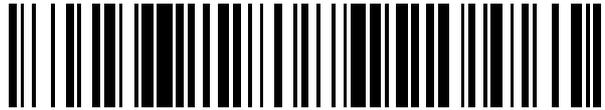


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 100**

51 Int. Cl.:

**C12R 1/35** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/US2013/076807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14105672**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13817835 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2938747**

54 Título: **Método de fabricación de una vacuna contra micoplasma**

30 Prioridad:

**28.12.2012 US 201261746997 P**

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

**20.01.2020**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH  
(100.0%)  
Binger Strasse 173  
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**JORDAN, DIANNA M. MURPHY;  
MARTINSON, BRIAN THOMAS;  
MUEHLENTHALER, CHRISTINE MARGARET;  
NEUBAUER, AXEL y  
IYER, ARUN V.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 738 100 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de fabricación de una vacuna contra micoplasma

## 5 Antecedentes

Las bacterias del género *Mycoplasma* pertenecen a la clase *Mollicutes* y representan un grupo de organismos que derivan del linaje Firmicutes. Los *Mollicutes* son los organismos de replicación autónoma más pequeños, que difieren estructuralmente de otras eubacterias en que carecen de pared celular. La superficie de su única membrana se considera una interfaz clave para mediar en la adaptación y la supervivencia en el contexto de un hospedador complejo e inmunocompetente. Adicionalmente, los *Mollicutes* tienen un genoma pequeño y un número limitado de vías metabólicas. Por tanto, los miembros del género *Mycoplasma* también se han retratado como "organismos auto-replicantes mínimos". Sin embargo, a pesar de esta aparente simplicidad, una gran cantidad de bacterias micoplasma son patógenas de los seres humanos y una amplia gama de animales. A diferencia de otras bacterias patógenas en las que la virulencia está determinada principalmente por toxinas, invasinas y citolisinas, las bacterias patógenas *Mycoplasma* no parecen tener dichos factores de virulencia primaria típicos (Chambaud, I. et al, 2001, *Nucleic Acids Res.* 29: 2145-2153, Fraser et al, 1995, *Science* 270: 397-403). Actualmente hay poco conocimiento disponible sobre los mecanismos moleculares y los efectores que permiten que los micoplasmas patógenos provoquen daño, inflamación y enfermedad a las células hospedadoras.

Las bacterias *Mycoplasma* patógenas provocan principalmente neumonía atípica, infecciones urogenitales y artritis en seres humanos y en animales (Blanchard, A. y G. F. Browning (ed.). 2005. *Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control.* Horizon Bioscience, Wymondham Reino Unido; Kobisch M. y Friis N.F. 1996, *Swine mycoplasmoses, Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz.* 15, 1569-1605). Se sabe que la reactivación o exacerbación de los signos se repite y se transfiere gradualmente a una enfermedad crónica, por lo que, junto con el diagnóstico precoz y el tratamiento precoz, la prevención o el tratamiento de la exacerbación o reactivación son importantes. *M. hyopneumoniae* es el agente etiológico de la neumonía enzoótica. En cerdos, es una de las enfermedades más comunes y económicamente importantes debido a la reducción del aumento de peso y la escasa eficiencia de alimentación. La enfermedad provoca lesiones en los pulmones, tos crónica, pelaje sin brillo, retraso en el crecimiento y aspecto desnutrido que dura varias semanas. Las lesiones pulmonares, en particular en los lóbulos cardíacos apical y ventral, se caracterizan por una hiperplasia de las células epiteliales y un aumento de la acumulación perivascular y peribronquiolar de células mononucleares. *M. hyorhinis*, otro micoplasma común del tracto respiratorio de los cerdos, puede provocar poliserositis y artritis en los lechones. *M. hyosynoviae* generalmente se encuentra en las amígdalas y puede provocar enfermedad artrítica, lo que conduce a pérdidas económicas. *M. hyosynoviae* se aísla de las articulaciones y de muestras faríngeas/amigdalinas y puede inducir anticuerpos en sangre y líquido articular. *M. bovis* se considera una de las bacterias más patógenas de *Mycoplasma* y provoca importantes pérdidas económicas en todo el mundo. Las bacterias *Mycoplasma* provocan signos clínicos graves en vacas de todas las edades. *M. bovis* es el patógeno más frecuente de *Mycoplasma* que provoca neumonía, mastitis y artritis en vacas y su papel etiológico también se ha asociado a otitis, queratoconjuntivitis, sinovitis y trastornos reproductivos en vacas y toros.

Debido a que los micoplasmas carecen de pared celular, no se ven afectados por muchos antibióticos comunes, tales como penicilina u otros antibióticos beta-lactámicos que actúan sobre la síntesis de la pared celular. Los agentes terapéuticos para la infección por micoplasma que están en uso práctico son algunos antibióticos tales como los antibióticos a base de macrólidos o nuevos antibióticos a base de quinolona o a base de tetraciclina, pero dichos antibióticos tienen grandes efectos adversos tales como la aparición de cepas resistentes a fármacos, que conduce a que la infección por micoplasma se agrave, al tiempo que no se esperan suficientes efectos de tratamiento, y se convierta en una causa para el paso a una enfermedad crónica. Adicionalmente, vacunación es un método eficaz de control de la infección por micoplasma.

El documento GB 1137306 A desvela el cultivo de *M. gallisepticum* en células renales aviares embrionarias. Volokhov et al 2008 (*Appl Environ Microbiol.*; 74 (17):5383-91) desvela que algunas estirpes celulares de mamíferos respaldan el enriquecimiento biológico de algunas especies de micoplasmas que se sabe que son contaminantes bacterianos de sustratos celulares. El documento US 2005/0037027 desvela una vacuna inactivada bivalente de *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis*.

Sin embargo, se obtienen altos rendimientos significativos de micoplasma necesarios para la preparación de vacunas mediante el cultivo normalmente solo en medios complejos (Kobisch M. y Friis N.F. 1996, *Swine mycoplasmoses, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15, 1569-1605; Gabridge M.G. et al. 1976, *Cultivation of mycoplasma in a modified tissue culture medium, Applied and Environmental microbiology.* 31, 986-989; Sotoodehnia A. Et al 2007, *Preparation of agalactia vaccine in fermentor, Archives of razi institute,* 62, 45-48; Dahlia et al., 2009 *Isolation of Mycoplasma hyosynoviae from pneumonic lung of swine, Tropical Biomedicine* 26:341-345). Dependiendo de las bacterias micoplasma que se han de cultivar, los medios complejos se complementan con un 10-30 % de suero y, a veces, con extracto de levadura. Por tanto, debido al alto precio del suero, el cultivo de bacterias micoplasma es costoso. Adicionalmente, una reducción de suero en los medios complejos también sería beneficiosa a la luz del bienestar animal. Por tanto, existe la necesidad de cultivo de altos rendimientos significativos de micoplasma en un sistema de cultivo reducido en suero para la preparación de composiciones inmunogénicas eficaces en la prevención de la

infección por micoplasma. Además, las bacterias micoplasma específicas de cerdos generalmente se cultivan en medios complejos que contienen suero específico de cerdos (Kobisch M. y Friis N.F. 1996, *Swine mycoplasmoses*, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15, 1569-1605). Sin embargo, el suero específico de cerdos puede contener otros patógenos específicos de cerdos o puede contener anticuerpos contra patógenos específicos de cerdos que pueden provocar una inmunogenicidad reducida de la composición inmunogénica que se ha de preparar. Por tanto, también existe la necesidad de cultivo de altos rendimientos significativos de micoplasma en un sistema de cultivo sin suero porcino para la preparación de composiciones inmunogénicas eficaces en la prevención de la infección por micoplasma.

10 Descripción de la invención

Antes de que se describan los aspectos de la presente invención, debe tenerse en cuenta que como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "uno o un antígeno" incluye una pluralidad de antígenos, la referencia a la "célula" es una referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la materia y así sucesivamente. A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que el experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención entiende normalmente. Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la presente invención cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos. No debe interpretarse que nada en el presente documento sea un reconocimiento de que la invención no tenga derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de una invención anterior.

La presente invención resuelve los problemas inherentes a la técnica anterior y proporciona un avance distinto en el estado de la técnica.

