



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.23

(21) Номер заявки
201500700

(22) Дата подачи заявки
2013.12.20

(51) Int. Cl. **A61K 39/02** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12R 1/35 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(54) ИММУНОГЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ АНТИГЕНЫ МИКОПЛАЗМ

(31) 61/747,026

(32) 2012.12.28

(33) US

(43) 2016.01.29

(86) PCT/US2013/076803

(87) WO 2014/105671 2014.07.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Джордан Дайана М. Мёрфи,
Мартинсон Брайан Томас,
Мьюленталер Кристине Маргарет,
Нойбауер Аксель, Айер Арун В. (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) SOBKO A.I. ET AL.: "Development of specific technics for the prevention of mycoplasma infections in swine", ARCHIV FUER EXPERIMENTED VETERINAERMEDIZIN, HIRZEL VERLAG, LEIPZIG, DE, vol. 43, no. 5, 1 January 1989 (1989-01-01), pages 645-655, XP009176494, ISSN: 0003-9055, see the english abstract on page 654

WO-A2-2013152083

WO-A1-2013152081

US-A1-2005037027

WO-A2-2009126356

WO-A1-2011075379

WO-A2-2009058833

KOBISCH M. ET AL.: "Swine mycoplasmoses", REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE - OFFICE INTERNATIONAL DES PIZOOTIES/SCIENTIFIC AND TECHNICAL REVIEW - INTERNATIONAL OFFICE OF EPIZOOTICS, OFFICE INTERNATIONAL DES

EPIZOOTIES, PARIS, FR, vol. 15, no. 4, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 1569-1605, XP002979012, ISSN: 0253-1933, the whole document but see in particular page 1592, line 11: the concentration of serum used to cultivate porcine mycoplasmas in the absence of cells was 20%

D.V. VOLOKHOV ET AL.: "Biological Enrichment of Mycoplasma Agents by Cocultivation with Permissive Cell Cultures", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 74, no. 17, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 5383-5391, XP55105261, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00720-08, see in particular page 5384, right column, first and second full paragraphs

DMITRIY V. VOLOKHOV ET AL.: "Mycoplasma testing of cell substrates and biologies: Review of alternative non-microbiological techniques", MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 25, no. 2, 4 January 2011 (2011-01-04), pages 69-77, XP028202245, ISSN: 0890-8508, DOI: 10.1016/J.MCP.2011.01.002 [retrieved on 2011-01-11], see in particular page 74, left column, paragraphs 1 to 3

L.N. POTGIETER ET AL.: "Chronological development of Mycoplasma hyorhinis and Mycoplasma hyosynoviae infections in cultures of a swine synovial cell strain", CANADIAN JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE - REVUE CANADIENNE DE MEDECINE COMPAREE, vol. 36, no. 2, 1 April 1972 (1972-04-01), pages 145-149, XP55114690, CA, ISSN: 0008-4050, see in particular page 146 (the second page of the document), left column

BHOGAL B.S. ET AL.: "Production of mycoplasma-specific antisera in rabbits immunologically tolerized at birth to mycoplasma medium constituents", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 97, no. 2, 12 March 1987 (1987-03-12), pages 191-199, XP023987028, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/0022-1759(87) 90459-5 [retrieved on 1987-03-12], abstract

IMURA S. ET AL.: "AN IMMUNO ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF MYCOPLASMA-HYOSYNOVIAE IN PRIMARY SWINE KIDNEY CELL CULTURE", KOBE JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, vol. 29, no. 1, 1983, pages 1-16, XP002723466, ISSN: 0023-2513, see e.g. the last two paragraphs on page 3

GB-A-1137306

WO-A2-9316726

(57) В изобретении описана иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов M. hyorhinis и один или несколько антигенов M. hyosynoviae и б) фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, в изобретении описана иммуногенная композиция, которая содержит

а) один или несколько антигенов микоплазм из микоплазматических бактерий, выбранных из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae*; и б) один или несколько компонентов из системы на основе эукариотических клеток. Кроме того, в настоящем изобретении описана иммуногенная композиция, полученная способом, заключающимся в том, что а) культивируют микоплазматические бактерии, выбранные из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae*, в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки; б) получают антиген указанных микоплазматических бактерий и в) добавляют фармацевтически приемлемый носитель.

038206 **B1**

038206 **B1**

Предпосылки создания изобретения

Бактерии рода *Mycoplasma* принадлежат к классу Mollicutes и представляют собой группу организмов, имеющую происхождение из типа Firmicutes (фирмикуты). Mollicutes представляют собой самые мелкие автономно реплицирующиеся организмы, которые структурно отличаются от других эубактерий отсутствием у них клеточной стенки. Поверхность их однослойной мембраны рассматривается в качестве поверхности раздела, имеющей решающее значение для адаптации и выживания, которые имеют место в обладающем сложным механизмом иммунокомпетентном хозяине. Кроме того, Mollicutes имеет небольшой геном и ограниченное количество метаболических путей. По этой причине представители рода *Mycoplasma* описаны также в качестве "минимальных самореплицирующихся организмов". Однако несмотря на эту кажущуюся простоту, большое количество микоплазматических бактерий являются патогенами человека и широкого спектра животных. В отличие от других патогенных бактерий, вирулентность которых главным образом определяется токсинами, инвазинами и цитоллизинами, патогенные микоплазматические бактерии, по-видимому, не имеют указанных типичных первичных факторов вирулентности (Chambaud I. и др., *Nucleic Acids Res.* 29, 2001, с. 2145-2153, Fraser и др., *Science* 270, 1995, с. 397-403). В настоящее время доступно лишь небольшое количество данных о молекулярных механизмах и факторах, которые обеспечивают патогенным микоплазмам возможность повреждать клетки-хозяева, вызывать воспаление и заболевание.

Патогенные микоплазматические бактерии являются, прежде всего, возбудителями атипичной пневмонии, мочеполовых инфекций и артритов у человека и животных (*Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*, под ред. Blanchard A. и G. F. Browning, изд-во Horizon Bioscience, Wymondham U.K., 2005; Kobisch M. и Friis N.F. *Swine mycoplasmoses*, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15, 1996, с. 1569-1605). Известно, что реактивация или обострение симптомов повторяются и постепенно переходят в хроническую стадию заболевания, и по этой причине наряду с ранним диагностированием и ранним лечением важными являются предупреждение или лечение обострения или реактивации. *M. hyorheumoniae* является этиологическим агентом энзоотической пневмонии. У свиней это является одной из наиболее распространенных и экономически важных болезней, с которой связаны пониженный прирост массы и плохая эффективность использования корма. Болезнь вызывает повреждение в легких, хронический кашель, тусклый волосяной покров, задержку роста и внешние признаки плохого развития, проявляющиеся в течение нескольких недель. Повреждения легких, прежде всего в вентральной верхушечной и сердечной долях, характеризуются гиперплазией эпителиальных клеток и повышенным накоплением мононуклеарных клеток в периваскулярном и перибронхиальном пространстве. *M. hyorhinis*, другой вид микоплазм, часто встречающийся в дыхательных путях свиней, может вызывать полисерозит и артрит у поросят. *M. hyosynoviae*, как правило, локализованы в миндалинах и могут вызывать артрит, что приводит к экономическим потерям. *M. hyosynoviae* выделяют из образцов, полученных из суставов и из гортани/миндалин, и этот вид может индуцировать образование антител в крови и синовиальной жидкости. *M. bovis* рассматривается как один из наиболее патогенных видов микоплазматических бактерий, и он наносит серьезный экономический ущерб во всем мире. Микоплазмы вызывают серьезные клинические признаки у крупного рогатого скота всех возрастов. *M. bovis* представляет собой наиболее часто встречающийся патоген *Mycoplasma*, который, как установлено, вызывает пневмонию, мастит и артрит у крупного рогатого скота, и его этиологическая роль также связана с отитом, кератоконъюнктивитом, синуситом и репродуктивными нарушениями у коров и быков.

Поскольку у микоплазм отсутствует клеточная стенка, на них не оказывают воздействие многие общепринятые антибиотики, такие как пенициллин или другие бета-лактамы, мишенью которых является синтез клеточной стенки. Терапевтические средства, применяемые при заражении микоплазмами, которые нашли применение на практике, представляют собой некоторые антибиотики, например, на основе макролидов, или новые антибиотики на основе хинолонов или антибиотики на основе тетрациклинов, но для таких антибиотиков характерны вредные воздействия, такие как возникновение устойчивых к лекарственным средствам штаммов, что приводит к тому, что связанная с микоплазмами инфекция становится более серьезной, поскольку при этом не достигаются требуемые терапевтические воздействия, и это является предпосылкой для превращения в хроническую стадию заболевания.

Кроме того, эффективным методом контроля вызываемой микоплазмами инфекции является вакцинация. Вакцины, эффективные в отношении нескольких видов микоплазматических бактерий, известны из существующего уровня техники. Например, в WO 2009/058833 (A2) описан ослабленный, авирулентный штамм бактерий *Mycoplasma bovis*, предназначенный для вакцинации. Кроме того, в WO 2009/126356 (A2) описана иммуногенная композиция против *Mycoplasma hyorheumoniae*. Однако существует потребность в эффективных комбинированных вакцинах, которые обеспечивают защиту от нескольких патогенов. Потребность в указанных комбинированных вакцинах является очень высокой для минимизации количества иммунизации, требуемых для обеспечения защиты от нескольких патогенов, для снижения стоимости обработок и для повышения приемлемости и зоны действия. Однако проблема, связанная с антигенной интерференцией, усложняет развитие многокомпонентных вакцин. Так, антигенная интерференция характеризуется тем, что введение нескольких антигенов часто приводит к пониженному ответу на определенные антигены по сравнению с иммунным ответом, обнаруженным при индиви-

дуальном введении указанных антигенов.

Таким образом, существует потребность в эффективных комбинированных вакцинах, которые обеспечивают защиту от нескольких патогенов.

Описание изобретения

Перед описанием объектов настоящего изобретения следует отметить, что в контексте настоящего описания и в прилагаемой формуле изобретения употребление понятия в единственном числе подразумевает также его упоминание во множественном числе, если из контекста точно не следует иное. Так, например, ссылка на "антиген" включает также множество антигенов, ссылка на "клетку" относится к одной или нескольким клеткам и их эквивалентам, известным специалистам в данной области, и т.д. Если не указано иное, то все технические и научные понятия, применяемые в контексте настоящего описания, имеют значения, хорошо известные обычному специалисту в области, к которой относится изобретение. Хотя для воплощения на практике или при тестировании настоящего изобретения можно применять любые методы и материалы, сходные или эквивалентные представленным в настоящем описании, ниже описаны предпочтительные методы, устройства и материалы. Все упомянутые в контексте настоящего описания публикации включены в него в качестве ссылки для целей описания и обсуждения клеточных линий, векторов и методологий, указанных в публикациях, которые можно применять в связи с изобретением. Ничто из указанного в настоящем описании не следует рассматривать как признание того, что в свете существующего уровня техники настоящее изобретение не может претендовать на объем, представленный в указанном описании.

Настоящее изобретение решает проблемы, имеющиеся в существующем уровне техники, и имеет выраженное преимущество в данной области техники. В целом настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей а) один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и один или несколько антигенов, выбранных из группы, состоящей из *M. hyorhynis* и *M. hyorhynis*, и их комбинации; и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Ценным является то, что согласно представленным в описании настоящего изобретения экспериментальным данным, иммуногенная композиция, представленная в настоящем описании, обладает эффективностью и лишена антигенной интерференции. В частности, после введения иммуногенной композиции, содержащей антигены *M. hyorhynis*, *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae*, продемонстрировано отсутствие интерференции вне зависимости от эффективности *M. hyorhynis* и *M. hyorhynis*.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis*; один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; б) один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и в) фармацевтически приемлемый носитель.

Понятие "иммуногенная композиция" относится к композиции, которая содержит по меньшей мере один антиген, который вызывает иммунологический ответ у хозяина, которому вводят иммуногенную композицию. Указанный иммунологический ответ может представлять собой клеточный и/или антитело-обусловленный (гуморальный) иммунный ответ на иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении. Хозяина обозначают также как "субъект". Предпочтительно любой из хозяев или субъектов, описанных или упомянутых в контексте настоящего описания, представляет собой животное.

Как правило, "иммунологический ответ" включает (но не ограничиваясь только ими) одно или несколько из следующих действий: производство или активация антител, В-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток-супрессоров и/или цитотоксических Т-клеток и/или гамма-дельта-Т-клеток, направленных конкретно к антигену или антигенам, включенному(ым) в иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении. Предпочтительно у хозяина должен иметь место либо защитный иммунологический ответ, либо терапевтический ответ.

