



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **121097**

(13) **C2**

(51) МПК

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C12R 1/35** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 39/295** (2006.01)

**A61K 35/76** (2015.01)

**C07K 14/30** (2006.01)

**A61P 31/10** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2015 07462</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Джордан Дайана М. Мерфі (US), Мартінсон Брайан Томас (US), Мюленталер Крістін Маргарет (US), Нойбауер Аксель (US), Айер Арун В. (US)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>20.12.2013</b>	(73) Власник(и):	<b>БЬОРІНГЕР ІНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДІКА ГМБХ, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany (DE)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>10.04.2020</b>	(74) Представник:	<b>Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</b>
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/747,026</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>Sobko A.I. et al: "Development of specific technics for the prevention of mycoplasma infections in swine", Archiv fuer experimentelle Veterinaermedizin, Hirzel Verlag, Leipzig, DE, vol. 43, no. 5, 01.01.1989, P.645 - 655 US 2005037027 A1, 17.02.2005 WO 2009126356 A2, 15.10.2009 WO 2011075379 A1, 23.06.2011</b>
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>28.12.2012</b>		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>10.11.2015, Бюл.№ 21</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.04.2020, Бюл.№ 7</b>		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2013/076803, 20.12.2013</b>		

## (54) ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ АНТИГЕНИ МІКОПЛАЗМ

### (57) Реферат:

Винахід стосується імуногенної композиції та її застосування, що містить один або декілька антигенів мікоплазм із мікоплазматичних бактерій, вибраних із групи, яка складається з *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій; або один або декілька компонентів системи на основі еукаріотичних клітин на MDCK-клітини або McCoу-клітини, де один або декілька антигенів являють собою цільні інактивовані бактерини.

UA 121097 C2



### Передумови створення винаходу

Бактерії роду *Mycoplasma* належать до класу Mollicutes і являють собою групу організмів, що має походження з типу Firmicutes (фірмікути). Mollicutes являють собою найдрібніші організми, що автономно реплікуються, які структурно відрізняються від інших еубактерій відсутністю в них клітинної стінки. Поверхня їх одношарової мембрани розглядається як поверхня розділу, що має вирішальне значення для адаптації й виживання, які мають місце в імунікомпетентному хазяїні, що має складний механізм. Крім того, Mollicutes має невеликий геном і обмежену кількість метаболічних шляхів. Із цієї причини представники роду *Mycoplasma* описані також як "мінімальні саморепліковані організми". Однак, незважаючи на цю уявну простоту, велика кількість мікоплазматичних бактерій є патогенами людини й широкого спектру тварин. На відміну від інших патогенних бактерій, вірулентність яких головним чином визначається токсинами, інвазінами й цитолізинами, патогенні мікоплазматичні бактерії, ймовірно, не мають вказаних типових первинних факторів вірулентності (Chambaud I. і ін., Nucleic Acids Res. 29, 2001, стор. 2145-2153, Fraser і ін., Science 270, 1995, стор. 397-403). Зараз доступна лише невелика кількість даних про молекулярні механізми й фактори, які забезпечують патогенним мікоплазмам можливість ушкоджувати клітини-хазяї, викликати запалення й захворювання.

Патогенні мікоплазматичні бактерії є, насамперед, збудниками атипової пневмонії, сечостатевої інфекції і артритів у людини й тварин (*Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*, під ред. Blanchard A. і G. F. Browning, вид-во Horizon Bioscience, Wymondham U.K., 2005; Kobisch M. і Friis N.F. Swine mycoplasmoses, Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1996, стор. 1569-1605). Відомо, що реактивація або загострення симптомів повторюються й поступово переходять у хронічну стадію захворювання, і із цієї причини поряд з раннім діагностуванням і раннім лікуванням важливими є попередження або лікування загострення або реактивації. *M. hyorheumoniae* є етіологічним агентом ензоотичної пневмонії. У свиней це є однією з найпоширеніших і економічно важливих хвороб, з якою зв'язані знижений приріст маси й погана ефективність використання корму. Хвороба викликає ушкодження в легенях, хронічний кашель, тьмянний волоссяний покрив, затримку росту й зовнішні ознаки поганого розвитку, що проявляються протягом декількох тижнів. Ушкодження легень, насамперед у вентральній верхівковій й серцевій долях, характеризуються гіперплазією епітеліальних клітин і підвищеним накопиченням монуклеарних клітин у периваскулярному і перибронхіальному просторі. *M. hyorhinis*, інший вид мікоплазм, що часто зустрічається в дихальних шляхах свиней, може викликати полісерозит і артрит у поросят. *M. hyosynoviae*, як правило, локалізовані в мигдаликах і можуть викликати артрит, що приводить до економічних втрат. *M. hyosynoviae* виділяють зі зразків, отриманих із суглобів і з гортані/мигдалин, і цей вид може індукувати утворення антитіл у крові й синовіальній рідині. *M. bovis* розглядається як один або найбільш патогенний вид мікоплазматичних бактерій, і він наносить серйозний економічний збиток у усьому світі. Мікоплазми викликають серйозні клінічні ознаки у великої рогатої худоби будь-якого віку. *M. bovis* являє собою патоген *Mycoplasma*, що найчастіше зустрічається, який, як встановлено, викликає пневмонію, мастит і артрит у великої рогатої худоби, і його етіологічна роль також пов'язана з отитом, кератокон'юнктивітом, синовітом і репродуктивними порушеннями в корів і биків.

Оскільки в мікоплазм відсутня клітинна стінка, на них не впливають багато загальноприйнятих антибіотиків, такі як пеніцилін або інші бета-лактамі антибіотики, мішенню яких є синтез клітинної стінки. Терапевтичні засоби, застосовувані при зараженні мікоплазмами, які знайшли застосування на практиці, являють собою деякі антибіотики, наприклад, на основі макролідів, або нові антибіотики на основі хінолонів або антибіотики на основі тетрациклінів, але для таких антибіотиків характерні шкідливі впливи, такі як виникнення стійких до лікарських засобів штамів, що приводить до того, що зв'язана з мікоплазмами інфекція стає більш серйозною, оскільки при цьому не досягаються необхідні терапевтичні впливи, і це є передумовою для перетворення в хронічну стадію захворювання.

Крім того, ефективним методом контролю інфекції, яка викликається мікоплазмами, є вакцинація. Вакцини, ефективні у відношенні декількох видів мікоплазматичних бактерій, відомі з існуючого рівня техніки. Наприклад, в WO 2009/058833 (A2) описаний ослаблений, авірулентний штам бактерій *Mycoplasma bovis*, призначений для вакцинації. Крім того, в WO 2009/126356 (A2) описана імунігенна композиція проти *Mycoplasma hyorheumoniae*. Однак існує потреба в ефективних комбінованих вакцинах, які забезпечують захист від декількох патогенів. Потреба у вказаних комбінованих вакцинах є дуже високою для мінімізації кількості імунізацій, необхідних для забезпечення захисту від декількох патогенів, для зниження вартості обробок і для підвищення прийнятності й зони дії. Однак проблема, пов'язана з антигенною інтерференцією, ускладнює розвиток багатокомпонентних вакцин. Так, антигенна інтерференція

характеризується тим, що введення декількох антигенів часто приводить до зниженої відповіді на певні антигени в порівнянні з імунною відповіддю, виявленою при індивідуальному введенні вказаних антигенів.

Таким чином, існує потреба в ефективних комбінованих вакцинах, які забезпечують захист від декількох патогенів.

#### Опис винаходу

Перед описом об'єктів даного винаходу слід зазначити, що в контексті даного опису й у доданий формулі винаходу вживання поняття в однині має на увазі також його згадування в множині, якщо з контексту точно не є очевидним інше. Так, наприклад, посилання на "антиген" включає також множину антигенів, посилання на "клітину" стосується однієї або декількох клітин і їх еквівалентів, відомих фахівцям у даній галузі, і т.д. Якщо не вказане інше, то всі технічні й наукові поняття, застосовувані в контексті даного опису, мають значення, добре відомі звичайному фахівцеві в галузі, до якої належить винахід. Хоча для втілення на практиці або при тестуванні даного винаходу можна застосовувати будь-які методи й матеріали, подібні або еквівалентні до представлених у даному описі, нижче описані переважні методи, обладнання й матеріали. Усі згадані в контексті даного опису публікації включені в нього як посилання для цілей опису й обговорення клітинних ліній, векторів і методологій, вказаних у публікаціях, які можна застосовувати у зв'язку з винаходом. Ніщо із вказаного в даному описі не слід розглядати як визнання того, що з урахуванням існуючого рівня техніки даний винахід не може претендувати на обсяг, представлений у вказаному описі.

Даний винахід вирішує проблеми, які є в існуючому рівні техніки, і має виражену перевагу в даній галузі техніки. У цілому, даний винахід стосується імуногенної композиції, що містить: а) один або декілька антигенів *M. hyosynoviae* і один або декілька антигенів, вибраних із групи, яка складається з *M. hyorhynis* і *M. hyorhinis*, і їх комбінації; і б) фармацевтично прийнятний носій.

Крім того, даний винахід стосується імуногенної композиції, що містить: а) один або декілька антигенів *M. hyorhynis* і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій.

Цінним є те, згідно із представленими в описі даного винаходу експериментальними даними, імуногенна композиція, представлена в даному описі, має ефективність і позбавлена антигенної інтерференції. Зокрема, після введення імуногенної композиції, що містить антигени *M. hyorhynis*, *M. hyorhynis* і *M. hyosynoviae*, продемонстрована відсутність інтерференції незалежно від ефективності *M. hyorhynis* і *M. hyorhynis*.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhynis*; один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; б) один або декілька антигенів *M. hyorhynis*; і в) фармацевтично прийнятний носій.

Поняття "імуногенна композиція" стосується композиції, яка містить принаймні один антиген, який викликає імунологічну відповідь у хазяїна, якому вводять імуногенну композицію. Вказана імунологічна відповідь може являти собою клітинну та/або антитіло-обумовлену (гуморальну) імунну відповідь на імуногенну композицію, запропоновану у винаході. Хазяїна позначають також як "суб'єкт". Переважно будь-який з хазяїв або суб'єктів, описаних або згаданих у контексті даного опису, являє собою тварину.

Як правило, "імунологічна відповідь" включає (але, не обмежуючись тільки ними) одну або декілька з наступних дій: виробництво або активація антитіл, В-клітин, Т-клітин-хелперів, Т-клітин-супресорів та/або цитотоксичних Т-клітин та/або гама-дельта-Т-клітин, спрямованих конкретно до антигену або антигенів, включеного (их) в імуногенну композицію, запропоновану у винаході. Переважно в хазяїна повинна бути або захисна імунологічна відповідь, або терапевтична відповідь.

"Захисна імунологічна відповідь" може проявлятися або в зниженні, або у відсутності клінічних ознак, у нормі характерних для інфікованого хазяїна, більш швидкому часі відновлення та/або меншій тривалості інвазійної здатності або більш низькому титрі патогену в тканинах або загальній воді організму або екскрементах інфікованого хазяїна.

У випадку, коли в хазяїна проявляється захисна імунологічна відповідь, така як стійкість до нової інфекції, та/або в нього знижується клінічна серйозність хвороби, то імуногенну композицію називають "вакциною".

Поняття "інфекція" або "інфікований" стосується зараження суб'єкта патогеном, тобто *M. hyorhynis* або *M. hyorhynis* і *M. hyosynoviae* або *M. hyorhynis*, *M. hyorhynis* і *M. hyosynoviae*.

"Терапевтична відповідь" можна продемонструвати за зниженням та/або лікуванням клінічних ознак, у нормі характерних для хазяїна, коли хазяїн уже інфікований патогеном (наприклад, мікоплазмою), який у нормі викликає вказану клінічну ознаку або клінічні ознаки.

Поняття "мікоплазми" відоме фахівцям в даній галузі. "Mycoplasma" стосується роду бактерій, наприклад, описаному в: *Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*, під ред. Blanchard A. і G. F. Browning, вид-во Horizon Bioscience, Wymondham U.K., 2005; Kobisch M. і в Friis N.F. *Swine mycoplasmoses*, Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1996, стор. 1569-1605. Бактерії можна класифікувати на основі їх біохімічних і мікробіологічних властивостей, а також їх морфології. Такі критерії класифікації добре відомі в даній галузі. Як правило, зараження мікоплазмами асоціюється із клінічними ознаками, вказаними в даному описі.

У контексті даного опису поняття "мікоплазми" стосується *M. hyorhinis* або *M. hyorhinis* і *M. hyosynoviae* або *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* і *M. hyosynoviae*. Приклад повної геномної послідовності *M. hyorhinis* представлений в Liu W. і ін., J. Bacteriol. T. 192 (21), 2010, стор. 5844-5845 doi: 10.1128/JB.00946-10, Epub від 27 серпня 2010 р або в Calcutt M.J. і ін., J. Bacteriol. т. 194 (7), 2012, с. 1848 doi: 10.1128/JB.00033-12. Наприклад, ізоляти *M. hyosynoviae* депоновані в Американській колекції тканинних культур під реєстраційними номерами ATCC 25591 або ATCC 27095. Наприклад, ізоляти *Mycoplasma hyopneumoniae* депоновані в Американській колекції тканинних культур під реєстраційними номерами ATCC 25095, ATCC 25617 і ATCC 25934. Геномна ДНК J-штаму *Mycoplasma hyopneumoniae* депонована в Американській колекції тканинних культур під реєстраційними номерами ATCC 25934D.

