

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 108546A

(51) A61D 1/00



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

<p>(21) Заявителски № 108546 (22) Заявено на 26.01.2004 (24) Начало на действие на патента от:</p> <p style="text-align: center;">Приоритетни данни</p> <p>(31) 302636 (32) 02.07.2001 (33) US</p> <p>(41) Публикувана заявка в бюлетин № 2 28.02.2005 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници:</p> <p>(62) Разделена заявка от рег. №</p>	<p>(71) Заявител(и): PFIZER PRODUCTS INC. , , , 06340 GROTON , EASTERN POINT ROAD CONNECTICUT (US) ; (72) Изобретател(и): KEICH , Robin L . , 06340 Groton CONNECTICUT (US) ; SABBADINI , Lisa G . , 06340 Groton CONNECTICUT (US) ; (74) Представител по индустриална собственост: Румяна Стефанова Слабова , 1124 София , ул. "Леонардо да Винчи" 3</p> <p>(86) № на PCT заявка: PCT/ IB2002 / 002121 , 07.06.2002 (87) № и дата на PCT публикация: WO2003 / 003941 , 16.01.2003</p>
---	--

(54) ИЗПОЛЗВАНЕ НА ЕДНОКРАТНА ВАКСИНА ОТ MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

(57) Изобретението се отнася до използване на еднократна ваксина от Mycoplasma hyopneumoniae за лечение или профилактика на заболявания или нарушения причинени от инфекция с Mycoplasma hyopneumoniae (M. hyo) при животни. На животно на възраст приблизително от 3 до 10 дни се прилага еднократна доза ефективно количество ваксина от M. hyo. М. Ваксината може да е от пълен или частично клетъчно инактивиран или модифициран жив препарат, субединична ваксина или нуклеинова киселина, или ДНК ваксина. М. hyo ваксината може да се синтезира или да се получи рекомбинантно.

15 претенции , 0

BG 108546A

2735/03-PC

ИЗПОЛЗВАНЕ НА ЕДНОКРАТНА ВАКСИНА ОТ MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Изобретението се отнася до използване на еднократна ваксина от *Mycoplasma hyopneumoniae* за лечение на или предпазване от заболяване или нарушения при животни, причинени от инфекция с *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), като на животно на възраст от приблизително три (3) до приблизително десет (10) дни се прилага еднократна доза на ефективно количество ваксина от M. hyo. M. hyo ваксината може да е от пълен или частично клетъчно инактивиран или модифициран жив препарат, субединична ваксина, или нуклеинова киселина или ДНК ваксина. M. hyo ваксината, приложена съгласно настоящото изобретение, може да се синтезира или да се получи рекомбинантно.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

M. hyo е бактериален патоген, който причинява ензоотична пневмония при свине. Ензоотичната пневмония е хронично заболяване, което води до слабо преработване на храната, задържан растеж и предразположение към вторични белодробни инфекции. *M. hyo* лесно се предава посредством секретите на респираторния тракт и посредством свиня-към-прасенце, и силно преобладаващо в свинефермите. Приблизително 99% от стадата от свине в САЩ са инфектирани, което струва на свиневъдната индустрия приблизително 300 милиона \$ годишно.

Преобладаващото количество известни ваксини срещу *M. hyo* са основани върху препарати на *M. hyo* от инактивирани цели клетки с инертен пълнител. Освен това, ваксините на основата на имуногенни пептиди или протеини могат да се синтезират или да се получат чрез клониране и рекомбинантна експресия на гени на *M. hyo*. Гени на *M. hyo*, способни да експресират такива полипептиди или протеини *in vivo* също могат да се използват като ваксини.

Примери за ваксини с цели инактивирани клетки на *M. hyo* включват RESPISURE и STELLAMUNE, достъпни в търговската мрежа на Pfizer Inc., USA.

Освен това са описани известен брой рекомбинантно продуцирани полипептиди и протеини на *M. hyo*, които могат да се използват, като субединични ваксини. Публикация на Международен Патент WO96/28472 описва шест вида антигенни протеини от *M. hyo* с молекулни тегла от 46-48, 52-54, 60-64, 72-75, 90-94 и 110-114 килодалтона, и описва частични протеиниви последователности от 52-54, 60-64 и 72-

75 килодалтона антигени и пълна дължина на нуклеотидни и аминокиселинни последователности на 46-48 килодалтона антиген.

Клонирането на гена, кодиращ *M. hyo* протеин P46, т.е., p46, също са описва от Futo et al., (1995; J. Bacteriol 177:1915-1917). Същата група показва, че *in vitro* експресираният генен продукт се използва за диагностициране на отговорите на антителата на *M. hyo* инфекции, без да реагират кръстосано с други *Mycoplasma species* (Futo et al., 1995, J. Clin. Microbiol. 33:680-683). Последователностите и диагностичното използване на p46 гена, описани от Futo et al., са описани също така в Публикация на Европейски Патент № 0 475 185 A1.

Wise et al., (1987, J. Bacteriol., 169-5546-5555) съобщават, че съществуват четири вида интегрални мембранни протеина в *M. hyo*, наречени p70, p65 (P65, по-горе), и p50 и p44, и че последните три протеина са модифицирани чрез ковалентно липидно свързване и индуцират силен хуморален отговор. Предпазните ефекти на именния отговор не са изследвани. Генът кодиращ P65 протеина са клонирани и неговите последователности и използването им във ваксини и диогностики са описани в патент на САЩ № 5,788,962.

Публикация на Международен Патент WO 91/15593 описва пет протеина на *M. hyo* с явно молекулно тегло от 105, 90, 85, 70 и 43 килодалтона. Последователността в цялата пълна дължина на гена кодиращ 85 килодалтона протеин (протеинС) се предоставя, както и частичните нуклеотидни последователности, кодиращи другите четири протеина.

