

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения заболевания или нарушения у животного, вызванного *Mycoplasma hyopneumoniae* (М. хуо) инфекцией, при котором животному однократно вводят эффективную дозу вакцины на основе *Mycoplasma hyopneumoniae*, причем возраст животного составляет приблизительно от 3 до 10 суток, а доза вакцины содержит по меньшей мере 1×10^8 единиц изменения цвета (CCU). М. хуо вакцина может представлять собой инактивированный или модифицированный живой препарат на основе целых клеток или их частей, субъединичные вакцины или вакцину на основе нуклеиновых кислот или ДНК. М. хуо вакцина, вводимая в соответствии с настоящим изобретением, может быть получена синтетическим или рекомбинантным путем.

Предшествующий уровень техники

М. хуо представляет собой бактериальный патоген, который вызывает энзоотическую пневмонию у свиней. Энзоотическая пневмония является хроническим заболеванием, которое приводит к плохому перевариванию пищи, задержке роста и предрасположенности к вторичным легочным инфекциям. М. хуо легко передается через выделения из респираторного тракта и путем передачи от свиноматки поросят и широко распространен на свинофермах. Приблизительно 99% стад свиней в США инфицированы, что обходится свиноводческой индустрии приблизительно в 300 млн долларов в год.

Большинство известных вакцин против М. хуо основаны на препаратах из инактивированных целых клеток М. хуо с адъювантом. Кроме того, вакцины, основанные на иммуногенных полипептидах или белках, можно синтезировать или получить путем клонирования и рекомбинантной экспрессии М. хуо генов. М. хуо гены, способные экспрессировать такие полипептиды или белки *in vivo*, также можно применять в качестве вакцин.

Примеры М. хуо вакцин на основе инактивированных целых клеток включают в себя RESPISURE и STELLAMUNE, имеющиеся в продаже у Pfizer Inc., USA.

Кроме того, описаны некоторые рекомбинантно получаемые иммуногенные полипептиды и белки М. хуо, которые могут быть полезны в качестве субъединичных вакцин. В международной публикации WO 96/28472 описаны шесть видов белковых антигенов М. хуо с молекулярными массами 46-48, 52-54, 60-64, 72-75, 90-94 и 110-114 кДа и описаны частичные белковые последовательности антигенов массой 52-54, 60-64 и 72-75 кДа и полная нуклеотидная и аминокислотная последовательности антигена массой 46-48 кДа.

Клонирование гена, кодирующего М. хуо белок P46, то есть p46, также описано Futo et al. (1995; J. Bacteriol. 177: 1915-1917). Та же группа исследователей показала, что *in vitro* экспрессируемый генный продукт являлся полезным при диагностике ответов антител на М. хуо инфекции без перекрестной реактивности к другим видам *Mycoplasma* (Futo et al., J. Clin. Microbiol. 33: 680-683). Последовательности и применения в диагностике p46 гена, описанные Futo et al., дополнительно раскрыты в публикации европейского патента № 0475185 A1.

Wise and Kim (1987, J. Bacteriol., 169: 5546-5555) сообщают, что существуют четыре вида интегральных мембранных белков М. хуо, а именно p70, p65 (P65, выше), p50 и p44, и что последние три модифицированы путем ковалентных присоединений липидов и вызывают сильный гуморальный иммунный ответ. Защитные действия иммунного ответа не были исследованы. Ген, кодирующий P65 белок, клонировали, и его последовательности и применения в вакцинах и диагностике описаны в патенте США № 5788962.

В международной публикации WO 91/15593 описаны пять белков М. хуо с кажущимися молекулярными массами 105, 90, 85, 70 и 43 кДа. Была предложена полная последовательность гена, кодирующего белок массой 85 кДа (белок C), а также частичные нуклеотидные последовательности, кодирующие другие четыре белка.

Патент США № 5252328, выданный Faulds, раскрывает аминоконцевые последовательности иммунореактивных М. хуо белков с молекулярной массой 36, 41, 44, 48, 64, 68, 74,5, 79, 88,5, 96 и 121 кДа. Другие белки, идентифицированные на основе электрофоретических подвижностей, но для которых не были описаны белковые последовательности, имели кажущиеся молекулярные массы 22,5, 34 и 52 кДа. Хотя в патенте США № 5252328 предложено применение этих белков в вакцинных препаратах, не было представлено результатов испытаний вакцин.

В международной публикации WO 95/09870 раскрыты биохимические способы очистки М. хуо адгезинов, микоплазменных интегральных мембранных белков, ответственных за адгезию к ресничкам эпителия верхних дыхательных путей хозяина. В WO 95/09870 также предложены анализы и применения этих белков, например в вакцинах и диагностике.

В исследовании King et al. (1997; Vaccine 15: 25-35) раскрыт Mhp1, адгезин массой 124 кДа, который является штаммовой разновидностью P97.

Вариант P97 массой 94 кДа был идентифицирован Wilton et al. (1998, Microbiology 144: 1931-1943). Кроме того, было показано, что ген p97 является частью оперона, который также кодирует второй белок, а именно P102, с предполагаемой молекулярной массой приблизительно 102 кДа (Hsu et al., 1998, Gene 214: 13-23). Minion and Hsu предложили применение P102 в вакцинах в международной публикации WO 99/26664, но не сообщили об испытаниях вакцин.

Ни одна из известных *M. hyo* вакцин не была описана как эффективная при лечении свиней в возрасте приблизительно от 3 до 10 суток однократной дозой. Такая вакцина позволит избежать необходимости многократного введения доз и, следовательно, значительно снизит стоимость и трудозатраты, связанные с массовой вакцинацией свиных стад во всем мире. Таким образом, существует потребность в эффективной *M. hyo* вакцине, которую можно вводить поросят путем однократной вакцинации в возрасте от приблизительно 3 до приблизительно 10 суток для защиты и предупреждения заболеваний или нарушений, вызываемых *M. hyo*.