En general, la presente invención proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende:

- a.) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero, en el que dicho sistema de células eucariotas comprende una estirpe celular MDCK o una estirpe celular Mc Coy;
- b.) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y
- c.) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en el que la composición inmunogénica comprende bacterias micoplasma seleccionadas entre la lista que contiene: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* y, en el que el antígeno es una bacterina inactivada completa, en el que el cultivo de bacterias micoplasma en el sistema de células eucariotas incluye concentraciones de suero de entre el 0-10 % (v/v).

Adicionalmente, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ventajosamente, los datos experimentales proporcionados desvelan que las bacterias micoplasma pueden producirse en un sistema de células eucariotas reducido en suero.

La expresión "composición inmunogénica" se refiere a una composición que comprende al menos un antígeno, que provoca una respuesta inmunitaria en el hospedador al que se le administra la composición inmunogénica. Dicha respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria mediada por células y/o por anticuerpos a la composición inmunogénica de la divulgación. El hospedador también se describe como "sujeto". Preferentemente, cualquiera de los hospedadores o sujetos que se describen o se mencionan en el presente documento es un animal.

Por lo general, una "respuesta inmunitaria" incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T colaboradores, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos, y/o linfocitos T gamma-delta, dirigidos específicamente a un antígeno o a antígenos incluidos en la composición inmunogénica de la divulgación. Preferentemente, el hospedador mostrará una respuesta inmunitaria protectora o una respuesta terapéutica.

Una "respuesta inmunitaria protectora" se demostrará mediante una reducción o la falta de los signos clínicos que normalmente muestra un hospedador infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o una menor duración de la infectividad o una disminución del título de patógenos en los tejidos o fluidos corporales o excreciones del hospedador infectado.

En caso de que el hospedador muestre una respuesta inmunitaria protectora de manera que la resistencia a una nueva infección se potencie y/o se reduzca la gravedad clínica de la enfermedad, la composición inmunogénica se describe como una "vacuna".

5 Un "antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a, pero sin limitación, componentes que provocan una respuesta inmunitaria en un hospedador a una composición inmunogénica o vacuna de interés que comprende dicho antígeno o un componente inmunitariamente activo del mismo. El antígeno o componente inmunitariamente activo puede ser un microorganismo completo (en forma viva inactivada o modificada) o cualquier fragmento o fracción del mismo, que, si se administra a un hospedador, puede provocar una respuesta inmunitaria en el hospedador. El antígeno puede ser o puede comprender organismos vivos completos en su forma original o como organismos atenuados en una denominada vacuna viva modificada (MLV, del inglés *modified live vaccine*). El antígeno puede comprender adicionalmente elementos apropiados de dichos organismos (vacunas de subunidades), por lo que estos elementos se generan mediante la destrucción del organismo completo o los cultivos de crecimiento de dichos organismos y etapas de purificación posteriores que producen la o las estructuras deseadas, o mediante procesos de síntesis inducidos por una manipulación apropiada de un sistema adecuado como, pero sin restricción, bacterias, insectos, mamíferos u otras especies y, opcionalmente, mediante procedimientos de aislamiento y purificación posteriores, o mediante inducción de dichos procesos de síntesis en el animal que necesita una vacuna mediante incorporación directa de material genético usando composiciones farmacéuticas adecuadas (vacunación con polinucleótidos). El antígeno puede comprender organismos completos inactivados mediante métodos apropiados en una denominada vacuna inactivada (KV, del inglés *killed vaccine*). Si el organismo es una bacteria, la vacuna inactivada se denomina bacterina.

La expresión "tratamiento y/o profilaxis" se refiere a la disminución de la incidencia de la infección por micoplasma particular en una manada o la reducción de la gravedad de los signos clínicos provocados o asociados a la infección por micoplasma particular. Por tanto, la expresión "tratamiento y/o profilaxis" también se refiere a la reducción del número de animales en una manada que se infectan con las bacterias micoplasma particulares (= disminución de la incidencia de la infección por micoplasma particular) o a la reducción de la gravedad de los signos clínicos normalmente asociados a o provocados por una infección por micoplasma en un grupo de animales cuyos animales han recibido una cantidad eficaz de la composición inmunogénica que se proporciona en el presente documento en comparación con un grupo de animales cuyos animales no han recibido dicha composición inmunogénica.

El "tratamiento y/o profilaxis" generalmente implica la administración de una cantidad eficaz de la composición inmunogénica de la presente divulgación a un sujeto o manada de sujetos que necesitan o que podrían beneficiarse de dicho tratamiento/profilaxis. El término "tratamiento" se refiere a la administración de la cantidad eficaz de la composición inmunogénica una vez que el sujeto o al menos algunos animales de la manada ya están infectados con dicho micoplasma y en la que dichos animales ya muestran algunos signos clínicos provocados por o asociados a dicha infección por micoplasma. El término "profilaxis" se refiere a la administración a un sujeto antes de cualquier infección de dicho sujeto con micoplasma o al menos cuando dicho animal, o ninguno de los animales en un grupo de animales, no muestra ningún signo clínico provocado por o asociado a la infección por dicho micoplasma.

La expresión "una cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, significa, pero sin limitación, una cantidad de antígeno, que provoca o es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Dicha cantidad eficaz es capaz de disminuir la incidencia de la infección por micoplasma particular en una manada o de reducir la gravedad de los signos clínicos de la infección por micoplasma particular.

Preferentemente, los signos clínicos se disminuyen en incidencia o gravedad en al menos un 10 %, más preferentemente en al menos un 20 %, aún más preferentemente en al menos un 30 %, incluso más preferentemente en al menos un 40 %, aún más preferentemente en al menos un 50 %, incluso más preferentemente en al menos un 60 %, aún más preferentemente en al menos un 70 %, incluso más preferentemente en al menos un 80 %, aún más preferentemente en al menos un 90 % y mucho más preferentemente en al menos un 95 % en comparación con sujetos que no se tratan o se tratan con una composición inmunogénica que estaba disponible antes de la presente divulgación, pero que posteriormente se infectan con las bacterias micoplasma particulares.

La expresión "signos clínicos", como se usa en el presente documento, se refiere a signos de infección de un sujeto por bacterias micoplasma. Los signos clínicos de infección dependen del patógeno seleccionado. Los ejemplos de dichos signos clínicos incluyen, pero sin limitación, dificultad respiratoria, poliserositis (tal como peritonitis, pleuritis, pericarditis), artritis (cojera e inflamación de las articulaciones), otitis, pelaje áspero, fiebre leve, depresión, apetito reducido y bacteriemia. Sin embargo, los signos clínicos también incluyen, pero sin limitación, los signos clínicos que son observables directamente en un animal vivo. Los ejemplos de signos clínicos que son observables directamente en un animal vivo incluyen descarga nasal y ocular, letargia, tos, respiración sibilante, palpaciones, fiebre elevada, aumento o pérdida de peso, deshidratación, diarrea, hinchazón de las articulaciones, cojera, caquexia, palidez de la piel, desnutrición, diarrea y similares.

La reducción de la incidencia o la reducción de la gravedad de los signos clínicos provocados por o asociados a la infección por micoplasma particular en un sujeto puede conseguirse mediante la administración de una o más dosis de la composición inmunogénica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. Como se muestra mediante

los Ejemplos 2 y 3, se ha demostrado que la composición inmunogénica que se proporciona en el presente documento es eficaz después de la administración de una dosis única a un sujeto que lo necesita.

5 La expresión "infección" o "infectado" se refiere a la infección de un sujeto por un patógeno, es decir, *M. hyorhinis* o *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* o *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*.

10 El término "micoplasma" es conocido por los expertos en la materia. "*Mycoplasma*" se refiere a un género de bacterias, por ejemplo, como se describe en Blanchard, A. y G. F. Browning (ed.). 2005. *Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham Reino Unido; Kobisch M. y Friis N.F. 1996, *Swine mycoplasmoses*, *Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz.* 15, 1569-1605. Las bacterias pueden clasificarse en función de sus propiedades bioquímicas y microbiológicas, así como su morfología. Estos criterios de clasificación son bien conocidos en la técnica. En general, la infección por micoplasma se asocia a los signos clínicos que se describen en otro sitio en la presente descripción.

