



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I660736 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：107103700

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 12 月 27 日

(51)Int. Cl. : A61K39/02 (2006.01)

C12N1/20 (2006.01)

C12R1/35 (2006.01)

(30)優先權：2012/12/28 美國

61/746,997

(71)申請人：德商百靈佳殷格翰維美迪加股份有限公司 (德國) BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA GMBH (DE)

德國

(72)發明人：喬登黛安娜 M 墨非 JORDAN, DIANNA M. MURPHY (US)；馬汀森布萊恩
湯瑪士 MARTINSON, BRIAN THOMAS (US)；慕蘭塞勒克里斯汀 瑪格瑞特
MUEHLENTHALER, CHRISTINE MARGARET (US)；紐包爾亞瑟
NEUBAUER, AXEL (DE)；艾爾亞倫 V IYER, ARUN V. (IN)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

GB 1137306A

US 2005/0037027A1

Volokhov DV et al, "Biological enrichment of Mycoplasma agents by
cocultivation with permissive cell cultures.", Appl Environ
Microbiol. 2008 Sep; 74(17):5383-91.

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：項 圖式數： 共頁

(54)名稱

黴漿菌疫苗之製備方法

METHOD OF MAKING A MYCOPLASMA VACCINE

(57)摘要

本發明尤其係關於製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含在減少血清或無豬血清真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及添加醫藥上可接受之載劑。此外，本發明係關於可藉由該方法獲得之免疫組合物及對個體進行免疫之方法，該方法包含將該免疫組合物投與個體。

The present invention relates i.a. to a method for the preparation of an immunogenic composition for the treatment and/or prophylaxis of mycoplasma infections in a subject comprising the cultivation of mycoplasma bacteria in a serum-reduced or swine serum-free, eukaryotic cell system; obtaining an antigen of the mycoplasma bacteria; and addition of a pharmaceutically acceptable carrier. Further, the present invention relates to the immunogenic composition obtainable by said method and a method for immunizing a subject comprising the administration of said immunogenic composition to a subject.

【發明說明書】

【中文發明名稱】

黴漿菌疫苗之製備方法

【英文發明名稱】

METHOD OF MAKING A MYCOPLASMA VACCINE

【技術領域】

【先前技術】

黴漿菌(*Mycoplasma*)屬細菌屬於柔膜菌綱(*Mollicutes*)且代表一組源自厚壁菌門(*Firmicutes*)譜系之有機體。柔膜菌綱係最小自主複製有機體，其在結構上與其他真細菌之不同之處在於，其缺少細胞壁。業內認為其單膜表面係在複雜免疫活性宿主環境中介導適應及存活之關鍵界面。此外，柔膜菌綱具有小基因組及數目有限之代謝路徑。因此，亦將黴漿菌屬成員描述為「最小自我複製有機體」。然而，儘管其非常簡單，多種黴漿菌細菌係人類及多種動物之病原體。與其他毒力主要取決於毒素、侵襲素及細胞溶素之病原性細菌相比，病原性黴漿菌細菌似乎不具有該等典型主要毒力因子(*Chambaud, I. 等人，2001, Nucleic Acids Res. 29: 2145-2153, Fraser 等人，1995, Science 270: 397-403*)。目前可獲得之對容許病原性黴漿菌引起宿主細胞損傷、發炎及疾病之分子機制及效應物之瞭解極少。

病原性黴漿菌細菌主要引起人類及動物之非典型肺炎、泌尿生殖道感染及關節炎(*Blanchard, A. 及 G. F. Browning (編輯). 2005. Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control. Horizon Bioscience, Wymondham U.K.; Kobisch M. 及 Friis N.F.*

1996, *Swine mycoplasmoses*, *Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz.* 15, 1569-1605)。已知該等體徵之再活化或加重會反覆並逐漸轉變成慢性疾病，且因此藉由早期診斷及早期治療預防或治療加重或再活化非常重要。豬肺炎黴漿菌(*M. hyopneumoniae*)係地方性肺炎之病因。在豬中，其因體重增長降低及飼料效率低而係最常見且經濟上最重要之疾病之一。該疾病引起肺損害、慢性咳嗽、毛色無光、生長遲滯及持續數週之不興旺外觀。肺損害、尤其在腹側頂葉及心葉中之損害之特徵在於上皮細胞增生及單核細胞之血管週及細支氣管週累積增加。豬呼吸道之另一常見黴漿菌豬鼻黴漿菌(*M. hyorhinis*)可引起仔豬之多發性漿膜炎及關節炎。豬關節滑膜黴漿菌(*M. hyosynoviae*)一般位於扁桃體中且可引起關節炎疾病，從而導致經濟損失。豬關節滑膜黴漿菌係自關節及咽/扁桃體樣品分離且可在血液及關節液中誘導抗體。牛黴漿菌(*M. bovis*)被認為係致病性更強之黴漿菌細菌中之一者且在世界上造成顯著經濟損失。黴漿菌細菌引起所有年齡之牛之嚴重臨床體徵。牛黴漿菌係發現引起牛之肺炎、乳腺炎及關節炎之最常見黴漿菌病原體，且其病因學作用與母牛及公牛之耳炎、角膜結膜炎、滑膜炎及生殖障礙有關。

由於黴漿菌缺少細胞壁，許多靶向細胞壁合成之常見抗生素(例如青黴素或其他 β -內醯胺抗生素)對其無影響。實際使用之黴漿菌感染之治療劑係一些抗生素，例如基於大環內酯或基於新喹諾酮或基於四環素之抗生素，但該等抗生素具有嚴重不良效應，例如抗藥性菌株之出現，其導致黴漿菌感染變嚴重同時預期治療效應不足，且成為轉變成慢性疾病的病因。此外，疫苗接種係控制黴漿菌感染之有效方法。然而，通常僅在複合培養基中培養才可獲得製備疫苗所需之黴漿菌之極高產率(*Kobisch M.及Friis*

*N.F. 1996, Swine mycoplasmoses, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1569-1605 ; Gabridge M.G.等人, 1976, Cultivation of mycoplasma in a modified tissue culture medium, Applied and Environmental microbiology. 31, 986-989 ; Sotoodehnia A.等人2007, Preparation of agalactia vaccine in fermentor, Archives of razi institute, 62, 45-48 ; Dahlia等人, 2009 Isolation of mycoplasma hyosynoviae from penumonic lung of swine, Tropical Biomedicine 26:341-345)。*端視欲培養之黴漿菌細菌，複合培養基補充有10-30%血清且有時補充有酵母提取物。因此，由於血清之高價格，培養黴漿菌細菌之成本密集。此外，減少複合培養基中之血清亦將有益於動物福利。因此，業內需要以極高產率在減少血清培養系統中培養黴漿菌，以供製備有效預防黴漿菌感染之免疫組合物。此外，豬特異性黴漿菌細菌一般係在含有豬特異性血清之複合培養基中培養 (*Kobisch M. 及 Friis N.F. 1996, Swine mycoplasmoses, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1569-1605*)。然而，豬特異性血清可含有其他豬特異性病原體或可含有可使欲製備之免疫組合物之免疫原性降低之針對豬特異性病原體之抗體。因此，業內亦需要以極高產率在無豬血清培養系統中培養黴漿菌，以供製備有效預防黴漿菌感染之免疫組合物。

【發明內容】

在闡述本發明各態樣之前，必須注意，除非上下文明確指示其他含義，否則如在本文中及在隨附申請專利範圍中使用之單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該」包括複數參考。因此，例如，在提及「一抗原」時包括複數種抗原，在提及「細胞」時係指一或多個細胞及熟習此項技術者已知之其等效物，等等。除非另有定義，否則本文中所使用之所有