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно настоящему изобретению предложен способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения у животного, вызванного инфекцией *Mycoplasma hyopneumoniae*, при котором животному однократно вводят эффективную дозу вакцины на основе *Mycoplasma hyopneumoniae*, причем возраст животного составляет приблизительно от 3 до 10 суток, а доза вакцины содержит по меньшей мере 1×10^8 единиц изменения цвета (CCU).

В одном из воплощений изобретения вакцина представляет собой инаktivированный препарат из целых клеток *Mycoplasma hyopneumoniae* или их частей.

Предпочтительно доза вакцины содержит от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 5×10^{10} CCU.

Предпочтительно количество указанной вводимой вакцины составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 3,0 мл.

Предпочтительно вакцинный препарат представляет собой RESPISURE-1.

В другом предпочтительном воплощении вакцинный препарат дополнительно содержит вирусный или бактериальный антиген, отличный от *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Предпочтительно вирусные или бактериальные антигены выбраны из группы, включающей антигены вируса гриппа свиней (SIV), вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (вируса, вызывающего PRRS или таинственную болезнь свиней), бактерий, вызывающих диарею после отъема от свиноматки (PWD), и бактерий, вызывающих пролиферативный энтерит свиней (PPE).

Предпочтительно вакцинный препарат вводят внутримышечно.

Предпочтительно способ по изобретению обеспечивает защиту животного до 25 недель после вакцинации.

Предпочтительно вакцина дополнительно содержит адъювант.

В другом предпочтительном воплощении вакцина представляет собой субъединичную вакцину.

Предпочтительно субъединичная вакцина содержит один или более иммуногенных полипептидов или белков *Mycoplasma hyopneumoniae* или иммуногенных фрагментов таких полипептидов или белков.

Более предпочтительно полипептиды или белки выбраны из группы, состоящей из P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

Еще в одном воплощении изобретения вакцина содержит генетический материал, обеспечивающий экспрессию *in vivo* одного или более иммуногенных полипептидов или белков *Mycoplasma hyopneumoniae* или иммуногенных фрагментов таких полипептидов или белков.

Предпочтительно генетический материал выбран из группы, включающей нуклеотидные последовательности, кодирующие P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

Способ по настоящему изобретению исключает необходимость дополнительного введения доз для того, чтобы вызвать и/или поддерживать иммунитет к *M. hyo*. Данный способ однократной вакцинации обеспечивает защиту как серонегативных, так и серопозитивных свиней при заражении вирулентным *M. hyo*. Способ по настоящему изобретению эффективен для лечения или предупреждения симптомов, вызываемых инфекцией *M. hyo*, включая, например, предупреждение или уменьшение поражений легких у свиней.

Подробное описание сущности изобретения

Настоящее изобретение включает в себя способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения у животного, вызванного инфекцией *Mycoplasma hyopneumoniae*, при котором животному однократно вводят эффективную дозу вакцины на основе *Mycoplasma hyopneumoniae*, причем возраст животного составляет приблизительно от 3 до 10 суток, а доза вакцины содержит по меньшей мере 1×10^8 единиц изменения цвета (CCU).

Способ однократной вакцинации по настоящему изобретению исключает необходимость введения дополнительных доз свинье для того, чтобы вызвать и/или поддерживать иммунитет к *M. hyo*.

Для ясности описания, а не в виде ограничения, подробное описание сущности изобретения разделено на следующие подразделы, которые описывают или иллюстрируют некоторые признаки, воплощения или применения данного изобретения.

В некоторых воплощениях вакцины, применяемые в способе по настоящему изобретению, содержат инаktivированный препарат на основе частей или целых клеток *M. hyo* (бактерин), или модифицированную живую вакцину и фармацевтически приемлемый носитель, или инаktivированный препарат на основе частей или целых клеток *M. hyo* (бактерин), или модифицированную живую вакцину и адъювант.

В других конкретных воплощениях вакцины, применяемые в способе по настоящему изобретению, содержат иммуногенный белок, или полипептид, или их фрагмент и фармацевтически приемлемый носи-

тель, или иммуногенный белок, или полипептид, или их фрагмент и адъювант.

Определения и сокращения

Термин "лечение или предупреждение" по отношению к *M. hyorheumoniae* инфекции при использовании здесь означает ингибирование репликации *M. hyorheumoniae* бактерии, ингибирование *M. hyorheumoniae* передачи или предотвращение укрепления *M. hyorheumoniae* в организме хозяина и облегчение симптомов заболевания или нарушения, вызванного *M. hyorheumoniae* инфекцией. Лечение считается лечебным, если происходит снижение бактериальной нагрузки, уменьшение легочных заболеваний и/или увеличение приема пищи и/или роста. Способ по настоящему изобретению является, например, эффективным в предупреждении или уменьшении поражений легких.

Термин "*M. hyo* вакцина" при использовании здесь относится к вакцине, пригодной для предупреждения или лечения нарушения или заболевания, вызванного инфекцией *M. hyo*. *M. hyo* вакцина может включать в себя любую вакцину, эффективную при лечении или предупреждении инфекции *M. hyo* у свиней. *M. hyo* вакцина, которую можно применять в настоящем изобретении, может включать в себя, например, препарат на основе целых клеток *M. hyo* или их частей, инактивированные или модифицированные живые вакцины, субъединичную вакцину, содержащую один или более полипептидов или белков, полученных из *M. hyo*, или иммуногенные фрагменты таких белков или полипептидов, или один или более *M. hyo* генов или нуклеиновых кислот, кодирующих один или более чем один полипептид или белок, получаемый из *M. hyo*, или их иммуногенные фрагменты, причем данные гены или нуклеиновые кислоты могут экспрессироваться *in vivo* у свиньи. *M. hyo* полипептиды, белки, иммуногенные фрагменты таких полипептидов и белков или *M. hyo* гены или нуклеиновые кислоты можно синтезировать или получать рекомбинантно, используя способы, известные в данной области техники. Предпочтительно *M. hyo* вакцина, используемая в способе по данному изобретению, представляет собой бактерин.