15 El término "micoplasma", como se usa en el presente documento, se refiere a *M. hyorhinis* o *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* o *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*. Sin embargo, el término micoplasma también abarca *M. bovis*. La secuencia completa del genoma de *M. hyorhinis* se proporciona a modo de ejemplo, por ejemplo, por Liu, W. et al., *J. Bacteriol.* 2010, vol. 192 (21), 5844-45 doi: 10.1128/JB.00946-10. Epub 27 de agosto de 2010 o por Calcutt MJ. et al., 2012, *J. Bacteriol.* Vol. 194 (7), 1848 doi: 10.1128/JB.00033-12. Los aislados de *M. hyosynoviae* se depositan a modo de ejemplo en la Colección Estadounidense de Cultivos de Tejidos (American Tissue Culture Collection) con los números de acceso ATCC 25591 o ATCC 27095. Los aislados de *Mycoplasma hyopneumoniae* se depositan a modo de ejemplo en la Colección Estadounidense de Cultivos de Tejidos (American Tissue Culture Collection) con los números de acceso ATCC 25095, ATCC 25617 y ATCC 25934. El ADN genómico de la cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae* se deposita en la Colección Estadounidense de Cultivos de Tejidos (American Tissue Culture Collection) con los números de acceso ATCC 25934D. Los aislamientos de *Mycoplasma bovis* son bien conocidos por los expertos en la materia y algunos aislamientos se depositan a modo de ejemplo en la Colección Estadounidense de Cultivos de Tejidos (American Tissue Culture Collection) con los números de acceso ATCC 25025, ATCC 25523 y ATCC 27368.

30 El término "cultivo" es conocido por los expertos en la materia. El término se refiere a la propagación de células en cultivo fuera del organismo. En particular, el término "cultivo" se refiere a la propagación de células fuera del organismo en un sistema celular.

35 La expresión "sistema celular" es conocido por los expertos en la materia. En particular, la expresión "sistema celular" es un sistema de cultivo celular *in vitro* para el cultivo de microorganismos, tales como, pero sin limitación, bacterias micoplasma. Dicho sistema celular comprende células hospedadoras y medio de cultivo celular adecuado para la propagación de dichas células fuera del organismo. En particular, las células hospedadoras pueden o no ser susceptibles a una infección con las bacterias micoplasma. Dichas células hospedadoras pueden estar presentes como células vivas, en forma inactivada o como fragmentos celulares. Preferentemente, dichas células hospedadoras son células eucariotas de un sistema de células eucariotas.

45 La expresión "sistema de células eucariotas" comprende células eucariotas primarias y células eucariotas derivadas de organismos multicelulares tales como plantas o animales. Asimismo, el sistema de células eucariotas abarca organismos unicelulares eucariotas (también denominados microorganismos), por ejemplo, bacterias u hongos, incluyendo la levadura. Sin embargo, se entiende que las células eucariotas son diferentes de las bacterias micoplasma. Las células hospedadoras eucariotas que pueden usarse para poner en práctica el método que se describe en el presente documento incluyen, pero sin limitación, células epiteliales renales caninas Madin-Darby (MDCK) (por ejemplo, células epiteliales renales caninas Madin-Darby depositadas en la Colección Estadounidense de Cultivos de Tejidos (American Tissue Culture Collection) con el número de acceso ATCC CCL-34 o ATCC CRL-2285) o células McCoy (por ejemplo, depositadas en la Colección Estadounidense de Cultivos de Tejidos (American Tissue Culture Collection) con el número de acceso ATCC CRL-1696).

55 La expresión "sistema de cultivo sin células", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de cultivo que no incluye ninguna célula excepto las bacterias micoplasma.

60 La expresión "reducido en suero" se refiere a una cantidad reducida de suero que se añade para el cultivo de bacterias micoplasma en el sistema de células eucariotas en comparación con la cantidad de suero que se usa para el cultivo de bacterias micoplasma de la misma especie en un sistema de cultivo sin células. La cantidad de suero para el cultivo de bacterias micoplasma en el sistema de células eucariotas en comparación con la cantidad de suero para el cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de cultivo sin células se reduce en al menos un 10 %, preferentemente en al menos un 20 %, más preferentemente en al menos un 30 %, incluso más preferentemente en al menos un 40 %, incluso más preferentemente en al menos un 50 %, incluso más preferentemente en al menos un 60 %, incluso más preferentemente en al menos un 70 %, incluso más preferentemente en al menos un 80 %, incluso más preferentemente en al menos un 90 %, incluso más preferentemente en al menos un 95 %, incluso más preferentemente en al menos un 96 %, incluso más preferentemente en al menos un 97 %, incluso más preferentemente en al menos un 98 %, incluso más preferentemente en al menos un 99 %, mucho más

preferentemente en un 100 %. Por tanto, debe entenderse que, de acuerdo con la presente divulgación, las bacterias micoplasma se cultivan más preferentemente en un sistema de células eucariotas que carecen de suero.

5 Las cantidades de suero preferidas para el cultivo de bacterias micoplasma en el sistema de células eucariotas incluyen concentraciones de suero de aproximadamente el 0-10 % (v/v), más preferentemente de aproximadamente el 1-9 % (v/v), aún más preferentemente de aproximadamente el 1-8 % (v/v), incluso más preferentemente de aproximadamente el 1-7 % (v/v), incluso más preferentemente de aproximadamente el 1-6 % (v/v) y mucho más preferentemente de aproximadamente el 2-5 % (v/v).

10 Las cantidades de suero preferidas para el cultivo de bacterias micoplasma en el sistema de células eucariotas que comprende células MDCK incluyen una concentración de suero de aproximadamente el 0-6 % (v/v), más preferentemente de aproximadamente el 1-5 % (v/v), aún más preferentemente de aproximadamente el 2-4 % (v/v), incluso más preferentemente de aproximadamente el 2-3 % (v/v) y mucho más preferentemente de aproximadamente el 2 % (v/v).

15 Las cantidades de suero preferidas para el cultivo de bacterias micoplasma en el sistema de células eucariotas que comprende células McCoy incluyen una concentración en suero de aproximadamente el 0-10 % (v/v), más preferentemente de aproximadamente el 1-9 % (v/v), aún más preferentemente de aproximadamente el 2-8 % (v/v), incluso más preferentemente de aproximadamente el 3-7 % (v/v), incluso más preferentemente de aproximadamente el 4-6 % (v/v) y mucho más preferentemente de aproximadamente el 5 % (v/v).

20 De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, debe entenderse que las células eucariotas del sistema de células eucariotas han de infectarse con bacterias micoplasma. La infección de células eucariotas por bacterias micoplasma y las condiciones del período posterior a la incubación son bien conocidas por los expertos en la materia.

25 Sin embargo, preferentemente, después de la transfección, las células se incuban durante un período de hasta 21 días, más preferentemente de aproximadamente dos días a aproximadamente catorce días, más preferentemente de aproximadamente dos días a aproximadamente ocho días, aún más preferentemente de aproximadamente tres a cinco días. Las condiciones de incubación preferidas incluyen una temperatura de aproximadamente 32-42 °C, más preferentemente de aproximadamente 34-40 °C, aún más preferentemente de aproximadamente 35-39 °C, incluso más preferentemente de aproximadamente 36-38 °C y mucho más preferentemente de aproximadamente 37 °C. Las condiciones de incubación preferidas también incluyen una concentración de CO<sub>2</sub> de entre aproximadamente el 2 % al 8 %, más preferentemente de aproximadamente el 3 % al 7 %, incluso más preferentemente de aproximadamente el 4 % al 6 % y mucho más preferentemente aproximadamente del 5 %. Preferentemente, las células eucariotas se observan después de la transfección para detectar cambios característicos, tales como tendencias de densidad celular, la disminución de la viabilidad, incluyendo efectos citopáticos durante el período posterior a la infección y el cambio de color del medio debido a los cambios de pH.

35 El término "obtención" comprende la recogida, el aislamiento, la purificación y/o la formulación (por ejemplo, el acabado, la inactivación y/o la mezcla) del antígeno.

40 El término "recogida" se refiere a la recolección o recuperación del antígeno de las bacterias micoplasma del sistema de células eucariotas transfectadas. Puede usarse cualquier método convencional conocido en la técnica para recuperar dicho antígeno de micoplasma, por ejemplo, cualquier método de separación. Los métodos bien conocidos en la técnica comprenden la centrifugación o filtración, tal como el uso de una membrana semipermeable que tiene un determinado tamaño de poro.