У контексті даного опису поняття "антиген" стосується (але, не обмежуючись тільки ними) компонентів, які викликають імунологічну відповідь у хазяїна на імуногенну композицію, що представляє інтерес, або вакцину, що містить вказаний антиген або його імунологічно активний компонент. Антиген або його імунологічно активний компонент може являти собою цільний мікроорганізм (в інактивованій або модифікованій живій формі) або будь-який його фрагмент або фракцію, який/яка, якщо його/її вводять хазяїнові може викликати імунологічну відповідь у хазяїна. Антиген може являти собою або може містити цільні живі організми або в їх вихідній формі, або у вигляді ослаблених організмів у так званій модифікованій живій вакцині (MLV). Антиген може додатково містити елементи, властиві вказаним організмам (субодичні вакцини), при цьому вказані елементи одержують або шляхом розщеплення цільного організму або ростучих культур вказаних організмів і наступних стадій очищення, з одержанням необхідних(ої) структур(и), або шляхом процесів синтезу за допомогою відповідної маніпуляції в прийнятній системі, наприклад, (але, не обмежуючись тільки ними) у бактеріях, комах, ссавцях і інших видах, і необов'язково шляхом наступних процедур виділення й очищення, або шляхом індукції вказаних процесів синтезу у тварині, яка потребує вакцини, шляхом безпосереднього включення генетичного матеріалу з використанням прийнятих фармацевтичних композицій (вакцинація полінуклеотидом). Антиген може містити цільні організми, інактивовані відповідними методами, у так званій убитій вакцині (KV). Якщо організм являє собою бактерію, то вбиту вакцину називають бактерином.

Поняття "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-який і всі розчинники, дисперсійні середовища, агенти для нанесення покриттів, стабілізатори, розріджувачі, консерванти, антибактеріальні й протигрибкові засоби, агенти, що надають ізотонічність, агенти, що сповільнюють адсорбцію, ад'юванти, засоби, що стимулюють імунну систему, і їх комбінації.

В одному з об'єктів даного винаходу один або декілька антигенів являють собою цільні інактивовані бактерини. Один або декілька цільних інактивованих антигенів може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин, вибраний із групи, що включає: *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; *M. hyopneumoniae*; *M. hyorhinis* і *M. hyosynoviae*; і *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* і *M. hyosynoviae*.

Так, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій, у якій антигени *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; або *M. hyorhinis* і *M. hyosynoviae* являють собою цільні інактивовані бактерини.

Згідно з іншим об'єктом винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; один або декілька антигенів *M. hyosynoviae* і один або декілька антигенів *M. hyopneumoniae* б) фармацевтично прийнятний носій, у якій антигени *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; та/або *M. hyopneumoniae* являють собою цільні інактивовані бактерини. Згідно із цим об'єктом даного винаходу або антиген *M. hyorhinis* являє собою цільний інактивований бактерин, або антиген *M. hyopneumoniae* являє собою цільний інактивований бактерин, або антиген *M. hyosynoviae* являє собою цільний інактивований бактерин. Однак згідно із цим об'єктом винаходу мається на увазі також, що всі антигени в імуногенній композиції, запропонованій в даному винаході, являють собою цільні інактивовані бактерини, тобто антигени *M. hyorhinis* і *M. hyosynoviae* або антигени *M. hyorhinis*, *M.*

hyor pneumoniae і M. hyosynoviae являють собою цільні інактивовані бактерини.

Для цілей даного винаходу можна використовувати будь-який прийнятний метод інактивації. Так, інактивацію можна здійснювати шляхом хімічних та/або фізичних обробок, відомих фахівцеві в даній галузі. Переважні методи інактивації включають додавання циклізованого бінарного етиленіміну (BEI), включаючи додавання розчину гідробромиду 2-брометиленаміну (BEA), циклізованого з утворенням бінарного етиленіміну (BEI). Інші переважні хімічні інактивуючі агенти включають (але, не обмежуючись тільки ними) Тритон X-100, дезоксихолат натрію, бромід цетилтриметиламонію, β-пропіолактон, тимеросал, фенол і формальдегід (формалін). Однак інактивація може включати також стадію нейтралізації. Переважні нейтралізуючі агенти включають (але, не обмежуючись тільки ними) тіосульфат натрію, бісульфіт натрію й т.п.

Переважні умови інактивації формаліном включають застосування формаліну в концентрації приблизно від 0,02 до 2,0 об. %, більш переважно приблизно від 0,1 до 1,0 об. %, ще більш переважно приблизно від 0,15 до 0,8 об. %, ще більш переважно приблизно від 0,16 до 0,6 об. % і найбільш переважно приблизно від 0,2 до 0,4 об. %. Тривалість інкубації залежить від стійкості видів мікоплазм. Як правило, процес інактивації здійснюють доти, поки ріст мікоплазм не перестає піддаватися виявленню в прийнятній системі культивування.

Відповідно до одного з об'єктів даного винаходу цільні інактивовані бактерини являють собою інактивовані формаліном бактерини, переважно з використанням вказаних вище концентрацій. Так, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів M. hyorhinis; і один або декілька антигенів M. hyosynoviae; і б) фармацевтично прийнятний носій, у якій один або декілька антигенів являють собою цільні інактивовані бактерини, і один або декілька цільних інактивованих бактеринів являють собою інактивовані формаліном бактерини. Згідно з іншим об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція містить також один або декілька антигенів M. hyor pneumoniae. Згідно із цим об'єктом даного винаходу мається на увазі, що або антиген M. hyorhinis являє собою інактивований формаліном бактерин, або антиген M. hyor pneumoniae являє собою інактивований формаліном бактерин, або антиген M. hyosynoviae являє собою інактивований формаліном бактерин. Однак згідно із цим об'єктом даного винаходу мається на увазі також, що всі антигени мікоплазм в імуногенній композиції, запропонованій в даному винаході, являють собою інактивовані формаліном бактерини, тобто антигени M. hyorhinis і M. hyosynoviae або антигени M. hyorhinis і M. hyor pneumoniae і M. hyosynoviae являють собою інактивовані формаліном бактерини.

Пропонований у винаході компонент, що представляє собою інактивований бактерин, можна включати в ліпосоми, використовуючи відому технологію, наприклад, описану в Nature, 252, 1974, стор. 252-254 або в Journal of Immunology, 120, 1978, стор. 1109-1113. В іншому варіанті здійснення винаходу компонент, який являє собою інактивований бактерин, запропонований у винаході, можна кон'югувати із прийнятними біологічними сполуками, такими як полісахариди, пептиди, білки або т.п. або з їх комбінацією.

Згідно з наступним об'єктом винаходу імуногенна композиція, представлена в даному описі, має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються M. hyorhinis, у суб'єкта, який потребує цього. Так, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів M. hyorhinis; і один або декілька антигенів M. hyosynoviae; і б) фармацевтично прийнятний носій, де вказана імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються M. hyorhinis, у суб'єкта, який потребує цього. Згідно з наступним об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція містить також один або декілька антигенів M. hyor pneumoniae. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільні інактивовані бактерини вказаних вище видів мікоплазм.

Згідно з наступним об'єктом винаходу імуногенна композиція, представлена в даному описі, яка містить також один або декілька антигенів M. hyor pneumoniae, має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються M. hyor pneumoniae, у суб'єкта, який потребує цього. Так, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів M. hyorhinis; один або декілька антигенів M. hyosynoviae; б) один або декілька антигенів M. hyor pneumoniae; і в) фармацевтично прийнятний носій, де вказана імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються M. hyor pneumoniae, у суб'єкта, який потребує цього. Згідно з наступним об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються M. hyorhinis і M. hyor pneumoniae, у суб'єкта, який потребує цього. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або

декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільні інактивовані бактерини вказаних вище видів мікоплазм.

Поняття "лікування та/або профілактика" стосується зменшення захворюваності інфекцією, яка викликається мікоплазмами, череди або зниження серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційовані з конкретною мікоплазматичною інфекцією. Так, поняття "лікування та/або профілактика" стосується також зменшення кількості тварин у череді, які стають інфікованими конкретними мікоплазматичними бактеріями (тобто зменшення захворюваності конкретною інфекцією, яка викликається мікоплазмою) або зниження серйозності клінічних ознак, які, як правило, викликаються або асоційовані з мікоплазматичною інфекцією, у групі тварин, у якій тварин обробляли застосовуваною в ефективній кількості імуногенною композицією, представленою в даному описі, у порівнянні з групою тварин, яких не обробляли вказаною імуногенною композицією.

"Лікування та/або профілактика", як правило, передбачає введення в ефективній кількості імуногенної композиції, запропонованої в даному винаході, тварині або череді тварин, які потребують цього, або на яких може виявляти сприятливий вплив вказане лікування/вказана профілактика. Поняття "лікування" стосується введення в ефективній кількості імуногенної композиції, коли особина або принаймні декілька тварин у череді вже інфіковані вказаною мікоплазмою й коли у вказаних тварин уже виявлені деякі клінічні ознаки, які викликаються або асоційовані з мікоплазматичною інфекцією. Поняття "профілактика" стосується обробки особини до зараження вказаної особини мікоплазмою або принаймні, коли у вказаної тварини або в жодної із тварин у групі тварин не виявлені які-небудь клінічні ознаки, які викликаються або асоційовані із зараженням вказаною мікоплазмою.

У контексті даного опису "ефективна кількість" означає (але, не обмежуючись тільки вказаним) кількість антигену, яка викликає або може викликати імунну відповідь у суб'єкта. Вказана ефективна кількість може зменшувати захворюваність конкретною мікоплазматичною інфекцією в череді або знижувати серйозність клінічних ознак, пов'язаних з конкретною мікоплазматичною інфекцією.

Переважно частоту зустрічальності або серйозність клінічних ознак знижують принаймні на 10 %, більш переважно принаймні на 20 %, більш переважно принаймні на 30 %, ще більш переважно принаймні на 40 %, ще більш переважно принаймні на 50 %, ще більш переважно принаймні на 60 %, ще більш переважно принаймні на 70 %, ще більш переважно принаймні на 80 %, ще більш переважно принаймні на 90 % і найбільш переважно принаймні на 95 % у порівнянні із суб'єктами, яких або не обробляли імуногенною композицією, або обробляли відомою з існуючого рівня техніки імуногенною композицією, але які згодом були інфіковані конкретними мікоплазматичними бактеріями.

Поняття "клінічні ознаки" у контексті даного опису стосується ознак інфекції в суб'єкта, яка викликається мікоплазматичними бактеріями. Клінічні ознаки інфекції залежать від конкретного патогену. Приклади вказаних клінічних ознак включають (але, не обмежуючись тільки ними) респіраторний дистрес-синдром, полісерозит (такий як перитоніт, плеврит, перикардит), артрит (кульгавість і набрякання суглобів), отит, огрубіння волоссяного покриву, невелика лихоманка, депресія, знижений апетит і бактеріємія. При цьому клінічні ознаки включають також (але, не обмежуючись тільки ними) клінічні ознаки, які піддаються безпосередньому виявленню в живій тварини. Приклади клінічних ознак, які піддаються безпосередньому виявленню в живій тварини, включають виділення з носа й ока, апатичність, кашель, стерторозне дихання, схильність до падіння, підвищену температуру, приріст або втрату маси, зневоднювання, діарею, набрякання суглобів, кульгавість, кахексію, блідість шкіри, поганий ріст і т.п.

Зниження частоти зустрічальності або серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційованих з інфекцією конкретною мікоплазмою, у суб'єкта можна досягати шляхом введення однієї або декількох доз імуногенної композиції, запропонованої в даному винаході, суб'єктові, який потребує цього. Як продемонстровано в прикладах 2 і 3, імуногенна композиція, представлена в даному описі, мала ефективність після введення однократної дози суб'єктові, який цього потребує. Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій, де вказана імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyorhinis*, у суб'єкта, який потребує цього, після введення однократної дози. Вказану однократну дозу вводять тільки один раз. Згідно з іншим об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція містить також один або декілька антигенів *M. hyopneumoniae*. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм являють собою цільні інактивовані бактерини вказаних вище видів мікоплазм.

Крім того, було встановлено, що одна доза імуногенної композиції, яка містить *M. hyorheumoniae*, також є ефективною після введення вказаної однократної дози такої імуногенної композиції. Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; б) один або декілька антигенів *M. hyorheumoniae*; в) фармацевтично прийнятний носій, де вказана імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyorheumoniae*, у суб'єкта, який потребує цього, після введення однократної дози. Вказану однократну дозу вводять тільки один раз. Згідно з іншим об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyorhinis* і *M. hyorheumoniae*, у суб'єкта, який потребує цього. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільні інактивовані бактерини вказаних вище видів мікоплазм.