技術及科學術語皆具有熟習本發明所屬領域技術者一般理解之相同意義。儘管在本發明之實踐或測試中可使用任何與本文所述之方法及材料類似或等效之彼等，但現在闡述較佳方法、裝置及材料。本文所提及之所有出版物皆係以引用方式併入本文中，用於闡述及揭示該等出版物中所報導可結合本發明使用之細胞系、載體及方法之目的。本文中所有內容皆不應視為承認該揭示內容由於先前發明而有資格先於本發明。

本發明解決先前技術中固有之問題並提供技術現況之獨特進步。

概言之，本發明提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。

有利地，本發明所提供實驗數據揭示，可在減少血清真核細胞系統中產生黴漿菌細菌。

術語「免疫組合物」係指包含至少一種抗原之組合物，其引發被投與該免疫組合物之宿主之免疫反應。該免疫反應可為細胞及/或抗體介導之針對本發明免疫組合物之免疫反應。該宿主亦被稱為「個體」。較佳地，本文所闡述或提及之任一宿主或個體係動物。

通常，「免疫反應」包括(但不限於)以下效應中之一或多者：特異性指向本發明免疫組合物中所包括抗原之抗體、B細胞、輔助性T細胞、抑制性T細胞及/或細胞毒性T細胞及/或 γ - δ T細胞之產生或活化。較佳地，宿主將展示保護性免疫反應或治療反應。

「保護性免疫反應」將顯示為受感染宿主通常展示之臨床體徵之減少或缺少、較短回復時間及/或縮短之感染性持續時間或組織或體液中降低之病原體效價或受感染宿主之排泄。

若宿主展示保護性免疫反應而使得對新感染之抗性將增強及/或疾病之臨床嚴重度降低，則將免疫組合物稱為「疫苗」。

如本文所用「抗原」係指(但不限於)引發宿主對包含該抗原或其免疫活性組份之所關注免疫組合物或疫苗之免疫反應之組份。抗原或免疫活性組份可為完整微生物(呈滅活或改良活形式)或其任何碎片或部分，若將其投與宿主可引發宿主之免疫反應。抗原可為或可包含呈其原始形式或作為所謂改良活疫苗(MLV)中之減毒有機體之完整的活有機體。抗原可進一步包含該等有機體之適當元件(亞單位疫苗)，其中該等元件係藉由以下方式來生成：破壞完整有機體或該等有機體之生長培養物且實施後續純化步驟以產生期望結構；或藉由對適宜系統(如但不限於細菌、昆蟲、哺乳動物或其他物種)進行適當操作來誘導合成過程，且隨後視情況實施分離及純化程序；或藉由使用適宜醫藥組合物直接納入遺傳物質在需要疫苗之動物中誘導該等合成過程(多核苷酸疫苗接種)。抗原可包含所謂的死菌疫苗(KV)中之藉由適當方法滅活之完整有機體。若有機體係細菌，則死菌疫苗稱為死菌苗(bacterin)。

術語「治療及/或預防」係指減小畜群中具體黴漿菌感染之發病率或降低由具體黴漿菌感染引起或與該感染相關之臨床體徵之嚴重度。因此，術語「治療及/或預防」亦係指減小畜群中受具體黴漿菌細菌感染之動物數(= 減小具體黴漿菌感染之發病率)，或與動物未接受如本文所提供免疫組合物之動物組相比，在動物已接受有效量之該免疫組合物之動物組中降低通常與黴漿菌感染相關或由該感染引起之臨床體徵之嚴重度。

「治療及/或預防」一般涉及向需要或可受益於此一治療/預防之個體或個體群投與有效量之本發明免疫組合物。術語「治療」係指一旦個體或

畜群中之至少一些動物已被該黴漿菌感染且其中該等動物已顯示一些由該黴漿菌感染引起或與該感染相關之臨床體徵，則投與有效量之免疫組合物。術語「預防」係指在個體之任何黴漿菌感染之前，或至少在該動物或動物組中沒有動物不顯示任何由該黴漿菌感染引起或與該感染相關之臨床體徵時，向該個體投與。

如本文所用術語「有效量」意指(但不限於)引發或能引發個體之免疫反應之抗原之量。該有效量能減小畜群中具體黴漿菌感染之發病率或降低具體黴漿菌感染之臨床體徵之嚴重度。

較佳地，與未經治療或經在本發明之前可獲得之免疫組合物治療但隨後被具體黴漿菌細菌感染之個體相比，臨床體徵之發病率或嚴重度減小至少10%、更佳至少20%、更佳至少30%、甚至更佳至少40%、更佳至少50%、甚至更佳至少60%、更佳至少70%、甚至更佳至少80%、更佳至少90%且最佳至少95%。

如本文所用術語「臨床體徵」係指個體來自黴漿菌細菌之感染體徵。感染之臨床體徵取決於所選病原體。該等臨床體徵之實例包括(但不限於)呼吸窘迫、多發性漿膜炎(例如腹膜炎、肋膜炎、心包炎)、關節炎(跛行及關節腫脹)、耳炎、被毛粗化、微熱、抑鬱症、食欲下降及菌血症。然而，臨床體徵亦包括(但不限於)可自活動物直接觀察到之臨床體徵。可自活動物直接觀察到之臨床體徵之實例包括鼻排出物及眼分泌物、嗜睡、咳嗽、喘鳴、膈痙攣性呼吸(thumping)、高熱、體重增加或減少、脫水、腹瀉、關節腫脹、跛行、消瘦、皮膚蒼白、羸弱、腹瀉及諸如此類。

可藉由向有需要個體投與一或多個劑量之本發明免疫組合物來降低

個體中由具體黴漿菌感染引起或與該感染相關之臨床體徵之發病率或嚴重度。如實例2及3中所顯示，已證實如本文所提供免疫組合物在向有需要個體投與單一劑量後有效。

術語「感染」或「受感染的」係指個體被病原體(即豬鼻黴漿菌或豬鼻黴漿菌及豬關節滑膜黴漿菌或豬鼻黴漿菌、豬肺炎黴漿菌及豬關節滑膜黴漿菌)感染。

術語「黴漿菌」為熟習此項技術者已知。「黴漿菌」係指一細菌屬，例如如以下文獻中所述：*Blanchard, A.及G. F. Browning (編輯). 2005. Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control. Horizon Bioscience, Wymondham U.K. ; Kobisch M.及Friis N.F. 1996, Swine mycoplasmoses, Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1569-1605*。可基於細菌之生物化學及微生物性質以及其形態對其加以分類。該等分類準則為業內所熟知。一般而言，黴漿菌感染與本說明中其他地方闡述之臨床體徵有關。

如本文所用術語「黴漿菌」係指豬鼻黴漿菌或豬鼻黴漿菌及豬關節滑膜黴漿菌或豬鼻黴漿菌、豬肺炎黴漿菌及豬關節滑膜黴漿菌。然而，術語黴漿菌亦涵蓋牛黴漿菌。豬鼻黴漿菌之全基因組序列例示性地由(例如)*Liu, W. 等人, J. Bacteriol. 2010, 第192卷(21), 5844-45 doi: 10.1128/JB.00946-10. Epub 2010年8月27日或Calcutt MJ.等人, 2012, J. Bacteriol., 第194卷(7), 1848 doi: 10.1128/JB.00033-12*提供。豬關節滑膜黴漿菌之分離物例示性地以登錄號ATCC 25591或ATCC 27095存放於美國組織培養物保藏中心(American Tissue Culture Collection)。豬肺炎黴漿菌之分離物例示性地以登錄號ATCC 25095、ATCC 25617及ATCC

25934存放於美國組織培養物保藏中心。豬肺炎黴漿菌J-菌株之基因組DNA以登錄號ATCC 25934D存放於美國組織培養物保藏中心。牛黴漿菌之分離物為熟習此項技術者所熟知且一些分離物例示性地以登錄號ATCC 25025、ATCC 25523及ATCC 27368存放於美國組織培養物保藏中心。