Патент на САЩ № 5,252,328 на Faulds описва аминокислотни последователности на имунореактивни протеини на *M. hu*, молекулните тегла на които са 36, 41, 44, 48, 64, 68, 74,5, 79, 88,5, 96 и 121 килодалтона. Други протеини, идентифицирани на основата на електрофоретичната подвижност, но за които не са описани протеинови последователности, имат явно молекулно тегло от 22,5, 34 и 52 килодалтона. Докато патент на САЩ № 5,252,328 предлага използването на тези протеини в лекарствени форми на ваксини, не се докладват резултати от изпитания на ваксините.

Публикация на Международен Патент WO 95/09870 описва биохимични методи за пречистване на адхезин от *M. hu*, микоплазмени интегрални мембранни протеини, отговорни за адхезията към силите на горния епител на гостоприемниците. WO 95/09870 предлага, също така, опити и използвания за тези протеини, например, при ваксини и диагностика.

Опитен доклад на King et al., (1997; Vaccine 15:25-35) описва Mhr1, адхезин от 124 килодалтона, който е щам на вариант на P97.

Вариант от P97 килодалтона на P97 се идентифицира от Wilton et al., (1998, Microbiology 144:1931-1943). Допълнително, p97 ген е показан, като част от оперон, който също кодира втори протеин, наречен P102, с предсказано молекулно тегло от приблизително 102 килодалтона (Hsu et al., 1998q Gene 214:13-23). Minion and Hsu подсказват използването на P102 във ваксини в Публикация на Международен Патент WO 99/26664, но не описват опити с ваксини.

Нито една от известните ваксини на *M. hyo* не е описана, като ефективна при лечение на свине с еднократни дози, при приблизително 3 до 10 дневна възраст. Такава ваксина би елиминирала необходимостта от многократно дозиране, и следователно, значително намаляване на себестойността и труда, свързани с световното масивно ваксиниране на стада от свине. Следователно, съществува необходимост от ефективна *M. hyo* ваксина, която да може да се прилага на свинете като еднократна доза на ваксина, от приблизително 3 до приблизително 10 дневна възраст, за предотвратяване на заболяване или нарушения, причинени от *M. hyo*.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение се отнася до използване на *Mycoplasma hyopneumoniae* за лечение или предпазване от заболяване или нарушение при животно от инфекция, причинена с *Mycoplasma hyopneumoniae*, като се прилага на животното на възраст от приблизително 3 до приблизително 10 дни, ефективно количество от еднократна доза на ваксина на *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Използването, съгласно изобретението, елиминира необходимостта от прилагане на допълнителни дози, с цел да се генерира и/или да се поддържа имунитета срещу *M. hyo*. Настоящото използване на единично еднократно (едно) ваксиниране предоставя защита на двете, и серонегативни и серопозитивни прасета срещу вирулентен *M. hyo*. Използването, съгласно настоящото изобретение, е ефективно при лечение или предпазване от симптомите,

причинени от *M. hyo*, включително, например, предпазване и намаляване на лезии на белите дробове при свине.

Използването, съгласно настоящото изобретение, включва прилагане на свинете на ефективно количество единична доза от *M. hyo* ваксина, при което *M. hyo* ваксината съдържа цял или частичен клетъчен препарат, като бактерин или модифициран жив препарат, субединична ваксина, като субединична ваксина, която съдържа един или повече произлизащи от *M. hyo* полипептида или протеина, имуногенни фрагменти на такива полипептиди или протеини, или един или повече гена на *M. hyo*, кодиращи такива протеини, полипептиди или имуногенни фрагменти, чиито гени или нуклеинови киселини са способни да се експресират *in vivo*. Полипептидите на *M. hyo*, протеините, неговите имуногенни фрагменти или нуклеинови киселини, осигурени от *M. hyo* ваксината, могат да са синтезирани или да се продуцират рекомбинантно, при използване на техники, добре известни от предшестващото състояние на техниката.

M. hyo ваксината, приложена съгласно настоящото изобретение, може да включва допълнителни съставки, като инертен пълнител. Различни инертни пълнители, които могат да се използват включват тези, описани в настоящото и тези, известни от предшестващото състояние на техниката.

ПОДРЕБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Насатоящото изобретение обхваща използването за лечение или предпазване от заболяване или нарушения при животни, причинени от инфекция с *Mycoplasma hyopneumoniae*, при което се прилага на животното на възраст

от приблизително 3 до приблизително 10 дни, ефективно количество от еднократна доза на *Mycoplasma hyopneumoniae* ваксина.

Използването на еднократно прилагане на ваксина на настоящото изобретение, елиминира необходимостта от прилагане на допълнителни дози, с цел да се генерира и/или да се поддържа имунитета срещу *M. hyo.*

За яснота на описанието, а не с цел ограничаване, подробното описание на изобретението се разделя на следните подраздели, които описват или илюстрират някои характеристики, варианти за изпълнение или приложения на изобретението.

При някои варианти за изпълнение на изобретението, използваните ваксини от настоящото изобретение включват частични или цели клетки на *M. hyo* инактивиран препарат (бактерин) или модифицирана жива ваксина и фармацевтично приемлив носител, или частични или цели клетки на *M. hyo* инактивиран препарат (бактерин) или модифицирана ваксина и инертен пълнител.

При други специфични варианти за изпълнение на изобретението, използваните ваксини от настоящото изобретение включват имуногенен протеин или полипептид или негов фрагмент и фармацевтично приемлив носител, или имуногенен протеин или полипептид или негов фрагмент и инертен пълнител.

