



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121193** (13) **C2**
(51) МПК

C12R 1/35 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
C07K 14/30 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2015 07463</p> <p>(22) Дата подання заявки: 20.12.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 27.04.2020</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/746,997</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 28.12.2012</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.11.2015, Бюл.№ 21</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.04.2020, Бюл.№ 8</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2013/076807, 20.12.2013</p> <p>(72) Винахідник(и): Джордан Дайана М. Мерфі (US), Мартінсон Брайан Томас (US), Мюленталер Крістін Маргарет (US), Нойбауер Аксель (US), Айер Арун В. (US)</p>	<p>(73) Власник(и): БЬОРІНГЕР ІНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДІКА ГМБХ, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany (DE)</p> <p>(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: GB 1137306 A, 18.12.1968 Volokhov D.V. et al: "Biological Enrichment of Mycoplasma Agents by Cocultivation with Permissive Cell Cultures", Applied and environmental microbiology, vol. 74, no. 17, 01.09.2008, P. 5383-5391 GB 1074920 A, 05.07.1967 EP1260581 A1, 27.11.2002 EP 1862537 A1, 05.12.2007 Mochizuki et al: "Growth characteristics of canine pathogenic viruses in MDCK cells cultured in RPMI 1640 medium without animal protein", Vaccine, Elsevier LTD, GB, vol. 24, no. 11, 10.03.2006, P. 1744-1748 Gaush C.R. et al: "Characterization Of An Established Line Of Canine Kidney Cells (MDCK)", Proceedings of the society for experimental Biology & Medicine, Academic Press INC. New York, US, vol. 122, no. 3, 01.07.1966, P.931-935 Okada M et al: "Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with Mycoplasma hyopneumoniae inactivated vaccine prepared from broth culture supernate", Vaccine, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 18, no. 25, 01.06.2000, P. 2825-2831 US 2005037027 A1, 17.02.2005</p>
--	---

UA 121193 C2

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОГЕННОЇ КОМПОЗИЦІЇ ПРОТИ МІКОПЛАЗМИ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, у суб'єкта, що включає культивування мікоплазматичних бактерій, які вибирають з групи *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* і *M. hyosynoviae*, у системі на основі еукаріотичних клітин MDCK або McCoy із зниженим вмістом сироватки та одержання антигену мікоплазматичних бактерій, де антиген являє собою повний інактивований бактерин, і додавання фармацевтично прийнятного носія.

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 волосяний 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 мононуклеарних 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/мигдалини, 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. Мікоплазматичні бактерії 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. Однак необхідні високі виходи мікоплазм, необхідні для приготування вакцин, одержують шляхом культивування, як правило, тільки в комплексних середовищах [Kobisch M. і Friis N.F., Swine mycoplasmoses, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1996, стор. 1569-1605; Gabridge M.G. і ін., Cultivation of mycoplasma in a modified tissue culture medium, Applied and Environmental microbiology. 31, 1976, стор. 986-989; Sotoodehnia A. і ін., Preparation of agalactia vaccine in fermentor, Archives of razi institute, 62, 207, стор. 45-48; Dahlia і ін., Isolation of *Mycoplasma hyosynoviae* from pneumonic lung of swine, Tropical Biomedicine 26, 2009, стор. 341-345]. Залежно від мікоплазматичних бактерій, які підлягають культивуванню, комплексні середовища доповнюють 10-30 % сироватки й іноді дріжджовим екстрактом. Таким чином, через високу