Термин "животное" при использовании здесь относится ко всем животным, не являющимся человеком, включая млекопитающих.

Термин "свинья" при использовании здесь относится к пороссятам, молодым свиньям, свиньям, свиноподобным, свиноматкам, свиньям до второй беременности, боровам, кабанам и членам семейства Suidae (свиные).

Предпочтительно способ по настоящему изобретению применяют для животных, которые являются млекопитающим, но не человеком; наиболее предпочтительно для свиньи.

Термин "бактерин" при использовании здесь, относится к препарату на основе инактивированных целых клеток *M. hyo* или их частей, пригодных для применения в качестве вакцины.

Термин "эффективное количество" относится к количеству *M. hyo* вакцины, достаточному, чтобы вызвать иммунный ответ у субъекта, которому ее вводят. Иммунный ответ может включать в себя, без ограничения, индукцию видового, клеточного и/или гуморального иммунитета.

Инактивированные (из целых клеток или их частей) и модифицированные живые вакцины

Способы получения традиционных инактивированных или модифицированных живых вакцин для применения в способе по настоящему изобретению известны в данной области техники.

M. hyo бактерины, которые можно применять в данном способе однократной вакцинации, можно получать из разных общедоступных источников. Например, *M. hyo* бактерии можно получать из *M. hyo* изолятов. Многочисленные *M. hyo* изоляты известны специалистам в данной области техники и имеются, например, в Американской коллекции типовых культур, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Они включают в себя, например, ATTC №№ 25095, 25617, 25934, 27714 и 27715.

M. hyo изоляты также можно получить непосредственно из очагов поражения легких естественно или экспериментально инфицированных свиней, используя известные методики.

M. hyo изоляты можно инактивировать, используя ряд известных способов, например обрабатывая бактериальный изолят димером этиленмина (BEI, binary ethyleneimine), как описано в патенте США № 5565205 или инактивируя, например, формалином, нагреванием, BPL, радиацией или глутаровым альдегидом.

M. hyo бактерины, пригодные для применения в способе по настоящему изобретению, также можно получить из различных коммерческих источников. Такие источники включают в себя, но не ограничены ими, RESPIFEND (Fort Dodge, American Home Products), HYORESP (Merial Ltd), M+PAC (Schering Plough), PROSYSTEM M (Intervet), INGLEVAC M (Boehringer), RESPISURE (Pfizer Inc.), и STELLAMUNE MYCOPLASMA (Pfizer Inc.).

Предпочтительным источником *M. hyo* бактерина для применения в способе по настоящему изобретению является RESPISURE и STELLAMUNE MYCOPLASMA.

Особенно предпочтительным источником *M. hyo* бактерина для применения в способе по настоящему изобретению является RESPISURE-1 (Pfizer Inc.), содержащий штамм P-5722-3 (NL1042), полученный из Purdue University, USA (США).

Предпочтительно штамм P-5722-3 инактивируют BEI и дополняют имеющимся в продаже адъювантом, предпочтительно AMPHIGEN (Hydronics, USA). Предпочтительная доза составляет приблизительно 2,0 мл. Традиционно используемые консерванты включают в себя мертиолят/EDTA (этилендиаминтетрауксусную кислоту). Можно добавить носитель, предпочтительно PBS (фосфатный буферный солевой раствор). Получение модифицированных живых вакцин, например, при помощи ослабления ви-

рулентных штаммов путем пассажа в культуре, известно в данной области техники.

Субъединичные вакцины

Способ по настоящему изобретению можно реализовать на практике, используя субъединичные вакцины, содержащие очищенные М. хуо иммуногенные белки, полипептиды и иммуногенные фрагменты таких белков и полипептидов. Такие белки и полипептиды можно получить, используя методики, известные в данной области техники. Кроме того, для того, чтобы определить чистоту или гомогенность белков, можно использовать способы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как электрофорез образца на полиакриламидном геле с последующей визуализацией единственной полипептидной полосы на окрашивающем геле.

Более высокое разделение можно получить, используя HPLC (высокоэффективную жидкостную хроматографию) или другие аналогичные способы, хорошо известные в данной области техники.

В конкретном воплощении вакцина, используемая в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один белок М. хуо, например, но без ограничения, Р46, Р65, Р97, Р102, Р70, Р50 и Р44.

В других воплощениях вакцина, используемая в способе по настоящему изобретению, содержит М. хуо бактерин (инактивированные целые клетки, или их части, или модифицированные живые клетки), или М. хуо белок или полипептид, или их иммуногенный фрагмент и по меньшей мере один другой иммуноген (инактивированные целые клетки, или их части, или модифицированные живые клетки), или иммуногенный или антигенный белок, полипептид, или его иммуногенный фрагмент и предпочтительно является полипептидом вирусов, бактерий или паразитов. Примеры таких других патогенов и белков, полипептидов или иммуногенных фрагментов включают в себя, но не ограничены ими, вирус гриппа свиней (SIV), вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PRRS или таинственной болезни свиней), диарею после отъема от свиноматки (PWD) и пролиферативный энтерит свиней (PPE). Такая композиция полезна в качестве комбинированной вакцины.

Еще в одном конкретном воплощении иммуногенные фрагменты таких белков или полипептидов имеют последовательность, содержащую подряд по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100 аминокислот иммуногенных белков и полипептидов, применяемых в способе по настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, Р46, Р65, Р97, Р102, Р70, Р50 и Р44.

Кроме того, М. хуо белки для применения в вакцинах являются, по существу, чистыми или гомогенными. В способе по настоящему изобретению применяют белки или полипептиды, которые обычно очищают из клеток хозяина, экспрессирующих рекомбинантные нуклеотидные последовательности, кодирующие эти белки. Такую очистку белков можно осуществить рядом способов, хорошо известных в данной области техники. См., например, методики, описанные в "Methods in Enzymology", 1990, Academic Press, Inc., San Diego, "Protein Purification: Principles and practice", 1982, Springer-Verlag, New York.

