

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 673**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12R 1/35 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/US2013/076803**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14105671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13821324 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 2938356**

54 Título: **Composición inmunogénica que comprende antígenos de micoplasma**

30 Prioridad:

28.12.2012 US 201261747026 P

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

01.03.2021

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;
MUEHLENHALER, CHRISTINE MARGARET;
NEUBAUER, AXEL y
IYER, ARUN V.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 808 673 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

Composición inmunogénica que comprende antígenos de micoplasma

5 Antecedentes

Las bacterias del género *Mycoplasma* pertenecen a la clase *Mollicutes* y representan un grupo de organismos derivados del linaje Firmicutes. *Mollicutes* son los organismos más pequeños que se replican de forma autónoma, que difieren estructuralmente de otras eubacterias en que carecen de una pared celular. La superficie de su membrana única se considera una interfaz clave para mediar la adaptación y la supervivencia en el contexto de un hospedador complejo, inmunocompetente. Además, *Mollicutes* tiene un genoma pequeño y un número limitado de vías metabólicas. Por tanto, los miembros del género *Mycoplasma* también se han interpretado como "organismos mínimos autorreplicantes". Sin embargo, a pesar de esta evidente simplicidad, una gran cantidad de bacterias de micoplasma son patógenas de los humanos y de una amplia gama de animales. A diferencia de otras bacterias patógenas en donde la virulencia está determinada principalmente por toxinas, invasinas y citolisinas, las bacterias patógenas de *Mycoplasma* parecen no tener tales factores de virulencia primarios 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 causen daño a las células hospedadoras, inflamación y enfermedad.

El micoplasma patógeno causa principalmente neumonía atípica, infecciones urogenitales y artritis en humanos y en animales (Blanchard, A. y G. F. Browning (eds.). 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 síntomas se repite y transfiere gradualmente a una enfermedad crónica, y por lo tanto, junto con el diagnóstico temprano y el tratamiento temprano, la prevención o el tratamiento de la exacerbación o reactivación son importantes. *M. hyopneumoniae* es el agente etiológico de la neumonía enzoótica. En los cerdos es una de las enfermedades más comunes y económicamente importantes debido al aumento de peso reducido y la mala eficiencia de alimentación. La enfermedad causa lesiones en los pulmones, una tos crónica, pelaje sin brillo, retraso en el crecimiento y aspecto no saludable que perdura durante varias semanas. Las lesiones pulmonares, particularmente en los lóbulos ventrales apicales y cardíacos, 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 causar poliserositis y artritis en lechones. *M. hyosynoviae* generalmente se encuentra en las amígdalas y puede causar enfermedad artrítica, conduciendo a pérdidas económicas. *M. hyosynoviae* se aísla de las articulaciones y muestras faríngeas/amigdalares y puede inducir anticuerpos en la sangre y el líquido sinovial. *M. bovis* se considera una de las especies más patógenas de *Mycoplasma* y causa pérdidas económicas significativas en todo el mundo. Los micoplasmas causan signos clínicos graves en bovinos de todas las edades. *M. bovis* es el patógeno de *Mycoplasma* más frecuente que causa neumonía, mastitis y artritis en el ganado y su papel etiológico también se ha asociado con otitis, queratoconjuntivitis, sinovitis y trastornos reproductivos en vacas y toros.

Debido a que el micoplasma carece de una pared celular, no se ven afectados por muchos antibióticos comunes como la penicilina u otros antibióticos betalactámicos que se dirigen a la síntesis de la pared celular. Los agentes terapéuticos para la infección por micoplasma que están en uso práctico son algunos antibióticos, como los antibióticos a base de macrólidos, a base de nequinolonas o a base de tetraciclina, pero tales antibióticos tienen grandes efectos adversos, tales como la aparición de cepas resistentes a los medicamentos, lo que lleva a que la infección por micoplasma se vuelva grave, mientras que no se esperan suficientes efectos de tratamiento, y se convierte en una causa de transferencia a una enfermedad crónica.

Sobko et al 1989 (Arch Exp Vet. med.; 43 (5): 645-55) describe diferentes cepas vivas atenuadas de *Mycoplasma*. Además, el documento US 2005/0037027 desvela una vacuna combinada que comprende una vacuna bacteriana de *M. hyopneumoniae* y *M. hyorhinis*.

Además, la vacunación es un método eficaz para controlar la infección por micoplasma. Las vacunas eficaces contra varias bacterias de micoplasma se han descrito en la técnica anterior. El documento WO2009058833 (A2) describe una cepa bacteriana atenuada, avirulenta de *Mycoplasma bovis* para la vacunación. Además, el documento WO2009126356 (A2) describe una composición inmunogénica contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Sin embargo, lo que se necesita son vacunas combinadas eficaces que brinden protección contra múltiples patógenos. Dichas vacunas combinadas son muy deseables para minimizar el número de inmunizaciones requeridas para conferir protección contra múltiples patógenos, para reducir los costes de administración y aumentar las tasas de aceptación y cobertura. Sin embargo, el problema de la interferencia antigénica complica el desarrollo de vacunas multicomponentes. Específicamente, la interferencia antigénica se refiere a la observación de que la administración de múltiples antígenos a menudo da como resultado una respuesta disminuida a ciertos antígenos en relación con la respuesta inmune observada cuando tales antígenos se administran individualmente.

Por lo tanto, existe la necesidad de vacunas combinadas eficaces que brinden protección contra múltiples patógenos.

Descripción de la invención

Antes de describir los aspectos de la presente invención, cabe destacar que, tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una pluralidad de antígenos, la referencia a la "célula" es una referencia a una o más células y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente. A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que el experto en la materia a la que pertenece la presente invención entiende comúnmente. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen a continuación.

Generalmente, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: a) una vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyorhinis* y una vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyosynoviae* y una vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyopneumoniae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención proporciona dicha composición inmunogénica para su uso en un método para inmunizar a un sujeto.

Además, la presente divulgación resuelve los problemas inherentes a la técnica anterior y proporciona un avance distinto en el estado de la técnica. Generalmente, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende: a) uno o más antígenos de *M. hyosynoviae* y uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en *M. hyopneumoniae* y *M. hyorhinis* y combinaciones de los mismos; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende: a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis* y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ventajosamente, los datos experimentales proporcionados desvelan la eficacia de la composición inmunogénica descrita en el presente documento y la falta de interferencia antigénica. Específicamente, después de la administración de una composición inmunogénica que comprende antígenos de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, se ha demostrado una falta de interferencia con respecto a la eficacia de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; b) uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*; y c) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

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

Se demostrará una "respuesta inmunológica protectora" mediante una reducción o falta de signos clínicos que normalmente presenta un hospedador infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o una menor duración de la infectividad o un menor título de patógeno en los tejidos o fluidos corporales o excreciones del hospedador infectado.

En caso de que el huésped muestre una respuesta inmunológica protectora de tal manera que se mejore la resistencia a la nueva infección y / o se reduzca la gravedad clínica de la enfermedad, La composición inmunogénica se describe como una "vacuna".

El término "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*.

Se demostrará una "respuesta terapéutica" mediante una reducción y/o curación de los signos clínicos que normalmente presenta un hospedador cuando dicho hospedador ya está infectado con un patógeno (por ejemplo, micoplasma) que normalmente causa dicho signo o signos clínicos.

El término "micoplasma" es conocido por el experto en la materia. "Micoplasma" se refiere a un género de bacterias, por ejemplo, tal como se describe en Blanchard, A. y G. F. Browning (eds.). 2005. Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control. Horizon Bioscience, Wyomondham, Reino Unido; Kobisch M. y Friis N.F. 1996,

Swine mycoplasmoses, Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1569-1605. Las bacterias se pueden clasificar en función de sus propiedades bioquímicas y microbiológicas, así como de su morfología. Estos criterios de clasificación son bien conocidos en la técnica. En general, la infección por micoplasma se asocia con los signos clínicos descritos en otra parte de la presente descripción.

El término "micoplasma" tal 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*. La secuencia completa del genoma de *M. hyorhinis* es proporcionada de manera ejemplar, por ejemplo, por Liu, W. et al., J. Bacteriol. 2010, vol. 192 (21), 5844-45 doi: 10.1128/JB.00946-10. Epub de 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 de manera ejemplar en la American Tissue Culture Collection con los números de referencia de ATCC 25591 o ATCC 27095. Los aislamientos de *Mycoplasma hyopneumoniae* se depositan de manera ejemplar en la American Tissue Culture Collection con los números de referencia de ATCC 25095, ATCC 25617 y ATCC 25934. El ADN genómico de la cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae* está depositado en la American Tissue Culture Collection con los números de referencia de ATCC 25934D.

Un "antígeno" tal como se usa en el presente documento se refiere a, pero sin limitación, componentes que provocan una respuesta inmunológica en un hospedador a una composición inmunogénica o vacuna de interés que comprende dicho antígeno o un componente inmunológicamente activo del mismo. El antígeno o componente inmunológicamente 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 inmunológica 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, por sus siglas en inglés). El antígeno puede comprender además elementos apropiados de dichos organismos (vacunas de subunidades) mediante los cuales estos elementos se generan destruyendo todo el organismo o los cultivos de crecimiento de dichos organismos y las posteriores etapas de purificación que producen la estructura o estructuras deseadas, o mediante procesos sintéticos inducidos mediante una manipulación adecuada de un sistema adecuado como, pero no restringido a bacterias, insectos, mamíferos u otras especies, y opcionalmente mediante procedimientos de aislamiento y purificación posteriores, o por inducción de dichos procesos sintéticos en el animal que necesita una vacuna mediante la incorporación directa de material genético utilizando composiciones farmacéuticas adecuadas (vacunación con polinucleótidos). El antígeno puede comprender organismos completos inactivados por métodos apropiados en una llamada vacuna muerta (KV, por sus siglas en inglés). Si el organismo es una bacteria, la vacuna muerta se llama vacuna bacteriana.