вартість сироватки культивування мікоплазматичних бактерій є дорогим. Крім того, зниження сироватки в комплексних середовищах повинне бути також сприятливим з позицій загального стану здоров'я тварин. Таким чином, існує необхідність у культивуванні з одержанням необхідних високих виходів мікоплазм у системі культивування із зниженим вмістом сироватки для одержання імуногенних композицій, ефективних відносно попередження інфекції, яка викликається мікоплазмами. Крім того, специфічні для свиней мікоплазматичні бактерії, як правило, культивують у комплексних середовищах, що містять специфічну для свиней сироватку [Kobisch M. i Friis N.F., Swine mycoplasmoses, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1996, стор. 1569-1605]. Однак специфічна для свиней сироватка може містити інші специфічні для свиней патогени або може містити антитіла проти специфічних для свиней патогенів, що може приводити до зниженої імуногенності отриманої імуногенної композиції. Таким чином, існує необхідність у культивуванні з одержанням необхідних високих рівнів мікоплазм у системі культивування, що не містить свинячу сироватку для одержання імуногенних композицій, ефективних відносно попередження інфекції, яка викликається мікоплазмами.

Опис винаходу

Перед описом об'єктів даного винаходу слід зазначити, що в контексті даного опису й у доданій 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, у даному винаході запропонований спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики в суб'єкта інфекцій, які викликаються мікоплазмами, який полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій і в) додають фармацевтично прийнятний носій.

Цінним є те, згідно із представленими в описі даного винаходу експериментальними даними, мікоплазматичні бактерії можна одержувати в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки.

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 активацію 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 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".

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 "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 в 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.

Переважаю 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, хахексію, 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.

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

Поняття "мікоплазми" відоме фахівцеві 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. Ізоляти *Mycoplasma bovis* добре відомі фахівцеві в даній галузі й деякі ізоляти депоновані, наприклад, в Американській колекції тканинних культур під реєстраційними номерами ATCC 25025, ATCC 25523 і ATCC 27368.

Поняття "культивування" відоме фахівцеві 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 фахівцеві 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. Переважні вказані клітини-хазяї являють собою еукаріотичні клітини або систему на основі еукаріотичних клітин.

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. Еукаріотичні клітини-хазяї, які можна застосовувати для втілення на практиці способу, представленого в даному описі, включають (але, не обмежуючись тільки ними) клітини Мадин-Дарбі епітелію нирки собаки (MDCK) (наприклад, клітини Мадин-Дарбі епітелію нирки собаки, депоновані в Американській колекції тканинних культур під реєстраційним номером ATCC CCL-34 або ATCC CRL-2285) або клітини McCoy (наприклад, депоновані в Американській колекції тканинних культур під реєстраційним номером ATCC CRL-1696).

Поняття "безклітинна система культивування" у контексті даного опису стосується системи культивування, яка не містить ніяких клітин, крім 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.

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. Зараження еукаріотичних клітин мікоплазматичними бактеріями й умови постінкубаційного періоду добре відомі фахівцям 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 CO₂, 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, і зміна кольору середовища через зміну pH.

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

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.

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.

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 80 %, переважно 80 %-90 %, більш переважно 90 %-97 %, найбільш переважно більше 97 % аж до абсолютно чистотою форми без будь-якого забруднення.

5 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.

Для цілей даного винаходу можна використовувати будь-який загальноприйнятий 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 гідроброміду 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.

15 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.

20

Згідно з наступним об'єктом винаходу запропонований 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.

25

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому імуногенна композиція являє собою мікоплазматичну імуногенну композицію.

30

Відповідно до одного з об'єктів даного винаходу сироватка, яку застосовують для культивування мікоплазматичних бактерій, вільна від свинячої сироватки. Поняття "вільна від свинячої сироватки" означає, що свинячу сироватку не додають під час процесу культивування мікоплазматичних бактерій у систему на основі еукаріотичних клітин.

35

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому сироватка вільна від свинячої сироватки. Згідно із ще одним об'єктом винаходу всі мікоплазматичні антигени одержують у системі на основі еукаріотичних клітин, вільної від свинячої сироватки.

40

Згідно з наступним об'єктом винаходу культивування мікоплазматичних бактерій здійснюють без сироватки. Це означає, що ніяку сироватку не додають у процесі культивування мікоплазматичних бактерій у системі на основі еукаріотичних клітин. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин без сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Згідно із ще одним об'єктом винаходу всі мікоплазматичні антигени одержують без сироватки.