術語「培養」為熟習此項技術者已知。該術語係指細胞在有機體外之培養物中之增殖。具體而言，術語「培養」係指細胞在有機體外在細胞系統中之增殖。

術語「細胞系統」為熟習此項技術者已知。具體而言，術語「細胞系統」係用於培養微生物、例如黴漿菌細菌之活體外細胞培養系統。該細胞系統包含宿主細胞及適合該等細胞在有機體外增殖之細胞培養基。具體而言，宿主細胞可易受或可不易受黴漿菌細菌感染。該等宿主細胞可作為呈滅活形式之活細胞或作為細胞碎片存在。較佳地，該等宿主細胞係真核細胞系統中之真核細胞。

術語「真核細胞系統」包含初代真核細胞及源自諸如植物或動物等多細胞有機體之真核細胞。此外，真核細胞系統涵蓋真核單細胞有機體(亦稱作微生物)，例如細菌或真菌(包括酵母)。然而，應理解，真核細胞與黴漿菌細菌不同。可用於實踐如本文所述之方法之真核宿主細胞包括(但不限於)馬-達二氏(Madin-Darby)犬腎上皮(MDCK)細胞(例如如美國組織培養物保藏中心以登錄號ATCC CCL-34或ATCC CRL-2285存放之馬-達二氏犬腎上皮細胞)或McCoy細胞(例如如美國組織培養物保藏中心以登錄號ATCC CRL-1696所存放)。

如本文所用術語「無細胞培養系統」係指除了黴漿菌細菌以外不包括任何細胞之培養系統。

術語「減少血清的」係指與用於在無細胞培養系統中培養黴漿菌細菌之血清之量相比，經添加用於在真核細胞系統中培養相同物種之黴漿菌細菌之血清之減少量。與用於在無細胞培養系統中培養黴漿菌細菌之血清之量相比，用於在真核細胞系統中培養黴漿菌細菌之血清之量減少至少10%、較佳至少20%、更佳至少30%、甚至更佳至少40%、甚至更佳至少50%、甚至更佳至少60%、甚至更佳至少70%、甚至更佳至少80%、甚至更佳至少90%、甚至更佳至少95%、甚至更佳至少96%、甚至更佳至少97%、甚至更佳至少98%、甚至更佳至少99%、最佳100%。因此，必須理解，根據本發明，最佳在缺少任何血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌。

用於在真核細胞系統中培養黴漿菌細菌之血清之較佳量包括介於約0–10% (v/v)之間、更佳約1–9% (v/v)、更佳約1–8% (v/v)、甚至更佳約1–7% (v/v)、甚至更佳約1–6% (v/v)且最佳約2–5% (v/v)之血清濃度。

用於在包含MDCK細胞之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌之血清之較佳量包括介於約0–6% (v/v)之間、更佳約1–5% (v/v)、更佳約2–4% (v/v)、甚至更佳約2–3% (v/v)且最佳約2% (v/v)之血清濃度。

用於在包含McCoy細胞之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌之血清之較佳量包括介於約0–10% (v/v)之間、更佳約1–9% (v/v)、更佳約2–8% (v/v)、甚至更佳約3–7% (v/v)、甚至更佳約4–6% (v/v)且最佳約5% (v/v)之血清濃度。

根據本發明之一態樣，必須理解，真核細胞系統之真核細胞必須被黴漿菌細菌感染。黴漿菌細菌對真核細胞之感染及後培育期之條件為熟習此項技術者所熟知。然而，較佳地，轉染後，將細胞培育長達21天、更佳

約2天至約14天、更佳約2天至約8天、更佳約3至5天時期。較佳培育條件包括介於約32 - 42°C之間、更佳約34 - 40°C、更佳約35 - 39°C、甚至更佳約36 - 38°C且最佳約37°C之溫度。較佳培育條件亦包括介於約2%至8%之間、更佳約3%至7%、甚至更佳約4%至6%且最佳約5%之CO₂濃度。較佳地，在轉染後觀察真核細胞之特徵變化，例如細胞密度趨勢、在感染後時期期間活力之下降(包括細胞病變效應)及培養基由於pH變化所致之顏色變化。

術語「獲得」包含抗原之採集、分離、純化及/或調配(例如最後加工、滅活及/或摻和)。

術語「採集」係指自經轉染真核細胞系統收集或回收黴漿菌細菌抗原。可使用業內已知之任何習用方法來回收該黴漿菌抗原，例如任何分離方法。業內熟知方法包含離心或過濾，例如使用具有某一孔徑之半透膜。

術語「分離」包含黴漿菌抗原之分離步驟。用於自經感染真核細胞系統分離黴漿菌細菌抗原之方法為熟習此項技術者已知。彼等方法包含物理及/或化學方法，包括(但不限於)冷凍-解凍循環、用超音波處理及諸如此類。

用於自分離物「純化」抗原之方法為熟習此項技術者已知，例如彼等闡述於Protein purification methods - a practical approach (*E.L.V. Harris及S. Angel編輯，IRL Press at Oxford University Press*)中之方法。彼等方法包括(但不限於)藉由離心及/或過濾分離、沈澱、粒徑篩析(凝膠過濾)層析、親和層析、金屬螯合物層析、離子交換層析、共價層析、疏水相互作用層析及諸如此類。抗原可以經純化之純淨形式獲得，或不含或實質上不含其他細胞物質或培養基等。在該分離及/或純化後，抗

原展現至少80%、較佳80%-90%、更佳90%-97%、最佳大於97%之純度直至不含任何污染之絕對純淨形式。

根據另一態樣，如本文所用「獲得」可亦包括進一步最後加工步驟作為最終調配製程之一部分，如添加緩衝劑、滅活、中和步驟及諸如此類。

任何習用「滅活」方法皆可用於本發明之目的。因此，滅活法可藉由熟習此項技術者已知之化學及/或物理處理來實施。較佳滅活方法包括添加環化二乙烯亞胺(BEI)，包括添加已環化為二乙烯亞胺(BEI)之2-溴乙基胺氫溴化物(BEA)。其他較佳化學滅活劑包含(但不限於)曲拉通(Triton) X-100、去氧膽酸鈉、溴化十六烷基三甲銨、 β -丙內酯、硫柳汞(Thimerosal)、酚及甲醛(福馬林)。然而，滅活亦可包含中和步驟。較佳中和劑包括(但不限於)硫代硫酸鈉、亞硫酸氫鈉及諸如此類。

較佳福馬林滅活條件包括約0.02% (v/v) – 2.0% (v/v)、更佳約0.1% (v/v) – 1.0% (v/v)、更佳約0.15% (v/v) – 0.8% (v/v)、甚至更佳約0.16% (v/v) – 0.6% (v/v)且最佳約0.2% (v/v) – 0.4% (v/v)之福馬林濃度。培育時間取決於黴漿菌之抗性。一般而言，實施滅活過程直至在適宜培養系統中檢測不到黴漿菌生長。

根據另一態樣，可使用已知技術將本發明滅活死菌苗組份納入脂質體中，例如*Nature*, 1974, 252, 252-254或*Journal of Immunology*, 1978, 120, 1109-13中所述之技術。根據另一態樣，可將本發明滅活死菌苗組份偶聯至適宜生物化合物，例如多糖、肽、蛋白質或諸如此類或其組合。

因此，根據一態樣，本申請案提供一種製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清真核細胞系統

中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該免疫組合物係黴漿菌免疫組合物。

在本發明之一態樣中，用於培養黴漿菌細菌之血清不含豬血清。術語「不含豬血清」意指，在真核細胞系統中之黴漿菌細菌培養過程期間不添加豬血清。

因此，根據一態樣，本申請案提供一種製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該血清不含豬血清。根據另一態樣，所有黴漿菌抗原皆係在不含豬血清之真核細胞系統中產生。