Очищенные М. хуо полипептиды и протеины и их иммуногенные фрагменты также можно получить, используя известные способы синтеза.

Вакцинные препараты

Подходящие вакцинные препараты, применяемые в настоящем изобретении, включают в себя инъекционные препараты, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий; также можно приготовить твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Такой препарат также можно эмульгировать. Активные иммуногенные ингредиенты часто смешивают с адьювантами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом.

Полипептиды можно ввести в состав вакцины в нейтральной или солевой формах. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя соли присоединения кислот (образованные свободными аминокислотными группами пептида) и те, которые образованы неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, винная, малеиновая и подобные. Соли, образованные свободными карбоксильными группами, также можно получить из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, новокаин и подобные.

Вакцинные препараты, применяемые в настоящем изобретении содержат эффективное иммунизирующее количество М. хуо иммуногена и фармацевтически приемлемый носитель. Вакцинные препараты содержат эффективное иммунизирующее количество одного или более чем одного антигена и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области техники и включают в себя, но не ограничены ими, солевой раствор, буферный солевой раствор, декстрозу, воду, глицерин, стерильный изотонический водный буфер и их комбинации. Одним из примеров такого приемлемого носителя является физиологически сбалансированная культуральная среда, содержащая один или более чем один стабилизирующий агент, такой как стабилизированные, гидролизованные белки, лактоза и т.д. Носитель предпочтительно является стерильным. Препарат должен соответствовать пути введения.

Применение очищенных антигенов в качестве вакцинных препаратов можно осуществить стандартными способами. Например, очищенный(е) белок(ки) следует довести до подходящей концентрации,

приготовить с любым подходящим для вакцины адъювантом и упаковать для применения. Подходящие адъюванты могут включать в себя, но не ограничены ими, минеральные гели, например гидроксид алюминия; поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин; гликозиды, например сапонин и производные сапонина, такие как Quil A или GPI-0100; катионные поверхностно-активные вещества, например DDA (галогениды четвертичного углеводородного аммония, плурониковые полиолы; полианионы и полиатомные ионы; полиакриловые кислоты, неионные блок-полимеры, например Pluronic F-127 (B.A.S.F., USA); Avridine и Rantidine; пептиды; рекомбинантные мутантные лабильные токсины, например лейкотоксин (rmLT) или токсин холеры (CT); переносчики химически связанных или близкорасположенных молекул; минеральные масла, например Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, France), карбопол, Amphigen (Hydronics, USA), Omaha, NE, USA, Alhydrogel, (Superfos Biosector, Frederikssund, Denmark) масляные эмульсии, например эмульсия минерального масла, например BayolF/Arlacel A и вода, или эмульсия растительного масла, воды и эмульгатора, такого как лецитин; квасцы, MDP (мурамилдипептид), N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетил-нор-мурамил-L-аланил-D-изоглутамин, N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси) этиламин; цитокины холестерина и комбинации адъювантов. Полиатомные ионы также могут действовать как диспергирующие, загущающие агенты и агенты против слеживания, которые позволяют ресуспендировать вакцину в виде монодисперсной суспензии после длительного периода отстаивания. Комбинации адъювантов можно представить в водной, инкапсулированной (с регулируемым или замедленным высвобождением) или микроинкапсулированной формах.

Иммуноген также можно ввести в липосомы или соединить с полисахаридами и/или другими полимерами для применения в вакцинном препарате. В тех случаях, когда рекомбинантный антиген представляет собой гаптен, то есть молекулу, которая является антигенной в том смысле, что она может взаимодействовать селективно с родственными антителами, но не является иммуногенной потому, что она не может вызывать иммунный ответ, гаптен можно ковалентно связать с носителем или иммуногенной молекулой; например, большой белок, такой как сывороточный альбумин, придаст иммуногенность гаптену, присоединенному к нему. Комплекс гаптен-носитель можно приготовить для применения в качестве вакцины.

Вакцины на основе генов и нуклеиновых кислот

Способ по настоящему изобретению можно осуществить на практике, используя М. хуо гены или нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуногенные белки, полипептиды и иммуногенные фрагменты таких белков и полипептидов. Такие гены и нуклеиновые кислоты могут экспрессироваться *in vivo*, и их можно получить, применяя методики, известные в данной области техники.

В конкретном воплощении вакцина, применяемая в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один ген или нуклеиновую кислоту, кодирующую белок М. хуо, такой как, но без ограничения ими, P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

Еще в одном конкретном воплощении гены или нуклеиновые кислоты, применяемые в способе по настоящему изобретению, кодирующие иммуногенные фрагменты М. хуо белков или пептидов, имеют последовательность, содержащую подряд по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100 аминокислот иммуногенных белков и полипептидов, используемых в способе по настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

В других воплощениях способа по настоящему изобретению, используемые ген или нуклеиновые кислоты вводят известными способами, такими как, например, применение генной пушки.

В других воплощениях способа по настоящему изобретению применяемый ген или нуклеиновые кислоты представляют собой ДНК вакцины. Кроме того, нуклеиновая кислота или гены могут находиться в объединении с липосомами или другими облегчающими трансфекцию агентами, такими как известные в данной области техники.

Способы получения и доставки ДНК вакцин известны в данной области техники. См., например, Krishan, B.R., "Current Status of DNA vaccines in veterinary medicine", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Elsevier Science (2000).