45

В одному з об'єктів даного винаходу антиген(и) мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі антигени мікоплазм може (уть) являти собою повністю інактивований мікоплазматичний бактерин.

50

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції,

55

60

призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому антиген мікоплазм являє собою цільний інактивований бактерин. Згідно з наступним об'єктом винаходу всі мікоплазматичні антигени в імуногенній композиції являють собою цільні інактивовані бактерини. Інактивовані мікоплазматичні антигени можна одержувати таким чином, щоб стадія б) описаного вище способу включала стадію інактивації. Таким чином, наступним об'єктом даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій і інактивують мікоплазматичний антиген; і в) додають фармацевтично прийнятний носій.

Цільний інактивований бактерин можна одержувати шляхом інактивації повних мікоплазматичних бактерій за допомогою описаних вище методів. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій і інактивують мікоплазматичні антигени; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому мікоплазматичні антигени являють собою цільні мікоплазматичні бактерії.

Переважно мікоплазматичні бактерії інактивують формаліном відповідно до описаного вище методу. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій і інактивують мікоплазматичні антигени формаліном; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому мікоплазматичні антигени являють собою цільні мікоплазматичні бактерії. Переважно формалін застосовують у вказаних вище концентраціях.

В одному з об'єктів даного винаходу система на основі еукаріотичних клітин містить клітинну лінію MDCK. Клітинну лінію MDCK (наприклад, клітини Мадін-Дарбі епітелію нирки собаки) одержували з ниркової тканини дорослої самки кокер-спанієля. У цілому, клітини лінії MDCK відомі фахівцям в даній галузі. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій і інактивують мікоплазматичні антигени формаліном; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому система на основі еукаріотичних клітин містить клітинну лінію MDCK. І в цьому варіанті мікоплазматичний антиген може являти собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном.

У наступному об'єкті даного винаходу система на основі еукаріотичних клітин містить клітинну лінію McCoу. Клітинна лінія McCoу відома фахівцям в даній галузі. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій і інактивують мікоплазматичні антигени формаліном; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому система на основі еукаріотичних клітин містить клітинну лінію McCoу. І в цьому варіанті мікоплазматичний антиген може являти собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном.

В одному з об'єктів даного винаходу мікоплазматичні бактерії вибирають із групи, яка складається з: *M. hyorheumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* і *M. bovis*. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому

мікоплазматичні бактерії вибирають із групи, яка складається з: *M. hyorheumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* і *M. bovis*. Переважно мікоплазматичний антиген може являти собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою

5

цільний інактивований бактерин.

У наступному об'єкті даного винаходу мікоплазматичні бактерії вибирають із групи, яка складається з: *M. hyorheumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому мікоплазматичні бактерії вибирають із групи, яка складається з: *M. hyorheumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій. Переважно мікоплазматичний антиген може являти собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

10

15

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують бактерії *M. hyorheumoniae* у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген бактерій *M. hyorheumoniae*; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Переважно антиген *M. hyorheumoniae* може являти собою цільний інактивований бактерин *M. hyorheumoniae*, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі антигени *M. hyorheumoniae* може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин *M. hyorheumoniae*.

20

25

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують бактерії *M. hyorhinis* у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген бактерій *M. hyorhinis*; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Переважно антиген *M. hyorhinis* може являти собою цільний інактивований бактерин *M. hyorhinis*, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі антигени *M. hyorhinis* може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин *M. hyorhinis*.

30

35

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують бактерії *M. hyosynoviae* у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген бактерій *M. hyosynoviae*; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Переважно антиген *M. hyosynoviae* може являти собою цільний інактивований бактерин *M. hyosynoviae*, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі антигени *M. hyosynoviae* може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин *M. hyosynoviae*.