45 El término "aislamiento" comprende una etapa de aislamiento del antígeno de micoplasma. Los expertos en la materia conocen métodos para el aislamiento de antígenos de las bacterias micoplasma del sistema de células eucariotas infectadas. Los métodos comprenden métodos físicos y/o químicos, que incluyen, pero sin limitación, ciclos de congelación y descongelación, tratamiento con ultrasonidos y similares.

50 Los expertos en la materia conocen métodos para la "purificación" de antígenos del aislado, por ejemplo, mediante los métodos que se describen en *Protein purification methods-a practical approach* (E.L. V. Harris y S. Angel, eds., IRL Press at Oxford University Press). Los métodos incluyen, pero sin limitación, separación por centrifugación y/o filtración, precipitación, cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel), cromatografía de afinidad, cromatografía de quelatos metálicos, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía covalente, cromatografía de interacción hidrófoba y similares. El antígeno puede obtenerse en una forma purificada pura, o sin o sustancialmente sin otros materiales celulares o medios de cultivo, etc. Después de dicho aislamiento y/o purificación, el antígeno presenta una pureza de al menos el 80 %, preferentemente del 80 %-90 %, más preferentemente del 90 %-97 %, mucho más preferentemente de más del 97 % hasta una forma pura absoluta sin ninguna contaminación.

55 De acuerdo con un aspecto adicional, "obtención" como se usa en el presente documento también puede incluir etapas de acabado adicionales como parte del proceso de formulación final, como la adición de tampón, la inactivación, etapas de neutralización y similares.

60 Para los fines de la presente divulgación puede usarse cualquier método de "inactivación" convencional. Por tanto, la

inactivación puede realizarse mediante tratamientos químicos y/o físicos que son conocidos por los expertos en la materia. Los métodos de inactivación preferidos incluyen la adición de etilenimina binaria ciclada (BEI), incluyendo la adición de una solución de bromhidrato de 2-bromoetilenamina (BEA), que se ha ciclado con etilenimina binaria (BEI). Agentes adicionales de inactivación química preferidos comprenden, pero sin limitación, Triton X-100, desoxicolato de sodio, bromuro de cetiltrimetilamonio,  $\beta$ -propiolactona, timerosal, fenol y formaldehído (formol). Sin embargo, la inactivación también puede comprender una etapa de neutralización. Los agentes de neutralización preferidos incluyen, pero sin limitación, tiosulfato de sodio, bisulfito de sodio y similares.

Las condiciones de inactivación con formol preferidas incluyen una concentración de formol de aproximadamente el 0,02 % (v/v)-2,0 % (v/v), más preferentemente de aproximadamente el 0,1 % (v/v)-1,0 % (v/v), aún más preferentemente de aproximadamente el 0,15 % (v/v)-0,8 % (v/v), incluso más preferentemente de aproximadamente el 0,16 % (v/v)-0,6 % (v/v) y mucho más preferentemente de aproximadamente el 0,2 % (v/v)-0,4 % (v/v). El tiempo de incubación depende de la resistencia de las especies de micoplasma. En general, el proceso de inacción se realiza hasta que no se pueda detectar ningún crecimiento de micoplasma en un sistema de cultivo adecuado.

De acuerdo con un aspecto adicional, el componente de bacterina inactivada de la divulgación puede incorporarse en liposomas usando una tecnología conocida tal como la que se describe en *Nature*, 1974, 252, 252-254 o *Journal of Immunology*, 1978, 120, 1109-13. De acuerdo con otro aspecto, el componente de bacterina inactivada de la divulgación puede conjugarse con compuestos biológicos adecuados tales como polisacáridos, péptidos, proteínas o similares, o una combinación de los mismos.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la composición inmunogénica es una composición inmunogénica de micoplasma.

En un aspecto de la presente divulgación, el suero que se usa para el cultivo de las bacterias micoplasma está sin suero porcino. El término "sin suero porcino" significa que no se añade suero porcino durante el proceso de cultivo de las bacterias micoplasma en el sistema de células eucariotas.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el suero está sin suero porcino. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas sin suero porcino.

En un aspecto adicional, el cultivo de las bacterias micoplasma se produce en ausencia de suero. Esto significa, que no se añade suero durante el cultivo de las bacterias micoplasma en el sistema de células eucariotas. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas en ausencia de suero; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en ausencia de suero.

En un aspecto de la presente divulgación, los antígenos de micoplasma son una bacterina de micoplasma inactivada completa. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina de micoplasma inactivada completa.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el antígeno de micoplasma es una bacterina inactivada completa. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma dentro de la composición inmunogénica son bacterina inactivada completa. Los antígenos de micoplasma inactivados pueden obtenerse de manera que la etapa b) del método descrito anteriormente incluya una etapa de inactivación. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, se desvela un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma e inactivación de los antígenos de micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La bacterina inactivada completa puede obtenerse mediante la inactivación de bacterias micoplasma completas, preferentemente mediante un método que se ha descrito anteriormente en el presente documento. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición

inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma e inactivación de los antígenos de micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que los antígenos de micoplasma son bacterias micoplasma completas.

5 Preferentemente, las bacterias micoplasma se inactivan con formol como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma e inactivación de los antígenos de micoplasma con formalina; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que los antígenos de micoplasma son bacterias micoplasma completas. Preferentemente, el formol se usa en concentraciones como se han descrito anteriormente en el presente documento.

15 En un aspecto de la presente divulgación, el sistema de células eucariotas comprende una estirpe celular MDCK. La estirpe celular MDCK (Células Epiteliales Renales Caninas Madin-Darby) se obtuvo del tejido renal de una hembra cocker spaniel adulta. Sin embargo, la estirpe celular MDCK es conocida por el experto en la materia. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el sistema de células eucariotas comprende una estirpe celular MDCK. De nuevo, el antígeno de micoplasma puede ser bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol.

25 En un aspecto adicional de la presente divulgación, el sistema de células eucariotas comprende una estirpe celular McCoy. La estirpe celular McCoy es conocida por los expertos en la materia. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el sistema de células eucariotas comprende una estirpe celular McCoy. De nuevo, el antígeno de micoplasma puede ser bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol.

35 En un aspecto de la presente divulgación, las bacterias micoplasma se seleccionan entre el grupo que consiste en: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y *M. bovis*. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la bacteria micoplasma se selecciona entre el grupo que consiste en: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y *M. bovis*. Preferentemente, el antígeno de micoplasma puede ser bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

45 En un aspecto adicional de la presente divulgación, las bacterias micoplasma se seleccionan entre el grupo que consiste en: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que las bacterias micoplasma se seleccionan entre el grupo que consiste en: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, el antígeno de micoplasma puede ser bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

55 Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias *M. hyopneumoniae* en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de la bacteria *M. hyopneumoniae*; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el antígeno de *M. hyopneumoniae* es bacterina de *M. hyopneumoniae* inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de *M. hyopneumoniae* pueden ser bacterina de *M. hyopneumoniae* inactivada completa.

65 Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias *M. hyorhinis* en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de la bacteria *M. hyorhinis*; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente

aceptable. Preferentemente, el antígeno de *M. hyorhinis* es bacterina de *M. hyorhinis* inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de *M. hyorhinis* pueden ser bacterina de *M. hyorhinis* inactivada completa.

- 5 Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias *M. hyosynoviae* en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de la bacteria *M. hyosynoviae*; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el antígeno de *M. hyosynoviae* es bacterina de *M. hyosynoviae* inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de *M. hyosynoviae* pueden ser bacterina de *M. hyosynoviae* inactivada completa.

- 15 De acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica comprende el antígeno de micoplasma seleccionado entre el grupo que consiste en: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos. Se cultivan al menos bacterias de una de las especies de micoplasma descritas anteriormente (por ejemplo, *M. hyopneumoniae* o *M. hyorhinis* o *M. hyosynoviae*) que se usan para la preparación de la composición inmunogénica de micoplasma de acuerdo con la divulgación en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino. Preferentemente, todas las bacterias micoplasma que se usan para la preparación de la composición inmunogénica de micoplasma se cultivan de acuerdo con la divulgación en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino.

- 25 Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica que comprende antígeno de micoplasma de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y/o cualquier combinación de los mismos para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de al menos una bacteria micoplasma seleccionada entre el grupo que consiste en: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, todas las bacterias micoplasma se cultivan en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino de acuerdo con la divulgación. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

- 35 Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica que comprende antígeno de micoplasma de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y/o cualquier combinación de los mismos para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de al menos bacterias *M. hyopneumoniae* en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, todas las bacterias *M. hyopneumoniae* se cultivan en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino de acuerdo con la divulgación. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de *M. hyopneumoniae* es bacterina de *M. hyopneumoniae* inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de *M. hyopneumoniae* pueden ser bacterina inactivada completa.