Системы экспрессии

Ряд систем «хозяин-вектор экспрессии» можно использовать для экспрессии антигенных белковых последовательностей по изобретению. Такие системы «хозяин-вектор экспрессии» представляют собой транспорт, посредством которого можно получить и затем очистить интересующие кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые могут, при трансформации или трансфекции подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями, выделять продукты М. хуо гена, применяемые в способе по настоящему изобретению *in situ*. Они включают в себя, но не ограничены ими, микроорганизмы, такие как бактерин (например, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии на основе ДНК бактериофага, ДНК плазмиды или ДНК космиды, содержащими *thp3* кодирующие последовательности; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими последовательно-сти, кодирующие продукт М. хуо гена; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными

вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирус), содержащими М. hyo кодирующие последовательности; системы клеток растений, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирус табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti плазмиды), содержащими М. hyo кодирующие последовательности; или системы клеток млекопитающих (например, линии COS, CHO, BHK, 293, 3T3), содержащие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, производные генома клеток млекопитающих (например, металлотионеиновый промотор) или вирусов млекопитающих (например, аденовирусный поздний промотор; промотор вакцинного вируса 7,5K). В предпочтительном воплощении система экспрессии представляет собой бактериальную систему.

М. hyorheumoniae полипептиды и белки и их иммуногенные фрагменты также можно экспрессировать и доставить, используя живые рекомбинантные вирусные и бактериальные векторы, такие как аденовирус или Salmonella. Действующие векторы также известны и легко доступны в данной области техники, или их могут сконструировать специалисты в данной области техники, используя хорошо известные методики.

Дозировка и способы введения

Согласно настоящему изобретению однократная доза эффективного количества М. hyo вакцины, вводимая свинье в возрасте от приблизительно 3 до 10 суток, обеспечивает эффективный иммунитет к последующему заражению М. hyo. Предпочтительно М. hyo вакцину вводят в возрасте от приблизительно 6 до приблизительно 8 суток. Наиболее предпочтительно М. hyo вакцину вводят в возрасте приблизительно 7 суток.

Количество М. hyo бактериальной вакцины, эффективное при однократном введении, содержит от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 5×10^{10} единиц изменения цвета (CCU, color changing units) на дозу. Предпочтительно М. hyo бактериальная вакцина, которая обеспечивает эффективный иммунитет в однократной дозе, содержит от приблизительно 1×10^8 до 5×10^{10} CCU/дозу и более предпочтительно от приблизительно 5×10^8 до 5×10^{10} CCU/дозу.

В соответствии с настоящим изобретением, когда вводят предпочтительный бактериальный продукт RESPISURE-1, количество RESPISURE-1 для однократного введения составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 3,0 мл, предпочтительно от приблизительно 1,5 до приблизительно 2,5 мл и более предпочтительно приблизительно 2 мл.

Количество М. hyo вакцины, которая представляет собой субъединичную вакцину, содержащую один или более чем один белок или полипептид или иммуногенные фрагменты таких белков или полипептидов, эффективное в способе по настоящему изобретению, составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 200 мкг.

Количество М. hyo вакцины, которая представляет собой вакцину, содержащую один или более чем один М. hyo ген или нуклеиновую кислоту (предпочтительно ДНК), кодирующие иммуногенные белки или полипептиды или иммуногенные фрагменты таких белков или полипептидов, эффективные в способе по настоящему изобретению, составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 200 мг.

В соответствии с настоящим изобретением введение можно осуществить известными путями, включая пероральный, интраназальный, через слизистую, местный, чрескожный и парентеральный (например, внутривенный, внутривнутрибрюшинный, интрадермальный, подкожный или внутримышечный). Введение также можно осуществить, используя безыгольные устройства для доставки. Введение можно осуществить, используя комбинацию путей, например первое введение, используя парентеральный путь, и следующее введение, используя путь через слизистую оболочку. Предпочтительным путем введения является внутримышечное введение.

Эффективную дозу (иммунизирующие количества) вакцин по изобретению можно также экстраполировать из кривых доза-ответ, выведенных из модельных испытательных систем.

Настоящие способы вакцинации обеспечивают защитный иммунитет как для серопозитивных к М. hyo поросят, так и для серонегативных. К серопозитивным поросётам относят те поросята, у которых в сыворотке имеются антитела к М. hyo. К серонегативным поросётам относят те поросята, у которых в сыворотке не имеется определяемых уровней антител к М. hyo.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано, но не ограничено следующими примерами.

Пример 1. Получение М. hyo бактерина.

Для инактивации М. hyo штамма NL1042 используют димер этиленмина (BEI).

В конце периода роста pH культуры повышали до $7,8 \pm 0,2$ и pH поддерживали в этих пределах в течение по меньшей мере 1 ч. В это время добавляли стерилизованный фильтрованием водный раствор 2-бромэтиламингидробромида (BEA) до конечной концентрации приблизительно 4,0 mM. При повышенном pH BEA химически превращается в BEI. Эту культуру инкубировали при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ при постоянном перемешивании в течение по меньшей мере 24 ч.

После 24 ч инкубации добавляли стерилизованный фильтрованием водный раствор тиосульфата натрия до конечной концентрации приблизительно 4,0 mM для нейтрализации BEI. Культуру инкубировали

при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ при постоянном перемешивании в течение еще 24 ч.

После инактивации, но перед нейтрализацией тиосульфатом натрия отбирали показательную выборку и проверяли завершение инактивации. Свежую среду, содержащую 0,0026% фенолового красного, инокулировали 5-20% инокулятом и инкубировали при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение по меньшей мере 1 недели до изучения изменения цвета, что указывает на неудачу инактивации. Образцы из выборки исследовали на стерильность в тиогликолятном бульоне при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ и Trypticase соевом бульоне при комнатной температуре. Инактивированную культуру можно перенести в стерильные резервуары для хранения и хранить при $2-8^{\circ}\text{C}$ до объединения.

Активность определяли при помощи *in vitro* серологического анализа количественного определения антигена в последнем контейнере. Активность вакцин, используемых в исследовании эффективности, определяет минимальную активность, которая должна быть в вакцине на день окончания срока годности.

Образцы законченного продукта каждой серии или первой подсерии из выборки или из последнего контейнера образцы исследовали на М. *hyo* следующим образом.

Бактерин хранили при -50°C в 100 мл сосудах. Сосуды размораживали и субаликвоты по 15 мл хранили до использования при $5\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Для изучения активности объединенной серии образец серии сравнивали со стандартом и для данной серии определяли единицы RP (относительной активности). Серия или субсерия должна предпочтительно содержать по меньшей мере 6,33 RP в начале срока отсчета и по меньшей мере 5,06 RP в течение срока отсчета.