在另一態樣中，黴漿菌細菌之培養係在不存在血清下進行。此意指，在真核細胞系統中之黴漿菌細菌培養期間不添加血清。因此，根據一態樣，本申請案提供一種製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在不存在血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。根據另一態樣，所有黴漿菌抗原皆係在不存在血清下產生。

在本發明之一態樣中，黴漿菌抗原係完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活黴漿菌死菌苗。

因此，根據一態樣，本申請案提供一種製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該黴漿菌抗原係完整滅活死菌苗。根據另一態樣，免疫組合物內之所有黴漿菌抗原皆係完整滅活死菌苗。可在包括

滅活步驟之上述方法之該步驟b)中獲得滅活黴漿菌抗原。因此，根據另一態樣，提供用於製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原並使該等黴漿菌抗原滅活；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。

完整滅活死菌苗可藉由完整黴漿菌細菌之滅活、較佳藉由如上文所述之方法來獲得。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原並使該等黴漿菌抗原滅活；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該等黴漿菌抗原係完整黴漿菌細菌。

較佳地，黴漿菌細菌係如上文所述用福馬林滅活。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原並用福馬林使該等黴漿菌抗原滅活；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該等黴漿菌抗原係完整黴漿菌細菌。較佳地，以如上文所述之濃度使用福馬林。

在本發明之一態樣中，真核細胞系統包含MDCK細胞系。MDCK (馬-達二氏犬腎上皮細胞)細胞系源自成年雌性克卡犬(cocker spaniel)之腎組織。然而，MDCK細胞系為熟習此項技術者已知。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其

中該真核細胞系統包含MDCK細胞系。同樣，黴漿菌抗原可為較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。

在本發明之另一態樣中，真核細胞系統包含McCoy細胞系。McCoy細胞系為熟習此項技術者已知。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該真核細胞系統包含McCoy細胞系。同樣，黴漿菌抗原可為較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。

在本發明之一態樣中，黴漿菌細菌選自由以下組成之群：豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及牛黴漿菌。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該黴漿菌細菌選自由以下組成之群：豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及牛黴漿菌。較佳地，黴漿菌抗原可為較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在本發明之另一態樣中，黴漿菌細菌選自由以下組成之群：豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及其任何組合。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載

劑，其中該等黴漿菌細菌選自由以下組成之群：豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及其任何組合。較佳地，黴漿菌抗原可為較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養豬肺炎黴漿菌細菌；b) 獲得該等豬肺炎黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。較佳地，豬肺炎黴漿菌之抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活豬肺炎黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有豬肺炎黴漿菌抗原可為完整滅活豬肺炎黴漿菌死菌苗。

因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養豬鼻黴漿菌細菌；b) 獲得該等豬鼻黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。較佳地，豬鼻黴漿菌之抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活豬鼻黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有豬鼻黴漿菌抗原可為完整滅活豬鼻黴漿菌死菌苗。

因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養豬關節滑膜黴漿菌細菌；b) 獲得該等豬關節滑膜黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。較佳地，豬關節滑膜黴漿菌之抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活豬關節滑膜黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有豬關節滑膜黴漿菌抗原可為完整滅活豬關節滑膜黴漿菌死菌苗。

根據另一態樣，免疫組合物包含選自由以下組成之群之黴漿菌抗原：豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及其任何組合。至少上述用於製備黴漿菌免疫組合物之黴漿菌中之一者之細菌(例如豬肺炎黴漿菌或豬鼻黴漿菌或豬關節滑膜黴漿菌)係根據本發明在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養。較佳地，所有用於製備黴漿菌免疫組合物之黴漿菌細菌皆係根據本發明在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養。

因此，根據一態樣，本申請案提供製備包含豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及/或其任何組合之黴漿菌抗原的用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養至少一種選自由以下組成之群之黴漿菌細菌：豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌及豬關節滑膜黴漿菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。較佳地，所有黴漿菌細菌皆係根據本發明在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

因此，根據一態樣，本申請案提供製備包含豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及/或其任何組合之黴漿菌抗原的用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養至少豬肺炎黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。較佳地，所有豬肺炎黴漿菌細菌皆係根據本發明在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養。較佳地，至少一種豬肺炎黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活

豬肺炎黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有豬肺炎黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

因此，根據一態樣，本申請案提供製備包含豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及/或其任何組合之黴漿菌抗原的用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養至少豬鼻黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。較佳地，所有豬鼻黴漿菌細菌皆係根據本發明在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養。較佳地，至少一種豬鼻黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活豬鼻黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有豬鼻黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

因此，根據一態樣，本申請案提供製備包含豬肺炎黴漿菌、豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及/或其任何組合之黴漿菌抗原的用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養至少豬關節滑膜黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。較佳地，所有豬關節滑膜黴漿菌細菌皆係根據本發明在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養。較佳地，至少一種豬關節滑膜黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活豬關節滑膜黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有豬關節滑膜黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在本發明之一態樣中，免疫組合物經調配用於投與單一劑量。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞

系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該免疫組合物經調配用於投與單一劑量。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

有利地，本發明所提供實驗數據揭示，投與單一劑量之本發明免疫組合物可靠且有效地刺激保護性免疫反應。特定而言，已顯示針對豬鼻黴漿菌及豬肺炎黴漿菌之可量測抗體反應。

如本文所用術語「個體」係指動物，較佳係指哺乳動物，例如小鼠、大鼠、天竺鼠、兔、倉鼠、豬、綿羊、狗、貓、馬、猴或牛，且亦較佳係指人類。

在本發明之一態樣中，個體係豬。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該個體係豬。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在本發明之另一態樣中，個體係牛。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該個體係牛。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

苗。

在本發明之另一態樣中，個體係貓。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該個體係貓。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在本發明之另一態樣中，個體係狗。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該個體係狗。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

術語「醫藥上可接受之載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、包衣、穩定劑、稀釋劑、防腐劑、抗細菌及抗真菌劑、等滲劑、吸附延遲劑、佐劑、免疫刺激劑及其組合。

在本發明之一態樣中，醫藥上可接受之載劑係佐劑。

如本文所用「佐劑」可包括氫氧化鋁及磷酸鋁；皂苷，例如Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech公司，Cambridge MA)、GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals公司，Birmingham, AL)；油包水乳液；水包油乳液；水包油包水乳液。乳液可尤其基於輕質液體石蠟油(歐洲藥典類型(European

Pharmacopea type))；類異戊二烯油，例如角鯊烷或角鯊烯；由烯烴(尤其異丁烯或癸烯)寡聚產生之油；含有直鏈烷基之酸或醇之酯，更具體而言植物油、油酸乙酯、丙二醇二-(辛酸酯/癸酸酯)、甘油三-(辛酸酯/癸酸酯)或丙二醇二油酸酯；具支鏈脂肪酸或脂肪醇之酯，尤其異硬脂酸酯。油可與乳化劑組合使用以形成乳液。乳化劑較佳為非離子型表面活性劑，尤其山梨醇酐、二縮甘露醇(例如無水甘露醇油酸酯)、二醇、聚甘油、丙二醇與油酸、異硬脂酸、蓖麻油酸或羥基硬脂酸之視情況經乙氧基化之酯，以及聚氧丙烯-聚氧乙烯共聚物嵌段，具體而言普流尼克(Pluronic)產品，尤其L121。參見Hunter等人，*The Theory and Practical Application of Adjuvants* (編輯Stewart-Tull, D. E. S.)。John Wiley and Sons, NY，第51-94頁(1995)及Todd等人，*Vaccine* 15:564-570 (1997)。舉例而言，可使用M. Powell及M. Newman編輯之「*Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*」，Plenum Press, 1995第147頁闡述之SPT乳液及同一本書的第183頁闡述之乳液MF59。其他適宜佐劑尤其包括(但不限於)RIBI佐劑系統(Ribi公司)、嵌段共聚物(CytRx, Atlanta GA)、SAF-M (Chiron, Emeryville CA)、單磷醯脂質A、阿夫立定(Avridine)脂質-胺佐劑、來自大腸桿菌(*E. coli*，重組或其他)之不耐熱腸毒素、霍亂毒素、IMS 1314或胞壁醯二肽。在馬來酸酐與烯基衍生物之共聚物中包括共聚物EMA (Monsanto)，其為馬來酸酐與乙烯之共聚物。將該等聚合物溶解於水中產生酸溶液，較佳將其中和至生理pH以得到佐劑溶液，將免疫原性組合物、免疫組合物或疫苗組合物本身納入該佐劑溶液中。

