cabo cinco ensaios de potência replicados

para a bacterina em ou cerca do momento da vacinação. A RP foi determinada através da quantificação de antigénio relativo conforme comparado com uma vacina de referência. A vacina de referência, tendo um RP = 1,0, conteve cerca de 8000 unidades de antigénio de *M. hyo*. As RPs destes cinco ensaios foram 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 e 4,36, respetivamente.

No Dia 0, os porcos no Grupo de Tratamento T02 foram vacinados com uma dose intramuscular de 2 ml de bacterina de *M. hyo*. Os 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 76, 77 e 78. Em cada um dos 3 dias, foi cultivada uma alíquota do material de desafio no momento da inoculação para confirmar a ausência de contaminação bacteriana. Uma segunda alíquota foi titulada por retorno para confirmar que a solução-mãe de desafio continha aproximadamente 10^6 CCU/ml de *M. hyo*. Todos os porcos foram monitorizados e verificados em relação a sinais de doença clínica diariamente.

Vinte e nove dias após o primeiro dia do desafio, todos os porcos foram submetidos a eutanásia e a necropsia. Os pulmões foram removidos e avaliados. A exameação pós-morte incluiu uma estimativa da extensão de patologia associada com a doença respiratória induzida por *M. hyo*. Cada lobo pulmonar foi examinado, e foram traçadas lesões para estimar a percentagem de envolvimento em cada lobo. Foi registado o grau de lesões macroscópicas.

O Quadro 5 resume o desenho experimental.

Quadro 5

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

Inóculo de *M. hyo* virulento

²Os porcos 237 e 239 testaram positivo no Dia -1 para *M. hyopnuemoniae*. Estes leitões foram removidos do estudo no Dia 14 e submetidos a eutanásia. O porco 220 foi encontrado morto no dia 3 devido a ter sido esmagado pela porca.

³Os porcos 238, 240 e 277 testaram positivo no Dia -1 para *M. hyo pneumoniae*. Estes leitões foram removidos do estudo no Dia 14 e submetidos a eutanásia. O porco 280 foi submetido a eutanásia no Dia 7 devido a encontrar-se anoréxico e debilitado. O porco 177 foi submetido a eutanásia no Dia 40 devido a síndrome de cansaço crónico.

Os resultados das lesões pulmonares encontram-se resumidos no Quadro 6. A análise geral indicou que os porcos vacinados (T02) tiveram uma percentagem média por mínimos quadrados significativamente menor ($P=0,0001$) de lesões pulmonares pneumónicas que os porcos com placebo (T01) (0,5 vs. 9,9%).

Quadro 6. Resumo da Percentagem de Lesões Pulmonares Totais

Percentagem de Pulmão com Lesões

Tratamento	Composto	Número de Porcos	Média MQ	Intervalo
------------	----------	------------------	----------	-----------

T01	Placebo	23	9,9 ^a	0 a 40,5
T02	Vacina	21	0,5 ^b	0 a 5

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

REIVINDICAÇÕES

1. Uma vacina contendo uma bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* para utilização no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em porcos causado por infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* em que a dita vacina é administrada numa dose única aos ditos porcos aos 3 dias de idade; e em que a dita dose única é eficaz no tratamento ou prevenção dos sintomas causados pela infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*.
2. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 1 que compreende adicionalmente um adjuvante.
3. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o adjuvante é selecionado a partir do grupo consistindo em: géis minerais; substâncias tensioativas; glicosídeos compreendendo saponina ou derivados de saponina; polióis plurónicos; polianíões; polímeros em bloco não iónicos; óleos minerais; emulsões de óleo; uma emulsão de óleo vegetal, água e emulsionante; alúmen; citoquinas; acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (muramil dipéptido; MDP); N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetyl-nor-muramil-L-alanina-D-isoglutamina; N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(T-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina; toxinas lábeis mutantes recombinantes (rMLT) e AMPHIGEN™.
4. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o adjuvante é AMPHIGEN™.
5. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a dita substância ativa de superfície é lisolecitina.

6. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a dita saponina ou derivado de saponina é Quil A ou GP1-0100.

7. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o dito emulsionante é lecitina.

8. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 1 que compreende adicionalmente um veículo farmaceuticamente aceitável.

9. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 1 que compreende adicionalmente um antígeno viral ou bacteriano selecionado a partir do vírus da gripe suína (SIV), vírus da doença reprodutiva e respiratória porcina (PRRS ou doença suína misteriosa), diarreia pós-desmame (PWD) e enterite proliferativa porcina (PPE).

10. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 1 em que a bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* contém a estirpe P-5722-3 (NL1042).

11. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 10, em que a estirpe é inativada com etilenoimina binária (BEI).

12. A vacina para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que a estirpe é adjuvada com AMPHIGEN™.

13. A vacina de acordo com a reivindicação 1, em que a dita dose única é eficaz no tratamento ou prevenção de lesões pulmonares.