Відповідно до одного з об'єктів даного винаходу імуногенну композицію готують для введення у вигляді однократної дози вказаної імуногенної композиції. Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; б) один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; в) фармацевтично прийнятний носій, де імуногенну композицію готують для введення у вигляді однократної дози вказаної імуногенної композиції. Вказана імуногенна композиція може містити також один або декілька антигенів *M. hyorheumoniae*, при цьому вказану імуногенну композицію, яка містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis* і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; б) один або декілька антигенів *M. hyorheumoniae*; в) фармацевтично прийнятний носій, готують або надають для введення у вигляді однократної дози. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм можуть являти собою цільні інактивовані бактерини вказаних вище видів мікоплазм. Крім того, вказана імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyorhinis* або *M. hyorhinis* і *M. hyorheumoniae*, у суб'єкта, який потребує цього, після введення однократної дози вказаних антигенів мікоплазм, у кожному випадку залежно від того, чи містить композиція один або декілька антигенів *M. hyorheumoniae* чи ні. Важливо відзначити, що експериментальні дані, представлені в описі даного винаходу, продемонстрували, що введення однократної дози імуногенної композиції, запропонованої в даному винаході, вірогідно й ефективно стимулювало захисну імунну відповідь. Зокрема, гуморальна імунна відповідь, що піддається вимірюванню, продемонстрована для *M. hyorhinis* і *M. hyorheumoniae*.

Як відзначалося вище, поняття суб'єкт або хазяїн у контексті даного опису стосується тварин, переважно ссавців, таких як миші, щури, морські свинки, кролики, хом'яки, свині, вівці, собаки, кішки, коні, мавпи або велика рогата худоба, а також переважно людини.

Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; б) один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; в) фармацевтично прийнятний носій, де вказана імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyorhinis* у свиней. Згідно з наступним об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyorhinis* у свиней. Коли вказана імуногенна композиція містить також один або декілька антигенів *M. hyorheumoniae*, то вона згідно з наступним об'єктом винаходу має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyorheumoniae* у свиней. Згідно з наступним об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів *M. hyorhinis* і *M. hyorheumoniae*, має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyorhinis* і *M. hyorheumoniae* у свиней. І в цьому випадку один або декілька антигенів мікоплазм можуть являти собою цільні інактивовані бактерини вказаних вище видів мікоплазм.

Згідно з наступним об'єктом даного винаходу імуногенна композиція являє собою вакцину. Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; б) один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; в) фармацевтично прийнятний носій, де імуногенна композиція являє собою вакцину. Вказана вакцина може містити також один або декілька антигенів *M. hyorheumoniae*. Вакцина, запропонована у винаході, при її введенні суб'єктові, який потребує цього, має такі ж цінні властивості, що й властивості, описані для імуногенних композицій.

Відповідно до одного з об'єктів даного винаходу фармацевтично прийнятний носій вибирають із групи, яка складається з розчинників, дисперсійних середовищ, агентів для



нанесення покриттів, стабілізаторів, розріджувачів, консервантів, антибактеріальних і протигрибкових засобів, агентів, що надають ізотонічність, агентів, що сповільнюють адсорбцію, ад'ювантів, засобів, що стимулюють імунну систему, і їх комбінацій.

Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імунотенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій, у якій фармацевтично прийнятний носій вибирають із групи, яка складається з розчинників, дисперсійних середовищ, агентів для нанесення покриттів, стабілізаторів, розріджувачів, консервантів, антибактеріальних і протигрибкових засобів, агентів, що надають ізотонічність, агентів, що сповільнюють адсорбцію, ад'ювантів, засобів, що стимулюють імунну систему, і їх комбінацій. Як відзначалося вище, вказана вакцина може містити також один або декілька антигенів *M. hyorheumoniae*. Крім того, один або декілька антигенів мікоплазм із вказаних вище видів мікоплазм може являти собою цільний інактивованим бактерин, вказаний вище.

У контексті даного опису "ад'юванти" можуть включати гідроксид алюмінію й фосфат алюмінію, сапоніни, наприклад, Quil A, QS-21 (фірма Cambridge Biotech Inc., Кембридж, шт. Масачусетс), GPI-0100 (фірма Galenica Pharmaceuticals, Inc., Бірмінгем, шт. Алабама), емульсію вода-в-маслі, масло-в-воді, емульсію вода-в-маслі-в-воді. Основою емульсії можуть бути, зокрема, легке рідке парафінове масло (типу, що відповідає Європейській фармакопеї); ізопреноїдне масло, таке як сквалан або сквален; масло, що утворюється при олігомеризації алкенів, зокрема, ізобутену або децену; ефіри кислот або спиртів, що містять лінійну алкільну групу, більш конкретно рослинні олії, етилолеат, пропіленгліколю ди(каприлат/капрат), гліцерину три(каприлат/капрат) або пропіленгліколю диолеат; ефіри розгалужених жирних кислот або спиртів, зокрема ефіри ізостеаринової кислоти. Масла застосовують у комбінації з емульгаторами з одержанням емульсії. Переважними емульгаторами є неіоногенні поверхово-активні речовини, зокрема, ефіри сорбітану, маніду (наприклад, ангідроманітолеат), гліцерину, полігліцерину, пропіленгліколю й олеїнової, ізостеринової, рицинолевої або гідроксистеаринової кислоти, які необов'язково є етоксированими, і блокспівполімери поліоксипропілену-поліоксиетилену, зокрема продукти типу Pluronic, насамперед L121 (див. Hunter і ін., *The Theory and Practical Application of Adjuvants*, під ред. Stewart-Tull D. E. S., вид-во John Wiley and Sons, NY, 1995, стор. 51-94 і Todd і ін., *Vaccine* 15, 1997, стор. 564-570). Наприклад, можна застосовувати емульсію SPT, описану на с. 147 в "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", під ред. M. Powell і M. Newman, вид-во Plenum Press, 1995 і емульсію MF59, описану на с. 183 у цій же книзі. Інші придатні ад'юванти включають (але, не обмежуючись тільки ними) ад'ювантну систему RIBI (фірма Ribi Inc.), блокспівполімер (фірма Cytrx, Атланта, шт. Джорджія), SAF-M (фірма Chiron, Емерівіл, шт. Каліфорнія), монофосфорил-ліпід А, ад'ювант авридин ліпід-аміну, термолабільний ентеротоксин з *E. coli* (рекомбінантний або інший), холерний токсин, IMS 1314 або мураміддипептид (але винахід не обмежений вказаними ад'ювантами). Із співполімерів малеїнового ангідриду й алкенільного похідного застосовують співполімери ЕМА (фірма Monsanto) співполімери, що представляють собою, малеїнового ангідриду й етилену. Розчинення вказаних полімерів у воді приводить до одержання кислого розчину, який повинен бути нейтралізований, переважно до фізіологічного значення рН, для одержання розчину ад'юванта, у який може бути включена імунотенна, імунотенна композиція або композиція вакцини.

Відповідно до одного з об'єктів даного винаходу фармацевтично прийнятний носій являє собою ад'ювант, вибраний із групи, яка складається з гідроксиду алюмінію, фосфату алюмінію, сапонінів, емульсії вода-в-маслі, емульсії масло-в-воді, емульсії вода-в-маслі-в-воді, полімерів акрилової або метакрилової кислоти, співполімерів малеїнового ангідриду й алкенільного похідного, ад'ювантної системи RIBI, блокспівполімеру, SAF-M, монофосфорил-ліпід А, авридин ліпід-аміну, термолабільного ентеротоксину з *E. coli* (рекомбінантного або іншого), холерного токсину, IMS 1314, мураміддипептиду і їх комбінацій. Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імунотенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій, де фармацевтично прийнятний носій являє собою ад'ювант, вибраний із групи, яка складається з гідроксиду алюмінію, фосфату алюмінію, сапонінів, емульсії вода-в-маслі, емульсії масло-в-воді, емульсії вода-в-маслі-в-воді, полімерів акрилової або метакрилової кислоти, співполімерів малеїнового ангідриду й алкенільного похідного, ад'ювантної системи RIBI, блокспівполімеру, SAF-M, монофосфорил-ліпід А, авридин ліпід-аміну, термолабільного ентеротоксину з *E. coli* (рекомбінантного або іншого), холерного токсину, IMS 1314, мураміддипептиду і їх комбінацій. Вказана вакцина може містити також один або декілька антигенів *M. hyorheumoniae*. Крім того, один або декілька антигенів мікоплазм із

вказаних видів мікоплазм може являти собою цільний інактивований бактерин, вказаний вище в даному описі.

Іншим прикладом ад'юванта є сполука, вибрана з полімерів акрилової або метакрилової кислоти й співполімерів малеїнового ангідриду й алкенільного похідного. Переважними ад'ювантами є полімери акрилової або метакрилової кислоти, зшиті, насамперед із простими поліалкеніловими ефірами цукрів або поліспиртів. Такі сполуки позначають як карбомер (Pharmeuropa, т. 8, № 2, червень 1996 р.). Фахівець у даній галузі може також почерпнути з US № 2909462 опис вказаних акрилових полімерів, зшитих з полігідроксилованою сполукою, що має принаймні 3 гідроксильні групи, переважно не більше 8, при цьому атоми водню принаймні в трьох гідроксилах заміщені ненасиченими аліфатичними радикалами, що мають принаймні 2 атоми вуглецю. Переважними радикалами є радикали, які містять від 2 до 4 атомів вуглецю, наприклад, вініли, аліли й інші ненасичені групи етиленового ряду. Ненасичені радикали можуть самі містити інші замісники, такі як метил. Найбільш придатними є продукти, які продаються за назвою CARBOPOL®; (фірма BF Goodrich, шт. Огайо, США). Вони являють собою полімери акрилової кислоти, зшиті із простими поліалкеніловими ефірами, або дивінілгліколем, або зшиті з алілсахарозою або з алілпентаеритритом. З них можна відзначити CARBOPOL® 974P, 934P і 971P. Найбільш переважним є застосування CARBOPOL® 971P.

Переважаю ад'ювант додають у кількості, що становить від приблизно 100 мкг до приблизно 10 мг на дозу. Ще більш переважно ад'ювант додають у кількості від приблизно 100 мкг до приблизно 10 мг на дозу. Ще більш переважно ад'ювант додають у кількості від приблизно 500 мкг до приблизно 5 мг на дозу. Ще більш переважно ад'ювант додають у кількості від приблизно 750 мкг до приблизно 2,5 мг на дозу. Найбільш переважно ад'ювант додають у кількості приблизно 1 мг на дозу.

Відповідно до одного з об'єктів винаходу фармацевтично прийнятний носій являє собою емульсію вода-в-маслі або карбомер. Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій, де фармацевтично прийнятний носій являє собою емульсію вода-в-маслі-в-воді або карбомер. Вказана вакцина може містити також один або декілька антигенів *M. hyorhinis*. Крім того, один або декілька антигенів мікоплазм із вказаних видів мікоплазм може являти собою цільний інактивований бактерин, вказаний вище в даному описі.

Відповідно до одного з об'єктів даного винаходу емульсія вода-в-маслі-в-воді являє собою Монтанід ISA207 VG або CARBOPOL®. Монтанід ISA207 VG являє собою ад'ювант, що складається із складних олійних ефірів безводного маніту в розчині немінерального масла, і її створюють для одержання емульсій вакцин типу вода-в-маслі-в-воді. Монтанід ISA207 VG добре відомий фахівцям в даній галузі. Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, що містить а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis*; і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій, де фармацевтично прийнятний носій являє собою Монтанід ISA207 VG або CARBOPOL®. Як відзначалося вище, вказана вакцина може містити також один або декілька антигенів *M. hyorhinis*. Крім того, один або декілька антигенів мікоплазм із вказаних видів мікоплазм може являти собою цільний інактивований бактерин, вказаний вище в даному описі.

Даний винахід стосується також імуногенної композиції, отриманої за допомогою способу, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії, вибрані із групи, яка складається з *M. hyorhinis*, *M. hyorhinis* і *M. hyosynoviae*, у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки; б) одержують один або декілька антигенів вказаних мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій.

Поняття "культивування" відоме фахівцям в даній галузі. Поняття стосується розмноження клітин у культурі за межами організму. Зокрема, поняття "культивування" стосується розмноження клітин за межами організму у клітинній системі.

Поняття "клітинна система" відоме фахівцям в даній галузі. Зокрема, "клітинна система" являє собою клітинну систему *in vitro* для культивування мікроорганізму, такого, наприклад, як мікоплазматична бактерія. Вказана клітинна система містить клітини-хазяї й середовище для культури клітин, придатне для розмноження вказаних клітин за межами організму. Зокрема, клітини-хазяї можуть бути чутливими або нечутливими до зараження мікоплазматичними бактеріями. Вказані клітини-хазяї можуть бути присутні у вигляді живих клітин, в інактивованій формі або у вигляді клітинних фрагментів. Переважно вказані клітини-хазяї є чутливими до зараження мікоплазматичними бактеріями. Клітини-хазяї, які можна застосовувати для втілення на практиці способу, представленого в даному описі, включають (але, не обмежуючись тільки ними) клітини Мадін-Дарбі епітелію нирки собаки (MDCK) (наприклад, клітини Мадін-Дарбі

епітелію нирки собаки, депоновані в Американській колекції тканинних культур під реєстраційним номером ATCC CCL-34 або ATCC CRL-2285) або клітини McCoу (наприклад, депоновані в Американській колекції тканинних культур під реєстраційним номером ATCC CRL-1696). Прийнятні середовища для культивування клітин відомі фахівцеві в даній галузі й надходять у продаж. Вони можуть містити живильні речовини, солі, фактори росту, антибіотики, сироватку (наприклад, сироватку плода корови) і рН-індикатори (наприклад, феноловий червоний).