40

Згідно з наступного об'єкту винаходу імуногенна композиція містить антиген мікоплазм, вибраних із групи, яка складається з: *M. hyorheumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* і будь-яких їх комбінацій. Принаймні бактерії одного з видів мікоплазм, вказаних вище (наприклад, *M. hyorheumoniae* або *M. hyorhinis*, або *M. hyosynoviae*), які застосовують для одержання імуногенної композиції на основі мікоплазм, культивують згідно із даним винаходом в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки. Переважно всі мікоплазматичні бактерії, які застосовують для одержання імуногенної композиції на основі мікоплазм, культивують згідно із даним винаходом в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки.

45

50

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, яка містить антиген мікоплазм *M. hyorheumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* та/або будь-які комбінації вказаних антигенів, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують принаймні одну бактерію, вибрану із групи, яка складається з *M. hyorheumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae*, у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Переважно всі мікоплазматичні бактерії культивують у запропонованій у винаході системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої

55

60

сироватки. Переважно принаймні один антиген(и) мікоплазм представляє (ють) собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі антигени мікоплазм може (уть) являти собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин.

5 Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імунотенної композиції, яка містить антиген мікоплазм *M. hyorhynis*, *M. hyosynoviae* та/або будь-які комбінації вказаних антигенів, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують принаймні бактерії *M. hyorhynis* у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Переважно все бактерії *M. hyorhynis* культивують у запропонованій у винаході системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки. Переважно принаймні один з антигенів *M. hyorhynis* являє собою цільний інактивований бактерин *M. hyorhynis*, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі антигени *M. hyorhynis* може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

20 Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імунотенної композиції, яка містить антиген мікоплазм *M. hyorhynis*, *M. hyosynoviae* та/або будь-які комбінації вказаних антигенів, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують принаймні бактерії *M. hyorhynis* у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Переважно все бактерії *M. hyorhynis* культивують у запропонованій у винаході системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки. Переважно принаймні один з антигенів *M. hyorhynis* являє собою цільний інактивований бактерин *M. hyorhynis*, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі антигени *M. hyorhynis* може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

30 Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імунотенної композиції, яка містить антиген мікоплазм *M. hyorhynis*, *M. hyosynoviae* та/або будь-які комбінації вказаних антигенів, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують принаймні бактерії *M. hyosynoviae* у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Переважно все бактерії *M. hyosynoviae* культивують у запропонованій у винаході системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки. Переважно принаймні один з антигенів *M. hyosynoviae* являє собою цільний інактивований бактерин *M. hyosynoviae*, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі антигени *M. hyosynoviae* може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

40 В одному з об'єктів даного винаходу імунотенну композицію готують у вигляді форми для однодозового застосування. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імунотенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому імунотенну композицію готують у вигляді форми для однодозового застосування. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

50 Важливо відзначити, що експериментальні дані, представлені в описі даного винаходу, продемонстрували, що введення однієї дози імунотенної композиції, запропонованої в даному винаході, вірогідно й ефективно стимулювало захисну імунну відповідь. Зокрема, гуморальна імунна відповідь, що піддається вимірюванню, продемонстрована для *M. hyorhynis* і *M. hyosynoviae*.

Поняття "суб'єкт" 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 (корова), а також переважно людини.

60 В одному з об'єктів даного винаходу суб'єкт являє собою свиню. Таким чином, одним з

об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому суб'єкт являє собою свиню. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивованій мікоплазматичний бактерин, переважно інактивованій формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивованій бактерин.

В одному з об'єктів даного винаходу суб'єкт являє собою корову. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому суб'єкт являє собою корову. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивованій мікоплазматичний бактерин, переважно інактивованій формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивованій бактерин.

В одному з об'єктів даного винаходу суб'єкт являє собою кішку. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому суб'єкт являє собою кішку. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивованій мікоплазматичний бактерин, переважно інактивованій формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивованій бактерин.