"Защитный иммунологический ответ" может проявляться либо в снижении, либо в отсутствии клинических признаков, в норме характерных для инфицированного хозяина, более быстром времени восстановления и/или меньшей продолжительности инвазионной способности или более низким титром патогена в тканях или общей воде организма или экскрементах инфицированного хозяина.

В случае, когда у хозяина проявляется защитный иммунологический ответ, такой как устойчивость к новой инфекции, и/или у него снижается клиническая серьезность болезни, то иммуногенную композицию называют "вакциной".

Понятие "инфекция" или "инфицированный" относится к заражению субъекта патогеном, т.е. *M. hyorhynis* или *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae* или *M. hyorhynis*, *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae*.

"Терапевтический ответ" можно продемонстрировать по снижению и/или лечению клинических признаков, в норме характерных для хозяина, когда хозяин уже инфицирован патогеном (например, микоплазмой), который в норме вызывает указанный клинический признак или клинические признаки.

Понятие "микоплазмы" известно специалисту в данной области. "*Mycoplasma*" относится к роду бактерий, например, описанному в *Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*,

под ред. Blanchard A. и G. F. Browning, изд-во Horizon Bioscience, Wymondham U.K., 2005; Kobisch M. и у Friis N.F. Swine mycoplasmoses, Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1996, с. 1569-1605. Бактерии можно классифицировать на основе их биохимических и микробиологических свойств, а также их морфологии. Такие критерии классификации хорошо известны в данной области. Как правило, заражение микоплазмами ассоциируется с клиническими признаками, указанными в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие "микоплазмы" относится к *M. hyorhinis* или *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae* или *M. hyorhinis*, *M. hyorhinis*, *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae*. Пример полной геномной последовательности *M. hyorhinis* представлен у Liu W. и др., J. Bacteriol. T. 192 (21), 2010, с. 5844-5845 doi: 10.1128/JB.00946-10, Epub от 27 августа 2010 г. или у Calcutt M.J. и др., J. Bacteriol. т. 194 (7), 2012, с. 1848 doi: 10.1128/JB.00033-12. Например, изоляты *M. hyosynoviae* депонированы в Американской коллекции тканевых культур под регистрационными номерами ATCC 25591 или ATCC 27095. Например, изоляты *Mycoplasma hyorhinis* депонированы в Американской коллекции тканевых культур под регистрационными номерами ATCC 25095, ATCC 25617 и ATCC 25934. Геномная ДНК J-штамма *Mycoplasma hyorhinis* депонирована в Американской коллекции тканевых культур под регистрационными номерами ATCC 25934D.

В контексте настоящего описания понятие "антиген" относится (но не ограничиваясь только ими) к компонентам, которые вызывают иммунологический ответ у хозяина на представляющую интерес иммуногенную композицию или вакцину, содержащую указанный антиген или его иммунологически активный компонент. Антиген или его иммунологически активный компонент может представлять собой цельный микроорганизм (в инаktivированной или модифицированной живой форме) или любой его фрагмент или фракцию, который/которая, если его/ее вводят хозяину может вызывать иммунологический ответ у хозяина. Антиген может представлять собой или может содержать цельные живые организмы либо в их исходной форме, либо в виде ослабленных организмов в так называемой модифицированной живой вакцине (MLV). Антиген может дополнительно содержать элементы, присущие указанным организмам (субъединичные вакцины), при этом указанные элементы получают либо путем расщепления цельного организма или растущих культур указанных организмов и последующих стадий очистки, с получением требуемых(ой) структур(ы), либо путем процессов синтеза с помощью соответствующей манипуляции в приемлемой системе, например, (но не ограничиваясь только ими) в бактериях, насекомых, млекопитающих и других видах, и необязательно путем последующих процедур выделения и очистки, либо путем индукции указанных процессов синтеза в животном, которое нуждается в вакцине, путем непосредственного включения генетического материала с использованием приемлемых фармацевтических композиций (вакцинация полинуклеотидом). Антиген может содержать цельные организмы, инаktivированные соответствующими методами, в так называемой убитой вакцине (KV). Если организм представляет собой бактерию, то убитую вакцину называют бактерином.

Понятие "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, агенты для нанесения покрытий, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые средства, агенты, придающие изотоничность, замедляющие адсорбцию агенты, адъюванты, средства, стимулирующие иммунную систему, и их комбинации.

В одном из объектов настоящего изобретения один или несколько антигенов представляют собой цельные инаktivированные бактерии. Один или несколько цельных инаktivированных антигенов может(гут) представлять собой цельный инаktivированный бактерин, выбранный из группы, включающей *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; *M. hyorhinis*; *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae*; и *M. hyorhinis*, *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae*.

Так, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhinis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель, в которой антигены *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; или *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae* представляют собой цельные инаktivированные бактерии.

Согласно другому объекту изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhinis*; один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и один или несколько антигенов *M. hyorhinis* б) фармацевтически приемлемый носитель, в которой антигены *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; и/или *M. hyorhinis* представляют собой цельные инаktivированные бактерии. Согласно этому объекту настоящего изобретения либо антиген *M. hyorhinis* представляет собой цельный инаktivированный бактерин, либо антиген *M. hyorhinis* представляет собой цельный инаktivированный бактерин, либо антиген *M. hyosynoviae* представляет собой цельный инаktivированный бактерин. Однако согласно этому объекту изобретения подразумевается также, что все антигены в иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, представляют собой цельные инаktivированные бактерии, т.е. антигены *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae* или антигены *M. hyorhinis*, *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae* представляют собой цельные инаktivированные бактерии.

Для целей настоящего изобретения можно использовать любой приемлемый метод инаktivации. Так, инаktivацию можно осуществлять путем химических и/или физических обработок, известных спе-

циалисту в данной области. Предпочтительные методы инактивации включают добавление циклизованного бинарного этиленимина (BEI), включая добавление раствора гидробромида 2-бромэтиленамина (BEA), циклизованного с образованием бинарного этиленимина (BEI). Другие предпочтительные химические инактивирующие агенты включают (но не ограничиваясь только ими) Тритон X-100, дезоксихолат натрия, бромид цетилтриметиламмония, β -пропиолактон, тимеросал, фенол и формальдегид (формалин). Однако инактивация может включать также стадию нейтрализации. Предпочтительные нейтрализующие агенты включают (но не ограничиваясь только ими) тиосульфат натрия, бисульфит натрия и т.п.

Предпочтительные условия инактивации формалином включают применение формалина в концентрации примерно от 0,02 до 2,0 об.%, более предпочтительно примерно от 0,1 до 1,0 об.%, еще более предпочтительно примерно от 0,15 до 0,8 об.%, еще более предпочтительно примерно от 0,16 до 0,6 об.% и наиболее предпочтительно примерно от 0,2 до 0,4 об.%. Продолжительность инкубации зависит от устойчивости видов микоплазм. Как правило, процесс инактивации осуществляют до тех пор, пока рост микоплазм не перестает поддаваться обнаружению в приемлемой системе культивирования.

Согласно одному из объектов настоящего изобретения цельные инаktivированные бактерины представляют собой инаktivированные формалином бактерины, предпочтительно с использованием указанных выше концентраций. Так, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhinis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и б) фармацевтически приемлемый носитель, в которой один или несколько антигенов представляют собой цельные инаktivированные бактерины, и один или несколько цельных инаktivированных бактеринов представляют собой инаktivированные формалином бактерины. Согласно другому объекту изобретения указанная иммуногенная композиция содержит также один или несколько антигенов *M. hyorhynis* представляет собой инаktivированный формалином бактерин, либо антиген *M. hyorhynis* представляет собой инаktivированный формалином бактерин, либо антиген *M. hyosynoviae* представляет собой инаktivированный формалином бактерин. Однако согласно этому объекту настоящего изобретения подразумевается также, что все антигены микоплазм в иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, представляют собой инаktivированные формалином бактерины, т.е. антигены *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae* или антигены *M. hyorhinis* и *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae* представляют собой инаktivированные формалином бактерины.

Предлагаемый в изобретении компонент, представляющий собой инаktivированный бактерин, можно включать в липосомы, используя известную технологию, например, описанную в *Nature*, 252, 1974, с. 252-254 или в *Journal of Immunology*, 120, 1978, с. 1109-1113. В другом варианте осуществления изобретения компонент, который представляет собой инаktivированный бактерин, предлагаемый в изобретении, можно конъюгировать с приемлемыми биологическими соединениями, такими как полисахариды, пептиды, белки или т.п. или с их комбинацией.

Согласно следующему объекту изобретения иммуногенная композиция, представленная в настоящем описании, обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhinis*, у субъекта, который нуждается в этом. Так, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhinis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель, где указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhinis*, у субъекта, который нуждается в этом. Согласно следующему объекту изобретения указанная иммуногенная композиция содержит также один или несколько антигенов *M. hyorhynis*. Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельные инаktivированные бактерины указанных выше видов микоплазм.

Согласно следующему объекту изобретения иммуногенная композиция, представленная в настоящем описании, которая содержит также один или несколько антигенов *M. hyorhynis*, обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis*, у субъекта, который нуждается в этом. Так, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis*; один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; б) один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и в) фармацевтически приемлемый носитель, где указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis*, у субъекта, который нуждается в этом. Согласно следующему объекту изобретения указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis* и *M. hyorhynis*, у субъекта, который нуждается в этом. Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельные инаktivированные бактерины указанных выше видов микоплазм.

Понятие "лечение и/или профилактика" относится к уменьшению заболеваемости инфекцией, вызываемой микоплазмами, стада или снижению серьезности клинических признаков, которые вызываются или ассоциированы с конкретной микоплазматической инфекцией. Так, понятие "лечение и/или профи-

лактика" относится также к уменьшению количества животных в стаде, которые становятся инфицированными конкретными микоплазматическими бактериями (т.е. к уменьшению заболеваемости конкретной инфекцией, вызываемой микоплазмой) или к снижению серьезности клинических признаков, которые, как правило, вызываются или ассоциированы с микоплазматической инфекцией, в группе животных, в которой животных обрабатывали применяемой в эффективном количестве иммуногенной композицией, представленной в настоящем описании, по сравнению с группой животных, которых не обрабатывали указанной иммуногенной композицией.

"Лечение и/или профилактика", как правило, предусматривает введение в эффективном количестве иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, животному или стаду животных, которые нуждаются в этом, или на которых может оказывать благоприятное воздействие указанное лечение/указанная профилактика. Понятие "лечение" относится к введению в эффективном количестве иммуногенной композиции, когда особь или по меньшей мере несколько животных в стаде уже инфицированы указанной микоплазмой и когда у указанных животных уже обнаружены некоторые клинические признаки, которые вызываются или ассоциированы с микоплазматической инфекцией. Понятие "профилактика" относится к обработке особи до заражения указанной особи микоплазмой или, по меньшей мере, когда у указанного животного или ни у одного из животных в группе животных не обнаружены какие-либо клинические признаки, которые вызываются или ассоциированы с заражением указанной микоплазмой.

В контексте настоящего описания "эффективное количество" обозначает (но не ограничиваясь только указанным) количество антигена, которое вызывает или может вызывать иммунный ответ у субъекта. Указанное эффективное количество может уменьшать заболеваемость конкретной микоплазматической инфекцией в стаде или снижать серьезность клинических признаков, связанных с конкретной микоплазматической инфекцией.

Предпочтительно частоту встречаемости или серьезность клинических признаков снижают по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% по сравнению с субъектами, которых либо не обрабатывали иммуногенной композицией, либо обрабатывали известной из существующего уровня техники иммуногенной композицией, но которые впоследствии были инфицированы конкретными микоплазматическими бактериями.

Понятие "клинические признаки" в контексте настоящего описания относится к признакам инфекции у субъекта, вызываемой микоплазматическими бактериями. Клинические признаки инфекции зависят от конкретного патогена. Примеры указанных клинических признаков включают (но не ограничиваясь только ими) респираторный дистресс-синдром, полисерозит (такой как перитонит, плеврит, перикардит), артрит (хромота и опухание суставов), отит, огрубение волосяного покрова, небольшая лихорадка, депрессия, пониженный аппетит и бактериемия. При этом клинические признаки включают также (но не ограничиваясь только ими) клинические признаки, которые поддаются непосредственному обнаружению у живого животного. Примеры клинических признаков, которые поддаются непосредственному обнаружению у живого животного, включают выделения из носа и глаза, апатичность, кашель, стерторозное дыхание, склонность к падению, повышенную температуру, прирост или потерю массы, обезвоживание, диарею, опухание суставов, хромоту, кахексию, бледность кожи, плохой рост и т.п.