ДЕФИНИЦИИ И СЪКРАЩЕНИЯ

Терминът "лечение или предпазване" по отношение на *M. hyopneumoniae* инфекция, както се използва в настоящото,

означава да се инхибира репликацията на *M. hyorheumoniae* бактерията, да се инхибира предаването на *M. hyorheumoniae*, или да се предпази от самостоятелното установяване на самата *M. hyorheumoniae* в гостоприемника, и да се облекчат симптомите на заболяването или на нарушенията, причинени от инфекция с *M. hyorheumoniae*. Лечението се приема, като терапевтично, ако има редуциране на бактериалния товар, намаляване на белодробната инфекция и/или увеличаване на поеманата храна и/или растеж. Използването при настоящото изобретение е, например, ефективно за предпазване или редуциране на белодробни лезии.

Терминът "M. hyo ваксина", както се използва в настоящото, се отнася до ваксина, полезна за предпазване или лечение на нарушения, причинени от инфекция с *M. hyo*. *M. hyo* ваксината може да включва каквато и да е ваксина, ефективна при лечение или предпазване от инфекция от *M. hyo* при свине. *M. hyo* ваксината, която може да се използва в настоящото изобретение, може да включва, например, цял или частичен *M. hyo* клетъчен препарат, инактивирани или живи ваксини, субединична ваксина притежаваща един или повече полипептиди или протеини, произлезли от *M. hyo*, или имуногенни фрагменти на такива протеини или полипептиди, или един или повече гени или нуклеинови киселини на *M. hyo*, кодиращи един или повече полипептиди или протеини, произлезли от *M. hyo*, или негови имуногенни фрагменти, и които гени или нуклеинови киселини са способни да се експресират *in vivo* при свине. *M. hyo* полипептидите, протеините, имуногенните фрагменти на такива полипептиди и

протеини, или гени или нуклеинови киселини на *M. hyo*, могат да се синтезират или да се получат рекомбинантно при използване на техники, известни от предшестващото състояние на техниката. За предпочитане, *M. hyo* ваксината, използвана в настоящото изобретение е бактерин.

Терминът “животно”, както се използва в настоящото, се отнася до всички животни не-хора, включително бозайници.

Терминът “прасе”, както се използва в настоящото, се отнася до прасенца, свине, прасета, свинско, майки прасета, млади женски свине, къстриран шопар, глигани или членове на семейство Suidae.

За предпочитане, използването, съгласно настоящото изобретение се прилага на животно бозайник, който не е човек; по-предпочитано прасе.

Терминът “бактерин”, както се използва в настоящото, се отнася до препарат от инактивирани цели или частични *M. hyo* клетки, подходящи за използване като ваксина.

Терминът “ефективно количество” се отнася до такова количество *M. hyo* ваксина, достатъчно да предизвика имунен отговор в субект, на който е приложена. Имунният отговор може да включва, без ограничения, индуциране на вроден, клетъчен и/или хуморален имунитет.

ИНАКТИВИРАНИ (ЧАСТИЧНИ ИЛИ ЦЕЛИ КЛЕТКИ) И МОДИФИЦИРАНИ ЖИВИ ВАКСИНИ

Използване на конвенционални инактивирани или модифицирани живи ваксини, които се използват в настоящото изобретение са известни от предшестващото състояние на техниката.

М. hyo бактерини, които могат да се използват в настоящия метод за ваксиниране с еднократна доза могат да се получат от различни, достъпни за обществеността източници. Например, М. hyo бактерии могат да се приготвят от М. hyo изолати. Многобройни М. hyo изолати са известни на специалистите в областта и са достъпни от, например, American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manasses, VA 20110-2209. те включват, например, ATCC № 25095, 25934 и 27715.

М. hyo изолати могат да се получат, също така, директно от естествено или експериментално инфектирани лезии на бели дробове на прасенца, при използване на известни техники.

М. hyo изолати могат да се инактивират при използване на разнообразие от известни методи, например, чрез третиране на бактериалния изолат с бенарен етиленамин (BEI), както е описано в патент на САЩ № 5,565,205, или инактивиране с, например, формалин, топлинно, BPL, облъчване или glutaraldehyde.

М. hyo бактерии, подходящи за използване в настоящото изобретение, могат да се получат, също така, посредством различни търговски източници. Такива източници включват, без да се ограничават до: RESPIFEND (Fort Dodge, American Home Products), HYORESP (Meriel Ltd), M + PAC (Searching Plough), PROSYSTEM M (Intervet), INGLEVAC M (Boehringer), RESPISURE (Pfizer Inc.), and STELLAMUNE MYCOPLASMA (Pfizer Inc.).

Предпочитан източник на *M. hyo* бактерин за използване в настоящото изобретение е RESPISURE и STELLAMUNE MYCOPLASMA.

По-предпочитано предпочетен източник на *M. hyo* бактерин, за използване в настоящото изобретение е RESPISURE-1 (Pfizer Inc.), съдържащ щам P-5722-3 (NL1042), придобит от Purdue University, USA.

За предпочитане, щам P-5722-3 се инактивира с BEI и се прибавя търговски инертен пълнител, за предпочитане AMPHIGEN (Hydronics, USA). Предпочитаната доза е от приблизително 2,0 ml. Конвенционално използваните консерванти включват мертиолат/EDTA. Може да се добави носител, за предпочитане, PBS. Препарат от модифицирани живи ваксини, като чрез атенюиране на вирулентни щамове чрез пасиране, е известен от предшестващото състояние на техниката.

