

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390385** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.17

(22) Дата подачи заявки
2021.07.22

(51) Int. Cl. *A61K 39/04* (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ СВИНАЯ ВАКЦИНА

(31) 63/055,947; 20196349.3

(32) 2020.07.24; 2020.09.16

(33) US; EP

(86) PCT/US2021/042778

(87) WO 2022/020593 2022.01.27

(88) 2022.02.24

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ЭНИМАЛ ХЕЛС Ю-ЭС-ЭЙ ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:

**Диас Эдгар, Клайн Грег Стюарт,
Кролл Джереми, Лейте Фернандо
Лопес Лейвас, Руф Майкл Б., Стейлен
Майк Алан (US)**

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение касается вакцины, включающей антиген *Lawsonia intracellularis* и один или несколько антигенов по меньшей мере еще одного патогена, выбранного из группы, к которой относятся цирковирус свиней (ЦВС), *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo.) и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (ВРПС), причем антиген *Lawsonia intracellularis* является живым *Lawsonia intracellularis*.

A1

202390385

202390385

A1

КОМБИНИРОВАННАЯ СВИНАЯ ВАКЦИНА

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ И ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ

Настоящим делается ссылка на Публикации РСТ №№ WO 96/39629, WO 05/011731, WO 06/012949, WO 06/020730, WO 06/099561, WO 07/011993, WO 07/076520, WO 07/140244, WO 08/073464, WO 09/037262, WO 09/127684, WO 09/144088, WO 2011/054951, WO 2015/082457, WO 2015/082458, WO 2015/082465, WO 2016/124620, WO 2016/124623, WO 2017/068126, WO 2017/162741, WO 2018/189290, WO 2018/115435 и WO 2019/166362, и на Международную патентную заявку под серийным номером РСТ/US2020/026930, поданную 6 апреля 2020 г.

Предыдущие заявки и все документы, упомянутые в них или в процессе их рассмотрения (“приведенные в заявке документы”), и все документы, приведенные или упомянутые в качестве ссылки в приведенных в заявке документах, и все документы, приведенные или упомянутые здесь в качестве ссылки (“приведенные здесь документы”), и все документы, приведенные или упомянутые в качестве ссылки в приведенных здесь документах, вместе с любыми инструкциями производителей, описаниями, техническими характеристиками изделий и технологическими картами для любых продуктов, упомянутых в этом документе или в любом документе, включенном в него путем ссылки, настоящим включаются в этот документ путем ссылки и могут применяться в практическом осуществлении изобретения. Более конкретно, все упомянутые в качестве ссылки документы включены путем ссылки в такой же мере, как если бы каждый отдельный документ был конкретно и отдельно указан как включенный путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторами настоящего изобретения раскрывается комбинированная свиная вакцина, включающая антиген *Lawsonia intracellularis*, антиген цирковируса свиней (ЦВС), антиген *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo.*) и антиген вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (ВРРС), способы ее производства и ее применение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Lawsonia intracellularis, возбудитель пролиферативной энтеропатии свиней ("ПЭС"), поражает практически всех животных, включая человека, кролика, хорька, хомяка, лисицу, лошадь и других животных, вплоть до страусов и эму, и особенно большие потери причиняет поголовью свиней. Неизменной особенностью ПЭС является возникновение внутрицитоплазматических немембраносвязанных изогнутых бацилл в пределах энтероцитов в пораженных частях кишечника. Бактерии, связанные с ПЭС, называют "кампилобактероподобными организмами". S. McOrist et al., Vet. Pathol., Vol. 26, 260 - 64 (1989). Впоследствии бактерии-возбудители были идентифицированы как новый таксономический род и вид, называемый среди специалистов Peal symbiont (IS) *intracellularis*. C. Gebhart et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, No. 3, 533 - 38 (1993). Этим новым бактериям было присвоено новое таксономическое название *Lawsonia (L.) intracellularis*. S. McOrist et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, No. 4, 820 - 25 (1995). Эти три названия употребляли взаимозаменяемо в отношении одного и того же организма как он идентифицирован и описан здесь далее.

Тип цирковируса свиней (ЦВС) представляет собой безоболочечный икосаэдрический вирус одноцепочечной ДНК (оцДНК), относящийся к роду *Circovirus* семейства *Circoviridae*. Геном кодирует две главные открытые рамки считывания (ОРС), причем ОРС1 кодирует связанный с репликацией белок (rep), а ОРС2 кодирует вирусный капсидный (cap) белок, который определяет антигенные характеристики вируса. ЦВС2 имеет приблизительно 80 % идентичности последовательностей с цирковирусом свиней типа 1 (ЦВС1). Однако в отличие от ЦВС1, который, как правило, не вирулентен, у свиней, инфицированных ЦВС2, обнаруживается синдром, общеизвестный как мультисистемный синдром истощения после отъема (PMWS). ЦВС3 является генетически отличным от цирковируса свиней типа 2 (ЦВС2); так, существует лишь 48 % идентичности аминокислот в гене *rep* и 26 % идентичности аминокислот в гене *cap* между двумя вирусами.

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyo.*) представляет собой малую бактерию (400 - 1200 нм), относящуюся к семейству *mycoplasmataceae*. *M. hyo.* Связана с энзоотической пневмонией, респираторным заболеванием свиней, обычно наблюдаемым у растущих свиней и свиней в заключительной стадии откорма. *M.*

hуо. поражает реснички эпителиальных клеток трахей и легких, вызывая прекращение двигательной активности ресничек (цилиостаз) и в итоге приводя к складыванию участков легких. *М. hуо.* считают первичным патогеном, способствующим проникновению ВРРСС и других респираторных патогенов в легкие. Геномы отдельных штаммов, 232, J и 7448, были секвенированы (Minion et al., J. Bacteriol. 186: 7123 - 33, 2004; Vasconcelos et al., J. Bacteriol. 187: 5568 - 77, 2005 and Han et al., Genome Announc. 2017 Sep; 5(38): e01012 - 17).

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) многими рассматривается как наиболее значительное заболевание, в настоящее время наносящее урон свиноводству во всем мире. Вирус РРСС (ВРРСС) представляет собой вирус оболочечной одноцепочечной РНК, относящийся к семейству *Arteriviridae*. Антигенные характеристики различных изолятов ВРРСС сильно разнятся, а эффективные меры по профилактике инфекций ограничены. Существуют три главные группы доступных вакцин для РРСС: ослабленный модифицированный живой вирус (МЖВ), битая вирусная вакцина или рекомбинантные вакцины. Вирусные оболочечные белки ВРРСС в целом разделяют на мажорные и минорные белки в зависимости от содержания белков в вирионе. Мажорными вирусными оболочечными белками являются *gp5* (ОРС 5) и *М* (ОРС 6) и образуют димер. Минорными оболочечными белками являются *gp2* (ОРС2), *gp3* (ОРС3), *gp4* (ОРС4) и *Е* (ОРС2b) и, возможно, недавно идентифицированный вирусный белок *gp5a* (ОРС 5a). Активный антигенный компонент может включать ОРС4, ОРС5, ОРС6 или ОРС7 из вируса ВРРСС.

По-прежнему существует потребность в новых режимах иммунизации животных против вышеупомянутых патогенов.

Таким образом, техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, состоит в обеспечении дополнительных средств и способов иммунизации животных против патогенов. Проблему решают и вышеупомянутые потребности удовлетворяют путем обеспечения вариантов осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения и представленных в этом описании ниже.

Ссылки или указания на какой-либо документ в этой заявке не означают признание такого документа источником существующего уровня техники по отношению к настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение касается вакцины, включающей антиген *Lawsonia intracellularis* и один или несколько антигенов по меньшей мере еще одного патогена, выбранного из группы, к которой относятся цирковирс свиней (ЦВС), *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo.*) и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (ВРРСС), причем антиген *Lawsonia intracellularis* является живым *Lawsonia intracellularis*.

Соответственно, в возможном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и антиген ЦВС.

Таким образом, в возможном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2.

В возможном варианте вакцина также включает живой *Lawsonia intracellularis* и антиген *M. hyo.*

Таким образом, в возможном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и бактериин *M. hyo.*

В возможном варианте вакцина также включает живой *Lawsonia intracellularis* и антиген ВРРСС.

Таким образом, в возможном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и ослабленный вирус ВРРСС.

В возможном варианте вакцина также включает живой *Lawsonia intracellularis*, антиген ЦВС и антиген *M. hyo.*

Таким образом, в возможном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2 и бактериин *M. hyo.*

В возможном варианте вакцина также включает живой *Lawsonia intracellularis*, антиген ЦВС и антиген ВРРСС.

Таким образом, в возможном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2 и ослабленный вирус ВРРСС.

В возможном варианте вакцина также включает живой *Lawsonia intracellularis*, антиген ВРРСС и антиген *M. hyo.*

Таким образом, в возможном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и ослабленный вирус ВРРСС и бактериин *M. hyo.*

В возможном варианте вакцина также включает живой *Lawsonia intracellularis*, антиген ЦВС, антиген *M. hyo.* и антиген РРСС.

Таким образом, в возможном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2 и бактерин *M. hyo.* и ослабленный вирус ВРРСС.

В предпочтительном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и антиген ЦВС.

В более предпочтительном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и антиген ЦВС2.

В более предпочтительном варианте вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и рекомбинантный полипептид ЦВС2.

В особенно предпочтительном варианте осуществления вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Pleitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®. Термин “живой *Lawsonia intracellularis*” охватывает “аттенюированный живой *Lawsonia intracellularis*” и “ослабленный *Lawsonia intracellularis*”.

В возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает дозу *Lawsonia intracellularis* приблизительно от 10^3 до 10^9 бактерий/кг массы тела, предпочтительно приблизительно от 10^5 до 10^7 бактерий/кг массы тела. В возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением также включает дозу антигена *Lawsonia intracellularis* от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^7 бактерий *Lawsonia intracellularis*.

В возможном варианте антиген *Lawsonia intracellularis* лиофилизируют. В предпочтительном варианте антиген *Lawsonia intracellularis* является антигеном, включенным в Enterisol® Pleitis.

В возможном варианте антиген ЦВС вакцины в соответствии с настоящим изобретением является антигеном ЦВС1, ЦВС2 или ЦВС3. В предпочтительном варианте антиген ЦВС является антигеном ЦВС2. В возможном варианте антиген ЦВС является рекомбинантным полипептидом. В возможном варианте вышеупомянутый рекомбинантный полипептид экспрессируется геном ОРС ЦВС. В предпочтительном варианте ген ОРС ЦВС является геном ОРС ЦВС2. В возможном варианте рекомбинантный полипептид ЦВС экспрессируется в клетках бакуловируса. В предпочтительном варианте антиген ЦВС является антигеном, включенным в Ingelvac CircoFLEX® или антигеном ЦВС, включенным в 3FLEX®. В вакцине в соответствии с настоящим изобретением

возможна доза антигена ЦВС от приблизительно 2 мкг до приблизительно 400 мкг.

В возможном варианте антиген *M. hyo.* вакцины в соответствии с настоящим изобретением является супернатантом и/или бактерином. Подробное описание супернатанта и бактериона представлено авторами ниже. В предпочтительном варианте антиген *M. hyo.* является антигеном *M. hyo.*, включенным в Ingelvac MycoFLEX®, или антигеном *M. hyo.*, включенным в 3FLEX®.

В возможном варианте антиген ВРРСС вакцины в соответствии с настоящим изобретением является живым вирусом ВРРСС. В возможном варианте вышеупомянутый живой вирус является модифицированным и/или ослабленным вирусом. В возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает дозу антигена ВРРСС от приблизительно 10^1 до приблизительно 10^7 вирусных частиц на дозу, предпочтительно от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^5 частиц на дозу, более предпочтительно от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^5 частиц на дозу. В возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает дозу антигена ВРРСС от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^7 вирусных частиц на дозу. В возможном варианте антиген ВРРСС является лиофилизированным. В предпочтительном варианте антиген ВРРСС является антигеном ВРРСС, включенным в МЖВ ВРРСС Ingelvac® или антигеном ВРРСС, включенным в 3FLEX®.

В возможном варианте антиген ЦВС, антиген *M. hyo.* и антиген ВРРСС являются антигенами, включенными в 3FLEX®.

В возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением является лиофилизированным антигеном *Lawsonia intracellularis*, растворенным в 3FLEX®. Соответственно, вакцина в соответствии с настоящим изобретением в возможном варианте является лиофилизированным живым *Lawsonia intracellularis*, растворенным в 3FLEX®. Кроме того, вакцина в соответствии с настоящим изобретением в возможном варианте является Enterisol® Ileitis, растворенным в 3FLEX®.

В одном возможном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением также включает фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель. В одном возможном варианте осуществления вакцина в соответствии с

изобретением также включает один или несколько адъювантов. Подходящие адъюванты известны специалистам в данной области техники, и их неограничивающие примеры описаны авторами изобретения. В возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает в

5 качестве адъюванта один или несколько полимеров акриловой или метакриловой кислоты; сополимер малеинового ангидрида и алкенильного производного; полимер акриловой или метакриловой кислоты, который является сшитым; полимер акриловой или метакриловой кислоты, который является сшитым с полиалкениловым эфиром сахара или полиспирта; карбомер; акриловый

10 полимер, сшитый с полиоксисоединением, имеющим по меньшей мере 3 и не более 8 гидроксильных групп с атомами водорода по меньшей мере трех гидроксильных, необязательно замененных ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими по меньшей мере 2 атома углерода, причем вышеупомянутые радикалы содержат от 2 до 4 атомов углерода, такие как

15 винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы, и ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие как метил; Carbopol®; Carbopol® 974P; Carbopol® 934P; Carbopol® 971P; Carbopol® 980; Carbopol® 941P; ImpranFLEX®; гидроксид алюминия; фосфат алюминия; сапонин; Quil A; QS-21; GPI-0100; эмульсию типа "вода в масле"; эмульсию типа

20 "масло в воде"; эмульсию типа "вода в масле в воде"; эмульсию на основе легкого жидкого парафинового масла или адъюванта, соответствующего требованиям Европейской фармакопеи; изопреноидное масло; сквалан; скваленовое масло, полученное в результате олигомеризации алкенов или изобутена или децена; сложный(е) эфир(ы) кислоты (кислот) или спирта(ов),

25 которые содержат линейную алкильную группу; растительное(ые) масло(а); этилолеат; пропиленгликольди-(каприлат/капрат); глицерилтри-(каприлат/капрат); пропиленгликольдиолеат; сложный(е) эфир(ы) разветвленной(ых) жирной(ых) кислоты (кислот) или спирта(ов); сложный(е) эфир(ы) изостеариновой кислоты; неионное(ые) поверхностно-активное(ые)

30 вещество(а); сложный(е) эфир(ы) сорбита или маннита или гликоля или полиглицерина или пропиленгликоля или олеиновой, или изостеариновой кислоты или рициноленовой кислоты или гидроксистеариновой кислоты, необязательно этоксилированной, ангидроманнитолата; блоксополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, продукт Pluronic, адъювантная система

RIBI; блоксополимер; SAF-M; монофосфорил-липид А; адъювант авридин липид-амин; термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой); холерный токсин; IMS 1314, или мурамилдипептид.

В предпочтительном варианте адъювант является карбомером. В
5 возможном варианте адъювантом предпочтительно является ImgranFLEX® и/или Carbopol®.

В возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением предусмотрена в форме для системного введения.

В возможном варианте вакцину в соответствии с настоящим изобретением
10 рецептируют и/или упаковывают для одноклового или одноразового введения.

В возможном варианте вакцину в соответствии с настоящим изобретением рецептируют и/или упаковывают для многоклового режима, предпочтительно двухклового режима.

В возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением
15 предусмотрена как лекарственная форма, причем вышеупомянутую лекарственную форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество вышеупомянутой вакцины, и предусмотрена возможность доставки лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого контейнера. Вышеупомянутый контейнер может содержать по меньшей мере 10,
20 по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200 или по меньшей мере 250 доз вышеупомянутой вакцины.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение
25 вышеупомянутой вакцины животному.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у свиньи, который включает введение вышеупомянутой вакцины свинье.

30 Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРС у животного.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС.

5 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и *M. hyo*.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и РРСС.

10 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС и *M. hyo*.

15 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС и РРСС.

20 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и РРСС и *M. hyo*.

25 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС и *M. hyo*. и ВРРСС.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем вакцину вводят системно.

30 Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем вакцину вводят одной дозой.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания

защитной иммунной реакции, причем вакцину вводят как по меньшей мере одну дозу.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем вышеупомянутое животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу иммунизации животного против клинического заболевания, вызываемого по меньшей мере одним патогеном у вышеупомянутого животного, причем вышеупомянутая вакцина не способна вызывать клинические признаки инфекции, но способна вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую животное против патогенных форм вышеупомянутого по меньшей мере одного патогена.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для уменьшения поражения кишечника у животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида. Таким образом, вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу для уменьшения поражения кишечника у животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида, который включает введение животному вышеупомянутой вакцины. В возможном варианте поражения кишечника являются поражениями подвздошной кишки.

В возможных вариантах поражения кишечника и/или поражения подвздошной кишки являются макроскопическими повреждениями и/или микроскопическими повреждениями.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для уменьшения фекального выделения у животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида. Таким образом, вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу уменьшения

фекального выделения у животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида, который включает введение животному вышеупомянутой вакцины.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для увеличения среднего суточного привеса животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида. Таким образом, вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу увеличения среднего суточного привеса животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида, который включает введение животному вышеупомянутой вакцины.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем вакцина защищает от контрольного заражения 8×10^9 бактерии *Lawsonia*.

Настоящее изобретение также охватывает способ вызывания иммунной реакции или иммунологической реакции или защитной иммунной или иммунологической реакции против *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* и ВРРСС у животного, который в возможном варианте включает введение животному одной из описываемых авторами вакцин.

Настоящее изобретение также охватывает способ иммунизации животного против клинического заболевания, вызываемого по меньшей мере одним патогеном у вышеупомянутого животного, причем вышеупомянутый способ в возможном варианте включает этап введения животному вакцины одной из описываемых авторами вакцин, причем вышеупомянутая вакцина не способна вызывать клинические признаки инфекции, но способна вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую животное против патогенных форм вышеупомянутого по меньшей мере одного патогена.

Соответственно, настоящее изобретение охватывает применение вакцины в соответствии с настоящим изобретением в приготовлении композиции для вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и/или

ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС или в способе вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС.

Настоящее изобретение также охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками, причем вышеупомянутая вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и/или белок ОРС2 ЦВС2 и/или бактерин *M. hyo.* и/или ослабленный вирус ВРРСС.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками, причем вышеупомянутая вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2 и бактерин *M. hyo.* и ослабленный вирус ВРРСС.

Настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками, причем вышеупомянутая вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2.

Настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Peitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат с применением Denagard® (тиамулина) и/или ХТЦ (хлортетрациклина), и вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Ileitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

Следует также заметить, что объем изобретения не предусматривает включения какого бы то ни было продукта, процесса или получения продукта или способа применения продукта, которые не соответствуют письменному описанию и требованиям реализации Ведомства по патентам и товарным знакам США (USPTO) (Раздел 35 Кодекса законов США (U.S.C.), § 112, первый абзац), и, таким образом, Заявители оставляют за собой право и настоящим заявляют отказ от притязаний на любой ранее описанный продукт, процесс изготовления продукта или способ применения продукта. Все права на прямой отказ от притязаний на любые варианты осуществления, являющиеся предметом любого(ых) выданного(ых) патента(ов) заявителя по линии этой заявки или любой другой линии или в отношении любой заявки любой третьей стороны существующего уровня техники, в прямой форме сохраняются. Ни одно из содержащихся в данной заявке положений не может быть истолковано как обязательство.

Следует заметить, что в данном раскрытии, в особенности в формуле изобретения и/или абзацах, такие термины, как "включает", "включаемый" или "включая" и другие подобные, употребляются в значении согласно Закону о патентах США; например, возможными значениями являются "охватывает", "охватываемый", "охватывая" и т. п.; и такие термины, как "состоящий по сути из" и "состоит по сути из" имеют значения согласно Закону о патентах США, например, предполагают возможность наличия элементов, прямо не указанных, но исключают элементы, встречающиеся в существующем уровне техники или влияющие на основные или новые характеристики изобретения.

Эти и другие варианты осуществления раскрываются или становятся очевидными из представленного ниже Подробного описания и охватываются им.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Нижеследующее подробное описание, представленное для примера, но не с целью ограничения объема изобретения лишь конкретными описанными вариантами осуществления, наилучшим образом поясняется в сочетании с прилагаемыми фигурами.

5 ФИГУРА 1 показывает: Средние показатели макроскопического поражения подвздошной кишки. Разные буквы означают статистическую значимость ($p < 0,05$), "усы" представляют стандартную погрешность среднего.

10 ФИГУРА 2 показывает: Среднюю длину макроскопического поражения подвздошной кишки. Разные буквы означают статистическую значимость ($p < 0,05$), "усы" представляют стандартную погрешность.

ФИГУРА 3 показывает: Среднюю тяжесть поражения подвздошной кишки. Разные буквы означают статистическую значимость ($p < 0,05$), "усы" представляют стандартную погрешность.

15 ФИГУРА 4 показывает: Средний суточный привес по группе (фунты). Разные буквы означают статистическую значимость ($p < 0,05$), "усы" представляют стандартную погрешность.

ФИГУРА 5 показывает: Процент животных с определенными при помощи анализа ELISA положительными результатами *Lawsonia* в сыворотке.

20 ФИГУРА 6 показывает: Среднее количество выделенного *L. Intracellularis* по дням. Разные буквы означают статистическую значимость ($p < 0,05$), "усы" представляют стандартную погрешность.

25 ФИГУРА 7 показывает: Средние показатели микроскопического поражения, измеренные в терминальном отделе подвздошной кишки. Разные буквы означают статистическую значимость ($p < 0,05$), "усы" представляют стандартную погрешность.

ФИГУРА 8 показывает: Средний иммуногистохимический показатель присутствия антигена *L. intracellularis* в ткани подвздошной кишки.

ФИГУРА 9 показывает: Смешивание вакцины.

30 ФИГУРА 10 показывает: Схема исследования. Тиамулин/ХТЦ, вводимый только группе ЕИМАТВ с кормом, за неделю до и через неделю после вакцинации. Обе группы (ЕИМ и ЕИМАТВ) получали вакцину одновременно, за 4 недели до контрольного заражения. Всех животных усыпляли и подвергали вскрытию через 21 день после инфицирования (ДПИ)* = взятие образцов крови и кала. Клинические показатели за каждый день, 0 - 21.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение касается вакцины, включающей антиген *Lawsonia intracellularis* и один или несколько антигенов по меньшей мере еще одного патогена, выбранного из группы, к которой относятся цирковироз свиней (ЦВС),
5 *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo.*) и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (ВРРСС), причем антиген *Lawsonia intracellularis* является живым *Lawsonia intracellularis*.

В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и антиген ЦВС.

10 В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2.

В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и антиген *M. hyo.*

15 В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и бактериин *M. hyo.*

В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и антиген ВРРСС.

20 В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и ослабленный вирус ВРРСС.

В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis*, антиген ЦВС и антиген *M. hyo.*

25 В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2 и бактериин *M. hyo.*

В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis*, антиген ЦВС и антиген ВРРСС.

30 В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2 и ослабленный вирус ВРРСС.

В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis*, антиген ВРРСС и антиген *M. hyo*.

5 В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и ослабленный вирус ВРРСС и bacterin *M. hyo*.

В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis*, антиген ЦВС, антиген *M. hyo*. и антиген ВРРСС.

10 В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает живой *Lawsonia intracellularis* и белок ОРС2 ЦВС2 и bacterin *M. hyo*. и ослабленный вирус ВРРСС.

По отношению ко всем компонентам вакцины в соответствии с изобретением следует заметить, что термины “вакцина” и “антиген” в тексте
15 данного описания иногда употребляются как синонимы. Соответственно, возможно, например, синонимическое употребление фразы “вакцина включает вакцину ЦВС” с фразой “вакцина включает антиген ЦВС”.

По отношению к вакцине в соответствии с изобретением возможно синонимическое употребление терминов “вакцина” и “иммуногенная
20 композиция”.

В данном описании возможно синонимическое употребление терминов “антиген”, “иммуноген” и “иммуногенный компонент”.

В данном описании возможно синонимическое употребление терминов “иммунная реакция”, “иммунологическая реакция”, “защитная иммунная
25 реакция” и “защитная иммунологическая реакция”.

Кроме того, следует отметить возможность комбинации всех раскрытий, представленных в этом описании. Таким образом, также возможна комбинация, например, конкретного раскрытия, представленного авторами в связи с вакциной или антигеном ЦВС, с вакциной или антигеном ВРРСС, и наоборот, при
30 условии, что такой перенос будет считаться выполнимым специалистом в данной области техники с учетом идеи данного изобретения. Другими словами, если способ, технология, путь введения и т. п. описаны, например, в связи с ЦВС, они не обязательно ограничиваются ЦВС, и их применение также возможно, например, в связи с ВРРСС. Кроме того, все представленные в

данном описании раскрытия в связи с определенной описанной вакциной, содержащей один антиген, также применимы к описанной вакцине, включающей более одного антигена.

5 Раскрытия в контексте способов согласно описываемому авторами изобретению применимы к соответствующим способам применения, и наоборот.

Вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает антиген *Lawsonia intracellularis*. Соответственно, обеспечивается иммуногенная композиция для вызывания защитной иммунной реакции у свиньи против *Lawsonia intracellularis*.

10 В контексте данного описания термин "*Lawsonia intracellularis*" или "*L. intracellularis*" означает внутриклеточные изогнутые грамотрицательные бактерии, подробно описываемые в публикациях C. Gebhart et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, No. 3, 533 - 38 (1993) и S. McOrist et al. Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, No. 4, 820 - 25 (1995) (каждая из которых
15 включена в данное описание путем ссылки в полном объеме) и включает, помимо прочих, бактерии, депонированные как ATCC 55672 в Американской коллекции типовых культур, Роквилл, Мэриленд; бактерии, депонированные как NCTC 12656 и 12657 в Национальной коллекции типовых культур, Колиндейл, Лондон; бактерии-возбудители, возможность получения которых от
20 инфицированных ПЭС свиней или других животных по всему миру обеспечивается знаниями существующего уровня техники и идеей изобретения, изложенной в данном описании; и варианты или мутанты любых из вышеупомянутых бактерий, полученных спонтанно или искусственно.

"Живой *L. intracellularis*" в контексте данного описания означает, что
25 бактерии *L. intracellularis* являются живыми бактериями. В публикациях WO 96/39629 и WO 05/011731 описаны непатогенные живые или ослабленные штаммы *L. intracellularis*. Однако в возможном варианте композиция вакцины в соответствии с изобретением, как описано авторами, включает инактивированные / убитые бактерии *L. intracellularis* благодаря этапу
30 выработки / рецептирования. В контексте данного описания термин "ослабленный штамм" означает любой штамм *L. intracellularis*, приготовленный в соответствии с технологиями культивирования и пассирования, известными специалистам в данной области техники и/или изложенными в этом описании, для достижения сниженной вирулентности, предпочтительно авирулентности, с

сохранением иммуногенных свойств при введении животному-хозяину. Как продемонстрировано ниже, разные другие штаммы *L. intracellularis* были культивированы и ослаблены в соответствии с идеей настоящего изобретения для получения ослабленных иммуногенных штаммов, эффективных в качестве вакцин у свиней и других животных, восприимчивых к инфицированию *L. intracellularis*.

Генетически модифицированный вирус и/или бактерия или модифицированный живой вирус и/или бактерия являются "ослабленными", ясли они менее вирулентны по сравнению с их немодифицированными родительскими штаммами. Штамм является "менее вирулентным", если он демонстрирует статистически значимое снижение одного или нескольких параметров, определяющих тяжесть заболевания. К таким параметрам относятся уровень виремии, бактериемии, лихорадки, тяжесть респираторного дистресса, тяжесть репродуктивных симптомов или количество или тяжесть поражений органа, такого как кишечник (в частности, подвздошная кишка) или легкое, и т п.

Ожидается, что ослабленные штаммы для применения в вакцине в соответствии с изобретением должны найти применение в качестве иммуногенов в противомикробных вакцинах для животных, включая птиц, рыб, крупный рогатый скот, свиней, лошадей, млекопитающих и приматов в целом, а также человека. Такие вакцины приготавливают с применением технологий, известных специалистам в данной области техники, по ознакомлении с идеей изобретения, содержащейся в данном описании. Такая вакцина должна включать иммунологически эффективное количество ослабленного штамма в фармацевтически приемлемом носителе. Вакцину вводят одно или несколькими дозами. Иммунологически эффективное количество определяют способами, известными специалистам в данной области техники, без излишних экспериментов, по ознакомлении с идеей изобретения, содержащейся в данном описании. Количество авирулентной бактерии должно быть достаточным для стимулирования иммунной реакции у восприимчивых к заболеванию животных при сохранении авирулентности. Это зависит от конкретных животного, бактерии и заболевания. Рекомендуемая доза для введения восприимчивому животному предпочтительно составляет приблизительно от 10^3 до 10^9 бактерий/кг массы тела, наиболее предпочтительно – приблизительно от 10^5 до

10⁷ бактерий/кг массы тела. Носители известны специалистам в данной области техники, и к ним относятся стабилизаторы и разбавители. В возможном варианте такая вакцина также содержит соответствующий адъювант. Вакцину в соответствии с изобретением применяют в комбинации с другими вакцинами, например, в качестве разбавителя другой лиофилизированной вакцины, или комбинируют перед лиофилизацией с другой вакциной или просто смешивают. В другом варианте осуществления также предусмотрена смесь двух или более жидких вакцин. Препараты вакцин также обезвоживают, например, путем высушивания замораживанием с целью хранения или для дальнейшего рецептирования в жидкие вакцины.

Соответственно, изобретение также включает способ вызывания иммунной реакции на вирулентную бактерию *L. intracellularis* дикого типа у животного-хозяина с целью защиты хозяина от таких бактерий. Способ включает введение иммунологически эффективного количества живых, модифицированных живых или ослабленных бактерий или описанных авторами бактерий хозяину, в предпочтительном варианте – введение вакцины в соответствии с изобретением хозяину.