Снижение частоты встречаемости или серьезности клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с инфекцией конкретной микоплазмой, у субъекта можно достигать путем введения одной или нескольких доз иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, субъекту, который нуждается в этом. Как продемонстрировано в примерах 2 и 3, иммуногенная композиция, представленная в настоящем описании, обладала эффективностью после введения однократной дозы субъекту, нуждавшемуся в этом. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhinis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель, где указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhinis*, у субъекта, который нуждается в этом, после введения однократной дозы. Указанную однократную дозу вводят только один раз. Согласно другому объекту изобретения указанная иммуногенная композиция содержит также один или несколько антигенов *M. hyopneumoniae*. Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляют собой цельные инактивированные бактерии указанных выше видов микоплазм.

Кроме того, было установлено, что одна доза иммуногенной композиции, которая содержит *M. hyopneumoniae*, также является эффективной после введения указанной однократной дозы такой иммуногенной композиции. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем патенте предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhinis*; один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; б) один или несколько антигенов *M. hyopneumoniae* и в) фар-

мацевтически приемлемый носитель, где указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae*, у субъекта, который нуждается в этом, после введения однократной дозы. Указанную однократную дозу вводят только один раз. Согласно другому объекту изобретения указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae*, у субъекта, который нуждается в этом. Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляют собой цельные инактивированные бактерии указанных выше видов микоплазм.

Согласно одному из объектов настоящего изобретения иммуногенную композицию приготавливают для введения в виде однократной дозы указанной иммуногенной композиции. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель, где иммуногенную композицию приготавливают для введения в виде однократной дозы указанной иммуногенной композиции. Указанная иммуногенная композиция может содержать также один или несколько антигенов *M. hyorhynis*, при этом указанную иммуногенную композицию, которая содержит а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; б) один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; в) один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; г) один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и д) фармацевтически приемлемый носитель, приготавливают или предоставляют для введения в виде однократной дозы. Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм могут представлять собой цельные инактивированные бактерии указанных выше видов микоплазм. Кроме того, указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis* или *M. hyosynoviae* и *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae*, у субъекта, который нуждается в этом, после введения однократной дозы указанных антигенов микоплазм, в каждом случае в зависимости от того, содержит ли композиция один или несколько антигенов *M. hyorhynis* или нет. Важно отметить, что экспериментальные данные, представленные в описании настоящего изобретения, продемонстрировали, что введение однократной дозы иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, достоверно и эффективно стимулировало защитный иммунный ответ. В частности, поддающийся измерению гуморальный иммунный ответ продемонстрирован для *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae*.

Как отмечалось выше, понятие субъект или хозяин в контексте настоящего описания относится к животным, предпочтительно млекопитающим, таким как мыши, крысы, морские свинки, кролики, хомяки, свиньи, овцы, собаки, кошки, лошади, обезьяны или крупный рогатый скот, а также предпочтительно к человеку.

Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель, где указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis* у свиней. Согласно следующему объекту изобретения указанная иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis* у свиней. Когда указанная иммуногенная композиция содержит также один или несколько антигенов *M. hyorhynis*, то она согласно следующему объекту изобретения обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis* у свиней. Согласно следующему объекту изобретения указанная иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae*, обладает эффективностью при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызываемых *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae* у свиней. И в этом случае один или несколько антигенов микоплазм могут представлять собой цельные инактивированные бактерии указанных выше видов микоплазм.

Согласно следующему объекту настоящего изобретения иммуногенная композиция представляет собой вакцину. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель, где иммуногенная композиция представляет собой вакцину. Указанная вакцина может содержать также один или несколько антигенов *M. hyorhynis*. Вакцина, предлагаемая в изобретении, при ее введении субъекту, который нуждается в этом, обладает такими же ценными свойствами, что и свойства, описанные для иммуногенных композиций.

Согласно одному из объектов настоящего изобретения фармацевтически приемлемый носитель выбирают из группы, состоящей из растворителей, дисперсионных сред, агентов для нанесения покрытий, стабилизаторов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых средств, агентов, придающих изотоничность, замедляющих адсорбцию агентов адъювантов, средств, стимулирующих иммунную систему, и их комбинаций. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носи-

тель, в которой фармацевтически приемлемый носитель выбирают из группы, состоящей из растворителей, дисперсионных сред, агентов для нанесения покрытий, стабилизаторов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых средств, агентов, придающих изотоничность, замедляющих адсорбцию агентов, адъювантов, средств, стимулирующих иммунную систему, и их комбинаций. Как отмечалось выше, указанная вакцина может содержать также один или несколько антигенов *M. hyor-pneumoniae*. Кроме того, один или несколько антигенов микоплазм из указанных выше видов микоплазм может представлять собой цельный инактивированный бактерин, указанный выше.

В контексте настоящего описания "адъюванты" могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например Quil A, QS-21 (фирма Cambridge Biotech Inc., Кэмбридж, шт. Массачусетс), GPI-0100 (фирма Galenica Pharmaceuticals, Inc., Бирмингем, шт. Алабама), эмульсию вода-в-масле, масло-в-воде, эмульсию вода-в-масле-в-воде. Основой эмульсии могут быть, в частности, легкое жидкое парафиновое масло (типа соответствующего Европейской фармакопеи); изопреноидное масло, такое как сквалан или сквален; масло, образующееся при олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; эфиры кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, более конкретно растительные масла, этилолеат, пропиленгликоля ди(каприлат/капрат), глицерина три(каприлат/капрат) или пропиленгликоля диолеат; эфиры разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности эфиры изостеариновой кислоты. Масла применяют в сочетании с эмульгаторами с получением эмульсии. Предпочтительными эмульгаторами являются неионогенные поверхностно-активные вещества, в частности, эфиры сорбитана, маннида (например, ангидроманнитолеат), глицерина, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостериновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности продукты типа Pluronic, прежде всего L121 (см. Hunter и др., *The Theory and Practical Application of Adjuvants*, под ред. Stewart-Tull D. E. S., изд-во John Wiley and Sons, NY, 1995, с. 51-94 и Todd и др., *Vaccine* 15, 1997, с. 564-570). Например, можно применять эмульсию SPT, описанную на с. 147 в "*Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*", под ред. M. Powell и M. Newman, изд-во Plenum Press, 1995 и эмульсию MF59, описанную на с. 183 в этой же книге. Другие пригодные адъюванты включают (но не ограничиваясь только ими) адъювантную систему RIBI (фирма Ribi Inc.), блок-сополимер (фирма CytRx, Атланта, шт. Джорджия), SAF-M (фирма Chiron, Эмеривилл, шт. Калифорния), монофосфорил-липид А, адъювант авридин липид-амин, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или иной), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид (но изобретение не ограничено указанными адъювантами). Из сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного применяют сополимеры ЕМА (фирма Monsanto), представляющие собой сополимеры малеинового ангидрида и этилена. Растворение указанных полимеров в воде приводит к получению кислого раствора, который должен быть нейтрализован, предпочтительно до физиологического значения pH, для получения раствора адъюванта, в который может быть включена иммуногенная, иммунологическая композиция или композиция вакцины.

Согласно одному из объектов настоящего изобретения фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант, выбранный из группы, состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия, сапонинов, эмульсии вода-в-масле, эмульсии масло-в-воде, эмульсии вода-в-масле-в-воде, полимеров акриловой или метакриловой кислоты, сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного, адъювантной системы RIBI, блок-сополимера, SAF-M, монофосфорил-липид А, авридин липид-амин, термолабильного энтеротоксина из *E. coli* (рекомбинантного или иного), холерного токсина, IMS 1314, мурамилдипептида и их комбинаций. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhinae*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант, выбранный из группы, состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия, сапонинов, эмульсии вода-в-масле, эмульсии масло-в-воде, эмульсии вода-в-масле-в-воде, полимеров акриловой или метакриловой кислоты, сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного, адъювантной системы RIBI, блок-сополимера, SAF-M, монофосфорил-липид А, авридин липид-амин, термолабильного энтеротоксина из *E. coli* (рекомбинантного или иного), холерного токсина, IMS 1314, мурамилдипептида и их комбинаций. Указанная вакцина может содержать также один или несколько антигенов *M. hyor-pneumoniae*. Кроме того, один или несколько антигенов микоплазм из указанных видов микоплазм может представлять собой цельный инактивированный бактерин, указанный выше в настоящем описании.

Другим примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного. Предпочтительными адъювантами являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, сшитые, прежде всего с простыми полиалкениловыми эфирами сахаров или полиспиртов. Такие соединения обозначают как карбомер (Pharmecopora, т. 8, № 2, июнь 1996 г.). Специалист в данной области может также почерпнуть из US № 2909462 описание указанных акриловых полимеров, сшитых с полигидроксильрованным соединением, имеющим по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, при этом атомы водорода по меньшей мере в трех гидроксилах замещен ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются радикалы,

которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллилы и другие ненасыщенные группы этиленового ряда. Ненасыщенные радикалы могут сами содержать другие заместители, такие как метил. Наиболее пригодными являются продукты, которые продаются под названием CARBOPOL® (фирма BF Goodrich, шт. Огайо, США). Они представляют собой полимеры акриловой кислоты, сшитые с простыми полиалкениловыми эфирами, или дивинилгликолем, или сшитые с аллилсахарозой или с аллилпентаэритритом. Из них можно отметить CARBOPOL® 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является применение CARBOPOL® 971P.

Предпочтительно адъювант добавляют в количестве, составляющем от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу. Еще более предпочтительно адъювант добавляют в количестве от примерно 100 мкг до примерно 10 мг на дозу. Еще более предпочтительно адъювант добавляют в количестве от примерно 500 мкг до примерно 5 мг на дозу. Еще более предпочтительно адъювант добавляют в количестве от примерно 750 мкг до примерно 2,5 мг на дозу. Наиболее предпочтительно адъювант добавляют в количестве примерно 1 мг на дозу.

Согласно одному из объектов изобретения фармацевтически приемлемый носитель представляет собой эмульсию вода-в-масле или карбомер. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhinis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой эмульсию вода-в-масле-в-воде или карбомер. Указанная вакцина может содержать также один или несколько антигенов *M. hyopneumoniae*. Кроме того, один или несколько антигенов микоплазм из указанных видов микоплазм может представлять собой цельный инактивированный бактериин, указанный выше в настоящем описании.

Согласно одному из объектов настоящего изобретения эмульсия вода-в-масле-в-воде представляет собой Монтанид ISA207 VG или CARBOPOL®.

Монтанид ISA207 VG представляет собой адъювант, состоящий из сложных олеиновых эфиров безводного маннита в растворе неминерального масла, и ее создают для получения эмульсий вакцин типа вода-в-масле-в-воде. Монтанид ISA207 VG хорошо известен специалисту в данной области. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая а) один или несколько антигенов *M. hyorhinis*; и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой Монтанид ISA207 VG или CARBOPOL®. Как отмечалось выше, указанная вакцина может содержать также один или несколько антигенов *M. hyopneumoniae*. Кроме того, один или несколько антигенов микоплазм из указанных видов микоплазм может представлять собой цельный инактивированный бактериин, указанный выше в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится также к иммуногенной композиции, полученной с помощью способа, заключающегося в том, что а) культивируют микоплазматические бактериин, выбранные из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae*, в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки; б) получают один или несколько антигенов указанных микоплазматических бактерий и в) добавляют фармацевтически приемлемый носитель.

Понятие "культивирование" известно специалисту в данной области. Понятие относится к размножению клеток в культуре вне организма. В частности, понятие "культивирование" относится к размножению клеток вне организма в клеточной системе.

Понятие "клеточная система" известно специалисту в данной области. В частности, "клеточная система" представляет собой клеточную систему *in vitro* для культивирования микроорганизма, такого, например, как микоплазматическая бактерия. Указанная клеточная система содержит клетки-хозяева и среду для культуры клеток, пригодную для размножения указанных клеток вне организма. В частности, клетки-хозяева могут быть чувствительными или нечувствительными к заражению микоплазматическими бактериями.