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 de retardo de adsorción, adyuvantes, estimulantes inmunes y combinaciones de los mismos.

En un aspecto de la presente descripción, uno o más de los antígenos son vacunas bacterianas inactivadas completas. Los uno o más antígenos inactivados completos pueden ser vacunas bacterianas inactivadas completas seleccionadas del grupo que consiste en: *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; *M. hyopneumoniae*; *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*; y *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde los antígenos de *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; o *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* son vacunas bacterianas inactivadas completas.

Según otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; uno o más antígenos de *M. hyosynoviae* y uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae* b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde los antígenos de *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; y/o *M. hyopneumoniae* son vacunas bacterianas inactivadas completas. Este aspecto de la presente divulgación abarca que o bien el antígeno de *M. hyorhinis* una vacuna bacteriana inactivada completa o el antígeno de *M. hyopneumoniae* es una vacuna bacteriana inactivada completa o el antígeno de *M. hyosynoviae* es una vacuna bacteriana inactivada completa. Sin embargo, este aspecto de la presente divulgación también abarca que todos los antígenos en la composición inmunogénica de acuerdo con la presente divulgación son vacunas bacterianas inactivadas completas, es decir los antígenos de *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* o los antígenos de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae* son vacunas bacterianas inactivadas completas.

Para los fines de la presente divulgación se puede usar cualquier método de inactivación convencional. Por lo tanto, la inactivación se puede realizar mediante tratamientos químicos y/o físicos que son conocidos por el experto en la materia. Los métodos de inactivación preferidos incluyen la adición de etilenimina binaria ciclada (BEI) que incluye la adición de una solución de bromhidrato de 2-bromoetilenamina (BEA), que se ha ciclado a etilenimina binaria (BEI). Los agentes de inactivación química adicionales preferidos comprenden, pero no se limitan a Triton X-100, desoxicolato de sodio, bromuro de cetiltrimetilamonio, β -propiolactona, timerosal, fenol y formaldehído (formalina). Sin embargo, la inactivación también puede comprender una etapa de neutralización. Los agentes de neutralización

preferidos incluyen, pero no se limitan a tiosulfato de sodio, bisulfito de sodio y similares.

Las condiciones preferidas de inactivación de formalina incluyen la concentración de formalina entre 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 lo más preferentemente, aproximadamente el 0,2 % (v/v) - 0,4 % (v/v). El tiempo de incubación depende de la resistencia de las especies de micoplasmas. En general, el proceso de inactivación se realiza hasta que no se pueda detectar el crecimiento de micoplasmas en un sistema de cultivo adecuado.

En un aspecto de la presente divulgación, todas las vacunas bacterianas inactivadas son vacunas bacterianas inactivadas con formalina, preferentemente usando las concentraciones como se describió anteriormente en el presente documento. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde uno o más antígenos son vacunas bacterianas inactivadas completas y en donde una o más de las vacunas bacterianas inactivadas completas son vacunas bacterianas inactivadas con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, dicha composición inmunogénica comprende además uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*. Este aspecto de la presente divulgación abarca que o bien el antígeno de *M. hyorhinis* una vacuna bacteriana inactivada con formalina o el antígeno de *M. hyopneumoniae* es una vacuna bacteriana inactivada con formalina o el antígeno de *M. hyosynoviae* es una vacuna bacteriana inactivada con formalina. Sin embargo, este aspecto de la presente divulgación también abarca que todos los antígenos de micoplasma en la composición inmunogénica de acuerdo con la presente divulgación son vacunas bacterianas inactivadas con formalina, es decir los antígenos de *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* o los antígenos de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae* son vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

El componente de vacuna bacteriana inactivado de la divulgación se puede incorporar en liposomas usando tecnología conocida como la descrita en Nature, 1974, 252, 252-254 o Journal of Immunology, 1978, 120, 1109-13. En otra realización de la divulgación, el componente de vacuna bacteriana inactivada de la divulgación se puede conjugar con compuestos biológicos adecuados tales como polisacáridos, péptidos, proteínas o similares, o una combinación de los mismos.

En un aspecto adicional, la composición inmunogénica tal como se desvela en este documento es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyorhinis* en un sujeto que lo necesite. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición inmunogénica es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyorhinis* en un sujeto que lo necesite. De acuerdo con un aspecto adicional, dicha composición inmunogénica comprende además uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*. De acuerdo con un aspecto adicional, el uno o más antígenos de micoplasma es/son vacunas bacterianas inactivadas completas de las especies de micoplasma tal como se describió anteriormente en el presente documento.

En un aspecto adicional, la composición inmunogénica tal como se desvela en el presente documento y que también comprende uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae* es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyopneumoniae* en un sujeto que lo necesite. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; b) uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*; y c) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición inmunogénica es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyorhinis* en un sujeto que lo necesite. De acuerdo con un aspecto adicional, dicha composición inmunogénica es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyorhinis* en un sujeto que lo necesite. De acuerdo con un aspecto adicional, el uno o más antígenos de micoplasma es/son vacunas bacterianas inactivadas completas de las especies de micoplasma tal como se describió anteriormente en el presente documento.

El término "tratamiento y/o profilaxis" se refiere a la disminución de la incidencia de la infección por micoplasma particular en un rebaño o la reducción en la severidad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por micoplasma particular. Por lo tanto, el término "tratamiento y/o profilaxis" también se refiere a la reducción del número de animales en un rebaño que se infectan con la bacteria de micoplasma particular (= disminución de la incidencia de la infección de micoplasma particular) o la reducción de la gravedad de signos clínicos normalmente asociados o causados por una infección por micoplasma en un grupo de animales cuyos animales han recibido una cantidad eficaz de la composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento en comparación con un grupo de animales cuyos animales no han recibido dicha composición inmunogénica.

El "tratamiento y/o la profilaxis" generalmente implica la administración de una cantidad eficaz de la composición inmunogénica de la presente divulgación a un sujeto o rebaño 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 del rebaño ya está/están infectados con dicho micoplasma y en el que dichos animales ya muestran algunos signos clínicos causados o asociados con tal

infección por micoplasma. El término "profilaxis" se refiere a la administración de 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 causado o asociado con la infección por tal micoplasma.

5 El término "cantidad eficaz" tal como se usa en el presente documento se refiere, pero no se limita a una cantidad de antígeno, que provoca o es capaz de provocar una respuesta inmunológica en un sujeto. Tal cantidad eficaz puede disminuir la incidencia de la infección por micoplasma particular en un rebaño o reducir la gravedad de los signos clínicos de la infección por micoplasma particular.

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

La expresión "signos clínicos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a signos de infección de un sujeto por bacterias de micoplasma. Los signos clínicos de infección dependen del patógeno seleccionado. Los ejemplos de tales signos clínicos incluyen, entre otros, dificultad respiratoria, poliserositis (como peritonitis, pleuritis, pericarditis), artritis (cojera y articulaciones inflamadas), otitis, pelo áspero, fiebre leve, depresión, apetito reducido y bacteriemia. Sin embargo, los signos clínicos también incluyen, pero no se limitan a, signos clínicos que son directamente observables desde un animal vivo. Los ejemplos de signos clínicos que se pueden observar directamente de un animal vivo incluyen secreción nasal y ocular, letargia, tos, respiración sibilante, pulsación acelerada, fiebre elevada, aumento o pérdida de peso, deshidratación, diarrea, inflamación de articulaciones, cojera, caquexia, palidez de la piel, aspecto no saludable, diarrea y similares.

La reducción de la incidencia o la reducción de la gravedad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por micoplasma particular en un sujeto se puede alcanzar mediante la administración de una o más dosis de la composición inmunogénica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. Tal como lo demuestran los Ejemplos 2 y 3, se ha demostrado que la composición inmunogénica tal como se desvela en el presente documento es eficaz después de la administración de una dosis única a un sujeto que lo necesite. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición inmunogénica es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyorhinis* en un sujeto que lo necesite tras la administración de una única dosis. Dicha dosis única solo se administra una vez. De acuerdo con un aspecto adicional, dicha composición inmunogénica comprende además uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*. De acuerdo con un aspecto adicional, los uno o más antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas de las especies de micoplasma tal como se describió anteriormente en el presente documento.

Además, se ha demostrado que una dosis de la composición inmunogénica que comprende *M. hyopneumoniae* también es eficaz después de la administración de dicha dosis única de dicha composición inmunogénica. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; b) uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*; y c) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición inmunogénica es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyopneumoniae* en un sujeto que lo necesite tras la administración de una única dosis. Dicha dosis única solo se administra una vez. De acuerdo con un aspecto adicional, dicha composición inmunogénica es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyorhinis* en un sujeto que lo necesite. De acuerdo con un aspecto adicional, el uno o más antígenos de micoplasma es/son vacunas bacterianas inactivadas completas de las especies de micoplasma tal como se describió anteriormente en el presente documento.