- 45 Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica que comprende antígeno de micoplasma de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y/o cualquier combinación de los mismos para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de al menos bacterias *M. hyorhinis* en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, todas las bacterias *M. hyorhinis* se cultivan en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino de acuerdo con la divulgación. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de *M. hyorhinis* es bacterina de *M. hyorhinis* inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de *M. hyorhinis* pueden ser bacterina inactivada completa.

- 55 Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica que comprende antígeno de micoplasma de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y/o cualquier combinación de los mismos para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de al menos bacterias *M. hyosynoviae* en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, todas las bacterias *M. hyosynoviae* se cultivan en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino de acuerdo con la divulgación. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de *M. hyosynoviae* es bacterina de *M. hyosynoviae* inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de *M. hyosynoviae* pueden ser bacterina inactivada completa.

- 65 En un aspecto de la presente divulgación, la composición inmunogénica se formula para una administración de dosis

única. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la composición inmunogénica se formula para una administración de dosis única. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

Ventajosamente, los datos experimentales desvelan que una administración de dosis única de la composición inmunogénica estimuló de manera fiable y eficaz una respuesta inmunitaria protectora. Específicamente, se ha demostrado una respuesta a anticuerpos medible para *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a animales, preferentemente a mamíferos tales como cerdos.

En un aspecto de la presente divulgación, el sujeto es un cerdo. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el sujeto es un cerdo. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, el sujeto son vacas. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el sujeto son vacas. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, el sujeto es un gato. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el sujeto es un gato. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, el sujeto es un perro. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el sujeto es un perro. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retrasan la adsorción, adyuvantes, estimulantes inmunitarios y combinaciones de los mismos.

En un aspecto de la presente divulgación, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un adyuvante.

Los "adyuvantes", como se usa en el presente documento, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede basarse en particular en aceite de parafina líquida ligero (del tipo de la Farmacopea Europea); un aceite isoprenoide tal como escualeno o escualeno; el aceite resultante de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más en particular aceites vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol,

tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferentemente tensioactivos no iónicos, en particular, ésteres de sorbitano, de manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico y hidroxiesteárico, que están opcionalmente etoxilados y bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, especialmente L121. Véase Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). JohnWiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Por ejemplo, es posible usar la emulsión SPT que se describe en la página 147 de "*Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*" editado por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 que se describe en la página 183 de este mismo libro. Otros adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), copolímero de bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil lípido A, adyuvante de amina lipoidal Avridine, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o no), toxina colérica, IMS 1314 o dipéptido de muramilo entre muchos otros. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alquenilo, se incluyen los copolímeros EMA (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua conduce a una solución ácida que se neutralizará, preferentemente a pH fisiológico, con el fin de proporcionar la solución adyuvante a la que se incorporará la propia composición inmunogénica, inmunitaria o de vacuna.

Un ejemplo adicional de un adyuvante es un compuesto elegido entre los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alquenilo. Son compuestos adyuvantes ventajosos los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con polialquenil éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (*Pharmeuropa* Vol. 8, N.º 2, junio de 1996). Los expertos en la materia también pueden referirse a la Patente de los EE.UU. N.º 2.909.462, que describe dichos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferentemente no más de 8, estando reemplazados los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferentes son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados también pueden contener a su vez otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos comercializados con el nombre CARBOPOL®; (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son particularmente apropiados. Son polímeros de ácido acrílico reticulados con polialquenil éteres o divinilglicol o reticulados con una alil sacarosa o con alil pentaeritritol. Entre ellos, pueden mencionarse CARBOPOL® 974P, 934P y 971P. Se prefiere mucho más el uso de CARBOPOL® 971P.

Preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis. Aún más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis. Mucho más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

En un aspecto preferido de la divulgación, el adyuvante se selecciona entre el grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, saponinas, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua, polímeros de ácido acrílico o metacrílico, copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alquenilo, el sistema adyuvante RIBI, copolímero de bloque, SAF-M, monofosforil lípido A, lípido-amina Avridina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o no), toxina colérica, IMS 1314, dipéptido de muramilo y combinaciones de los mismos.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable es un adyuvante. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

En un aspecto de la presente divulgación, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una emulsión de agua en aceite en agua o un carbómero. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable es una emulsión de agua en aceite en agua o un carbómero. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

En un aspecto de la presente divulgación, la emulsión de agua en aceite en agua es Montanide ISA207 VG. Montanide

ISA207 VG es un adyuvante compuesto por ésteres oleicos de manitol anhidro en solución en un aceite no mineral y está diseñado para conseguir emulsiones de vacunas de agua en aceite en agua. Montanide ISA207 VG es bien conocido por los expertos en la materia y puede usarse.

5 Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable es Montanide ISA207 VG o CARBOPOL®.  
10 Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

15 La presente divulgación también se refiere a un método que se ha descrito anteriormente para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno de micoplasma. Ventajosamente, los datos experimentales proporcionados desvelan que los antígenos de bacterias micoplasma proporcionados mediante el método descrito anteriormente tienen una inmunogenicidad aumentada en comparación con los antígenos obtenidos a partir de bacterias micoplasma cultivadas en un sistema de cultivo sin células. Específicamente, las vacunas de *M. hyorhinis* basadas en MDCK mostraron un inicio temprano de la sero-conversión, mayor número de cerdos sero-positivos y mayores títulos serológicos.

20 Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

25 En un aspecto de la presente divulgación, el antígeno tiene una inmunogenicidad aumentada en comparación con un antígeno obtenido de bacterias micoplasma cultivadas en un sistema de cultivo sin células. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la composición inmunogénica tiene una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que comprende el mismo antígeno obtenido de bacterias micoplasma cultivadas en un sistema de cultivo sin células. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

30 La expresión "inmunogenicidad aumentada", como se usa en el presente documento, significa que la respuesta inmunitaria provocada por una composición inmunogénica que comprende un antígeno de interés aumenta en comparación con una composición inmunogénica de referencia que comprende el mismo antígeno, en el que el antígeno de la composición inmunogénica de referencia se prepara a partir de bacterias micoplasma cultivadas en un sistema de cultivo sin células.

35 El término "aumentado" significa que la respuesta inmunitaria mediada por células y/o por anticuerpos aumenta en al menos un 10 %, preferentemente en al menos un 20 %, más preferentemente en al menos un 30 %, incluso más preferentemente en al menos un 40 %, incluso más preferentemente en al menos un 50 %, incluso más preferentemente en al menos un 75 %, más preferentemente en al menos un 100 % en comparación con la respuesta inmunitaria mediada por células y/o por anticuerpos provocada por una composición inmunogénica de referencia que comprende el mismo antígeno, en el que el antígeno de la composición inmunogénica de referencia se prepara a partir de bacterias micoplasma cultivadas en un sistema de cultivo sin células. Es de conocimiento general de un experto en la materia cómo medir la respuesta inmunitaria mediada por células y/o por anticuerpos. En particular, queda claro para dicho experto en la materia comparar la respuesta inmunitaria mediada por células de la composición inmunogénica de interés con la respuesta inmunitaria mediada por células de la referencia, o la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos de la composición inmunogénica de interés con la de la composición de referencia, pero no la respuesta inmunitaria mediada por células de una composición inmunogénica de interés con la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos de la referencia o viceversa. Además, la respuesta inmunitaria mediada por células puede medirse, por ejemplo, midiendo la activación de linfocitos T citotóxicos mediante una composición inmunogénica/antígeno de interés. La respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos puede medirse, por ejemplo, midiendo la cantidad de anticuerpos específicos de antígeno, generados por causa de la administración de la composición inmunogénica que comprende dicho antígeno a un animal. La respuesta inmunitaria mediada por células y/o por anticuerpos puede medirse, por ejemplo, mediante el uso de un modelo de ratón, un modelo de gato, un modelo de vaca o un modelo de cerdo. Sin embargo, los ensayos que se describen en los Ejemplos 4 y 5 se usarán como un ensayo de referencia para detectar la respuesta inmunitaria contra *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*.