В контексте данного описания термин "крупномасштабное культивирование" означает уровень культивирования *L. intracellularis*, больший, чем приблизительно от 2,0 до 3,0 литров, и включает производство в масштабе 100 литров или более. "Культивирование" в контексте данного описания означает процесс содействия росту, воспроизводству и/или пролиферации *L. intracellularis*.

В возможном варианте практического осуществления способа культивирования описываемой авторами бактериальной культуры клетки сначала инокулируют с инокулятом, включающим бактерии *L. intracellularis*, для инфицирования клеток бактериями. В практическом осуществлении изобретения возможно использование многочисленных линий клеток, включая, помимо прочих, IEC-18 (ATCC 1589) -- эпителиальные клетки кишечника крысы, HEp-2 (ATCC 23) -- клетки эпидермоидной карциномы человека, McCoy (ATCC 1696) -- клетки мыши (неуказанные), MDCK (ATCC 34) -- клетки Мадин-Дарби почек собак, BGМК (Biowhittaker #71-176) -- клетки почек африканской зеленой мартышки и эпителиальные клетки кишечника свиньи. Предпочтительными клетками для культивирования являются клетки HEp-2, McCoy или IEC-18. В

альтернативном варианте бактерии культивируют в бесклеточной системе при условии поддержания бактерий при соответствующей концентрации растворенного O_2 согласно идее настоящего изобретения.

При использовании клеток культур перед инокуляцией клетки предпочтительно, но не обязательно, пребывают в форме монослоя. Для образования монослоя клетки высевает в традиционные колбы. В каждую колбу, как правило, высевает от приблизительно 1×10^5 клеток до приблизительно 10×10^5 клеток на 25 см^2 колбу, смешанных со средами для роста. В качестве сред для роста подходящими являются среды для культивирования клеток, включающие источник азота, необходимые факторы роста для выбранных культур клеток и источник углерода, такой как глюкоза или лактоза. Предпочтительной средой является МДСИ с 2 - 5 % эмбриональной бычьей сыворотки, хотя возможно получение хороших результатов и с разными другими средами промышленного производства.

Заявителями было обнаружено, что успешное культивирование *L. intracellularis* усиливается путем поддержания культивируемых клеток в постоянном состоянии роста. Таким образом, монослой культивируемых клеток должен иметь конфлюэнтность от приблизительно 20 процентов до приблизительно 50 процентов во время инокуляции. В предпочтительном варианте конфлюэнтность клеток должна составлять от приблизительно 30 процентов до приблизительно 40 процентов во время инокуляции, причем наибольшее предпочтение отдают конфлюэнтности приблизительно 30 процентов.

Инокулят может быть чистой культурой *L. intracellularis*, получаемой, например, из депозита ATCC 55672, депозитов NCTC 12656 или 12657, или из организма инфицированных свиней или других животных с применением обсуждаемых в настоящем описании способов выделения и очистки.

В соответствии с одним вариантом осуществления, инокулятом для практического осуществления изобретения является кишечный гомогенат, приготовленный путем соскоба слизистой оболочки с подвздошной кишки свиньи или другого животного, инфицированного ПЭС. При приготовлении кишечного гомогената на отрезках подвздошной кишки, выбранных для культивирования, должны быть обнаружены тяжелые поражения со значительным утолщением кишки. Из-за хрупкости бактерий образцы

предпочтительно отправляют на хранение при -70°C как можно быстрее после вскрытия. Антибиотик, к которому резистентен *L. intracellularis*, такой как Ванкомицин, Амфотерицин В или представители аминогликозидной группы антибиотиков, включая, помимо прочих, Гентамицин и Неомицин, предпочтительно добавляют к инокуляту для подавления загрязняющих бактерий при сохранении возможности роста *L. intracellularis*. В зависимости от того, является ли инокулят чистой культурой или кишечным гомогенатом, инокуляцию культивируемых клеток выполняют с применением различных технологий, известных специалистам в данной области техники, согласно идее настоящего изобретения.

Бактерии и/или инокулированные клетки культуры затем инкубируют при сниженной концентрации растворенного O_2 . При концентрации растворенного кислорода более 18 % рост *L. intracellularis* не достигает оптимального, и рост в конечном итоге прекращается при концентрации кислорода за пределами этого диапазона. В предпочтительном варианте инокулированные клетки культуры инкубируют при концентрации растворенного кислорода в диапазоне от приблизительно 0 % до приблизительно 10 %. В более предпочтительном варианте клетки инкубируют при концентрации кислорода в диапазоне от приблизительно 0 % до приблизительно 8 %, причем наибольшее предпочтение отдают концентрации кислорода от приблизительно 0 % до приблизительно 3,0 %.

Соответствующая концентрация диоксида углерода также является важной для надлежащего роста *L. intracellularis*. При концентрации диоксида углерода более 10 % и менее 4 % не достигает оптимального, и рост в конечном итоге прекращается при концентрации диоксида углерода за пределами этого диапазона. В предпочтительном варианте концентрация диоксида углерода составляет в диапазоне от приблизительно 6 % до приблизительно 9 %, причем наибольшее предпочтение отдают концентрации диоксида углерода приблизительно 8,8 %.

Кроме того, клетки предпочтительно инкубируют при концентрации водорода в диапазоне от приблизительно 73 % до приблизительно 94 %. Возможно использование азота вместо части или всего присутствующего водорода. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления,

клетки инкубируют при приблизительно 0 - 8,0 % O₂, приблизительно 8,8 % CO₂ и приблизительно 83,2 % H₂.

Инокулированные клетки инкубируют в инкубаторе с двойным газом или другой газовой камере, содержащей надлежащую концентрацию кислорода и диоксида углерода и обеспечивающей возможность суспендирования клеток во время инкубации. Камера должна включать средства поддержания инокулированных клеток в суспензии и газосигнализатор и источник подачи для подачи и поддержания надлежащей концентрации газа. Температура инкубации должна составлять в диапазоне от 30 °C до 45 °C, более предпочтительно в диапазоне от приблизительно 36 °C до приблизительно 38 °C. В наиболее предпочтительном варианте температура составляет приблизительно 37 °C. Необходимое оборудование для осуществления способов культивирования и ослабления согласно изобретению является легко доступным для специалистов в данной области техники согласно идее настоящего изобретения. Примером оборудования, подходящего для осуществления настоящего изобретения является инкубатор с двойным газом, например, модель 480 от Lab-Line, Мелроуз Парк, Иллинойс, в сочетании с вращающимися колбами для поддержания клеток в суспензии. Предпочтительное с точки зрения данного изобретения оборудование включает ферментатор, биореактор или ротационный шейкер, содержащий по меньшей мере приблизительно 2 литра среды и способный поддерживать клетки культуры в суспензии путем барботирования газа надлежащей концентрации или другими средствами механического перемешивания и непрерывного отслеживания уровня растворенного O₂ в среде. New Brunswick, Braun и другие компании производят ферментаторы и биореакторы, подходящие для этой цели.

Путем поддержания инокулированных клеток в суспендированном состоянии во время инкубации максимального роста клеток, а значит, и *L. intracellularis*, достигают путем увеличения воздействия на каждую отдельную клетку сред для роста и соответствующей смеси кислорода и диоксида углерода. Культивируемые клетки перемешивают и поддерживают в суспензии различными способами, известными специалистам в данной области техники, включая, например, колбы для культур, роллерные флаконы, мембранные культуры и вращающиеся колбы. Клетки держат в суспензии во время инкубации путем инкубации клеток во вращающейся колбе внутри инкубатора с

двойным газом или подобном устройстве. Термин "вращающаяся колба" в контексте данного описания означает колбу или другой контейнер, в котором применяют лопасть, крыльчатку или другие средства для перемешивания культуры и поддержания содержащихся в ней клеток в суспензии.

5 В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения инокулированные клетки инкубируют, пока клетки не достигают конфлюэнтности, а затем клетки помещают во вращающуюся колбу, содержащую среду для роста, и инкубируют в инкубаторе с двойным газом при вращении колбы. В предпочтительном варианте инокулированные клетки
10 соскабливают во вращающуюся колбу. Этого достигают разными способами, известными специалистам в данной области техники, например, используя скребок для клеток с целью отделения клеток. Сразу после помещения клеток во вращающуюся колбу лопасть вращающейся колбы, как правило, приводят во вращение со скоростью в диапазоне от приблизительно 30 до приблизительно 60
15 об/мин с целью поддержания инфицированных клеток в суспензии.

Затем часть культивированных *L. intracellularis* переносят путем пассирования в свежие культивируемые клетки для повышения продуцирования бактерий *L. intracellularis*. Термин "пассирование" или его варианты означает процесс переноса части культивируемых *L. intracellularis* в свежие
20 культивируемые клетки с целью инфицирования свежих клеток бактерией. Термин "свежие" в контексте данного описания означает клетки, которые еще не были инфицированы *L. intracellularis*. Предпочтительно такие клетки в среднем не старше приблизительно одного дня.

Пассаж *L. intracellularis* в суспензионные культуры выполняют путем
25 удаления части первоначальной культуры и добавления ее в новую колбу, содержащую клетки свежей культуры. Если первоначальная культура содержит большое число бактерий/мл, например, более, чем приблизительно 10^4 бактерий/мл, предпочтение отдают добавлению приблизительно от 1 до 10 % (объем-объем) культуры из инфицированной колбы в новую колбу, содержащую
30 свежие клетки. Предпочтительно это осуществляют тогда, когда инфицировано 50 - 100 % клеток. Если инфицировано менее 50 % клеток, пассирование предпочтительно выполняют путем помещения культуры в соотношении 1:2 в новую колбу и пропорционального увеличения объема путем добавления свежей среды. В любом из случаев лизис клеток и другие этапы не требуются, и в этом

состоит прямое отличие от пассажа монослойных культур согласно существующему уровню техники.

После достаточного роста культивируемых клеток и последующего инфицирования *L. intracellularis* при инфективности клеток более чем
5 приблизительно 70 %, согласно определению с применением ИФА, ЦПД₅₀ или другого сравнимого способа, по меньшей мере часть культивированных бактерий *L. intracellularis* собирают. Однако в случае получения разных результатов при применении разных технологий определения инфективности клеток используют результаты способа ИФА. Этап сбора выполняют путем
10 отделения бактерий от суспензии с применением различных технологий, известных специалистам в данной области техники, согласно идее настоящего изобретения. В предпочтительном варианте бактерии *L. intracellularis* собирают путем центрифугирования содержимого всей суспензии или ее части для осаждения культивируемых клеток, ресуспендирования полученного в
15 результате осадка клеток и лизиса инфицированных клеток. Как правило, по меньшей мере часть содержимого центрифугируют при приблизительно 3000 x g в течение приблизительно 20 минут с целью осаждения клеток и бактерий. Затем осадок ресуспендируют, например, в растворе сахарозы-фосфата-глутамата (СФГ) и подвергают пассажу приблизительно четыре раза, пропуская через иглу
20 калибра 25 с целью лизиса клеток. Если желательна дальнейшая очистка, образцы центрифугируют при приблизительно 145 x g в течение приблизительно пяти минут для удаления клеточных ядер и дебриса. Затем супернатант центрифугируют при приблизительно 3000 x g в течение приблизительно двадцати минут и полученный в результате осадок ресуспендируют в
25 соответствующем разбавителе, таком как СФГ, с эмбриональной бычьей сывороткой (для приготовления собранных бактерий, подходящих для замораживания или применения в качестве прививочного материала) или средой для роста (для приготовления собранных бактерий, более подходящих для пассирования в свежие клетки).

30 Как уже было упомянуто, эффективный рост *L. intracellularis* для крупномасштабного производства усиливают путем поддержания активного роста тканевых клеток. В монослоях, когда культуры становятся конфлюэнтными, скорость деления клеток существенно снижается. Попытки выращивания *L. intracellularis* на монослойных тканевых культурах имели

ограниченный успех, и увеличение масштаба было невозможно. Однако применение суспензионных культур в значительной мере способствует поддержанию активного роста клеток и обеспечивает возможность непрерывного расширения культуры и увеличения масштаба. Благодаря применению ферментатора и приблизительно 0 - 3 % растворенного O₂, как пояснялось выше, Заявителям удалось вырастить до 10⁸ бактерий/мл. Заявителям также удалось поддерживать активный рост культивируемых бактерий в течение многих месяцев, что позволило рассчитывать на возможность такого роста в течение неопределенного срока.

Ранее существовало распространенное мнение, что клетки должны быть прикреплены к поверхности для того, чтобы быть инфицированными *L. intracellularis*. Раскрываемые авторами суспензии клеток являются уникальными и противоречат этой теории. При использовании клеток McCoу или IEC-18 возможно добавление желатиновых, агарозных, коллагеновых, акриламидных или кремнеземных шариков, таких как пористые микроносители Cultisphere-G производства HyClone Laboratories, Логан, Юта, вместе со средами для роста. В одном варианте осуществления неинфицированные клетки McCoу добавляют к средам во время роста культуры клеток McCoу, инфицированных *L. intracellularis*. Однако использование клеток McCoу, а также клеток HEp-2 при выполнении способа культивирования согласно изобретению возможно и без необходимости в микроносителях. Это обеспечивает особенно благоприятный и экономичный путь для крупномасштабного культивирования.

С целью поддержания культивирования в случае культур HEp-2 предпочтительно 25 - 50 % культуры удаляют и заменяют свежей средой с интервалами в неделю. Для культур клеток с микроносителями или шариками предпочтительно 25 - 50 % культуры удаляют и заменяют свежими микроносителями или шариками и свежей средой 1 - 2 раза в неделю. Для увеличения масштаба к культуре добавляют дополнительные 25 - 50 % среды или среды с микроносителями.

В зависимости от скорости инфицирования культивируемых клеток, пассаж в свежие клетки, как правило, осуществляют приблизительно от раза в 2 недели до раза в 5 недель. Исходя из того, что культивируемые клетки инфицируются по меньшей мере на 70 % в течение 2 - 3 недель, пассаж предпочтительно осуществляют приблизительно от раза в 3 недели до раза в 4 недели.

Живой антиген *L. intracellularis* для применения в вакцине в соответствии с изобретением производят в соответствии с описанными выше способами производства. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, после поддержания инфицированных клеток в суспензии в течение длительного времени (например, 6 - 8 месяцев) по меньшей мере часть культивируемых бактерий *L. intracellularis* собирают и наблюдают на возможное ослабление. Такое наблюдение предпочтительно осуществляют по контрольным заражениям животного-хозяина или животной модели для отбора ослабленных штаммов. Такие ослабленные штаммы используют в вакцинах в соответствии с описанными авторами способами. Ослабленные вакцины *L. intracellularis* в соответствии с настоящим изобретением оказались эффективными против инфекции *L. intracellularis* для разных животных, и ожидается, что они будут эффективны и для человека.

Культивирование в суспензии позволяет быстро расширять культуру, увеличивать выход в 100 - 1000 раз при снижении расходов. В результате значительный запас бактерий *L. intracellularis*, произведенных в соответствии с раскрываемым авторами способом культивирования легко поддается ослаблению с целью производства вакцины. Ослабление затруднено в монослойных культурах из-за низкого выхода бактерий, производимых с применением традиционных технологий монослойного выращивания. В отличие от них, раскрываемый способ выращивания *L. intracellularis* значительно облегчает, ускоряет такое выращивание и увеличивает количество бактерий, доступных для этой цели. Чем больше клеток и их делений, тем выше уровень производимых мутаций, что способствует разработке вакцин. Выращивание в суспензиях повышает экспрессию важных иммуногенов, контролируемых регулируемой средой генами и продуктами их экспрессии.

Полученные в результате ослабленные штаммы поддаются культивированию в монослоях тканевой культуры, как описано в Примере 1 Патента США № 5,885,823, но предпочтительно их культивируют в суспензионных культурах в соответствии с раскрываемым авторами способом. Другие средства ослабления включают химическое ослабление путем применения, например, N-метилнитрозогуанидина, и другие, известные специалистам в данной области техники. Либо путем множественных пассажей,

либо химическими средствами, ослабленный *L. intracellularis* производят и отбирают для приготовления вакцины.

Согласно одному варианту осуществления вакцины в соответствии с изобретением, антиген собирают путем центрифугирования или
5 микрофльтрации, как описано выше. Затем антиген стандартизируют на определенном уровне на основе оптимальной иммунной реакции животного-хозяина, определяемой путем титрования дозы у вида животного-хозяина.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления вакцины с применением описанных выше способов культивирования, бактерии подвергают
10 серийным пассажам для вызывания ослабления и отбора на ослабленную, авирулентную культуру клеток. Культуру испытывают на животном-хозяине (предпочтительно после по меньшей мере 6 - 8 или более месяцев выращивания в суспензионной культуре) на наличие признаков ослабления. Культуру собирают, как описано выше, и разводят. Например, свиней вакцинируют, вводя
15 перорально по меньшей мере от 1×10^5 до 1×10^6 бактерий. Приблизительно через двадцать восемь дней после вакцинации свиней перорально инокулируют, вводя приблизительно 1×10^7 организмов из менее пассажированной (возраст приблизительно от 30 до 45 дней) вирулентной культуры *L. intracellularis*. Инфицированных животных подвергают вскрытию через 21 день после
20 контрольного заражения и тонкий кишечник исследуют на наличие макроскопических поражений, а также микроскопических поражений. Также следует выполнить ПЦР. Приблизительно у восьмидесяти процентов контрольных животных обнаруживаются макроскопические или микроскопические поражения и положительный результат теста на наличие *L.*
25 *intracellularis* в клетках слизистой оболочки кишечника при ПЦР- или ФА-тестов. Вакцинированные животные имеют нормальную поверхность слизистой оболочки согласно гистологическим наблюдениям и отрицательный результат ПЦР-теста.

В целом ослабленный иммуногенный штамм *L. intracellularis*
30 вырабатывается после непрерывного культивирования в течение периода по меньшей мере приблизительно от 150 до 250 дней, в течение которых культуру пассажируют по меньшей мере от приблизительно 7 до приблизительно 12 раз. Другие ослабленные культуры производят путем варьирования этих значений при условии применения описанных здесь способов наблюдения и отбора.

Затем готовят вакцину, включающую иммунологически эффективное количество ослабленного *L. intracellularis* в фармацевтически приемлемом носителе. Комбинация иммуногена и носителя возможна в водном растворе, эмульсии или суспензии. Иммунологически эффективное количество определяют известными специалистам в данной области техники способами без излишних экспериментов по ознакомлении с идеей изобретения, содержащейся в данном описании. В целом количество иммуногена составляет от 50 до 500 микрограммов, предпочтительно от 10^7 до 10^9 ЦПД₅₀, при использовании очищенных бактерий.

Бактерии *L. intracellularis*, выращиваемые согласно способу в соответствии с изобретением, или компоненты, производные от таких бактерий, применяют в качестве антигена в анализе ELISA или другом иммуноанализе, таком как иммуноферментный анализ на антитела ("ИФА"), для обнаружения антител к *L. intracellularis* в сыворотке и других жидкостях организма животных с подозрением на инфицирование бактериями. В настоящее время предпочтительным иммуноанализом является ИФА, как описано в Примере 1 Патента США № 5,885,823. В альтернативном варианте бактерии, выращиваемые в соответствии с изобретением, используют в вестерн-блоттинге.

В публикациях WO 96/39629 и WO 05/011731 описано культивирование *Lawsonia intracellularis*, ослабленного *Lawsonia intracellularis* и его введение.

В предпочтительном варианте осуществления живой *Lawsonia intracellularis* является аттенюированным живым *Lawsonia intracellularis*. В другом предпочтительном варианте осуществления живой *Lawsonia intracellularis* является ослабленным *Lawsonia intracellularis*.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением имеет дозу *Lawsonia intracellularis* приблизительно от 10^3 до 10^9 бактерий/кг массы тела, предпочтительно приблизительно от 10^5 до 10^7 бактерий/кг массы тела.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением имеет дозу антигена *Lawsonia intracellularis* от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^7 бактерий *Lawsonia intracellularis*.

В предпочтительном варианте осуществления антиген *Lawsonia intracellularis* является лиофилизированным.

В предпочтительном варианте осуществления антиген *Lawsonia intracellularis* в вакцине в соответствии с настоящим изобретением является антигеном, включенным в Enterisol® Ileitis.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина *Lawsonia intracellularis* является вакциной Enterisol® Ileitis.

Предпочтительный способ иммунизации или вакцинации состоит во введении вакцины в соответствии с изобретением путем системного введения, например, внутримышечным путем.

В одном возможном аспекте вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает антиген ЦВС. Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается иммуногенная композиция для вызывания защитной иммунной реакции у свиньи против ЦВС. В контексте настоящего изобретения возможно применение плазмидных конструктов, кодирующих и экспрессирующих иммуногены (антигены) ЦВС. Кроме того, авторами описаны способы вакцинации и ДНК-вакцины. Кроме того, изобретение касается способов производства или рецептирования этих вакцин. Также предусмотрены инактивированные вакцины ЦВС (см., например, Патент США № 6,517,843).

ОРС1 и ОРС2 ЦВС в соответствии с публикацией Meehan 1998 г. кодируют белки с прогнозируемой молекулярной массой 37,7 кДа и 27,8 кДа, соответственно. ОРС3 и ОРС4 (согласно публикации Meehan et al. 1998, соответствуют ОРС7 и ОРС10, соответственно, в WO9918214) кодируют белки с прогнозируемой молекулярной массой 11,9 и 6,5 кДа, соответственно. Последовательность этих ОРС также доступна в базе данных Genbank под номером AF055392. Также возможно их включение в плазмиды и применение в соответствии с изобретением отдельно или в комбинации, например, с ОРС1 и/или ОРС2 и/или ОРС3.

В описанных выше условиях возможно использование других ОРС ЦВС 1 - 3 и 5, 6, 8 - 9, 11 - 12, раскрываемых в Патенте США № 6,391,314 (COL 1 - 3 и 5, 6, 8 - 9, 11 - 12 в публикации WO-A-9918214), в комбинации или ином сочетании друг с другом или с ОРС 1 и 2, как определено авторами.

Также в вышеуказанном контексте охватывается применение эквивалентных последовательностей, в частности, ОРС, взятых их разных упомянутых авторами штаммов ЦВС. Термин “эквивалентные

последовательности" в контексте данного описания относится к последовательностям, взятым из штамма ЦВС, имеющего ОРС2 и/или ОРС1, которые имеют гомологию или идентичность, как подробнее определено ниже, с соответствующей ОРС штамма Imp 1010. Для ОРС3 согласно публикации Meehan, также следует отметить, что гомология или идентичность должна быть, например, равной или большей, чем 80 %, в частности, 85 %, предпочтительно 90 % или 95 %, с ОРС3 штамма Imp1010. Для ОРС4 согласно публикации Meehan 1998 г. она может быть равной или большей, чем 86 %, в частности, 90 %, предпочтительно 95 %, с ОРС4 штамма Imp1010.

Из геномной нуклеотидной последовательности, например, из тех, которые раскрываются в публикации WO-A-99 18214, специалист в данной области техники сможет определить ОРС с применением стандартной программы, такой как MacVector™. Кроме того, выравнивание геномов с геномом штамма 1010 и сравнение с ОРС штамма 1010 позволяет специалисту в данной области техники легко определить ОРС на геноме для другого штамма (например, раскрываемые в публикации WO-A-99 18214). Применение программы или осуществление выравнивания является привычной задачей для специалиста в данной области техники и обеспечивает прямой доступ к эквивалентным ОРС.

ОРС2 ЦВС3 и геномные последовательности ЦВС3 брали из KT869077 (GenBank).

В предпочтительном варианте антиген ЦВС вакцины в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антиген ЦВС1, ЦВС2 и/или ЦВС3. В предпочтительном варианте антиген ЦВС вакцины в соответствии с настоящим изобретением является рекомбинантным полипептидом.

В предпочтительном аспекте полипептид согласно данному изобретению является рекомбинантным белком ОРС2 ЦВС1, ЦВС2 или ЦВС3, таким как экспрессируемый бакуловирусом рекомбинантный белок ОРС2 ЦВС3 или, в предпочтительном варианте, экспрессируемый бакуловирусом рекомбинантный белок ОРС2 ЦВС2. Термин "рекомбинантный белок ОРС2" в контексте данного описания, в частности, относится к белковой молекуле, которая экспрессируется из молекулы рекомбинантной ДНК, такой как полипептид, которую производят с применением технологий рекомбинантных ДНК. Примером таких технологий является случай, в котором ДНК, кодирующую экспрессируемый белок, вставляют в подходящий экспрессирующий вектор, предпочтительно

бакуловирусный экспрессирующий вектор, который, в свою очередь, применяют для трансфекции, или, в случае бакуловирусного экспрессирующего вектора, для инфицирования, клетки-хозяина для получения белка или полипептида, кодируемого ДНК. Термин "рекомбинантный белок ОРС2" в контексте данного описания, таким образом, в частности, относится к белковой молекуле, которая экспрессируется из молекулы рекомбинантной ДНК.

Другими словами, антиген ЦВС вакцины в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является рекомбинантным полипептидом, экспрессируемым (кодированным) геном ОРС ЦВС, предпочтительно геном ОРС2 ЦВС, наиболее предпочтительно геном ОРС2 ЦВС2.

Антиген ЦВС вакцины в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является рекомбинантным полипептидом, экспрессируемым из клетки бакуловируса (кодированным ею).

Антиген ЦВС вакцины в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является рекомбинантным полипептидом, экспрессируемым из гена ОРС ЦВС (кодированным им), предпочтительно гена ОРС2 ЦВС, наиболее предпочтительно гена ОРС2 ЦВС2, и экспрессируемым в клетке бакуловируса.

Антиген ЦВС вакцины в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является антигеном ЦВС, включенным в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

В соответствии с конкретным примером, рекомбинантный белок ОРС2 ЦВС1, ЦВС2 или ЦВС3 производят способом, включающим следующие этапы: ген для ОРС2 ЦВС1, ЦВС2 или ЦВС3 клонируют в бакуловирусный трансферный вектор; трансферный вектор применяют для приготовления рекомбинантного бакуловируса, содержащего вышеупомянутый ген, путем гомологичной рекомбинации в клетках насекомых; и белок ОРС2 ЦВС1, ЦВС2 или ЦВС3 затем экспрессируют в клетках насекомых во время инфицирования рекомбинантным бакуловирусом.

Следует также понимать, что термин "рекомбинантный белок ЦВС, состоящий из последовательности", в частности, также касается любой котрансляционной и/или посттрансляционной модификации или модификаций последовательности, осуществленных клеткой, в которой экспрессируется полипептид. Таким образом, термин "рекомбинантный белок ОРС2 ЦВС, состоящий из последовательности", как описано авторами, также касается

последовательности, имеющей одну или несколько модификаций, осуществленных клеткой, в которой экспрессируется полипептид, в частности, модификаций аминокислотных остатков, осуществленных при биосинтезе белка и/или обработке белка, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из гликозилирования, фосфорилирования и ацетилирования.

В предпочтительном варианте рекомбинантный белок ОРС2 ЦВС1, ЦВС2 или ЦВС3 в соответствии с раскрытием изобретения производят или получают при помощи бакуловирусной экспрессионной системы, в частности, в культивируемых клетках насекомых.

Значение слова “плазида” в данном контексте охватывает любую единицу транскрипции ДНК в форме полинуклеотидной последовательности, включающей экспрессируемую последовательность ЦВС и элементы, необходимые для ее экспрессии *in vivo*. Предпочтение отдают круговой форме плазмиды, сверхспиральной или уложенной иным образом. Объем изобретения также охватывает линейную форму.

В контексте настоящего изобретения возможно применение, в частности, плазмид согласно Патенту США № 6,943,152. Каждая плазида включает промотор, способный обеспечивать в клетках-хозяевах экспрессию вставленного гена под его контролем. Как правило, это сильный эукариотный промотор, в частности, ранний промотор цитомегаловируса CMV-IE человеческого или мышиного происхождения или, необязательно, другого происхождения, например, крысы или морской свинки. В более общем смысле промотор имеет либо вирусное происхождение, либо клеточное происхождение. В качестве вирусного промотора, отличного от CMV-IE, следует упомянуть ранний или поздний промотор вируса SV40 или промотор вируса саркомы Рауса LTR. Возможен также промотор из вируса, от которого происходит ген, например, промотор, специфичный к гену. В качестве клеточного промотора следует упомянуть промотор цитоскелетного гена, такой как, например, десминовый промотор или, в альтернативном варианте, актиновый промотор. В случае наличия нескольких генов в одной плазмиде возможно их присутствие в одной транскрипционной единице или в двух разных единицах.

В возможном варианте плазмиды также включают другие регулирующие транскрипцию элементы, такие как, например, стабилизирующие последовательности интронного типа, предпочтительно интрон II гена бета-

глобина кролика (van Ooyen et al. Science, 1979, 206: 337 - 344), сигнальная последовательность белка, кодируемого геном тканевого активатора плазминогена (tPA; Montgomery et al. Cell. Mol. Biol. 1997, 43: 285 - 292), и сигнал полиаденилирования (polyA), в частности, гена гормона роста крупного рогатого скота (bGH) (публикация US-A-5,122,458) или гена бета-глобина кролика.