Указанные клетки-хозяева могут присутствовать в виде живых клеток, в инактивированной форме или в виде клеточных фрагментов. Предпочтительно указанные клетки-хозяева являются чувствительными к заражению микоплазматическими бактериями. Клетки-хозяева, которые можно применять для воплощения на практике способа, представленного в настоящем описании, включают (но не ограничиваясь только ими) клетки Мадин-Дарби эпителия почки собаки (MDCK) (например, клетки Мадин-Дарби эпителия почки собаки, депонированные в Американской коллекции тканевых культур под регистрационным номером ATCC CCL-34 или ATCC CRL-2285) или клетки McCoу (например, депонированные в Американской коллекции тканевых культур под регистрационным номером ATCC CRL-1696). Приемлемые среды для культивирования клеток известны специалисту в данной области и поступают в продажу. Они могут содержать питательные вещества, соли, факторы роста, антибиотики, сыворотку (например, сыворотку плода коровы) и рН-индикаторы (например, феноловый красный).

Под понятие "система на основе эукариотических клеток" подпадает система, содержащая первичные эукариотические клетки и эукариотические клетки, выведенные из многоклеточных организмов, таких как растения или животные. Кроме того, система на основе эукариотических клеток включает эу-

кариотические одноклеточные организмы (которые называют также микроорганизмами), например бактерии или грибы, включая дрожжи. Однако, как должно быть очевидно, эукариотические клетки отличаются от микоплазматических бактерий.

Понятие "низкое содержание сыворотки" относится к пониженному количеству сыворотки, добавляемому для культивирования микоплазматических бактерий в систему на основе эукариотических клеток, по сравнению с количеством сыворотки, которое используют для культивирования микоплазматических бактерий этих же видов в бесклеточной системе культивирования. Количество сыворотки для культивирования микоплазматических бактерий в системе на основе эукариотических клеток по сравнению с количеством сыворотки для культивирования микоплазматических бактерий в бесклеточной системе культивирования снижают по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 96%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 97%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99%, наиболее предпочтительно на 100%. Таким образом, должно быть очевидно, что согласно настоящему изобретению микоплазматические бактерии наиболее предпочтительно культивировать в системе на основе эукариотических клеток, совсем не содержащей какую-либо сыворотку.

Понятие "бесклеточная система культивирования" в контексте настоящего описания относится к системе культивирования, которая не включает какие-либо клетки кроме микоплазматических бактерий.

Предпочтительные количества сыворотки для культивирования микоплазматических бактерий в системе на основе эукариотических клеток включают концентрации сыворотки, составляющие примерно от 0 до 10 об.%, более предпочтительно примерно от 1 до 9 об.%, еще более предпочтительно примерно от 1 до 8 об.%, еще более предпочтительно примерно от 1 до 7 об.%, еще более предпочтительно примерно от 1 до 6 об.% и наиболее предпочтительно примерно от 2 до 5 об.%.

Предпочтительные количества сыворотки для культивирования микоплазматических бактерий в системе на основе эукариотических клеток, содержащей MDCK-клетки, включают концентрации сыворотки, составляющие примерно от 0 до 6 об.%, более предпочтительно примерно от 1 до 5 об.%, еще более предпочтительно примерно от 2 до 4 об.%, еще более предпочтительно примерно от 2 до 3 об.% и наиболее предпочтительно примерно 2 об.%.

Предпочтительные количества сыворотки для культивирования микоплазматических бактерий в системе на основе эукариотических клеток, содержащей McCoу-клетки, включают концентрации сыворотки, составляющие примерно от 0 до 10 об.%, более предпочтительно примерно от 1 до 9 об.%, еще более предпочтительно примерно от 1 до 8 об.%, еще более предпочтительно примерно от 1 до 7 об.%, еще более предпочтительно примерно от 4 до 6 об.% и наиболее предпочтительно примерно 5 об.%.

Согласно настоящему изобретению следует понимать, что эукариотические клетки или система на основе эукариотических клеток должна инфицироваться микоплазматическими бактериями. Указанное заражение приводит к размножению микоплазматических бактерий в системе на основе эукариотических клеток. Заражение эукариотических клеток микоплазматическими бактериями и условия постинкубационного периода, позволяющие осуществлять размножение микоплазматических бактерий, хорошо известны специалисту в данной области. Однако предпочтительно после трансфекции клетки инкубируют в течение периода времени, составляющего вплоть до 21 дня, более предпочтительно от примерно 2 дней до примерно 14 дней, более предпочтительно от примерно 2 дней до примерно 8 дней, еще более предпочтительно от примерно 3 до 5 дней. Предпочтительные условия инкубации включают температуру примерно от 32 до 42°C, более предпочтительно примерно от 34 до 40°C, еще более предпочтительно примерно от 35 до 39°C, еще более предпочтительно примерно от 36 до 38°C и наиболее предпочтительно примерно 37°C. Предпочтительные условия инкубации включают также концентрацию CO₂, составляющую примерно от 2 до 8%, более предпочтительно примерно от 3 до 7%, еще более предпочтительно примерно от 4 до 6% и наиболее предпочтительно примерно 5%. Предпочтительно эукариотические клетки обследуют после трансфекции в отношении характеристических изменений, таких как тенденции в отношении клеточной плотности, снижение жизнеспособности, включая цитопатические действия во время постинкубационного периода и изменение цвета среды из-за изменений pH.

Понятие "получение" включает сбор, выделение, очистку и/или составление композиции (например, инактивацию и/или приготовление смеси) антигена.

Понятие "сбор" относится к сбору или извлечению антигена микоплазматических бактерий из трансфицированной системы на основе эукариотических клеток. Для извлечения указанного микоплазматического антигена можно применять любой общепринятый метод, известный в данной области, например, любой метод разделения. Методы, хорошо известные в данной области, включают центрифугирование или фильтрацию, например, с использованием полупроницаемой мембраны, имеющей определенный размер пор.

Понятие "выделение" включает стадию выделения микоплазматического антигена. Методы выделения антигенов микоплазматических бактерий из инфицированной системы на основе эукариотических клеток известны специалисту в данной области. Указанные методы представляют собой физические и/или химические методы, включая (но не ограничиваясь только ими) циклы замораживания-оттаивания, обработку ультразвуком и т.п.

Методы "очистки" антигенов из изолята хорошо известны специалистам в данной области, например, представляют собой методы, описанные в *Protein purification methods - a practical approach*, под ред. E.L.V. Harris и S. Angal, изд-во IRL Press at Oxford University Press. Указанные методы включают (но не ограничиваясь только ими) разделение путем центрифугирования и/или фильтрации, осаждение, вытеснительную хроматографию (гель-фильтрацию), аффинную хроматографию, металл-хелатную хроматографию, ионообменную хроматографию, ковалентную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействий и т.п. Антиген можно получать в очищенной (чистой) форме или в форме, свободной или практически свободной от других клеточных материалов или культуральной среды и т.д. После указанного выделения и/или очистки антиген имеет чистоту, составляющую по меньшей мере 80%, предпочтительно 80-90%, более предпочтительно 90-97%, наиболее предпочтительно более 97% вплоть до абсолютно чистотой формы без какого-либо загрязнения.

Согласно другому объекту изобретения понятие "получение" в контексте настоящего описания может включать также дополнительные стадии окончательной обработки типа стадий добавления буфера, инактивации, нейтрализации и т.п.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов микоплазм, выбранных из группы, включающей *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любые их комбинации, где один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhinitis*, где один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов микоплазм *M. hyosynoviae*, где один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов микоплазм *M. hyopneumoniae*, где один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhinitis* и *M. hyopneumoniae*, где один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhinitis* и *M. hyosynoviae*, где один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов микоплазм *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae*, где один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae*, где один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки.

Один или несколько антигенов микоплазм инактивируют, предпочтительно с помощью любого из методов указанных выше в настоящем описании. Согласно следующему объекту изобретения все анти-

гены микоплазм инактивируют, предпочтительно с помощью любого из методов указанных выше в настоящем описании. Таким образом, следующим объектом настоящего изобретения является иммуногенная композиция, полученная способом, заключающимся в том, что а) культивируют микоплазматические бактерии, выбранные из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любых их комбинаций в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки; б) получают один или несколько антигенов указанных микоплазматических бактерий, в котором стадия получения включает инактивацию одного или нескольких антигенов микоплазм; и в) добавляют фармацевтически приемлемый носитель. Стадию инактивации можно осуществлять с помощью любого метода, указанного выше в настоящем описании. Согласно одному из объектов изобретения указанная инактивация приводит к получению цельных инаktivированных бактеринов микоплазматических бактерий. Предпочтительно указанную инактивацию микоплазматических бактерий осуществляют с помощью формалина, в результате антиген микоплазм представляет собой цельный инаktivированный формалином бактерин. Согласно одному из объектов изобретения антигены микоплазм представляют собой цельный инаktivированный бактерин *M. hyorhinis*, цельный инаktivированный бактерин *M. hyopneumoniae*, цельный инаktivированный бактерин *M. hyosynoviae*, цельный инаktivированный бактерин *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae* или цельный инаktivированный бактерин *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae*, или цельный инаktivированный бактерин *M. hyorhinis* и *M. hyopneumoniae*, или цельный инаktivированный бактерин *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae*. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм в иммуногенной композиции представляют собой цельные инаktivированные бактерины, предпочтительно цельные инаktivированные формалином бактерины.

Согласно одному из объектов изобретения антиген микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где сыворотка не содержит свиную сыворотку. Поскольку микоплазматические бактерии *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae* являются патогенами свиней, свиная сыворотка может содержать компоненты, которые могут оказывать воздействие на антигены микоплазм в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, поэтому в предпочтительном объекте изобретения применяют не свиную сыворотку или совсем не применяют сыворотку. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, полученная способом, заключающимся в том, что а) культивируют микоплазматические бактерии, выбранные из группы, включающей *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любые их комбинации в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки; б) получают антиген указанных микоплазматических бактерий и в) добавляют фармацевтически приемлемый носитель, в котором система на основе эукариотических клеток свободна от свиной сыворотки.

Как отмечалось выше, система на основе эукариотических клеток может содержать клетки линии MDCK или клетки линии McCoу. Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложен способ получения иммуногенной композиции, заключающийся в том, что а) культивируют микоплазматические бактерии, выбранные из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любых их комбинаций, в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки; б) получают антиген указанных микоплазматических бактерий и в) добавляют фармацевтически приемлемый носитель, при этом система на основе эукариотических клеток содержит клетки линии MDCK или клетки линии McCoу.

Согласно следующему объекту изобретения антиген микоплазм, входящий в иммуногенную композицию, получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где указанный антиген микоплазм обладает повышенной иммуногенностью по сравнению с таким же антигеном, полученным из микоплазм, которые культивировали в бесклеточной системе для культивирования.

В контексте настоящего описания понятие "повышенная иммуногенность" означает, что иммунологический ответ, вызываемый иммуногенной композицией, содержащей представляющий интерес антиген, повышается по сравнению с применяемой в качестве контроля иммуногенной композицией, содержащей такой же антиген, где антиген применяемой в качестве контроля иммуногенной композиции получают из микоплазматических бактерий, культивируемых в бесклеточной системе для культивирования.

Понятие "повышенный" означает, что клеточный и/или гуморальный иммунный ответ повышается по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 75%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 100% по сравнению с клеточным и/или гуморальным иммунным ответом, вызываемым применяемой в качестве контроля иммуногенной композицией, содержащей такой же антиген, где антиген применяемой в качестве контроля иммуногенной композиции получают из микоплазматических бактерий, культивируемых в бесклеточной системе культивирования. Обычному специалисту в данной области должно быть очевидно, как измерять клеточный и/или гуморальный иммунный ответ. В частности, такому специалисту в данной области должно быть очевидно, что необходимо либо сравнивать кле-

точный иммунный ответ представляющей интерес иммуногенной композиции с клеточным ответом контрольной композиции, либо гуморальный иммунный ответ представляющей интерес иммуногенной композиции с гуморальным иммунным ответом контрольной композиции, но не клеточный иммунный ответ представляющей интерес иммуногенной композиции с гуморальным иммунным ответом контрольной композиции и наоборот. Кроме того, клеточный иммунный ответ можно измерять, например, путем оценки активации цитотоксических Т-клеток представляющей/представляющим интерес иммуногенной композицией/антигеном. Гуморальный иммунный ответ можно измерять, например, путем оценки количества антигенспецифических антител, выработавшихся в процессе введения иммуногенной композиции, содержащей указанный антиген, животному. Клеточный и/или гуморальный иммунный ответ можно измерять, например, путем применения мышиной модели, кошачьей модели, созданной на коровах модели или созданной на свиньях модели. Однако анализы, описанные в примере 4 и 5, можно применять в качестве референс-анализов для обнаружения иммунного ответа против *M. hyorhinis* и *M. hyopneumoniae*.