En un aspecto de la presente descripción, la composición inmunogénica se prepara para la administración de una dosis única de dicha composición inmunogénica. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición inmunogénica se prepara para la administración como una dosis única de dicha composición inmunogénica. Dicha composición inmunogénica también puede comprender uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*, en donde dicha composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis* y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; b) uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*; y c) un vehículo farmacéuticamente aceptable, se preparan o se proporcionan para una administración de dosis única. De acuerdo con un aspecto adicional, uno o más de los antígenos de micoplasma pueden ser vacunas bacterianas inactivadas completas de tales especies de micoplasma tal como se describe en el presente documento. Adicionalmente, dicha composición inmunogénica es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de signos clínicos causados por *M. hyorhinis* o *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* en un sujeto que lo necesite después de la administración de una dosis única de tales antígenos de micoplasma, dependiendo cada uno de si la composición

comprende uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae* o no. Ventajosamente, los datos experimentales proporcionados por la presente divulgación desvelan que una administración de dosis única de la composición inmunogénica de la presente divulgación estimuló de manera fiable y eficaz una respuesta inmune protectora. Específicamente, se ha demostrado una respuesta de anticuerpos medible para *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*.

5 Como se ha mencionado anteriormente, el término sujeto u hospedador tal como se usa en el presente documento se refiere a animales, preferentemente a mamíferos tales como ratones, ratas, cobayas, conejos, hámsteres, cerdos, ovejas, perros, gatos, caballos, monos o vacas y, también preferentemente, a seres humanos.

10 Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición inmunogénica es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyorhinis* en cerdos. De acuerdo con un aspecto adicional, dicha composición inmunogénica es eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyorhinis* en cerdos. Cuando dicha
15 composición inmunogénica comprende además uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*, es, de acuerdo con otro aspecto eficaz en el tratamiento y/o la profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyopneumoniae* en cerdos. De acuerdo con un aspecto adicional, tal composición inmunogénica, que comprende uno o más antígenos de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* Es eficaz en el tratamiento y/o profilaxis de los signos clínicos causados por *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* en cerdos. De nuevo, los uno o más de los antígenos de micoplasma pueden ser vacunas bacterianas inactivadas completas de tales especies de micoplasma tal como se describe anteriormente en el presente documento.

20 En otro aspecto de la presente divulgación, la composición inmunogénica es una vacuna. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición inmunogénica es una vacuna. Dicha vacuna también puede comprender uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*. La vacuna según la divulgación, cuando se administra a un sujeto que lo necesite, tiene las mismas propiedades beneficiosas que las descritas para las composiciones inmunogénicas.

25 En un aspecto de la presente divulgación, el vehículo farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes de retardo de adsorción, adyuvantes, estimulantes inmunes y combinaciones de los mismos. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable se
30 selecciona del grupo que consiste en disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes de retardo de adsorción, adyuvantes, estimulantes inmunes y combinaciones de los mismos. Como se ha mencionado anteriormente, dicha vacuna también puede comprender uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*. Adicionalmente, los uno o más antígenos de micoplasma de tales especies de micoplasma se pueden proporcionar como vacuna bacteriana inactivada completa tal como se describe anteriormente en el presente documento.

35 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 escualano o escualeno; 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 particularmente 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 sorbitán, de manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de oleico, isosteárico, ricinoleico y ácido hidroxisteárico, 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 y Sons, NY, pág. 51-94 (1995) y Todd *et al.*, Vaccine 15:564-570 (1997). Por ejemplo, es posible usar la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editado por M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de este mismo libro. Otros adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, 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 alqueno, 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, preferiblemente a pH fisiológico, con el fin de dar la solución adyuvante en la que se incorporará la propia composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna.

65 En un aspecto de la presente divulgación, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un adyuvante seleccionado del

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 alqueniolo, el sistema adyuvante RIBI, bloque de copolímero, SAF-M, monofosforil lípido A, avridina lípido-amina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o no), toxina colérica, IMS 1314, dipéptido de muramilo, y combinaciones de los mismos. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es un adyuvante seleccionado del 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 alqueniolo, el sistema adyuvante RIBI, bloque de copolímero, SAF-M, monofosforil lípido A, avridina lípido-amina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o no), toxina colérica, IMS 1314, dipéptido de muramilo, y combinaciones de los mismos. Dicha vacuna también puede comprender uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*. Adicionalmente, uno o más de los antígenos de micoplasma de tales especies de micoplasma se pueden proporcionar como vacuna bacteriana inactivada completa tal como se describe anteriormente en el presente documento.

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 alqueniolo. Compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con polialqueniéteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbomer (Phameuropa Vol. 8, N.º 2, junio de 1996). Los expertos en la materia también pueden referirse a la Patente de Estados Unidos N.º 2.909.462, que describe tales polímeros de acrílico 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 pueden ellos mismos contener otros sustituyentes, tal como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre CARBOPOL®; (BF Goodrich, Ohio, EE. UU.) son particularmente apropiados. Son polímeros de ácido acrílico reticulados con polialqueniéteres o divinilglicol o reticulados con una alilsacarosa o con alilpentaeritritol. Entre ellos, se pueden mencionar CARBOPOL® 974P, 934P y 971P. Es muy preferente 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. Lo más preferentemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

En un aspecto de la presente divulgación, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una emulsión de agua en aceite en agua o un carbómero. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es una emulsión de agua en aceite en agua o un carbómero. Dicha vacuna también puede comprender uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*. Adicionalmente, los antígenos de tales especies de micoplasma se pueden proporcionar como vacuna bacteriana inactivada completa tal como se describe anteriormente en el presente documento.

En un aspecto de la presente divulgación, la emulsión de agua en aceite en agua es Montanide ISA207 VG o CARBOPOL®. Montanide ISA207 VG es un adyuvante compuesto de ésteres oleicos de manitol anhidro en solución en un aceite no mineral y está diseñado para lograr emulsiones de vacunas de agua en aceite en agua. Montanide ISA207 VG es bien conocido por el experto en la materia. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis*; y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es Montanide ISA207 VG o CARBOPOL®. Como se ha mencionado anteriormente, dicha vacuna también puede comprender uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*. Adicionalmente, los antígenos de tales especies de micoplasma se pueden proporcionar como vacuna bacteriana inactivada completa tal como se describe anteriormente en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona una composición inmunogénica obtenida por un método que comprende a) cultivo de bacterias de micoplasma seleccionadas del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae* en un sistema de células eucariotas con suero reducido; b) obtener uno o más antígenos de tales bacterias de micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "cultivo" es conocido por el experto 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.

La expresión "sistema celular" es conocida por el experto en la materia. En particular, la expresión "sistema celular"

es un sistema de cultivo celular *in vitro* para el cultivo de microorganismos, tal como, por ejemplo, bacterias de micoplasma. Dicho sistema celular comprende células hospedadoras y medio de cultivo celular adecuado para la propagación de tales células fuera del organismo. En particular, las células hospedadoras, pueden o no ser susceptibles a una infección con las bacterias de micoplasma. Dichas células hospedadoras pueden estar presentes como células vivas, en forma inactiva o como fragmentos de células. Preferentemente, tales células hospedadoras son susceptibles a una infección con las bacterias de micoplasma. Las células hospedadoras que se pueden usar para poner en práctica el método tal como se describe en el presente documento incluyen, pero no se limitan a células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) (por ejemplo, células epiteliales de riñón canino Madin-Darby caninas depositadas en la American Tissue Culture Collection con el número de referencia ATCC CCL-34 o ATCC CRL-2285) o células McCoy (por ejemplo, depositadas en la American Tissue Culture Collection con el número de referencia ATCC CRL-1696). Los medios de cultivo celular adecuados son conocidos por los expertos en la materia y están disponibles comercialmente. Pueden comprender nutrientes, sales, factores de crecimiento, antibióticos, suero (por ejemplo, suero de ternera fetal) e indicadores de pH (por ejemplo, rojo fenol).

La expresión "sistema de células eucariotas" comprende células eucariotas primarias y células eucariotas que provienen de organismos multicelulares tales como plantas o animales. Adicionalmente, el sistema de células eucariotas abarca organismos de células individuales eucariotas (también conocidos como microorganismos), por ejemplo, bacterias u hongos, incluidas la levadura. Sin embargo, se entiende que las células eucariotas son diferentes de las bacterias de micoplasma.

El término "suero reducido" se refiere a una cantidad reducida de suero que se añade para el cultivo de bacterias de micoplasma en el sistema de células eucariotas en comparación con la cantidad de suero que se usa para el cultivo de bacterias de micoplasma de la misma especie en un sistema de cultivo libre de células. La cantidad de suero para el cultivo de bacterias micoplasma en el sistema celular eucariota en comparación con la cantidad de suero para el cultivo de bacterias de micoplasma en un sistema de cultivo libre de células se reduce en al menos un 10 %, preferentemente en al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 30 %, incluso más preferentemente al menos el 40 %, incluso más preferentemente al menos el 50 %, incluso más preferentemente al menos el 60 %, incluso más preferentemente al menos el 70 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, incluso más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 96 %, incluso más preferentemente al menos el 97 %, incluso más preferentemente al menos el 98 %, incluso más preferentemente al menos el 99 %, más preferentemente en un 100 %. Por lo tanto, debe entenderse que, según la presente divulgación, las bacterias de micoplasma se cultivan más preferentemente en un sistema de células eucariotas que carece de suero.

El término "sistema de cultivo sin células", tal como se usa en el presente documento, se refiere al sistema de cultivo que no incluye ninguna célula excepto la bacteria de micoplasma.

Las cantidades preferidas de suero para el cultivo de bacterias de micoplasma en el sistema de células eucariotas incluyen concentraciones séricas entre 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 lo más preferentemente de aproximadamente el 2-5 % (v/v).

Las cantidades preferidas de suero para el cultivo de bacterias de micoplasma en el sistema celular eucariota que comprende células MDCK incluyen una concentración sérica entre 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 lo más preferentemente de aproximadamente el 2 % (v/v).

Las cantidades preferidas de suero para el cultivo de bacterias de micoplasma en el sistema celular eucariota que comprende células McCoy incluyen una concentración sérica entre 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 lo más preferentemente de aproximadamente el 5 % (v/v).