"Идентичность последовательностей", как известно специалистам в данной области техники, означает связь между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, а именно контрольной последовательностью и данной последовательностью, сравниваемой с контрольной последовательностью. Идентичность последовательностей определяют путем сравнения данной последовательности с контрольной последовательностью после оптимального выравнивания последовательностей для получения наибольшей степени подобия последовательностей, которую определяют по совпадению между цепями таких последовательностей. После такого выравнивания идентичность последовательностей устанавливают на основе сопоставления позиций: например, последовательности являются "идентичными" в конкретной позиции, если в этой позиции нуклеотиды или аминокислотные остатки являются идентичными. Общее число таких идентичных позиций после этого делят на общее число нуклеотидов или остатков в контрольной последовательности для получения процента идентичности последовательностей. Идентичность последовательностей легко вычисляют известными способами, включая, помимо прочих, описанные в публикациях Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics и Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), содержание которых включено в данное описание путем ссылки. Предпочтительные способы определения идентичности последовательностей предназначены для получения наибольшего совпадения между испытываемыми последовательностями. Способы определения

идентичности последовательностей кодифицированы в общедоступных компьютерных программах, определяющих идентичность последовательностей между данными последовательностями. Примеры таких программ включают, помимо прочих, пакет программ GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215: 403 - 410 (1990)). Программа BLASTX является общедоступной с возможностью получения от NCBI и из других источников (см. публикации BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215: 403 - 410 (1990), содержание которых включено в данное описание путем ссылки). Эти программы позволяют оптимально выравнивать последовательности, используя вес гэпа по умолчанию с целью получения наивысшего уровня идентичности последовательностей между данной и контрольной последовательностями. В качестве иллюстрации, в случае полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере, например, 85 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно – 95 % "идентичности последовательностей" с контрольной нуклеотидной последовательностью, предполагается, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида идентична контрольной последовательности, за исключением того, что в данной полинуклеотидной последовательности допускается наличие до 15, предпочтительно до 10, еще более предпочтительно – до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов контрольной нуклеотидной последовательности. Другими словами, в полинуклеотиде, имеющем нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно – 95 % идентичности относительно контрольной нуклеотидной последовательности, возможна делеция до 15 %, предпочтительно 10 %, еще более предпочтительно – 5 % нуклеотидов в контрольной последовательности или их замещение другим нуклеотидом, или вставка нуклеотидов в количестве до 15 %, предпочтительно 10 %, еще более предпочтительно – 5 %, от общего количества нуклеотидов контрольной последовательности в контрольную последовательность. Эти мутации контрольной последовательности возможны на 5' или 3' конечных позициях контрольной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими конечными позициями, располагаясь либо по отдельности среди нуклеотидов в контрольной последовательности, либо одной или несколькими

смежными группами в пределах контрольной последовательности. Аналогичным образом, под полипептидом, имеющим данную аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере, например, 85 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно – 95 % идентичности последовательностей с контрольной аминокислотной последовательностью, предполагается, что данная аминокислотная последовательность полипептида является идентичной контрольной последовательности, за исключением того, что в данной полипептидной последовательности допускается наличие до 15, предпочтительно до 10, еще более предпочтительно – до 5 изменений аминокислот на каждые 100 аминокислот контрольной аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения данной полипептидной последовательности, имеющей по меньшей мере 85 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно – 95 % идентичности последовательностей с контрольной аминокислотной последовательностью, возможна делеция до 15 %, предпочтительно 10 %, еще более предпочтительно – 5 % аминокислотных остатков в контрольной последовательности или их замещение другой аминокислотой, или вставка аминокислот в количестве до 15 %, предпочтительно 10 %, еще более предпочтительно – 5 %, от общего количества аминокислотных остатков контрольной последовательности в контрольную последовательность. Эти изменения контрольной последовательности возможны в амино- или карбокси-концевых позициях контрольной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими конечными позициями, располагаясь либо по отдельности среди остатков в контрольной последовательности, либо одной или несколькими смежными группами в пределах контрольной последовательности. В предпочтительном варианте позиции остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными замещениями. Однако консервативные замещения не включаются как совпадения при определении идентичности последовательностей.

"Гомология последовательностей" в контексте данного описания касается способа определения родства двух последовательностей. Для определения гомологии последовательностей две или более последовательностей оптимально выравнивают и в случае необходимости включают гэпы. Однако, в отличие от "идентичности последовательностей", консервативные аминокислотные

замещения считают как совпадения при определении гомологии последовательностей. Другими словами, для получения полипептида или полинуклеотида, имеющего 95 % гомологии последовательностей с контрольной последовательностью, 85 %, предпочтительно 90 %, еще более предпочтительно – 95 % аминокислотных остатков или нуклеотидов в контрольной последовательности должны совпадать или включать консервативное замещение другой аминокислотой или нуклеотидом, или возможна вставка аминокислот или нуклеотидов в количестве до 15 %, предпочтительно до 10 %, еще более предпочтительно – до 5 %, от общего количества аминокислотных остатков или нуклеотидов, не включающих консервативные замещения, в контрольной последовательности, в контрольную последовательность. Предпочтительно гомологичная последовательность включает участок из по меньшей мере 50, еще более предпочтительно – 100, еще более предпочтительно – 250, еще более предпочтительно – 500 нуклеотидов.

Сравнение последовательностей осуществляют по всей длине двух сравниваемых последовательностей или по фрагментам двух последовательностей. Определение идентичности последовательностей возможно на участке, например, из двадцати, пятидесяти, ста или более смежно расположенных аминокислотных остатков, однако, как правило, сравнение производят по всей длине двух сравниваемых последовательностей.

"Консервативное замещение" касается замещения аминокислотного остатка или нуклеотида другим аминокислотным остатком или нуклеотидом, имеющим подобные характеристики или свойства, включая размер, гидрофобность и т. п., таким образом, чтобы общая функциональность не претерпевала значительных изменений.

В контексте настоящего изобретения возможно также использование белков ЦВС1 или ЦВС2 или ЦВС3 с мутациями, к которым, помимо прочих относятся мутации капсидного белка. Несмотря на расхождения аминокислотных последовательностей капсида между ЦВС2 и вирусом болезни клюва и перьев (BFDV), кристаллические структуры очень подобны, хотя их последовательности различны. Предпочтительно мутации ЦВС3 предназначены для стабилизации вирусоподобных частиц (ВПЧ). Капсидный белок ЦВС3 должен самостоятельно складываться в ВПЧ, однако уровень экспрессии белка ЦВС3 значительно ниже по сравнению с капсидным белком ЦВС2. Так, лишь

приблизительно 20 % белка складываются в ВПЧ, тогда как остальные 80 % белка вбираются в нерастворимую фракцию. В контексте настоящего изобретения возможно применение мутаций капсидного белка ЦВСЗ, раскрываемых в Международной патентной заявке под серийным номером
 5 PCT/US2020/026930.

Анализы и технологии, подходящие для применения в контексте настоящего изобретения, включают те, которые применяют для отслеживания или количественного определения сборки и разборки капсидного белка цирковируса свиней (ОРС2) в вирусоподобные частицы (ВПЧ), и к ним
 10 относятся: твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), SDS/PAGE, необязательно с окрашиванием серебром или окрашиванием Кумасси, вестерн-блоттинг или иммуноблот-анализ, эксклюзионная хроматография (ЭХ), динамическое рассеяние света (ДРС) или многоугловое рассеяние света (МУРС), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), аналитическое
 15 ультрацентрифугирование и флуоресцентный спектроскопический анализ (ФСА), необязательно в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Дополнительные подходящие технологии также включают: анализы комплексов белков – нуклеиновых кислот с задержкой в агарозном геле, иммунодиффузионные тесты например, одномерную
 20 радиальную иммунодиффузию (ОРИД), анализ отслеживания наночастиц (NTA), анализы на основе метаболического мечения и хемилюминесцентных ферментов. Каждый из этих анализов хорошо известен специалистам в данной области техники и описан, например, в публикациях Fang, Mingli et al. “Detection of the Assembly and Disassembly of PCV2b Virus-Like Particles Using Fluorescence
 25 Spectroscopy Analysis” *Intervirology* Vol. 58, 2015, pp. 318 - 323; Thompson, Christine et al. “Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches” *Virology Journal* vol 10, 2013, p. 141; Steppert, Petra et al. “Quantification and characterization of virus-like particles by size-exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis” *Journal of
 30 Chromatography A* Vol. 1487, 2017, pp. 89 - 99; Yadav, Shalini et al. “A facile quantitative assay for viral particle genesis reveals cooperativity in virion assembly and saturation of an antiviral protein” *Virology*, vol 429, No. 2, 2012, pp. 155 - 162; и Zeltins, Andris “Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A

Review” *Molecular Biotechnology* Vol. 53, 2013, pp. 92 - 107, каждая из которых включена в данное описание путем ссылки в полном объеме.

Разработка рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген OPC2 ЦВС3, под контролем полиэдринового промотора бакуловируса (BaculoG/ЦВС3 OPC2 Clone 4B4-2E12 Pre-MSV p8; lot No. 3624-039) описана в Примере 1 Международной патентной заявки под серийным номером PCT/US2020/026930. В некоторых возможных вариантах осуществления применение такого рекомбинантного экспрессируемого бакуловирусом белка, описанного в вышеупомянутом Примере 1, в вакцине включает убитые и/или инактивированные варианты рекомбинантного вируса. В альтернативном варианте в некоторых вакцинах рекомбинантный вирус, например, подобный показанному в Примере 1 Международной патентной заявки под серийным номером PCT/US2020/026930, используют как аттенюированный живой вирус.

В некоторых вариантах осуществления амплифицированную кодирующую последовательность OPC2 ЦВС субклонируют в бакуловирусный трансферный вектор, используя фланкирующие сайты рестрикции для генерирования нужного трансферного вектора. Например, возможно субклонирование амплифицированной кодирующей последовательности OPC2 ЦВС в бакуловирусный трансферный вектор с использованием фланкирующих сайтов рестрикции для генерирования трансферных векторов. Рекомбинантный бакуловирус генерируют путем трансфекции клеток насекомых трансферным вектором и ДНК бакуловируса. К подходящим для использования ДНК бакуловируса относятся линейаризованная и/или круговая ДНК бакуловируса. Например, в одном варианте осуществления рекомбинантный бакуловирус генерируют путем контрансфекции клеток насекомого Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) трансферным вектором и линейаризованной ДНК бакуловируса BaculoGold™. В возможном варианте линейаризованная ДНК бакуловируса происходит от вируса ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV) и содержит летальную делецию в локусе полиэдрина, и, таким образом, обеспечивают возможность спасения жизнеспособного бакуловируса после контрансфекции трансферным вектором. Полученный в результате рекомбинантный бакуловирус включает кодирующую последовательность OPC2 ЦВС под контролем полиэдринового промотора бакуловируса. Рекомбинантный бакуловирус амплифицируют на клетках насекомых Sf9, а затем очищают путем

клонирования путем серийных разведений на клетках насекомых Sf9. В некоторых вариантах осуществления используют круговую ДНК бакуловируса полной длины, например, Вас-to-Вас. Например, в Вас-to-Вас применяют транспозон-опосредованную рекомбинацию для вставки нужного гена в полиэдриновый локус. Также возможно применение и других способов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления выбирают способ на основе потенциальной устойчивости способа во время коммерциализации. Например, отбирают бакуловирусы, обеспечивающие повышенную устойчивость в вакцине.

В некоторых вариантах осуществления после высеваания в колбы маточной культуры клеток колбы инкубируют при заданной температуре и в конкретном диапазоне времени. Например, культуру инкубируют при 27 °C в течение четырех часов. В каждую колбу затем высевают рекомбинантный бакуловирус, содержащий ген OPC2 ЦВС. Например, плазмиду, содержащую ген OPC2, трансфицируют с ДНК бакуловируса BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) в клетки насекомых Sf+ (Protein Sciences, Meriden, Коннектикут, США) для генерирования рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген OPC2. Рекомбинантный бакуловирус, содержащий ген OPC2, биологически клонируют и исходный вакцинный вирус (ИВВ) распространяют на линии клеток SF+, аликвотируют и хранят при -70 °C. ИВВ положительно идентифицируют как бакуловирус OPC2 при помощи ПЦР-ПДРФ с применением специфичных к бакуловирусу праймеров. Клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом OPC2 для генерирования ИВВ или рабочего посевного вируса, экспрессируют антиген OPC2, как обнаруживается при помощи поликлональной сыворотки или моноклональных антител в анализе непрямой реакции флуоресцирующих антител. Кроме того, идентичность бакуловируса OPC2 подтверждают путем секвенирования N-концевой аминокислоты. Бакуловирус OPC2 ИВВ также испытывают на чистоту в соответствии с положениями Свода федеральных нормативных актов (С.Ф.Р., глава 9, пункты 113.27 (с), 113.28 и 113.55). Каждый рекомбинантный бакуловирус, посеянный во вращающиеся колбы, может иметь изменчивые показатели множественности инфекции (MOI).

После высеваания бакуловируса колбы инкубируют при 27 ± 2 °C в течение 7 дней, также с возможным перемешиванием в это время при 100 об/мин. В колбах возможно использование вентилируемых крышек, позволяющих

проникать потоку воздуха. Образцы из каждой колбы берут каждые 24 часа на следующие 7 дней. После извлечения каждый образец центрифугируют и осадок и супернатант отделяют, а затем подвергают микрофилтрации через мембрану с размером пор 0,45 - 1,0 мкм.

5 Количество ОРС2 в полученных в результате образцах затем определяют путем анализа ELISA. Анализ ELISA осуществляют с антителом против ЦВС, разведенным до 1:6000 в 0,05 М карбонатного буфера (pH 9,6). 100 мкл антитела затем помещают в лунки микротитрационного планшета, запечатывают и инкубируют в течение суток при 37 °С. Затем планшет трижды промывают

10 промывочным раствором, содержащим 0,5 мл Tween 20 (Sigma, St. Louis, Миссури, США), 100 мл 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Калифорния, США) и 899,5 мл дистиллированной воды. После этого 250 мкл блокирующего раствора (5 г обезжиренного сухого молока Carnation (Nestle, Glendale, Калифорния, США) в 10 мл D-PBS QS, доведенного до 100 мл

15 дистиллированной водой) добавляют в каждую из лунок. Следующий этап состоит в промывании испытательного планшета с последующим добавлением предварительно разведенного антигена. Предварительно разведенный антиген получают путем добавления 200 мкл раствора разбавителя (0,5 мл Tween 20 в 999,5 мл D-PBS) в каждую из лунок на планшете для разведения. Затем образец

20 разводят в соотношении 1:240 и в соотношении 1:480, после чего 100 мкл каждого из этих разведенных образцов добавляют в одну из верхних лунок на планшете для разведения (т. е., в одну верхнюю лунку помещают 100 мкл в разведении 1:240, а в другую – 100 мкл в разведении 1:480). Затем возможно осуществление серийных разведений для остальной части планшета путем

25 удаления 100 мкл из каждой последующей лунки и переноса в следующую лунку на планшете. Содержимое каждой лунки смешивают перед выполнением следующего переноса. Промывание испытательного планшета включает трехкратное промывание планшета промывочным буфером. Затем планшет запечатывают и инкубируют в течение часа при 37 °С перед промыванием

30 промывочным буфером еще три раза. Применяемым идентифицирующим антителом является антитело к ОРС2 ЦВС. Его разводят до 1 к 300 в растворе разбавителя, а затем в лунки добавляют 100 мкл разведенного идентифицирующего антитела. После этого планшет запечатывают и инкубируют в течение часа при 37 °С перед трехкратным промыванием

промывочным буфером. Затем приготавливают конъюгированный разбавитель путем добавления нормальной сыворотки кролика (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Пенсильвания, США) к раствору разбавителя до концентрации 1 %.

5 Конъюгат антитела козы против мыши (H+1)-HRP (Jackson ImmunoResearch) разводят в конъюгированном разбавителе до 1:10,000. 100 мкл разведенного конъюгата антитела затем добавляют в каждую из лунок. Затем планшет запечатывают и инкубируют в течение 45 минут при 37 °C перед трехкратным промыванием промывочным буфером. 100 мкл субстрата (пероксидазный субстрат TMB, Kirkgaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersburg, Мэриленд, США), смешанного с таким же объемом пероксидазного субстрата В (KPL), 10 добавляют в каждую из лунок. Планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем 100 мкл раствора IN HCL добавляют во все лунки для прекращения реакции. После этого планшет пропускают через ELISA-ридер.

15 Предпочтительно клетки насекомых культивируют и белок OPC2 ЦВС получают в бессывороточных условиях, таких как бессывороточные клетки насекомых по Патенту США № 6,103,526 (линия клеток *expresSF+*). Другие линии клеток насекомых включают, помимо прочих, линии клеток *Spodoptera frugiperda* (Sf), такие как Sf21, Sf9, и клетки *expresSF+1* (SF+), BTI-TN5B1 (High Five) из совки капустной *Trichoplusia ni* и клетки BmN из шелкопряда *Bombyx mori* 20 широко используют в исследовании бакуловируса и для производства рекомбинантного белка.

Предполагается наличие адъювантов, супернатантов культур клеток, консервантов, стабилизаторов, вирусных векторов, иммуномодулирующих веществ и доз, раскрываемых в Патентах США №№ 9610345 и 9669087, оба из 25 которых включены в данное описание путем ссылки.

В контексте настоящего изобретения также возможно применение иммуногенных препаратов и ДНК-вакцин, включающих по меньшей мере одну описанную авторами плазмиду, кодирующую и экспрессирующую один из иммуногенов ЦВС1 или ЦВС2 или ЦВС3, предпочтительно одну из 30 вышеупомянутых OPC, помимо ветеринарно приемлемых основы или разбавителя, необязательно с ветеринарно приемлемым адъювантом. В одном варианте осуществления адъювант включает CARBOPOL™ или ImpranFLEX®.

В одном варианте осуществления иммуногенная композиция означает композицию, включающую в дозе 1 мл I) по меньшей мере некоторое количество

белка OPC2 ЦВС, II) бакуловиром, экспрессирующий вышеупомянутый белок OPC2 ЦВС, III) культуру клеток, IV) инактивирующий агент (например, BEI), имеющий концентрацию в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 8 мМ, V) нейтрализующий агент (например, тиосульфат натрия) в эквивалентном количестве с инактивирующим агентом; и VI) заданное количество адъюванта (например, CARBOPOL® 971 или ImpranFLEX®.) и VII) фосфатную соль в физиологически приемлемой концентрации.

В наиболее предпочтительном варианте обеспечиваемая авторами изобретения композиция содержит белок OPC2 ЦВС, добытый из супернатанта *in vitro* культивируемых клеток, причем вышеупомянутые клетки были инфицированы рекомбинантным вирусным вектором, содержащим ДНК OPC2 ЦВС и экспрессируемый белок OPC2 ЦВС, причем вышеупомянутая культура клеток была обработана с применением от приблизительно 2 до приблизительно 8 мМ BEI, предпочтительно приблизительно 5 мМ BEI, для инактивации вирусного вектора, и эквивалентную концентрацию нейтрализующего агента, предпочтительно раствора тиосульфат натрия в конечной концентрации от приблизительно 2 до приблизительно 8 мМ, предпочтительно приблизительно 5 мМ.

Количество кодирующей антиген ЦВС ДНК, используемой в вакцине в соответствии с настоящим изобретением, составляет от приблизительно 10 мкг до приблизительно 2000 мкг, предпочтительно от приблизительно 50 мкг до приблизительно 1000 мкг. Специалисты в данной области техники обладают квалификацией, необходимой для точного определения эффективной дозы ДНК, применяемой согласно каждому протоколу иммунизации или вакцинации.

Объемы доз составляют от 0,5 до 5 мл, предпочтительно от 2 до 3 мл.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает способ вызывания иммунной реакции или иммунологической реакции или защитной иммунной или иммунологической реакции, в том числе против цирковируса свиней (ЦВС), включающий парентеральное или подкожное введение свинье однократного впрыскивания, однократного введения или однократной дозы (I) по меньшей мере 2 мкг до приблизительно 400 мкг рекомбинантного белка OPC2 ЦВС, экспрессируемого бакуловиром системой, и (II) ветеринарно приемлемого носителя, включающего растворитель, дисперсионную среду, покрытие, стабилизатор, разбавитель, консервант,

противомикробное средство, противогрибковое средство, изотонический агент, задерживающий адсорбцию агент, адъювант, супернатант культуры клеток, стабилизатор, вирусный или экспрессирующий вектор, иммуномодулирующий агент и/или любую их комбинацию.

5 В предпочтительном варианте осуществления вакциной ЦВС является Ingelvac CircoFLEX® (см., например, публикацию WO 2006/072065).

В публикациях WO2006/072065 и WO2008/076915 описано генерирование вакцины ЦВС, ее рецептирование и ее введение.

10 В предпочтительном варианте осуществления вакцина имеет дозу от приблизительно 2 мкг до приблизительно 400 мкг антигена ЦВС. Таким образом, вакцина имеет дозу от приблизительно 2 мкг до приблизительно 400 мкг белка OPC2 ЦВС2.

15 В другом предпочтительном варианте осуществления вакцина имеет дозу от приблизительно 4 мкг до приблизительно 200 мкг антигена ЦВС. Таким образом, вакцина имеет дозу от приблизительно 4 мкг до приблизительно 200 мкг белка OPC2 ЦВС2.

20 В еще одном предпочтительном варианте осуществления вакцина имеет дозу приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мкг антигена ЦВС. Таким образом, вакцина имеет дозу приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мкг белка OPC2 ЦВС2.

25 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением включает антиген *Lawsonia intracellularis* и один или несколько антигенов ЦВС, причем антиген *Lawsonia intracellularis* является живым *Lawsonia intracellularis*, предпочтительно ослабленным *Lawsonia intracellularis* или аттенюированным живым *Lawsonia intracellularis*.

30 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением включает антиген *Lawsonia intracellularis* и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®, причем антиген *Lawsonia intracellularis* является живым *Lawsonia intracellularis*, предпочтительно ослабленным *Lawsonia intracellularis* или аттенюированным живым *Lawsonia intracellularis*.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением имеет дозу антигена *Lawsonia intracellularis* приблизительно от 10^3 до 10^9 бактерий/кг массы тела, предпочтительно приблизительно от 10^5 до

10⁷ бактерий/кг массы тела, и включает антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®, причем антиген *Lawsonia intracellularis* является живым *Lawsonia intracellularis*, предпочтительно ослабленным *Lawsonia intracellularis* или аттенюированным живым *Lawsonia intracellularis*.

5 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением имеет дозу антигена *Lawsonia intracellularis* от приблизительно 10⁵ до приблизительно 10⁷ бактерий *Lawsonia intracellularis* и включает антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®, причем антиген *Lawsonia intracellularis* является живым *Lawsonia intracellularis*,
10 предпочтительно ослабленным *Lawsonia intracellularis* или аттенюированным живым *Lawsonia intracellularis*.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Peitis, и один или несколько антигенов ЦВС.

15 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Peitis, и один или несколько антигенов ЦВС, причем ЦВС является ЦВС1, ЦВС2 или ЦВС3.

20 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Peitis, и один или несколько антигенов ЦВС, причем антиген(ы) ЦВС является / являются (а) рекомбинантным(и) полипептидом(ами), предпочтительно экспрессируемым(и) в клетках бакуловируса.

25 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Peitis, и один или несколько антигенов ЦВС, причем антиген(ы) ЦВС является / являются (а) рекомбинантным(и) полипептидом(ами), экспрессируемым(и) геном ОРС ЦВС, предпочтительно экспрессируемым(и) в клетках бакуловируса.

30 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Peitis, и один или несколько антигенов ЦВС, причем антиген(ы) ЦВС является / являются (а) рекомбинантным(и) полипептидом(ами),

экспрессируемым(и) геном OPC2 ЦВС, предпочтительно экспрессируемым в клетках бакуловируса.

В особенно предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с изобретением включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Pleitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

Предпочтительный способ иммунизации или вакцинации состоит в системном введении вакцины в соответствии с изобретением и согласно изложенному непосредственно выше. Способы системного введения описаны авторами и включают, помимо прочего, внутримышечное и внутрикожное введение.

Соответственно, предпочтительный способ иммунизации или вакцинации состоит во введении вакцины в соответствии с изобретением внутримышечным путем.

В одном аспекте вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает антиген *M. hyo*. Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается иммуногенная композиция для вызывания защитной иммунной реакции у свиньи против *M. hyo*. В еще более предпочтительном варианте количество антигена *M. hyo*. в каждой дозе имеет относительную активность (ОА) по меньшей мере 1,22, причем показатель относительной активности 1,22 означает, что по меньшей мере у 95 %, предпочтительно у 100 % мышей, получающих одну сороковую (1/40) такого количества антигена *M. hyo*., вырабатывается обнаружимое количество антител в течение или через 21 день после лечения согласно анализу обнаружения специфичного к *M. hyo*. антитела. Таким образом, 40-кратное количество антигена *M. hyo*., необходимого для вызывания обнаружимого *M. hyo*-специфичного иммунного ответа у по меньшей мере 95 %, предпочтительно у 100 % мышей в течение или через 21 день после лечения, является достаточным для обеспечения защитной иммунной реакции против клинических признаков, связанных с инфекцией *M. hyo*., снижения их частоты и/или уменьшения их тяжести или их предотвращения. Другими словами, было продемонстрировано, что количество антигена *M. hyo*., как описано выше, позволяет преодолевать любое отрицательное взаимодействие с антигеном ЦВС при смешивании и введении в форме комбинированной вакцины. В некоторых предпочтительных формах композиция также включает

или содержит адъювант. С точки зрения настоящего изобретения подходящими являются разные адъюванты, выбираемые специалистами в данной области техники, однако особенно предпочтительными являются карбомер, еще более предпочтительно – CARBOPOL® (высокомолекулярный сшитый полимер полиакриловой кислоты) или ImgranFLEX®. Предпочтительно иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает защитную иммунную реакцию, снижает частоту и/или уменьшает тяжесть и/или предотвращает возникновение клинических признаков, связанных с инфекцией *M. hyo.*, предпочтительно при введении свинье однократной дозой. Такая однократная доза обеспечивает длительность иммунитета по меньшей мере 100, более предпочтительно – по меньшей мере 110, еще более предпочтительно – по меньшей мере 120, еще более предпочтительно – по меньшей мере 130, еще более предпочтительно – по меньшей мере 140, еще более предпочтительно – по меньшей мере 150, еще более предпочтительно – по меньшей мере 160, еще более предпочтительно – по меньшей мере 170, еще более предпочтительно – по меньшей мере 180, наиболее предпочтительно – по меньшей мере 184 дня после введения свинье. Другими словами, одна доза иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением, без бустерных или последующих доз, обеспечивает для животного или группы животных снижение частоты или уменьшение тяжести клинических признаков инфекции *M. hyo.* в течение по меньшей мере 100 (110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 и т. д.), наиболее предпочтительно – по меньшей мере 184 дней. В отношении анализа обнаружения антител специалисты в данной области техники смогут распознать и использовать соответствующие продукты. Предпочтение отдают анализам ELISA, в особенности испытательному комплекту IDEXX Herdchek *M. hyo.* Test Kit™ (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Мэн, США). В частности, возможно применение испытательного комплекта IDEXX Herdchek *M. hyo.* Test Kit™ (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Мэн, США) для контрольного анализа в контексте настоящего изобретения.

В контексте данного описания "защитная иммунная реакция" означает снижение частоты или уменьшение тяжести клинических, патологических или гистопатологических признаков инфекции *M. hyo.* вплоть до полного предотвращения таких признаков. "Защитная иммунная реакция" запускается иммунологически эффективным количеством антигена или вакцины.

Термин "антиген *M. hyo.*" касается любой композиции вещества, которая включает по меньшей мере один антиген, способный вызывать, стимулировать или усиливать иммунную реакцию против инфекции *M. hyo.* при введении животному, предпочтительно свинье. В предпочтительном варианте

5 вышеупомянутый антиген *M. hyo.* является полным бактерином *M. hyo.*, предпочтительно в инактивированной форме, живой модифицированной или ослабленной бактерией *M. hyo.*, химерным вирусом, включающим по меньшей мере иммуногенную аминокислотную последовательность *M. hyo.*, или любым

10 другим полипептидом или компонентом, который включает по меньшей мере иммуногенную аминокислотную последовательность *M. hyo.* В предпочтительном варианте антиген *M. hyo.* является инактивированным бактерином *M. hyo.* В более предпочтительном варианте антиген *M. hyo.* происходит от J-штамма *M. hyo.* В наиболее предпочтительном варианте

15 бактерий *M. hyo.* является инактивированным бактерином *M. hyo.*, включенным в вакцину INGELVAC® MYCOFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph, Миссури, США), или является INGELVAC® MYCOFLEX. Однако в возможном варианте антиген *M. hyo.*, который применяют в соответствии с изобретением, также выбирают из любого из антигенов, включенных в

20 следующие композиции вакцин: PORCILIS M. HYO, MYCO SILENCER® BPM, MYCO SILENCER® BPME, MYCO SILENCER® ME, MYCO SILENCER® M, MYCO SILENCER® ONCE, MYCO SILENCER® MEH (все от Intervet Inc., Millsboro, Делавэр, США) STELLAMUNE MYCOPLASMA™ (Pfizer Inc., New York, Нью-Йорк, США), SUVAXYN MYCOPLASMA™, SUVAXYN M. HYO™, SUVAXYN MH-ONE™ (все от Fort Dodge Animal Health, Overland Park, Канзас,

25 США (Wyeth). В предпочтительном варианте предусмотрена доза 2 мл супернатанта и/или бактерии *M. hyo.*

Существующие вакцины *M. hyo.* изготавливают из цельноклеточных препаратов убитой микоплазмы (бактеринов). Соответственно, "бактерин" в контексте данного описания относится к цельноклеточным препаратам бактерий,

30 в частности, *M. hyo.*, которые предпочтительно являются убитыми цельноклеточными препаратами. В случаях, когда вакцина или антиген описывается авторами как "супернатант", вышеупомянутый супернатант составляет растворимую фракцию / часть цельноклеточного препарата (убитого). Настоящее изобретение также предусматривает применение растворимой части

цельноклеточного препарата *M. hyo.*, причем растворимая часть препарата *M. hyo.* Практически не содержит (I) IgG и (II) иммунных комплексов, состоящих из антигена, связанного с иммуноглобулином (см., например, Патент США № 10,206,991). В некоторых вариантах осуществления растворимая часть препарата

5 *M. hyo.* включает по меньшей мере один антиген белка *M. hyo.* В других вариантах осуществления растворимая часть препарата *M. hyo.* включает два или более антигенов белка *M. hyo.* В одном варианте осуществления фракция супернатанта *M. hyo.* включает один или несколько следующих специфических антигенов белка *M. hyo.*: белки *M. hyo.* с молекулярной массой приблизительно

10 46 кДа (p46), 64 кДа (p64) и 97 кДа (p97). В другом варианте осуществления фракция супернатанта по меньшей мере включает антигены белка *M. hyo.* p46, p64 и p97. Белок *M. hyo.* приблизительно 64 кДа (p64) в альтернативном варианте указывается авторами как поверхностный антиген p65 из *M. hyo.*, описываемый в публикации Kim et al. (Infect. Immun. 58(8): 2637 - 2643 (1990)), а

15 также в Патенте США № 5,788,962.