佐劑之另一實例係選自丙烯酸系或甲基丙烯酸系聚合物及馬來酸酐與烯基衍生物之共聚物之化合物。有利的佐劑化合物係丙烯酸系或甲基丙

烯酸系聚合物，其尤其與糖或多元醇之聚烯基醚交聯。該等化合物被稱為術語卡波姆(carbomer) (Pharmeuropa，第8卷，第2期，1996年6月)。熟習此項技術者亦可參考美國專利第2,909,462號，其闡述與聚羥基化化合物交聯之該等丙烯酸聚合物，該聚羥基化化合物具有至少3個、較佳不多於8個羥基，至少3個羥基之氫原子經具有至少2個碳原子之不飽和脂肪族基團置換。較佳基團係彼等含有2至4個碳原子者，例如乙烯基、烯丙基及其他乙烯係不飽和基團。不飽和基團自身可含有諸如甲基等其他取代基。以名稱CARBOPOL[®] (BF Goodrich, Ohio, USA)出售之產品尤其適合。其係與聚烯基醚或二乙烯基二醇交聯或與烯丙基蔗糖或與烯丙基新戊四醇交聯之丙烯酸聚合物。尤其可提及CARBOPOL[®] 974P、934P及971P。最佳使用CARBOPOL[®] 971P。

較佳地，佐劑係以約100 µg至約10 mg/劑量之量添加。甚至更佳地，佐劑係以約100 µg至約10 mg/劑量之量添加。更佳地，佐劑係以約500 µg至約5 mg/劑量之量添加。更佳地，佐劑係以約750 µg至約2.5 mg/劑量之量添加。最佳地，佐劑係以約1 mg/劑量之量添加。

在本發明之較佳實施例中，佐劑選自由以下組成之群：氫氧化鋁、磷酸鋁、皂苷、油包水乳液、水包油乳液、水包油包水乳液、丙烯酸系或甲基丙烯酸系聚合物、馬來酸酐與烯基衍生物之共聚物、RIBI佐劑系統、嵌段共聚物、SAF-M、單磷醯脂質A、阿夫立定脂質-胺、來自大腸桿菌(重組或其他)之不耐熱腸毒素、霍亂毒素、IMS 1314、胞壁醯二肽及其組合。

因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真

核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該醫藥上可接受之載劑係佐劑。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在本發明之一態樣中，醫藥上可接受之載劑係水包油包水乳液或卡波姆。因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該醫藥上可接受之載劑係水包油包水乳液或卡波姆。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在本發明之一態樣中，水包油包水乳液係**Montanide ISA207 VG**。**Montanide ISA207 VG**係由無水甘露醇之油酸酯於非礦物油中之溶液組成之佐劑，且經設計以獲得水包油包水疫苗乳液。**Montanide ISA207 VG**為熟習此項技術者所熟知且可立即使用。

因此，根據一態樣，本申請案提供製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該醫藥上可接受之載劑係**Montanide ISA207 VG**或**CARBOPOL[®]**。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

本發明亦係關於如上文所述用於增強黴漿菌抗原之免疫原性之方法。有利地，本發明所提供實驗數據揭示，藉由上述方法提供之黴漿菌細菌抗原具有與自在無細胞培養系統中培養之黴漿菌細菌獲得之抗原相比增強之免疫原性。特定而言，基於MDCK之豬鼻黴漿菌疫苗顯示較早開始血清轉化、較大血清陽性豬數目及較高血清學效價。

因此，根據一態樣，本申請案提供增強抗原之免疫原性之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在本發明之一態樣中，抗原具有與自在無細胞培養系統中培養之黴漿菌細菌獲得之抗原相比增強之免疫原性。因此，根據一態樣，本申請案提供增強抗原之免疫原性之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該免疫組合物具有與包含自在無細胞培養系統中培養之黴漿菌細菌獲得之相同抗原之免疫組合物相比增強之免疫原性。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

如本文所用術語「增強之免疫原性」意指，由包含所關注抗原之免疫組合物引起之免疫反應比包含相同抗原之參照免疫組合物更增強，其中參照免疫組合物中之抗原係由在無細胞培養系統中培養之黴漿菌細菌製備。

術語「增強」意指該細胞及/或抗體介導之免疫反應比由包含相同抗

原之參照免疫組合物引發之細胞及/或抗體介導之免疫反應更增強至少10%、較佳至少20%、更佳至少30%、甚至更佳至少40%、甚至更佳至少50%、甚至更佳至少75%、最佳至少100%，其中參照免疫組合物之抗原係由在無細胞培養系統中培養之黴漿菌細菌製備。熟習此項技術者通常已知如何量測細胞及/或抗體介導之免疫反應。具體而言，該熟習此項技術者瞭解，可比較所關注免疫組合物之細胞介導之免疫反應與參照之細胞介導之免疫反應，或比較所關注免疫組合物與參照組合物之間之抗體介導之免疫反應，但不比較所關注免疫組合物之細胞介導之免疫反應與參照之抗體介導之免疫反應，或反之亦然。此外，細胞介導之免疫反應可藉由(例如)量測所關注免疫組合物/抗原對細胞毒性T細胞之活化作用來量測。抗體介導之免疫反應可藉由(例如)量測因向動物投與包含該抗原之免疫組合物而生成之抗原特異性抗體之量來量測。細胞及/或抗體介導之免疫反應可藉由(例如)使用小鼠模型、貓模型、牛模型或豬模型來量測。然而，應使用實例4及5中所述之分析作為參照分析，來檢測針對豬鼻黴漿菌及豬肺炎黴漿菌之免疫反應。

術語「相同抗原」意指抗原之性質相同。因此，若在減少血清真核細胞系統中產生之免疫組合物中之黴漿菌抗原係豬鼻黴漿菌之完整滅活死菌苗，則相同抗原意指無細胞系統之黴漿菌抗原亦係豬鼻黴漿菌之完整滅活死菌苗。此外，若在減少血清真核細胞系統中產生之免疫組合物中之黴漿菌抗原係根據特定方法製備或純化，則相同抗原意指無細胞系統之黴漿菌抗原係根據相同方法製備或純化。

術語「參照」免疫組合物係指並非根據本發明藉由在減少血清或無豬血清真核細胞系統中培養黴漿菌細菌獲得之免疫組合物。

相反，術語「參照」免疫組合物係指藉由在補充有使用相同抗原之血清之無細胞培養系統中培養黴漿菌細菌獲得之免疫組合物。在補充有血清之無細胞培養系統中培養黴漿菌細菌為熟習此項技術者所熟知。血清來源及血清濃度取決於欲培養之黴漿菌細菌以及欲獲得之黴漿菌細菌之產率。豬鼻黴漿菌、豬肺炎黴漿菌及豬關節滑膜黴漿菌一般係在補充有10-20% (v/v)豬血清及5-10% (v/v)酵母提取物之無細胞培養系統中培養以獲得高產率。然而，應理解，血清濃度可變，可除去酵母提取物且血清來源可變為(例如)胎牛血清或諸如此類。