RP относится к относительной активности. RP можно определить путем определения относительного количества антигена по сравнению с эталонной вакциной. В этом случае эталон по определению имеет $\text{RP}=1,0$. Одноразовый продукт по настоящему изобретению предпочтительно имеет RP 6,33, что в 6,33 раза больше эталона.

В качестве консерванта добавляют мертиолят в конечной концентрации, не превышающей 0,01% (мас./об.).

10%-ный раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA, динатриевая или тетранатриевая соль) добавляют в качестве консерванта в конечной концентрации приблизительно 0,07% (мас./об.).

Пример 2.

Животные

Для вакцинации отбирали свиней в возрасте приблизительно 1 неделя. Серологический статус к М. *hyo* определяли в ELISA анализе. Свиней с ELISA значением $\leq 0,50$ считали М. *hyo* негативными. Свиней с ELISA значением более 0,50 считали серологически позитивными к М. *hyo*.

Вакцины

Для вакцинации свиней применяли М. *hyo* бактерин RESPISURE-1 (Pfizer Inc.). Активность вакцин определяли перед применением путем определения относительного количества антигена по сравнению с эталонным М. *hyo* бактерином. Эталонная вакцина ($\text{RP}=1,0$) содержала приблизительно 8000 единиц антигена (приблизительно от 1×10^8 до 2×10^8 CCU жизнеспособных клеток, собранных перед инактивацией) на дозу, определенных при помощи твердофазного иммунологического анализа, в котором определяли количество М. *hyo* антигена в вакцине.

Такой же жидкий адъювант (ASMPHIGEN), использованный при приготовлении RESPISURE-1, использовали в качестве плацебо (то есть без бактериальных клеток).

Инокулят для контрольного заражения

Инокулят для контрольного заражения представляли в виде 10 мл аликвот гомогената легких, замороженных при -70°C , и идентифицировали как производное М. *hyo* штамма 11 (L1 36). Инокулят размораживали и затем разбавляли в бульоне для микоплазм Фрииса (Friis Mycoplasma Broth), чтобы получить 1:25 разведение, и хранили на льду до введения. Каждая свинья получала 5 мл интраназальную дозу (2,5 мл на ноздрю) 1:25 суспензии в сутки, указанные в каждом из следующих примеров. В каждый день заражения аликвоту инокулята легкого культивировали для подтверждения отсутствия бактериального заражения. Вторую аликвоту обратно титровали каждые 3 суток, результаты показали, что инокулят содержал приблизительно 10^6 - 10^7 единиц изменения цвета (CCU)/мл М. *hyo*.

Методика эксперимента

Свиней идентифицировали по меткам на ушах, пока они еще были у свиноматки [сутки (-1)]. Свиней распределяли по загонам и группам лечения согласно обобщенному случайному блоковому дизайну. Свиней разделяли на блоки по помету и загону после отъема от свиноматки.

В 0 сутки свиней вакцинировали либо 2 мл внутримышечной дозы М. *hyo* бактерии RESPISURE-1 (Pfizer Inc.), либо 2 мл внутримышечной дозы плацебо. Каждая свинья получала 5 мл интраназальной дозы 1:25 суспензии инокулята для контрольного заражения в сутки, указанные в каждом из следующих ниже примеров. Всех свиней ежедневно контролировали и проверяли на признаки заболевания.

В указанное время после первых суток заражения всех свиней умерщвляли и вскрывали. Легкие извлекали и оценивали. Исследование после смерти включало в себя оценку величины патологии, связанной с микоплазменным респираторным заболеванием. Исследовали каждую долю легкого и поражения

зарисовывали, чтобы оценить процент поражения каждой доли. Записывали имеющуюся степень макроскопических поражений.

Анализ данных

Эффективность оценивали на основании процента поражений легких типичных для *M. hyo* инфекции. Было определено, что свиньи в группах лечения (вакцинированные) имели процент поражения всего легкого, значительно меньший ($P \leq 0,05$), чем свиньи в плацебо группе.

Процент поражения всего легкого

Процентный вклад каждой доли легкого взвешивали, используя следующие отношения отдельных долей легкого к общей массе легкого: левая краниальная - 10%, левая средняя - 10%, левая каудальная - 25%. правая краниальная - 10%, правая средняя - 10%, правая каудальная - 25% и добавочная - 10%. Взвешенные значения долей легкого затем суммировали по долям с получением процента поражения всего легкого (Pointon et al., 1992).

Пример 3.

Защиту против контрольного заражения вирулентным *M. hyo* оценивали у свиней, серологически положительных к *M. hyo*, используя однократную дозу *M. hyo* бактерина RESPISURE-1 (Pfizer Inc.), которую вводили свиньям в возрасте от 3 до 8 суток.

Пять параллельных анализов активности на RESPISURE-1 проводили во время или вблизи времени вакцинации. Относительную активность (RP) определяли по относительному количеству антигена по сравнению с эталонной вакциной. Эталонная вакцина, имеющая $RP=1,0$, содержала приблизительно 8000 единиц *M. hyo* антигена. RP значения из этих пяти анализов составляли 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 и 4,36, соответственно.

В 0 сутки свиней из группы лечения T02 (см. табл. 1 ниже) вакцинировали 2 мл внутримышечной дозы *M. hyo* бактерина RESPISURE-1 (Pfizer Inc.). Свиней в группе T01 вакцинировали внутримышечно 2 мл плацебо. Каждая свинья получала 5 мл интраназальной дозы 1:25 суспензии инокулята для контрольного заражения на 178, 179 и 180 сутки. Каждые 3 суток аликвоту материала для заражения культивировали к моменту инокуляции, чтобы подтвердить отсутствие бактериального загрязнения. Вторую аликвоту обратно титровали для подтверждения того, что исходный раствор для контрольного заражения содержал приблизительно 10^7 CCU/мл *M. hyo*. Всех свиней ежедневно контролировали и проверяли на признаки заболевания.