Любой штамм *M. hyo.* Является подходящим в качестве исходного материала для получения растворимой части препарата *M. hyo.* Подходящие штаммы *M. hyo.* получают из коммерческих или академических источников, включая депозитории, такие как Американская коллекция типовых культур

20 (ATCC) (Manassas, Вирджиния) и Коллекция культур Северной региональной исследовательской лаборатории (NRRL) (Служба сельскохозяйственных исследований, Министерство сельского хозяйства США, Пеория, Иллинойс). Только в ATCC на продажу предлагаются следующие шесть штаммов *M. hyo.*: *M. hyo.* ATCC 25095, *M. hyo.* ATCC 25617, *M. hyo.* ATCC 25934, *M. hyo.* ATCC

25 27714, *M. hyo.* ATCC 27715 и *M. hyo.* ATCC 25934D. Предпочтительный штамм *M. hyo.* для применения в вариантах осуществления этого изобретения идентифицирован как штамм P-5722-3, ATCC #55052, депонированный 30 мая 1990 г. согласно правилам доступа, соблюдения которых требует Бюро США по патентам и торговым знакам. С учетом широкого распространения заболевания

30 получение штаммов также возможно путем извлечения *M. hyo.* Из секретий легких или ткани свиней, инфицированных известными штаммами, вызывающими первую атипичную пневмонию у свиней.

Возможен гибкий временной график инъекций. Применение описываемых авторами композиций возможно уже в трехнедельном возрасте, когда поросят

забирают из дорашивания с целью вакцинирования по меньшей мере за 2 недели до подвергания воздействию *M. hyo*. Вакцину в соответствии с изобретением применяют любым традиционным способом, включая внутрикожный, внутритрахеальный или внутривагинальный. Вакцину в соответствии с изобретением также применяют путем системного введения. Композицию предпочтительно применяют внутримышечно или внутрикожно.

В публикациях WO2009/126356, US8444989, US 8852613 и US 8940309 описано генерирование бактеринов *M. hyo*., их рецептирование и введение.

В предпочтительном варианте осуществления количество антигена *M. hyo*. в каждой дозе имеет относительную активность (RP) по меньшей мере 1,22.

В другом предпочтительном варианте осуществления бактериин *M. hyo*. включает количество антигена от $5 \log_{10}$ до $8 \log_{10}$ на мл перед инактивацией.

В предпочтительном варианте осуществления вакциной *M. hyo*. является Ingelvac MycoFLEX®. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления антигеном *M. hyo*. является антиген *M. hyo*., включенный в Ingelvac MycoFLEX®.

Предпочтительный способ иммунизации или вакцинации состоит во введении вакцины в соответствии с изобретением путем системного введения, например, внутримышечно.

В одном аспекте вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает антиген ВРРСС. Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается иммуногенная композиция для вызывания защитной иммунной реакции у свиньи против ВРРСС. Вирусные оболочечные белки ВРРСС разделяют на две общие категории мажорных и минорных белков в зависимости от содержания белков в вирионе. Мажорными вирусными оболочечными белками являются gr5 (ОРС 5) и М (ОРС 6), образующие димер. Минорными оболочечными белками являются gr2 (ОРС2), gr3 (ОРС3), gr4 (ОРС4) и Е (ОРС2b) и, возможно, недавно идентифицированный вирусный белок gr5a (ОРС 5a). Активный антигенный компонент включает ОРС4, ОРС5, ОРС6 или ОРС7 из вируса ВРРСС.

Рекомбинантный антиген ВРРСС экспрессируется в векторной вакцине ВРРСС или композиции, включающей один или несколько подвергнутых инженерии, рекомбинантных аденовирусных векторов, которые содержат и экспрессируют определенные антигены ВРРСС, и, необязательно,

фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, адъювант, формообразующее или основу. Предпочтительно вектор является аденовирусным вектором, хотя предполагаются и другие векторы, такие как бакуловир.

5 ВРРСС предполагает любой штамм, поскольку описываемые авторами новые и созданные в соответствии с изобретением композиции и способы общеприменимы ко всем известным и еще ожидающим открытия штаммам ВРРСС. Вирус ВРРСС существует в двух генотипах, называемых “US” и “EU”, которые имеют приблизительно 50 % гомологии последовательностей (Dea S et al. (2000). Arch Virol 145: 659 - 88). Эти два генотипа также различают по их иммунологическим свойствам. Большая часть касающейся секвенирования информации о разных изолятах основана на структурных белках, таких как оболочечный белок GP5, на который приходится лишь приблизительно 4 % вирусного генома, и при этом мало известно о неструктурных белках (nsp).

10 Выделение ВРРСС и производство вакцин описывается во многих публикациях (WO 92/21375, WO 93/06211, WO 93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930, US 10,039,821). Антиген ВРРСС включает минорные белки ВРРСС (например, gp2, gp3, gp4, gp5a, gp5 или E) в любой комбинации и необязательно включает дополнительные мажорные белки ВРРСС

15 (например, gp5 или M). Например, антигены ВРРСС представлены на поверхности вирусоподобных частиц (ВПЧ). В других вариантах осуществления животному-хозяину вводят растворимые варианты антигенов, причем возможна олигомеризация (включая тримеризацию) белков друг с другом или, дополнительно, с компонентами VSV-G, или другими вирусными белками или

20 любая олигомеризация (включая мотивы тримеризации) (например, мотивы из бактериального GCN4, и т. п.). Кроме того, предполагается, что домены TM/CT вирусных поверхностных гликопротеинов Типа I выполняют ту же задачу, что и соответствующие домены из VSV-G, и, таким образом, являются взаимозаменяемыми с ними.

30 В некоторых вариантах осуществления вакцина ВРРСС является рекомбинантной вакциной. В этом случае один или несколько векторов включают: нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, полипептид, эктодомен или его вариант ВРРСС E; или нуклеотидную последовательность, кодирующую модифицированный антиген, полипептид,

эктодомен или его вариант ВРРСС gr2, gr3, gr4, gr5a, gr5 или М, причем существующая последовательность клеточной локализации gr2, gr3, gr4, gr5a, gr5 или М была заменена последовательностью детерминации экспрессии на поверхности клеток из гетерологичного гена. В некоторых вариантах осуществления один или несколько векторов включают смесь двух векторов, из которых первый вектор экспрессирует перенацеленные минорные белки ВРРСС, а второй вектор экспрессирует перенацеленные мажорные белки ВРРСС.

В контексте настоящего изобретения применяют способы продуцирования живого вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (ВРРСС) для применения в производстве вакцин и других композиций. Согласно типичным способам продуцирования, вирус выращивают на линии клеток, которая подвержена инфицированию ВРРСС. Однако при таких общих способах линию клеток выращивают до конфлюэнтности или почти до конфлюэнтности перед инфицированием ВРРСС.

Согласно предпочтительному способу, линия клеток не требует высева и выращивания перед инфицированием ВРРСС – ВРРСС и линию клеток добавляют в процессе культивирования клеток одновременно. Таким образом, вышеупомянутый способ обеспечивает значительное преимущество экономии времени, средств и материалов при массовом производстве вируса в промышленном масштабе. Термин "промышленный масштаб" касается объемов культуры клеток, превышающих 10 л. Например, промышленный масштаб для живого ВРРСС означает объемы производства в пределах от 10 л до 3000 л. В более конкретных вариантах осуществления объем составляет от 30 л до приблизительно 300 л.

Описываемые авторами способы применимы для продуцирования любого штамма ВРРСС, включая, помимо прочих, штамм ВРРСС, депонированный как ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, и VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388 или ECACC V93070108. В особенно предпочтительных вариантах осуществления способы согласно изобретению применяют для продуцирования штамма ВРРСС 94881, депонированного в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) под номерами доступа ECACC 11012501 (родительский штамм), и ECACC 11012502 (многократно пассированный ослабленный ИВВ), каждый из которых депонирован 25 января 2011 г. в соответствии с положениями Будапештского договора, или любого

потомства одного из вышеупомянутых штаммов. Возможно выращивание любого из вышеупомянутых вирусов в их ослабленном формате. В альтернативном варианте вирусы являются генетически модифицированными таким образом, чтобы включать одну или несколько гетерологичных нуклеиновых кислот, кодирующих другие антигенные детерминанты одного или нескольких заболеваний свиней.

Специалисту в данной области техники станет понятно, что существует множество линий клеток, подверженных инфицированию ВРРСС. Типичными клетками являются клетки альвеолярных макрофагов свиней, например, производные от клеток MARC-145. К другим клеткам, подверженным инфицированию ВРРСС, относятся клетки МА-104; клетки почки новорожденного хомяка (ВНК); клетки яичника китайского хомячка (СНО); и клетки почек африканской зеленой мартышки, отличные от клеток МА-104 или клеток MARC-145, такие как клетки VERO; клетки трансфицируют. Кроме того, возможно использование первичных клеток свиньи, адаптированных для длительного роста в культуре. Особенно подходящими клетками-хозяевами являются линия клеток обезьян МА-104, клетки Vero или альвеолярные макрофаги свиней. ВРРСС предпочтительно выращивают в альвеолярных макрофагах легких (Wensvoort et al., 1991). Несколько линий клеток, таких как CL2621 и другие линии клеток, клонированные из линии клеток почек обезьян МА-104 (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992; Kim et al., 1993) также восприимчивы к вирусу и являются подходящими для описываемых авторами способов крупномасштабного производства.

Согласно типичному способу, показанному в Примере 1 Патента США № 9,944,902, обеспечивается параллельный процесс получения МЖВ ВРРСС 94881. Хотя эта процедура показана для МЖВ ВРРСС 94881, специалистам в данной области техники станет понятно, что существует возможность применения этой процедуры для любого ВРРСС, для которого требуется крупномасштабное производство.

Вирусы, получаемые описанным способом продуцирования, применяют для обеспечения антигена ВРРСС для применения в вакцине в соответствии с изобретением, в частности, МЖВ ВРРСС.

Штаммы вирусов, выращиваемые в соответствии с вышеупомянутыми способами, являются вирулентными вирусами РРСС, ослабленными вирусами

РРСС или фактически вирусами РРСС, которые были модифицированы для придания им дополнительных нужных свойств. Этого достигают с применением классических технологий размножения и отбора, таких как непрерывное размножение в подходящих клетках-хозяевах для расширения ослабленного фенотипа. В альтернативном варианте штаммы генетически модифицируют путем направленной мутации нуклеиновокислотной последовательности геном этих штаммов с применением подходящих технологий генной инженерии. Геном ВРРСС полностью или частично секвенирован (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a, Murthaugh et al, 1995) и кодирует, помимо РНК-зависимой РНК-полимеразы (ОРС 1a и 1b), шесть структурных белков, из которых четыре являются оболочечными гликопротеинами GP2 (ОРС2), GP3 (ОРС3), GP4 (ОРС4) и GP5 (ОРС5), негликозилированный мембранный белок М (ОРС6) и нуклеокапсидный белок N (ОРС7) (Meulenberg et al. 1995, 1996; van Nieuwstadt et al., 1996). Иммунологическая характеристика и нуклеотидное секвенирование европейских и американских штаммов ВРРСС позволили распознать незначительные антигенные различия в пределах штаммов ВРРСС, которые расположены в структурных вирусных белках (Nelson et al., 1993; Wensvoort et al., 1992; Murtaugh et al., 1995).

Действительно, типичным вирусом является вирус ВРРСС 94881. Хотя ослабленный штамм выращивают с применением описываемых авторами способов, вполне возможен вариант, в котором вирус является вирусом ВРРСС 94881, преобразованным в химерный вирус, причем остов вируса ВРРСС 94881 под номером доступа ЕСАСС 11012502 или фактически родительского штамма, депонированного под номером доступа ЕСАСС 11012501, модифицируют для замены эндогенной последовательности одной или нескольких из ОРС 1a, ОРС 1b, ОРС 2, ОРС 3, ОРС 4, ОРС 5, ОРС 6 или ОРС 7 на соответствующую ОРС из другого штамма вируса РРСС. Например, в возможном варианте другой штамм вируса РРСС является другим европейским штаммом, таким как штамм вируса Lelystad (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), или других штаммов, таких как те, которые депонированы под номерами доступа ЕСАСС 04102703, ЕСАСС 04102702, ЕСАСС 04102704, номером доступа CNCM I-1140, номером доступа CNCM I-1387, номером доступа CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 и VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, или ЕСАСС V93070108 или фактически является американским

штаммом, таким как североамериканский вирус РРСС, рТ7Р129А; депонирование в ATCC VR-2332, депонирование в ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 и ATCC VR 2402.

5 Рекомбинантные технологии для получения модифицированных последовательностей общеизвестны среди специалистов в данной области техники и, как правило, включают построение копии комплементарной ДНК
10 полной длины (инфекционных клонов) вирусного генома, который затем модифицируют путем рекомбинации и манипуляции ДНК (например сайт-направленного мутагенеза и т. п.). Таким образом, например, модифицируют антигенные сайты или ферментные свойства вирусных белков. Инфекционные клоны штаммов вирусов РРСС европейского и североамериканского генотипа описаны в литературе и поддаются выращиванию с применением способов согласно изобретению.

15 В предпочтительном варианте вакцины в соответствии с настоящим изобретением включают модифицированный живой ВРРСС, включающий один или несколько этих штаммов, живых в подходящем носителе, однако также возможно использование инактивированного вируса для приготовления убитой вакцины (УВ). МЖВ, как правило, рецептируют таким образом, чтобы
20 обеспечивалась возможность введения от 10^1 до 10^7 вирусных частиц на дозу, предпочтительно от 10^3 до 10^5 частиц на дозу, более предпочтительно от 10^4 до 10^5 частиц на дозу ($4,0 - 5,0 \log_{10}$ ЦПД₅₀). В возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает дозу антигена ВРРСС от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^7 вирусных частиц на дозу. УВ
25 рецептируют на основе прединактивационного титра от 10^3 до 10^{10} вирусных частиц на дозу. В возможном варианте вакцина включает фармацевтически приемлемый носитель, например, физиологический солевой раствор. Вакцина необязательно включает адъювант. Примером подходящего адъюванта является ацетат альфа-токоферола, который приобретают под торговым названием
30 Diluvac Forte®. В альтернативном варианте, используют, например, адъюванты на основе алюминия.

Свиней инфицируют ВРРСС ороназальным путем. Вирус в легких поглощается альвеолярными макрофагами легких, и в этих клетках репликация ВРРСС завершается в течение 9 часов. ВРРСС перемещается из легких в

лимфатические узлы легких в течение 12 часов и в периферийные лимфатические узлы, костный мозг и селезенку в течение 3 дней. В этих местах только некоторые клетки положительно окрашиваются на вирусный антиген. Вирус присутствует в крови в течение по меньшей мере 21 дня и часто гораздо
 5 дольше. Через 7 дней антитела к ВРСС обнаруживают в крови. Наличие комбинации вируса и антитела у инфицированных РСС свиней демонстрирует, что вирусная инфекция способна сохраняться в течение длительного времени, пускай и на низком уровне, несмотря на присутствие антитела. В течение по
 10 меньшей мере 7 недель популяция альвеолярных клеток в легких отличается от показателя нормальных легких SPF.

В возможном варианте вакцина присутствует в форме лиофилизированного препарата живого вируса, подлежащего восстановлению влагосодержания растворителем для получения раствора для инъекций. Таким образом, после
 15 этапов сбора согласно описываемым способам вирус комбинируют и подвергают лиофилизации. В возможном варианте растворителем является, например, вода, физиологический раствор или буфер, или адъювантный растворитель. В растворителе возможно содержание адъювантов, например, ацетата альфа-токоферола. Восстановленную вакцину затем вводят свинье путем инъекции, например, например, внутримышечной или внутрикожной инъекции в шею. Для
 20 внутримышечной инъекции применяют объем 2 мл, для внутрикожной инъекции он, как правило, составляет 0,2 мл. Таким образом, в еще одном аспекте настоящее изобретение касается вакцинного продукта, содержащего в отдельных контейнерах лиофилизированную композицию вируса и растворитель для восстановления влагосодержания и, необязательно, также включающего
 25 аннотацию или ярлык с инструкцией по применению.

Вакцина, приготовленная из вируса, продуцируемого с применением вышеописанного способа, не только содержит один или несколько из вышеупомянутых штаммов, но и включает дополнительные компоненты, активные против РСС или других вирусных или бактериальных заболеваний
 30 свиней, таких как *Lawsonia intracellularis*, ЦВС и/или *M. hyo*. Таким образом, изобретение также касается описываемой вакцины, характеризующейся тем, что она содержит по меньшей мере еще один антиген, действующий против болезни свиней, отличной от РСС. Кроме того, в возможном варианте вакцина включает определенные фармацевтически или ветеринарно приемлемые адъюванты.

Одним из таких адъювантов является альфа-токоферол. Таким образом, новые вакцинные композиции, в частности, вирусные вакцины РРСС, включающие ВРРСС 94881, поддаются улучшению путем добавления адъювантов. Такие улучшения включают приготовление вакцин в комбинации с адъювантами, 5 повышающими эффективность вакцины, таким образом, чтобы наблюдался улучшенный клинический ответ / результат при введении комбинации адъюванта и вакцины по сравнению с введением только вакцины. Например, композиции вакцины в соответствии с изобретением в возможном варианте включают вирусную вакцину ВРРСС 94881 и адъювант, выбранный из группы, 10 состоящей из МСР-1, фракций *Haemophilus sonnmus*, Carborol® и их комбинаций. В некоторых возможных вариантах осуществления вирусная вакцина включает вирусную вакцину ВРРСС 94881, являющуюся рекомбинантной субъединичной вакциной или, в альтернативном варианте, живой ослабленной вирусной вакциной. Типичной существующей живой вакциной является МЖВ 15 Ingelvac®РРСС, и ВРРСС 94881 рецептируют подобно МЖВ Ingelvac®РРСС.

В добавление к вышеизложенному композиции вакцин в возможных вариантах содержат другие ингредиенты, если эти другие ингредиенты не препятствуют адъювантным свойствам МСР-1, фракций *Haemophilus sonnmus*, Carborol® или другого карбомера или лежащей в основе вирусной вакцины. К 20 таким другим ингредиентам относятся, например, связующие, красители, сиккаты, антисептики, смачивающие агенты, стабилизаторы, формообразующие, адгезивы, пластификаторы, вещества, повышающие клейкость, загустители, трансдермальные материалы, основы мазей, удалители кератина, основные вещества, стимуляторы абсорбции, жирные кислоты, 25 сложные эфиры жирных кислот, высшие спирты, поверхностно-активные вещества, вода и буферные агенты. Предпочтительно к другим ингредиентам относятся буферные агенты, основы мазей, жирные кислоты, антисептики, основные вещества или поверхностно-активные вещества.

Содержание или количество адъювантов, применяемых согласно 30 изобретению, варьируют и определяются с учетом, например, свойств применяемой вирусной вакцины РРСС и лекарственной формы.

Композиции вакцин в соответствии с изобретением рецептируют любым способом, известным специалистам в области рецептуры, например, в жидкие препараты, суспензии, мази, порошки, лосьоны, эмульсии типа вода в масле,

эмульсии типа масло в воде, эмульсии, кремы, припарки, пластыри и гели и предпочтительно применяют в качестве медикаментов. Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения, обеспечивается фармацевтическая композиция, включающая вышеупомянутую композицию вакцины. Композиция вакцины в соответствии с настоящим изобретением при кожном введении в значительной мере вызывает выработку антител. Соответственно, в другом варианте осуществления композицию в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают в форме чрескожного препарата.

При введении в организм адъюванта и вирусной вакцины РРСС клинический исход для животного улучшается. Эффективное количество адъюванта и иммунологически эффективное количество вирусной вакцины РРСС надлежащим образом определяет специалист в данной области техники, учитывая, например, тип и свойства антигенного вещества, виды организмов, возраст, массу тела, тяжесть заболеваний, тип заболеваний, время введения и способ введения, а также с использованием количества антитела, выработанного против антигенного вещества в организме, в качестве показателя.

Вирусную вакцину РРСС, адъювант или их комбинации вводят в организмы любым подходящим способом, выбранным, например, в зависимости от состояния пациентов и свойств заболевания. Примерами таких способов являются внутрибрюшинное введение, кожное введение (например, подкожная инъекция, внутримышечная инъекция, внутрикожная инъекция и нанесение пластыря), назальное введение, пероральное введение, мукозальное введение (например, ректальное введение, вагинальное введение и роговичное введение). Среди них предпочтение отдают внутримышечному введению.

Типичная терапевтическая доза МЖВ ВРРСС составляет приблизительно два миллилитра (2 мл). Специалистам в данной области техники станет понятно, что количество дозы варьирует в зависимости от породы, размера и других физических факторов отдельного субъекта, а также конкретной рецептуры МЖВ ВРРСС и пути введения. В предпочтительном варианте МЖВ ВРРСС вводят однократной дозой; однако возможно и применение дополнительных доз. Специалисту в данной области техники по ознакомлении с настоящим изобретением также станет понятно, что на дозировку и количество доз влияют возраст и физическое состояние свиньи, а также, другие учитываемые в данной области факторы и конкретные условия, при которых вводят МЖВ ВРРСС.

В некоторых других возможных вариантах осуществления вакцина представляет собой поливалентную вакцину, которая включает два или более вирусов РРСС, причем по меньшей мере один из вирусов РРСС является ослабленным вирусом 94881, депонированным под номером доступа ЕСАСС 11012502. Другими вирусами РРСС являются один или несколько вирусов, выбранных из группы, состоящей из штамма ВРРСС, депонированного под номерами доступа штамма вируса Lelystad (агент Lelystad (CDI-NL-2.91), или других штаммов, таких как те, которые депонированы под номерами доступа ЕСАСС 04102703, ЕСАСС 04102702, ЕСАСС 04102704, номером доступа CNCM I-1140, номером доступа CNCM I-1387, номером доступа CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, и VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388 или ЕСАСС V93070108, или фактически является американским штаммом, таким как североамериканский вирус РРСС, рТ7Р129А; депонирование в ATCC VR-2332, депонирование в ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 и ATCC VR 2402.

Вакцины на основе вирусов РРСС применяют для вакцинации как поросят, так и свиноматок. В одном аспекте изобретения конкретный режим дозирования выбирают в зависимости от возраста свиньи и антигена, выбранного для введения. Это позволяет свиньям любого возраста получать наиболее эффективную дозу на основе сделанного благодаря настоящему изобретению открытия, что инфекция ВРРСС (как от воздействия дикого типа, так и от вакцинации) гораздо быстрее устраняется у старших животных. Таким образом, в некоторых отношениях вакцинация старших животных является предпочтительной, однако эта вакцинация более молодых свиней, включая поросят трехнедельного возраста и моложе, помогает вызвать активный иммунитет и остается очень благоприятной. Возраст животного является важным фактором в сдерживании РРСС, а также возможным фактором, влияющим на вакцинацию и выработку эффективной иммунной реакции. Таким образом, возраст, управление течением заболевания, содержание животных, врожденный и активный иммунитет являются важными факторами и должны учитываться в стратегии контроля.

Вакцину ВРРСС вводят любым традиционным путем, и в некоторых предпочтительных способах предусмотрено назальное введение. В

предпочтительном варианте вводимая вакцина ВРРСС обеспечивает преимущества лечения или уменьшения тяжести или частоты инфицирования ВРРСС после однократной дозы, как при Ingelvac РРСС®, однако в случае выбора других антигенов или комбинации или поливалентных вакцин следует

5 понимать, что существует возможность их введения традиционным способом, включающим одну или несколько бустерных доз после первоначального введения. Специалисты в данной области техники смогут определить надлежащий уровень доз на основе выбранной вакцины ВРРСС и возрастных пределов животного, которому вводят антиген.

10 В предпочтительном варианте осуществления вакцина ВРРСС представляет собой МЖВ Ingelvac РРСС®. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления антиген ВРРСС является антигеном ВРРСС, включенным в МЖВ Ingelvac РРСС®. Предпочтительный способ иммунизации или вакцинации состоит во введении вакцины в соответствии с изобретением путем системного

15 введения, например, внутримышечным путем.

В особенно предпочтительном варианте осуществления антиген ЦВС, антиген *M. hyo.* и антиген ВРРСС являются антигеном ЦВС, антигеном *M. hyo.* и антигеном ВРРСС, включенными в 3FLEX®.

В особенно предпочтительном варианте осуществления антиген *Lawsonia intracellularis* лиофилизируют и растворяют в вакцине 3FLEX®. В другом

20 особенно предпочтительном варианте осуществления антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Ileitis, растворяют в вакцине 3FLEX®. В еще более предпочтительном варианте осуществления антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Ileitis, растворяют в Ingelvac

25 CircoFLEX®. Объем вакцины составляет 2 мл.

Изобретение также предусматривает вакцину, которая в возможном варианте также включает одно или несколько противомикробных средств. К противомикробным средствам, помимо прочих, относятся тиамулин и/или хлортетрациклин. В этом случае доза тиамулина составляет приблизительно 35

30 г/т или приблизительно 35 млн⁻¹, а доза хлортетрациклина составляет приблизительно 400 г/т или приблизительно 400 млн⁻¹.

Комбинированную вакцину в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно вводят внутримышечно, хотя пероральное введение также возможно.

Настоящее изобретение также охватывает комбинации с антигенами из другого болезнетворного для свиней микроорганизма. Предпочтительно другой болезнетворный для свиней микроорганизм выбирают из группы, к которой относятся: актинобациллезная плевропневмония; аденовирус; альфавирус, такой как вирусы восточного энцефаломиелита лошадей; бордетелла бронхисептика; виды *Brachyspira*, предпочтительно *B. hyodysenteriae*; *B. piosicoli*, *Brucella suis*, предпочтительно биовары 1, 2 и 3; вирус классической чумы свиней; виды *Clostridium*, предпочтительно *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* типов A, B и C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; коронавирус, предпочтительно респираторный коронавирус свиней; *Eperythrozoonosis suis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, предпочтительно подтипов 1, 7 и 14; вирус *Hemagglutinating encephalomyelitis*; вирус японского энцефалита; виды *Leptospira*, предпочтительно *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagicae* и *Leptospira interrogans*, *Leptospira pomona*, *Leptospira tarassovi*; виды микобактерий, предпочтительно *M. avium*, *M. intracellulare* и *M. bovis*; *Pasteurella multocida*; цитомегаловирус свиней; парвовирус свиней; вирус псевдобешенства; ротавирус; виды сальмонеллы, предпочтительно *S. thyphimurium* и *S. choleraesuis*; *Staph. hyicus*; виды стафилококков, предпочтительно виды стрептококков, предпочтительно *Strep. suis*; вирус герпеса свиней; вирус гриппа свиней; вирус оспы свиней; вирус везикулярного стоматита; вирус везикулярной экзантемы свиней; *Leptospira Hardjo* и/или *Mycoplasma hyosynoviae*.

Иммуногенные препараты в соответствии с изобретением также комбинируют с по меньшей мере одной традиционной вакциной (ослабленной живой, инаktivированной или субъединичной) или рекомбинантной вакциной (вирусным вектором), направленной против по меньшей мере одного свиного патогена, отличного или идентичного. Изобретение, в частности, обеспечивает комбинацию с содержащими адъювант традиционными вакцинами (ослабленной живой, инаktivированной или субъединичной). Среди инаktivированных или субъединичных вакцин следует упомянуть те, которые содержат, в частности, алюмогель, отдельно в смеси с сапонином в качестве адъюванта, или те, которые были рецептированы в форме эмульсии типа "масло в воде".

Кроме того, в возможном варианте композиция включает один или несколько ветеринарно приемлемых носителей. В контексте данного описания

“ветеринарно приемлемый носитель” включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, адъюванты, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические агенты, задерживающие адсорбцию агенты и т. п. В предпочтительном варианте осуществления иммуногенная композиция включает белок OPC2 ЦВС3 или OPC2 ЦВС2, как представлено авторами, предпочтительно в описанной выше концентрации, который смешивают с адъювантом, предпочтительно CARBOPOL®, и физиологический раствор.

Специалистам в данной области техники станет понятно, что композиция для применения согласно изобретению в возможном варианте включает известные подходящие для инъекций, физиологически приемлемые стерильные растворы. Для приготовления готового к применению раствора для парентеральной инъекции или инфузии в общем доступе предлагаются водные изотонические растворы, такие как, например, солевой раствор или соответствующие растворы белка плазмы. Кроме того, в возможном варианте иммуногенные и вакцинные композиции в соответствии с настоящим изобретением включают разбавители, изотонические агенты, стабилизаторы или адъюванты. К разбавителям относятся вода, солевой раствор, декстроза, этанол, глицерин и т. п. К изотоническим агентам относятся, помимо прочих, хлорид натрия, декстроза, маннит, сорбит и лактоза. К стабилизаторам относятся, помимо прочих, альбумин и соли щелочных металлов с этилендиаминтетрауксусной кислотой.

“Адъюванты” в контексте данного описания включают гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge, Массачусетс, США), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, Алабама, США), эмульсию типа “вода в масле”, эмульсию типа “масло в воде”, эмульсию типа “вода в масле в воде”. Эмульсию, в частности, изготавливают на основе легкого жидкого парафинового масла (согласно Европейской фармакопее); изопреноидное масло, такое как сквалановое или скваленовое масло, полученное в результате олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; сложные эфиры кислот или спиртов, которые содержат линейную алкильную группу, в частности, растительных масел, этилолеата, пропиленгликольди-(каприлат/капрата), глицерилтри-(каприлат/капрата) или пропиленгликольдиолеата; сложные эфиры

разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложные эфиры изостеариновой кислоты. Масло применяют в комбинации с эмульгаторами для образования эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбита, маннида (например, ангидроманнитолеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рициноленовой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блоксополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности, продукты Pluronic, в особенности L121. См. Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp 51 - 94 (1995) и Todd et al., *Vaccine* 15: 564 - 570 (1997).