本發明不僅提供如上文所定義之製備免疫組合物之方法或增強抗原之免疫原性之方法，其亦係關於可藉由如上文所述之方法獲得之免疫組合物。因此，在另一態樣中，本申請案係關於可藉由根據本發明且如本文所述之方法可獲得之免疫組合物。一般而言，該方法包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在本發明之一態樣中，免疫組合物顯示與包含抗原之參照免疫組合物相比增強之免疫原性，其中參照免疫組合物之抗原係由在無細胞培養系統中培養之黴漿菌細菌製備。

因此，根據另一態樣，本申請案提供可藉由包含以下之方法獲得之免疫組合物：a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑。根據另一態樣，該免疫組合物顯示與包含由在無細胞培養系統中培養之黴

漿菌細菌製備之相同抗原之參照免疫組合物相比增強之免疫原性。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在另一態樣中，免疫組合物包含該真核細胞系統中之真核細胞之組份。

術語「真核細胞之組份」包含完整細胞及該等真核細胞之碎片二者。術語「碎片」包含真核細胞之任何部分，例如作為整體或其部分之細胞膜或細胞內細胞器之部分。然而，術語碎片亦涵蓋該真核細胞中包含脂質、蛋白質、糖、DNA、RNA及諸如此類以及其組合之任何部分。此外，真核細胞之組份及黴漿菌抗原可分開存於免疫組合物中或彼此附接或其組合。

因此，根據一態樣，本申請案提供可藉由包含以下之方法獲得之免疫組合物：a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該免疫組合物包含該真核細胞系統中之真核細胞之組份。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

在另一態樣中，真核細胞之該等組份附接至黴漿菌抗原。

術語「附接的」係指真核細胞之該等組份對黴漿菌抗原之任何相互作用、締合、結合、附著或連接。因此，術語附接的涵蓋任何相互作用，包括間接或直接的、不可逆或可逆的、物理及化學的、靜電及/或共價鍵。因此，必須理解，真核細胞之組份可(例如)結合至黴漿菌抗原。然而，必須理解，真核細胞之組份亦可連接至黴漿菌抗原。該連接可藉由若

干種熟習此項技術者熟知之方法來產生，例如甲醛處理及諸如此類。

因此，根據一態樣，本申請案提供可藉由包含以下之方法獲得之免疫組合物：a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中真核細胞之該等組份附接至黴漿菌抗原。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

通常，在使用細菌抗原(該黴漿菌死菌苗)時，免疫組合物含有約 $10^{<3>}$ 至約 $10^{<10>}$ 菌落形成單位(CFU)之細菌抗原/劑量、較佳約 $10^{<4>}$ 至約 $10^{<9>}$ CFU之細菌抗原/劑量、更佳約 $10^{<5>}$ 至約 $10^{<6>}$ CFU之細菌抗原/劑量之量。若在免疫組合物中使用滅活死菌苗，則CFU值係指黴漿菌細菌在滅活之前之量。

舉例而言，本發明之包含豬肺炎黴漿菌抗原之免疫組合物較佳以約 $10^{<2>}$ 至約 $10^{<10>}$ CFU/劑量、較佳約 $10^{<3>}$ 至約 $10^{<9>}$ CFU/劑量之量使用，甚至更佳以約 $10^{<4>}$ 至約 $10^{<8>}$ CFU/劑量之量使用，最佳以約 $10^{<5>}$ 至約 $10^{<7>}$ CFU/劑量之量使用。本發明之包含豬鼻黴漿菌抗原之免疫組合物較佳以約 $10^{<2>}$ 至約 $10^{<10>}$ CFU/劑量、較佳約 $10^{<3>}$ 至約 $10^{<9>}$ CFU/劑量之量使用，甚至更佳以約 $10^{<4>}$ 至約 $10^{<8>}$ CFU/劑量之量使用，最佳以約 $10^{<5>}$ 至約 $10^{<7>}$ CFU/劑量之量使用。本發明之包含豬關節滑膜黴漿菌抗原之免疫組合物較佳以約 $10^{<2>}$ 至約 $10^{<10>}$ CFU/劑量、較佳約 $10^{<3>}$ 至約 $10^{<9>}$ CFU/劑量之量使用，甚至更佳以約 $10^{<4>}$ 至約 $10^{<8>}$ CFU/劑量之量使用，最佳以約 $10^{<5>}$ 至約 $10^{<7>}$ CFU/劑量之量使用。

因此，根據一態樣，本申請案提供用於提供免疫組合物之方法，其包含a) 在減少血清或不含豬血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；b) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及c) 添加醫藥上可接受之載劑，其中該免疫組合物含有約 10^3 至約 10^{10} 菌落形成單位(CFU)之細菌抗原/劑量之量。較佳地，至少一種黴漿菌抗原係較佳經福馬林滅活之完整滅活黴漿菌死菌苗。應理解，僅一種、一些或所有黴漿菌抗原可為完整滅活死菌苗。

熟習此項技術者理解，可組合用於提供如本文所述之免疫組合物之方法之各個過程步驟以實踐如本文所述之本發明。

【實施方式】

實例

以下實例僅意欲闡釋本發明。其決不應限制申請專利範圍之範疇。

實例1

分別在MDCK細胞或McCoy細胞中之黴漿菌細菌之培養。

A. 在MDCK細胞中之豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及豬肺炎黴漿菌之培養

豬鼻黴漿菌：

將匯合T75燒瓶之MDCK細胞用胰蛋白酶處理，並使用MEM + 5% FBS繼代培養至5個T150燒瓶(1:10分裂)中。將燒瓶在 37°C + 5% CO_2 下培育直至觀察到約95-100%匯合單層為止。倒出培養基並將燒瓶用1 × PBS沖洗兩次。然後將4-5 ml豬鼻黴漿菌添加至每一燒瓶(MOI=10-100)。在與上文相同之培育條件下將燒瓶感染不超過2小時。在感染期後，將升溫至約 37°C 之足量感染培養基(MEM + 2% FBS)添加至每一燒瓶中至每一燒

瓶中60 ml之總體積。然後培育燒瓶直至記錄到> 90% CPE為止(約3-7天)。然後自每一燒瓶收集細胞懸浮液並彙集在一起(傳代n次)。然後使用此材料以與先前感染相同之方式感染95-100%匯合MDCK細胞之新燒瓶(傳代n + 1次)，增加所用燒瓶數以獲得認為需要之足夠最終體積(傳代n + 2次，傳代n + 3次等)。

豬關節滑膜黴漿菌

豬關節滑膜黴漿菌係以與豬鼻黴漿菌相同之方式培養，但略有不同：感染培養基含有DMEM + 2% FBS + 1%精胺酸溶液；豬關節滑膜黴漿菌通常不展現CPE，故培養基之顏色變化及濁度係繼代培養至下一代之關鍵指示劑。

豬肺炎黴漿菌

豬肺炎黴漿菌係以與豬鼻黴漿菌相同之方式培養。端視用於感染之菌株，CPE可存在或可不存在。因此，可使用培養基之顏色變化及濁度作為繼代培養至下一代之指示劑。

B. 在McCoy細胞中用於豬鼻黴漿菌、豬關節滑膜黴漿菌及豬肺炎黴漿菌之培養條件

豬鼻黴漿菌：

McCoy細胞係以懸浮培養物形式在攪拌燒瓶中在補充有10% FBS之改良EMEM中生長。藉由接種新燒瓶以具有 10^5 - 10^6 細胞/ml之最終計數來對細胞進行繼代培養。對於豬鼻黴漿菌，以 10^5 - 10^6 細胞/ml在3 L燒瓶中接種500 ml細胞，其中1 ml為 10^7 - 10^8 CFU。然後將燒瓶在37°C及5% CO₂存在下在磁性攪拌板上培育3-7天。黴漿菌生長係藉由明顯酸性pH變化及濁度之增加來確定。亦藉由PFU分析測定計數來評估黴漿菌生長。