Під поняття "система на основі еукаріотичних клітин" підпадає система, що містить первинні еукаріотичні клітини й еукаріотичні клітини, виведені з багатоклітинних організмів, таких як рослини або тварини. Крім того, система на основі еукаріотичних клітин включає еукаріотичні одноклітинні організми (які називають також мікроорганізмами), наприклад, бактерії або гриби, включаючи дріжджі. Однак, як повинно бути очевидно, еукаріотичні клітини відрізняються від мікоплазматичних бактерій.

Поняття "низький вміст сироватки" стосується зниженої кількості сироватки, що додається для культивування мікоплазматичних бактерій у систему на основі еукаріотичних клітин, у порівнянні з кількістю сироватки, яку використовують для культивування мікоплазматичних бактерій цих же видів у безклітинній системі культивування. Кількість сироватки для культивування мікоплазматичних бактерій у системі на основі еукаріотичних клітин у порівнянні з кількістю сироватки для культивування мікоплазматичних бактерій у безклітинній системі культивування знижують принаймні на 10 %, переважно принаймні на 20 %, більш переважно принаймні на 30 %, ще більш переважно принаймні на 40 %, ще більш переважно принаймні на 50 %, ще більш переважно принаймні на 60 %, ще більш переважно принаймні на 70 %, ще більш переважно принаймні на 80 %, ще більш переважно принаймні на 90 %, ще більш переважно принаймні на 95 %, ще більш переважно принаймні на 96 %, ще більш переважно принаймні на 97 %, ще більш переважно принаймні на 98 %, ще більш переважно принаймні на 99 %, найбільш переважно на 100 %. Таким чином, повинно бути очевидно, що згідно із даним винаходом мікоплазматичні бактерії найбільш переважно культивувати в системі на основі еукаріотичних клітин, що зовсім не містить яку-небудь сироватку.

Поняття "безклітинна система культивування" у контексті даного опису стосується системи культивування, яка не включає які-небудь клітини крім мікоплазматичних бактерій.

Переважні кількості сироватки для культивування мікоплазматичних бактерій у системі на основі еукаріотичних клітин включають концентрації сироватки, що становлять приблизно від 0 до 10 об. %, більш переважно приблизно від 1 до 9 об. %, ще більш переважно приблизно від 1 до 8 об. %, ще більш переважно приблизно від 1 до 7 об. %, ще більш переважно приблизно від 1 до 6 об. % і найбільш переважно приблизно від 2 до 5 об. %.

Переважні кількості сироватки для культивування мікоплазматичних бактерій у системі на основі еукаріотичних клітин, що містить MDCK-клітини, включають концентрації сироватки, що становлять приблизно від 0 до 6 об. %, більш переважно приблизно від 1 до 5 об. %, ще більш переважно приблизно від 2 до 4 об. %, ще більш переважно приблизно від 2 до 3 об. % і найбільш переважно приблизно 2 об. %.

Переважні кількості сироватки для культивування мікоплазматичних бактерій у системі на основі еукаріотичних клітин, що містить McCoу-клітини, включають концентрації сироватки, що становлять приблизно від 0 до 10 об. %, більш переважно приблизно від 1 до 9 об. %, ще більш переважно приблизно від 1 до 8 об. %, ще більш переважно приблизно від 1 до 7 об. %, ще більш переважно приблизно від 4 до 6 об. % і найбільш переважно приблизно 5 об. %.

Згідно із даним винаходом слід розуміти, що еукаріотичні клітини або система на основі еукаріотичних клітин повинні інфікуватися мікоплазматичними бактеріями. Вказане зараження приводить до розмноження мікоплазматичних бактерій у системі на основі еукаріотичних клітин. Зараження еукаріотичних клітин мікоплазматичними бактеріями й умови постінкубаційного періоду, що дозволяють здійснювати розмноження мікоплазматичних бактерій, добре відомі фахівцеві в даній галузі. Однак переважно після трансфекції клітини інкубують протягом періоду часу, що становить аж до 21 дня, більш переважно від приблизно 2 днів до приблизно 14 днів, більш переважно від приблизно 2 днів до приблизно 8 днів, ще більш переважно від приблизно 3 до 5 днів. Переважні умови інкубації включають температуру приблизно від 32 до 42°C, більш переважно приблизно від 34 до 40°C, ще більш переважно приблизно від 35 до 39°C, ще більш переважно приблизно від 36 до 38°C і найбільш переважно приблизно 37°C. Переважні умови інкубації включають також концентрацію CO<sub>2</sub>, що становить приблизно від 2 до 8 %, більш переважно приблизно від 3 до 7 %, ще більш переважно приблизно від 4 до 6 % і найбільш переважно приблизно 5 %. Переважно еукаріотичні клітини обстежують після трансфекції відносно характеристичних змін, таких як тенденції відносно клітинної щільності, зниження

життєздатності, включаючи цитопатичні дії під час постінкубаційного періоду й зміна кольору середовища через зміну pH.

Поняття "одержання" включає збір, виділення, очищення та/або складання композиції (наприклад, інактивацію та/або приготування суміші) антигену.

5 Поняття "збір" стосується збору або витягу антигену мікоплазматичних бактерій із трансфікованої системи на основі еукаріотичних клітин. Для витягу вказаного мікоплазматичного антигену можна застосовувати будь-який загальноприйнятий метод, відомий у даній галузі, наприклад, будь-який метод розділення. Методи, добре відомі в даній галузі, включають центрифугування або фільтрацію, наприклад, з використанням напівпроникної мембрани, що має певний розмір пор.

10 Поняття "виділення" включає стадію виділення мікоплазматичного антигену. Методи виділення антигенів мікоплазматичних бактерій з інфікованої системи на основі еукаріотичних клітин відомі фахівцям в даній галузі. Вказані методи являють собою фізичні та/або хімічні методи, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) цикли заморожування-відтавання, обробку ультразвуком і т.п.

15 Методи "очищення" антигенів з ізоляту добре відомі фахівцям у даній галузі, наприклад, являють собою методи, описані в: Protein purification methods-a practical approach, під ред. E.L.V. Harris і S. Angal, вид-во IRL Press at Oxford University Press. Вказані методи включають (але, не обмежуючись тільки ними) розділення шляхом центрифугування та/або фільтрації, осадження, витісню хроматографію (гель-фільтрацію), афінну хроматографію, метал-хелатну хроматографію, іонообмінну хроматографію, ковалентну хроматографію, хроматографію гідрофобних взаємодій і т.п. Антиген можна одержувати в очищеній (чистій) формі або у формі, вільній або практично вільній від інших клітинних матеріалів або культурального середовища і т.д. Після вказаного виділення та/або очищення антиген має чистоту, що становить принаймні 20 80 %, переважно 80 %-90 %, більш переважно 90 %-97 %, найбільш переважно більше 97 % аж до абсолютно чистотою форми без будь-якого забруднення.

25 Згідно з іншим об'єктом винаходу поняття "одержання" у контексті даного опису може включати також додаткові стадії остаточної обробки типу стадій додавання буфера, інактивації, нейтралізації й т.п.

30 Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що містить один або декілька антигенів мікоплазм, вибраних із групи, що включає *M. hyorhinitis*, *M. hyorheumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-які їх комбінації, де один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки.

35 Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinitis*, де один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки.

40 Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyosynoviae*, де один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки.

45 Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorheumoniae*, де один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки.

50 Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinitis* і *M. hyorheumoniae*, де один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки.

55 Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinitis* і *M. hyosynoviae*, де один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhyniae* і *M. hyosynoviae*, де один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhyniae*, *M. hyorhyniae* і *M. hyosynoviae*, де один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки.

Один або декілька антигенів мікоплазм інактивують, переважно за допомогою будь-якого з методів, вказаних вище в даному описі. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм інактивують, переважно за допомогою будь-якого з методів, вказаних вище в даному описі. Таким чином, наступним об'єктом даного винаходу є імуногенна композиція, отримана способом, який полягає у тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії, вибрані із групи, яка складається з *M. hyorhyniae*, *M. hyorhyniae*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки; б) одержують один або декілька антигенів вказаних мікоплазматичних бактерій, у якому стадія одержання включає інактивацію одного або декількох антигенів мікоплазм; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Стадію інактивації можна здійснювати за допомогою будь-якого методу, вказаного вище в даному описі. Відповідно до одного з об'єктів винаходу вказана інактивація приводить до одержання цільних інактивованих бактеринів мікоплазматичних бактерій. Переважно вказану інактивацію мікоплазматичних бактерій здійснюють за допомогою формаліну, у результаті антиген мікоплазм являє собою цільний інактивований формаліном бактерин. Відповідно до одного з об'єктів винаходу антигени мікоплазм являють собою цільний інактивований бактерин *M. hyorhyniae*, цільний інактивований бактерин *M. hyorhyniae*, цільний інактивований бактерин *M. hyorhyniae* і *M. hyosynoviae* або цільний інактивований бактерин *M. hyorhyniae* і *M. hyosynoviae*, або цільний інактивований бактерин *M. hyorhyniae* і *M. hyosynoviae*. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм в імуногенній композиції являють собою цільні інактивовані бактерини, переважно цільні інактивовані формаліном бактерини.

Відповідно до одного з об'єктів винаходу антиген мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де сироватка не містить свинячої сироватки. Оскільки мікоплазматичні бактерії *M. hyorhyniae*, *M. hyorhyniae* і *M. hyosynoviae* є патогенами свиней, свиняча сироватка може містити компоненти, які можуть впливати на антигени мікоплазм у композиції, запропонованої в даному винаході, тому в переважному об'єкті винаходу застосовують не свинячу сироватку або зовсім не застосовують сироватку. Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, отримана способом, який полягає у тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії, вибрані із групи, що включає *M. hyorhyniae*, *M. hyorhyniae*, *M. hyosynoviae* і будь-які їх комбінації в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки; б) одержують антиген вказаних мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому система на основі еукаріотичних клітин вільна від свинячої сироватки.

Як відзначалося вище, система на основі еукаріотичних клітин може містити клітини лінії MDCK або клітини лінії McCoу. Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонований спосіб одержання імуногенної композиції, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії, вибрані із групи, яка складається з *M. hyorhyniae*, *M. hyorhyniae*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій, у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки; б) одержують антиген вказаних мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, при цьому система на основі еукаріотичних клітин містить клітини лінії MDCK або клітини лінії McCoу.

Згідно з наступним об'єктом винаходу антиген мікоплазм, що входить в імуногенну композицію, одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де вказаний антиген мікоплазм має підвищену імуногенність в порівнянні з таким же антигеном, отриманим з мікоплазм, які культивували в безклітинній системі для культивування.

У контексті даного опису поняття "підвищена імуногенність" означає, що імунологічна відповідь, яка викликається імуногенною композицією, що містить антиген, що представляє інтерес, підвищується в порівнянні із застосовуваною як контроль імуногенною композицією, що містить такий же антиген, де антиген застосовуваної як контроль імуногенної композиції

одержують із мікоплазматичних бактерій, культивованих у безклітинній системі для культивування.

Поняття "підвищений" означає, що клітинна та/або гуморальна імунна відповідь підвищується принаймні на 10 %, переважно принаймні на 20 %, більш переважно принаймні на 30 %, ще більш переважно принаймні на 40 %, ще більш переважно принаймні на 50 %, ще більш переважно принаймні на 75 %, найбільш переважно принаймні на 100 % у порівнянні з клітинною та/або гуморальною імунною відповіддю, яка викликається застосовуваною як контроль імуногенною композицією, що містить такий же антиген, де антиген застосовуваної як контроль імуногенної композиції одержують із мікоплазматичних бактерій, культивованих у безклітинній системі культивування. Звичайному фахівцеві в даній галузі повинно бути очевидно, як вимірювати клітинну та/або гуморальну імунну відповідь. Зокрема, такому фахівцеві в даній галузі повинно бути очевидно, що необхідно або порівнювати клітинну імунну відповідь імуногенної композиції, що представляє інтерес, із клітинною відповіддю контрольної композиції, або гуморальну імунну відповідь імуногенної композиції, що представляє інтерес, з гуморальною імунною відповіддю контрольної композиції, але не клітинну імунну відповідь імуногенної композиції, що представляє інтерес, з гуморальною імунною відповіддю контрольної композиції й навпаки. Крім того, клітинну імунну відповідь можна вимірювати, наприклад, шляхом оцінки активації цитотоксичних Т-клітин, що представляє/, що представляють інтерес імуногенною композицією /антигеном. Гуморальну імунну відповідь можна вимірювати, наприклад, шляхом оцінки кількості антигенспецифічних антитіл, що виробилися в процесі введення імуногенної композиції, що містить вказаний антиген, тварині. Клітинну та/або гуморальну імунну відповідь можна вимірювати, наприклад, шляхом застосування мишиної моделі, котячої моделі, створеної на коровах моделі або створеної на свинях моделі. Однак аналізи, описані в прикладі 4 і 5, можна застосовувати як референс-аналізи для виявлення імунної відповіді проти *M. hyorhinis* і *M. hyorhneumoniae*.