Например, существует возможность применения эмульсии SPT, описанной на странице 147 публикации "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под редакцией Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсии MF59, описанной на странице 183 той же книги.

Еще одним примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного. Предпочтительными адъювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые сшиты сшитый, в частности, с полиалкениловыми эфирами сахаров или полиспиртов. Эти соединения известны как карбомеры (Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). Специалисты в данной области техники также могут обратиться к Патенту США № 2,909,462, в котором описаны такие акриловые полимеры, сшитые с полиоксисоединением, имеющим по меньшей мере 3 гидроксильных группы, предпочтительно не более, чем 8, причем атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных заменены ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются те, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллиллы и другие этиленненасыщенные группы. В возможных вариантах ненасыщенные радикалы сами содержат другие заместители, такие как метил. Продукты, реализуемые под названием CARBOPOL®; (BF Goodrich, Огайо, США), особенно предпочтительны. Они являются сшитыми с аллилсахарозой или с аллил-пентаэритритом. Среди них следует упомянуть CARBOPOL™ 974P, 941P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является применение

CARBOPOL®, в частности, применение CARBOPOL® 971P, предпочтительно в количестве от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, еще более предпочтительно – в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу, наиболее предпочтительно – в количестве приблизительно 1 мг на дозу. В частности, в возможном варианте доза конечной композиции включает CARBOPOL® или CARBOPOL® 971 в пределах от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг CARBOPOL®. Например, в некоторых вариантах осуществления доза конечной композиции включает приблизительно 1 мг CARBOPOL® 971.

К другим подходящим адъювантам относятся, помимо прочих, адъювантная система RIBI (Ribi Inc.), блоксополимер (CytRx, Atlanta, Джорджия, США), SAF-M (Chiron, Emeryville, Калифорния, США), монофосфорил-липид А, адъювант авридин липид-амин, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид и т. п.

Другими словами, вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает один или несколько адъювантов. Неограничивающие примеры адъювантов представлены во всем тексте описания.

Кроме того, в возможном варианте вакцина в соответствии с настоящим изобретением включает в качестве адъюванта одно или несколько соединений, к которым относятся полимер акриловой или метакриловой кислоты; сополимер малеинового ангидрида и алкенильного производного; полимер акриловой или метакриловой кислоты, который является сшитым; полимер акриловой или метакриловой кислоты, который сшит с полиалкениловым эфиром сахара или полиспирт; карбомер; акриловый полимер, сшитый с полиоксисоединением, имеющим по меньшей мере 3 и не более 8 гидроксильных групп с атомами водорода по меньшей мере трех гидроксильных, необязательно замененных ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими по меньшей мере 2 атома углерода, причем вышеупомянутые радикалы содержат от 2 до 4 атомов углерода, такие как винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы, и ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие как метил; Carbopol®; Carbopol® 974P; Carbopol® 934P; Carbopol® 971P; Carbopol® 980; Carbopol® 941P; ImpranFLEX®; гидроксид алюминия; фосфат алюминия; сапонин; Quil A; QS-21; GPI-0100; эмульсия типа "вода в масле"; эмульсия типа "масло в воде"; эмульсия типа "вода в масле в воде"; эмульсия на основе легкого

жидкого парафинового масла или адъюванта, соответствующего требованиям Европейской фармакопеи; изопреноидное масло; сквалан; скваленовое масло, полученное в результате олигомеризации алкенов или изобутена или децена; сложный(е) эфир(ы) кислоты (кислот) или спирта(ов), которые содержат

5 линейную алкильную группу; растительное(ые) масло(а); этилолеат; пропиленгликольди-(каприлат/капрат); глицерилтри-(каприлат/капрат); пропиленгликольдиолеат; сложный(е) эфир(ы) разветвленной(ых) жирной(ых) кислоты (кислот) или спирта(ов); сложный(е) эфир(ы) изостеариновой кислоты; неионное(ые) поверхностно-активное(ые) вещество(а); сложный(е) эфир(ы)

10 сорбита или маннита или гликоля или полиглицерина или пропиленгликоля или олеиновой, или изостеариновой кислоты или рициноленовой кислоты или гидроксистеариновой кислоты, необязательно этоксилированной, ангидроманнитолеата; блоксополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, продукт Pluronic, адъювантная система RIBI; блоксополимер; SAF-M;

15 монофосфорил-липид А; адъювант авридин липид-амин; термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой); холерный токсин; IMS 1314, или мурамилдипептид.

В предпочтительном и благоприятном варианте осуществления вакцины в соответствии с настоящим изобретением включают один или несколько

20 карбомеров.

В предпочтительном и благоприятном варианте осуществления вакцины в соответствии с настоящим изобретением включают Carbopol® и/или ImgranFLEX®. Конкретные примеры Carbopol® представлены авторами.

В еще одном возможном варианте осуществления вакцины в соответствии с

25 настоящим изобретением включают фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель.

В предпочтительном варианте адъювант добавляют в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу. В еще более

30 предпочтительном варианте адъювант добавляют в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу. В еще более предпочтительном варианте адъювант добавляют в количестве от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу. В еще более предпочтительном варианте адъювант добавляют в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу. В наиболее

предпочтительном варианте адъювант добавляют в количестве приблизительно 1 мг на дозу.

Кроме того, в возможном варианте композиция включает один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. В контексте данного описания “фармацевтически приемлемый носитель” включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, стабилизаторы, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические агенты, задерживающие адсорбцию агенты и т. п.

В соответствии с еще одним аспектом эта иммуногенная композиция также включает фармацевтически приемлемую соль, предпочтительно фосфатную соль в физиологически приемлемой концентрации. В предпочтительном варианте уровень pH вышеупомянутой иммуногенной композиции регулируют до физиологического уровня pH, то есть, приблизительно от 6,5 до 7,5.

Режимы дозирования применяют для улучшения экономичности содержания свиней. Например, иммуногенные композиции, такие как вакцины, вводят свиньям и/или поросятам с целью защиты свиноматок, поросят или и тех, и других.

Также заявлено, что вакцина в соответствии с изобретением способна защищать разводимых подсвинков и свиней, подвергнутых контрольному заражению *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* или ВРРСС во всех или двух или по меньшей мере одном триместре в течение 114 дней беременности.

Также заявлено, что вакцина способна в значительной мере снижать частоту случаев мумификации, мертворождения и эмбрионов у вакцинированных подсвинков и свиней, которых вакцинировали при контрольном заражении *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* или ВРРСС во всех или двух или по меньшей мере одном триместре в течение 114 дней беременности.

Режим дозирования включает вакцинацию молодых свиней (т. е., в возрасте 5 месяцев или моложе) по меньшей мере одной дозой описываемой авторами иммуногенной композиции перед отбором для спаривания. Дозу описываемой авторами иммуногенной композиции вводят внутримышечно как дозу в один (1) мл перед отбором для спаривания. В некоторых вариантах осуществления свиньям вводят одну или несколько доз вакцины. Например, вводят первую вакцину с последующим введением бустерной вакцины через 21 день и перед

отбором для спаривания. В некоторых вариантах осуществления свиней спаривают в пределах от 14 дней до 21 дня после бустерной вакцинации. Эти временные рамки позволяют свиньям выработать иммунную реакцию. Применение такого режима дозирования позволяет уменьшать и/или сдерживать количество мумификаций при опоросе.

Кроме того, применение режима дозирования, который включает введение иммуногенной композиции, которая включает *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* или ВРРСС, снижает, уменьшает и/или сдерживает лимфаденопатию, истощение лимфоидной ткани и/или многоядерных / гигантских гистиоцитов у свиней, инфицированных *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* или ВРРСС. Предпочтительно доза составляет приблизительно 2 мл.

Также описан способ иммунизации, позволяющий вызывать иммунную реакцию у свиней в отношении цирковиров. В частности, описан способ вакцинации, который эффективен для свиней. Эти способы иммунизации и вакцинации включают введение одного из препаратов или одной из моновалентных или поливалентных вакцин, как описано выше. Эти способы иммунизации и вакцинации включают введение одной или нескольких последовательных доз этих препаратов или вакцин. Препараты и вакцины в контексте этого способа иммунизации или вакцинации вводят различными путями введения, предлагаемыми согласно существующему уровню техники для полинуклеотидной вакцинации, в частности, внутримышечным и внутрикожным путями, и с применением известных технологий введения, в частности, инъекций при помощи шприца, имеющего иглу, струей жидкости (Furth et al. Analytical Bioch., 1992, 205: 365 - 368) или путем выбрасывания золотых частиц, покрытых ДНК (Tang et al. Nature, 1992, 356: 152 - 154).

Этот способ не только позволяет осуществлять введение взрослым свиньям, но и молодым, и беременным самкам; в последнем случае это позволяет, в частности, обеспечить пассивный иммунитет новорожденных (через материнские антитела). В предпочтительном варианте самок свиней инокулируют перед отбором для спаривания; и/или перед спариванием, и/или во время беременности. Предпочтительно по меньшей мере одну инокуляцию осуществляют перед спариванием, предпочтительно с последующей инокуляцией, выполняемой во время беременности, например, приблизительно в середине срока (приблизительно после 6 - 8 недель беременности) и/или в конце

срока (приблизительно после 11 - 13 недель беременности). Таким образом, предпочтительный режим состоит в инокуляции перед спариванием и бустерной инокуляции во время беременности. После этого возможна повторная инокуляция перед каждым спариванием и/или во время беременности
5 приблизительно в середине срока и/или в конце срока. В предпочтительном варианте повторные инокуляции осуществляют во время беременности.

В еще одном аспекте настоящее изобретение касается применения описываемой авторами вакцины в соответствии с изобретением. Кроме того, настоящее изобретение касается способов, которые включают применение
10 описываемой авторами вакцины в соответствии с изобретением.

Соответственно, в одном варианте осуществления, вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному.

Соответственно, в одном варианте осуществления, вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у свиньи, который включает введение
15 вышеупомянутой вакцины свинье.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, причем вакцину вводят системно, предпочтительно внутримышечно или внутрикожно.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу
20 вызывания защитной иммунной реакции у животного, причем вакцину вводят одной дозой или по меньшей мере одной дозой.

Настоящее изобретение также предусматривает, что вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС у животного.
25 30

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и *M. hyo.*

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и РРСС.

5 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС и *M. hyo*.

10 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС и РРСС.

15 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и РРСС и *M. hyo*.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС и *M. hyo*. и ВРРСС.

20 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС.

25 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС, причем вышеупомянутая вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis*, предпочтительно ослабленный *Lawsonia intracellularis* или аттенюированный живой *Lawsonia intracellularis*, и антиген ЦВС.

30 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС, причем вышеупомянутая вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis*, предпочтительно ослабленный *Lawsonia intracellularis* или аттенюированный живой *Lawsonia intracellularis*, и рекомбинантный полипептид ЦВС.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС, причем вышеупомянутая вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis*,
5 предпочтительно ослабленный *Lawsonia intracellularis* или аттенюированный живой *Lawsonia intracellularis*, и рекомбинантный полипептид ЦВС, экспрессируемый геном OPC2 ЦВС.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу
10 вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Ileitis, и антиген ЦВС.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу
15 вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Ileitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу
20 вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis* и антиген ЦВС, и вышеупомянутую вакцину вводят системно, предпочтительно внутримышечно или внутрикожно.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу
25 вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Ileitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®, и вышеупомянутую вакцину вводят системно,
30 предпочтительно внутримышечно или внутрикожно.

В одном варианте осуществления, вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу иммунизации животного против клинического заболевания, вызываемого по меньшей мере

одним патогеном у вышеупомянутого животного, причем вышеупомянутая вакцина не способна вызывать клинические признаки инфекции, но способна вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую животное против патогенных форм вышеупомянутого по меньшей мере одного патогена.

5 В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу иммунизации животного против клинического заболевания, вызываемого *Lawsonia intracellularis* и ЦВС у вышеупомянутого животного, причем вышеупомянутая вакцина не способна вызывать клинические признаки
10 инфекции, но способна вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую животное против патогенных форм вышеупомянутых патогенов.

В одном варианте осуществления, вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем защитная иммунная реакция против
15 *Lawsonia intracellularis* предназначена для уменьшения поражения кишечника у животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида.

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения
20 согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для уменьшения поражения кишечника у животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*,
25 включенный в Enterisol® Ileitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

В возможном варианте поражения кишечника являются поражениями подвздошной кишки. Поражение кишечника и/или поражение подвздошной кишки являются макроскопическими повреждениями и/или микроскопическими
30 повреждениями.

В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для уменьшения фекального выделения у

животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для уменьшения фекального выделения у животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Peitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

В одном варианте осуществления, вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для увеличения среднего суточного привеса животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для увеличения среднего суточного привеса животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Peitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

Настоящее изобретение также охватывает способ вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС у животного который включает введение животному вакцины в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также охватывает способ вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС у животного, который включает введение животному вакцины в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также охватывает способ вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС у свиньи, который включает введение свинье вакцины в соответствии с настоящим изобретением.

5 Настоящее изобретение также охватывает способ иммунизации животного против клинического заболевания, вызываемого по меньшей мере одним патогеном у вышеупомянутого животного, причем вышеупомянутый способ включает этап введения животному вакцины в соответствии с настоящим изобретением, причем вышеупомянутая вакцина не способна вызывать клинические признаки инфекции, но способна вызывать иммунную реакцию,
10 иммунизирующую животное против патогенных форм вышеупомянутого по меньшей мере одного патогена.

Настоящее изобретение также охватывает способ иммунизации животного против клинического заболевания, вызываемого *Lawsonia intracellularis* и ЦВС у вышеупомянутого животного, причем вышеупомянутый способ включает этап
15 введения животному вакцины в соответствии с настоящим изобретением, причем вышеупомянутая вакцина не способна вызывать клинические признаки инфекции, но способна вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую животное против патогенных форм вышеупомянутых патогенов.

Настоящее изобретение также охватывает способ иммунизации свиньи
20 против клинического заболевания, вызываемого *Lawsonia intracellularis* и ЦВС у вышеупомянутой свиньи, причем вышеупомянутый способ включает этап введения животному вакцины в соответствии с настоящим изобретением, причем вышеупомянутая вакцина не способна вызывать клинические признаки инфекции, но способна вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую свинью
25 против патогенных форм вышеупомянутых патогенов.

Настоящее изобретение также охватывает применение вакцины в соответствии с настоящим изобретением в приготовлении композиции для вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС.

30 В предпочтительном варианте осуществления применение вакцины в соответствии с настоящим изобретением предназначено для приготовления композиции для вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС.

В предпочтительном варианте осуществления применение вакцины в соответствии с настоящим изобретением предназначено для приготовления композиции для вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС и *M. hyo.* и РРСС.

5 Настоящее изобретение также охватывает применение вакцины в соответствии с настоящим изобретением для осуществления способа вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС.

10 В предпочтительном варианте осуществления применение вакцины в соответствии с настоящим изобретением предназначено для осуществления способа вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС.

15 В предпочтительном варианте осуществления применение вакцины в соответствии с настоящим изобретением предназначено для осуществления способа вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и ЦВС и *M. hyo.* и РРСС.

Вакцину в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно вводят как однократную дозу, т. е., для одноразового введения.

20 Соответственно, в одном варианте осуществления вакцину в соответствии с настоящим изобретением рецептируют и/или упаковывают для однократного или одноразового введения.

В одном варианте осуществления вакцину в соответствии с настоящим изобретением рецептируют и/или упаковывают для многодозового режима, предпочтительно двухдозового режима.

25 В одном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предусмотрена в лекарственной форме, причем вышеупомянутую лекарственную форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество вышеупомянутой вакцины, и предусмотрена возможность доставки лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого
30 контейнера. Вышеупомянутый контейнер может содержать по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200 или по меньшей мере 250 доз вышеупомянутой вакцины.

Как правило, заболевание, вызываемое *Lawsonia intracellularis*, т. е., пролиферативная энтеропатия свиней (ПЭС), поддается контролю с

применением живой вакцины (Enterisol® Pleitis) промышленного производства, которую вводят перорально путем вливания или с питьевой водой. При этом требуется, чтобы за три дня до вакцинации, в день вакцинации и через три дня после вакцинации животные, вакцинированные Enterisol® Pleitis, не получали
5 никакого лечения антибиотиками, эффективного против *Lawsonia intracellularis*.

Авторами изобретения неожиданно было обнаружено, что живая вакцина *Lawsonia intracellularis* является эффективной, несмотря на одновременное /
сопутствующее лечение животного антибиотиками при внутримышечном введении.

10 Соответственно, авторами предполагается возможность введения животному вакцины в соответствии с настоящим изобретением несмотря на одновременное / сопутствующее лечение животного антибиотиками. При введении вакцины в соответствии с настоящим изобретением несмотря на
одновременное / сопутствующее лечение животного антибиотиками системное
15 введение представляет предпочтительный путь введения.

Соответственно, настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает
введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное
20 одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у свиньи, который включает введение свинье
вышеупомянутой вакцины, причем свинью одновременно / параллельно лечат
25 одним или несколькими антибиотиками.

Фраза “одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками” в контексте данного описания означает, что животное / свинья получает лечение антибиотиками (т. е., животному / свинье вводят один или
несколько антибиотиков) за три дня до вакцинации, за два дня до вакцинации
30 и/или за один день до вакцинации. Вышеупомянутая фраза также означает, что животное / свинья получает лечение антибиотиками и вакцинацию в один и тот же день. Вышеупомянутая фраза также означает, что животное / свинья будет получать лечение антибиотиками через один день, два дня и/или три дня после вакцинации.

Термин “антибиотик” хорошо известен специалистам в данной области техники, и его применяют в самом широком смысле. Термин “антибиотик” в контексте данного описания относится к соединениям, имеющим неблагоприятное воздействие на бактерии. Неограничивающие примеры антибиотиков включают бета-лактамы (например, пенициллин VK, пенициллин G, амоксициллин тригидрат), нитроимидазолы, макролиды (например, тилозин тартрат, эритромицин, азитромицин и кларитромицин), тетрациклины, гликопептиды (например, ванкомицин), плевомутилины и фторхинолоны.

В предпочтительном варианте для лечения антибиотиками применяют антибиотик Denagard® (тиамулин) или ХТЦ (хлортетрациклин) или их комбинацию.

В предпочтительном варианте антибиотики вводят в дозе 35 г/т Denagard® (тиамулина) и 400 г/т ХТЦ (хлортетрациклина) в течение всего двухнедельного периода.

Соответственно, настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis* и антиген ЦВС.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками, причем вышеупомянутая вакцина включает живой *Lawsonia intracellularis* и антиген ЦВС, и вакцину вводят системно, предпочтительно внутримышечно.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками, причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*,

включенный в Enterisol® Pleitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат с применением Denagard® (тиамулина) и/или ХТЦ (хлортетрациклина), и вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Pleitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному, при котором животное одновременно / параллельно лечат с применением Denagard® (тиамулина) и/или ХТЦ (хлортетрациклина), причем вышеупомянутая вакцина включает антиген *Lawsonia intracellularis*, включенный в Enterisol® Pleitis, и антиген ЦВС, включенный в Ingelvac CircoFLEX® или 3FLEX®, и вакцину вводят системно, предпочтительно внутримышечно.

Хотя настоящее изобретение и его преимущества были подробно описаны, следует понимать, что существует возможность различных изменений, замещений и модификаций без отклонения от сущности и объема изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Некоторые аспекты настоящего изобретения далее описаны в следующих пронумерованных пунктах.

1. Вакцина, подходящая для применения в качестве свиной вакцины, включающая иммуногенный компонент *Lawsonia intracellularis*, иммуногенный компонент цирковируса свиней (ЦВС), иммуногенный компонент *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo.*) и иммуногенный компонент а репродуктивно-респираторного синдрома свиней (ВРРС).

2. Вакцина по пункту 1, причем вакцина включает один или несколько адъювантов.

3. Вакцина по пункту 2, причем один или несколько адъювантов включает один или несколько из компонентов, к которым относятся полимер

акриловой или метакриловой кислоты; сополимер малеинового ангидрида и алкенильного производного; полимер акриловой или метакриловой кислоты, который является сшитым; полимер акриловой или метакриловой кислоты, сшитый с полиалкениловым эфиром сахара или полиспирта; карбомер;

5 акриловый полимер, сшитый с полиоксисоединением, имеющим по меньшей мере 3 и не более 8 гидроксильных групп с атомами водорода по меньшей мере трех гидроксильных, необязательно замененных ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими по меньшей мере 2 атома углерода, причем вышеупомянутые радикалы содержат от 2 до 4 атомов углерода, такие как

10 винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы, и ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие как метил; карбопол; Carbopol 974P; Carbopol 934P; Carbopol 971P; гидроксид алюминия; фосфат алюминия; сапонин; Quil A; QS-21; GPI-0100; эмульсия типа "вода в масле"; эмульсия типа "масло в воде"; эмульсия типа "вода в масле в воде"; эмульсия на

15 основе легкого жидкого парафинового масла или адъюванта, соответствующего требованиям Европейской фармакопеи; изопреноидное масло; сквалан; скваленовое масло, полученное в результате олигомеризации алкенов или изобутена или децена; сложный(е) эфир(ы) кислоты (кислот) или спирта(ов), которые содержат линейную алкильную группу; растительное(ые) масло(а);

20 этилолеат; пропиленгликольди-(каприлат/капрат); глицерилтри-(каприлат/капрат); пропиленгликольдиолеат; сложный(е) эфир(ы) разветвленной(ых) жирной(ых) кислоты (кислот) или спирта(ов); сложный(е) эфир(ы) изостеариновой кислоты; неионное(ые) поверхностно-активное(ые) вещество(а); сложный(е) эфир(ы) сорбита или маннита или гликоля или

25 полиглицерина или пропиленгликоля или олеиновой, или изостеариновой кислоты или рициноленовой кислоты или гидроксистеариновой кислоты, необязательно этоксилированной, ангидроманнитолеата; блоксополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, продукт Pluronic, адъювантная система RIBI; блоксополимер; SAF-M; монофосфорил-липид A; адъювант авридин

30 липид-амин; термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой); холерный токсин; IMS 1314 или мурамилдипептид.

4. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем иммуногенный компонент *Lawsonia intracellularis* является вакциной *Lawsonia intracellularis*.

5. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем иммуногенный компонент *Lawsonia intracellularis* является живой вакциной.

6. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент *Lawsonia intracellularis* является ослабленной вакциной.

5 7. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент *Lawsonia intracellularis* имеет дозу от 10^3 до 10^9 бактерий/кг массы тела или приблизительно от 10^5 до 10^7 бактерий/кг массы тела.

8. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент *Lawsonia intracellularis* имеет дозу от 1×10^5 до 1×10^7 бактерий *Lawsonia intracellularis*.
10

9. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент *Lawsonia intracellularis* является лиофилизированным.

10. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина *Lawsonia intracellularis* также включает адъювант.

15 11. Вакцина по предыдущему пункту, причем адъювантом является ImpranFLEX®.

12. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонентом *Lawsonia intracellularis* является вакцина Enterisol® Ileitis.

13. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем иммуногенным
20 компонентом цирковируса свиней (ЦВС) является вакцина цирковируса свиней (ЦВС).

14. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем ЦВС является ЦВС1.

15. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем ЦВС является
25 ЦВС2.

16. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем ЦВС является ЦВС3.

17. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем ЦВС является ЦВС2 и ЦВС3.

30 18. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ЦВС является рекомбинантной вакциной ЦВС.

19. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем рекомбинантный компонент ЦВС представляет собой или включает или

экспрессируется геном ОРС ЦВС, таким как белок, экспрессируемый геном ОРС ЦВС.

20. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем рекомбинантный компонент ЦВС представляет собой или включает или
5 экспрессируется геном ОРС ЦВС, таким как белок, экспрессируемый геном ОРС ЦВС, и ген ОРС ЦВС кодирует ген ОРС2 ЦВС.

21. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем рекомбинантный компонент ЦВС представляет собой или включает или
10 экспрессируется геном ОРС ЦВС, таким как белок, экспрессируемый геном ОРС ЦВС, причем ген ОРС ЦВС кодирует ген ОРС2 ЦВС, и ген ОРС2 ЦВС является геном ОРС2 ЦВС2.

22. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ЦВС представляет собой или включает рекомбинантный белок ОРС2 ЦВС.

23. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент
15 ЦВС представляет собой или включает рекомбинантный белок ОРС2 ЦВС, и вакцина имеет дозу от приблизительно 2 мкг до приблизительно 400 мкг рекомбинантного белка ОРС2 ЦВС.

24. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ЦВС представляет собой или включает ДНК.

20 25. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ЦВС представляет собой или включает ДНК, и ДНК предусмотрена в количестве от приблизительно 10 мкг до приблизительно 2000 мкг, предпочтительно от приблизительно 50 мкг до приблизительно 1000 мкг.

26. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент
25 ЦВС экспрессируется или был экспрессирован в клетках бакуловируса.

27. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ЦВС также включает адъювант.

28. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина или один из компонентов вакцины включает адъювант, и адъювантом является
30 CARBOPOL™.

29. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонентом ЦВС является Ingelvac CircoFLEX®.

30. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем иммуногенный компонент *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) является вакциной *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*).

5 31. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент *M. hyo*. является супернатантом и/или бактерином.

32. Вакцина по предыдущему пункту, причем компонент *M. hyo*. является бактерином.

10 33. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем доза компонента *M. hyo*. составляет приблизительно 2 мл супернатанта и/или бактериона.

34. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонентом *M. hyo*. является Ingelvac MycoFlex®.

15 35. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем иммуногенный компонент вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (ВРРСС) является вакциной вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (ВРРСС).

36. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ВРРСС является живой вакциной.

20 37. Вакцина по предыдущему пункту, причем компонент ВРРСС является ослабленной вакциной.

38. Вакцина по двум предыдущим пунктам, причем компонент ВРРСС является модифицированной живой вакциной.

25 39. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ВРРСС имеет дозу от приблизительно 10^1 до приблизительно 10^7 вирусных частиц на дозу, предпочтительно от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^5 частиц на дозу, более предпочтительно от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^5 частиц на дозу.

40. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ВРРСС является лиофилизированным.

30 41. Вакцина по предыдущему пункту, причем влагосодержание лиофилизированного компонента ВРРСС для введения восстанавливают или было восстановлено в 2 мл растворителя.

42. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонентом ВРРСС является МЖВ РРСС Ingelvac®.

43. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ЦВС, компонент *M. hyo.* и компонент ВРРСС является вакциной 3FLEX® или ее производным.

5 44. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем компонент ЦВС, компонент *M. hyo.* и компонент ВРРСС является вакциной 3FLEX® или ее производным, и компонент *Lawsonia intracellularis* лиофилизируют и растворяют в вакцине 3FLEX®.

45. Вакцина по двум предыдущим пунктам, причем компонентом *Lawsonia intracellularis* является Enterisol® Ileitis.

10 46. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем объем вакцины составляет от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 4 мл.

47. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем объем вакцины составляет приблизительно 2 мл.

15 48. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, также включающая фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель.

49. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, также включающая адъювант.

50. Вакцина по предыдущему пункту, причем адъювантом является ImpranFLEX®.

20 51. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в форме для перорального введения.

52. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в форме для перорального введения с питьевой водой или путем перорального вливания.

25 53. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в форме для внутримышечного введения.

54. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцину рецептируют и/или упаковывают для одноклового или одноразового введения.

30 55. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцину рецептируют и/или упаковывают для многоклового режима.

56. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцину рецептируют и/или упаковывают для двухклового режима.

57. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в лекарственной форме; и вышеупомянутую лекарственную

форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество вышеупомянутой вакцины, причем предусмотрена возможность доставки лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого контейнера.

5 58. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в лекарственной форме; и вышеупомянутую лекарственную форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество вышеупомянутой вакцины, причем предусмотрена возможность доставки лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого
10 контейнера; причем вышеупомянутый контейнер содержит по меньшей мере 10 доз вышеупомянутой композиции.

 59. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в лекарственной форме; и вышеупомянутую лекарственную форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество
15 вышеупомянутой вакцины, причем предусмотрена возможность доставки лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого контейнера; причем вышеупомянутый контейнер содержит по меньшей мере 50 доз вышеупомянутой композиции.

 60. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в лекарственной форме; и вышеупомянутую лекарственную форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество
20 вышеупомянутой вакцины, причем предусмотрена возможность доставки лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого контейнера; причем вышеупомянутый контейнер содержит по меньшей мере 100
25 доз вышеупомянутой композиции.

 61. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в лекарственной форме; и вышеупомянутую лекарственную форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество
30 вышеупомянутой вакцины, причем предусмотрена возможность доставки лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого контейнера; причем вышеупомянутый контейнер содержит по меньшей мере 150 доз вышеупомянутой композиции.

 62. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в лекарственной форме; и вышеупомянутую лекарственную

форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество вышеупомянутой вакцины, причем предусмотрена возможность доставки лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого контейнера; причем вышеупомянутый контейнер содержит по меньшей мере 200
5 доз вышеупомянутой композиции.

63. Вакцина по одному из предыдущих пунктов, причем вакцина предусмотрена в лекарственной форме; и вышеупомянутую лекарственную форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество вышеупомянутой вакцины, причем предусмотрена возможность доставки
10 лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого контейнера; причем вышеупомянутый контейнер содержит по меньшей мере 250 доз вышеупомянутой композиции.

64. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения с целью вызывания иммунной реакции или иммунологической реакции или
15 защитной иммунной реакции или защитной иммунологической реакции у животного.

65. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения с целью вызывания иммунной реакции или иммунологической реакции или
20 защитной иммунной реакции или защитной иммунологической реакции у животного, причем животным является свинья.

66. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из двух предыдущих пунктов, причем применение предназначено для вызывания иммунной реакции или иммунологической реакции или защитной
25 иммунной реакции или защитной иммунологической реакции против *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* и ВРРСС у животного.

67. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих трех пунктов, причем вакцину вводят перорально.

68. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих четырех пунктов, причем вакцину вводят с питьевой
30 водой или путем перорального вливания.

69. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих пяти пунктов, причем вакцину вводят внутримышечно.

70. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих шести пунктов, причем вакцину вводят одной дозой.

71. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих семи пунктов, причем вакцину вводят одной дозой, и вышеупомянутая одна доза обеспечивает иммунную реакцию или иммунологическую реакцию или защитную иммунную реакцию или защитную иммунологическую реакцию против *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* и ВРРСС у животного.

72. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих восьми пунктов, причем вакцину вводят как по меньшей мере одну дозу.

73. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих девяти пунктов, причем вакцину вводят как по меньшей мере одну дозу, и вышеупомянутая одна доза обеспечивает иммунную реакцию или иммунологическую реакцию или защитную иммунную реакцию или защитную иммунологическую реакцию против *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* и ВРРСС у животного.

74. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих десяти пунктов, причем вакцину вводят свинье одной дозой.

75. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих одиннадцати пунктов, причем вакцину вводят свинье только одной дозой.

76. Вакцина по одному из предыдущих пунктов для применения по одному из предыдущих двенадцати пунктов, причем вакцину вводят свинье по меньшей мере одной дозой.

77. Способ вызывания иммунной реакции или иммунологической реакции или защитной иммунной или иммунологической реакции против *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* и ВРРСС у животного, который включает введение животному вакцина по одному из предыдущих пунктов

78. Способ иммунизации животного против клинического заболевания, вызываемого по меньшей мере одним патогеном у вышеупомянутого животного, причем вышеупомянутый способ включает этап введения животному вакцины по одному из предыдущих пунктов, причем вышеупомянутая иммуногенная композиция не вызывает клинических признаков инфекции, но способна

вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую животное против патогенных форм вышеупомянутого по меньшей мере одного патогена.

79. Применение вакцины по одному из предыдущих пунктов с целью приготовления композиции для вызывания иммунологической или иммунной реакции или защитной иммунной или иммунологической реакции против *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* и ВРРСС или для применения согласно способу вызывания иммунологической или иммунной реакции или защитной иммунной или иммунологической реакции против *Lawsonia intracellularis*, ЦВС, *M. hyo.* и ВРРСС.

Таким образом, после подробного описания предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения следует понимать, что изобретение, определенное в представленных выше пунктах, не ограничивается конкретными деталями, изложенными в представленном выше описании, поскольку предполагается возможность множества его вариантов без отклонения от сущности или объема настоящего изобретения.

Далее настоящее изобретение поясняется на следующих ниже Примерах, представленных лишь с целью пояснения, а не ограничения изобретения каким бы то ни было образом.

Примеры

Пример 1: Эффективность Enterisol® Pleitis, вводимого внутримышечно и при наличии плана исследования противомикробных средств

Цель:

Главная цель Примера состоит в оценке эффективности Enterisol® Pleitis в комбинации с вакциной 3FLEX® при внутримышечной инъекции свиньям, подвергнутым контрольному заражению кишечным гомогенатом, содержащим вирулентный *Lawsonia intracellularis*, возбудитель ПЭС. Вторичная цель состоит в оценке эффективности этой комбинированной вакцины при введении свиньям, получающим сопутствующее противомикробное лечение.

Обоснование:

ПЭС поддается контролю с применением живой вакцины (Enterisol® Pleitis) промышленного производства, которую вводят перорально путем вливания или с питьевой водой. При этом требуется, чтобы за три дня до вакцинации, в день вакцинации и через три дня после вакцинации животные, вакцинированные Enterisol® Pleitis, не получали никакого лечения антибиотиками, эффективного

против *Lawsonia*. Несмотря на тенденцию к уменьшению применения антибиотиков, оно до сих пор представляет значительное препятствие, требующее преодоления на многих фермах. Применение другого пути введения позволило бы обеспечить эффективность вакцины при наличии лечения антибиотиками, что облегчило бы применение вакцины. В то же время, в отрасли существует необходимость в уменьшении количества получаемых свиньями инъекций, и улучшение понимания эффективности Enterisol® Ileitis при введении в комбинации с вакциной 3FLEX® позволило бы лучше разобратся в целесообразности разработки комбинированной вакцины против *Lawsonia*, ЦВС2, *M. hyo.* и ВРРСС. В этом исследовании вакцинацию свиней внутримышечным путем исследуют для Enterisol® Ileitis в комбинации с 3FLEX® с последующим контрольным заражением через три недели кишечным гомогенатом, содержащим вирулентный *Lawsonia intracellularis*.

Описание общего плана исследования:

Сто двенадцать отнятых поросят в возрасте 21 день (+/- 2 дня) получают из источника, в котором не было зафиксировано клинических случаев илеита. Кроме того, свиньи, используемые в этом исследовании, должны быть отрицательными на *Lawsonia intracellularis* согласно кПЦР кала, а также анализу сывороточных антител. Свиней рандомизированно распределяют по четырем группам, три из которых включают 24 животных, и одна включает 16; группирование по весу, помету и полу. Экспериментальные группы следующие: положительная контрольная с контрольным заражением (РС); получающая Enterisol® Ileitis внутримышечно с вакциной 3®FLEX (ЕИМ) и получающая Enterisol® Ileitis внутримышечно с вакциной 3®FLEX с сопутствующим противомикробным введением (ЕИМАТВ). Отрицательную контрольную группу из 16 свиней не подвергают контрольному заражению, но сравнивают с группой РС для оценки контрольного заражения с применением только *Lawsonia*. Эту отрицательную контрольную группу подвергают эвтаназии во время прекращения исследования вместе с другими экспериментальными группами. Экспериментальная группа ЕИМАТВ является единственной группой, получающей противомикробные препараты и получающей указанную дозу 35 г/т Denagard® (тиамулина) и 400 г/т ХТЦ (хлортетрациклина) в течение всего двухнедельного периода. Противомикробное лечение начинают (D-7) после пятидневного адаптационного периода, позволяющего свиньям восстановиться

после уменьшения потребления пищи вследствие отъема. После недели приема Denagard® ХТЦ с кормом группу ЕИМАТВ внутримышечно вакцинируют дозой 2 мл Enterisol® Peitis в комбинации с вакциной 3FLEX. Влагосодержание лиофилизированной формы вакцины Enterisol® Peitis восстанавливают, используя вакцину 3FLEX таким образом, чтобы в результате получить одну 2 мл дозу Enterisol® Peitis в каждой 2 мл дозе 3FLEX. Это значит, что 2 мл доза полученной в результате экспериментальной вакцины "4FLEX" содержит надлежащее количество всех четырех антигенов. Все экспериментальные группы вакцинируют одновременно (D0). Архивные образцы вакцины, оставшиеся после вакцинации, хранят при -80 °С. После вакцинации животных наблюдают на предмет повреждений в месте инъекции и других неблагоприятных реакций. Наблюдения записывают. Положительные и отрицательные контрольные группы с контрольным заражением вакцинируют только 3FLEX без введения антигена *Lawsonia*. После периода в 28 дней (4 недели), позволяющего развиться иммунитету, всех животных перорально подвергают контрольному заражению гомогенатом слизистой оболочки, содержащим *Lawsonia intracellularis*, который содержит мишень из 10^{8-9} организмов на свинью. Этот гомогенат слизистой оболочки секвенируют путем секвенирования нового поколения для исследования его полного содержания и для количественной ПЦР с целью определения количества *Lawsonia intracellularis*. Материал кишечного гомогената не должен содержать других патогенов, включая *Salmonella*, ВРРСС и видов *Brachyspira*. Во время контрольного заражения всех свиней взвешивают, что позволяет измерять привес до и после контрольного заражения. После контрольного заражения всех животных ежедневно оценивают на наличие клинических признаков изменения стула, изменения физического состояния и поведения до прекращения исследования.

Исследование прекращают через 21 день после контрольного заражения, когда всех животных подвергают эвтаназии и снова взвешивают. При вскрытии макроскопические повреждения измеряют и оценивают во всех частях кишечного тракта, образцы терминального отдела подвздошной кишки, а также любую дополнительную пораженную ткань собирают и помещают в формалин для измерения микроскопических поражений.

Микроскопические поражения оценивают путем иммуногистохимического (ИГХ) исследования и путем окрашивания гематоксилином-эозином (Н&Е) для

измерения пролиферативных поражений. Образцы крови и кала берут у всех животных во время вакцинации, во время контрольного заражения и еженедельно после него до вскрытия для серологического анализа на *Lawsonia intracellularis* и кПЦР, соответственно. Образцы кала собирают, вставляя палец, со сменой перчаток после каждого животного, или при помощи фекальной петли. Если образцы кала собирают при помощи фекальной петли, повторное использование таких петель не допускается, и для каждого животного должна использоваться новая фекальная петля. Все образцы крови и кала должны быть аликвотированы, и только одну аликвоту представляют на серологию и фекальную ПЦР на наличие *Lawsonia*. Все пробирки с образцами снабжают ярлыками с датой сбора, днем исследования и идентификационным номером свиньи.

Предмет исследования: каждая отдельная свинья.

Обоснование для количества повторностей:

Расчет статистической мощности: исходя из коэффициента заболеваемости в контрольной группе с контрольным заражением по меньшей мере 75 %, ожидается, что 21 животное на экспериментальную группу обеспечит приблизительно 80 % статистической мощности для выведения разницы в 40 процентных точек между экспериментальными и контрольными животными для двустороннего критерия с использованием $\alpha=0,05$. Общее количество 24 животных на экспериментальную группу используют поправки на возможный побочный результат, а также принятия уровня статистической мощности несколько выше 80 %.

Способ рандомизации:

Животных группируют по массе, полу и помету; для распределения свиней по экспериментальным группам используют генератор случайных чисел.

Уровни и описание маскирования:

Экспериментальные группы маскируют для оценки повреждений, фекальных выделений и серологии. Маскирование также выполняют для статистического анализа.

Детали и требования диагностики:

После моментов вакцинации и контрольного заражения у всех исследуемых животных еженедельно берут образцы крови и кала. Количество равняется приблизительно 560 образцам крови и кала (112 животных x 5 отборов

образцов). Все образцы подвергают диагностике. По меньшей мере одну аликвоту каждого образца хранят при -80 °С до прекращения исследования.

Продуктивная фаза: фаза пребывания в питомнике.

5 Пол животных: молодых хряков и свинок по возможности поровну распределяют между экспериментальными группами.

Критерии включения / исключения и снятия после включения:

Критерии включения в начале исследования: группа свиней коммерческого разведения с нормальным состоянием здоровья на D(-7). Критерии исключения в начале исследования: клинически больные или плохо развивающиеся свиньи на 10 D(-7).

Критерии исключения / снятия во время исследования:

15 При возникновении проблем с самочувствием или болезни главный исследователь и ветеринар исследовательского центра и/или уполномоченное лицо оценивает и определяет оптимальный порядок действий, вплоть до эвтаназии.

Пример 2: Эффективность Enterisol® Ileitis, вводимого внутримышечно и при наличии окончательного отчета об исследовании противомикробных средств

20 В этом исследовании оценивали эффективность внутримышечного пути введения Enterisol® Ileitis и в комбинации с вакциной Ingelvac®3FLEX в защите от *Lawsonia intracellularis*, возбудителя пролиферативной энтеропатии свиней (ПЭС). Также оценивали потенциальные помехи противомикробных средств для эффективности вакцины.

25 В этом исследовании ПЭС успешно воспроизводилась, согласно измерениям по характерным макроскопическим поражениям, микроскопическим поражениям, фекальным выделениям *L. intracellularis*, сероконверсии к *L. intracellularis*, клиническим признакам и влиянию на показатели продуктивности. Внутримышечная комбинация Enterisol® Ileitis с 3FLEX®, “4FLEX”, приводила к значительному и существенному снижению тяжести 30 макроскопического поражения, тяжести микроскопического поражения, показателя клинической диареи и фекального выделения *L. intracellularis*. В этой экспериментальной группе также наблюдали увеличение среднего суточного привеса по сравнению с невакцинированными контрольными животными. Эти результаты показывают, что внутримышечный путь и смешивание Enterisol®

Pleitis с вакциной 3FLEX® являются подходящим и эффективным вариантом для профилактики ПЭС. При этом также наблюдали, что эта комбинация вакцин была безопасной, и неблагоприятных явлений или реакций в месте инъекции отмечено не было.

5 При введении противомикробных средств во время вакцинации было замечено изменение некоторых параметров, оцениваемых в этом исследовании. Несмотря на наблюдаемое снижение макроскопических и микроскопических поражений в группе, получавшей противомикробные средства (ЕИМАТВ), по сравнению с невакцинированными подвергнутыми контрольному заражению
10 контрольными животными, эти уровни не достигали статистической значимости и увеличивались в числовом выражении по сравнению с тем же режимом лечения без противомикробных средств (ЕИМ). Однако группа, которая была вакцинирована и при этом получала противомикробные средства (ЕИМАТВ), была вакцинированной группой с наибольшим привесом после контрольного
15 заражения, который значительно увеличивался по сравнению с невакцинированными контрольными животными. Также наблюдали значительное снижение частоты измененного показателя клинической диареи. Эти результаты показывают, что противомикробные средства, возможно, препятствуют эффективности вакцины, хотя все же обеспечивался значительный
20 уровень защиты при вакцинации в присутствии испытываемых противомикробных средств.

Главная цель исследования состояла в оценке эффективности внутримышечного пути введения Enterisol® Pleitis в комбинации с вакциной 3FLEX® в защите свиней от *Lawsonia intracellularis*, возбудителя
25 пролиферативной энтеропатии свиней (ПЭС).

Вторая цель состояла в оценке эффективности этой комбинации вакцин при введении свиньям получавшим сопутствующее противомикробное лечение.

Эффективность вакцины определяли по снижению макроскопического и микроскопического поражения кишечника. Также оценивали другие важные
30 переменные, включая показатели роста, клинические признаки и фекальное выделение.

ПЭС поддается контролю с применением живой вакцины (Enterisol® Pleitis) промышленного производства, которую вводят перорально путем вливания или с питьевой водой. При этом требуется, чтобы за три дня до вакцинации, в день

вакцинации и через три дня после вакцинации животные, вакцинированные Enterisol® Ileitis, не получали никакого лечения антибиотиками, эффективного против *Lawsonia*. Несмотря на тенденцию к уменьшению применения антибиотиков, оно до сих пор представляет значительное препятствие, требующее преодоления на многих фермах. Применение другого пути введения позволило бы обеспечить эффективность вакцины при наличии лечения антибиотиками, что облегчило бы применение вакцины. В то же время, в отрасли существует необходимость в уменьшении количества получаемых свиньями инъекций, и улучшение понимания эффективности Enterisol® Ileitis при введении в комбинации с вакциной 3FLEX® позволило бы лучше разобраться в целесообразности разработки комбинированной вакцины против *Lawsonia*, ЦБС2, *Mycoplasma hyopneumoniae* и ВРРСС. В этом исследовании вакцинацию свиней внутримышечным путем исследовали для Enterisol® Ileitis в комбинации с 3FLEX® с последующим контрольным заражением через четыре недели кишечным гомогенатом, содержащим вирулентный *Lawsonia intracellularis*.

Условия плана исследования:

Свиней в возрасте 21 день (+/- 2 дня) получали из источника, в котором не было зафиксировано клинических случаев илеита. Свиней рандомизированно распределяли по четырем группам, три из которых включали 24 животных на группу, и одна включала 16 животных. Экспериментальные группы были следующие: положительная контрольная с контрольным заражением (РС); получающая Enterisol® Ileitis внутримышечно с вакциной 3®FLEX (ЕИМ) и получающая Enterisol® Ileitis внутримышечно с вакциной 3®FLEX с сопутствующим противомикробным введением (ЕИМАТВ). Отрицательную контрольную (NC) группу из 16 свиней не подвергали контрольному заражению, и она служила для оценки тяжести контрольного заражения в группе РС. Экспериментальная группа ЕИМАТВ была единственной группой, получающей противомикробные средства и получавшей указанную дозу 35 г/т Denagard® (тиамулина) и 400 г/т ХТЦ (хлортетрациклина) в течение всего двухнедельного периода. Противомикробное лечение начинали (D-7) после адаптационного периода в 13 дней, позволявшего свиньям восстановиться после уменьшения потребления пищи вследствие отъема. После недели приема Denagard® ХТЦ с кормом группу ЕИМАТВ внутримышечно вакцинировали дозой 2 мл Enterisol®

- 5 Peitis в комбинации с вакциной 3FLEX®. Все экспериментальные группы вакцинировали одновременно (D0). После периода в 28 дней (4 недели), позволяющего развиться иммунитету, всех животных перорально подвергали контрольному заражению гомогенатом слизистой оболочки, содержащим *Lawsonia intracellularis*. Исследование прекращали через 21 день после контрольного заражения, когда всех животных подвергали эвтаназии, измеряли повреждения и собирали образцы. Дополнительные детали плана исследования представлены ниже в таблицах.

План исследования

ID группы	Описание группы	#	Доза вакцины <i>Lawsonia</i>	Путь введения вакцины <i>Lawsonia</i>	Контрольное заражение
NC	Невакцинированные и не подвергнутые контрольному заражению контрольные животные (отрицательный контроль)	16	Н/Д	Н/Д	Нет
PC	Невакцинированные и подвергнутые контрольному заражению контрольные животные (положительный контроль)	24	Н/Д	Н/Д	Да
ЕИМ	Enterisol® Peitis IM + 3FLEX ("4FLEX")	24	2 мл	IM	Да
ЕИМАТВ	Enterisol® Peitis IM + 3FLEX + тиамулин / хлортетрациклин ("4FLEX" с противомикробными средствами)	24	2 мл	IM	Да

10

График событий

День исслед.	Дата	Событие и форма записи (код в скобках)
День (-20)		Свиньи доставлены в GBI; Выполнение медицинского осмотра животных (АНЕ_1.0); Ежедневный общий медицинский осмотр до даты контрольного заражения (ГНО_1.0); Взвешивание всех животных (BWR_1.0); Распределение животных по экспериментальным группам и загонам с группированием по массе, полу и помету
День (-7)		Начало лечения антибиотиками с кормом для группы ЕИМАТВ (BPT_1.0)

День 0		Вакцинация всех животных (PDR_1.1), с соблюдением указаний; Сбор образцов крови и кала (SCR_2.0), аликвотирование образцов; Отправка одной аликвоты образцов крови и кала в ISU VDL (Форма подачи GBI BI - ярлыки с индивидуальным идентификатором животного); Хранение архивных образцов вакцины; Наблюдение повреждений в месте инъекции в течение 3-х последовательных дней (ISX_1.0)
День 7		Прекращение введения антибиотика с кормом для группы ЕИМАТВ (BPT_1.0)
День 28		Контрольное заражение всех животных <i>Lawsonia</i> (CDR_1.0); Взвешивание всех животных (BWR_1.0); Сбор образцов материала контрольного заражения до и после контрольного заражения (SCR_2.0); Выполнение ежедневных клинических наблюдений до конца исследования (COR_1.0); Сбор образцов крови и кала (SCR_2.0), аликвотирование образцов; Отправка одной аликвоты образцов крови и кала в ISU VDL (Форма подачи GBI BI - индивидуальные ярлыки)
День 35		Сбор образцов крови и кала (SCR_2.0), аликвотирование образцов
День 42		Сбор образцов крови и кала (SCR_2.0), аликвотирование образцов
День 49		Сбор образцов крови и кала (SCR_2.0), аликвотирование образцов; Взвешивание всех животных (BWR_1.0); Выполнение вскрытия всех животных; Измерение и фиксация макроскопических поражений (ONP_2.0); Сбор кишечного лаважа, соскобов и мезентериальных лимфатических узлов (SCR_2.0) Отправка образцов UMN на гистологический анализ (SCR_2.0) для измерений (HIR_2.0)

Лечение по группам:

Экспериментальные группы были следующими: положительная контрольная с контрольным заражением (PC); получающая Enterisol® Peitis внутримышечно с вакциной Ingelvac®3FLEX (EIM) и Получающая Enterisol® Peitis внутримышечно с вакциной Ingelvac®3FLEX с сопутствующим противомикробным введением (EIMATB). Отрицательную контрольную (NC) группу из 16 свиней не подвергали контрольному заражению, и она служила для оценки тяжести контрольного заражения в группе PC. Экспериментальная группа EIMATB была единственной группой, получающей противомикробные средства и получавшей указанную дозу 35 г/т Denagard® (тиамулина) и 400 г/т ХТЦ (хлортетрациклина) в течение всего двухнедельного периода. После одной недели приема Denagard ХТЦ с кормом группу EIMATB внутримышечно вакцинировали 2 мл дозой Enterisol® Peitis в комбинации с вакциной Ingelvac®3FLEX. Влагосодержание лиофилизированной формы вакцины Enterisol® Peitis восстанавливали, используя вакцину Ingelvac®3FLEX таким

образом, чтобы в результате получить одну 2 мл дозу Enterisol® Ileitis в каждой 2 мл дозе Ingelvac®3FLEX. Это значит, что 2 мл доза полученной в результате экспериментальной вакцины "4FLEX" содержала надлежащее количество всех четырех антигенов.

5 Экспериментальные дозы:

Вакцины вводили группам 1-5 в D0 путем, который указан ниже в таблице. Введение путем внутримышечных инъекций выполняли в правую сторону шеи, посредине между основанием уха и концом плеча, с использованием стерильных шприцев и игл соответствующего размера.

10 Лечение

Группа	Лечение
ЕИМ	Вакцина Ingelvac®3FLEX + Enterisol® Ileitis (IM) [4FLEX + без мед.] = корм без медикамента / вода (ЕИМ)
ЕИМАТВ	Вакцина Ingelvac®3FLEX + Enterisol® Ileitis (IM) [4FLEX + Тиамулин / ХТЦ] = корм с медикаментом (35млн ⁻¹ тиамулина, 400 млн ⁻¹ хлортетрациклина) (ЕИМАТВ)
РС	Вакцина Ingelvac®3FLEX (IM), контрольное заражение [положительная контрольная с контрольным заражением] = корм без медикамента / вода (РС)
NC	Вакцина Ingelvac®3FLEX (IM), без контрольного заражения [отрицательная контрольная с контрольным заражением] = корм без медикамента / вода (NC)

Контрольное заражение

Описание	Кишечный гомогенат с <i>Lawsonia intracellularis</i> (LI)
Рецептура	Контрольное заражение состояло из материала кишечного гомогената. Замороженный запас кишечного гомогената размораживали и разводили в среде МДСИ непосредственно перед контрольным заражением.
Доза	Дозу контрольного заражения LI определяли для достижения значимого высокого уровня поражений и характеристик заболевания в положительной контрольной группе с контрольным заражением. Применяемая доза составляла 8x10 ⁹ организмов <i>Lawsonia intracellularis</i> на свинью, согласно количественному определению путем кПЦР в ISU VDL.
Процедура контрольного заражения	В D28 все свиньи в группах 1 - 4 получали материал контрольного заражения через желудочный лаваж. Контрольное заражение фиксировали в журнале доз контрольного заражения
Тестирование	Материал контрольного заражения направляли на метагеномное секвенирование методом дробовика для исследования его полного содержимого. Представляющие интерес патогены <i>Salmonella</i> , <i>Brachyspira</i> и BPPCC в этом материале не обнаруживались. Количественное определение <i>Lawsonia</i> в материале контрольного заражения выполняли при помощи количественной ПЦР ISU VDL.

Критерии включения / исключения животных:

Перед началом исследования оценивали состояние здоровья каждого животного и заполняли форму медицинского осмотра животного. В это исследование включали только животных с нормальным состоянием здоровья, которые согласно кПЦР и серологически были негативными на *Lawsonia*. При возникновении проблем с самочувствием или болезни во время исследования главный исследователь и ветеринар исследовательского центра и/или уполномоченное лицо оценивали и определяли оптимальный порядок действий, вплоть до эвтаназии, и эти события фиксировали в журнале.

Предмет исследования: предметом исследования была свинья.

Рандомизация:

Рандомизацию свиней с распределением по загонам и экспериментальным группам выполняла статистическая служба, предоставленная GBI, с применением статистической программы SAS. Перед началом исследования данные об имеющихся в наличии свиньях, информацию о помете, поле, возрасте, массе тела и организации содержания предоставляли Статистику GBI. Животных группировали по массе, полу и помету, а для распределения свиней по экспериментальным группам использовали генератор случайных чисел.

Критерии маскирования:

В течение всего исследования распределение свиней по группам было замаскировано для персонала, задействованного в фиксации поражений и выполнении лабораторных анализов. Весь персонал исследовательского центра, задействованный в сборе данных для исследования, заносил записи в журнал за подписью с целью документирования.

Ветеринария и сопутствующее лечение:

По прибытии животных в исследовательский центр фармацевтические средства не вводили без предварительного согласия со стороны наблюдателя или уполномоченного лица. Животные находились под ветеринарным наблюдением по прибытии на место и до окончания исследования. Любые животные, у которых обнаруживали повреждения или заболевания, не связанные с введением средства контрольного заражения, должны были получать соответствующую ветеринарную помощь. Обеспечиваемая исследователем документация должна была включать описание наблюдаемых клинических признаков, результат любого диагностического обследования и исход любого применяемого лечения.

Все мероприятия по лечению должны были быть задокументированы в Журнале биологического и фармацевтического лечения, в том числе введение противомикробных средств в группе ЕПМАТВ. Подвергнутые эвтаназии или умершие животные должны были быть подвергнуты вскрытию, а образцы
5 собраны надлежащим образом для установления диагноза, и в таких случаях должен был быть составлен полный ветеринарный отчет. Любое неожиданное заболевание или умирающее животное требовали надлежащих мер со стороны исследователя и ветеринара исследовательского центра совместно с наблюдателем и главным исследователем для определения оптимального плана с
10 целью уменьшения боли / патологического состояния путем лечения или эвтаназии.

Общие наблюдения:

С момента поступления и до D28 всех свиней ежедневно наблюдали на общее состояние здоровья и наблюдения записывали в Журнал наблюдения
15 общего состояния здоровья.

Реакции на инъекции:

Свиней наблюдали через 4 - 8 часов после вакцинации на наличие реакции в местах инъекций путем наблюдения за местами инъекций, а также на наличие любых неблагоприятных явлений. Свиней подвергали повторной оценке через 1,
20 2 и 3 дня после вакцинации. Любое животное с отклонением, замеченным в месте инъекции, требовало ежедневного наблюдения устранения поражения. Отклонения должны были быть отмечены и описаны на предмет размера (см), покраснения, опухания, повышенной температуры и боли. Наблюдения мест инъекций документировали в Журнале наблюдений мест инъекций.

Клинические наблюдения:

Всех свиней ежедневно наблюдали с D28 по D49 на наличие клинических признаков, связанных с контрольным заражением *Lawsonia intracellularis*. Результаты фиксировали в Журнале клинических наблюдений, используя оценку наблюдений, как показано ниже в таблице.

Оценка клинических наблюдений

Клинические признаки	Диарея	Поведение	Физическое состояние
0 - нормальный	нормальный стул	нормальное поведение	нормальное физическое состояние

1 - легкий	полужидкий, без крови	от слегка до умеренно подавленного, может стоять	худое относительно скелета
2 - умеренный*	водянистый, без крови или темных включений	подавленное или лежащее	выпирающие ребра и позвонки
3 - тяжелый*	кровянистый стул, неоформленный или оформленный		
*Следует связаться с исследователем или наблюдателем для определения целесообразности эвтаназии из гуманных соображений			

Масса тела:

Каждую свинью взвешивали (lb), как указано в графике событий, и результаты фиксировали в Журнале массы тела. Вычисляли средний суточный привес для всех испытуемых животных для сравнения между группами.

Вскрытие:

В D49 всех оставшихся свиней подвергали эвтаназии в соответствии с процедурами исследовательского центра. Подвздошную кишку, тощую кишку, слепую кишку и толстую кишку исследовали на наличие макроскопических поражений с записью результатов в Журнале вскрытий некондиционных животных, согласно схеме подсчета, представленной ниже в таблице.

Шкала оценки макроскопического поражения

Баллы	Описание
0	Норма
1	Легкое утолщение
2	Умеренное утолщение / воспаление
3	Тяжелое утолщение / воспаление
4	Тяжелое утолщение / воспаление / кровянистое содержимое / сгустки
5	Некроз

Шкала оценки микроскопического поражения

Баллы	ИНС на <i>Lawsonia</i>	Гистология (окрашивание гематоксилином и эозином)
0	Очаги микроорганизмов отсутствуют	Поражение не развивается
1	Один очаг микроорганизмов	Несколько участков легкого развития поражения
2	Множественные очаги микроорганизмов	Умеренный многоочаговый участок умеренного развития поражения
3	Диффузные очаги микроорганизмов	Диффузные участки тяжелого развития поражения

Отбор образцов крови:

Отбор крови документировали в Журнале отбора образцов. Цельную венозную кровь брали в пробирки для отделения сыворотки (SST) согласно графику событий. Цельную венозную кровь брали исследователь или
 5 уполномоченное лицо через переднюю полую вену от каждой свиньи с применением стерильной иглы 18 - 20 г x 1 - 1,5" Vacutainer®, держателя иглы Vacutainer® и 9 или 13 мл SST-пробирок. Каждый образец снабжали ярлыком, на котором указывали идентификационный номер животного, номер исследования, дату отбора, день исследования и тип образца. Содержимое SST оставляли для
 10 свертывания при комнатной температуре перед центрифугированием приблизительно при 2000xg в течение 5 - 10 минут. Сразу после завершения центрифугирования получали аликвоты сыворотки для испытания и длительного хранения при -80 °C. Аликвоту сыворотки, хранившуюся при -80 °C, отправляли на сухом льду для стандартизации обращения со всеми
 15 образцами в диагностическую лабораторию (ISU-VDL) для ELISA-анализа на *Lawsonia*.

Отбор образцов кала:

Образцы кала отбирали, вставляя палец в прямую кишку в соответствии с графиком событий для исследования на выделение *Lawsonia* путем кПЦР в ISU-VDL. Отбор кала документировали в Журнале отбора образцов. Образцы кала
 20 собирали в пробирки, снабженные ярлыком, на котором указывали номер исследования, дату отбора, день исследования и идентификационный номер свиньи. Все образцы аликвотировали в две пробирки и хранили при -80 °C. Одну аликвоту отправляли в изолированном контейнере с сухим льдом для
 25 поддержания образцов в замороженном состоянии во время перевозки и гарантии одинакового обращения со всеми образцами в ISU-VDL.