Понятие "такой же (тот же самый) антиген" означает что природа антигенов является идентичной. Так, если антиген микоплазм, входящий в иммуногенную композицию, полученную в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, представляет собой цельный инактивированный бактерин *M. hyorhinis*, то понятие "такой же антиген" означает, что антиген микоплазм, полученный в бесклеточной системе, представляет собой также цельный инактивированный бактерин *M. hyorhinis*. Кроме того, если антиген микоплазм, входящий в иммуногенную композицию, полученную в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, получают или очищают с помощью конкретного метода, то понятие "такой же антиген" означает, что антиген микоплазм из бесклеточной системы получают или очищают с помощью такого же метода.

Важно отметить, что согласно экспериментальным данным, полученным при создании настоящего изобретения, антигены микоплазм, полученные указанные выше методом, обладают повышенной иммуногенностью по сравнению с антигенами микоплазматических бактерий, которые культивировали в бесклеточной системе культивирования. В частности, при применении полученных на основе MDCK содержащих *M. hyorhinis* вакцин установлено более раннее начало сероконверсии, большее количество серопозитивных свиней и более высокие серологические титры.

Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, полученная способом, заключающимся в том, что а) культивируют микоплазматические бактерии, выбранные из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любых их комбинаций, в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки; б) получают антиген указанных микоплазматических бактерий и в) добавляют фармацевтически приемлемый носитель, где указанная иммуногенная композиция обладает повышенной иммуногенностью по сравнению с иммуногенной композицией, которая содержит такой же антиген, полученный из микоплазм, культивируемых в бесклеточной системе культивирования. Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать методами инактивации, указанными в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhinis*, в которой один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где иммуногенная композиция обладает повышенной иммуногенностью по сравнению с иммуногенной композицией, которая содержит такой же антиген, полученный из микоплазм, культивируемых в бесклеточной системе культивирования. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyosynoviae*, в которой один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где иммуногенная композиция обладает повышенной иммуногенностью по сравнению с иммуногенной композицией, которая содержит такой же антиген, полученный из микоплазм, культивируемых в бесклеточной системе культивирования. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивиро-

ских клеток с пониженным содержанием сыворотки. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм представляют собой инактивированные бактерины, предпочтительно инактивированные формалином бактерины.

Согласно следующему объекту изобретения антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, при этом иммуногенная композиция содержит компоненты эукариотических клеток из указанной системы на основе эукариотических клеток.

Понятие "компоненты эукариотических клеток" включает как цельные клетки, так и фрагменты указанных эукариотических клеток. Понятие "фрагмент" относится к любым частям эукариотической клетки, таким как части клеточной мембраны или внутриклеточные органеллы, в том числе цельные органеллы или их компоненты. Однако понятие фрагмент относится также к любому компоненту указанной эукариотической клетки, такому как липиды, белки, сахара, ДНК, РНК и т.п., а также их комбинации. Кроме того, компоненты эукариотических клеток и антигена микоплазм могут в иммуногенной композиции либо находиться отдельно друг от друга, либо быть присоединены друг к другу, или находиться в виде комбинации указанных положений.

Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, полученная способом, заключающимся в том, что а) культивируют микоплазматические бактерии, выбранные из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любых их комбинаций, в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки; б) получают антиген указанных микоплазматических бактерий; и в) добавляют фармацевтически приемлемый носитель, где иммуногенная композиция содержит компоненты эукариотических клеток из указанной системы на основе эукариотических клеток. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhinis*, в которой один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где иммуногенная композиция содержит компоненты эукариотических клеток из указанной системы на основе эукариотических клеток. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyosynoviae*, в которой один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где иммуногенная композиция содержит компоненты эукариотических клеток из указанной системы на основе эукариотических клеток. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyopneumoniae*, в которой один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где иммуногенная композиция содержит компоненты эукариотических клеток из указанной системы на основе эукариотических клеток. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhinis* и *M. hyopneumoniae*, в которой один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где иммуногенная композиция содержит компоненты эукариотических клеток из указанной системы на основе эукариотических клеток. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм представляют собой инактивированные бактерины, предпочтительно инактивированные формалином бактерины.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae*, в которой один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где иммуногенная композиция содержит компоненты эукариотических клеток из указанной системы на основе эукариотических клеток. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм представляют собой инактивированные бактерины, предпочтительно инактивированные формалином бактерины.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* и *M. hyosynoviae*, в которой один или несколько антигенов микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, где иммуногенная композиция содержит компоненты эукариотических клеток из указанной системы на основе эукариотических клеток. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки. Кроме того, согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин. Согласно следующему объекту изобретения все антигены микоплазм представляют собой инактивированные бактерины, предпочтительно инактивированные формалином бактерины.

Согласно следующему объекту изобретения антиген микоплазм получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, при этом указанные компоненты эукариотических клеток присоединены к антигену микоплазм.

Понятие "присоединен" относится к любому взаимодействию, ассоциации, связыванию, прикреплению или сшиванию указанных компонентов эукариотических клеток с антигеном микоплазм. Таким образом, понятие "присоединен" включает любые взаимодействия, включая косвенные и прямые, необратимые или обратимые, физические и химические, электростатические и/или ковалентные связи. Таким образом, должно быть очевидно, что компоненты эукариотических клеток, например, могут быть связаны с антигеном микоплазм. Однако следует понимать, что компоненты эукариотических клеток могут также быть сшиты с антигеном микоплазм. Указанное сшивание можно получать несколькими методами, известными специалисту в данной области, например, путем обработки формальдегидом и т.п.

Таким образом, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, полученная способом, заключающимся в том, что а) культивируют микоплазматическую бактерию, выбранную из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любых их комбинаций, в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки; б) получают антиген указанных микоплазматических бактерий и в) добавляют фармацевтически приемлемый носитель, где указанные компоненты эукариотических клеток присоединены к антигену микоплазм. Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция,

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae*; и один или несколько компонентов системы на основе эукариотических клеток. Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин.

Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является иммуногенная композиция, которая содержит один или несколько антигенов микоплазм *M. hyorhynis*, *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae*; и один или несколько компонентов системы на основе эукариотических клеток. Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Указанный цельный инактивированный бактерин можно получать с помощью методов инактивации, указанных в настоящем описании. Предпочтительно указанный цельный инактивированный бактерин представляет собой инактивированный формалином бактерин.

Настоящее изобретение относится также к способу иммунизации субъекта, заключающемуся в том, что вводят субъекту любую из иммуногенных композиций, указанных в настоящем описании.

Понятие "иммунизация" относится к активной иммунизации путем введения иммуногенной композиции подлежащему иммунизации субъекту, что приводит к иммунологическому ответу на антиген, включенный в указанную иммуногенную композицию.

Предпочтительно иммунизация приводит к уменьшению заболеваемости, связанной с конкретной микоплазматической инфекцией в стаде, или снижению серьезности клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с конкретной микоплазматической инфекцией.

Следующим объектом настоящего изобретения является способ иммунизации субъекта с помощью любой из иммуногенных композиций, представленных в настоящем описании, заключающийся в том, что вводят указанному субъекту иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении.

Указанная иммуногенная композиция содержит а) один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и один или несколько антигенов, выбранных из группы, состоящей из *M. hyorhynis* и *M. hyosynoviae* и их комбинаций; и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно следующему объекту изобретения иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, содержит а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae*; и б) фармацевтически приемлемый носитель. Согласно следующему объекту изобретения иммуногенная композиция содержит также один или несколько антигенов *M. hyorhynis*.

Если иммуногенную композицию получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, указанной в настоящем описании, то иммуногенная композиция, как правило, может содержать один или несколько антигенов микоплазматической бактерин, выбранной из группы, состоящей из *M. hyorhynis*, *M. hyorhynis*, *M. hyosynoviae* и любых их комбинаций, как дополнительно будет описано ниже. Согласно следующему объекту изобретения, указанному выше, указанная иммуногенная композиция может содержать один или несколько компонентов системы на основе эукариотических клеток в дополнение к одному или нескольким антигенам микоплазматической бактерин, выбранной из группы, состоящей из *M. hyorhynis*, *M. hyorhynis*, *M. hyosynoviae* и любой их комбинации.

Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм, применяемых для иммунизации субъекта, который нуждается в этом, представляют собой цельный инактивированный бактерин. Согласно этому объекту настоящего изобретения любой один из антигенов микоплазм представляет собой цельный инактивированный бактерин. Однако согласно этому объекту настоящего изобретения подразумевается также, что все антигены в иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, представляют собой цельные инактивированные бактерины, т.е. антиген *M. hyorhynis*, антиген *M. hyosynoviae* и/или антигены *M. hyorhynis* представляет(ют) собой цельные инактивированные бактерины. Указанные цельные инактивированные бактерины можно получать с помощью методов инактивации, которые указаны в настоящем описании. Предпочтительно указанные цельные инактивированные бактерины представляют собой инактивированные формалином бактерины.

Предпочтительно такая обработка приводит к уменьшению заболеваемости, связанной с конкретной микоплазматической инфекцией в стаде, или снижению серьезности клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с конкретной микоплазматической инфекцией.

Согласно следующему объекту изобретения иммунизация животного, нуждающегося в этом, иммуногенными композициями, представленными в настоящем описании, приводит к предупреждению заражения животного микоплазматической инфекцией. Еще более предпочтительно иммунизация приводит к эффективному длительному иммунологическому ответу против микоплазматической инфекции. Как должно быть очевидно, указанный период времени должен составлять более 2 месяцев, предпочтительно более 3 месяцев, более предпочтительно более 4 месяцев, более предпочтительно более 5 месяцев, более предпочтительно более 6 месяцев. Как должно быть очевидно, иммунизация не может обладать эффективностью в отношении всех иммунизированных животных. Однако согласно изобретению требуется,

чтобы значительная часть животных в стаде была эффективно иммунизирована.

Предпочтительно в данном контексте под стадом животных подразумеваются животные, у которых в норме, т.е. без иммунизации могут развиваться клинические признаки, которые, как правило, вызываются или ассоциированы с микоплазматической инфекцией. Специалист в данной области легко может определить являются ли животные в стаде эффективно иммунизированными. Предпочтительно иммунизация может рассматриваться как эффективная, если частота встречаемости или серьезность клинических признаков по меньшей мере у 33%, по меньшей мере у 50%, по меньшей мере у 60%, по меньшей мере у 70%, по меньшей мере у 80% или по меньшей мере у 90% особей данного стада снизились по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% по сравнению с животными, которых либо не иммунизировали, либо иммунизировали с использованием иммуногенной композиции, известной из уровня техники, существующего до создания настоящего изобретения, и после этого заражали конкретной микоплазматической бактерией.

В одном из объектов настоящего изобретения животное выбирают из группы, включающей свиней, крупный рогатый скот, кошек и собак. Таким образом, одним из объектов изобретения является способ иммунизации животного, заключающийся в том, что вводят животному иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении, где животное выбирают из группы, включающей свиней, крупный рогатый скот, кошек и собак.

Согласно одному из объектов настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят однократно. Таким образом, следующим объектом изобретения является способ иммунизации животного, заключающийся в том, что вводят животному иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении, в котором иммуногенная композиция обладает эффективностью в отношении снижения заболеваемости, связанной с конкретной микоплазматической инфекцией в стаде, или снижению серьезности клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с конкретной микоплазматической инфекцией, после введения одной дозы указанной иммуногенной композиции указанному животному. Очевидно, что указанную одну дозу вводят только один раз. Как продемонстрировано в примерах 2 и 3, установлено, что иммуногенная композиция, представленная в настоящем описании, обладает эффективностью после введение в виде одной дозы животному, которое нуждается в этом.

Так, когда указанный способ заключается в том, что вводят один или несколько антигенов *M. hyorhinis*, то указанная иммуногенная композиция является эффективной в отношении снижения заболеваемости, связанной инфекцией *M. hyorhinis* в стаде, или снижению серьезности клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с инфекцией *M. hyorhinis*. Когда указанный способ заключается в том, что вводят один или несколько антигенов *M. hyopneumoniae*, то согласно следующему объекту изобретения композиция является эффективной в отношении снижения заболеваемости, связанной инфекцией *M. hyopneumoniae* в стаде, или снижению серьезности клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с инфекцией *M. hyopneumoniae*. И в этом варианте один или несколько подлежащих введению согласно способу, предлагаемому в настоящем изобретении, антигенов микоплазм могут представлять собой цельные инактивированные бактерии представленных выше в настоящем описании видов микоплазм.