De acuerdo con la presente divulgación, debe entenderse que las células eucariotas del sistema celular eucariota pueden infectarse con las bacterias de micoplasma. Dicha infección da como resultado una propagación de las bacterias de micoplasma dentro del sistema celular eucariota. El experto en la materia conoce bien la infección de las células eucariotas por la bacteria micoplasma y las condiciones del período posterior a la incubación para permitir la propagación de las bacterias de micoplasma. Sin embargo, preferentemente, después de la transfección, las células se incuban durante un período de hasta 21 días, más preferentemente de aproximadamente dos días hasta aproximadamente catorce días, más preferentemente de aproximadamente dos días hasta aproximadamente ocho días, aún más preferentemente de aproximadamente tres a cinco días. Las condiciones de incubación preferentes incluyen una temperatura de entre 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 lo más preferentemente de aproximadamente 37 °C. Las condiciones de incubación preferidas también incluyen

- una concentración de CO₂ entre aproximadamente el 2 % al 8 %, más preferentemente, de aproximadamente el 3 % al 7 %, incluso más preferentemente de aproximadamente el 4 % al 6 %, y lo más preferentemente aproximadamente el 5 %. Preferentemente, las células eucariotas se observan después de la transfección para cambios característicos, tales como las tendencias de densidad celular, la disminución de la viabilidad, incluidos los efectos citotáticos durante el período posterior a la infección y el cambio de color del medio debido a los cambios de pH.
- El término "obtención" comprende la recolección, el aislamiento, la purificación y/o la formulación (por ejemplo, inactivación y/o mezcla) del antígeno.
- El término "recolección" se refiere a la colecta o recuperación del antígeno de la bacteria de micoplasma del sistema celular eucariota transfectado. Cualquier método convencional conocido en la técnica se puede usar para recuperar dicho antígeno de micoplasma, por ejemplo, cualquier método de separación. Los métodos bien conocidos en la técnica comprenden centrifugación o filtración, tal como el uso de una membrana semipermeable que tiene un cierto tamaño de poro.
- El término "aislamiento" comprende una etapa de aislamiento del antígeno de micoplasma. Los expertos en la técnica conocen los métodos para el aislamiento de antígenos de la bacteria de micoplasma del sistema de células eucariotas infectadas. Esos métodos comprenden métodos físicos y/o químicos, incluidos, entre otros, los ciclos de congelación y descongelación, tratamiento con ultrasonidos y similares.
- Los métodos para la "purificación" de antígenos del aislado son conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, mediante los métodos descritos en *Protein purification methods-a practical approach* (E.L. V. Harris y S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press). Esos métodos incluyen, pero no se limitan a, la 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 se puede obtener en una forma pura purificada, o libre o sustancialmente libre de otros materiales celulares o medio de cultivo, etc. Después de dicho aislamiento y/o purificación, el antígeno presenta una pureza de al menos el 80 %, preferentemente el 80 % - 90 %, más preferentemente el 90 % - 97 %, más preferentemente más del 97 % hasta una forma pura absoluta sin ninguna contaminación.
- De acuerdo con un aspecto adicional, "obtener" tal como se usa en el presente documento también puede incluir etapas de acabado adicionales como las etapas de adición de tampón, inactivación, neutralización y similares.
- Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica, que comprende uno o más antígenos de micoplasma seleccionados del grupo de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido.
- Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido.
- Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido.
- Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido.
- Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido.
- Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido.
- Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos

de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido.

5 Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido.

10 El uno o más antígenos de micoplasma está/están inactivados, preferentemente por cualquiera de los métodos descritos anteriormente en el presente documento. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma están inactivados, preferentemente, por cualquiera de los métodos descritos anteriormente en el presente documento. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica preparada por un método que comprende a) cultivo de bacterias de micoplasma seleccionadas del grupo que consiste en *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos en un sistema de células eucariotas con suero reducido; b) obtener uno o más antígenos de tales bacterias de micoplasma en donde la etapa de obtención incluye la inactivación de uno o más de los antígenos de micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. La etapa de inactivación se puede realizar mediante cualquiera de los métodos tal como se describen anteriormente en el presente documento. Según un aspecto, dicha inactivación da como resultado vacunas bacterianas inactivadas completas de la bacteria de micoplasma. Preferentemente, dicha inactivación de la bacteria de micoplasma se realiza mediante formalina de tal manera que el antígeno de micoplasma es una vacuna bacteriana completa inactivada con formalina. En un aspecto, los antígenos de micoplasma inactivados son vacunas bacterianas inactivadas completas de *M. hyorhinitis*, vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyopneumoniae*, vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyosynoviae*, vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyorhinitis* y *M. hyosynoviae* o vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, o vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyorhinitis* y *M. hyopneumoniae* o vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma dentro de la composición inmunogénica son vacunas bacterianas inactivadas completas, preferentemente vacunas bacterianas completas inactivadas con formalina.

30 En un aspecto, el antígeno de micoplasma se produce en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde el suero es suero porcino libre. Como las bacterias de micoplasma *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae* son patógenos porcinos, el suero de cerdo puede comprender componentes que pueden interferir con los antígenos de micoplasma de la composición de la presente divulgación, de tal manera que el uso de suero no porcino o sin suero es un aspecto preferido de la divulgación. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación también proporciona una composición inmunogénica obtenida por un método que comprende a) cultivo de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos en un sistema de células eucariotas con suero reducido; b) obtener un antígeno de dicha bacteria de micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el sistema de células eucariotas está libre de suero porcino.

45 Como se mencionó anteriormente en el presente documento, el sistema celular eucariota puede comprender células de la línea celular MDCK o una línea celular McCoy. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para la preparación de una composición inmunogénica, en donde el método comprende a) el cultivo de una bacteria micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos en un sistema de células eucariotas con suero reducido; b) obtener un antígeno de dicha bacteria de micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el sistema de células eucariotas comprende una línea celular MDCK o una línea celular McCoy.

50 En un aspecto adicional, el antígeno de micoplasma de la composición inmunogénica se produce en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dicho antígeno de micoplasma tiene una inmunogenicidad incrementada en comparación con el mismo antígeno obtenido de micoplasma cultivado en un sistema de cultivo libre de células.

55 La expresión "inmunogenicidad aumentada" tal como se usa en el presente documento, significa que la respuesta inmunológica causada 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 donde el antígeno de la composición inmunogénica de referencia se prepara de bacterias de micoplasma cultivadas en un sistema de cultivo libre de células.

60 El término "aumentado" significa, que la respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos aumenta en al menos un 10 %, preferentemente en al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 30 %, incluso más preferentemente al menos el 40 %, incluso más preferentemente al menos el 50 %, incluso más preferentemente al menos el 75 %, lo más preferente al menos en un 100 % en comparación con la respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos provocada por una composición inmunogénica de referencia que comprende el mismo antígeno, en donde el antígeno de la composición inmunogénica de referencia se prepara de bacterias de micoplasma cultivadas en un sistema de

cultivo libre de células. Está en el conocimiento general de una persona experta en la técnica cómo medir la respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos. En particular, para el experto en la materia está claro si comparar la respuesta inmune mediada por células de la composición inmunogénica de interés con la respuesta inmune mediada por células de la referencia, o la respuesta inmune mediada por anticuerpos de la composición inmunogénica de interés con la de la referencia composición, pero no la respuesta inmune mediada por células de una composición inmunogénica de interés con la respuesta inmune mediada por anticuerpos de la referencia o *viceversa*. Además, se puede medir la respuesta inmune mediada por células, por ejemplo, midiendo la activación de los linfocitos T citotóxicos por una composición inmunogénica/antígeno de interés. La respuesta inmune mediada por anticuerpos se puede medir, por ejemplo, midiendo la cantidad de anticuerpos específicos de antígeno, generados a causa de la administración de la composición inmunogénica que comprende dicho antígeno a un animal. Se puede medir la respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos, por ejemplo, mediante el uso de un modelo de ratón, un modelo de gato, un modelo de ganado vacuno o un modelo porcino. Sin embargo, los ensayos descritos en los Ejemplos 4 y 5 se utilizarán como ensayo de referencia para detectar la respuesta inmunológica contra *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*.

La expresión "mismo antígeno" significa, que esa naturaleza de los antígenos es idéntica. Por lo tanto, si el antígeno de micoplasma de la composición inmunogénica producida en un sistema de células eucariotas con medio reducido es vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyorhinis*, que tiene el "mismo antígeno" significa que el antígeno de micoplasma del sistema libre de células también es vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyorhinis*. Adicionalmente, si el antígeno de micoplasma de la composición inmunogénica producida en un sistema de células eucariotas con suero reducido preparado o purificado de acuerdo con un método específico, que tiene el mismo antígeno significa que el antígeno de micoplasma del sistema libre de células se prepara o purifica de acuerdo con el mismo método.