В одному з об'єктів даного винаходу суб'єкт являє собою собаку. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому суб'єкт являє собою собаку. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивованій мікоплазматичний бактерин, переважно інактивованій формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивованій бактерин.

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 фармацевтично прийнятний носій являє собою ад'ювант.

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, Емеривіл, шт. Каліфорнія), монофосфорил-ліпід А, ад'ювант авридин ліпід-амін, 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 імуногенна, імунологічна композиція або композиція вакцини.

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 (Pharmecopora, 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 аліллпентаеритритом. 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.

У переважному варіанті здійснення винаходу ад'ювант вибирають 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-ліпиду А, авридин ліпід-аміну, термолабільного ентеротоксину з *E. coli* (рекомбінантного або іншого), холерного токсину, IMS 1314, мураміддипептиду і їх комбінацій.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому фармацевтично прийнятний носій являє собою ад'ювант. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

В одному з об'єктів даного винаходу фармацевтично прийнятний носій являє собою емульсію вода-в-маслі-у воді або карбомер. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому фармацевтично прийнятний носій являє собою емульсію вода-в-маслі-у воді або карбомер. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно

інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

В одному з об'єктів даного винаходу емульсія вода-в-маслі-в-воді являє собою Монтанід ISA207 VG. Монтанід ISA207 VG є ад'ювантом, який складається зі складних олеїнових ефірів безводного маніту в розчині немінерального масла, і його створюють для одержання вакцин у вигляді емульсій типу вода-в-маслі-в-воді. Ад'ювант Монтанід ISA207 VG добре відомий фахівцям в даній галузі і його можна застосовувати без додаткових досліджень.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, в суб'єкта, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому фармацевтично прийнятний носій являє собою Монтанід ISA207 VG або CARBOPOL®. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

Даний винахід стосується також описаного вище способу, призначеного для підвищення імуногенності мікоплазматичного антигену. Цінним є те, згідно із представленими в описі даного винаходу експериментальними даними антигени мікоплазматичних бактерій, отримані описаним вище способом, мають підвищену імуногенність в порівнянні з антигенами, отриманими з мікоплазматичних бактерій, які культивували в безклітинній системі культивування. Зокрема, отримані на основі MDCK, що включають M. hyorhinis вакцини характеризуються більш раннім початком сероконверсії, більшою кількістю серопозитивних свиней і більш високими серологічними титрами

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб підвищення імуногенності антигену, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

В одному з об'єктів даного винаходу антиген має підвищену імуногенність в порівнянні з антигеном, отриманим з мікоплазматичних бактерій, культивованих у безклітинній системі культивування. Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є спосіб підвищення імуногенності антигену, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якому імуногенна композиція має підвищену імуногенність в порівнянні з імуногенною композицією, яка містить такий же антиген, отриманий з мікоплазматичних бактерій, культивованих в безклітинній системі культивування. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

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 культивування.

Поняття "підвищений" означає, що клітинну та/або гуморальну імунну відповідь підвищують 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. Фахівцям в даній галузі повинно бути очевидно, як оцінювати 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 корові моделі або створеної на свинях моделі. При цьому аналізи, описані в прикладі 4 і 5, можна застосовувати як референс-аналізи для виявлення імунної відповіді проти *M. hyorhinis* і *M. hyopneumoniae*.

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 повний інактивованим бактерин *M. hyorhinis*, то поняття "такий же антиген" означає, що антиген мікоплазм, отриманий у безклітинній системі, являє собою також повний інактивованим 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.

Поняття "контрольна (референс)" імуногенна композиція стосується імуногенної композиції, не отриманої шляхом культивування мікоплазматичних бактерій у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки, запропонованої в даному винаході.