Предпочтительно одна доза имеет общий объем примерно до 0,5 до 2,5 мл, более предпочтительно примерно от 0,6 до 2,0 мл, еще более предпочтительно примерно от 0,7 до 1,75 мл, еще более предпочтительно примерно от 0,8 до 1,5 мл, еще более предпочтительно примерно от 0,9 до 1,25 мл, при этом наиболее предпочтительной является одна доза объемом 1,0 мл.

Однако иммуногенную композицию можно вводить два или большее количество раз, при этом первую дозу вводят до введения второй (бустерной) дозы. Предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 15 дней после первой. Более предпочтительно вторую дозу вводят через 15-40 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 17 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят через 17-30 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 19 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят через 19-25 дней после первой дозы. Наиболее предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 21 день после первой дозы. Согласно предпочтительному объекту изобретения применяют двухразовую схему введения, при этом первую и вторую дозы иммуногенной композиции вводят в одинаковом количестве. Предпочтительно каждая доза включает предпочтительное указанное выше количества, при этом наиболее предпочтительной является первая и вторая доза объемом 1 мл. Помимо схемы на основе первой и второй доз в альтернативном варианте осуществления изобретения предусматривается применение дополнительных последующих доз. Например, согласно этим объектам изобретения можно вводить третью, четвертую или пятую дозу. Предпочтительно при применении схем, включающих третью, четвертую и пятую дозу, их вводят в таком же количестве, что и первую дозу, с временными рамками между дозами, согласующимися с указанным выше проме-

жутком временем между введением первой и второй доз.

Иммуногенную композицию предпочтительно применяют местно или системно. Приемлемыми обычно применяемыми путями введения являются оральное или парентеральное введение, такое как интраназальное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, подкожное введение, а также введение путем ингаляции. Однако в зависимости от природы и механизма действия соединения иммуногенную композицию можно вводить также другими путями.

Как правило, когда применяют бактериальный антиген, такой как микоплазматический бактериин, иммуногенная композиция содержит от примерно 10^3 до примерно 10^{10} колониестимулирующих единиц (КОЕ) бактериального антигена на дозу, предпочтительно от примерно 10^4 до примерно 10^9 КОЕ бактериального антигена на дозу, более предпочтительно от примерно 10^5 до примерно 10^6 КОЕ бактериального антигена на дозу. Если в иммуногенной композиции применяют инактивированный бактериин, то величина КОЕ относится к количеству микоплазматических бактерий до инактивации.

Например, иммуногенную композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, которая содержит антигены *M. hyorheumoniae*, предпочтительно применяют в количествах, составляющих от примерно 10^2 до примерно 10^{10} КОЕ на дозу, предпочтительно от примерно 10^3 до примерно 10^9 КОЕ на дозу, еще более предпочтительно в количестве от примерно 10^4 до примерно 10^8 КОЕ на дозу, наиболее предпочтительно в количествах от примерно 10^5 до примерно 10^7 КОЕ на дозу. Иммуногенную композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, которая содержит антигены *M. hyorhinis*, предпочтительно применяют в количествах, составляющих от примерно 10^2 до примерно 10^{10} КОЕ на дозу, предпочтительно от примерно 10^3 до примерно 10^9 КОЕ на дозу, еще более предпочтительно в количестве от примерно 10^4 до примерно 10^8 КОЕ на дозу, наиболее предпочтительно в количествах от примерно 10^5 до примерно 10^7 КОЕ на дозу. Иммуногенную композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, которая содержит антигены *M. hyosynoviae*, предпочтительно применяют в количествах, составляющих от примерно 10^2 до примерно 10^{10} КОЕ на дозу, предпочтительно от примерно 10^3 до примерно 10^9 КОЕ на дозу, еще более предпочтительно в количестве от примерно 10^4 до примерно 10^8 КОЕ на дозу, наиболее предпочтительно в количествах от примерно 10^5 до примерно 10^7 КОЕ на дозу.

Таким образом, следующим объектом изобретения является способ иммунизации животного, заключающийся в том, что вводят животному иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении, в котором иммуногенная композиция обладает эффективностью в отношении снижения заболеваемости, связанной с конкретной микоплазматической инфекцией в стаде, или снижению серьезности клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с конкретной микоплазматической инфекцией, после введения одной дозы указанной иммуногенной композиции указанному животному, где указанная одна доза содержит от 10^2 до примерно 10^{10} КОЕ микоплазматических бактерий на дозу.

Одним из объектов настоящего изобретения является способ иммунизации животного, нуждающегося в этом, приводящий к повышению параметра эффективности, выбранного из группы, включающей укорочение продолжительности бактериемии, уменьшение бактериальной нагрузки, или их комбинацию в сравнении с животным из неиммунизированной контрольной группы этого же вида.

Понятие "укорочение продолжительности бактериемии" означает, что продолжительность бактериемии у животного, иммунизированного иммуногенной композицией, укорачивается по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 100% по сравнению с животными, которых не иммунизируют или которых иммунизируют иммуногенной композицией, известной из уровня техники, существовавшего до создания настоящего изобретения, и после этого заражают конкретной микоплазматической бактерией. Как должно быть очевидно, продолжительность бактериемии определяют с использованием репрезентативного количества животных в каждой группе (неиммунизированной и иммунизированной группе) перед их сравнением.

Понятие "уменьшение бактериальной нагрузки" означает, что бактериальная нагрузка микоплазматическими бактериями дикого типа у животного, инфицированного микоплазматическими бактериями дикого типа, снижается по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 100% после иммунизации иммуногенной композицией, предлагаемой в настоящем изобретении, по сравнению с животными, которых не иммунизируют или которых иммунизируют иммуногенной композицией, известной из уровня техники, существовавшего до создания настоящего изобретения, и после этого заражают конкретной микоплазматической бактерией. Как должно быть очевидно, бактериальную нагрузку определяют с использованием репрезентативного количества животных в каждой группе (неиммунизированной и иммунизированной группе) перед их сравнением.

Таким образом, следующим объектом настоящего изобретения является способ иммунизации животного, заключающийся в том, что вводят животному, нуждающемуся в этом, иммуногенную композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, что приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, включающей укорочение продолжительности бактериемии, уменьшение бактериальной нагрузки, или их комбинацию в сравнении с животным из неиммунизированной контрольной группы этого же вида.

Согласно одному из объектов настоящего изобретения способ можно применять для животного возрастом примерно 3 недели. Так, согласно одному из объектов изобретения в настоящем изобретении предложен способ иммунизации особи, заключающийся в том, что обрабатывают животное иммуногенной композицией, предлагаемой в изобретении, где способ можно применять для животного возрастом примерно 3 недели.

Важно отметить, что экспериментальные данные, представленные в настоящем изобретении, свидетельствуют об эффективности иммуногенной композиции для поросят возрастом примерно 3 недели.

Предпочтительно указанное животное следует иммунизировать в возрасте от 1 дня до 21 дня, более предпочтительно в возрасте от 1 дня до 10 дней, еще более предпочтительно в возрасте от 1 дня до 9 дней, еще более предпочтительно в возрасте от 1 дня до 8 дней, еще более предпочтительно в возрасте от 1 дня до 7 дней, еще более предпочтительно в возрасте от 1 дня до 6 дней, еще более предпочтительно в возрасте от 1 дня до 5 дней, еще более предпочтительно в возрасте от 1 дня до 4 дней, еще более предпочтительно в возрасте от 1 дня до 3 дней, еще более предпочтительно в возрасте от 1 или 2 дня и наиболее предпочтительно в возрасте 1 день.

Таким образом, одним из объектов изобретения является способ иммунизации животного, заключающийся в том, что вводят животному иммуногенную композицию, предлагаемую в изобретении, для иммунизации животного, нуждающегося в этом, где возраст подлежащего иммунизации животного составляет от 1 дня до 21 дня.

Настоящее изобретение относится также к любой иммуногенной композиции, представленной в настоящем описании, предназначенной для применения в любом из способов, представленных в настоящем описании, например, для применения для лечения и/или профилактики микоплазматических инфекций у животного или для применения для иммунизации животного против микоплазматической инфекции.

Указанная иммуногенная композиция содержит а) один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и один или несколько антигенов, выбранных из группы, состоящей из *M. hyorhynis* и *M. hyopneumoniae*, и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно следующему объекту изобретения иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, содержит а) один или несколько антигенов *M. hyorhynis* и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и б) фармацевтически приемлемый носитель. Согласно следующему объекту изобретения иммуногенная композиция содержит также один или несколько антигенов *M. hyopneumoniae*.

Если иммуногенную композицию получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, представленной в настоящем описании, то иммуногенная композиция, как правило, может содержать один или несколько антигенов микоплазматической бактерии, выбранной из группы, состоящей из *M. hyorhynis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любой их комбинации, что дополнительно будет описано ниже. Как описано выше, согласно другому объекту изобретения указанная иммуногенная композиция может содержать один или несколько компонентов системы на основе эукариотических клеток помимо одного или двух антигенов микоплазматических бактерий, выбранных из группы, состоящей из *M. hyorhynis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любой их комбинации.

Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм, применяемый(ых) для иммунизации субъекта, который нуждается в этом, представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Согласно этому объекту настоящего изобретения любой один антиген микоплазм представляет собой цельный инактивированный бактерин. Однако под этот объект настоящего изобретения подпадает также вариант, когда все антигены в иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, представляют собой цельные инактивированные бактерины, т.е. антиген *M. hyorhynis*, антиген *M. hyosynoviae* и/или антиген *M. hyopneumoniae*, представляет(ют) собой цельные инактивированные бактерины. Указанные цельные инактивированные бактерины можно получать с помощью методов инактивации, представленных в настоящем описании. Предпочтительно указанные цельные инактивированные бактерины представляют собой инактивированные формалином бактерины.

Предпочтительно указанное применение приводит к снижению заболеваемости, связанной с конкретной микоплазматической инфекцией в стаде, или снижению серьезности клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с конкретной микоплазматической инфекцией.

Настоящее изобретение относится также к применению иммуногенной композиции, представленной в настоящем описании, для лечения и/или профилактики микоплазматических инфекций у субъекта или для иммунизации субъекта против микоплазматической инфекции.

Указанная иммуногенная композиция содержит а) один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и один или несколько антигенов, выбранных из группы, состоящей из *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhynis* и их комбинаций; и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно следующему объекту иммуногенная композиция, предлагаемая в изобретении, содержит а) один или несколько антигенов *M. hyorhinis* и один или несколько антигенов *M. hyosynoviae* и б) фармацевтически приемлемый носитель. Согласно следующему объекту изобретения иммуногенная композиция содержит также один или несколько антигенов *M. hyopneumoniae*.

Если иммуногенную композицию получают в системе на основе эукариотических клеток с пониженным содержанием сыворотки, представленной в настоящем описании, то иммуногенная композиция, как правило, может содержать один или несколько антигенов микоплазматической бактерин, выбранной из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любой их комбинации, что дополнительно будет описано ниже. Как описано выше, согласно другому объекту изобретения указанная иммуногенная композиция может содержать один или несколько компонентов системы на основе эукариотических клеток помимо одного или нескольких антигенов микоплазматических бактерий, выбранных из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* и любой их комбинации.

Согласно следующему объекту изобретения один или несколько антигенов микоплазм, применяемый(ых) для иммунизации субъекта, который нуждается в этом, представляет(ют) собой цельный инактивированный бактерин. Согласно этому объекту настоящего изобретения любой один антиген микоплазм представляет собой цельный инактивированный бактерин. Однако под этот объект настоящего изобретения подпадает также вариант, когда все антигены в иммуногенной композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, представляют собой цельные инактивированные бактерины, т.е. антиген *M. hyorhinis*, антиген *M. hyosynoviae* и/или антигены *M. hyopneumoniae*, представляет(ют) собой цельные инактивированные бактерины. Указанные цельные инактивированные бактерины можно получать с помощью методов инактивации, представленных в настоящем описании. Предпочтительно указанные цельные инактивированные бактерины представляют собой инактивированные формалином бактерины.

Предпочтительно указанное применение приводит к снижению заболеваемости, связанной с конкретной микоплазматической инфекцией, в стаде, или снижению серьезности клинических признаков, вызываемых или ассоциированных с конкретной микоплазматической инфекцией.

Примеры

Приведенные ниже примеры даны только с целью иллюстрации настоящего изобретения. Они не должны рассматриваться, как ограничивающие каким-либо образом объем формулы изобретения.

Пример 1.

Культивирование микоплазматических бактерий в MDCK-клетках или McCoy-клетке соответственно.

А. Культивирование *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* и *M. hyopneumoniae* в МРСК-клетках.
M. hyorhinis.