Субединични ваксини

Използването, съгласно настоящото изобретение, може да се проведе чрез субединични ваксини, притежаващи пречистени *M. hyo* имуногенни протеини, полипептиди и имуногенни фрагменти на такива протеини и полипептиди. Такива протеини и полипептиди могат да се получат чрез използване на техники, известни от предшестващото състояние на техниката. Също така, методи, които са добре известни на специалистите в областта, могат да се използват за определяне на чистотата на протеина или хомогенността му, като полиакриламидна гел електрофореза на проба, с последващо визуализиране на ивица на единичен полипептид

върху оцветяващ гел. По-висока разделителна способност може да се определи при използване на BETX или други подобни методи, добре известни от предшестващото състояние на техниката.

При един специфичен вариант за изпълнение, ваксината, която се използва при настоящото изобретение, съдържа най-малкото един протеин от *M. hyo*, като, но без да се ограничава до, P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

При един друг вариант за изпълнение, използваната ваксина от настоящото изобретение включва *M. hyo* бактерин (инактивирана цяла или частична клетка или модифицирана жива клетка) или *M. hyo* протеин или полипептид или негов имуногенен фрагмент и най-малко един друг имуногенен (инактивирана цяла или частична клетка или модифицирана жива) или имуногенен или антигенен протеин, полипептид или негов имуногенен фрагмент, и за предпочитане вирусен, бактериален или паразитен полипептид. Такива примери за други патогени и протеини, полипептиди или имуногенни негови фрагменти включват, без да се ограничават до, грип по свинете (SIV), вирус на репродуктивно и респираторно заболяване при свинете (PRRS или мистериозно заболяване по свинете), диария след отбиване (PWD) и пролиферативни ентерити при прасета (PPE). Такъв състав има предимство като комбинирана ваксина.

При един друг специфичен вариант за изпълнение на изобретението, имуногенни фрагменти на такива имуногенни протеини или полипептиди имат последователност, която включва най-малко 10, най-малко 20, най-малко 30, най-малко 40, най-малко 50 или най-малко 100 съседни аминокиселини

на имуногенни протеини и полипептиди, използвани в настоящото изобретение, включително, но без да се ограничава до, P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

Освен това, M. hu протеините, които се използват във ваксините са чисти по същество или хомогенни. Методът при настоящото изобретение използва протеини или полипептиди, които характерно се пречистват от клетки гостоприемник, които експерсират рекомбинантни последователности, кодиращи тези протеини. Пречистването на такива протеини може да се извърши по многообразни методи, добре известни от предшестващото състояние на техниката. Виж например, техниките описани в "Методи в Ензимологията" 1990, Academic Press, Inc., San Diego, "Protein Purification: Principles and practice", 1982, Springer-Verlag, New York.

Пречистените M. hu протеини и полипептиди и тяхни имуногенни фрагменти могат, също така, да се получат при използване на известни методи на синтез.

Лекарствени форми на ваксини

Подходящи препарати на ваксините, използвани в настоящото изобретение включват инжекционни, било то течни разтвори или суспенсии; твърди форми подходящи за разтваряне в или суспендиране в течност преди инжектиране също могат да се приготвят. Препаратът може, също така да е емулгируем. Активните имуногенни съставки често се смесват с инертни пълнители, които са фармацевтично приемливи и съвместими с активната съставка.

Полипептидите могат да се приведат в лекарствена форма на ваксина като неутрална или солева форма.

Фармацевтично приемливи соли включват кисели присъединителни соли (образувани със свободни аминокиселини пептида), и които се образуват с неорганични киселини, като например, хлороводородна киселина или фосфорна киселина, или органични киселини, като оцетна, оксалова, винена, малеинова киселина и други подобни. Солеви форми със свободни хидроксилни групи могат да произлизат, също така, от неорганични бази, като например, натриев, калиев, амониев, калициев, или фери хидрооксиди, и като органични основи, като изопропиламин, триметиламин, 2-етиламино етанол, хистидин, прокаин и други.

Лекарствените препарати на ваксини, които се използват в настоящото изобретение включват едно ефективно имунизирателно количество M. huo имуноген и фармацевтично приемлив носител. Препаратите на ваксини включват афактивно имунизирателно количество на един или повече антигени и фармацевтично приемлив носител. Фармацевтично приемливи носители са добре известни от предшестващото състояние на техниката и включват, но без да се ограничават до, физиологичен разтвор, буфериран физиологичен разтвор, декстроза, вода, глицерол, стерилни изотинични водни разтвори и тяхни комбинации. Един пример за такъв приемлив носител е физиологично балансирана културална среда, съдържаща едно или повече стабилизиращи средства, като стабилизиращи, хидролизирани протеини, лактоза и др. носителят е стерилен за предпочитане. Лекарствената форма трябва да удовлетворява начина на прилагане.

Използването на пречистени антигени, като препарати за ваксини може да се осъществи по стандартни методи.

Например, пречистените протеини трябва да се доведат до подходяща концентрация, да се приведат в лекарствена форма с който и да е подходящ за ваксина инертен пълнител и да се пакетират за използване. Подходящи инертни пълнители могат да включват, но без да се ограничават до: минерални гелове, например, алуминиев хидроксид; повърхностноактивни вещества, като лизолецитин; гликозиди, например, сапонин и производни на сапонини, като Quil A или GPI-0100; катийонни повърхностноактивни вещества, например, DDA (кватернерни въглеродородни амониеви халогениди, плуронови полиоли; полианйони и полиатомни йони; полиакрилови киселини, не-йонни блок полимери, например, Pluronic F-127 (B.A.S.F., USA); Avridine and Rantidine; пептиди; рекомбинантни мутантни лабилни токсини, например, левкотоксин (rmLT) или холерен токсин (CT); химически свързани или молекулни транспортери в близко съседство; минерални масла, например, Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, France), карбопол, Amphigen (Hydronics, USA), Omaha, NE. USA, Alhydrogel, (Superfos Biosector, Fredrickssund, Denmark) маслени емулсии, например, емулсия на минерално масло, като BayolF/Arlacel A и вода, или емулсия на растително масло, вода и емулгиращо средство, като лецитин; стипца, MDP, N-ацетил-мурамил-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'-дипалмитоил-sn-глицеро-3-хидроксифосфорилокси)-етиламин; холистеролни цитокини и комбинация от помощни вещества. Полиатомни йони могат също да действат като диспергиращи, съгъстяващи и

антисгъстяващи средства, които позволяват ваксината да бъде ресуспендирана, като монодисперсна суспензия след удължен период на сгъстяване. Комбинацията от помощни вещества може да се представи под водна, инкапсулирана (контролирано или забавено освобождаване) или микроинкапсулирани форми.