Більш строго, поняття "контрольна (референс)" імуногенна композиція стосується імуногенної композиції, отриманої шляхом культивування мікоплазматичних бактерій у безклітинній системі культивування, доповненою сироваткою, з використанням такого ж антигену. Культивування мікоплазматичних бактерій у безклітинній системі культивування, доповненою сироваткою, добре відоме фахівцям в даній галузі. Джерело сироватки й концентрація сироватки залежить від мікоплазматичних бактерій, які підлягають культивуванню, і необхідних виходів мікоплазматичних бактерій. *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* і *M. hyosynoviae*, як правило, культують у безклітинній системі культивування, доповненій 10-20 об. % свинячої сироватки й 5-10 об. % дріжджового екстракту з одержанням високих виходів. Однак, як повинно бути очевидно, концентрації сироватки можна варіювати, дріжджовий екстракт можна не застосовувати й сироватку можна одержувати з іншого джерела, наприклад, застосовувати сироватку плода корови або т.п.

У даному винаході запропоновані не тільки вказані вище способи одержання імуногенних композицій або способи підвищення імуногенності антигену, то також і імуногенна композиція, яку можна одержувати описаними вище способами. Таким чином, наступним об'єктом даного винаходу є імуногенна композиція, яку можна одержувати способом, запропонованим у винаході й представленим у даному описі. У цілому, вказаний спосіб полягає в тому, що а) культують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивованим мікоплазматичний бактерин, переважно інактивованим формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивованим бактерин.

Одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, що відрізняється підвищеною імуногенністю в порівнянні з контрольною імуногенною композицією, що містить антиген, де антиген контрольної імуногенної композиції одержують із мікоплазматичних бактерій, культивованих у безклітинній системі.

Таким чином, наступним об'єктом даного винаходу є імуногенна композиція, яку можна одержувати способом, що полягає в тому, що а) культують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій. Згідно з іншим об'єктом винаходу вказана імуногенна композиція відрізняється підвищеною імуногенністю в порівнянні з контрольною імуногенною композицією, що містить такий же антиген, отриманий з мікоплазматичних бактерій, культивованих у безклітинній системі. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивованим

мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

У наступному об'єкті винаходу 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 в імуногенній композиції можуть або знаходитися окремо один від одного, або бути приєднані один до одного, або знаходитися у вигляді комбінації вказаних положень.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яку можна одержувати способом, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, де імуногенна композиція містить компоненти еукаріотичних клітин із вказаної системи на основі еукаріотичних клітин. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивований мікоплазматичний бактерин, переважно інактивований формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивований бактерин.

У наступному об'єкті винаходу 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. Так, 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(ами) мікоплазм. Вказане зшивання можна одержувати декількома методами, добре відомими фахівцеві в даній галузі, наприклад, шляхом обробки формальдегідом і т.п.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є імуногенна композиція, яку можна одержувати способом, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, у якій вказані компоненти еукаріотичних клітин приєднані до антигену мікоплазм.

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 інактивований 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, одним з об'єктів даного винаходу спосіб одержання імуногенної композиції, що полягає в тому, що а) культивують мікоплазматичні бактерії в системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки або без свинячої сироватки; б) одержують антиген

мікоплазматичних бактерій; і в) додають фармацевтично прийнятний носій, де імуногенна композиція містить від приблизно 10^3 до приблизно 10^{10} колонієутворюючих одиниць (КУО) бактеріального антигену на дозу. Переважно принаймні один з антигенів мікоплазм являє собою цільний інактивованим мікоплазматичний бактерин, переважно інактивованим формаліном. Слід розуміти, що тільки один, декілька або всі мікоплазматичні антигени може (уть) являти собою цільний інактивованим бактерин.

Фахівцєві в даній галузі повинно бути очевидно, що різні стадії процесів, що входять у способи одержання імуногенної композиції, представленої в даному описі, можна поєднувати при втіленні на практиці винаходу, представленогo в даному описі.