Ventajosamente, los datos experimentales proporcionados por la presente divulgación desvelan que los antígenos de micoplasma proporcionados por el método descrito anteriormente tienen una inmunogenicidad aumentada en comparación con los antígenos obtenidos de bacterias de micoplasma cultivadas en un sistema de cultivo libre de células. Específicamente, las vacunas de *M. hyorhinis* a base de MDCK mostraron un inicio temprano de seroconversión, un mayor número de cerdos seropositivos y títulos serológicos más altos.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación también proporciona una composición inmunogénica obtenida por un método que comprende a) cultivo de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos en un sistema de células eucariotas con suero reducido; b) obtener un antígeno de dicha bacteria de micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición inmunogénica tiene una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que comprende el mismo antígeno obtenido de micoplasma cultivado en un sistema de cultivo libre de células. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dicha composición inmunogénica tiene una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que comprende el mismo antígeno obtenido de micoplasma cultivado en un sistema de cultivo libre de células. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dicha composición inmunogénica tiene una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que comprende el mismo antígeno obtenido de micoplasma cultivado en un sistema de cultivo libre de células. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido en el que dicha composición inmunogénica tiene

una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que comprende el mismo antígeno obtenido de micoplasma cultivado en un sistema de cultivo libre de células. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dicha composición inmunogénica tiene una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que comprende el mismo antígeno obtenido de micoplasma cultivado en un sistema de cultivo libre de células. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dicha composición inmunogénica tiene una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que comprende el mismo antígeno obtenido de micoplasma cultivado en un sistema de cultivo libre de células. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dicha composición inmunogénica tiene una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que comprende el mismo antígeno obtenido de micoplasma cultivado en un sistema de cultivo libre de células. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dicha composición inmunogénica tiene una inmunogenicidad aumentada en comparación con una composición inmunogénica que comprende el mismo antígeno obtenido de micoplasma cultivado en un sistema de cultivo libre de células. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

En un aspecto adicional, los antígenos de micoplasma se produce/n en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema celular eucariota.

La expresión "componentes de las células eucariotas" comprende tanto células completas como fragmentos de dichas células eucariotas. El término "fragmento" comprende cualquier parte de la célula eucariota tal como partes de la

membrana celular u orgánulos intracelulares en su conjunto o partes de la misma. Sin embargo, el término fragmento también abarca cualquier parte de dicha célula eucariota que comprende lípidos, proteínas, azúcares, ADN, ARN y similares, así como sus combinaciones. Además, 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 lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación también proporciona una composición inmunogénica obtenida por un método que comprende a) cultivo de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos en un sistema de células eucariotas con suero reducido; b) obtener un antígeno de dicha bacteria de micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema celular eucariota. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema celular eucariota. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema celular eucariota. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido en el que la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema de células eucariotas. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema celular eucariota. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido en el que la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema de células eucariotas. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana

inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

5 Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema celular eucariota. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde la composición inmunogénica comprende componentes de las células eucariotas de dicho sistema celular eucariota. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

En un aspecto adicional, el antígeno de micoplasma se produce/n en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dichos componentes de las células eucariotas están unidos 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 lo tanto, el término "unido" abarca cualquier interacción, incluyendo enlaces indirectos o directos, no reversibles o reversibles, físicos y químicos, electrostáticos y/o covalentes. Por lo tanto, debe entenderse que los componentes de las células eucariotas, por ejemplo, pueden unirse al antígeno de micoplasma. Sin embargo, debe entenderse que los componentes de las células eucariotas también pueden unirse al antígeno de micoplasma. Tal enlace se puede producir mediante varios métodos bien conocidos por la persona experta en la técnica, tales como tratamiento con formaldehído y similares.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación también proporciona una composición inmunogénica obtenida por un método que comprende a) cultivo de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos en un sistema de células eucariotas con suero reducido; b) obtener un antígeno de dicha bacteria de micoplasma; y c) adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dichos componentes de las células eucariotas están unidos al antígeno de micoplasma. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dichos componentes de las células eucariotas están unidos al antígeno de micoplasma. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dichos componentes de las células eucariotas están unidos al antígeno de micoplasma. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente

documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

5 Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido en el que dichos componentes de las células eucariotas están unidos al antígeno de micoplasma. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

15 Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinitis* y *M. hyopneumoniae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dichos componentes de las células eucariotas están unidos al antígeno de micoplasma. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

25 Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinitis* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dichos componentes de las células eucariotas están unidos al antígeno de micoplasma. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

35 Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dichos componentes de las células eucariotas están unidos al antígeno de micoplasma. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

50 Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido, en donde dichos componentes de las células eucariotas están unidos al antígeno de micoplasma. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma se producen en un sistema de células eucariotas con suero reducido. Adicionalmente, según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina. De acuerdo con un aspecto adicional, todos los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas, preferentemente, vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

60 De nuevo, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma seleccionados del grupo que consiste en *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos, en donde uno o más de los antígenos de micoplasma se obtienen de un sistema de células eucariotas con suero reducido. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*; y uno o más componentes de un sistema celular eucariota. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es

vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis*; y uno o más componentes de un sistema celular eucariota. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyosynoviae*; y uno o más componentes de un sistema celular eucariota. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae*; y uno o más componentes de un sistema celular eucariota. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*; y uno o más componentes de un sistema celular eucariota. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*; y uno o más componentes de un sistema celular eucariota. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*; y uno o más componentes de un sistema celular eucariota. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

Por lo tanto, según un aspecto, la presente descripción proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más antígenos de micoplasma de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*; y uno o más componentes de un sistema celular eucariota. Según otro aspecto, uno o más de los antígenos de micoplasma son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dicha vacuna bacteriana inactivada completa se puede obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha vacuna bacteriana inactivada completa es vacuna bacteriana inactivada con formalina.

La presente divulgación también se refiere a un método para inmunizar a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto cualquiera de las composiciones inmunogénicas tal como se describe en el presente documento.

El término "inmunizar" se refiere a una inmunización activa mediante la administración de una composición inmunogénica a un sujeto que se va a inmunizar, causando así una respuesta inmunológica contra el antígeno incluido en dicha composición inmunogénica.

Preferentemente, la inmunización da como resultado una disminución de la incidencia de la infección por micoplasma particular en un rebaño o en la reducción de la gravedad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por micoplasma particular.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para inmunizar a un sujeto con cualquiera de las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento, que comprende administrar a dicho sujeto una composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación.

Dicha composición inmunogénica comprende a) uno o más antígenos de *M. hyosynoviae* y uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en *M. hyopneumoniae* y *M. hyorhinis* y combinaciones de los mismos; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 De acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación comprende: a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis* y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica también comprende uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*.

10 Si la composición inmunogénica se produce en sistema de células eucariotas con suero reducido tal como se describe en el presente documento, entonces la composición inmunogénica puede comprender en general uno o más antígenos de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos tal como se define adicionalmente en el presente documento. De acuerdo con un aspecto adicional definido anteriormente en el presente documento, dicha composición inmunogénica puede comprender uno o más componentes de un sistema celular eucariota además del uno o más antígenos de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos.

20 De acuerdo con otro aspecto, los uno o más de los antígenos de micoplasma usados para inmunizar al sujeto que lo necesite es/son vacunas bacterianas inactivadas completas. Este aspecto de la presente divulgación abarca que cualquiera de los antígenos de micoplasma es una vacuna bacteriana inactivada completa. Sin embargo, este aspecto de la presente divulgación también abarca que todos los antígenos en la composición inmunogénica de acuerdo con la presente divulgación son vacunas bacterianas inactivadas completas, es decir, el antígeno de *M. hyorhinis*, el antígeno de *M. hyosynoviae* y/o los antígenos de *M. hyopneumoniae* es/son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dichas vacunas bacterianas inactivadas completas se pueden obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dichas vacunas bacterianas inactivadas completas es/son vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

30 Preferentemente, dicha administración da como resultado una disminución de la incidencia de la infección por micoplasma particular en un rebaño o en la reducción de la gravedad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por micoplasma particular.

35 De acuerdo con un aspecto adicional, la inmunización de un sujeto que lo necesite con las composiciones inmunogénicas tal como se desvelan a continuación, da como resultado la prevención de la infección de un sujeto por infección por micoplasma. Incluso más preferentemente, la inmunización da como resultado una respuesta inmunológica eficaz y de larga duración contra la infección por micoplasma. Se entenderá que dicho período de tiempo durará más de 2 meses, preferentemente más de 3 meses, más preferentemente, más de 4 meses, más preferentemente, más de 5 meses, más preferentemente, más de 6 meses. Debe entenderse que la inmunización puede no ser eficaz en todos los sujetos inmunizados. Sin embargo, el término requiere que una parte importante de los sujetos de un rebaño estén efectivamente inmunizados.

45 Preferentemente, se prevé una manada de sujetos en este contexto que normalmente, es decir, sin inmunización, desarrollaría signos clínicos normalmente causados o asociados con una infección por micoplasma. El experto en la materia puede determinar si los sujetos de un rebaño están inmunizados de manera eficaz sin una carga excesiva. Preferentemente, la inmunización será eficaz si los signos clínicos son de al menos el 33 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, o al menos el 90 % de los sujetos de un rebaño dado se reducen en incidencia o gravedad en al menos el 10 %, más preferentemente al menos un 20 %, aún más preferentemente al menos el 30 %, incluso más preferentemente al menos el 40 %, aún más preferentemente al menos el 50 %, incluso más preferentemente al menos el 60 %, aún más preferentemente al menos el 70 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, aún más preferentemente, en al menos un 90 %, y lo más preferentemente en al menos un 95 % en comparación con sujetos que no están inmunizados o bien se inmunizan con una composición inmunogénica que estaba disponible antes de la presente divulgación pero que posteriormente se infectan por la bacteria de micoplasma particular.

55 En un aspecto de la presente divulgación, el sujeto se selecciona de una lista que consiste en cerdos, ganado bovino, gato y perro. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, se desvela un método para inmunizar a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación, en donde el sujeto se selecciona de una lista que consiste en cerdos, ganado bovino, gato y perro.