Клетки MDCK, выращенные в T75-колбе(ах) до достижения конфлюэнтности, обрабатывали трипсином и пересевали в 5 T150-колб (расщепление 1:10), используя среду MEM + 5% FBS. Колбы инкубировали при 37°C + 5% CO₂ до достижения монослоем конфлюэнтности примерно 95-100%. Среду отбрасывали, колбы промывали дважды 1-кратным ЗФР. Затем в каждую колбу добавляли 4-5 мл *M. hyorhinis* (MOI=10-100). Давали пройти заражению в колбах в одинаковых условиях инкубации в течение периода времени, составляющего не менее 2 ч. После периода заражения в каждую колбу добавляли среду для инфицирования (MEM + 2% FBS), предварительно нагретую примерно до 37°C, в количестве, достаточном для достижения объема в каждой колбе 60 мл. Затем колбам давали пройти инкубацию до достижения > 90% ЦПД (примерно 3-7 дней). Затем собирали клеточную суспензию из каждой колбы и объединяли (пассаж n). Затем этот продукт использовали для заражения новых колб MDCK-клетками, достигшими 95-100% конфлюэнтности, используя такую же процедуру, что и для предыдущего заражения (пассаж n + 1), увеличивая количество колб, применяемых для достижения необходимого соответствующего конечного объема (пассаж n + 2, пассаж n + 3 и т.д.).

M. hyosynoviae.

M. hyosynoviae культивировали также как *M. hyorhinis* с несколькими модификациями: среда для инфицирования содержала DMEM + 2% FBS + 1% раствора аргинина; *M. hyosynoviae*, как правило, не характеризовалась ЦПД, поэтому изменение цвета и мутности среды являлись имеющим решающее значение индикатором для пересева с получением следующего пассажа.

M. hyopneumoniae.

M. hyopneumoniae культивировали таким же образом, что и *M. hyorhinis*. В зависимости от применяемого для заражения штамма ЦПД могло проявляться или отсутствовать. Поэтому изменение цвета и мутности среды можно использовать в качестве индикатора для пересева с получением следующего пассажа.

Б. Условия культивирования *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* и *M. hyopneumoniae* в McCoy-клетках.

M. hyorhinis.

McCoy-клетки выращивали в суспензионных культурах в перемешиваемых колбах в модифицированной среде EMEM, дополненной 10% FBS. Клетки пересевали в новые колбы так, чтобы конечная

концентрация составляла 10^5 - 10^6 клеток/мл. Для *M. hyorhinis* 500 мл клеток с концентрацией 10^5 - 10^6 клеток/мл высевали в 3-литровую колбу из расчета 10^7 - 10^8 КОЕ в 1 мл. Затем колбы инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ на магнитной мешалке в течение 3-7 дней. Мониторинг роста микоплазм осуществляли путем визуального определения изменения кислотности pH и повышения мутности. Рост микоплазм оценивали также путем анализа БОЕ для определения количеств.

M. hyosynoviae.

M. hyosynoviae культивировали также как *M. hyorhinis*. 500 мл клеток с плотностью 10^5 - 10^6 клеток/мл высевали в 3-литровую колбу из расчета 10^5 - 10^7 КОЕ в 1 мл. Затем колбы инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ на магнитной мешалке в течение примерно 2 недель. Для оценки роста определяли как изменение pH, так и повышение мутности, в дополнение к анализам БОЕ для оценки количеств.

M. hyopneumoniae.

M. hyopneumoniae культивировали таким же образом, что и *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae*. 500 мл клеток с концентрацией 10^5 - 10^6 клеток/мл высевали в 3-литровую колбу из расчета 10^5 - 10^7 КОЕ в 1 мл. Затем колбы инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ на магнитной мешалке в течение примерно 2 недель. Для оценки роста можно применять как определение изменения pH, так и повышения мутности в дополнение к анализам БОЕ для оценки количеств.

В. Культивирование различных видов микоплазм с различными типами сыворотки.

Для решения вопроса о том, можно ли культивировать виды микоплазм с использованием различных типов сыворотки различного происхождения, MDCK-клетки заражали *M. hyorhinis* и культивировали с использованием сыворотки плода коровы, свиной сыворотки, кроличьей сыворотки, куриной сыворотки или лошадиной сыворотки соответственно. Для каждого типа сыворотки культивирование *M. hyorhinis* в MDCK-клетках осуществляли согласно описанному выше методу (т.е. применяли 5% сыворотки для выращивания клеток и 2% сыворотки для заражения). MDCK-клетки собирали через 4 дня после заражения согласно стандартному методу. Анализ CCU (единица изменения цвета) осуществляли для определения титра живых *M. hyorhinis*. Кроме того, осуществляли qПЦР (количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени) для определения общего содержания генома (gc) *M. hyorhinis*. Результаты приведенного в качестве примера эксперимента представлены в табл. 1.

Таблица 1

Культивирование *M. hyorhinis* с использованием различных типов сыворотки

Тип сыворотки	qПЦР log (gc/мкл)	CCU ₅₀ (log/мл)
Сыворотка плода коровы	6,15	8,00
Свиная сыворотка	6,06	8,50
Кроличья сыворотка	6,11	8,33
Куриная сыворотки	6,31	8,00
Лошадиная сыворотка	6,49	9,00

В табл. 1 продемонстрировано, что титры, измеренные либо с помощью анализа CCU, либо с помощью qПЦР, оказались сходными при использовании различных типов сыворотки. Кроме того, данные, полученные методом вестерн-блоттинга (не представлены), подтвердили указанный результат. Таким образом, *M. hyorhinis* можно культивировать в MDCK-клетках независимо от того, какой тип сыворотки применяли для культивирования.

Пример 2.

Приготовление вакцин.

Когда последний пассаж был готов для сбора (наличие >90% ЦПД), осуществляли один цикл замораживания-оттаивания во всех колбах путем выдерживания их в морозильной камере при температуре < -60°C в течение >2 ч, быстрого оттаивания при 37°C, сбора и объединения лизатов, и пипетирования вверх и вниз до гомогенизации. Как правило, затем к этой суспензии добавляли 10-20% глицерина и гомогенизировали. Указанную суспензию разделяли на аликвоты рабочего объема. Маточные растворы хранили при температуре < -60°C до употребления.

Требуемые объемы указанных выше маточных растворов инактивировали с помощью 0,2% формалина. Избыток формалина нейтрализовали бисульфитом натрия в момент смешения вакцины. Вакцины смешивали с адьювантом Montanide™ ISA 207 VG или с адьювантом Carbopol®. Вакцины хранили при 2-7°C.

Пример 3.

Оценка эффективности вакцин.

Эффективность вакцин оценивали по их способности вызывать гуморальный иммунный ответ (а также по титру, определенному с помощью ELISA) после введения свиньям.

Уход за животными.

Перед началом эксперимента животные имели хорошее состояние здоровья и фон питания. Перед процедурой рандомизации и оценки осуществляли определение состояния здоровья. Во время эксперимента использовали немедицинский корм. Кормовой рацион соответствовал возрасту, состоянию и виду тестируемого животного согласно стандартной процедуре выращивания в производственных условиях.

Во время эксперимента животные имели свободный доступ к воде.

Оценка эффективности вакцин на основе *M. hyorhinis* и *M. hyorhineumoniae* после введения свиньям. *M. hyorhinis*.

Нормальным поросётам возрастом 6 недель $\pm$ 5 дней вводили внутримышечно дозу объемом 2 мл ($7,1-7,3 \log_{10}$ CCU/дозу) в день 0 (D0) и вновь в день 21 (D21) вакцины на основе *M. hyorhinis*. *M. hyorhinis* культивировали в MDCK-клетках согласно описанному выше методу. В вакцину добавляли адъювант Монтанид ISA207VG или CARBOPOL®. В качестве плацебо использовали ЗФР. Общее состояние здоровья поросётов оценивали ежедневно. Образцы крови собирали перед вакцинацией в D0, и в дни 7, 14, 21, 28, 35 и 42. Сыворотку тестировали в отношении специфических в отношении *M. hyorhinis* антител с помощью непрямого ELISA фирмы BIVI R&D. При применении ELISA фирмы BIVI R&D соотношение S/P > 0,200 рассматривали как положительное.

Как продемонстрировано в табл. 2, по данным ELISA *M. hyorhinis* вызывал сильный гуморальный иммунный ответ. 6/6 (100%) животных, вакцинированных *M. hyorhinis*-MDCK + Монтанид ISA207VG оказались позитивными через 2 недели после обработки первой дозой (D14). Все животные оставались позитивными вплоть до D42, при этом повышение титров обнаружено после применения второй дозы (D28). У животных, вакцинированных *M. hyorhinis*-MDCK + Carbopol®, также обнаружен гуморальный иммунный ответ.

Таблица 2
Полученные с помощью ELISA результаты для *M. hyorhinis*

	До вакцинации	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
<i>M. hyorhinis</i> MDCK + Монтанид ISA207VG	0,00	0,003	0,043	0,972	1,123	1,340	1,152	1,133
<i>M. hyorhinis</i> MDCK + CARBOPOL®	0,002	0,018	0,059	0,095	0,122	0,354	0,375	0,409
Плацебо (ЗФР)	0,001	0,005	0,011	0,015	0,021	0,031	0,057	0,070

Аналогичные результаты, касающиеся гуморального иммунного ответа после вакцинации, получали при культивировании *M. hyorhinis* в McCoу-клетках (данные не представлены). Кроме того, аналогичные результаты, касающиеся гуморального иммунного ответа после вакцинации, получали при обработке поросётов возрастом 3 недели $\pm$ 5 дней (данные не представлены). Аналогичные результаты получали после однократной обработки (данные не представлены).

M. hyorhineumoniae.

Нормальным поросётам возрастом 6 недель $\pm$ 5 дней вводили внутримышечно дозу объемом 2 мл ($8,0-8,5 \log_{10}$ CCU/дозу) в D0 и вновь в D21 вакцину на основе *M. hyorhineumoniae*. В вакцину добавляли адъювант Монтанид ISA207VG. В качестве плацебо использовали ЗФР. Общее состояние здоровья поросётов оценивали ежедневно. Образцы крови собирали перед вакцинацией в D0, и в дни 7, 14, 21, 28, 35 и 42 для тестирования в отношении присутствия антител к *M. hyorhineumoniae*. В примере, результаты которого представлены в табл. 3, применяли поступающий в продажу набор для ELISA фирмы IDEXX в отношении присутствия антител к. При применении ELISA фирмы соотношение S/P > 0,400 рассматривали как положительное.

Как продемонстрировано в табл. 3, по данным ELISA *M. hyorhineumoniae* вызывала сильный гуморальный иммунный ответ. Из вакцинированных *M. hyorhineumoniae* MDCK + ISA207 животных 3/6 (50%) оказались позитивными в D14 и 5/6 (83,3%) в D21, а 6/6 (100%) оказались позитивными в D28, 35 и 42.

Таблица 3
Полученные с помощью ELISA фирмы IDEXX результаты для *M. hyorhineumoniae*

	До вакцинации	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
<i>M. hyorhineumoniae</i> MDCK + Монтанид ISA207VG	-0,024	-0,022	0,034	0,601	0,949	1,775	1,986	1,895
Плацебо (ЗФР)	-0,019	0,011	-0,021	-0,015	-0,025	-0,025	0,016	0,016

Аналогичные результаты получали после однократной обработки (данные не представлены).

Пример 4.

Эффективность вакцин, полученных из микоплазматических бактерий, которые культивировали в линии эукариотических клеток, в сравнении с вакцинами, полученными из микоплазматических бактерий, которые культивировали в бесклеточной системе 54 животных линии CD/CD возрастом 8 недель $\pm$ 5 дней разделяли на 6 групп. Каждую из групп V1 и V2 обрабатывали инактивированным изолятом *M. hyorhinis*, который культивировали в MDCK-клетках и среде CM (комплексная среда; например, среда на основе протеозного пептона, содержащая свиную сыворотку и дрожжевой экстракт, или среда Фриза) соответственно; группу V3 и V4 обрабатывали инактивированным изолятом *M. hyorhinis*, который культивировали в MDCK-среде и CM соответственно. Во все вакцины в качестве адъюванта добавляли Монтанид ISA207VG; доза и путь соответствовали схеме 2x2 мл, дозы вводили путем внутримышечной инъекции одной дозы в D0, а второй дозы в D21. Группу CC (контрольная группа) обрабатывали плацебо без антигена (ЗФР) согласно такой же схеме. Группу SC (строгий контроль) не обрабатывали в течение эксперимента, эти животные служили в качестве строгого контроля. В D42, 43 и 44 поросёты в группах V1-

V4 и СС подвергали контрольному заражению вирулентным изолятом *M. hyorhinis*. Доза и путь соответствовали схеме: 40 мл внутривенно, 15 мл внутривенно и 15 мл интраназально соответственно. Образцы крови собирали еженедельно, начиная с D0, и до окончания эксперимента (D58) для тестирования с помощью специфического для *M. hyorhinis* ELISA. При применении ELISA фирмы R&D соотношение S/P > 0,200 рассматривали как положительное. Все поросята в SC-группе оставались негативными в течение эксперимента, что свидетельствовало об отсутствии экспозиции *M. hyorhinis*. Группы V I-V4 и СС были негативными в D0 и 7. Однако серологические результаты варьировались в значительной степени между вакцинами на основе СМ и на основе MDCK. По сравнению с вакцинами на основе СМ для вакцин на основе MDCK обнаружено более раннее начало сероконверсии, большее количество серопозитивных свиней и более высокие серологические титры.