65 La expresión "mismo antígeno" significa que la naturaleza de los antígenos es idéntica. Por tanto, si el antígeno de

micoplasma de la composición inmunogénica producida en un sistema de células eucariotas reducido en suero es una bacterina inactivada completa de *M. hyorhinis*, entonces el mismo antígeno significa que el antígeno de micoplasma del sistema sin células también es una bacterina inactivada completa de *M. hyorhinis*. Asimismo, si el antígeno de micoplasma de la composición inmunogénica producida en un sistema de células eucariotas reducido en suero se prepara o se purifica de acuerdo con un método específico, entonces el "mismo antígeno" significa que el antígeno de micoplasma del sistema sin células se prepara o se purifica de acuerdo con el mismo método.

La expresión "composición inmunogénica de referencia" se refiere a una composición inmunogénica no obtenida mediante el cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino de acuerdo con la presente divulgación.

Más bien, la expresión "composición inmunogénica de referencia" se refiere a una composición inmunogénica obtenida mediante el cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de cultivo sin células complementado con suero usando el mismo antígeno. El cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de cultivo sin células complementado con suero es bien conocido por los expertos en la materia. El origen del suero y la concentración del suero dependen de las bacterias micoplasma que se han de cultivar y los rendimientos de las bacterias micoplasma que se han de obtener. *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae* generalmente se cultivan en un sistema de cultivo sin células complementado con un 10-20 % (v/v) de suero porcino y un 5-10 % (v/v) de extracto de levadura para obtener altos rendimientos. Sin embargo, ha de entenderse que las concentraciones de suero pueden variarse, el extracto de levadura puede eliminarse y el origen del suero puede modificarse, a modo de ejemplo, por suero de ternera fetal o similares.

La presente divulgación no solo proporciona métodos para la preparación de composiciones inmunogénicas o métodos para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno como se ha definido anteriormente, sino que también se refiere a una composición inmunogénica que puede obtenerse mediante los métodos que se han descrito anteriormente. Por tanto, en un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a una composición inmunogénica que puede obtenerse mediante un método que se describe en el presente documento. En general, dicho método comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

En un aspecto de la presente divulgación, la composición inmunogénica muestra una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica de referencia que comprende un antígeno, en el que el antígeno de la composición inmunogénica de referencia se prepara a partir de una bacteria micoplasma cultivada en un sistema de cultivo sin células.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que puede obtenerse mediante un método que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con un aspecto adicional, dicha composición inmunogénica muestra una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica de referencia que comprende el mismo antígeno preparado a partir de una bacteria micoplasma cultivada en un sistema de cultivo sin células. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

En un aspecto adicional, la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema de células eucariotas.

La expresión "componentes de las células eucariotas" comprende tanto células completas como fragmentos de dichas células eucariotas. El término "fragmento" comprende cualesquier partes de la célula eucariota tales como partes de la membrana celular u orgánulos intracelulares en su totalidad o partes de los mismos. Sin embargo, el término fragmento también abarca cualquier parte de dicha célula eucariota que comprende lípidos, proteínas, azúcares, ADN, ARN y similares, así como combinaciones de los mismos. Adicionalmente, los componentes de las células eucariotas y el antígeno de micoplasma pueden estar en la composición inmunogénica por separado o unidos entre sí o una combinación de los mismos.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que puede obtenerse mediante un método que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema de células eucariotas. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

En un aspecto adicional, dichos componentes de las células eucariotas se unen al antígeno de micoplasma.

El término "unido" se refiere a cualquier interacción, asociación, unión, adhesión o enlace de dichos componentes de las células eucariotas al antígeno de micoplasma. Por tanto, el término unido abarca cualquier interacción que incluya enlaces indirectos o directos, no reversibles o reversibles, físicos y químicos, electrostáticos y/o covalentes. Por tanto, ha de entenderse que los componentes de las células eucariotas, por ejemplo, pueden unirse al antígeno de micoplasma. Sin embargo, ha de entenderse que los componentes de las células eucariotas también pueden estar unidos a los uno o más antígenos de micoplasma. Dicha unión puede producirse mediante varios métodos bien conocidos por los expertos en la materia, tales como tratamiento con formaldehído y similares.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que puede obtenerse mediante un método que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que dichos componentes de las células eucariotas se unen al antígeno de micoplasma. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

Normalmente, cuando se usa un antígeno bacteriano tal como bacterina de micoplasma la composición inmunogénica contiene una cantidad de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) del antígeno bacteriano por dosis, preferentemente, aproximadamente  $10^9$  UFC del antígeno bacteriano por dosis, más preferentemente de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^6$  UFC del antígeno bacteriano por dosis. Si se usa bacterina inactivada en la composición inmunogénica, los valores de UFC se refieren a la cantidad de bacterias micoplasma antes de la inactivación.

Por ejemplo, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende antígenos de *M. hyopneumoniae* se usa preferentemente en cantidades de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^{10}$  UFC por dosis, preferentemente de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$  UFC por dosis, incluso más preferentemente en una cantidad de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^8$  UFC por dosis, más preferentemente en una cantidad de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^7$  UFC por dosis. La composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende antígenos de *M. hyorhinis* se usa preferentemente en cantidades de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^{10}$  UFC por dosis, preferentemente de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$  UFC por dosis, incluso más preferentemente en una cantidad de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^8$  UFC por dosis, más preferentemente en una cantidad de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^7$  UFC por dosis. La composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende antígenos de *M. hyosynoviae* se usa preferentemente en cantidades de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^{10}$  UFC por dosis, preferentemente de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$  UFC por dosis, incluso más preferentemente en una cantidad de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^8$  UFC por dosis, más preferentemente en una cantidad de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^7$  UFC por dosis.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para proporcionar una composición inmunogénica que comprende a) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero o sin suero porcino; b) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la composición inmunogénica contiene una cantidad de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) del antígeno bacteriano por dosis. Preferentemente, al menos uno de los antígenos de micoplasma es bacterina de micoplasma inactivada completa, preferentemente inactivada con formol. Se entiende que solo uno, algunos o todos los antígenos de micoplasma pueden ser bacterina inactivada completa.

Un experto en la materia entiende que las diversas etapas del proceso de los métodos para proporcionar una composición inmunogénica que se describe en el presente documento pueden combinarse para poner en práctica la invención que se describe en el presente documento.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos solo pretenden ilustrar la presente invención. No limitarán el alcance de las reivindicaciones de ninguna manera.

#### Ejemplo 1

Cultivo de bacterias micoplasma en células MDCK o células McCoy, respectivamente.

A. Cultivo de *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y *M. hyopneumoniae* en células MDCK

M. hyorhinis:

Uno o más matraces T75 confluentes de células MDCK se tripsinizan y se subcultivan en 5 matraces T150 (división 1:10) usando MEM + FBS al 5 %. Los matraces se incuban a 37 °C + CO<sub>2</sub> al 5 % hasta que se observa una monocapa confluyente aproximadamente al 95-100 %. Los medios se decantaron y los matraces se aclararon dos veces con 1xPBS. Se añaden cuatro o cinco ml de *M. hyorhinis* a cada matraz (MOI = 10-100). Las células confluentes en los matraces se infectan en las mismas condiciones de incubación que anteriormente durante no menos de 2 horas. Después del período de infección, se añade suficiente medio de infección (MEM + FBS al 2 %), precalentado a aproximadamente 37 °C, a cada matraz para un volumen total de 60 ml por matraz. Los matraces se incuban hasta > 90 % de CPE (aproximadamente 3-7 días). Las suspensiones celulares se recogen de cada matraz y se agrupan (Pase = n). El material agrupado se usa para infectar nuevos matraces de células MDCK confluentes aproximadamente al 95-100 % de la misma manera que la infección anterior (Pase = n + 1), aumentando el número de matraces utilizados para conseguir un volumen final suficiente como se considere necesario (Pase = n + 2, Pase = n + 3, etc).

M. hyosynoviae:

Se cultiva *M. hyosynoviae* de la misma manera que *M. hyorhinis* con algunas modificaciones: El medio de infección contienen DMEM + FBS al 2 % + solución de arginina al 1 %; *M. hyosynoviae* normalmente no presenta CPE, por lo que el cambio de color y la turbidez del medio es el indicador clave para subcultivar al siguiente pase.