60 En un aspecto de la presente divulgación, la composición inmunogénica se administra una vez. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, se desvela un método para inmunizar a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación, en donde la composición inmunogénica es eficaz para disminuir la incidencia de la infección por micoplasma particular en un rebaño o reducir la gravedad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por micoplasma particular después de la administración de una dosis única de dicha composición inmunogénica a dicho sujeto. Se entiende que tal dosis única se administra solo una vez. Tal como se muestra en los Ejemplos 2 y 3, se ha demostrado que la composición inmunogénica tal como se desvela

en el presente documento es eficaz después de la administración de una dosis única a un sujeto que lo necesite.

Por lo tanto, cuando dicho método comprende la administración de uno o más antígenos de *M. hyorhinis*, dicha composición inmunogénica es eficaz para disminuir la incidencia de la infección de *M. hyorhinis* en un rebaño o en la reducción de la gravedad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por *M. hyorhinis*. Cuando dicho método comprende la administración de uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*, es, de acuerdo con un aspecto adicional, eficaz para disminuir la incidencia de la infección de *M. hyopneumoniae* en un rebaño o en la reducción de la gravedad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por *M. hyopneumoniae*. De nuevo, los uno o más de los antígenos de micoplasma que se van a administrar por el método de la presente divulgación pueden ser vacunas bacterianas inactivadas completas de tales especies de micoplasma tal como se describe anteriormente en el presente documento.

Preferentemente, la dosis única tiene un volumen total entre aproximadamente 0,5 ml y 2,5 ml, más preferentemente entre aproximadamente 0,6 ml y 2,0 ml, incluso más preferentemente entre aproximadamente 0,7 ml y 1,75 ml, aún más preferentemente entre aproximadamente 0,8 ml y 1,5 ml, incluso más preferentemente entre aproximadamente 0,9 ml y 1,25 ml, siendo una dosis única de 1,0 ml la más preferida.

Sin embargo, la composición inmunogénica se puede administrar dos o varias veces, administrándose una primera dosis antes de la administración de una segunda dosis (de refuerzo). Preferentemente, la segunda dosis se administra al menos 15 días después de la primera dosis. Más preferentemente, la segunda dosis se administra entre 15 y 40 días después de la primera dosis. Incluso más preferentemente, la segunda dosis se administra al menos 17 días después de la primera dosis. Aún más preferentemente, la segunda dosis se administra entre 17 y 30 días después de la primera dosis. Incluso más preferentemente, la segunda dosis se administra al menos 19 días después de la primera dosis. Aún más preferentemente, la segunda dosis se administra entre 19 y 25 días después de la primera dosis. Lo más preferiblemente, la segunda dosis se administra al menos 21 días después de la primera dosis. En un aspecto preferido del régimen de administración de dos veces, tanto la primera como la segunda dosis de la composición inmunogénica se administran en la misma cantidad. Preferentemente, cada dosis está en las cantidades preferidas especificadas anteriormente, con una dosis de 1 ml para la primera y segunda dosis siendo la más preferida. Además del primer y segundo régimen de dosis, una realización alternativa comprende otras dosis posteriores. Por ejemplo, se podrían administrar una tercera, cuarta o quinta dosis en estos aspectos. Preferentemente, los regímenes de dosificación posterior tercero, cuarto y quinta se administran en la misma cantidad que la primera dosis, siendo consistente el marco de tiempo entre las dosis con el tiempo entre la primera y la segunda dosis mencionadas anteriormente.

La composición inmunogénica, preferentemente, se administra por vía tópica o sistémica. Las vías de administración adecuadas usadas convencionalmente son la administración oral o parenteral, tal como intranasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, así como la inhalación. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y del modo de acción de un compuesto, la composición inmunogénica se puede administrar también por otras vías.

Normalmente, cuando se usa un antígeno bacteriano tal como la vacuna bacteriana de micoplasma, la composición inmunogénica contiene una cantidad de aproximadamente 10^3 a unos 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) del antígeno bacteriano por dosis, preferentemente, aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^9 UFC del antígeno bacteriano por dosis, más preferentemente aproximadamente de 10^5 a unas 10^6 UFC del antígeno bacteriano por dosis. Si se usa vacuna bacteriana inactivada en la composición inmunogénica, los valores de UFC se refieren a la cantidad de bacterias de 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 unas 10^{10} UFC por dosis, preferentemente alrededor de 10^3 a unas 10^9 UFC por dosis, incluso más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 10^4 a unas 10^8 UFC por dosis, lo más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 10^5 a unas 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 unas 10^{10} UFC por dosis, preferentemente alrededor de 10^3 a unas 10^9 UFC por dosis, incluso más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 10^4 a unas 10^8 UFC por dosis, lo más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 10^5 a unas 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 unas 10^{10} UFC por dosis, preferentemente alrededor de 10^3 a unas 10^9 UFC por dosis, incluso más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 10^4 a unas 10^8 UFC por dosis, lo más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 10^5 a unas 10^7 UFC por dosis.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, se desvela un método para inmunizar a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación, en donde la composición inmunogénica es eficaz para disminuir la incidencia de la infección por micoplasma particular en un rebaño o reducción en la gravedad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por micoplasma particular después de la administración de una dosis única de dicha composición inmunogénica a dicho sujeto, en donde dicha dosis única comprende 10^2 a unas 10^{10} UFC por bacteria de micoplasma por dosis.

En un aspecto de la presente divulgación, el método para inmunizar a un sujeto que lo necesite da como resultado una mejora en un parámetro de eficacia seleccionado del grupo que consiste en una duración más corta de bacteriemia, una carga bacteriana más baja, o combinaciones de las mismas, en comparación con un sujeto de un grupo de control no inmunizado de la misma especie.

5 La expresión "duración más corta de bacteriemia" significa, que la duración de la bacteriemia en un sujeto que se inmuniza con una composición inmunogénica se acorta al menos en un 10 %, más preferentemente al menos un 20 %, aún más preferentemente al menos el 30 %, incluso más preferentemente al menos el 40 %, aún más preferentemente al menos el 50 %, incluso más preferentemente al menos el 60 %, aún más preferentemente al menos el 70 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, aún más preferentemente, en al menos un 90 %, y lo más preferentemente en al menos un 100 % en comparación con sujetos que no están inmunizados o bien se inmunizan con una composición inmunogénica que estaba disponible antes de la presente divulgación pero que posteriormente se infectan por la bacteria de micoplasma particular. Se entiende que la duración de la bacteriemia se determina en un número representativo de sujetos en cada grupo (grupo no inmunizado e inmunizado) antes de su comparación.

15 La expresión "menor carga bacteriana" significa, que la carga bacteriana con bacterias de micoplasma de tipo silvestre en un sujeto infectado con dicha bacteria de micoplasma de tipo silvestre se reduce en los sujetos en al menos un 10 %, más preferentemente al menos un 20 %, aún más preferentemente al menos el 30 %, incluso más preferentemente al menos el 40 %, aún más preferentemente al menos el 50 %, incluso más preferentemente al menos el 60 %, aún más preferentemente al menos el 70 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, aún más preferentemente, en al menos un 90 %, y lo más preferentemente en al menos un 100 % después de la inmunización con una composición inmunogénica de acuerdo con la presente divulgación en comparación con sujetos que no están inmunizados o bien se inmunizan con una composición inmunogénica que estaba disponible antes de la presente divulgación pero que posteriormente se infectan por la bacteria de micoplasma particular. Se entiende que la "carga bacteriana" se determina en un número representativo de sujetos en cada grupo (grupo no inmunizado e inmunizado) antes de su comparación.

20 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, se desvela un método para inmunizar a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación que inmuniza a un sujeto que lo necesita da como resultado una mejora en un parámetro de eficacia seleccionado del grupo que consiste en una duración más corta de bacteriemia, una carga bacteriana más baja, o combinaciones de las mismas, en comparación con un sujeto de un grupo de control no inmunizado de la misma especie.

25 En un aspecto de la presente divulgación, el método es adecuado para un sujeto de aproximadamente tres semanas de edad. Por lo tanto, según un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inmunizar a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación, en donde el método es adecuado para un sujeto de aproximadamente tres semanas de edad.

30 Ventajosamente, los datos experimentales proporcionados por la presente divulgación desvelan la eficacia de la composición inmunogénica en lechones de aproximadamente 3 semanas de edad.

35 Preferentemente, dicho sujeto que se va a inmunizar tiene entre 1 día de edad y 21 días de edad, más preferentemente, dicho sujeto que se va a inmunizar tiene entre 1 día de edad y 10 días de edad, incluso más preferentemente, entre 1 día de edad y 9 días de edad, incluso más preferentemente, entre 1 día y 8 días de edad, incluso más preferentemente, entre 1 día y 7 días de edad, incluso más preferentemente, entre 1 día y 6 días de edad, incluso más preferentemente, entre 1 día y 5 días de edad, incluso más preferentemente, entre 1 día y 4 días de edad, incluso más preferentemente, entre 1 día y 3 días de edad, incluso más preferentemente 1 o 2 día(s) de edad, y lo más preferentemente 1 día de edad.

40 Por lo tanto, según un aspecto, se desvela un método para inmunizar a un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación que inmuniza a un sujeto que lo necesite, en donde dicho sujeto que se va a inmunizar tiene entre 1 día de edad y 21 días de edad.

45 La presente divulgación también se refiere a cualquiera de las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento en el uso de cualquiera de los métodos tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, en el uso para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto, o en el uso de la inmunización de un sujeto contra dicha infección por micoplasma.

50 Dicha composición inmunogénica comprende a) uno o más antígenos de *M. hyosynoviae* y uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y la combinación de los mismos; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 De acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación comprende: a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis* y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica también comprende uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*.