Приклади

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

Приклад 1

Культивування мікоплазматичних бактерій в MDCK-клітинах або McCoу-клітині відповідно

A. 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 MEM+5 % FBS. Колби інкубували при 37°C+5 % CO₂ до досягнення моношаром конфлюентності приблизно 95-100 %. Середовище відкидали, колби промивали двічі 1-кратним ЗФР. Потім у кожную 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 кожную колбу додавали середовище для інфікування (MEM+2 % FBS), попередньо нагріте приблизно до 37°C, у кількості, достатній до досягнення об'єму в кожній колбі 60 мл. 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 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 характеризувалася ЦПД, тому зміна кольору й каламутності середовища були індикатором, що має вирішальне значення, для пересівання з одержанням наступного пасажу.

M. hyopneumoniae

M. hyopneumoniae культивували також як *M. hyorhinis*. Залежно від застосовуваногo 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 % CO₂ 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 їх кількості.

M. hyosynoviae

M. hyosynoviae культивували в такий же спосіб, як і *M. hyorhinis*. 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 % CO₂ 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, як і *M. hyorhinis* і *M. hyosynoviae*. 500 мл клітин з концентрацією 105-106 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 % CO₂ на магнітній мішалці протягом

приблизно 2 тижнів. Для оцінки росту можна застосовувати як визначення зміни pH, так і оцінку підвищення каламутності, додатково до аналізів БОЕ для оцінки кількості.

В. Культивування різних видів мікоплазм із різними типами сироватки

Для вирішення питання про те, чи можна культивувати види мікоплазм із використанням сироватки від різних видів, 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 культивували *M. hyorhinis* в MDCK-клітинах відповідно до описаного вище методу (тобто застосовували 5 % сироватки для вирощування клітин і 2 % сироватки для зараження). *M. hyorhinis* збирали через 4 дня після зараження згідно зі стандартним методом. Аналіз ССУ (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)	ССУ ₅₀ (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 ССУ, 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 типу застосовуваної для культивування сироватки.

Приклад 2

Приготування вакцин

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. 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.

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

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 немедицинний 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.

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

M. hyorhinis:

Нормальним поросятam віком 6 тижнів ± 5 днів вводили внутрішньом'язово дозу об'ємом 2 мл (7,1-7,3 log₁₀ ССУ/дозу) у день 0 (DO) і знову в день 21 (D21) вакцини на основі *M. hyorhinis*. *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 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 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
M.hyorhinis MDCK + Монтанід ISA207VG	0,00	0,003	0,043	0,972	1,123	1,340	1,152	1,133
M.hyorhinis MDCK + CARBOPOL®	0,002	0,018	0,059	0,095	0,122	0,354	0,375	0,409
Плацебо (ЗФР)	0,001	0,005	0,011	0,015	0,021	0,031	0,057	0,070

Аналогічні результати, що стосуються гуморальної імунної відповіді після вакцинації, одержували при культивуванні M.hyorhinis в McCoу-клітинах (дані не представлені). Аналогічні результати одержували після односторової обробки (дані не представлені).

M. hyorhneumoniae

Усім нормальним поросятam віком 6 тижнів \pm 5 днів вводили внутрішньом'язово дозу об'ємом 2 мл (8,0-8,5 log₁₀ CCU/дозу) в D0 і знову в D21 вакцину на основі M. hyorhneumoniae. 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. hyorhneumoniae. В одному із прикладів застосовували набір, що продається, для ELISA фірми IDEXX. При застосуванні ELISA фірми IDEXX співвідношення S/P > 0,400 розглядали як позитивне.

Як продемонстровано в таблиці 3, за даними ELISA M. hyorhneumoniae викликала сильну гуморальну імунну відповідь. 3 вакцинованих M. hyorhneumoniae 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. hyorhneumoniae