Собранные образцы документировали в Журнале отбора образцов. Оценку микроскопических поражений выполняли путем окрашивания гематоксилином-эозином (H&E) и иммуногистохимического анализа (ИГХ) на *Lawsonia*.
 30 Процедура и результаты испытания включены в этот окончательный отчет; необработанные данные фиксировали в Журнале гистологических и иммуногистохимических исследований. Образцы подвздошной кишки отбирали и фиксировали формалином для микроскопического гистологического исследования, при котором оценку в баллах выполняли ранее установленным

способом с использованием записей в Журнале гистологических и иммуногистохимических исследований.

Статистический анализ:

Статистический критерий соответствовал тем, которые применяли в
5 проходящих экспертную оценку публикациях с подобными данными и позволяет проводить попарные сравнения. Качественные данные оценивали при помощи критерия хи-квадрат. Значимость определяли при $p < 0,05$, а тенденцию при $0,05 \leq p < 0,10$.

Общие наблюдения / неблагоприятные явления:

10 Во время исследования имели место три неблагоприятных явления. Ни одно из неблагоприятных явлений не было связано с вакцинацией, и одно явление было связано с контрольным заражением *Lawsonia intracellularis*. Эти явления описаны ниже в таблице.

Общие наблюдения / неблагоприятные явления

Неблагоприятное явление	Пострадавшая свинья / группа	Дни исследования, когда возникло явление
Хромота / эвтаназировано	РС	D11
Пропалс прямой кишки / эвтаназировано	ЕПМАТВ	D36
Тяжелый илеит / обнаружено мертвым	РС	D45

15

Реакции на инъекции:

Ни у одного из вакцинированных животных не развивалось покраснение, опухание, повышение температуры или боль в течение 3-х дней оценки после вакцинации. Не было отмечено различий реакции в месте инъекции в группах,
20 получавших вакцину Ingelvac®3FLEX IM, отдельно или в смеси, которую вводили путем инъекции в комбинации с Enterisol® Ileitis.

Клинические наблюдения:

Показатели клинической диареи были нулевыми или нормальными у всех животных во время контрольного заражения и начинали отличаться у разных групп через 6 дней после инфекции (ДПИ). Частота случаев измененных
25 показателей диареи была значительно ($p < 0,0001$) больше в группе РС по сравнению с группой NC (см. таблицу ниже), указывая на то, что контрольное заражение *L. intracellularis* приводило к характерным клиническим признакам. Во всех группах, получавшие Enterisol® Ileitis, отмечалось значительное

снижение частоты случаев измененного показателя клинической диареи по сравнению с невакцинированной группой РС (см. таблицу ниже). Поведение после контрольного заражения не претерпело больших изменений: было отмечено только одно явление измененного поведения среди 501 оценки в

5 группе РС. Было обнаружено, что изменение показателя физического состояния вызвано контрольным заражением. Во всех экспериментальных группах значительно чаще случались изменения физического состояния по сравнению с отрицательной контрольной группой (см. таблицу ниже). Экспериментальная

10 группа ЕИМ была группой с наименьшей частотой случаев изменения физического состояния, с тенденцией ($p=0,054$) к снижению физического состояния по сравнению с невакцинированной группой РС.

Оценка клинических показателей среди экспериментальных групп.

	Показатель диареи	Показатель поведения	Показатель физического состояния
ЕИМ	172/528 ^c	0/528	6/528 ^b
ЕИМАТВ	172/514 ^c	0/514	10/514 ^{bc}
NC	5/352 ^b	0/352	0/352 ^a
РС	229/501 ^a	1/501	14/501 ^{bc}

Показатели макроскопических поражений:

15 Показатели макроскопических поражений подвздошной кишки, места преимущественной колонизации *L. intracellularis*, были наивысшими в группе РС со средним баллом 1,55 (ФИГУРА 1). Этот показатель был значительно выше, чем в контрольной группе без контрольного заражения (NC), что подтверждало эту модель контрольного заражения (ФИГУРА 1, $p<0,05$). Среди

20 вакцинированных групп группа ЕИМ имела наименьшие показатели поражения, в среднем 0,67 балла, то есть, значительно ($p<0,05$) ниже, чем в невакцинированной группе РС (ФИГУРА 1). В группе ЕИМАТВ развивался подобный уровень поражений, который был не таким тяжелым, как в группе РС, но не достигал статистической значимости. Длину макроскопических поражений

25 также измеряли с соблюдением подобной модели, как для показателя поражения. В группе ЕИМ средняя длина поражения подвздошной кишки составляла около половины показателя в группе РС ($p=0,097$) (ФИГУРА 2). Показатель тяжести определяли путем умножения показателя поражения на длину поражения. Средние показатели тяжести поражения представлены на ФИГУРЕ 3. Показатель

30 тяжести имел тенденцию, подобную наблюдаемой для показателя и длины

поражения. Группа ЕИМ имела средний показатель тяжести 15,63, тогда как группа РС имела средний показатель 40,68 ($p=0,053$; ФИГУРА 3). Вакцинированные группы также приводили к уменьшению поражений в других частях кишечного тракта. Дальнейшего исследования этой тенденции не проводили из-за отсутствия значительной разницы в поражениях между группами РС и NC, что, вероятно, было вызвано меньшим количеством животных с поражениями за пределами подвздошной кишки.

Масса тела:

Средний суточный привес (ССП) был почти одинаковым среди экспериментальных групп в период исследования перед контрольным заражением, и значительных различий между группами не было обнаружено. В период после контрольного заражения все группы, подвергнутые контрольному заражению, имели значительное снижение ССП по сравнению группой NC, которую не подвергали контрольному заражению (ФИГУРА 4). Группа ЕИМАТВ была вакцинированной группой, имевшей наилучшие показатели в период после контрольного заражения с ССП 1,71 фунта/день, что было значительно выше, чем в невакцинированной подвергнутой контрольному заражению группе РС ($p<0,05$), в которой средний ССП составлял 1,43. Группа ЕИМ была вакцинированной группой, которая занимала второе место по наблюдаемому после контрольного заражения ССП, который составлял 1,65, что также было значительно выше, чем в группе РС ($p<0,05$); (ФИГУРА 4).

ELISA по определению антител против *Lawsonia* в сыворотке:

Количество животных с антителами против *Lawsonia* в сыворотке, измеряемыми при помощи ELISA в ISU-VDL, показано на ФИГУРЕ 5. Все животные были серонегативными во время вакцинации, в 0-й день исследования (за 28 дней до контрольного заражения, -28 ДПИ). Только двое животных были сероположительными во время контрольного заражения (28-й день исследования) – одно животное в группе ЕИМ и другое в группе ЕИМАТВ. Это указывает на то, что внутримышечная вакцинация с применением Enterisol® Peitis в комбинации с вакциной Ingelvac®3FLEX не приводит к очень большой сероконверсии. Как и ожидалось, большинство животных были сероконвертированы и положительными на 21 ДПИ, что также подтверждало обоснованность контрольного заражения с применением *Lawsonia*, оправдывая ожидания, возлагаемые на эту модель контрольного заражения. В группе РС

было наибольшее количество животных с антителами против *Lawsonia* на 21 ДПИ – 95 % свиней были положительными. На 14 ДПИ в группах ЕИМ и РС было 67 % и 65 % процентов сероположительных свиней, соответственно.

Фекальная кПЦР на *Lawsonia*:

5 Согласно фекальной кПЦР, все животные были отрицательными на *Lawsonia* во время вакцинации, день исследования 0 (за 28 дней до контрольного заражения, -28 ДПИ). Во время контрольного заражения у двоих животных в группе ЕИМАТВ отмечали обнаружимый уровень *Lawsonia* в фекалиях согласно кПЦР. У одного из животных в группе РС значение Ct составляло 34,1 или 10 252/организмов на грамм фекалий во время контрольного заражения. Выделение *Lawsonia* достигло пика на 14 ДПИ, когда в группе РС в среднем было выделено 6,88 log₁₀ организмов на грамм фекалий. В этот момент времени группа ЕИМ привела к значительному ($p<0,05$) снижению фекального выделения по сравнению с группой РС, при уровне выделения 5,96 log₁₀ организмов на грамм фекалий, соответственно. На 21 ДПИ группа ЕИМ была группой, выделявшей 15 меньше всего *Lawsonia* среди подвергнутых контрольному заражению животных, со средним значением 3,20 log₁₀ организмов на грамм фекалий. Это было гораздо меньше, чем в невакцинированной группе РС, которая выделяла в среднем 4,64 log₁₀ организмов на грамм фекалий (ФИГУРА 6). Группа ЕИМАТВ 20 также снизила выделение по сравнению с РС, хотя и в меньшей степени, со средним значением 4,05 log₁₀ организмов на грамм фекалий, соответственно (ФИГУРА 6).

Микроскопические поражения и ИГХ *Lawsonia*:

25 Микроскопические поражения измеряли путем окрашивания гематоксилином-эозином (Н&Е) ткани терминального отдела подвздошной кишки, взятой при вскрытии. Группой, в которой развились наиболее тяжелые поражения, была группа РС, со средним показателем поражения 2,05, у животных в группе РС поражения не развивались, что также подтверждало эту модель инфицирования (ФИГУРА 7). Вакцинированной группой, в которой 30 развивались наименее тяжелые поражения, была группа ЕИМ, со средним показателем 1,29, который был значительно ниже, чем в группе РС (ФИГУРА 7, $p<0,05$). Группа ЕИМАТВ демонстрировала подобный, но более высокий средний показатель поражения по сравнению с группой ЕИМ, со средним показателем поражения 1,57.

Ткань терминального отдела подвздошной кишки, взятую при вскрытии и зафиксированную в формалине, также подвергали иммуногистохимическому (ИГХ) окрашиванию на антиген *L. intracellularis*. Подобно окрашиванию НЕ, группой с наивысшим показателем была группа РС, со средним показателем 2,23, который был значительно ($p < 0,05$) выше по сравнению с группой НС, также в подтверждение инфицирования и воспроизводство заболевания в этом исследовании (ФИГУРА 8). Подобно показателю НЕ, группа ЕИМ также была вакцинированной группой с самым низким показателем тяжести, с показателем 1,63, который был значительно ниже по сравнению с группой РС ($p < 0,05$).

Обсуждение:

В этом исследовании изучали эффективность лиофилизированной формы Enterisol® Peitis в комбинации с вакциной 3FLEX® в одной 2 мл дозе, которую вводили внутримышечным путем. Кроме того, оценивали взаимное влияние тиамулина и хлортетрациклина, которые вводили с кормом во время вакцинации.

Пролиферативная энтеропатия свиней (ПЭС), вызываемая *L. intracellularis*, успешно воспроизводилась в этом исследовании, согласно измерению по характерным макроскопическим поражениям, микроскопическим поражениям, фекальному выделению *L. intracellularis*, сероконверсии к *L. intracellularis*, клиническим признакам и влиянию на показатели продуктивности. Внутримышечная комбинация Enterisol® Peitis с 3FLEX®, “4FLEX” приводила к значительному и существенному снижению тяжести макроскопического поражения, тяжести микроскопического поражения, показателя клинической диареи и фекального выделения *L. intracellularis*. Незначительное, но численно выражаемое увеличение среднего суточного привеса также наблюдали в этой экспериментальной группе (ЕИМ) по сравнению с невакцинированными контрольными животными (РС). Эти результаты показывают, что внутримышечный путь и смешивание Enterisol® Peitis с вакциной 3FLEX® являются подходящим и эффективным вариантом для профилактики ПЭС. При этом также наблюдали, что эта комбинация вакцин была безопасной, и неблагоприятных явлений или реакций в месте инъекции отмечено не было.

При введении противомикробных средств во время вакцинации отмечали изменение в параметрах, оцениваемых в этом исследовании. Несмотря на наблюдаемое снижение макроскопических и микроскопических поражений в

группе ЕИМАТВ по сравнению с невакцинированными подвергнутыми контрольному заражению контрольными животными, эти уровни не достигали статистической значимости и увеличивались в числовом выражении по сравнению с тем же режимом лечения без противомикробных средств (ЕИМ).

5 Однако группа ЕИМАТВ была вакцинированной группой с наибольшим численно выражаемым привесом после контрольного заражения (ФИГУРА 4) и демонстрировала значительное снижение клинического показателя частоты случаев измененной диареи (таблица оценки клинических показателей среди экспериментальных групп). Эти результаты показывают, что противомикробные
10 средства, возможно, препятствуют эффективности вакцины, хотя все же обеспечивался значительный уровень защиты при вакцинации в присутствии испытываемых противомикробных средств, которые эффективны против *Lawsonia*.

В исследовании Nogueira M. G. et al. (Immunological responses to vaccination
15 following experimental *Lawsonia intracellularis* virulent challenge in pigs. Vet Microbiol. 2013) также было обнаружено, что внутримышечное введение Enterisol® Ileitis приводило к снижению микроскопических поражений и фекального выделения *L. intracellularis* по сравнению с невакцинированными и подвергнутыми контрольному заражению животными. В этом исследовании
20 живой антиген *L. intracellularis*, присутствующий в Enterisol® Ileitis, вводили отдельно, без какого бы то ни было адъюванта. Возможно, смешивание Enterisol® Ileitis с 3FLEX® способно улучшить иммунную реакцию на вакцину благодаря включению адъюванта ImpranFLEX®.

Это исследование представляет убедительное доказательство того, что
25 внутримышечное введение Enterisol® Ileitis в комбинации с Ingelvac 3FLEX® обеспечивает существенную защиту от *L. intracellularis*.

Потенциальные помехи противомикробных средств, вводимых во время вакцинации, неочевидны, что дает основания для дальнейшего исследования. Однако внутримышечная вакцинация с сопутствующим введением
30 противомикробного средства обеспечивала значительный уровень защиты в нескольких релевантных параметрах заболевания.

Пример 3: Исследование Enterisol® Pleitis, вводимого внутримышечно и при наличии кормовых противомикробных средств

Введение:

Вакцина Enterisol® Pleitis является высокоэффективным, успешным продуктом, утвержденным к применению для здоровых свиней после отъема для профилактики пролиферативной энтеропатии свиней благодаря введению *Lawsonia intracellularis* с питьевой водой или путем перорального вливания. На данный момент отсутствуют данные, касающиеся эффективности этого продукта, вводимого путем внутримышечной инъекции в комбинации с 3FLEX® и параллельно с сопутствующей противомикробной терапией.

Цели этого Примера следующие: 1. Оценка эффективности вакцины Enterisol® Pleitis, применяемой в комбинации с вакциной 3FLEX® и вводимой путем внутримышечной инъекции, и 2. Оценка эффективности этой комбинации вакцин при введении свиньям, получавшим сопутствующее противомикробное лечение с кормом.

ФИГУРА 9 поясняет смешивание вакцины.

ФИГУРА 10 представляет схему исследования.

К первичным измеряемым параметрам относятся показатели макроскопического поражения, показатели микроскопического поражения и фекальное выделение. К вторичным измеряемым параметрам относятся средний суточный привес, клинические показатели и сероконверсия.

Материалы и способы:

Свиней приобретали после отъема в возрасте 17 - 21 дней и рандомизированно разделяли на 3 экспериментальных группы по 24 животных в каждой. Экспериментальные группы были следующие: невакцинированная положительная контрольная с контрольным заражением (РС); получающая Enterisol® Pleitis внутримышечно с вакциной 3FLEX (ЕИМ); получающая Enterisol® Pleitis внутримышечно с вакциной 3FLEX с сопутствующим противомикробным введением (ЕИМАТВ). Приготовление вакцины осуществляли путем восстановления влагосодержания лиофилизированной формы Enterisol® Pleitis вакциной 3FLEX®. В результате получали конечную 2 мл дозу, содержащую модифицированный живой антиген *Lawsonia intracellularis* вместе с фракциями вакцины ЦВС2, *M. hyo.* и МЖВ ВРРСС. Чтобы исследовать, подавляет ли противомикробное лечение, применяемое с кормом,

эффективность вакцинации живой модифицированной вакциной Enterisol® Peitis, группе ЕИМАТВ с кормом вводили тиамулин (35 млн^{-1}) и хлортетрациклин (400 млн^{-1}), начиная со дня за одну неделю до вакцинации и с продолжением в течение одной недели после вакцинации. Всех животных подвергали контрольному заражению кишечным гомогенатом, содержащим вирулентный *Lawsonia intracellularis*, через 28 дней после вакцинации и вскрытию еще через 21 день. При вскрытии оценивали клинические признаки, средний суточный привес (ССП), фекальное выделение, а также макроскопические и микроскопические поражения.

Результаты:

Обе вакцинированные экспериментальные группы приводили к значительному снижению клинического показателя диареи ($P < 0,05$). Обе вакцинированные группы также приводили к увеличению СПП после контрольного заражения. Контрольная группа с контрольным заражением имела СПП после контрольного заражения 1,43 фунта, тогда как группы ЕИМ и ЕПАТВ имели показатели СПП 1,65 и 1,71 фунта ($P < 0,05$), соответственно. Показатели макроскопических поражений снижались в обеих вакцинированных группах со значениями 0,67 и 1,04 по сравнению с невакцинированной группой, имевшей средний показатель 1,55. Подобным образом микроскопические поражения также уменьшали путем вакцинации, со средним показателем 2,05 в группе РС по сравнению со средними показателями 1,29 и 1,57 в группах ЕИМ и ЕИМАТВ, соответственно. Неблагоприятных реакций отмечено не было, поскольку комбинированная вакцина для внутримышечного введения была признана безопасной.

Заключение:

Две группы, получавших предназначенные для инъекций вакцины, которые сравнивали с невакцинированной группой после контрольного заражения *Lawsonia*, демонстрировали улучшение СПП, приводили к уменьшению показателей макроскопического и микроскопического поражения, снижению фекального выделения *Lawsonia* и снижению клинических признаков. Подтверждения помех противомикробного средства для комбинации Enterisol® Peitis и внутримышечной вакцины 3FLEX® не наблюдали. Это исследование демонстрирует новые средства для свиноводов, что дает основания для дальнейшего исследования.

Пример 4: Эффективность вакцины OPC2 ВПЧ от цирковируса свиней
Типа 2а (ЦВС2а) в комбинации с вакциной Lawsonia АЖК, вводимой
внутримышечно

Цель исследования состоит в демонстрации эффективности вакцины OPC2 ВПЧ от цирковируса свиней Типа 2а (ЦВС2а) (Ingelvac CircoFLEX®) в комбинации с вакциной Lawsonia АЖК (авирулентной живой культурой) (Enterisol® Pleitis, лиофилизированной), вводимой внутримышечно свиньям трехнедельного возраста против контрольного заражения цирковирусом свиней Типа 2а через четыре недели.

Свиней рандомизируют после включения в это исследование. Во время фазы вакцинации свиней помещают в загон с однопометниками. Как показано ниже в Таблице, в 0-й день возраст свиней составляет 21 ± 3 дней во время вакцинации. Вакцину ЦВС2а OPC2 ВПЧ (Ingelvac CircoFLEX®) применяют в комбинации с *L. intracellularis* АЖК (авирулентной живой культурой; Enterisol® Pleitis, лиофилизированной), влагосодержание лиофилизата Enterisol® Pleitis восстанавливают при помощи Ingelvac CircoFLEX (Группа 1). Группа 2 (авирулентная живая культура Lawsonia, моновалентная) включает авирулентную культуру Lawsonia, а также солевой раствор и адъювант Carborol, поскольку Carborol и солевой раствор присутствуют в Ingelvac CircoFLEX® и, таким образом, Carborol и солевой раствор также присутствуют в Группе 1 и 3. Группа 3 (ЦВС2 ВПЧ, моновалентная) включает ЦВС2а OPC2 ВПЧ. Группа NTX состоит из шести свиней и служит в качестве не получающей лечения контрольной группы.

Свиней наблюдают на наличие любых неблагоприятных реакций на инокуляцию, включая реакции в месте инъекции и анафилаксию.

Lawsonia АЖК (авирулентная живая культура; Enterisol® Pleitis, лиофилизированная) и ЦВС2а OPC2 ВПЧ (Ingelvac CircoFLEX®) являются зарегистрированными и общеизвестными ветеринарными вакцинами. Однако в публикациях WO2006/072065 и WO2008/076915 описано генерирование вакцины ЦВС, ее рецептирование и ее введение. В публикациях WO 96/39629 и WO 05/011731 описано культивирование *Lawsonia intracellularis*, ослабленного *Lawsonia intracellularis* и его введение.

Перед контрольным заражением (D27) свиней смешивают. Группу NTX подвергают вскрытию в D20, чтобы установить, что свиньи не подвергались

воздействию ЦВС2 дикого типа во время фазы вакцинации. На 28-й день свиней подвергают контрольному заражению вирулентным ЦВС2а ($4,77 \log_{10}$ ЦПД₅₀ / 2 мл дозу) путем внутримышечной инъекции и интраназального введения. Клинические показатели определяют с 27-го дня на основе наблюдений

5 консистенции фекалий, физического состояния и поведения на оставшуюся часть исследования.

Вскрытие

Через двадцать два дня после контрольного заражения животных в группах 1 - 3 подвергают эвтаназии и вскрытию. Лимфатические узлы и подвздошную

10 кишку оценивают, определяют балльный показатель и собирают для гистопатологического и иммуногистохимического анализа.

План эксперимента

Группа	Описание	Кол-во свиней	Объем дозы вакцинации (D0)	Путь введ.	Контрольное заражение (D28)	Вскрытие
1	<i>Lawsonia</i> , авирулентная живая культура + ЦВС2 ВПЧ (совместное применение, бивалентная)	24	1 мл	IM	D28 ЦВС2а 1 мл IN + 1 мл IM	D50
2	<i>Lawsonia</i> , авирулентная живая культура (моновалентная)	24	1 мл	IM		
3	ЦВС2 ВПЧ (моновалентная)	24	1 мл	IM		
NTX	NTX строгий контроль	6	Н/Д	Н/Д	Н/Д	D20

Общий осмотр всех органов и участка инъекции выполняют в процессе

15 вскрытия для выявления отклонений. Образцы миндалин, трахеально-бронхиальных лимфатических узлов (ТБЛУ), мезентериальных лимфатических узлов (МЛУ), наружных подвздошных лимфатических узлов (НПЛУ) и подвздошной кишки собирают и фиксируют в 10 % нейтральном буферном формалине. Образцы обрабатывают в соответствии со стандартной процедурой и

20 оценивают путем окрашивания гематоксилином-эозином (H&E) для гистопатологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования на антиген ЦВС2. Балльную оценку тканей проводят в соответствии с представленной ниже системой балльной оценки.

[illegible]

Результаты в группе 2 показывают, что контрольное заражение было успешным, поскольку животные, вакцинированные только авирулентной живой вакциной *Lawsonia*, демонстрируют высокую частоту инфицирования ЦВС2. Кроме того, результаты показывают, что вакцина ЦВС2 эффективна в комбинации с авирулентной живой вакциной *Lawsonia*, поскольку группа 1 не демонстрирует клинических признаков инфекции ЦВС2. Группа 1 (авирулентная живая культура *Lawsonia* + ЦВС2 ВПЧ; бивалентная вакцина) ведет себя как Группа 3 (ЦВС2 ВПЧ, моновалентная вакцина), которая была вакцинирована только вакциной ЦВС2. Таким образом, взаимных помех при комбинации вакцины ЦВС2 с авирулентной живой вакциной *Lawsonia* не наблюдается.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина, включающая антиген *Lawsonia intracellularis* и один или несколько антигенов по меньшей мере еще одного патогена, выбранного из группы, к которой относятся цирковирус свиней (ЦВС), *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo.*) и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (ВРРСС), причем антиген *Lawsonia intracellularis* является живым *Lawsonia intracellularis*.
2. Вакцина по п. 1, причем дополнительным патогеном является ЦВС.
3. Вакцина по п. 1, причем дополнительным патогеном является *M. hyo.*
4. Вакцина по п. 1, причем дополнительным патогеном является ВРРСС.
5. Вакцина по п. 1, причем дополнительными патогенами являются ЦВС и *M. hyo.*
6. Вакцина по п. 1, причем дополнительными патогенами являются ЦВС и ВРРСС.
7. Вакцина по п. 1, причем дополнительными патогенами являются ВРРСС и *M. hyo.*
8. Вакцина по п. 1, причем дополнительными патогенами являются ЦВС, *M. hyo* и РРСС.
9. Вакцина по одному из пунктов 1, 2 5, 6 и 8, причем антиген ЦВС является рекомбинантным полипептидом.
10. Вакцина по п. 9, причем рекомбинантный полипептид экспрессируется геном ОРС ЦВС.

11. Вакцина по п. 10, причем ген ОРС ЦВС является геном ОРС ЦВС2.

12. Вакцина по одному из пунктов с 9 по 11, причем антиген
5 экспрессируется в клетках бакуловируса.

13. Вакцина по одному из пунктов 1, 2, 5 и 6, причем антиген ЦВС является антигеном, включенным в Ingelvac CircoFLEX®.

10 14. Вакцина по одному из пунктов 1, 2, 5, 6 и 8 - 13, причем вакцина имеет дозу антигена ЦВС от приблизительно 2 мкг до приблизительно 400 мкг или дозу белка ОРС2 ЦВС2 от приблизительно 2 мкг до приблизительно 400 мкг.

15 15. Вакцина по одному из пунктов 1, 3, 5 и 7, причем антиген *M. hyo.* является супернатантом и/или бактерином.

16. Вакцина по одному из пунктов 1, 3, 5, 7 и 15 причем антиген *M. hyo.* является антигеном, включенным в Ingelvac MycoFLEX®.

20 17. Вакцина по одному из пунктов 1, 4, 6 и 7, причем антиген ВРРСС является живым вирусом ВРРСС.

25 18. Вакцина по п. 17, причем живой вирус ВРРСС является модифицированным живым вирусом.

19. Вакцина по п. 17, причем живой вирус ВРРСС является ослабленным вирусом.

30 20. Вакцина по одному из пунктов с 17 по 19, причем вакцина включает дозу антигена ВРРСС от приблизительно 10^1 до приблизительно 10^7 вирусных частиц на дозу или от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^7 вирусных частиц на дозу.

21. Вакцина по одному из пунктов 1, 4, 6, 7 и 17 - 20, причем антиген ВРРСС является лиофилизированным.

22. Вакцина по одному из пунктов 1, 4, 6, 7 и 17 - 21, причем антиген ВРРСС является антигеном, включенным в МЖВ ВРРСС Ingelvac®.

23. Вакцина по п. 1, причем антиген ЦВС, *M. hyo.* и ВРРСС является антигеном ЦВС, *M. hyo.* и ВРРСС, включенным в 3FLEX®.

24. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 23, причем живой *Lawsonia intracellularis* является модифицированным живым *Lawsonia intracellularis*.

25. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 23, причем живой *Lawsonia intracellularis* является ослабленным *Lawsonia intracellularis*.

26. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 25, причем вакцина включает дозу антигена *Lawsonia intracellularis* приблизительно от 10^3 до 10^9 бактерий/кг массы тела, предпочтительно – приблизительно от 10^5 до 10^7 бактерий/кг массы тела.

27. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 26, причем вакцина включает дозу антигена *Lawsonia intracellularis* от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^7 бактерий *Lawsonia intracellularis*.

28. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 27, причем антиген *Lawsonia intracellularis* является лиофилизированным.

29. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 28, причем антиген *Lawsonia intracellularis* является антигеном, включенным в Enterisol® Ileitis.

30. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 29, причем вакцина также включает один или несколько адъювантов.

31. Вакцина по п. 30, причем адъювант(ы) включает(ют) один или несколько полимеров акриловой или метакриловой кислоты; сополимер малеинового ангидрида и алкенильного производного; полимер акриловой или метакриловой кислоты, который является сшитым; полимер акриловой или метакриловой кислоты, который является сшитым с полиалкениловым эфиром сахара или полиспирта; карбомер; акриловый полимер, сшитый с полиоксисоединением, имеющим по меньшей мере 3 и не более 8 гидроксильных групп с атомами водорода по меньшей мере трех гидроксильных, необязательно замененных ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими по меньшей мере 2 атома углерода, причем вышеупомянутые радикалы содержат от 2 до 4 атомов углерода, такие как винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы, и ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие как метил; Carbopol®; Carbopol® 974P; Carbopol® 934P; Carbopol® 971P; Carbopol® 980; Carbopol® 941P; ImpranFLEX®; гидроксид алюминия; фосфат алюминия; сапонин; Quil A; QS-21; GPI-0100; эмульсию типа "вода в масле"; эмульсию типа "масло в воде"; эмульсию типа "вода в масле в воде"; эмульсию на основе легкого жидкого парафинового масла или адъюванта, соответствующего требованиям Европейской фармакопеи; изопреноидное масло; сквалан; скваленовое масло, полученное в результате олигомеризации алкенов или изобутена или децена; сложный(е) эфир(ы) кислоты (кислот) или спирта(ов), которые содержат линейную алкильную группу; растительное(ые) масло(а); этилолеат; пропиленгликольди-(каприлат/капрат); глицерилтри-(каприлат/капрат); пропиленгликольдиолеат; сложный(е) эфир(ы) разветвленной(ых) жирной(ых) кислоты (кислот) или спирта(ов); сложный(е) эфир(ы) изостеариновой кислоты; неионное(ые) поверхностно-активное(ые) вещество(а); сложный(е) эфир(ы) сорбита или маннита или гликоля или полиглицерина или пропиленгликоля или олеиновой, или изостеариновой кислоты или рициноленовой кислоты или гидроксистеариновой кислоты, необязательно этоксилированной, ангидроманнитолеата; блоксополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, продукт Pluronic, адъювантная система RIBI; блоксополимер; SAF-M; монофосфорил-липид А; адъювант авридин липид-амин; термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой); холерный токсин; IMS 1314, или мурамилдипептид.

32. Вакцина по п. 30 или п. 31, причем адъювант(ы) является (являются) карбомером(ами).

5 33. Вакцина по одному из пунктов с 30 по 32, причем адъювантом(ами) является (являются) Carbopol® и/или ImpranFLEX®.