Поняття "такий же (той же самий) антиген" означає що природа антигенів є ідентичною. Так, якщо антиген мікоплазм, що входить в імуногенну композицію, отриману в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, являє собою цільний інактивований бактерин *M. hyorhinis*, то поняття "такий же антиген" означає, що антиген мікоплазм, отриманий у безклітинній системі, являє собою також цільний інактивований бактерин *M. hyorhinis*. Крім того, якщо антиген мікоплазм, що входить в імуногенну композицію, отриману в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, одержують або очищають за допомогою конкретного методу, то поняття "такий же антиген" означає, що антиген мікоплазм із безклітинної системи одержують або очищають за допомогою такого ж методу.

Важливо відзначити, що згідно з експериментальними даними, отриманими при створенні даного винаходу, антигени мікоплазм, отримані вказані вище методом, мають підвищену імуногенність в порівнянні з антигенами мікоплазматичних бактерій, які культивували в безклітинній системі культивування. Зокрема, при застосуванні отриманих на основі MDCK що містять *M. hyorhinis* вакцин встановлений більш ранній початок сероконверсії, більша кількість серопозитивних свиней і більш високі серологічні титри.

Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, отримана способом, який полягає у тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії, вибрані із групи, яка складається з *M. hyorhinis*, *M. hyorhneumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій, у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки; б) одержують антиген вказаних мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, де вказана імуногенна композиція має підвищену імуногенність в порівнянні з імуногенною композицією, яка містить такий же антиген, отриманий з мікоплазм, культивованих у безклітинній системі культивування. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Вказаний цільний інактивований бактерин можна одержувати методами інактивації, вказаними в даному описі. Переважно вказаний цільний інактивований бактерин являє собою інактивований формаліном бактерин.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinis*, у якій один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де імуногенна композиція має підвищену імуногенність в порівнянні з імуногенною композицією, яка містить такий же антиген, отриманий з мікоплазм, культивованих у безклітинній системі культивування. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Крім того, згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою



бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивованим бактерин являє собою інактивованим формаліном бактерин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм являють собою інактивовані бактерини, переважно інактивовані формаліном бактерини.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* і *M. hyosynoviae*, у якій один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де імуногенна композиція має підвищену імуногенність в порівнянні з імуногенною композицією, яка містить такий же антиген, отриманий з мікоплазм, культивованих у безклітинній системі культивування. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Крім того, згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивованим бактерин. Вказаний цільний інактивованим бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивованим бактерин являє собою інактивованим формаліном бактерин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм являють собою інактивовані бактерини, переважно інактивовані формаліном бактерини.

Згідно з наступним об'єктом винаходу антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, при цьому імуногенна композиція містить компоненти еукаріотичних клітин із вказаної системи на основі еукаріотичних клітин.

Поняття "компонента еукаріотичних клітин" включає як цільні клітини, так і фрагменти вказаних еукаріотичних клітин. Поняття "фрагмент" стосується будь-яких частин еукаріотичної клітини, таких як частини клітинної мембрани або внутрішньоклітинні органели, у тому числі цільні органели або їх компоненти. Однак поняття фрагмент стосується також будь-якого компонента вказаної еукаріотичної клітини, такому як ліпіди, білки, цукри, ДНК, РНК і т.п., а також їх комбінації. Крім того, компоненти еукаріотичних клітин і антигену мікоплазм можуть в імуногенній композиції або знаходитися окремо один від одного, або бути приєднані один до одного, або знаходитися у вигляді комбінації вказаних положень.

Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, отримана способом, який полягає у тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії, вибрані із групи, яка складається з *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій, у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки; б) одержують антиген вказаних мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, де імуногенна композиція містить компоненти еукаріотичних клітин із вказаної системи на основі еукаріотичних клітин.

Крім того, згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивованим бактерин. Вказаний цільний інактивованим бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивованим бактерин являє собою інактивованим формаліном бактерин.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinis*, у якій один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де імуногенна композиція містить компоненти еукаріотичних клітин із вказаної системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Крім того, згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивованим бактерин. Вказаний цільний інактивованим бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивованим бактерин являє собою інактивованим формаліном бактерин.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyosynoviae*, у якій один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де імуногенна композиція містить компоненти еукаріотичних клітин із вказаної системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Крім того, згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивованим бактерин. Вказаний цільний інактивованим бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивованим бактерин являє собою інактивованим формаліном бактерин.



Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorheumoniae*, у якій один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де імуногенна композиція містить компоненти еукаріотичних клітин із вказаної системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Крім того, згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Вказаний цільний інактивований бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивований бактерин являє собою інактивований формаліном бактерин.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinis* і *M. hyorheumoniae*, у якій один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де імуногенна композиція містить компоненти еукаріотичних клітин із вказаної системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Крім того, згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Вказаний цільний інактивований бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивований бактерин являє собою інактивований формаліном бактерин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм являють собою інактивовані бактерини, переважно інактивовані формаліном бактерини.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorheumoniae* і *M. hyosynoviae*, у якій один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де імуногенна композиція містить компоненти еукаріотичних клітин із вказаної системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Крім того, згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Вказаний цільний інактивований бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивований бактерин являє собою інактивований формаліном бактерин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм являють собою інактивовані бактерини, переважно інактивовані формаліном бактерини.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinis*, *M. hyorheumoniae* і *M. hyosynoviae*, у якій один або декілька антигенів мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де імуногенна композиція містить компоненти еукаріотичних клітин із вказаної системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки. Крім того, згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Вказаний цільний інактивований бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивований бактерин являє собою інактивований формаліном бактерин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі антигени мікоплазм являють собою інактивовані бактерини, переважно інактивовані формаліном бактерини.

Згідно з наступним об'єктом винаходу антиген мікоплазм одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, при цьому вказані компоненти еукаріотичних клітин приєднані до антигену мікоплазм.

Поняття "приєднаний" стосується будь-якої взаємодії, асоціації, зв'язування, прикріплення або зшивання вказаних компонентів еукаріотичних клітин з антигеном мікоплазм. Таким чином, поняття "приєднаний" включає будь-які взаємодії, включаючи непрямі й прямі, необоротні або оборотні, фізичні й хімічні, електростатичні та/або ковалентні зв'язки. Таким чином, повинно бути очевидно, що компоненти еукаріотичних клітин, наприклад, можуть бути зв'язані з антигеном мікоплазм. Однак слід розуміти, що компоненти еукаріотичних клітин можуть також бути зшиті з антигеном мікоплазм. Вказане зшивання можна одержувати декількома методами, відомими фахівцям в даній галузі, наприклад, шляхом обробки формальдегідом і т.п.

Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонована імуногенна композиція, отримана способом, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичну бактерію, вибрану із групи, яка складається з *M. hyorhinis*, *M. hyorheumoniae*,





компонентів системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Вказаний цільний інактивований бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивований бактерин являє собою інактивований формаліном бактерин.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinitis* і *M. hyosynoviae*; і один або декілька компонентів системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Вказаний цільний інактивований бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивований бактерин являє собою інактивований формаліном бактерин.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyopneumoniae* і *M. hyosynoviae*; і один або декілька компонентів системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Вказаний цільний інактивований бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивований бактерин являє собою інактивований формаліном бактерин.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яка містить один або декілька антигенів мікоплазм *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* і *M. hyosynoviae*; і один або декілька компонентів системи на основі еукаріотичних клітин. Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Вказаний цільний інактивований бактерин можна одержувати за допомогою методів інактивації, вказаних у даному описі. Переважно вказаний цільний інактивований бактерин являє собою інактивований формаліном бактерин.

Даний винахід стосується також способу імунізації суб'єкта, що полягає в тому, що вводять суб'єктові будь-яку з імуногенних композицій, вказаних у даному описі.

Поняття "імунізація" стосується активної імунізації шляхом введення імуногенної композиції суб'єкту, який підлягає імунізації, що приводить до імунологічної відповіді на антиген, включений у вказану імуногенну композицію.

Переважно імунізація приводить до зменшення захворюваності, зв'язаної з конкретною мікоплазматичною інфекцією в череді, або зниження серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційованих з конкретною мікоплазматичною інфекцією.

Наступним об'єктом даного винаходу є спосіб імунізації суб'єкта за допомогою будь-якої з імуногенних композицій, представлених у даному описі, що полягає в тому, що вводять вказаному суб'єктові імуногенну композицію, запропоновану у винаході.

Вказана імуногенна композиція містить а) один або декілька антигенів *M. hyosynoviae* і один або декілька антигенів, вибраних із групи, яка складається з *M. hyopneumoniae* і *M. hyorhinitis* і їх комбінацій; і б) фармацевтично прийнятний носій.

Згідно з наступним об'єктом винаходу імуногенна композиція, запропонована у винаході, містить: а) один або декілька антигенів *M. hyorhinitis* і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій. Згідно з наступним об'єктом винаходу імуногенна композиція містить також один або декілька антигенів *M. hyopneumoniae*.

Якщо імуногенну композицію одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, вказаної в даному описі, то імуногенна композиція, як правило, може містити один або декілька антигенів мікоплазматичної бактерії, вибраної із групи, яка складається з *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій, як додатково буде описано нижче. Згідно з наступним об'єктом винаходу, вказаному вище, вказана імуногенна композиція може містити один або декілька компонентів системи на основі еукаріотичних клітин додатково до одного або декількох антигенів мікоплазматичної бактерії, вибраної із групи, яка складається з *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-якої їх комбінації.

Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм, застосовуваних для імунізації суб'єкта, який потребує цього, являють собою цільний інактивований бактерин. Згідно із цим об'єктом даного винаходу будь-який один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивований бактерин. Однак згідно із цим об'єктом даного винаходу мається на увазі також, що всі антигени в імуногенній композиції, запропонованій в даному винаході, являють собою цільні інактивовані бактерини, тобто антиген *M. hyorhinitis*, антиген *M. hyosynoviae* та/або антигени *M. hyopneumoniae* представляє (ють) собою цільні

інактивовані бактерини. Вказані цільні інактивовані бактерини можна одержувати за допомогою методів інактивації, які вказані в даному описі. Переважно вказані цільні інактивовані бактерини являють собою інактивовані формаліном бактерини.

5 Переважно така обробка приводить до зменшення захворюваності, зв'язаної з конкретною мікоплазматичною інфекцією в череді, або зниження серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційованих з конкретною мікоплазматичною інфекцією.

Згідно з наступним об'єктом винаходу імунізація тварини, яка цього потребує, імуногенними композиціями, представленими в даному описі, приводить до попередження зараження тварини мікоплазматичною інфекцією. Ще більш переважно імунізація приводить до ефективної  
10 тривалої імунологічної відповіді проти мікоплазматичної інфекції. Як повинно бути очевидно, вказаний період часу повинен становити більше 2 місяців, переважно більше 3 місяців, більш переважно більше 4 місяців, більш переважно більше 5 місяців, більш переважно більше 6 місяців. Як повинно бути очевидно, імунізація не може мати ефективність у відношенні всіх імунізованих тварин. Однак згідно з винаходом потрібно, щоб значна частина тварин у череді  
15 була ефективно імунізована.

Переважно в даному контексті під чередою тварин маються на увазі тварини, у яких у нормі, тобто без імунізації можуть розвиватися клінічні ознаки, які, як правило, викликаються або асоційовані з мікоплазматичною інфекцією. Фахівець у даній галузі легко може визначити чи є тварини в череді ефективно імунізованими. Переважно імунізація може розглядатися як  
20 ефективна, якщо частота зустрічальності або серйозність клінічних ознак принаймні в 33 %, принаймні в 50 %, принаймні в 60 %, принаймні в 70 %, принаймні в 80 % або принаймні в 90 % особин даної череди знизилися принаймні на 10 %, більш переважно принаймні на 20 %, ще більш переважно по меншій мері на 30 %, ще більш переважно принаймні на 40 %, ще більш переважно принаймні на 50 %, ще більш переважно принаймні на 60 %, ще більш переважно принаймні на 70 %, ще більш переважно принаймні на 80 %, ще більш переважно принаймні на  
25 90 % і найбільш переважно принаймні на 95 % у порівнянні із тваринами, яких або не імунізували, або імунізували з використанням імуногенної композиції, відомої з рівня техніки, що існує до створення даного винаходу, і після цього заражали конкретною мікоплазматичною бактерією.

30 В одному з об'єктів даного винаходу тварини вибирають із групи, що включає свиней, велику рогату худобу, кішок і собак. Таким чином, одним з об'єктів винаходу є спосіб імунізації тварини, що полягає в тому, що вводять тварині імуногенну композицію, запропоновану у винаході, де тварину вибирають із групи, що включає свиней, велику рогату худобу, кішок і собак.

Відповідно до одного з об'єктів даного винаходу імуногенну композицію вводять однократно.  
35 Таким чином, наступним об'єктом винаходу є спосіб імунізації тварини, що полягає в тому, що вводять тварині імуногенну композицію, запропоновану у винаході, у якому імуногенна композиція має ефективність відносно зниження захворюваності, зв'язаної з конкретною мікоплазматичною інфекцією в череді, або зниження серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційованих з конкретною мікоплазматичною інфекцією, після введення однієї дози вказаної імуногенної композиції вказаній тварині. Очевидно, що вказану одну дозу  
40 вводять тільки один раз. Як продемонстровано в прикладах 2 і 3, встановлено, що імуногенна композиція, представлена в даному описі, має ефективність після введення у вигляді однієї дози тварині, яка потребує цього.