	До вакцинації	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
M. hyorhneumoniae 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 \pm 5 днів розділяли на 6 груп. Кожну із груп V1 і V2 обробляли інактивованим ізолятом M. hyorhinis, 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. hyorhinis, який культивували в MDCK-середовищу й CM відповідно. В усі вакцини як ад'ювант додавали Монтанід ISA207VG; доза й шлях відповідали схемі 2x2 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 свиней у групах V1-V4 і СС піддавали контрольному зараженню вірулентним ізолятом *M. hyorhinis*. 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. hyorhinis* ELISA. При застосуванні ELISA фірми R&D співвідношення S/P > 0,200 розглядали як позитивне. У наведеному як приклад експерименті, результати якого представлено в таблиці 4, усі свині в SC-групі залишалися негативними протягом експерименту, що свідчило про відсутність експозиції *M. hyorhinis*. Групи V I-V4 і СС були негативними в D0 і 7. Однак серологічні результати варіювалися в значній мірі між вакцинами на основі СМ і на основі MDCK. У порівнянні з вакцинами на основі СМ 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. hyorhinis*

M. hyorhinis, 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.

M. 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.

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".

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 ≥ 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 (невакцинованій) групі й групі "СМ+1:100" (відповідь у групі, обробленій "СМ+1:100", або її відсутність виявилися еквівалентними з відповіддю в невакцинованих тварин). 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.

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
CM + ISA "повний»	0,002	0,009	0,011	0,034	0,190	0,163	0,190
CM + ISA 1:10	-0,001	0,017	0,003	0,014	0,114	0,132	0,176
CM + ISA 1:100	-0,002	0,000	-0,002	0,001	0,019	0,043	0,093
Плацебо: ЗФР + 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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб одержання імуногенної композиції, призначеної для лікування та/або профілактики інфекцій, які викликаються мікоплазмами, у суб'єкта, що включає
 - а) культивування мікоплазматичних бактерій, які вибирають з групи, що складається з: *M. hyorhyniae*, *M. hyorhinis* і *M. hyosynoviae*, у системі на основі еукаріотичних клітин із зниженим вмістом сироватки, де вказана система містить клітинну лінію MDCK або McCoу;
 - б) одержання антигену мікоплазматичних бактерій, де антиген являє собою повний інактивованій бактерин, і
 - в) додавання фармацевтично прийнятного носія.
2. Спосіб за п. 1, у якому сироватка вільна від свинячої сироватки.
3. Спосіб за п. 1, у якому мікоплазматичні бактерії культивують у відсутності сироватки.
4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, у якому імуногенна композиція являє собою імуногенну композицію на основі мікоплазм.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, у якому антиген має підвищену імуногенність в порівнянні з антигеном, отриманим з мікоплазматичних бактерій, культивованих у безклітинній системі культивування.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, у якому повний інактивованій бактерин являє собою інактивованій формаліном бактерин.
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, у якому вказану імуногенну композицію готують у вигляді форми для однодозового введення.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому вказаний суб'єкт являє собою свиню.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому суб'єкт являє собою корову.
10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому суб'єкт являє собою кішку.
11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому суб'єкт являє собою собаку.
12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, у якому вказаний 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.
13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, у якому вказаний фармацевтично прийнятний носій являє собою ад'ювант, вибраний із групи, яка складається з гідроксиду алюмінію, фосфату алюмінію, сапонінів, емульсії вода-у-маслі, емульсії масло-у-воді, емульсії вода-у-маслі-у-воді, полімерів акрилової або метакрилової кислоти, співполімерів малеїнового ангідриду й алкенільного похідного, ад'ювантної системи RIBI, блок-співполімеру, SAF-M, монофосфорил-ліпиду А, авридин ліпід-аміну, термолабільного ентеротоксину з *E. coli* (рекомбінантного або іншого), холерного токсину, IMS 1314, мураміддипептиду і їх комбінацій.
14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, у якому вказаний фармацевтично прийнятний носій являє собою емульсію вода-у-маслі-у воді або карбомер.
15. Спосіб за будь-яким з пп. 1-14, призначений для підвищення імуногенності антигену.
16. Спосіб за п. 15, у якому антиген має підвищену імуногенність в порівнянні з антигеном, отриманим з мікоплазматичних бактерій, які культивували в безклітинній системі культивування.
17. Імуногенна композиція, яку можна одержувати способом за будь-яким з пп. 1-16.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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