Через 30 дней после первых суток заражения всех свиней умерщвляли и вскрывали. Легкие извлекали и оценивали. Посмертное исследование включало в себя оценку величины патологии, связанной с микоплазменным респираторным заболеванием. Исследовали каждую долю легкого и поражения зарисовывали, чтобы оценить процент вовлечения каждой доли. Записывали имеющуюся степень макроскопических поражений.

Таблица 1

Группа лечения	Соединение для вакцинации	Количество	Вакцинированы Сутки 0	Заражение Сутки 178 ¹	Заражение Сутки 179 ¹	Заражение Сутки 180 ¹
T01	Плацебо	26	26	26	26	26
T02	Вакцина	26	26	24 ²	22 ³	22 ³

¹ Вирулентный *M. hyo* инокулят

² Свиней 71 и 73 исключили из исследования до контрольного заражения, так как оба животных потеряли все ушные метки и, следовательно, нельзя было выполнить отождествление каждого животного.

³ Свинью 36 нашли мертвой на 178 сутки из-за осложнений от анестезии. Свинью 31 нашли мертвой на 179 сутки из-за осложнений от анестезии.

Результаты поражения легких обобщены в табл. 2. Результаты показывают, что вакцинированные свиньи (T02) имели значительно ($P=0,0385$) более низкий среднеквадратичный процент поражения легких пневмонией, чем свиньи из плацебо группы (T01) (2,0 против 4,5%).

Таблица 2

Сводные данные по общему проценту поражения легких

Группа лечения	Соединение	Количество свиней	Среднеквадратичное	Интервал
T01	Плацебо	26	4,5 ^a	от 0 до 36,75
T02	Вакцина	22	2,0 ^b	от 0 до 13,75

^{a,b} Значения с разным индексом являются статистически значимыми ($P = 0,0385$)

Результаты показывают, что однократная вакцинация свиней в возрасте приблизительно 1 недели *M. hyo* бактерином RESPISURE-1 вызывала защиту против последующего контрольного заражения вирулентным *M. hyo*.

Пример 4.

Защиту против контрольного заражения вирулентным *M. hyo* оценивали у свиней серологически негативных в *M. hyo*, используя однократную дозу *M. hyo* бактерины RESPISURE-1, вводимую свиньям в возрасте от 3 до 8 суток.

Пять параллельных анализов активности вакцины проводили во время или вблизи времени вакцинации. Относительную активность (RP) определяли по относительному количеству антигена по сравнению с эталонной вакциной. Эталонная вакцина, имеющая $RP=1,0$, содержала приблизительно 8000 единиц *M. hyo* антигена. RP значения из этих пяти анализов составляли 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 и 4,36, соответственно.

В 0 сутки свиней из группы лечения T02 вакцинировали 2 мл внутримышечной дозы *M. hyo* бактерии RESPISURE-1 (Pfizer Inc.). Свиней в группе T01 вакцинировали внутримышечно 2 мл плацебо. Каждая свинья получала 5 мл интраназальной дозы 1:25 суспензии инокулята для контрольного заражения на 173, 174 и 175 сутки. Каждые 3 суток аликвоту материала для контрольного заражения культивировали к моменту инокуляции, чтобы подтвердить отсутствие бактериального загрязнения. Вторую аликвоту обратно титровали для подтверждения того, что исходный раствор для контрольного заражения содержал приблизительно 10^6 CCU/мл *M. hyo*. Всех свиней ежедневно контролировали и проверяли на признаки заболевания.

Через 29 дней после первых суток контрольного заражения всех свиней умерщвляли и вскрывали. Легкие извлекали и оценивали. Посмертное исследование включало в себя оценку величины патологии, связанной с вызванным *M. hyo* респираторным заболеванием. Исследовали каждую долю легкого и поражения зарисовывали, чтобы оценить процент уплотнения в каждой доле. Записывали имеющуюся степень макроскопического поражения.

В табл. 3 обобщен дизайн эксперимента.

Таблица 3

Группа лечения	Соединение для вакцинации	Количество	Вакцинированы Сутки 0	Заражение Сутки 173 ¹	Заражение Сутки 174 ¹	Заражение Сутки 175 ¹
T01	Плацебо	26	26	25 ²	24 ⁴	24
T02	Вакцина	26	26	23 ³	20 ⁵	20

¹ Вирулентный *M. hyo*

² Свинью 123 умертвили на 19 сутки из-за хронического септического полиартрита

³ Свинью 222 нашли мертвой на 40 сутки. Вскрытие выявило большое количество перикардальной жидкости и кровоизлияние на эпикарде. Свинью 102 умертвили на 95 сутки из-за выпадения прямой кишки. Свинью 204 нашли мертвой на 145 сутки. Вскрытие не проводили из-за преждевременного разложения туши.

⁴ Свинью 244 нашли мертвой на 174 сутки после первых суток контрольного заражения из-за осложнений от анестезии.

⁵ NEEA для подсчета для 3 свиней.

Результаты поражения легких обобщены в табл. 4. Общий анализ показывает, что вакцинированные свиньи (T02) имели значительно ($P=0,0001$) более низкий среднеквадратичный процент поражения легких пневмонией, чем свиньи из плацебо группы (T01) (0,3 против 5,9%).

Таблица 4

Сводные данные общего процента поражений легких
Процент легких с поражением

Группа лечения	Соединение	Количество свиней	Среднеквадратичное	Интервал
T01	Плацебо	24	5,9 ^a	от 0 до 36
T02	Вакцина	20	0,3 ^b	от 0 до 6

^{a,b} Значения с разным индексом являются статистически различными ($P = 0,0001$)

Результаты этого исследования показывают, что однократная вакцинация свиней *M. hyo* бактерином RESPISURE ONE вызывала защиту против последующего экспериментального контрольного заражения вирулентным *M. hyo*.