Si la composición inmunogénica se produce en sistema de células eucariotas con suero reducido tal como se describe en el presente documento, que la composición inmunogénica puede comprender en general uno o más antígenos de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos tal como se define adicionalmente en el presente documento. De acuerdo con un aspecto adicional definido anteriormente en el presente documento, dicha composición inmunogénica puede comprender uno o más componentes de un sistema celular eucariota además del uno o más antígenos de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto, los uno o más de los antígenos de micoplasma usados para inmunizar al sujeto que lo necesite es/son vacunas bacterianas inactivadas completas. Este aspecto de la presente divulgación abarca que cualquiera de los antígenos de micoplasma es una vacuna bacteriana inactivada completa. Sin embargo, este aspecto de la presente divulgación también abarca que todos los antígenos en la composición inmunogénica de acuerdo con la presente divulgación son vacunas bacterianas inactivadas completas, es decir, el antígeno de *M. hyorhinis*, el antígeno de *M. hyosynoviae* y/o los antígenos de *M. hyopneumoniae* es/son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dichas vacunas bacterianas inactivadas completas se pueden obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dichas vacunas bacterianas inactivadas completas es/son vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

Preferentemente, dicho uso da como resultado una disminución de la incidencia de la infección por micoplasma particular en un rebaño o en la reducción de la gravedad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por micoplasma particular.

La presente divulgación también se refiere al uso de la composición inmunogénica tal como se describe en el presente documento para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por micoplasma en un sujeto o para la inmunización de un sujeto contra una infección por micoplasma.

Dicha composición inmunogénica comprende a) uno o más antígenos de *M. hyosynoviae* y uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y la combinación de los mismos; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica de acuerdo con la divulgación comprende: a) uno o más antígenos de *M. hyorhinis* y uno o más antígenos de *M. hyosynoviae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con un aspecto adicional, la composición inmunogénica también comprende uno o más antígenos de *M. hyopneumoniae*.

Si la composición inmunogénica se produce en sistema de células eucariotas con suero reducido tal como se describe en el presente documento, entonces la composición inmunogénica puede comprender en general uno o más antígenos de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos tal como se define adicionalmente en el presente documento. De acuerdo con un aspecto adicional definido anteriormente en el presente documento, dicha composición inmunogénica puede comprender uno o más componentes de un sistema celular eucariota además del uno o más antígenos de una bacteria de micoplasma seleccionada del grupo que consiste en *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* y cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto, los uno o más de los antígenos de micoplasma usados para inmunizar al sujeto que lo necesite es/son vacunas bacterianas inactivadas completas. Este aspecto de la presente divulgación abarca que cualquiera de los antígenos de micoplasma es una vacuna bacteriana inactivada completa. Sin embargo, este aspecto de la presente divulgación también abarca que todos los antígenos en la composición inmunogénica de acuerdo con la presente divulgación son vacunas bacterianas inactivadas completas, es decir, el antígeno de *M. hyorhinis*, el antígeno de *M. hyosynoviae* y/o los antígenos de *M. hyopneumoniae* es/son vacunas bacterianas inactivadas completas. Dichas vacunas bacterianas inactivadas completas se pueden obtener mediante los métodos de inactivación tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dichas vacunas bacterianas inactivadas completas es/son vacunas bacterianas inactivadas con formalina.

Preferentemente, dicho uso da como resultado una disminución de la incidencia de la infección por micoplasma particular en un rebaño o la reducción de la gravedad de los signos clínicos causados o asociados con la infección por micoplasma particular.

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 de micoplasma en células MDCK o células McCoy, respectivamente.

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

M. hyorhinitis:

Los 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 + CO₂ al 5 % hasta que se observa una monocapa confluyente de aproximadamente el 95-100 %. El medio se decanta y los matraces se enjuagan dos veces con PBS a 1x. Se añaden de cuatro a cinco ml de *M. hyorhinitis* a cada matraz (MOI = 10-100). Las células confluentes en matraces se infectan en las mismas condiciones de incubación que las anteriores durante no menos de 2 horas. Después del período de infección, los medios de infección suficientes (MEM + FBS al 2 %), precalentado a aproximadamente 37 °C, se añaden a cada matraz para un volumen total de 60 ml por matraz. Los matraces se incuban hasta que se observó > 90% de CPE (aproximadamente 3-7 días). Las suspensiones celulares se recogen de cada matraz y se agrupan (Paso = n). El material agrupado se usa para infectar nuevos matraces de aproximadamente el 95-100 % de células MDCK confluentes de la misma manera que la infección previa (Paso = n + 1), aumentando el número de matraces utilizados para lograr un volumen final suficiente según se considere necesario (Paso = n + 2, Paso = n + 3, etc).

M. hyosynoviae:

M. hyosynoviae se cultiva de la misma manera que *M. hyorhinitis* con algunas modificaciones: El medio de infección contiene DMEM + FBS al 2 % + solución de arginina al 1 %; *M. hyosynoviae* típicamente no ha presentado CPE, por lo que el cambio de color y la turbidez de los medios es el indicador clave para subcultivar al siguiente paso.

M. hyopneumoniae:

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

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

M. hyorhinitis:

Las células McCoy se cultivan como cultivos en suspensión en matraces de agitación en EMEM modificado suplementado con FBS al 10 %. Las células se subcultivan sembrando nuevos matraces para tener una concentración final de 10⁵-10⁶ células/ml. Para *M. hyorhinitis*, una suspensión celular de 500 ml a una concentración de 10⁵-10⁶ células/ml en un matraz de 3 l se siembra con 1 ml de 10⁷-10⁸ UFC. Los matraces se incuban a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % en una placa de agitación magnética durante 3-7 días. El crecimiento del micoplasma se determina por el cambio de pH ácido visible y el aumento de la turbidez. El crecimiento de micoplasma también se evalúa mediante ensayos de UFP para determinar los recuentos.

M. hyosynoviae:

M. hyosynoviae se cultiva de manera similar a *M. hyorhinitis*. Una suspensión celular de 500 ml a una concentración de 10⁵-10⁶ células/ml en un matraz de 3 l se siembra con 1 ml de 10⁵-10⁷ UFC. Los matraces se incuban a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % en una placa de agitación magnética durante aproximadamente 2 semanas. Tanto el cambio de pH como el aumento de la turbidez se usan para determinar el crecimiento, además de los ensayos de UFP para determinar los recuentos.

M. hyopneumoniae:

M. hyopneumoniae se cultiva de manera similar a *M. hyorhinitis* y *M. hyosynoviae*. Una suspensión celular de 500 ml a una concentración de 10⁵-10⁶ células/ml en un matraz de 3 l se siembra con 1 ml de 10⁵-10⁷ UFC. Los matraces se incuban a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % en una placa de agitación magnética durante alrededor de 2 semanas. Tanto el cambio de pH como el aumento de la turbidez se pueden usar para determinar el crecimiento, además de los ensayos de UFP para determinar los recuentos.

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

Para evaluar si una especie de micoplasma se puede cultivar en suero de diferentes especies, las células MDCK se infectan con *M. hyorhinitis* y se cultivan en suero bovino fetal, suero porcino, suero de conejo, suero de pollo o suero de caballo. Para cada tipo de suero, el cultivo de *M. hyorhinitis* en células MDCK se realiza tal como se describe anteriormente (es decir, el 5 % de suero para el crecimiento celular y el 2 % de suero para la infección). *M. hyorhinitis*

se recolecta a los cuatro días después de la infección por método estándar. Se realiza un ensayo UCC (unidad de cambio de color) para determinar el título vivo de *M. hyorhinis*. Además, se realiza una qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real) para determinar el contenido genómico total de *M. hyorhinis*. Un experimento ejemplar se muestra en la Tabla 1.

5

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

Tipo de suero	qPCR log (gc/ μ l)	UCC50 (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 muestra que los títulos medidos por el ensayo de UCC o qPCR son similares para los diversos tipos de suero. Además, los datos de análisis por transferencia de Western (no mostrados) admiten estos datos. Por lo tanto, *M. hyorhinis* se podría cultivar en células MDCK independientemente del tipo de suero utilizado para el cultivo.

10

Ejemplo 2

Preparación de vacunas.

15

Cuando el paso final esté listo para la recolección (> 90 % de la 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, recolectando y agrupando el lisado, y pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces para homogeneizar. Generalmente, se añade el 10-20 % de glicerol a la suspensión y se homogeniza. Esta suspensión se divide en alícuotas en volúmenes de trabajo. La solución madre se mantiene a < -60 °C hasta que se necesite.

20

Los volúmenes apropiados de la solución madre anterior se inactivan con formalina al 0,2 %. El exceso de formalina 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.

25

Ejemplo 3

Evaluación de la eficacia de las vacunas.

30

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

Cuidado animal

35

Los animales gozan de buena salud y estado nutricional antes de iniciar un estudio. Antes del procedimiento de aleatorización y registro se realiza un examen de salud. La alimentación no medicada se usa durante toda la duración del estudio. Las raciones alimenticias son apropiadas para la edad, condición y especie de animal de prueba de acuerdo con el procedimiento operativo estándar de la instalación. Se proporciona agua *ad libitum* a lo largo del estudio.

40

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

M. hyorhinis:

45

En D0 y nuevamente en D21, a los lechones convencionales de 6 semanas \pm 5 días de edad se les administra una dosis de 2 ml (7,1-7,3 log₁₀ UCC/dosis) de vacuna intramuscular de *M. hyorhinis*. *M. hyorhinis* se prepara como anteriormente; es decir, cultivadas en células MDCK tal como se describe anteriormente. La vacuna se adyuva con Montanide ISA207VG o CARBOPOL®. El PBS se usa como Placebo. Los cerdos se observan diariamente para la salud general. La sangre se recoge antes de la vacunación en D0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42. El suero se prueba para anticuerpos específicos de *M. hyorhinis* por BIVI R&D ELISA indirecto. Para el BIVI R&D ELISA, una relación S/P de > 0,200 se considera positiva.