Так, коли вказаний спосіб полягає в тому, що вводять один або декілька антигенів M. hyorhinis, то вказана імуногенна композиція є ефективною відносно зниження захворюваності, зв'язаною інфекцією M. hyorhinis у череді, або зниження серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційованих з інфекцією M. hyorhinis. Коли вказаний спосіб полягає в тому, що вводять один або декілька антигенів M. hyorhineptoniae, то згідно з наступним об'єктом винаходу композиція є ефективною відносно зниження захворюваності, зв'язаною інфекцією M. hyorhineptoniae у череді, або зниження серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційованих з інфекцією M. hyorhineptoniae. І в цьому варіанті один або декілька антигенів мікоплазм, що підлягають введенню згідно зі способом, запропонованим у даному винаході, можуть являти собою цільні інактивовані бактерини представлених вище в даному описі видів мікоплазм.  
50

55 Переважно одна доза має загальний об'єм приблизно до 0,5 до 2,5 мл, більш переважно приблизно від 0,6 до 2,0 мл, ще більш переважно приблизно від 0,7 до 1,75 мл, ще більш переважно приблизно від 0,8 до 1,5 мл, ще більш переважно приблизно від 0,9 до 1,25 мл, при цьому найбільш переважно є одна доза об'ємом 1,0 мл.

60 Однак імуногенну композицію можна вводити два або більшу кількість разів, при цьому першу дозу вводять до введення другий (бустерної) дози. Переважно другу дозу вводять

принаймні через 15 днів після першої. Більш переважно другу дозу вводять через 15-40 днів після першої дози. Ще більш переважно другу дозу вводять принаймні через 17 днів після першої дози. Ще більш переважно другу дозу вводять через 17-30 днів після першої дози. Ще більш переважно другу дозу вводять принаймні через 19 днів після першої дози. Ще більш переважно другу дозу вводять через 19-25 днів після першої дози. Найбільш переважно другу дозу вводять принаймні через 21 день після першої дози. Згідно із переважним об'єктом винаходу застосовують дворазову схему введення, при цьому першу й другу дози імуногенної композиції вводять в однаковій кількості. Переважно кожна доза включає переважні вказані вище кількості, при цьому найбільш переважно є перша й друга доза об'ємом 1 мл. Крім схеми на основі першої й другої доз в альтернативному варіанті здійснення винаходу передбачається застосування додаткових наступних доз. Наприклад, згідно із цими об'єктами винаходу можна вводити третю, четверту або п'яту дозу. Переважно при застосуванні схем, що включають третю, четверту й п'яту дозу, їх вводять у такий же кількості, що й першу дозу, з часовими рамками між дозами, що узгоджуються із вказаним вище проміжком часом між введенням першої й другої доз.

Імуногенну композицію переважно застосовують місцево або системно. Прийнятними звичайно застосовуваними шляхами введення є оральне або парентеральне введення, таке як інтраназальне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, підшкірне введення, а також введення шляхом інгаляції. Однак залежно від природи й механізму дії сполуки імуногенну композицію можна вводити також іншими шляхами.

Як правило, коли застосовують бактеріальний антиген, такий як мікоплазматичний бактерин, імуногенна композиція містить від приблизно  $10^3$  до приблизно  $10^{10}$  колонієутворюючих одиниць (КУО) бактеріального антигену на дозу, переважно від приблизно  $10^4$  до приблизно  $10^9$  КУО бактеріального антигену на дозу, більш переважно від приблизно  $10^5$  до приблизно  $10^6$  КУО бактеріального антигену на дозу. Якщо в імуногенній композиції застосовують інактивованний бактерин, то величина КУО стосується кількості мікоплазматичних бактерій до інактивації.

Наприклад, імуногенну композицію, запропоновану в даному винаході, яка містить антигени *M. hyorheumoniae*, переважно застосовують у кількостях, що становлять від приблизно  $10^2$  до приблизно  $10^{10}$  КУО на дозу, переважно від приблизно  $10^3$  до приблизно  $10^9$  КУО на дозу, ще більш переважно в кількості від приблизно  $10^4$  до приблизно  $10^8$  КУО на дозу, найбільш переважно в кількості від приблизно  $10^5$  до приблизно  $10^7$  КУО на дозу. Імуногенну композицію, запропоновану в даному винаході, яка містить антигени *M. hyorhinis*, переважно застосовують у кількостях, що становлять від приблизно  $10^2$  до приблизно  $10^{10}$  КУО на дозу, переважно від приблизно  $10^3$  до приблизно  $10^9$  КУО на дозу, ще більш переважно в кількості від приблизно  $10^4$  до приблизно  $10^8$  КУО на дозу, найбільш переважно в кількості від приблизно  $10^5$  до приблизно  $10^7$  КУО на дозу. Імуногенну композицію, запропоновану в даному винаході, яка містить антигени *M. hyosynoviae*, переважно застосовують у кількостях, що становлять від приблизно  $10^2$  до приблизно  $10^{10}$  КУО на дозу, переважно від приблизно  $10^3$  до приблизно  $10^9$  КУО на дозу, ще більш переважно в кількості від приблизно  $10^4$  до приблизно  $10^8$  КУО на дозу, найбільш переважно в кількості від приблизно  $10^5$  до приблизно  $10^7$  КУО на дозу.

Таким чином, наступним об'єктом винаходу є спосіб імунізації тварини, що полягає в тому, що вводять тварині імуногенну композицію, запропоновану у винаході, у якому імуногенна композиція має ефективність відносно зниження захворюваності, зв'язаної з конкретною мікоплазматичною інфекцією в череді, або зниження серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційованих з конкретною мікоплазматичною інфекцією, після введення однієї дози вказаної імуногенної композиції вказаній тварині, де вказана одна доза містить від  $10^2$  до приблизно  $10^{10}$  КУО мікоплазматичних бактерій на дозу.

Одним з об'єктів даного винаходу є спосіб імунізації тварини, що потребує цього, що приводить до підвищення параметра ефективності, вибраного із групи, що включає вкорочення тривалості бактеріємії, зменшення бактеріального навантаження, або їх комбінацію в порівнянні із твариною з неімунізованою контрольною групою цього ж виду.

Поняття "укорочення тривалості бактеріємії" означає, що тривалість бактеріємії у тварини, імунізованої імуногенною композицією, коротшає принаймні на 10 %, більш переважно принаймні на 20 %, ще більш переважно принаймні на 30 %, ще більш переважно принаймні на 40 %, ще більш переважно принаймні на 50 %, ще більш переважно принаймні на 60 %, ще більш переважно по меншій мері на 70 %, ще більш переважно принаймні на 80 %, ще більш переважно принаймні на 90 % і найбільш переважно принаймні на 100 % у порівнянні із тваринами, яких не імунізують або яких імунізують імуногенною композицією, відомою з рівня техніки, що існував до створення даного винаходу, і після цього заражають конкретною мікоплазматичною бактерією. Як повинно бути очевидно, тривалість бактеріємії визначають із

використанням репрезентативної кількості тварин у кожній групі (неімунізований і імунізований групи) перед їх порівнянням.

Поняття "зменшення бактеріального навантаження" означає, що бактеріальне навантаження мікоплазматичними бактеріями дикого типу у тварини, інфікованої мікоплазматичними бактеріями дикого типу, знижується принаймні на 10 %, більш переважно принаймні на 20 %, ще більш переважно принаймні на 30 %, ще більш переважно принаймні на 40 %, ще більш переважно принаймні на 50 %, ще більш переважно принаймні на 60 %, ще більш переважно принаймні на 70 %, ще більш переважно принаймні на 80 %, ще більш переважно принаймні на 90 % і найбільш переважно принаймні на 100 % після імунізації імуногенною композицією, запропонованою в даному винаході, у порівнянні із тваринами, яких не імунізують або яких імунізують імуногенною композицією, відомою з рівня техніки, що існував до створення даного винаходу, і після цього заражають конкретно мікоплазматичною бактерією. Як повинно бути очевидно, бактеріальне навантаження визначають із використанням репрезентативної кількості тварин у кожній групі (неімунізований і імунізований групи) перед їх порівнянням.

Таким чином, наступним об'єктом даного винаходу є спосіб імунізації тварини, що полягає в тому, що вводять тварині, що потребує цього, імуногенну композицію, запропоновану в даному винаході, що приводить до поліпшення параметра ефективності, вибраного із групи, що включає вкорочення тривалості бактеріємії, зменшення бактеріального навантаження, або їх комбінацію в порівнянні із твариною з неімунізованою контрольною групою цього ж виду.

Відповідно до одного з об'єктів даного винаходу спосіб можна застосовувати для тварини віком приблизно 3 тижні. Так, відповідно до одного з об'єктів винаходу в даній заявці запропонований спосіб імунізації особини, що полягає в тому, що обробляють тварину імуногенною композицією, запропонованою у винаході, де спосіб можна застосовувати для тварини віком приблизно 3 тижні.

Важливо відзначити, що експериментальні дані, представлені в даному винаході, свідчать про ефективність імуногенної композиції для поросят віком приблизно 3 тижні.

Переважно вказану тварину слід імунізувати у віці від 1 дня до 21 дня, більш переважно вказану тварину слід імунізувати у віці від 1 дня до 10 днів, ще більш переважно у віці від 1 дня до 9 днів, ще більш переважно у віці від 1 дня до 8 днів, ще більш переважно у віці від 1 дня до 7 днів, ще більш переважно у віці від 1 дня до 6 днів, ще більш переважно у віці від 1 дня до 5 днів, ще більш переважно у віці від 1 дня до 4 днів, ще більш переважно у віці від 1 дня до 3 днів, ще більш переважно у віці від 1 або 2 дня й найбільш переважно у віці 1 день.

Таким чином, одним з об'єктів винаходу є спосіб імунізації тварини, що полягає в тому, що вводять тварині імуногенну композицію, запропоновану у винаході, для імунізації тварини, що потребує цього, де вік тварини, яка підлягає імунізації, становить від 1 дня до 21 дня.

Даний винахід стосується також будь-якої імуногенної композиції, представленій в даному описі, призначеної для застосування в будь-якому зі способів, представлених у даному описі, наприклад, для застосування для лікування та/або профілактики мікоплазматичних інфекцій у тварини або для застосування для імунізації тварини проти мікоплазматичної інфекції.

Вказана імуногенна композиція містить а) один або декілька антигенів *M. hyosynoviae* і один або декілька антигенів, вибраних із групи, яка складається з *M. hyorheumoniae*, *M. hyorhinis* і їх комбінації; і б) фармацевтично прийнятний носій.

Згідно з наступним об'єктом винаходу імуногенна композиція, запропонована у винаході, містить: а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis* і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій. Згідно з наступним об'єктом винаходу імуногенна композиція містить також один або декілька антигенів *M. hyorheumoniae*.

Якщо імуногенну композицію одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, представленій в даному описі, то імуногенна композиція, як правило, може містити один або декілька антигенів мікоплазматичної бактерії, вибраної із групи, яка складається з *M. hyorhinis*, *M. hyorheumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-якої їх комбінації, що додатково буде описано нижче. Як описано вище, згідно з іншим об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція може містити один або декілька компонентів системи на основі еукаріотичних клітин крім одного або двох антигенів мікоплазматичних бактерій, вибраних із групи, яка складається з *M. hyorhinis*, *M. hyorheumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-якої їх комбінації.

Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм, застосовуваний(их) для імунізації суб'єкта, який потребує цього, представляє (ють) собою цільний інактивований бактерин. Згідно із цим об'єктом даного винаходу будь-який один антиген мікоплазм являє собою цільний інактивований бактерин. Однак під цей об'єкт даного винаходу підпадає також варіант, коли всі антигени в імуногенній композиції, запропонованій в даному

винаході, являють собою цільні інактивовані бактерини, тобто антиген *M. hyorhinis*, антиген *M. hyosynoviae* та/або антиген *M. hyopneumoniae*, представляє (ють) собою цільні інактивовані бактерини. Вказані цільні інактивовані бактерини можна одержувати за допомогою методів інактивації, представлених у даному описі. Переважно вказані цільні інактивовані бактерини

5 являють собою інактивовані формаліном бактерини.

Переважно вказане застосування приводить до зниження захворюваності, зв'язаної з конкретною мікоплазматичною інфекцією в череді, або зниження серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційованих з конкретною мікоплазматичною інфекцією.

10 Даний винахід стосується також застосування імуногенної композиції, представленої в даному описі, для лікування та/або профілактики мікоплазматичних інфекцій у суб'єкта або для імунізації суб'єкта проти мікоплазматичної інфекції.

Вказана імуногенна композиція містить а) один або декілька антигенів *M. hyosynoviae* і один або декілька антигенів, вибраних із групи, яка складається з *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* і їх комбінацій; і б) фармацевтично прийнятний носій.

15 Згідно з наступним об'єктом імуногенна композиція, запропонована у винаході, містить: а) один або декілька антигенів *M. hyorhinis* і один або декілька антигенів *M. hyosynoviae*; і б) фармацевтично прийнятний носій. Згідно з наступним об'єктом винаходу імуногенна композиція містить також один або декілька антигенів *M. hyopneumoniae*.