M. hyopneumoniae:

*M. hyopneumoniae* se cultiva de la misma manera que *M. hyorhinis*. Dependiendo de la cepa utilizada para la infección, puede o no estar presente CPE. Por tanto, el cambio de color y la turbidez de los medios pueden usarse como indicador para subcultivar al siguiente pase.

B. Condiciones de cultivo para *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y *M. hyopneumoniae* en células McCoy.

M. hyorhinis:

Se cultivan células McCoy como cultivos en suspensión en matraces en agitación en EMEM modificado complementado con FBS al 10 %. Las células se subcultivan sembrando nuevos matraces de manera que tengan una concentración final de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> células/ml. Para *M. hyorhinis*, se siembra una suspensión celular de 500 ml a una concentración de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> células/ml en un matraz de 3 l con 1 ml de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> UFC. Los matraces se incuban a 37 °C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5 % en una placa de agitación magnética durante 3-7 días. El crecimiento del *Mycoplasma* se determina mediante el cambio del pH ácido visible y el aumento de la turbidez. El crecimiento del *Mycoplasma* también se evalúa mediante ensayos de PFU para determinar los recuentos.

M. hyosynoviae:

Se cultiva *M. hyosynoviae* de manera similar a *M. hyorhinis*. Se siembra una suspensión celular de 500 ml a una concentración de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> células/ml en un matraz de 3 l con 1 ml de 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> UFC. Los matraces se incuban después a 37 °C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5 % en una placa de agitación magnética durante aproximadamente 2 semanas. Se usan tanto el cambio de pH como el aumento de la turbidez para determinar el crecimiento, además de los ensayos de PFU para determinar los recuentos.

M. hyopneumoniae:

Se cultiva *M. hyopneumoniae* de manera similar a *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*. Se siembra una suspensión celular de 500 ml a una concentración de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> células/ml en un matraz de 3 l con 1 ml de 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> UFC. Los matraces se incuban a 37 °C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5 % en una placa de agitación magnética durante aproximadamente 2 semanas. Pueden usarse tanto el cambio de pH como el aumento de la turbidez para determinar el crecimiento, además de los ensayos de PFU para determinar los recuentos.

C. Cultivo de especies de micoplasma con diversos tipos de suero

Para evaluar si puede cultivarse una especie de micoplasma en suero de diferentes especies, se infectan células MDCK con *M. hyorhinis* y se cultivan en suero fetal bovino, suero porcino, suero de conejo, suero de pollo o suero de caballo. Para cada tipo de suero, el cultivo de *M. hyorhinis* en células MDCK se realiza como se ha descrito anteriormente (es decir, suero al 5 % para el crecimiento celular y suero al 2 % para la infección). Se recoge *M. hyorhinis* cuatro días después de la infección según el método estándar. Se realiza un ensayo de CCU (unidad de cambio de color, por sus siglas en inglés) para determinar el título vivo de *M. hyorhinis*. Adicionalmente, se realiza una qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real) para determinar el contenido genómico total de *M. hyorhinis*. Se muestra un experimento de ejemplo en la Tabla 1.

Tabla 1: Cultivo de *M. hyorhinis* con diversos tipos de suero

Tipo de suero	log de qPCR (gc/μl)	CCU50 (log/ml)
---------------	---------------------	----------------

Suero bovino fetal	6,15	8,00
Suero porcino	6,06	8,50
Suero de conejo	6,11	8,33
Suero de pollo	6,31	8,00
Suero de caballo	6,49	9,00

La Tabla 1 demuestra que los títulos medidos ya sea por CCU o qPCR son similares para los distintos tipos de suero. Adicionalmente, los datos de transferencia Western (no mostrados) respaldan estos datos. Por tanto, puede cultivarse *M. hyorhinis* en células MDCK independientemente del tipo de suero que se use para el cultivo.

5

Ejemplo 2

Preparación de vacunas.

10 Cuando el pase final está listo para la recogida (> 90 % de CPE presente), se realiza un solo ciclo de congelación-descongelación en todos los matraces colocándolos en un congelador < -60 °C durante >2 horas, descongelando rápidamente a 37 °C, recogiendo y agrupando el lisado y pipeteando arriba y hacia abajo varias veces para homogeneizar. En general, se añade glicerol al 10-20 % a la suspensión y se homogeneiza. La suspensión se divide en partes alícuotas en volúmenes de trabajo. Las soluciones madre se mantienen a < -60 °C hasta que se necesiten.

15

Los volúmenes apropiados de las soluciones madre anteriores se inactivan con formol al 0,2 %. El exceso de formol se neutraliza con bisulfito de sodio en el momento de la mezcla de la vacuna. Las vacunas se mezclan con el adyuvante Montanide™ ISA 207 VG o con el adyuvante CARBOPOL®. Las vacunas se almacenan a 2-7 °C.

20

Ejemplo 3

Evaluación de la eficacia de las vacunas.

25 La eficacia de las vacunas se evalúa en función de la capacidad de inducir una respuesta a anticuerpos (así como el título mediante ELISA) después de la administración en cerdos.

Cuidado de los animales:

30 Los animales se encuentran en buen estado de salud y nutrición antes de iniciar el estudio. Antes del procedimiento de aleatorización se realiza un examen de salud. Se usa pienso no medicado durante toda la duración del estudio. Las raciones de pienso son apropiadas para la edad, la afección y la especie del animal de ensayo de acuerdo con el procedimiento operativo convencional de la instalación. Se proporciona agua a demandad durante todo el estudio.

35 Evaluación de la eficacia de vacunas de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* después de la administración en cerdos.

*M. hyorhinis*:

40 El D0 y nuevamente el D21, a lechones convencionales de 6 semanas ± 5 días de edad se les administra una dosis de 2 ml (7,1-7,3 log10 CCU/dosis) de vacuna de *M. hyorhinis* por vía intramuscular. Se prepara *M. hyorhinis* como anteriormente; es decir, se cultiva en células MDCK como se ha descrito anteriormente. La vacuna se potencia con Montanide ISA207VG o CARBOPOL®. Se usa PBS como placebo. Los cerdos se observan a diario para determinar su salud general. Se recoge sangre antes de la vacunación el D0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42. El suero se somete a ensayo para detectar anticuerpos específicos de *M. hyorhinis* mediante BIVI R&D ELISA Indirecto. Para el BIVI R&D ELISA, una relación S/P de >0,200 se considera positiva.

45

50 En el ejemplo que se muestra en la Tabla 2, el ELISA para *M. hyorhinis* indica una fuerte respuesta a anticuerpos. Seis/seis (100 %) animales vacunados con *M. hyorhinis*-MDCK + Montanide ISA207VG fueron positivos dos semanas después de la primera dosis (D14). Todos los animales se mantuvieron positivos hasta D42, con un aumento en los títulos observado una semana después de la segunda dosis (D28). Los animales vacunados con *M. hyorhinis*-MDCK + CARBOPOL® también muestran una respuesta a anticuerpos.

Tabla 2: Resultados de ELISA de *M. hyorhinis*

	Pre	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
M.hyorhinis MDCK + Montanide ISA207VG	0,00	0,003	0,043	0,972	1,123	1,340	1,152	1,133
M.hyorhinis MDCK + CARBOPOL®	0,002	0,018	0,059	0,095	0,122	0,354	0,375	0,409
Placebo (PBS)	0,001	0,005	0,011	0,015	0,021	0,031	0,057	0,070

Se consiguieron resultados de respuesta a anticuerpos similares después de la vacunación usando *M. hyorhinis*

cultivado en células McCoy (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares después de una administración de dosis única (datos no mostrados).

M. hyopneumoniae:

5 El D0 y nuevamente el D21, a lechones convencionales de 6 semanas ± 5 días de edad se les administra una dosis de 2 ml (8,0-8,5 log<sub>10</sub> CCU/dosis) de vacuna de *M. hyopneumoniae* por vía intramuscular. La vacuna se potencia con Montanide ISA207VG. Se usa PBS como placebo. Los cerdos se observan a diario para determinar su salud general. Se extrae sangre antes de la vacunación el D0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 para someter a ensayo la presencia de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*. En un ejemplo, se usó un IDEXX ELISA comercial. Para el IDEXX ELISA, una relación S/P de >0,400 se consideró positiva.

15 En el ejemplo que se muestra en la Tabla 3, el ELISA de *M. hyopneumoniae* indicó una fuerte respuesta a anticuerpos. Para los animales vacunados con *M. hyopneumoniae* MDCK + ISA207, 3/6 (50 %) de los animales dieron positivo el D14 y 5/6 (83,3 %) el D21 con 6/6 (100 %) positivos el D28, 35 y 42.