10 34. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 33, причем живой *Lawsonia intracellularis* является ослабленным *Lawsonia intracellularis* и/или антиген ЦВС является рекомбинантным полипептидом, экспрессируемым геном OPC2 ЦВС, и/или антиген *M. hyo.* является бактерином, и/или антиген BPPCC является ослабленным вирусом BPPCC.

15 35. Вакцина по одному из пунктов 1 и 24 - 34, причем антиген *Lawsonia intracellularis* лиофилизируют и растворяют в вакцине 3FLEX®.

36. Вакцина по п. 35, причем антиген *Lawsonia intracellularis* является Enterisol® Ileitis.

20 37. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 36, причем вакцина также включает фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель.

25 38. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 37, причем вакцина предусмотрена в форме для системного введения.

39. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 38, причем вакцину рецептируют и/или упаковывают для однократного или однократного введения.

30 40. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 38, причем вакцину рецептируют и/или упаковывают для многократного режима, предпочтительно двухкратного режима.

41. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 40, причем вакцина предусмотрена как лекарственная форма; причем вышеупомянутую

лекарственную форму доставляют из контейнера, содержащего большее количество вышеупомянутой вакцины, и предусмотрена возможность доставки лекарственной формы вышеупомянутой вакцины из вышеупомянутого контейнера.

5

42. Вакцина по п. 41, причем контейнер содержит по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200 или по меньшей мере 250 доз вышеупомянутой вакцины.

10

43. Вакцина по одному из пунктов с 1 по 42 для применения согласно способу вызывания защитной иммунной реакции у животного, который включает введение вышеупомянутой вакцины животному.

15

44. Вакцина для применения по п. 43, причем животным является свинья.

20

45. Вакцина для применения по п. 43 или п. 44, причем способ заключается в вызывании защитной иммунной реакции у животного против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС.

25

46. Вакцина для применения по одному из пунктов с 43 по 45, причем вакцину вводят системно.

47. Вакцина для применения по одному из пунктов с 43 по 46, причем вакцину вводят одной дозой.

30

48. Вакцина для применения по одному из пунктов с 43 по 47, причем животное одновременно / параллельно лечат одним или несколькими антибиотиками.

49. Вакцина для применения по одному из пунктов с 43 по 48, причем способ заключается в иммунизации животного против клинического заболевания, вызываемого по меньшей мере одним патогеном у вышеупомянутого животного, причем вышеупомянутая вакцина не способна

вызывать клинические признаки инфекции, но способна вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую животное против патогенных форм вышеупомянутого по меньшей мере одного патогена.

5 50. Вакцина для применения по одному из пунктов с 43 по 49, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для уменьшения поражения кишечника у животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида.

10 51. Вакцина для применения по п. 50, причем поражения кишечника являются поражениями подвздошной кишки.

15 52. Вакцина для применения по п. 50 или п. 51, причем поражения кишечника являются макроскопическими повреждениями и/или микроскопическими повреждениями.

20 53. Вакцина для применения по одному из пунктов с 43 по 52, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для уменьшения фекального выделения у животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида.

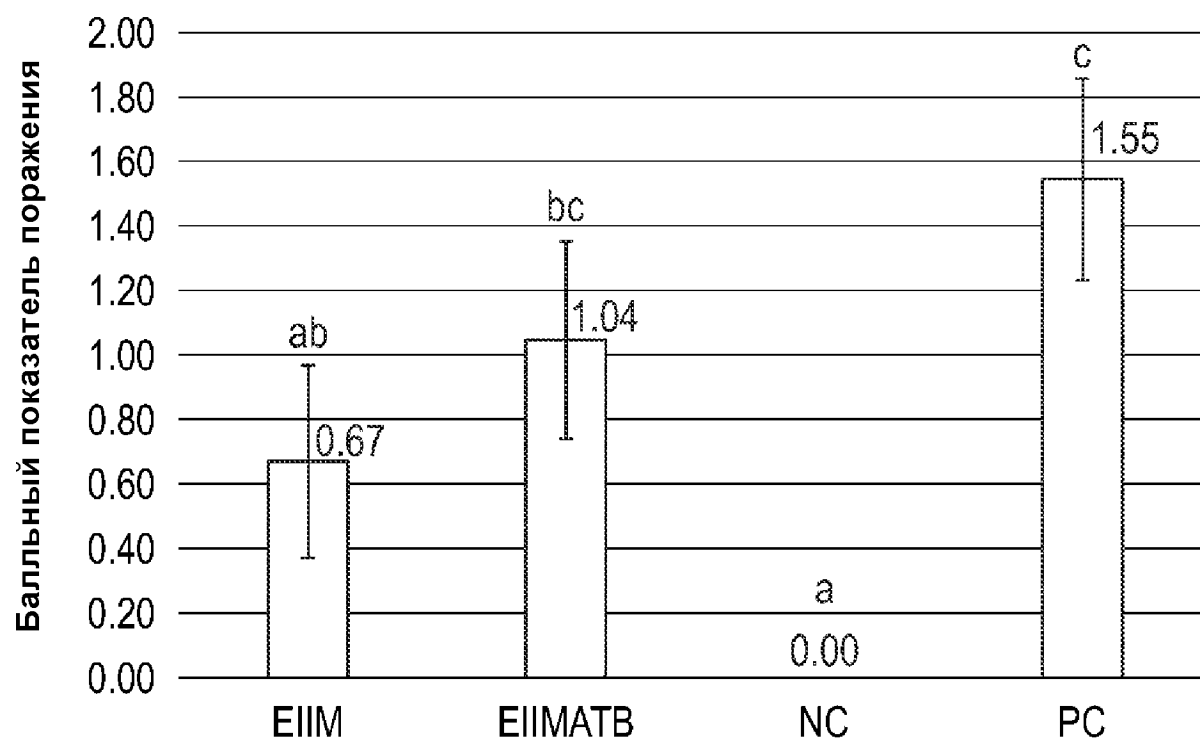
25 54. Вакцина для применения по одному из пунктов с 43 по 53, причем защитная иммунная реакция против *Lawsonia intracellularis* предназначена для увеличения среднего суточного привеса животного по сравнению с животным из неиммунизированной контрольной группы того же вида.

55. Вакцина для применения по одному из пунктов с 43 по 54, причем вакцина защищает от контрольного заражения 8×10^9 бактерии *Lawsonia*.

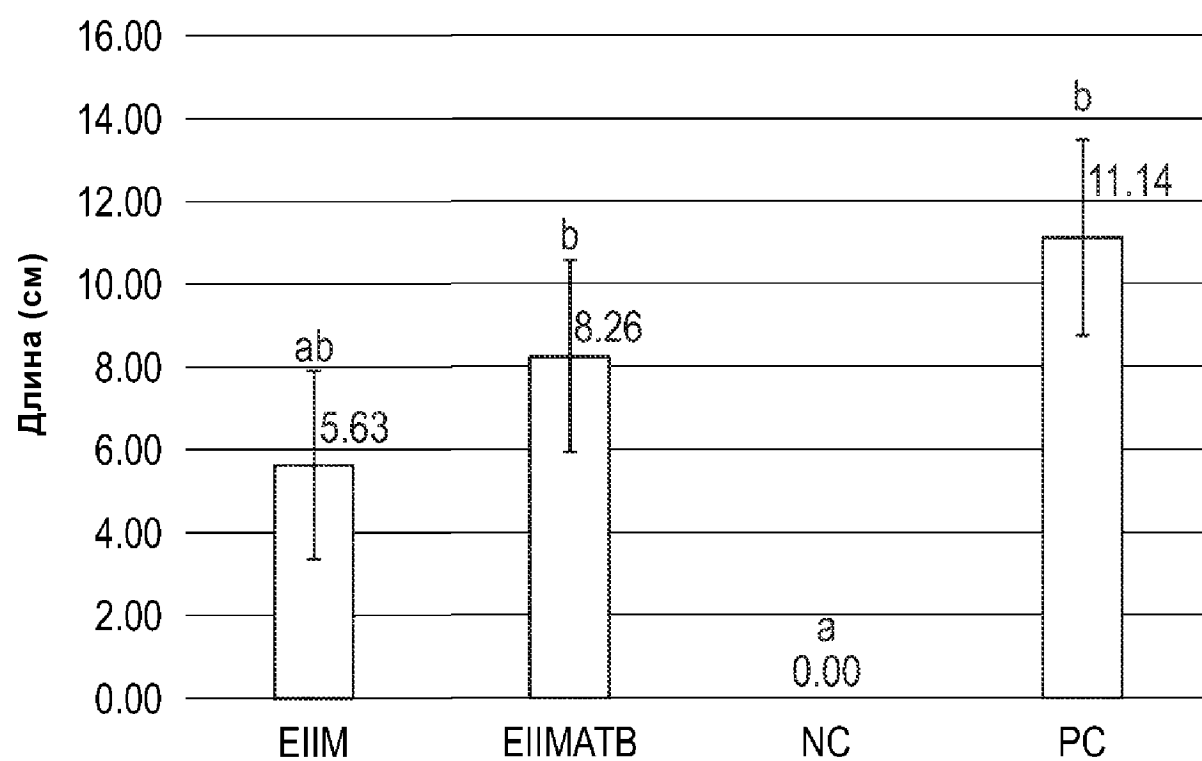
30 56. Способ вызывания защитной иммунной реакции у животного против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС, который включает введение животному вакцины по одному из пунктов с 1 по 42.

57. Способ иммунизации животного против клинического заболевания, вызываемого по меньшей мере одним патогеном у вышеупомянутого животного, причем вышеупомянутый способ включает этап введения животному вакцины по одному из пунктов с 1 по 42, причем вышеупомянутая вакцина не способна
5 вызывать клинические признаки инфекции, но способна вызывать иммунную реакцию, иммунизирующую животное против патогенных форм вышеупомянутого по меньшей мере одного патогена.

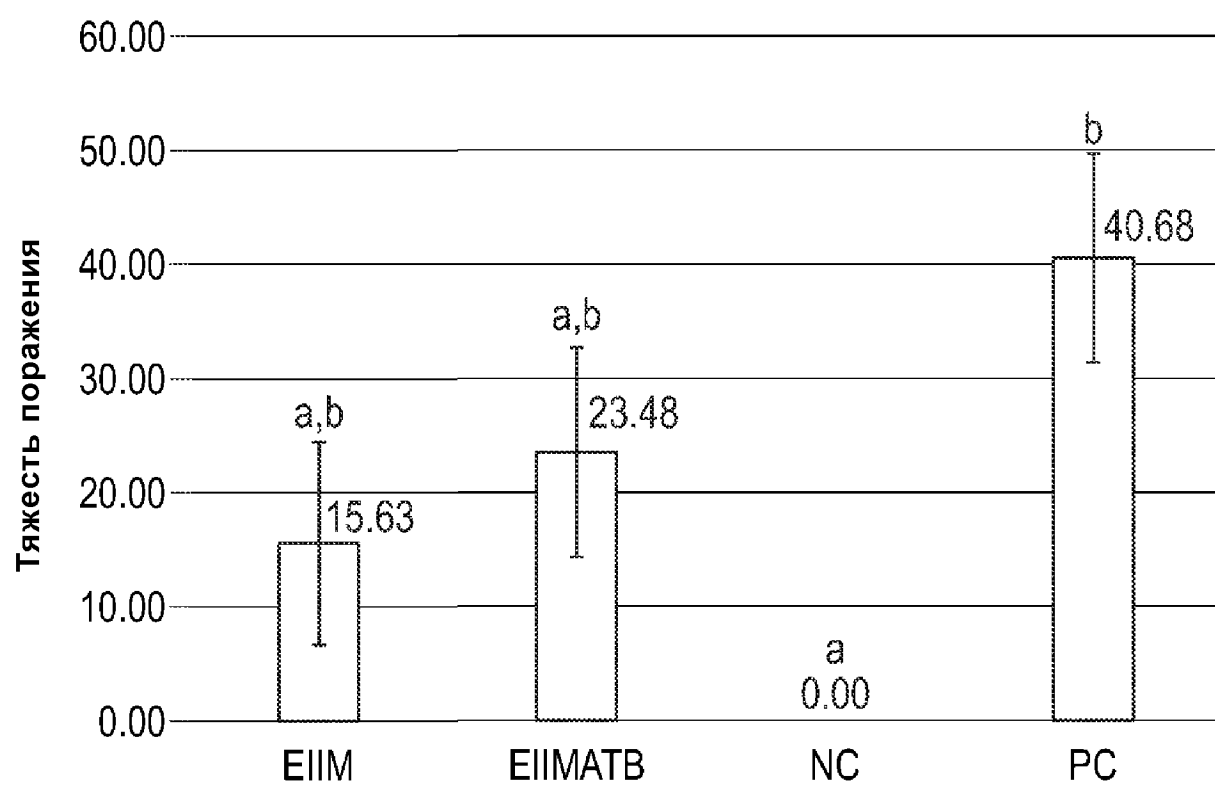
58. Применение вакцины по одному из пунктов с 1 по 42 в
10 при изготовлении композиции для вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС или в способе вызывания защитной иммунной реакции против *Lawsonia intracellularis* и/или ЦВС, и/или *M. hyo.*, и/или ВРРСС.



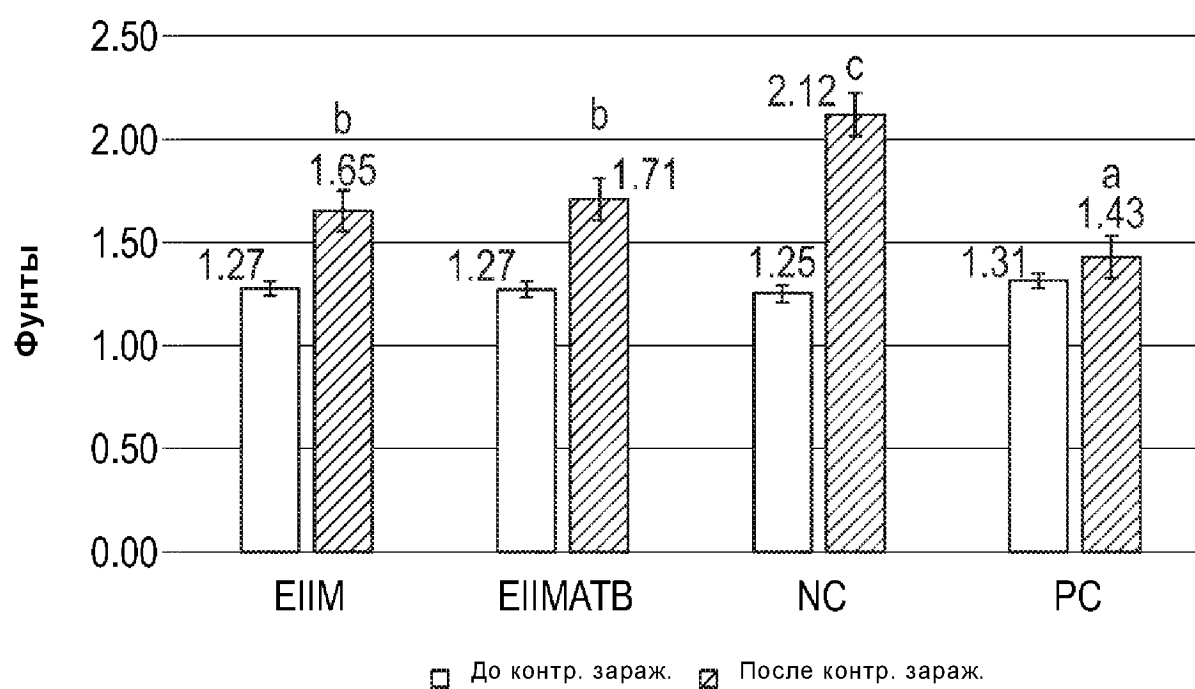
ФИГ. 1



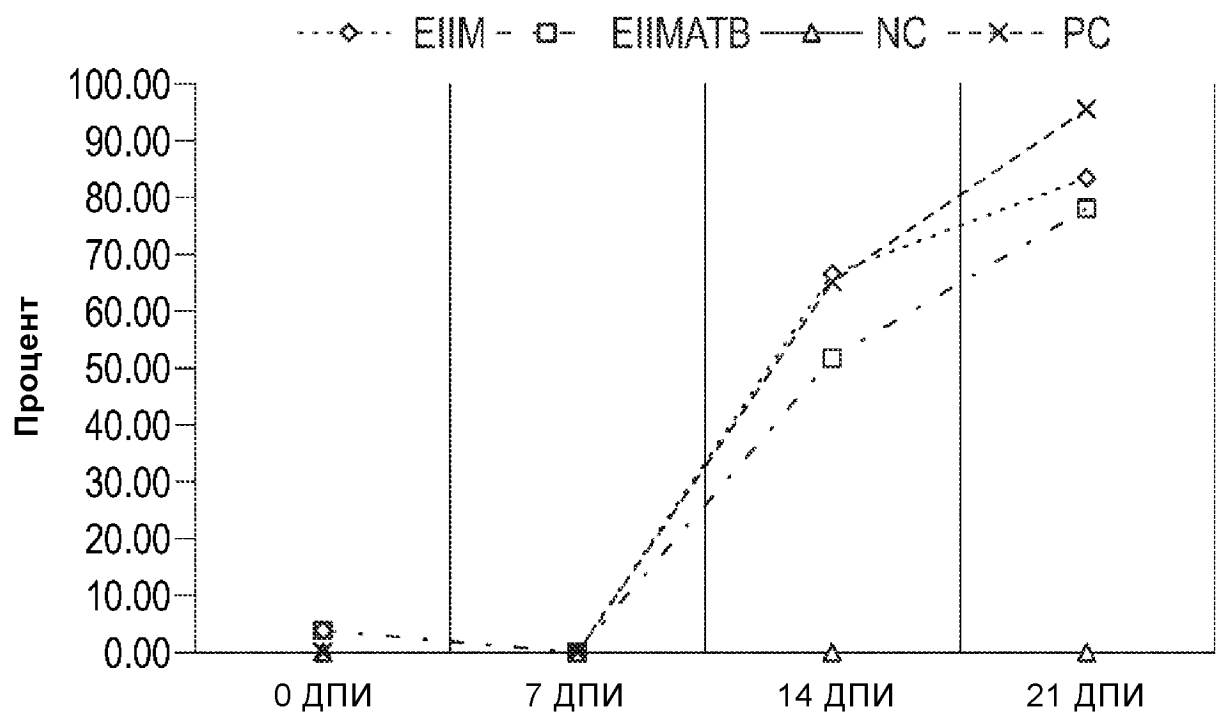
ФИГ. 2



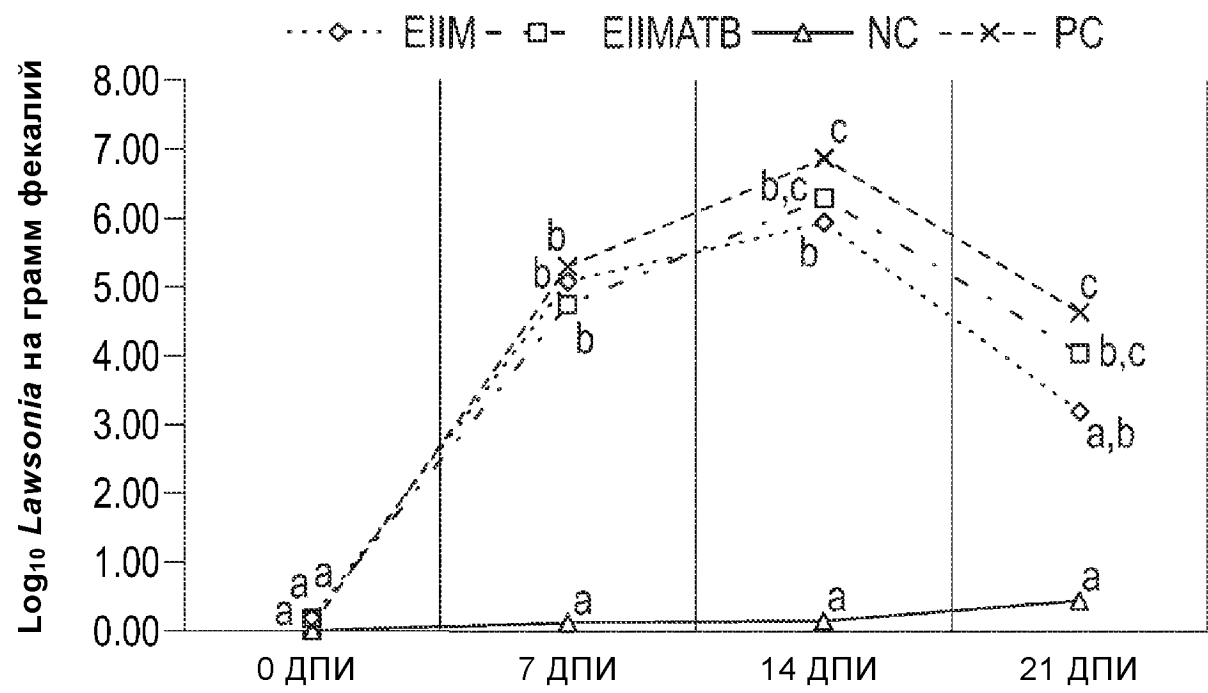
ФИГ. 3



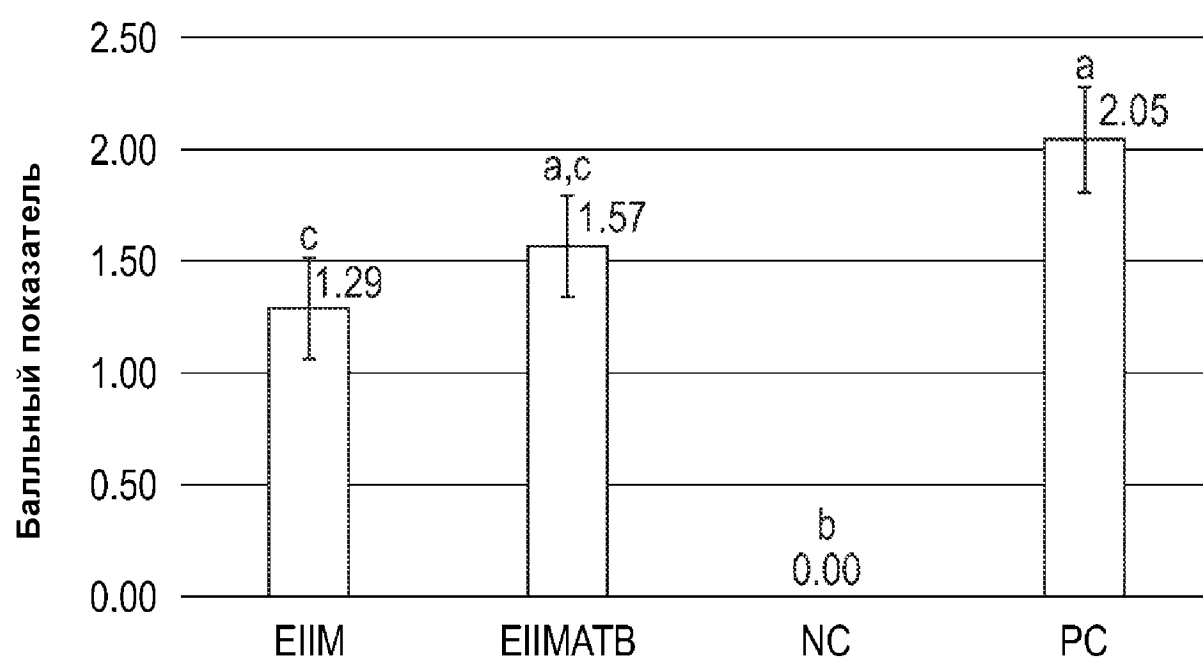
ФИГ. 4



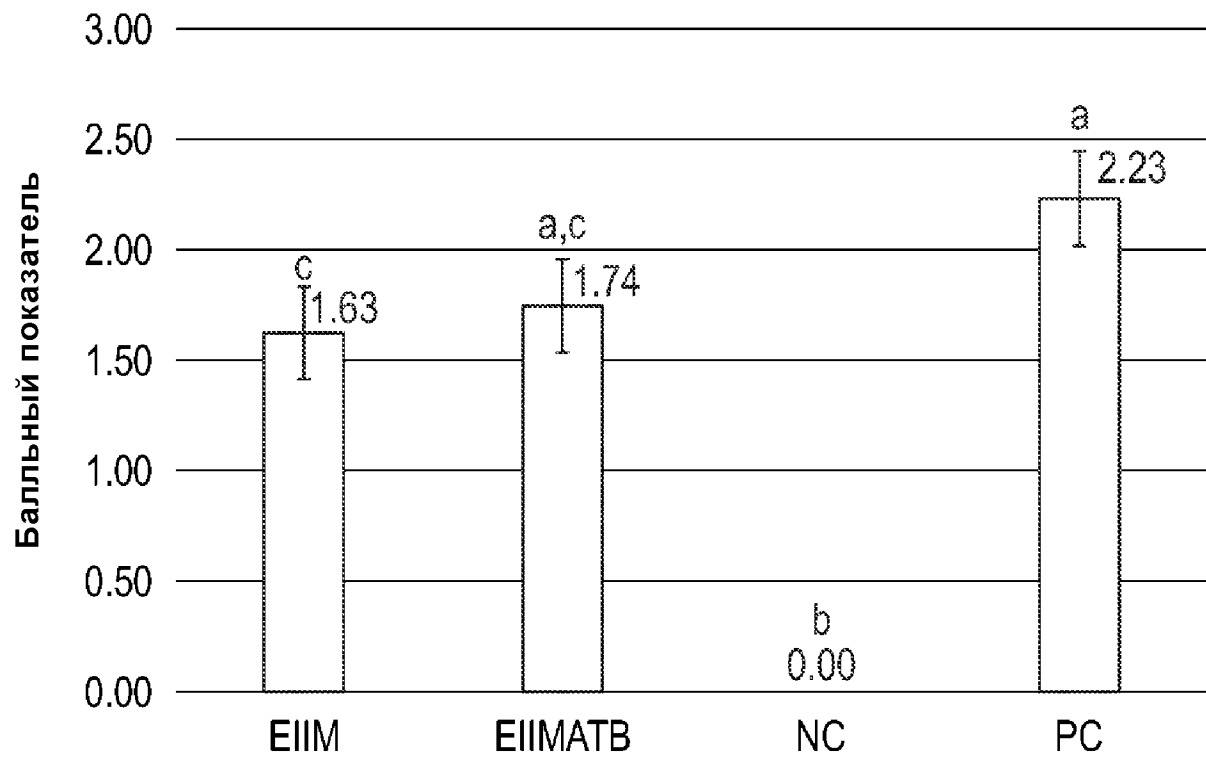
ФИГ. 5



ФИГ. 6

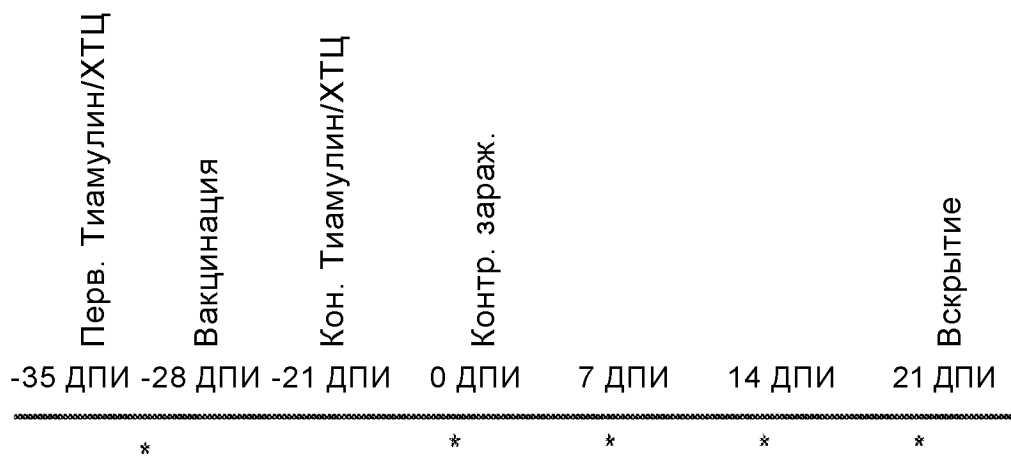
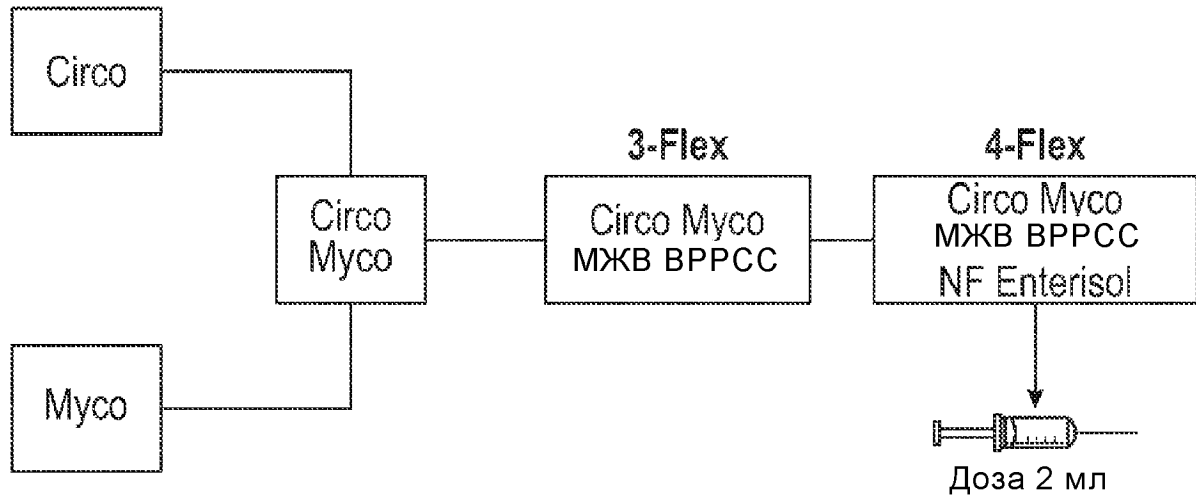


ФИГ. 7



ФИГ. 8

ФИГ. 9



ФИГ. 10