豬關節滑膜黴漿菌

豬關節滑膜黴漿菌係以與豬鼻黴漿菌類似之方式來培養。以 10^5 - 10^6 細胞/ml在3 L燒瓶中接種500 ml細胞，其中1 ml為 10^5 - 10^7 CFU。然後將燒瓶在37°C及5% CO₂下在磁性攪拌板上培育約2週。除了使用PFU分析測定計數以外，使用pH變化及濁度之增加二者來測定生長。

豬肺炎黴漿菌

豬肺炎黴漿菌係以與豬鼻黴漿菌及豬關節滑膜黴漿菌相同之方式來培養。以 10^5 - 10^6 細胞/ml在3 L燒瓶中接種500 ml細胞，其中1 ml為 10^5 - 10^7 CFU。然後將燒瓶在37°C及5% CO₂下在磁性攪拌板上培育約2週。除了使用PFU分析測定計數以外，可使用pH變化及濁度之增加二者來測定生長。

C. 使用各種血清型之黴漿菌之培養

為評估是否可在不同來源之不同血清型中培養黴漿菌，用豬鼻黴漿菌感染MDCK細胞且分別在胎牛血清、豬血清、兔血清、雞血清或馬血清中培養。豬鼻黴漿菌在MDCK細胞中之培養係如上文所述來實施(5%血清用於細胞生長且2%血清用於感染)。為測試是否可在不同血清型中培養黴漿菌，根據標準方法用豬鼻黴漿菌感染MDCK細胞並在感染後4天採集。實施CCU (顏色變化單位)分析以測定豬鼻黴漿菌之活效價。此外，實施qPCR (定量即時聚合酶鏈式反應)以測定豬鼻黴漿菌之總基因組含量。

表1：使用各種血清型之豬鼻黴漿菌之培養

血清型	qPCR log (gc/μl)	CCU50 (log/ml)
胎牛血清	6.15	8.00
豬血清	6.06	8.50
兔血清	6.11	8.33
雞血清	6.31	8.00
馬血清	6.49	9.00

表1顯示，藉由CCU分析或qPCR量測之各種血清型之效價類似。此外，西方墨點法(western blot)數據(未顯示)支持此數據。因此，不管使用何種血清型進行培養，皆可在MDCK細胞中培養豬鼻黴漿菌。

實例2

疫苗之製備。

在最終代備妥以採集(存在>90% CPE)時，藉由以下方式對所有燒瓶實施單一冷凍-解凍循環：將其置入< -60℃ 冷凍器中保持>2小時，在37℃下快速解凍，收集並彙集裂解物，並上下抽吸若干次以勻漿。概言之，然後將10-20%甘油添加至此懸浮液中並使其勻漿。然後將此懸浮液備妥以等分為工作體積。將母液保持在< -60℃下直至需要。

用0.2%福馬林將適當體積之上述母液滅活。在疫苗摻和時用亞硫酸氫鈉中和過量福馬林。將疫苗與 Montanide ISA 207 VG 佐劑或與 Carbopol 佐劑摻和。將疫苗儲存在2-7℃下。

實例3

對疫苗有效性之評價。

在豬中之投與後，基於誘導抗體反應之能力(以及藉由ELISA之效價)評估疫苗效能。

動物照護

在開始研究之前，動物處於良好健康及營養狀態。在隨機化程序之前實施健康檢查。在整個研究期間使用不加藥飼料。根據設施標準操作程序，飼量適合於測試動物之年齡、情況及物種。在整個研究期間隨意提供水。

在豬中之投與後對豬鼻黴漿菌及豬肺炎黴漿菌疫苗之有效性之評價。

豬鼻黴漿菌：

在D0以及在D21向6週 ± 5日齡習用仔豬之所有動物肌內投與2 ml劑量(7.1-7.3 log₁₀ CCU/劑量)之豬鼻黴漿菌疫苗。如上文所述在MDCK細胞中培養豬鼻黴漿菌。疫苗加有Montanide ISA207VG或CARBOPOL[®]佐劑。使用PBS作為安慰劑。每天觀察豬之一般健康。在疫苗接種之前在D0、7、14、21、28、35及42收集血液。藉由BIVI R&D間接ELISA測試血清之豬鼻黴漿菌特異性抗體。對於BIVI R&D ELISA，認為> 0.200之S/P比率為陽性。

如表2中所示，豬鼻黴漿菌ELISA指示強抗體反應。在第一劑量後兩週(D14)，6/6只(100%)豬鼻黴漿菌-MDCK + Montanide ISA207VG疫苗接種動物為陽性。至D42所有動物皆保持陽性，且在第二劑量後一週(D28)記錄到效價加強。經豬鼻黴漿菌-MDCK + Carbopol疫苗接種之動物亦顯示抗體反應。

表2：豬鼻黴漿菌ELISA結果

	Pre	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
豬 鼻 黴 漿 菌 MDCK + Montanide ISA207VG	0.00	0.003	0.043	0.972	1.123	1.340	1.152	1.133
豬 鼻 黴 漿 菌 MDCK + CARBOPOL [®]	0.002	0.018	0.059	0.095	0.122	0.354	0.375	0.409
安慰劑(PBS)	0.001	0.005	0.011	0.015	0.021	0.031	0.057	0.070

在McCoy細胞中培養豬鼻黴漿菌獲得類似的疫苗接種後抗體反應結果，數據未顯示。在投與單一劑量後獲得類似結果，數據未顯示。

豬肺炎黴漿菌

在D0以及在D21向6週 ± 5日齡習用仔豬之所有動物肌內投與2 ml劑量(8.0-8.5 log10 CCU/劑量)之豬肺炎黴漿菌疫苗。疫苗加有Montanide ISA207VG佐劑。使用PBS作為安慰劑。每天觀察豬之一般健康。在疫苗接種前在D0、7、14、21、28、35及42收集血液用於藉由市售IDEXX ELISA測試豬肺炎黴漿菌抗體之存在。對於IDEXX ELISA，認為> 0.400之S/P比率為陽性。

如表3中所示，豬肺炎黴漿菌ELISA指示強抗體反應。對於豬肺炎黴漿菌MDCK + ISA207疫苗接種動物，在D14有3/6只(50%)動物為陽性，且在D21有5/6只(83.3%)為陽性，且在D28、35及42有6/6只(100%)為陽性。

表3：豬肺炎黴漿菌IDEXX ELISA結果

	Pre	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
豬肺炎黴漿菌 MDCK + Montanide ISA207VG	-0.024	-0.022	0.034	0.601	0.949	1.775	1.986	1.895
安慰劑(PBS)	-0.019	0.011	-0.021	-0.015	-0.025	-0.025	0.016	0.016