50

En el ejemplo mostrado en la Tabla 2, el ELISA de *M. hyorhinis* indica una fuerte respuesta de anticuerpos. Seis/seis (6/6) (100 %) de los animales vacunados con *M. hyorhinis*-MDCK + Montanide ISA207VG fueron positivos dos semanas después de la primera dosis (D14). Todos los animales permanecieron positivos a través de D42, con un refuerzo en los títulos observados una semana después de la segunda dosis (D28). Los animales vacunados con *M.*

55

hyorhinis-MDCK + CARBOPOL® también muestran una respuesta de anticuerpos.

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

	Antes	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

5 Se lograron resultados de respuesta de anticuerpos similares después de la vacunación usando *M. hyorhinis* cultivado en células McCoy (datos no mostrados). Además, se obtuvieron resultados similares para una respuesta de anticuerpos después de la vacunación en lechones de 3 semanas \pm 5 días de edad (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares después de una administración de dosis única (datos no mostrados).

10 *M. hyopneumoniae*:

En D0 y nuevamente en D21, a los lechones convencionales de 6 semanas \pm 5 días de edad se les administra una dosis de 2 ml (8,0-8,5 log₁₀ UCC/dosis) de vacuna intramuscular de *M. hyopneumoniae*. La vacuna se adyuva con Montanide ISA207VG. El PBS se usa como Placebo. Los cerdos se observan diariamente para la salud general. Se recolecta sangre antes de la vacunación en D0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 para evaluar la presencia de anticuerpos de *M. hyopneumoniae*. En el ejemplo mostrado en la Tabla 3, se utilizó un ELISA IDEXX comercial. Para el ELISA IDEXX, una relación S/P de $>$ 0,400 se considera positiva.

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

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

	Antes	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

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

Ejemplo 4

30 Efectividad de las vacunas obtenidas de la bacteria de micoplasma cultivada en una línea celular eucariota frente a las vacunas obtenidas de la bacteria de micoplasma cultivada en un sistema libre de células.

Cincuenta y cuatro animales CD/CD a las 8 semanas \pm 5 días de edad se dividen en seis grupos. Los grupos V1 y V2 reciben cada uno un aislado inactivado de *M. hyorhinis* cultivado en células MDCK y CM (medio complejo; tal como medio a base de proteosa peptona que contiene suero porcino y extracto de levadura o medios a base de Friis), respectivamente; Los grupos V3 y V4 reciben un aislado inactivado de *M. hyorhinis* cultivado en células MDCK y CM, respectivamente. Todas las vacunas están adyuvadas con Montanide ISA207VG; la dosis y la vía fueron dosis de 2x2 ml por inyección intramuscular con una dosis administrada en D0 y la segunda en D21. El grupo CC (grupo control) recibe un placebo libre de antígeno (PBS) de la misma manera. El grupo SC (control estricto) no recibe tratamiento durante todo el estudio, sirviendo como estrictos animales de control. En D42, 43 y 44, los cerdos en el Grupo V1-V4 y CC se exponen a un *M. hyorhinis* virulento. La dosis y la vía de administración son 40 ml intraperitoneales, 15 ml intravenoso y 15 ml intranasal, respectivamente. Se recolecta sangre semanalmente desde D0 hasta el final del estudio (D58) para la prueba de ELISA específico de *M. hyorhinis*. Para el ELISA R&D de *M. hyorhinis*, una relación S/P de $>$ 0,200 se consideró positiva. En el estudio ejemplar que se muestra en la Tabla 4, todos los cerdos en el 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 en D0 y 7. Sin embargo, los resultados de la serología variaron entre las vacunas basadas en CM y MDCK. En comparación con las vacunas basadas en CM, las vacunas basadas en MDCK mostraron un inicio previo de seroconversión, mayor número de cerdos seropositivos y títulos serológicos más altos.

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

Proporciones S/P promedio de ELISA de <i>M. hyorhinis</i> por grupo									
Grupo	DO	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D58
MHRN001 MDCK (V1)	-0,002	0,010	0,199	0,482	0,916	0,971	0,929	1,056	0,991
MHRN001 - CM (V2)	0,001	0,009	0,031	0,081	0,395	0,401	0,370	0,793	0,770
MHRN002 MDCK (V3)	0,004	0,014	0,157	0,424	0,981	1,023	0,953	1,097	1,086
MHRN002 - 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 vacunas basadas en cultivos celulares con vacunas de bacterias de micoplasma cultivadas en un sistema libre de células.

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

10 Las vacunas se hacen con el antígeno McCoy usando antígeno sin diluir ("McCoy + ISA completo"), Antígeno 1:10 ("McCoy + ISA 1:10") y antígeno 1:100 ("McCoy + ISA 1:100") todos mezclados a 1:1 con Montanide ISA207VG como adyuvantes. Las vacunas que usan antígeno derivado de CM se hacen 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, sin embargo, los promedios grupales del estudio ejemplar fueron todos "negativos" antes de la exposición (DO-D21) aunque, el "McCoy + ISA completo" y "McCoy + ISA 1:10" mostraron respuestas con tendencia a ser positivas. Una semana después de la exposición (D28), todos los grupos vacunados respondieron con la excepción de "CM + ISA1:100".

25 De la Tabla 5 es evidente que cada tipo de antígeno (McCoy, CM) presenta un efecto de titulación estándar (Completo > 1:10 > 1:100). Además, de la Tabla 5 es evidente que los vacunados "McCoy + ISA completo" y "McCoy + ISA 1:10" tienen puntajes promedio más altos que el antígeno "CM + ISA completo", y eso es cierto a través de la terminación en D42. Los grupos con promedios positivos (S/P > 0,200) después de la exposición son los grupos "McCoy + ISA completo" y "McCoy + ISA 1:10". La vacuna McCoy completa y la dilución 1:10 mostraron una mayor respuesta serológica que la vacuna CM completa antes y después de la exposición. Adicionalmente, los animales vacunados con McCoy 1:100 también demostraron una respuesta distinguible de los grupos de placebo (no vacunados) y CM 1:100 (la respuesta CM 1:100, o la falta de ella, fue equivalente a 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 de micoplasma cultivadas en un sistema libre de células.

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

Proporciones 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

35 Ejemplo 5

Eficacia de la vacuna multivalente que comprende antígeno de *M. hyosynoviae*, *M. hypopneumoniae* y *M. hyorhinis*.

En este estudio, a 15 animales CD/CD a las 11 semanas \pm 5 días de edad se les administró una dosis única de 2 ml, IM, de un prototipo trivalente de vacuna de combinación de *Micoplasma*. La vacuna consistió en *M. hyorhinis* inactivado, *M. hyopneumoniae* inactivado e *M. hyosynoviae* inactivado. Todas las especies de micoplasma se prepararon en células MDCK. La vacuna se adyuvó con Montanide ISA207VG. Se recogieron muestras de sangre semanalmente desde el día 0 hasta el día 28. Los niveles de anticuerpos en suero fueron monitoreados por ELISA BIVI R&D de *M. hyorhinis* y ELISA IDEXX de *M. hyopneumoniae*. Ningún ensayo serológico para *M. hyosynoviae* estaba disponible en el momento de este estudio.

El ELISA de *M. hyorhinis* indicó una fuerte respuesta de anticuerpos dos semanas después de la vacunación (D14), con 11/15 (73,3 %) de los cerdos positivos y 15/15 (100 %) positivos hacia el D21.

Los resultados del ELISA IDEXX de *M. hyopneumoniae* indicaron que cuatro cerdos fueron positivos (S/P > 0,400) para anticuerpos de *M. hyopneumoniae* en el D0. Si se excluyen estos cuatro cerdos, cinco cerdos diferentes seroconvirtieron a *M. hyopneumoniae* hacia el D28. Tres de estos cinco cerdos fueron positivos en el D21.

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

Proporción S/P promedio del grupo de ELISA de <i>M. hyorhinis</i>				
D0	D7	D14	D21	D28
0,043	0,050	0,406	0,873	0,866

Tabla 5: Resultados de ELISA IDEXX de *M. hyopneumoniae*

Proporción S/P promedio del grupo ELISA IDEXX de <i>M. Hyopneumoniae</i>				
D0	D7	D14	D21	D28
0,294	0,255	0,259	0,287	0,421

Los resultados para *M. hyorhinis* indicaron una falta de interferencia por las fracciones restantes en la vacuna. Además, los niveles de antígeno de *M. hyorhinis* mezclados en la vacuna combinada tal como se usa en el presente estudio son suficientes para inducir una respuesta de anticuerpos medible después de una dosis única de 2 ml. Los resultados de *M. hyopneumoniae* demostraron cierta seroconversión. Los niveles de mezcla más altos para esta fracción pueden ser beneficiosos para aumentar la seroconversión. Los resultados de las fracciones de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* indicaron una falta de interferencia de estas especies.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende: a) una vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyorhinis* y una vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyosynoviae* y una vacuna bacteriana inactivada completa de *M. hyopneumoniae*; y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde todas las vacunas bacterianas inactivadas son vacunas bacterianas inactivadas con formalina.
- 15 3. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha composición inmunogénica es una vacuna.
- 20 4. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método para inmunizar a un sujeto.
5. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho sujeto se selecciona de la lista que consiste en cerdos, ganado bovino, gato y perro.
6. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde la composición inmunogénica se administra una vez.
7. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde dicho método es adecuado para un sujeto de tres semanas de edad o más.