Пример 5.

Защиту против контрольного заражения вирулентным *M. hyo* оценивали у свиней, серологически негативных в *M. hyo*, используя однократную дозу *M. hyo* бактерии RESPISURE-1, вводимую свиньям в возрасте от 3 до 8 суток.

Пять параллельных анализов активности бактериона проводили во время или вблизи времени вакцинации. RP определяли по относительному количеству антигена по сравнению с эталонной вакциной. Эталонная вакцина, имеющая $RP=1,0$, содержала приблизительно 8000 единиц М. хуо антигена. RP значения из этих пяти анализов составляли 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 и 4,36, соответственно.

В 0 сутки свиней из группы лечения T02 вакцинировали 2 мл внутримышечной дозы М. хуо бактериона. Свиней в группе T01 вакцинировали внутримышечно 2 мл плацебо. Каждая свинья получала 5 мл интраназальной дозы (2,5 мл на ноздрю) 1:25 суспензии инокулята для контрольного заражения на 76, 77 и 78 сутки. Каждые 3 суток аликвоту материала для контрольного заражения культивировали ко времени инокуляции, чтобы подтвердить отсутствие бактериального загрязнения. Вторую аликвоту обратно титровали для подтверждения того, что исходный раствор для контрольного заражения содержал приблизительно 10^6 CCU/мл М. хуо. Всех свиней ежедневно контролировали и проверяли на признаки клинического заболевания.

Через 29 дней после первых суток контрольного заражения всех свиней умерщвляли и вскрывали. Легкие извлекали и оценивали. Посмертное исследование включало в себя оценку величины патологии, связанной с вызванным М. хуо респираторным заболеванием. Исследовали каждую долю легкого и поражения зарисовывали, чтобы оценить процентное поражение каждой доли. Записывали имеющуюся степень уплотнения.

В табл. 5 обобщен дизайн эксперимента.

Таблица 5

Группа лечения	Соединение для вакцинации	Количество	Вакцинированы Сутки 0	Заражение Сутки 176 ¹	Заражение Сутки 177 ¹	Заражение Сутки 178 ¹
T01	Плацебо	26	26	23 ²	23	23
T02	Вакцина	26	26	21 ³	21	21

¹ Вирулентный М. хуо инокулят

² Свиньи 237 и 239 имели положительную реакцию в -1 сутки на М. хуо пневмонию. Этих поросят отстранили от исследования на 14 сутки и умертвили. Свинью 220 нашли мертвой на 3 сутки, потому что ее задавила свиноматка.

³ Свиньи 238, 240 и 277 имели положительную реакцию при испытании в -1 сутки на М. хуо пневмонию. Этих поросят отстранили от исследования на 14 сутки и умертвили. Свинью 228 умертвили на 7 сутки из-за анорексии и плохого развития. Свинью 177 умертвили на 40 сутки из-за синдрома хронического изнурения.

Результаты поражения легких обобщены в табл. 6. Общий анализ показывает, что вакцинированные свиньи (T02) имели значительно ($P=0,0001$) более низкий среднеквадратичный процент поражения легких пневмонией, чем свиньи из плацебо группы (T01) (0,5 против 9,9%).

Таблица 6

Сводные данные общего процента поражения легких
Процент легких с поражением

Группа лечения	Соединение	Количество свиней	Среднеквадратичное	Интервал
T01	Плацебо	23	9,9 ^a	от 0 до 40,5
T02	Вакцина	21	0,5 ^b	от 0 до 5

^{a,b} Значения с разными индексами являются статистически различными ($P = 0,0001$)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения у животного, вызванного инфекцией *Mycoplasma hyorheumoniae*, при котором животному однократно вводят эффективную дозу вакцины на основе *Mycoplasma hyorheumoniae*, причем возраст животного составляет приблизительно от 3 до 10 суток, а доза вакцины содержит по меньшей мере 1×10^8 единиц изменения цвета (CCU).

2. Способ по п.1, согласно которому вакцина представляет собой инактивированный препарат из целых клеток *Mycoplasma hyorheumoniae* или их частей.

3. Способ по п.2, согласно которому указанная доза вакцины содержит от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 5×10^{10} CCU.

4. Способ по п.2, согласно которому количество указанной вводимой вакцины составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 3,0 мл.

5. Способ по п.2, согласно которому вакцинный препарат представляет собой RESPISURE-1.

6. Способ по п.2, согласно которому вакцинный препарат дополнительно содержит вирусный или

бактериальный антиген, отличный от *Mycoplasma hyopneumoniae*.

7. Способ по п.6, согласно которому вирусные или бактериальные антигены выбраны из группы, включающей антигены вируса гриппа свиней (SIV), вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (вируса, вызывающего PRRS или таинственную болезнь свиней), бактерий, вызывающих диарею после отъема от свиноматки (PWD), и бактерий, вызывающих пролиферативный энтерит свиней (PPE).

8. Способ по п.2, согласно которому вакцинный препарат вводят внутримышечно.

9. Способ по п.1, обеспечивающий защиту животного до 25 недель после вакцинации.

10. Способ по п.1, согласно которому указанная вакцина дополнительно содержит адъювант.

11. Способ по п.1, согласно которому указанная вакцина представляет собой субъединичную вакцину.

12. Способ по п.11, согласно которому субъединичная вакцина содержит один или более иммуногенных полипептидов или белков *Mycoplasma hyopneumoniae* или иммуногенных фрагментов таких полипептидов или белков.

13. Способ по п.12, согласно которому полипептиды или белки выбраны из группы, состоящей из P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

14. Способ по п.1, согласно которому указанная вакцина содержит генетический материал, обеспечивающий экспрессию *in vivo* одного или более иммуногенных полипептидов или белков *Mycoplasma hyopneumoniae* или иммуногенных фрагментов таких полипептидов или белков.

15. Способ по п.14, согласно которому генетический материал выбран из группы, включающей нуклеотидные последовательности, кодирующие P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6