Tabla 3: Resultados de IDEXX ELISA de *M. hyopneumoniae*

	Pre	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
<i>M. hyopneumoniae</i> MDCK + Montanide ISA207VG	-0,024	-0,022	0,034	0,601	0,949	1,775	1,986	1,895
Placebo (PBS)	-0,019	0,011	-0,021	-0,015	-0,025	-0,025	0,016	0,016

Se obtuvieron resultados similares después de una administración de dosis única, datos no mostrados.

Ejemplo 4

Eficacia de vacunas obtenidas de bacterias micoplasma cultivadas en una estirpe celular eucariota frente a vacunas obtenidas de bacterias micoplasma cultivadas en un sistema sin células.

25 Se dividen cincuenta y cuatro animales CD/CD a las 8 semanas ± 5 días de edad en seis grupos. El grupo V1 y V2 reciben cada uno un aislado MHRN001 inactivado de *M. hyorhinis* cultivado en células MDCK y CM (medio complejo; tal como un medio a base de proteosa peptona que contiene suero porcino y extracto de levadura o medio a base de Friis), respectivamente; el grupo V3 y V4 reciben un aislado MHRN002 inactivado de *M. hyorhinis* cultivado en células MDCK y CM, respectivamente. Todas las vacunas se potencian con Montanide ISA207VG; la dosis y la vía fueron 2 dosis de 2 ml por inyección intramuscular con una dosis el D0 y la segunda el D21. El grupo CC (grupo de control, por sus siglas en inglés) recibe un placebo sin antígeno (PBS) de la misma manera. El grupo SC (control estricto, por sus siglas en inglés) no recibe ningún tratamiento durante el estudio, actuando como animales de control estricto. El D42, 43 y 44, los cerdos del Grupo V1-V4 y CC se someten a prueba de provocación con un *M. hyorhinis* virulento. La dosificación y la vía de administración son 40 ml por vía intraperitoneal, 15 ml por vía intravenosa y 15 ml por vía intranasal, respectivamente. Se extrae sangre semanalmente desde el D0 hasta el final del estudio (D58) para el ensayo ELISA específico para *M. hyorhinis*. Para el R&D ELISA de *M. hyorhinis*, una relación S/P de >0,200 se consideró positiva. En el estudio a modo de ejemplo que se muestra en la Tabla 4, todos los cerdos del Grupo SC permanecieron negativos durante todo el estudio, lo que indica una falta de exposición a *M. hyorhinis*. Los Grupos V I-V4 y CC fueron negativos el D0 y 7. Sin embargo, los resultados de serología variaron entre las vacunas basadas en CM y basadas en MDCK. Cuando se compararon con las vacunas basadas en CM, las vacunas basadas en MDCK mostraron un inicio más temprano de la sero-conversión, un mayor número de cerdos sero-positivos y títulos serológicos más altos.

Tabla 4: Resultados de ELISA de *M. hyorhinis*

Relaciones S/P promedio de ELISA de <i>M. hyorhinis</i> por Grupo									
Grupo	DO	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D58
MHRN00 1-MDCK (V1)	-0,002	0,010	0,199	0,482	0,916	0,971	0,929	1,056	0,991
MHRN00 1-CM (V2)	0,001	0,009	0,031	0,081	0,395	0,401	0,370	0,793	0,770
MHRN00 2 MDCK (V3)	0,004	0,014	0,157	0,424	0,981	1,023	0,953	1,097	1,086
MHRN00 2-CM (V4)	0,003	0,011	0,017	0,047	0,298	0,299	0,263	0,704	0,608
Placebo (CC)	0,004	0,004	0,009	0,023	0,021	0,029	0,031	0,262	0,433
Control estricto (SC)	-0,003	-0,002	-0,003	0,005	0,008	0,015	0,021	0,031	0,060

Se realizan experimentos de titulación para comparar las vacunas basadas en el cultivo de células con las vacunas a partir de bacterias de micoplasma cultivadas en un sistema sin células.

5 Se cultiva *M. hyorhinis* en células McCoy como se ha descrito anteriormente o se cultiva en CM (medio complejo), respectivamente.

10 Las vacunas se fabrican con antígeno McCoy usando antígeno sin diluir (completo), antígeno 1:10 y antígeno 1:100, todos mezclados 1:1 con Montanide ISA207VG como adyuvante. Las vacunas que usan antígeno derivado de CM se fabrican de la misma manera.

15 Los cerdos (tres semanas de edad en el momento de la vacunación) se vacunan con una dosis única de 2 ml administrada IM el día 0.

20 Como se muestra en la Tabla 5, los promedios de los grupos del estudio a modo de ejemplo fueron todos "negativos" antes de la prueba de provocación (D0-D21), sin embargo, "McCoy + ISA completo" y "McCoy + ISA 1:10" mostraron respuestas tendientes a ser positivas. Una semana después de la prueba de provocación (D28), todos los grupos vacunados respondieron con la excepción de CM 1:100.

25 A partir de la Tabla 5 es evidente que cada tipo de antígeno (McCoy, CM) presenta un efecto de titulación convencional (Completo>1:10>1:100). Adicionalmente, a partir de la Tabla 5 es evidente que los vacunados con "McCoy + ISA completo" y "McCoy + ISA 1:10" tienen puntuaciones promedio más altas que el antígeno "CM + ISA completo" y eso se mantiene hasta la terminación el D42. Los grupos con promedios positivos (S/P ≥0,200) después de la prueba de provocación son los grupos "McCoy + ISA completo" y "McCoy + ISA 1:10". La vacuna completa de McCoy y la dilución 1:10 mostraron una mayor sero-respuesta que la vacuna completa de CM tanto antes de la prueba de provocación como después de la prueba de provocación. Asimismo, los animales vacunados con McCoy 1:100 también mostraron una respuesta distinguible de los grupos placebo (no vacunados) y CM 1:100 (la respuesta de CM 1:100 o la falta de la misma, fue equivalente a la de los no vacunados). Los experimentos de titulación demostraron que las vacunas basadas en cultivos celulares tuvieron mejores resultados serológicos en comparación con las vacunas de bacterias micoplasma cultivadas en un sistema sin células.

Tabla 5: Resultados de ELISA de *M. hyorhinis*

Relaciones S/P promedio de ELISA de <i>M. hyorhinis</i> por Grupo							
Grupo	DO	D7	D14	D21	D28	D35	D42
McCoy + ISA completo	0,002	0,012	0,032	0,117	0,312	0,298	0,325
McCoy + ISA 1:10	0,000	0,005	0,065	0,107	0,291	0,193	0,221
McCoy + ISA 1:100	0,001	0,001	-0,001	0,000	0,145	0,118	0,150
CM + ISA completo	0,002	0,009	0,011	0,034	0,190	0,163	0,190
CM + ISA 1:10	-0,001	0,017	0,003	0,014	0,114	0,132	0,176
CM + ISA 1:100	-0,002	0,000	-0,002	0,001	0,019	0,043	0,093
Placebo: PBS + ISA	-0,001	0,002	-0,002	-0,002	0,021	0,039	0,081
Control estricto	-0,002	-0,001	-0,002	-0,002	-0,002	0,008	0,024

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la preparación de una composición inmunogénica para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto que comprende:
- a.) cultivo de bacterias micoplasma en un sistema de células eucariotas reducido en suero, en el que dicho sistema de células eucariotas comprende una estirpe celular MDCK o una estirpe celular Mc Coy;
  - b.) obtención de un antígeno de las bacterias micoplasma; y
  - c.) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable,
- 10 en el que la composición inmunogénica comprende bacterias micoplasma seleccionadas entre la lista que contiene: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* y, en el que el antígeno es una bacterina inactivada completa,
- 15 en el que el cultivo de las bacterias micoplasma en el sistema de células eucariotas incluye concentraciones de suero entre el 0-10 % (v/v).
2. El método de la reivindicación 1, en el que el suero está sin suero porcino.
3. El método de la reivindicación 1, en el que las bacterias micoplasma se cultivan en ausencia de suero.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la bacterina inactivada completa es bacterina inactivada con formol.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho sujeto es un cerdo.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable es una emulsión de agua en aceite en agua o un carbómero.
- 30 7. Una composición inmunogénica que puede obtenerse mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.