20 Якщо імуногенну композицію одержують у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, представленої в даному описі, то імуногенна композиція, як правило, може містити один або декілька антигенів мікоплазматичної бактерії, вибраної із групи, яка складається з *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-якої їх комбінації, що додатково буде описано нижче. Як описано вище, згідно з іншим об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція може містити один або декілька компонентів системи на основі

25 еукаріотичних клітин крім одного або декількох антигенів мікоплазматичних бактерій, вибраних із групи, яка складається з *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* і будь-якої їх комбінації.

Згідно з наступним об'єктом винаходу один або декілька антигенів мікоплазм, застосовуваний(их) для імунізації суб'єкта, який потребує цього, представляє (ють) собою

30 цільний інактивований бактерин. Згідно із цим об'єктом даного винаходу будь-який один антиген мікоплазм являє собою цільний інактивований бактерин. Однак під цей об'єкт даного винаходу підпадає також варіант, коли всі антигени в імуногенній композиції, запропонованій в даному винаході, являють собою цільні інактивовані бактерини, тобто антиген *M. hyorhinis*, антиген *M. hyosynoviae* та/або антигени *M. hyopneumoniae*, представляє (ють) собою цільні інактивовані

35 бактерини. Вказані цільні інактивовані бактерини можна одержувати за допомогою методів інактивації, представлених у даному описі. Переважно вказані цільні інактивовані бактерини являють собою інактивовані формаліном бактерини.

Переважно вказане застосування приводить до зниження захворюваності, зв'язаної з конкретною мікоплазматичною інфекцією, у череді, або зниження серйозності клінічних ознак, які викликаються або асоційованих з конкретною мікоплазматичною інфекцією.

#### Приклади

Наведені нижче приклади представлені тільки з метою ілюстрації даного винаходу. Вони не повинні розглядатися, як такі, що обмежують яким-небудь способом обсяг формули винаходу.

#### Приклад 1

45 Культивування мікоплазматичних бактерій в MDCK-клітинах або McCoy-клітині відповідно А. Культивування *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* і *M. hyopneumoniae* в MDCK-клітинах *M. hyorhinis*:

Клітини MDCK, вирощені в T75-колбі(ах) до досягнення конфлюентності, обробляли трипсином і пересівали в 5 T150-колб (розщеплення 1:10), використовуючи середовище

50 MEM+5 % FBS. Колби інкубували при 37°C+5 % CO<sub>2</sub> до досягнення моношаром конфлюентності приблизно 95-100 %. Середовище відкидали, колби промивали двічі 1-кратним ЗФР. Потім у кожен колбу додавали 4-5 мл *M. hyorhinis* (MOI=10-100). Давали пройти зараженню в колбах в однакових умовах інкубації протягом періоду часу, що становить не менше 2 год. Після періоду зараження в кожен колбу додавали середовище для інфікування (MEM+2 % FBS), попередньо нагріте приблизно до 37°C, у кількості, достатній для досягнення об'єму в кожній колбі 60 мл.

55 Потім колбам давали пройти інкубацію до досягнення > 90 % ЦПД (приблизно 3-7 днів). Потім збирали клітинну суспензію з кожної колби й об'єднували (пасаж n). Потім цей продукт використовували для зараження нових колб MDCK-клітинами, що досягли 95-100 % конфлюентності, використовуючи таку ж процедуру, що й для попереднього зараження (пасаж

60 n+1), збільшуючи кількість колб, застосовуваних для досягнення необхідного відповідного



кінцевого об'єму (пасаж n+2, пасаж n+3 і т.д.).

*M. hyosynoviae*

*M. hyosynoviae* культивували також як *M. hyorhinis* з декількома модифікаціями: середовище для інфікування містило DMEM+2 % FBS+1 % розчину аргініну; *M. hyosynoviae*, як правило, не характеризувався ЦПД, тому зміна кольору й каламутності середовища були індикатором, що має вирішальне значення, для пересівання з одержанням наступного пасажу.

*M. hyopneumoniae*

*M. hyopneumoniae* культивували в такий же спосіб, що й *M. hyorhinis*. Залежно від застосовуваного для зараження штаму ЦПД могло проявлятися або відсутнє. Тому зміну кольору й каламутності середовища можна використовувати як індикатор для пересівання з одержанням наступного пасажу.

Б. Умови культивування *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* і *M. hyopneumoniae* в McCoу-клітинах *M. hyorhinis*:

McCoу-клітини вирощували в суспензійних культурах у перемішуваних колбах у модифікованому середовищі EMEM, доповненому 10 % FBS. Клітини пересівали в нові колби так, щоб кінцева концентрація становила  $10^5$ - $10^6$  клітин/мл. Для *M. hyorhinis* 500 мл клітин з концентрацією  $10^5$ - $10^6$  клітин/мл висівали в 3-літрову колбу з розрахунку  $10^7$ - $10^8$  КУО в 1 мл. Потім колби інкубували при 37°C у присутності 5 % CO<sub>2</sub> на магнітній мішалці протягом 3-7 днів. Моніторинг росту мікоплазм здійснювали шляхом візуального визначення зміни кислотності pH і підвищення каламутності. Ріст мікоплазм оцінювали також шляхом аналізу БОЕ для визначення кількостей.

*M. hyosynoviae*

*M. hyosynoviae* культивували також як *M. hyorhinis*. 500 мл клітин із щільністю  $10^5$ - $10^6$  клітин/мл висівали в 3-літрову колбу з розрахунку  $10^5$ - $10^7$  КУО в 1 мл. Потім колби інкубували при 37°C у присутності 5 % CO<sub>2</sub> на магнітній мішалці протягом приблизно 2 тижнів. Для оцінки росту визначали як зміну pH, так і підвищення каламутності, додатково до аналізів БОЕ для оцінки кількостей.

*M. hyopneumoniae*

*M. hyopneumoniae* культивували в такий же спосіб, що й *M. hyorhinis* і *M. hyosynoviae*. 500 мл клітин з концентрацією  $10^5$ - $10^6$  клітин/мл висівали в 3-літрову колбу з розрахунку  $10^5$ - $10^7$  КУО в 1 мл. Потім колби інкубували при 37 °C у присутності 5 % CO<sub>2</sub> на магнітній мішалці протягом приблизно 2 тижнів. Для оцінки росту можна застосовувати як визначення зміни pH, так і підвищення каламутності додатково до аналізів БОЕ для оцінки кількостей.

В. Культивування різних видів мікоплазм із різними типами сироватки

Для вирішення питання про те, чи можна культивувати види мікоплазм із використанням різних типів сироватки різного походження, MDCK-клітини заражали *M. hyorhinis* і культивували з використанням сироватки плода корови, свинячої сироватки, кролячої сироватки, курячої сироватки або кінської сироватки відповідно. Для кожного типу сироватки культивування *M. hyorhinis* в MDCK-клітинах здійснювали відповідно до описаного вище методу (тобто застосовували 5 % сироватки для вирощування клітин і 2 % сироватки для зараження). MDCK-клітини збирали через 4 дня після зараження згідно зі стандартним методом. Аналіз CCU (одиниця зміни кольору) здійснювали для визначення титру живих *M. hyorhinis*. Крім того, здійснювали qПЛР (кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі) для визначення загального вмісту геному (gc) *M. hyorhinis*. Результати наведеного як приклад експерименту представлено в таблиці 1.

Таблиця 1:

Культивування *M. hyorhinis* з використанням різних типів сироватки

Тип сироватки	qПЛР log (gc/мкл)	CCU <sub>50</sub> (log/мл)
Сироватка плода корови	6,15	8,00
Свиняча сироватка	6,06	8,50
Кроляча сироватка	6,11	8,33
Куряча сироватки	6,31	8,00
Кінська сироватка	6,49	9,00

У таблиці 1 продемонстровано, що титри, виміряні або за допомогою аналізу CCU, або за допомогою qПЛР, виявилися подібними при використанні різних типів сироватки. Крім того, дані, отримані методом вестерн-блотингу (не представлені), підтвердили вказаний результат. Таким

чином, *M. hyorhinis* можна культивувати в MDCK-клітинах незалежно від того, який тип сироватки застосовували для культивування.

#### Приклад 2

##### Приготування вакцин

- 5 Коли останній пасаж був готовий для збору (наявність >90 % ЦПД), здійснювали один цикл заморожування-відтавання у всіх колбах шляхом витримувannya їх у морозильній камері при температурі < -60°C протягом >2 год., швидкого відтавання при 37°C, збору й об'єднання лізатів, і піпетування наверх й вниз до гомогенізації. Як правило, потім до цієї суспензії додавали 10-20 % гліцерину й гомогенізували. Вказану суспензію розділяли на аліквоти робочого об'єму.
- 10 Маточні розчини зберігали при температурі < -60°C до застосування.

Необхідні обсяги вказаних вище маточних розчинів інактивували за допомогою 0,2 % формаліну. Надлишок формаліну нейтралізували бісульфітом натрію в момент змішання вакцини. Вакцини змішували з ад'ювантом Montanide™ ISA 207 VG або з ад'ювантом Carbopol®. Вакцини зберігали при 2-7°C.

#### 15 Приклад 3

##### Оцінка ефективності вакцин

Ефективність вакцин оцінювали за їх здатністю викликати гуморальну імунну відповідь (а також за титром, визначеним за допомогою ELISA) після введення свиням.

##### Догляд за тваринами

- 20 Перед початком експерименту тварини мали хороший стан здоров'я й фон харчування. Перед процедурою рандомізації й оцінки здійснювали визначення стану здоров'я. Під час експерименту використовували немедицинський корм. Кормовий раціон відповідав віку, стану й виду тестованої тварини згідно зі стандартною процедурою вирощування у виробничих умовах. Під час експерименту тварини мали вільний доступ до води.

- 25 Оцінка ефективності вакцин на основі *M. hyorhinis* і *M. hyopneumoniae* після введення свиням

##### *M. hyorhinis*:

- Нормальним поросяткам віком 6 тижнів  $\pm$  5 днів вводили внутрішньом'язово дозу об'ємом 2 мл (7,1-7,3 log<sub>10</sub> CCU/дозу) у день 0 (D0) і знову в день 21 (D21) вакцини на основі *M. hyorhinis*.
- 30 *M. hyorhinis* культивували в MDCK-клітинах відповідно до описаного вище методу. У вакцину додавали ад'ювант Монтанід ISA207VG або CARBOPOL®. Як плацебо використовували ЗФР. Загальний стан здоров'я поросят оцінювали щодня. Зразки крові збирали перед вакцинацією в D0, і в дні 7, 14, 21, 28, 35 і 42. Сироватку тестували у відношенні специфічних у відношенні *M. hyorhinis* антитіл за допомогою непрямого ELISA фірми BIVI R&D. При застосуванні ELISA
- 35 фірми BIVI R&D співвідношення S/P > 0,200 розглядали як позитивне.

- Як продемонстровано в таблиці 2, за даними ELISA *M. hyorhinis* викликала сильну гуморальну імунну відповідь. 6/6 (100 %) тварин, вакцинованих *M. hyorhinis*-MDCK + Монтанід ISA207VG виявилися позитивними через 2 тижні після обробки першою дозою (D14). Усі тварини залишалися позитивними аж до D42, при цьому підвищення титрів виявлене після
- 40 застосування другої дози (D28). У тварин, вакцинованих *M. hyorhinis*-MDCK+Carbopol® також виявлена гуморальна імунна відповідь.

Таблиця 2:

Отримані за допомогою ELISA результати для *M. hyorhinis*

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

- 45 Аналогічні результати, що стосуються гуморальної імунної відповіді після вакцинації, одержували при культивуванні *M. hyorhinis* в McCoу-клітинах (дані не представлені). Крім того, аналогічні результати, що стосуються гуморальної імунної відповіді після вакцинації, одержували при обробці поросят віком 3 тижні  $\pm$  5 днів (дані не представлені). Аналогічні результати одержували після одноклозової обробки (дані не представлені).

##### *M. hyopneumoniae*

- 50 Нормальним поросяткам віком 6 тижнів  $\pm$  5 днів вводили внутрішньом'язово дозу об'ємом 2

мл (8,0-8,5 log<sub>10</sub> CCU/дозу) в D0 і знову в D21 вакцину на основі *M. hyorhyniae*. У вакцину додавали ад'ювант Монтанід ISA207VG. Як плацебо використовували ЗФР. Загальний стан здоров'я поросят оцінювали щодня. Зразки крові збирали перед вакцинацією в D0, і в дні 7, 14, 21, 28, 35 і 42 для тестування відносно присутності антитіл до *M. hyorhyniae*. У прикладі, результати якого представлено в таблиці 3, застосовували набір, що продається, для ELISA фірми IDEXX відносно присутності антитіл к. При застосуванні ELISA фірми співвідношення S/P > 0,400 розглядали як позитивне.

Як продемонстровано в таблиці 3, за даними ELISA *M. hyorhyniae* викликала сильну гуморальну імунну відповідь. З вакцинованих *M. hyorhyniae* MDCK+ISA207 тварин 3/6 (50 %) виявилися позитивними в D14 і 5/6 (83,3 %) в D21, а 6/6 (100 %) виявилися позитивними в D28, 35 і 42.