Имуногенът може, също така, да се инкорпорира в липозоми, или да се конюгира към полизахариди и/или други полимери за използване при лекарствени форми на ваксини, например, когато рекомбинантния антиген е хаптен, т.е., молекула, която е антигенна по това, че може да реагира селективно с познати антитела, но е не имуногенна, по това, че не може да предизвика имуноен отговор, хаптенът може да бъде коварентно свързан към носител или имуногенна молекула; например, голям протеин, като серумен албумин, ще придаде имуногенност на хаптена, присъединен към него. Хаптен-носител може да се приведе в лекарствена форма за използване при ваксини.

Генна ваксина и такава от нуклеинова киселина

Методът, съгласно настоящото изобретение, може да се осъществи при използване на M. huо гени или нуклеинови киселини, кодиращи имуногенни протеини, полипептиди и имуногенни фрагменти на такива протеини и полипептиди. Такива гени и нуклеинови киселини могат да се експресират *in vivo* и могат да се получат при използване на техники, добре известни от предшестващото състояние на техниката.

При един специфичен вариант за изпълнение на изобретението, използваната ваксина в настоящото

изобретение включва най-малкото един ген или нуклеинова киселина, кодиращ протеин на *M. hyo*, като, но без да се ограничава до, P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

При друг специфичен вариант за изпълнение на изобретението гените или нуклеинови киселини, използвани в настоящото изобретение, кодират за имуногенни фрагменти на *M. hyo* протеини или полипептиди с последователности, включващи най-малкото 10, най-малкото 20, най-малкото 30, най-малкото 40, най-малкото 50 или най-малкото 100 съседни аминокиселини от имуногенни протеини и полипептиди, използвани при настоящото изобретение, включително, но без да се ограничава до, P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

При един друг вариант за използване на настоящото изобретение, генът или нуклеиновите киселини, които се използват се прилагат чрез методи, добре известни от предшестващото състояние на техниката, като например, при използване на генно оръдие.

При други варианти за изпълнение на използването от настоящото изобретение, използваните гени или нуклеинови киселини са ДНК-ови ваксини. Освен това, нуклеиновите киселини или гени могат да присъстват в асоциация с липозоми или други средства улесняващи трансфектирането, известни от предшестващото състояние на техниката.

Методи за и получаване и доставяне на ДНК-ови ваксини са известни от предшестващото състояние на техниката. Виж например, Krishnan, B. R., "Current Status of DNA vaccines in veterinary medicine", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Elsevier Science (2000).

Експресионни системи

Могат да се използва голямо разнообразие от експресионни векторни системи на гостоприемници за експресиране на последователностите на антигенните протеини от изобретението. Експресионните системи на гостоприемници представляват носители чрез които кодиращите последователности представляващи интерес могат да бъдат продуцирани и пречистени по същество, но представляват също така клетки, които могат да бъдат трансформирани или трансфектирани с подходящи нуклеотидни кодиращи последователности, които представят *M. hu* генните продукти, използвани в настоящото изобретение *in situ*. Те включват, но без да се ограничава до, микроорганизми, като бактерии (например, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформирани с рекомбинантна ДНК от бактериофаг, плазмидна ДНК или космидни ДНК-ови експресионни вектори, съдържащи *mhr3* кодиращи последователности; дрожди (например, *Saccharomyces*, *Pichia*) трансформирани с рекомбинантни дрождеви експресионни вектори, съдържащи кодиращи последователности на *M. hu* генния продукт; системи от клетки на насекоми, инфектирани с рекомбинантни вирусни експресионни вектори (например, *baculovirus*), съдържащи *M. hu* кодиращи последователности; системи на растителни клетки, инфектирани с рекомбинантни вирусни експресионни вектори (например, вируса на мозайката по карфиола, *CaMV*; вируса на мозайката по тютюна, *TMV*) или трансформирани с рекомбинантни плазмидни експресионни вектори (например, *T1* плазмид), съдържащ *M. hu* кодиращи последователности; или системи от клетки на бозайници

(например, COS, CHO, ВНК, 293, 3Т3) съдържащи рекомбинантни експресионни структури, включващи промотори, произлизащи от генома на клетки на бозайници (например, металотионен промотор) или от вируси по бозайници (например, аденовирусен късен промотор; vaccinia вирус 7.5K промотор). При един предпочитан вариант за изпълнение, експресионната система е бактериална система.

M. hyorheumoniae полипептиди и протеини и тяхни имуногенни фрагменти могат също да бъдат експресирани и да бъдат доставени и при използване на рекомбинантни вирусни и бактериално вектори, като аденовируси или *Salmonella*. Настоящите вектори са известни, също така, и са лесно достъпни от предшестващото състояние на техниката или могат да се конструират от специалистите в областта при използване на добре известна методология.

Дозирание и начини на прилагане

Съгласно настоящото изобретение, еднократна доза на ефективно количество *M. hyo* ваксина приложено на свине на възраст от приблизително 3 до приблизително 10 дни предоставя ефективен имунитет срещу последващо заразяване с *M. hyo*. За предпочитане, *M. hyo* ваксина се прилага на приблизително седем дневна възраст.