在投與單一劑量後獲得類似結果，數據未顯示。

實例4

自在真核細胞系中培養之黴漿菌細菌獲得之疫苗對自在無細胞系統中培養之黴漿菌細菌獲得之疫苗之有效性。

將54只8週 ± 5日齡之CD/CD動物分為六組。組V1及V2各自分別接受在MDCK細胞及CM（複合培養基；例如含有豬血清及酵母提取物之基於蛋白胨蛋白朊之培養基或基於弗瑞斯(Friis)之培養基)中培養之豬鼻黴漿菌之滅活MHRN001分離物；組V3及V4分別接受在MDCK細胞及CM中培養之豬鼻黴漿菌之滅活MHRN002分離物。所有疫苗皆加有Montanide ISA207VG佐劑；劑量及途徑為肌內注射2 × 2 ml劑量，在D0給予一個劑量，且在D21給予第二劑量。組CC（對照組）以相同方式接受無抗原安慰劑(PBS)。組SC（嚴格對照）在整個研究中不接受處理，用作嚴格對照動物。在D42、43及44，用有毒力豬鼻黴漿菌激發組V1-V4及CC中之豬。投與劑量及途徑分別為40 ml腹膜內、15 ml靜脈內及15 ml鼻內。自D0至研究結束時(D58)每週收集血液用於豬鼻黴漿菌特異性ELISA測試。對於R&D豬鼻黴漿菌ELISA，認為> 0.200之S/P比率為陽性。組SC中之所有豬在整個研究中皆保持陰性，表明其未暴露於豬鼻黴漿菌。組V1-V4及CC在D0及7為陰性。然而，在基於CM之疫苗與基於MDCK之疫苗之間，

血清學結果顯著變化。在與基於CM之疫苗相比時，基於MDCK之疫苗顯示較早開始血清轉化、較大血清陽性豬數目及較高血清學效價。

表4：豬鼻黴漿菌ELISA結果

各組之豬鼻黴漿菌ELISA平均S/P比率									
組	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
安慰劑(CC)	0.004	0.004	0.009	0.023	0.021	0.029	0.031	0.262	0.433
嚴格對照(SC)	-0.003	-0.002	-0.003	0.005	0.008	0.015	0.021	0.031	0.060

此外，實施滴定實驗以證實，與來自在無細胞系統中培養之黴漿菌細菌之疫苗相比，基於細胞培養物之疫苗產生更佳血清學結果。

豬鼻黴漿菌分別係如上文所述在McCoy細胞中培養，或在CM（複合培養基）中培養。

用McCoy抗原使用皆1:1摻和Montanide ISA207VG佐劑之未稀釋抗

原(完全)、1:10抗原及1:100抗原製備疫苗。以相同方式製備使用CM源抗原之疫苗。

在第0天用IM投與之單一2 mL劑量對豬(在疫苗接種時三週齡)進行疫苗接種。

組平均值在激發前(D0-D21)皆為「陰性」，但完全及1:10 McCoy顯示趨向陽性之反應。在激發後一週(D28)，除了CM 1:100以外所有疫苗接種組皆有反應。

自表5可瞭解，每一抗原類型(McCoy、CM)展現標準滴定效應(完全>1:10>1:100)。此外，自表5可瞭解，完全及1:10 McCoy疫苗接種物之平均分高於完全CM抗原，且在D42之結束前始終如此。技術上，唯一具有陽性(S/P ≥ 0.200)激發後平均值之組係完全及1:10 McCoy組。因此McCoy完全疫苗及1:10稀釋液顯示血清反應在激發前及在激發後皆高於CM完全疫苗。此外，McCoy 1:100仍在顯示與安慰劑(非疫苗接種物)及CM 1:100組(CM 1:100反應或其缺乏等效於非疫苗接種物)不同之反應。

表5：豬鼻黴漿菌ELISA結果

各組之豬鼻黴漿菌ELISA平均S/P比率							
組	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
McCoy + ISA完全	0.002	0.012	0.032	0.117	0.312	0.298	0.325
McCoy + ISA 1:10	0.000	0.005	0.065	0.107	0.291	0.193	0.221
McCoy + ISA 1:100	0.001	0.001	-0.001	0.000	0.145	0.118	0.150
CM + ISA完全	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
安慰劑：PBS + ISA	-0.001	0.002	-0.002	-0.002	0.021	0.039	0.081
嚴格對照	-0.002	-0.001	-0.002	-0.002	-0.002	0.008	0.024



公告本

I660736

【發明摘要】

申請日：102年12月27日

※ I P C: A61K 39/02 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/35 (2006.01)

【中文發明名稱】

黴漿菌疫苗之製備方法

【英文發明名稱】

METHOD OF MAKING A MYCOPLASMA VACCINE

【中文】

本發明尤其係關於製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含在減少血清或無豬血清真核細胞系統中培養黴漿菌細菌；獲得該等黴漿菌細菌之抗原；及添加醫藥上可接受之載劑。此外，本發明係關於可藉由該方法獲得之免疫組合物及對個體進行免疫之方法，該方法包含將該免疫組合物投與個體。

【英文】

The present invention relates i.a. to a method for the preparation of an immunogenic composition for the treatment and/or prophylaxis of mycoplasma infections in a subject comprising the cultivation of mycoplasma bacteria in a serum-reduced or swine serum-free, eukaryotic cell system; obtaining an antigen of the mycoplasma bacteria; and addition of a pharmaceutically acceptable carrier. Further, the present invention relates to the immunogenic composition obtainable by said method and a method for immunizing a subject comprising the administration of said immunogenic composition to a subject.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種製備用於治療及/或預防個體之黴漿菌感染之免疫組合物之方法，其包含：

a.) 在減少血清之真核細胞系統中培養黴漿菌細菌，其中該黴漿菌為豬鼻黴漿菌(*M. hyorhinis*)；及

b.) 獲得該等黴漿菌細菌之抗原，其中該抗原係完整滅活死菌苗(bacterin)。

【第2項】

如請求項1之方法，其中該血清不含豬血清。

【第3項】

如請求項1之方法，其中該等黴漿菌細菌係在不存在血清下培養。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之方法，其中該免疫組合物係黴漿菌免疫組合物。

【第5項】

如請求項1至3中任一項之方法，其中該抗原具有比自無細胞培養系統中培養之黴漿菌細菌獲得之抗原更增強之免疫原性。

【第6項】

如請求項1之方法，其中該完整滅活死菌苗係福馬林滅活死菌苗。

【第7項】

如請求項1至3及6中任一項之方法，其中該免疫組合物經調配用於投與單一劑量。

【第8項】

如請求項1至3及6中任一項之方法，其中該個體係豬。

【第9項】

如請求項1至3及6中任一項之方法，其中該個體係牛。

【第10項】

如請求項1至3及6中任一項之方法，其中該個體係貓。

【第11項】

如請求項1至3及6中任一項之方法，其中該個體係狗。

【第12項】

如請求項1至3及6中任一項之方法，其進一步包含添加醫藥上可接受之載劑，其中該醫藥上可接受之載劑係選自由以下組成之群：溶劑、分散介質、包衣、穩定劑、稀釋劑、防腐劑、抗細菌及抗真菌劑、等滲劑、吸附延遲劑、佐劑、免疫刺激劑及其組合。

【第13項】

如請求項12之方法，其中該醫藥上可接受之載劑係選自由以下組成之群之佐劑：氫氧化鋁、磷酸鋁、皂苷、油包水乳液、水包油乳液、水包油包水乳液、丙烯酸系或甲基丙烯酸系聚合物、馬來酸酐與烯基衍生物之共聚物、RIBI佐劑系統、嵌段共聚物、SAF-M、單磷醯脂質A、阿夫立定(Avridine)脂質-胺、來自大腸桿菌(E. coli)之不耐熱腸毒素、霍亂毒素、IMS 1314、胞壁醯二肽及其組合。

【第14項】

如請求項13之方法，其中該醫藥上可接受之載劑係水包油包水乳液或卡波姆(carbomer)。

【第15項】

如請求項1至3及6中任一項之方法，其用於提高抗原之免疫原性。

【第16項】

如請求項15之方法，其中該抗原具有比自無細胞培養系統中培養之黴漿菌細菌獲得之抗原更增強之免疫原性。