Таблица 4

Полученные с помощью ELISA результаты для *M. hyorhinis*

<i>M. hyorhinis</i> , ELISA, средние соотношения S/P в группе									
Группа	D0	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-СМ (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-СМ (V4)	0,003	0,011	0,017	0,047	0,298	0,299	0,263	0,704	0,608
Плацебо (CC)	0,004	0,004	0,009	0,023	0,021	0,029	0,031	0,262	0,433
Строгий контроль (SC)	-0,003	-0,002	-0,003	0,005	0,008	0,015	0,021	0,031	0,060

Кроме того, осуществляли эксперименты по титрованию для сравнения вакцин, полученных с помощью клеточных культур, с вакцинами на основе микоплазматических бактерий, культивируемых в бесклеточной системе.

M. hyorhinis культивировали в McCoу-клетках согласно описанному выше методу или культивировали в СМ (комплексная среда) соответственно.

Приготавливали вакцины с антигеном, полученным с использованием McCoу, применяя неразведенный антиген (полный), антиген, разведенный в соотношении 1:10, и антиген, разведенный в соотношении 1:100, все смешанные в соотношении 1:1с применяемым в качестве адъюванта Монтанидом ISA207VG. Аналогичным образом приготавливали вакцины с использованием полученного в СМ антигена.

Свиней (возраст в момент вакцинации составлял 3 недели) вакцинировали, используя одну дозу объемом 2 мл, которую вводили ИМ в день 0.

Как продемонстрировано в табл. 5, перед контрольным заражением (D0-D21) все группы в среднем рассматривались как "негативные", хотя в группе "McCoу+ISA "полный" (антиген)" и "McCoу+ISA 1:10" обнаружены ответы, имеющие тенденцию к позитивности. Через 1 неделю после контрольного заражения (D28) обнаружен ответ во всех вакцинированных группах, кроме группы "СМ+ ISA 1:100".

Из табл. 5 очевидно, что для каждого типа антигена (McCoу, СМ) обнаружен стандартный титрационный эффект ("полный">1:10>1:100). Кроме того, в табл. 5 продемонстрировано, что животные из группы "McCoу+ISA "полный"" и "McCoу+ISA 1:10" имели более высокие средние баллы, по сравнению с группой, обработанной "СМ+ ISA "полный", и эта особенность сохранялась до окончания опыта в D42. Группы с позитивными (S/P ≥ 0,200) средними значениями после контрольного заражения представляли собой группы "McCoу+ "полный" и "McCoу+1:10". При применении вакцин "McCoу+ "полный" и "McCoу+1:10" получен более высокий серологический ответ по сравнению с вакциной "СМ+ "полный" как до контрольного заражения, так и после контрольного заражения. Кроме того, у животных, вакцинированных "McCoу+ 1:100", также обнаружен ответ, отличающийся от ответа в обработанной плацебо (невакцинированной) группе и группе "СМ+ 1:100" (ответ в группе, обработанной "СМ+ 1:100" или его отсутствие оказались эквивалентными с ответом у невакцинированных животных). Эксперименты по титрованию продемонстрировали, что вакцины на основе клеточных культур обеспечивали лучшие серологические результаты по сравнению с вакцинами из микоплазматических бактерий, культивируемых в бесклеточной системе.

Таблица 5

Полученные с помощью ELISA результаты для *M. hyorhinis*

<i>M. hyorhinis</i> , ELISA, средние соотношения S/P в группе							
Группа	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
McCoу + ISA «полный»	0,002	0,012	0,032	0,117	0,312	0,298	0,325
McCoу + ISA 1:10	0,000	0,005	0,065	0,107	0,291	0,193	0,221
McCoу + ISA 1:100	0,001	0,001	-0,001	0,000	0,145	0,118	0,150
CM + ISA «полный»	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
Плацебо: 3ФР + ISA	-0,001	0,002	-0,002	-0,002	0,021	0,039	0,081
Строгий контроль	-0,002	-0,001	-0,002	-0,002	-0,002	0,008	0,024

Пример 5.

Эффективность мультвалентной вакцины, содержащей антиген *M. hyosynoviae*, *M. hyorheumoniae* и *M. hyorhinis*.

В этом опыте 15 CD/CD-животным возрастом 11 недель $\pm$ 5 дней вводили однократно дозу объемом 2 мл, IM, трехвалентной прототипической комбинированной вакцины *Mycoplasma*. Вакцина состояла из инактивированной *M. hyorhinis*, инактивированной *M. hyorheumoniae* и инактивированной *M. hyosynoviae*. Все виды культивировали в MDCK-клетках. В вакцину добавляли в качестве адъюванта Монтанид ISA207VG. Образцы крови отбирали еженедельно, начиная со дня 0 и до дня 28. Мониторинг уровней антител в сыворотке осуществляли с помощью предназначенного для оценки *M. hyorhinis* ELISA фирмы BIVI R&D и предназначенного для оценки *M. hyorheumoniae* ELISA фирмы IDEXX. Никакой серологический анализ, пригодный для оценки *M. hyosynoviae*, не был известен к моменту проведения данного эксперимента.

Для *M. hyorhinis* с помощью ELISA продемонстрирован сильный гуморальный иммунный ответ через 2 недели после вакцинации (D14), при этом 11/15 (73,3%) были позитивными, а 15/15 (100%) были позитивными к D21.

Для *M. hyorheumoniae* с помощью ELISA фирмы IDEXX продемонстрировано, что 4 свиньи были позитивными (S/P > 0,400) по антителам к *M. hyorheumoniae* в D0. Если этих четырех свиней исключить, то пять других свиней оказались сероконвертированными к *M. hyorheumoniae* к D28. Три из этих пяти свиней оказались позитивными в D21.

Таблица 6

Полученные с помощью ELISA результаты для *M. hyorhinis*

<i>M. hyorhinis</i> , ELISA, средние соотношения S/P в группе				
D0	D7	D14	D21	D28
0,043	0,050	0,406	0,873	0,866

Таблица 7

Полученные с помощью ELISA фирмы IDEXX результаты для *M. hyorheumoniae*

<i>M. hyorheumoniae</i> , ELISA фирмы IDEXX, средние соотношения S/P в группе				
D0	D7	D14	D21	D28
0,294	0,255	0,259	0,287	0,421

Результаты, полученные для *M. hyorhinis*, свидетельствуют об отсутствии интерференции с другими фракциями в вакцине. Кроме того, уровни антигена *M. hyorhinis*, присутствующие в комбинированной вакцине, применяемой в данном эксперименте, являлись достаточными для индукции поддающегося измерению гуморального иммунного ответа после введения одной дозы объемом 2 мл. Результаты, полученные для *M. hyorheumoniae*, свидетельствуют о некоторой сероконверсии. Возможно, что в последующих исследованиях целесообразно применять в смеси более высокие уровни этой фракции для увеличения сероконверсии. Таким образом, результаты, касающиеся фракцией *M. hyorhinis* и *M. hyorheumoniae*, свидетельствуют об отсутствии интерференции между этими видами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения иммуногенной композиции, содержащей цельные инактивированные бактерии *M. hyorhinis* и/или *M. hyorheumoniae* и один или более фрагментов эукариотических клеток, где способ включает:

- а) культивирование микоплазматических бактерий, выбранных из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyorheumoniae* и их комбинации, в системе эукариотических клеток MDCK или McCoу в среде, содержащей до 10% сыворотки;
- б) выделение лизата клеток и его гомогенизацию;
- в) инактивацию бактеринов;

- г) добавление адьюванта.
2. Способ по п.1, в котором бактерины микоплазм представляют собой бактерины *M. hyorhinis*.
3. Способ по п.1, в котором бактерины микоплазм представляют собой бактерины *M. hyopneumoniae*.
4. Способ по п.1, в котором бактерины микоплазм представляют собой бактерины *M. hyorhinis* и *M. hyopneumoniae*.
5. Способ по любому из пп.1-4, в котором сыворотка не является свиной.
6. Способ по любому из пп.1-5, где иммуногенная композиция содержит компоненты эукариотических клеток из указанной системы на основе эукариотических клеток.
7. Способ по любому из пп.1-6, в которой цельные инактивированные бактерины представляют собой инактивированные формалином бактерины.
8. Иммуногенная композиция для лечения или профилактики микоплазматических инфекций, вызванных *M. hyorhinis* и/или *M. hyopneumoniae*, которая содержит а) один или несколько антигенов микоплазм из микоплазматических бактерий, выбранных из группы, состоящей из *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* и их комбинации; и б) один или несколько фрагментов эукариотических клеток MDCK или McCoу, где антигены микоплазмы являются цельными инактивированными бактеринами.
9. Иммуногенная композиция по п.8, в которой антиген микоплазм представляет собой антигены *M. hyorhinis*.
10. Иммуногенная композиция по п.8 или 9, в которой антиген микоплазм представляет собой антигены *M. hyopneumoniae*.
11. Иммуногенная композиция по п.8 или 9, в которой антиген микоплазм представляет собой антигены *M. hyorhinis* и *M. hyopneumoniae*.
12. Иммуногенная композиция по любому из пп.8-11, где компоненты системы на основе эукариотических клеток включают сыворотку.
13. Иммуногенная композиция по любому из пп.8-12, в которой сыворотка не является свиной.
14. Иммуногенная композиция по любому из пп.8-13, в которой цельные инактивированные бактерины представляют собой инактивированные формалином бактерины.
15. Иммуногенная композиция по любому из пп.9, 11-14, где иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике микоплазматических инфекций, вызываемых *M. hyorhinis*, у субъекта, который нуждается в этом.
16. Иммуногенная композиция по любому из пп.10-15, где иммуногенная композиция обладает эффективностью при лечении и/или профилактике микоплазматических инфекций, вызываемых *M. hyopneumoniae*, у субъекта, который нуждается в этом.
17. Иммуногенная композиция по п.16, где указанный субъект выбран из группы, состоящей из свиней, крупного рогатого скота, кошек и собак.
18. Иммуногенная композиция по любому из пп.8-17, где указанная иммуногенная композиция представляет собой вакцину.
19. Иммуногенная композиция по любому из пп.8-18, выполненная в виде формы для однократного введения.
20. Иммуногенная композиция по любому из пп.8-19, в которой дополнительный фармацевтически приемлемый носитель выбран из группы, состоящей из растворителей, дисперсионных сред, агентов для нанесения покрытий, стабилизаторов, разбавителей, консервантов, агентов, придающих изотоничность, замедляющих адсорбцию агентов, адьювантов и их комбинаций.
21. Иммуногенная композиция по любому из пп.8-20, в которой указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой Монтанид или Карбопол.
22. Иммуногенная композиция по любому из пп.8-21, в которой указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой эмульсию вода-в масле-в воде или карбомер.
23. Способ лечения и/или профилактики микоплазматических инфекций у субъекта, включающий введение указанному субъекту иммуногенной композиции по любому из пп.8-22.
24. Способ по п.23, в котором указанного субъекта выбирают из группы, состоящей из свиней, крупного рогатого скота, кошек и собак.
25. Способ по п.23 или 24, в котором иммуногенную композицию вводят однократно.
26. Способ по любому из пп.23-25, где способ можно применять для субъекта возрастом три недели или старше.
27. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.8-22 для лечения и/или профилактики микоплазматических инфекций у субъекта, вызванных *M. hyorhinis* и/или *M. hyopneumoniae*.
28. Иммуногенная композиция по любому из пп.8-22, предназначенная для применения в способе лечения и/или профилактики микоплазматических инфекций у субъекта, вызванных *M. hyorhinis* и/или *M. hyopneumoniae*.