Количеството на *M. hyo* бактериална ваксина ефективно при еднократна доза на прилагане съдържа 1×10^6 до приблизително 5×10^{10} променящи оцветяването единици (CCU) на доза. За предпочитане, *M. hyo* бактериална ваксина, която предоставя ефективен имунитет при еднократна доза

съдържа приблизително 1×10^8 до 5×10^{10} CCU/доза и по-предпочитано приблизително 5×10^8 до 5×10^{10} CCU/доза.

Съгласно настоящото изобретение, когато се прилага предпочитаният продукт бактерин RESPISURE-1, количеството на за прилагане на една доза е приблизително 0,5 до приблизително 3,0 ml, за предпочитане приблизително 1,5 ml до приблизително 2,5 ml, и по-предпочитано приблизително 2 ml.

Количеството на M. huо ваксина, което е субединична ваксина включваща един или повече протеини или полипептиди или имуногенни фрагменти на такива протеини или полипептиди, ефективно при метода на настоящото изобретение е от приблизително 0,01 μ g of приблизително 200 μ g.

Количеството на M. huо ваксина, което е ваксина, съдържаща един или повече M. huо гени или нуклеинови киселини (за предпочитане ДНК), кодиращи за имуногенни протеини или полипептиди или имуногенни фрагменти на такива протеини или полипептиди, ефективно при метода от настоящото изобретение е от приблизително 0,1 μ g до приблизително 200 μ g.

Съгласно настоящото изобретение, прилагането може да се осъществи по известни пътища, включително орален, интраназален, мукозен, локален, трансдермален, и парентерален (например, интравенозен, интраперитонеален, интрадермален, подкожен или интрамускуларен). Прилагането може да се постигне, също така, при използване на устройства за доставяне без игла. Прилагането може да се осъществи

при използване на комбинация от различни пътища, например, първо прилагане чрез използване на парентерален път и последващо прилагане чрез използване на мукозен път. Предпочитан път на прилагане е интрамускулно прилагане.

Ефекетивни дози (имунизирани количества) от ваксините на настоящото изобретение могат да се екстраполират от кривите доза-отговор, произтичащи от моделните тесетови системи.

Настоящите методи на ваксиниране предоставят предпазващ имунитет както да серопозитивни прасенца, така и за серонегативни прасенца за *M. hyo*. Серопозитивните прасенца се отнасят до тези прасенца, които имат в серума антитела срещу *M. hyo*. Серонегативни прасенца се отнасят до такива прасенца, които нямат в серума откриваеми нива на антитела срещу *M. hyo*.

Настоящото изобретение се илюстрира по-надолу, но без да се ограничава от следващите примери за изпълнение.

ПРИМЕРИ ЗА ОСЪЩЕСТВЯВАНЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

ПРИМЕР 1

Приготвяне на *M. hyo* бактерин

Бинарен етиленимин (BEI) се използва за инактивиране на *M. hyo* щам NL1042.

На края на периода на прорастване, рН на културата се увеличава до $7,8 \pm 0,2$, и рН се поддържа в тези граници поне в продължение на 1 час. В това време, воден разтвор, стерилизиран посредством филтър на 2-бромоетиламинхидромромид (BEA) се прибавя към крайна концентрация от приблизително 4,0 mM. При наличието на

повишеното рН, ВЕА се променя химически на ВЕІ. Културата се инкубира при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ при постоянно разбъркване в продължение на поне 24 часа.

След инкубиране от 24 часа, стерелизиран през филтър воден разтвор на натриев тиосульфат се прибавя до крайна концентрация от приблизително 4 mM за неутрализиране на излишъка на ВЕІ. Културата се инкубира при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ при постоянно разбъркване за допълнителни 24 часа.

След инактивиране, но преди неутрализиране с натриев тиосульфат, се взима представителна проба и се тества за завършването на инактивирането. Свежа среда, съдържаща 0,0026% фенол ред се инокулира с 5-20% инокулум при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ за най-малко една седмица преди изследването за цетова промуна, което е показателно за несполучливо инактивиране. Голямо количество проби се тестват за стерилност в тиогликолатен бульон при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и триптиказен соев бульон при стайна температура. Инактивираната култура може да се прехвърли в стерилен съд за съхранение и да се съхранява при $2-8^{\circ}\text{C}$ до съединяването.

Силата се оопределя чрез *in vitro* серологично изследване, за да се определи количествено антигена в крайния контейнер. Силата на използваните ваксини при изследваниата за ефикастност определя минималната сила, която да присъства във ваксината до датата на иизтичане на срока на годност.

Множество проби, или проби от краен контейнер на завършен продукт от всяка серия или първа подсерия, се тестват за М. *huo* както следва.

Бактеринът се съхранява при -50°C в 100 ml-ови ампули. Ампулите се размразяват и субаликвотни части от 15 ml се съхраняват при $+5/-2^{\circ}\text{C}$ да използването им.

За да се тества силата на съединената серия, проба от сериата се сравнява с конторла, и RP единици се определят за сериата. Серия или субсерия трябва, за предпочитане да съдържа най-малко 6,33 RP при инициирането на датата, и най-малко 5,06 RP за датата.

RP се отнася до относителна сила. RP's може да се определи чрез относително каличествено определяне на антиген към контролна ваксина. При този случай, конторлата има RP по дефиниция = 10. продукта за еднократна доза от настоящото изобретение, за предпочитане има RP от 6,33., което е 6,33 пъти конотролата.

Добавя се мертиолат, като консервант при крайна концентрация , която не превишава 0,01% (т/об).