Таблиця 3:

Отримані за допомогою ELISA фірми IDEXX результати для *M. hyorhyniae*

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

Аналогічні результати одержували після односторової обробки (дані не представлені).

#### Приклад 4

Ефективність вакцин, отриманих з мікоплазматичних бактерій, які культивували в лінії еукаріотичних клітин, у порівнянні з вакцинами, отриманими з мікоплазматичних бактерій, які культивували в безклітинній системі

54 тваринних ліній CD/CD віком 8 тижнів ± 5 днів розділяли на 6 груп. Кожну із груп V1 і V2 обробляли інактивованим ізолятом *M. hyorhyniae*, який культивували в MDCK-клітинах і середовищі CM (комплексне середовище; наприклад, середовище на основі протеозного пептону, що містить свинячу сироватку й дріжджовий екстракт, або середовище Фриза) відповідно; групу V3 і V4 обробляли інактивованим ізолятом *M. hyorhyniae*, який культивували в MDCK-середовищі й CM відповідно. В усі вакцини як ад'ювант додавали Монтанід ISA207VG; доза й шлях відповідали схемі 2×2 мл, дози вводили шляхом внутрішньом'язової ін'єкції однієї дози в D0, а другої дози в D21. Групу CC (контрольна група) обробляли плацебо без антигену (ЗФР) відповідно такій же схемі. Групу SC (строгий контроль) не обробляли протягом експерименту, ці тварини служили як строгий контроль. В D42, 43 і 44 поросят у групах V1-V4 і CC піддавали контрольному зараженню вірулентним ізолятом *M. hyorhyniae*. Доза й шлях відповідали схемі: 40 мл внутрішньоочеревинно, 15 мл внутрішньовенно й 15 мл інтраназально відповідно. Зразки крові збирали щотижня, починаючи з D0, і до закінчення експерименту (D58) для тестування за допомогою специфічного для *M. hyorhyniae* ELISA. При застосуванні ELISA фірми R&D співвідношення S/P > 0,200 розглядали як позитивне. Усі поросята в SC-групі залишалися негативними протягом експерименту, що свідчило про відсутність експозиції *M. hyorhyniae*. Групи V1-V4 і CC були негативними в D0 і 7. Однак серологічні результати варіювалися в значній мірі між вакцинами на основі CM і на основі MDCK. У порівнянні з вакцинами на основі CM для вакцин на основі MDCK виявлений більш ранній початок сероконверсії, більша кількість серопозитивних свиней і більш високі серологічні титри.

Таблиця 4:

Отримані за допомогою ELISA результати для *M. hyorhyniae*

<i>M. hyorhyniae</i> , ELISA, середні співвідношення S/P у групі									
Група	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D58
MHRN001-MDCK (V1)	-0,002	0,010	0,199	0,482	0,916	0,971	0,929	1,056	0,991
MHRN001-CM (V2)	0,001	0,009	0,031	0,081	0,395	0,401	0,370	0,793	0,770
MHRN002-MDCK (V3)	0,004	0,014	0,157	0,424	0,981	1,023	0,953	1,097	1,086
MHRN002-CM (V4)	0,003	0,011	0,017	0,047	0,298	0,299	0,263	0,704	0,608
Плацебо (CC)	0,004	0,004	0,009	0,023	0,021	0,029	0,031	0,262	0,433
Строгий контроль (SC)	-0,003	-0,002	-0,003	0,005	0,008	0,015	0,021	0,031	0,060

Крім того, здійснювали експерименти з титрування для порівняння вакцин, отриманих за допомогою клітинних культур, з вакцинами на основі мікоплазматичних бактерій, культивованих у безклітинній системі.

5 М. hyorhinis культивували в McCoу-клітинах відповідно до описаного вище методу або культивували в СМ (комплексне середовище) відповідно.

Готували вакцини з антигеном, отриманим з використанням McCoу, застосовуючи нерозведений антиген (повний), антиген, розведений у співвідношенні 1:10, і антиген, розведений у співвідношенні 1:100, усі змішані в співвідношенні 1:1 із застосуванням як ад'ювант Монтанідом ISA207VG. Аналогічним способом готували вакцини з використанням отриманого в СМ антигену.

Свиней (вік у момент вакцинації становив 3 тижні) вакцинували, використовуючи одну дозу об'ємом 2 мл, яку вводили ІМ у день 0.

15 Як продемонстровано в таблиці 5, перед контрольним зараженням (D0-D21) усі групи в середньому розглядалися як "негативні", хоча в групі "McCoу+ISA "повний" (антиген)» і "McCoу+ISA 1:10") виявлені відповіді, що мають тенденцію до позитивності. Через 1 тиждень після контрольного зараження (D28) виявлена відповідь у всіх вакцинованих групах, крім групи "СМ+ISA 1:100".

20 З таблиці 5 очевидно, що для кожного типу антигену (McCoу, СМ) виявлений стандартний титраційний ефект ("повний">1:10>1:100). Крім того, у таблиці 5 продемонстровано, що тварини із групи "McCoу+ISA "повний"» і "McCoу+ISA 1:10" мали більш високі середні бали, у порівнянні із групою, обробленою "СМ+ISA "повний", і ця особливість зберігалася до закінчення дослідів в D42. Групи з позитивними (S/P  $\geq$  0,200) середніми значеннями після контрольного зараження являли собою групи "McCoу+ "повний" і "McCoу+1:10". При застосуванні вакцин "McCoу+ "повний" і "McCoу+1:10" отримана більш висока серологічна відповідь у порівнянні з вакциною "СМ+ "повний" як до контрольного зараження, так і після контрольного зараження. Крім того, у тварин, вакцинованих "McCoу+1:100" також виявлена відповідь, що відрізняється від відповіді в обробленій плацебо (невакцинований) групі й групі "СМ+1:100" (відповідь у групі, обробленій "СМ+1:100" або її відсутність виявилися еквівалентними з відповіддю в невакцинованих тварин).

30 Експерименти з титрування продемонстрували, що вакцини на основі клітинних культур забезпечували переважні серологічні результати в порівнянні з вакцинами з мікоплазматичних бактерій, культивованих у безклітинній системі.

Таблиця 5:

Отримані за допомогою ELISA результати для M. hyorhinis

M. hyorhinis, ELISA, середні співвідношення S/P у групі							
Група	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
McCoу+ISA "повний»	0,002	0,012	0,032	0,117	0,312	0,298	0,325
McCoу+ISA 1:10	0,000	0,005	0,065	0,107	0,291	0,193	0,221
McCoу+ISA 1:100	0,001	0,001	-0,001	0,000	0,145	0,118	0,150
СМ + ISA "повний»	0,002	0,009	0,011	0,034	0,190	0,163	0,190
СМ + ISA 1:10	-0,001	0,017	0,003	0,014	0,114	0,132	0,176
СМ + ISA 1:100	-0,002	0,000	-0,002	0,001	0,019	0,043	0,093
Плацебо: 3ФР + ISA	-0,001	0,002	-0,002	-0,002	0,021	0,039	0,081
Строгий контроль	-0,002	-0,001	-0,002	-0,002	-0,002	0,008	0,024

35 Приклад 5

Ефективність мульвалентної вакцини, що містить антиген M. hyosynoviae, M. hyopneumoniae і M. hyorhinis.

40 У цьому досліді 15 CD/CD-тваринам віком 11 тижнів  $\pm$  5 днів вводили однократно дозу об'ємом 2 мл, ІМ, тривалентної прототипової комбінованої вакцини Mycoplasma. Вакцина складалася з інактивованої M. hyorhinis, інактивованої M. hyopneumoniae і інактивованої M. hyosynoviae. Усі види культивували в MDCK-клітинах. У вакцину додавали як ад'ювант Монтанід ISA207VG. Зразки крові відбирали щотижня, починаючи від дня 0 і до дня 28. Моніторинг рівнів антитіл у сироватці здійснювали за допомогою призначеного для оцінки M. hyorhinis ELISA

фірми BIVI R&D і призначеного для оцінки *M. hyorhyniae* ELISA фірми IDEXX. Ніякий серологічний аналіз, придатний для оцінки *M. hyosynoviae*, не був відомий до моменту проведення даного експерименту.

Для *M. hyorhyniae* за допомогою ELISA продемонстрована сильна гуморальна імунна відповідь через 2 тижні після вакцинації (D14), при цьому 11/15 (73,3 %) були позитивними, а 15/15 (100 %) були позитивними до D21.

Для *M. hyorhyniae* за допомогою ELISA фірми IDEXX продемонстровано, що 4 свині були позитивними (S/P > 0,400) за антитілами до *M. hyorhyniae* в D0. Якщо цих чотирьох свиней виключити, то п'ять інших свиней виявилися сероконвертованими до *M. hyorhyniae* до D28. Три із цих п'яти свиней виявилися позитивними в D21.

Таблиця 6:

Отримані за допомогою ELISA результати для *M. hyorhyniae*

M. hyorhyniae, ELISA, середні співвідношення S/P у групі				
D0	D7	D14	D21	D28
0,043	0,050	0,406	0,873	0,866

Таблиця 7:

Отримані за допомогою ELISA фірми IDEXX результати для *M. hyorhyniae*

M. hyorhyniae, ELISA фірми IDEXX, середні співвідношення S/P у групі				
D0	D7	D14	D21	D28
0,294	0,255	0,259	0,287	0,421

Результати, отримані для *M. hyorhyniae*, свідчать про відсутність інтерференції з іншими фракціями у вакцині. Крім того, рівні антигену *M. hyorhyniae*, присутні в комбінованій вакцині, застосовуваній в даному експерименті, були достатніми для індукції гуморальної імунної відповіді, що піддається вимірюванню після введення однієї дози об'ємом 2 мл. Результати, отримані для *M. hyorhyniae*, свідчать про деяку сероконверсію. Можливо, що в наступних дослідженнях доцільно застосовувати в суміші більш високі рівні цієї фракції для збільшення сероконверсії. Таким чином, результати, що стосуються фракцією *M. hyorhyniae* і *M. hyorhyniae*, свідчать про відсутність інтерференції між цими видами.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- Імуногенна композиція, яка містить а) один або декілька антигенів мікоплазм із мікоплазматичних бактерій, вибраних із групи, яка складається з *M. hyorhyniae*, *M. hyorhyniae*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій; і б) один або декілька компонентів системи на основі еукаріотичних клітин, де один або декілька антигенів являють собою цільні інактивовані бактерини, і де вказана система на основі еукаріотичних клітин містить MDCK-клітини або McCoу-клітини або один або декілька їх компонентів.
- Імуногенна композиція за п. 1, у якій антиген мікоплазм являє собою антигени *M. hyorhyniae* або *M. hyorhyniae*.
- Імуногенна композиція за п. 1 або п. 2, у якій антиген мікоплазм являє собою антигени *M. hyorhyniae* і *M. hyorhyniae* або антигени *M. hyorhyniae* і *M. hyorhyniae*, і *M. hyosynoviae*.
- Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-3, де компоненти системи на основі еукаріотичних клітин включають сироватку.
- Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-4, де імуногенна композиція не містить свинячої сироватки.
- Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-5, де вказані компоненти еукаріотичних клітин приєднані до антигену мікоплазм.
- Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-6, у якій цільні інактивовані бактерини являють собою інактивовані формаліном бактерини.
- Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-7, де вказана імуногенна композиція має підвищену імуногенність в порівнянні з імуногенною композицією, що містить такий самий антиген мікоплазм, отриманий з мікоплазм, які культивували в безклітинній системі

культивування.

9. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 2-8, де імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyorhinis*, у суб'єкта, який потребує цього.

5 10. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 2-9, де імуногенна композиція має ефективність при лікуванні та/або профілактиці клінічних ознак, які викликаються *M. hyopneumoniae*, у суб'єкта, який потребує цього.

11. Імуногенна композиція за п. 9 або п. 10, де вказаний суб'єкт вибраний із групи, яка складається зі свиней, великої рогатої худоби, кішок і собак.

10 12. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-11, де вказана імуногенна композиція являє собою вакцину.

13. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-12, де імуногенна композиція включає фармацевтично прийнятний носій, або де імуногенна композиція включає ад'ювант, або де імуногенна композиція включає емульсію вода-в-маслі-у-воді або карбомер.

15 14. Застосування імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-13 для приготування лікарського засобу для імунізації суб'єкта.

15. Застосування за п. 14, де вказаного суб'єкта вибирають із групи, яка складається зі свиней, великої рогатої худоби, кішок і собак.

16. Застосування за п. 14 або п. 15, де імуногенну композицію вводять однократно.

20 17. Застосування за будь-яким з пп. 14-16, де вказане застосування приводить до поліпшення параметра ефективності, вибраного із групи, яка складається з укорочення тривалості бактеріємії й зменшення бактеріального навантаження, або їх комбінації, у порівнянні із суб'єктом з неімунізованої контрольної групи цього ж виду.

25 18. Застосування за будь-яким з пп. 14-17, де зазначене застосування є придатним для суб'єкта віком три тижні або старше.

19. Застосування імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-13 для лікування та/або профілактики мікоплазматичних інфекцій у суб'єктів.

20. Застосування імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-13 для приготування лікарського засобу для лікування та/або профілактики мікоплазматичних інфекцій у суб'єкта.

30

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601