10% етилендиамин тетра оцетна киселина (EDTA, динатриева или тетранатриева сол) разтвор се добавя консервант при крайна концентрация от приблизително 0,07% (т/об).

ПРИМЕР 2

Животни

Прасета на възраст от приблизително една седмица се подбират за ваксиниране. Серологичният статус към M. hyo се определя при ELISA изследване. Прасета със стойност на ELISA надвишаваща 0,50 се считат серологично позитивни за M. hyo.

Ваксини

За ваксиниране на прасетата се използва M. hyo бактерин RESPISURE-1 (Pfizer Inc.).

Силата на ваксината се определя преди използването чрез относително антигенно количествено определяне, като се сравнява към контролен M. hyo бактерин. Контролната ваксина (RP=1,0) съдържа приблизително 8000 единици от анатигена (приблизително 1 до 2×10^8 CCU живи клетки, събрани преди инактивирането) на доза (per dose), определени чрез твърдофазово имуноизследване, което измерва количеството M. hyo антиген във ваксината.

Същата течност инертен пълнител (AMPHIGEN), използвана за получаване на лекарствена форма на RESPISURE-1 се използва, като плацебо (т.е., без бактериални клетки).

Инокулум за заразяване

Инокулумът за заразяване се предоставя във вид на 10 ml-ови аликвотни части от белодробен хомогенат, замръзен при -70°C и се идентифицира, като производно на M. hyo щам 11 (L1 36). Инокулумът се размръзва, след което се разрежда в Friis Mycoplasma Broth, до достигане на 1:25 разреждане и се поставя върху лед до прилагането му. Всяко прасе получава 5 ml интраназална доза (2,5 ml на ноздра) от 1:25 суспензията в дните, посочени във всеки от следващите примери. Всеки ден от заразяването, аликвотна част от белодробния инокулум се култивира, за да се потвърди липсата на бактериално контаминиране. Втора аликвотна част се титрува повторно на всеки три дни, резултатите показват,

че инокулумът съдържа приблизително 10^6 - 10^7 променящи оцветяването единици (CCU/ml *M. hyo*.

Експериментална процедура

Прасетата се идентифицират с етикети на ушите, докато те все още сучат ([ден -1]). Прасетата се разпределят в кочини и на групи на третиране, съгласно общ рандомизиран блок модел. Прасетата се блокират на основатана прасило и кочини след отбиване.

В деня 0, прасетата се ваксинират или с 2 ml интрамускулна доза от *M. hyo* бактерин RESPISURE-1 (Pfizer Inc.), или с 2 ml интрамускулна доза плацебо. Всяко прасе получава 5 ml интраназална доза от 1:25 суспензията от инокулума за заразяване в посочения ден при всеки от посочените примери. Всички прасета ежедневно се следят и се проверяват за признаци на клинично заболяване.

В определеното време, след първия ден на заразяване, всички прасета се подлагат на евтаназия и се аутопсират. Белите дробове се отстраняват и им се прави оценка. Посмъртният преглед включва оценка на разпространението на патология, асоциирана с микоплазмено респираторно залобяване. Всеки белодробен дял се преглежда и лезиите се очертават, за да се определи процента на включване на всеки дял. Записва се степента на наличните големи лезии.

Данни от анализа

Ефикасността се оценява на основата на процента на белодробните лезии, характерни за *M. hyo* инфекция. Прасетата в групата за третиране (ваксинирани) се определят, като имащи процент от всичките белодробни лезии, които са значително ($P \leq 0,05$) по-малко от прасетата в плацебо групата.

Процент на всичките белодробни лезии

Процентът на включена маса за всеки белодробен дял се претегля при използване на следното съотношение на отделните белодробни дялове: 10% ляв краниален; 10% ляв мадиален; 25% ляв каудален; ? % десен краниален; десен мадиален 10%; десен каудален 25% и допълнително 10%. Стойностите на претеглените белодробни дялове се сумират изцяло, след това, за да се получи Процента на Всичките Белодробни Лезии (Pointon et al., 1992).

ПРИМЕР 3

Предпазването от зараза с вирулентен *M. hyo* се определя в прасета, серологично позитивни за *M. hyo*, при използване на *M. hyo* бактерин RESPISURE-1 (Pfizer Inc.), който се прилага на прасета от 3 до 8 дневна възраст.

Пет повтора на изследване за сила на RESPISURE-1 се провеждат в или около веремето на ваксинирането. Относителната сила (RP) се определя чрез относително количествено определяне на антигена при сравнени с контролна ваксина. Контролната ваксина, притежаваща $RP=1,0$ съдържа приблизително 8000 единици *M. hyo* аантиген. RPs от тези пет изследвания са 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 и 4,36, съответно.

Вв деня 0, прасетата от Групата на Третиране T02 (виж таблица 1, по-долу) се ваксинират с 2 ml интрамускулна доза *M. hyo* бактерин RESPISURE-1 (Pfizer Inc.). прасетата от група T01 се ваксинират интрамускулно с 2 ml плацебо. Всяко прасе получава 5 ml интраназална доза от 1:25 суспензия от инокулум за заразяване в деня 178, 179 и 180. Всеки от трите

дни, аликвотно количество от продукта за заразяване се култивира за времето на инокулиране, за да се потвърди липсата на бактериално заразяване. Втора аликвотна част се титрува отново, за да се потвърди, че продукта за заразяване съдържа приблизително 10^7 CCU/ml M. hyo. Всички прасета се проследяват и проверяват ежедневно за признаци на клинично заболяване.

Тридесет дни след първия ден от заразяването всички прасета се подлагат на евтаназия и на аутопсия. Белите дробове се отстраняват и се оценяват. Огледът след настъпването на смърта включва оценка на обхвата на патологичията, асоциирана с микоплазмено респираторно заболяване. Всеки дял на белия дроб се разглежда и лезиите се скицират, за да се оцени процента на включване на всеки дял. Степента на налични общи белодробни лезии се записва.

ТАБЛИЦА 1

Група на третиране	Съед. за ваксиниране	Номер	Ден 0 на вакс иниране	Ден 178 ¹ на зара-зяване	Ден 179 ¹ на заразяване	Ден 180 ¹ на заразяване
T01	плацебо	26	26	26	26	26
T02	ваксина	26	26	24 ²	22 ³	22 ³

¹ вирулентен M. hyo инокулум

² прасета 71 и 73 се отстраняват от изследването преди заразяването, защото и двете животни губят етикетите си за ушите и следователно не би могло да се определи идентичността на всяко от животните.

³ прасета 36 намират смърта в деня 178, поради анестезични усложнения. Прасета 31 са намерени мъртви на 179-тия ден поради анестезични усложнения.

Резултатите от белодробните лезии са обобщени в таблица 2. Резултатите показват, че ваксинираните прасета (T02) имат значително ($P=0,0385$) по-малък средно квадратичен процент пневмонийни белодробни лезии, отколкото плацебо прасетата (T01) (2,0 vs. 4,5%).

ТАБЛИЦА 2

Сума на процента на всичките белодробни лезии

Третиране	Съединение	Номер на прасе	LS средно	Граници
T01	Плацебо	26	4,5 ^a	0 до 36,75
T02	Ваксина	22	2,0 ^b	0 до 13,75

^{a, b} Стойностите с различни степени са статистически значими ($P=0,0385$)

Резултатите показват, че еднократното ваксиниране на прасета на приблизителна възраст от една седмица с *M. hyo* бактерин RESPISURE-1 индуцират предпазване срещу последващо заразяване с вирулентен *M. hyo*.

ПРИМЕР 4

Предпазване от заразяване с вирулентен *M. hyo* се определя при прасета, серологично негативни за *M. hyo*, при използване на еднократна доза от *M. hyo* бактерин

RESPISURE-1, приложен върху прасета на 3 до 8 дневна възраст.

Пет повторения на изследване на силата на ваксината се провеждат по или около времето на аваксинирането. RP се определя чрез относително определяне на антигена в сравнение с контролна ваксина. Контролната ваксина, притежаваща $RP=1,0$, съдържа приблизително 8000 единици M. hyo антиген. RP's от тези пет изследвания са 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 и 4,36, съответно.

В деня 0, прасетата в групата за третиране T02 се ваксинират с 2 ml интрамускулна доза от M. hyo бактерин RESPISURE-1. прасетата от група T01 се ваксинират интрамускулно с 2 ml плацебо. Всяко прасе получава 5 ml интраназална доза от 1:25 суспензия от инокулума за заразяване в дните 172, 174 и 175. През всеки от трите дни, една аликвотна част от продукта за заразяване се култивира по времето на инокулирането, за да се потвърди липсата на бактериална контаминация. Втора аликвотна част се титрува отново, за да се потвърди, че материала за заразяване съдържа приблизително 10^6 CCU/ml M. hyo. Всички прасета се наблюдават и проверяват ежедневно за клинични признаци на заболяване.

Двадесет и девет дни след първия ден на заразяване, всички прасета се подлагат на евтаназия и на аутопсия. Белите дробове се отстраняват и се оценяват. Огледът след настъпването на смъртта включва оценка на обхвата на патологичията, асоциирана с микоплазмено респираторно заболяване. Всеки дял на белия дроб се разглежда и лезиите се скицира, за да се оцени процента на консолидиране на

всеки дял. Степента на налични тотални белодробни лезии се записва.

Таблица 3 обобщава проекта на експеримента.

ТАБЛИЦА 3

Група на трети- ране	Съед. за ваксини- ране	Номер	Ден 0 на вакс иниране	Ден 173 ¹ на зара-звяване	Ден 174 ¹ на заразя -ване	Ден 175 ¹ на заразя -ване
T01	плацебо	26	26	25 ²	24 ⁴	24
T02	ваксина	26	26	23 ³	20 ⁵	22

¹ вирулентен M. hyo

² прасе 123 се подлага на евтаназия на 19-тия ден, поради хроничен сепсисен полиартрит.

³ прасе 222 е намерено мъртво на 40-тия ден. Аутопсията разкрива голямо количество перикардиална течност и хеморагия на епикардиума. Прасе 102 се подлага на евтаназия на 95-тия ден поради ректален пролапс. Прасе 204 е открито мъртво на 145-тия ден. Не прави аутопсия поради напредналото трупно разлагане.

⁴ прасе 244 е открито мъртво на 174-тия ден след първия ден на заразяването, поради анестезични усложнения.

⁵ NEEA за отчет на 3 прасета

Резултатите от белодробните лезии са обобщени в таблица 4. Целият анализ показва, че ваксинираните прасета (T02) имат значително ($P=0,0001$) по-малко средно квадратичен процент пневмонийни белодробни лезии, отколкото плацебо прасетата (T01) (0,3 vs. 5,9%).

ТАБЛИЦА 4

Сума на процента на тотални белодробни лезии
Третиране Съединение Номер на LS средно Граници
прасе

T01	Плацебо	24	5,9 ^a	0 до 36
T02	Ваксина	20	0,3 ^b	0 до 6

^{a, b} Стойностите с различни степени са статистически различни (P=0,0001)

Резултатите от това изследване показват, че еднократното ваксиниране на прасета с M. hyo –бактерин RESPISURE-ONE индуцира предпазване срещу последващо експериментално заразяване с вирулентен M. hyo.

ПРИМЕР 5

Предпазване от заразяване с вирулентен M. hyo се определя при прасета, серологично негативни за M. hyo, при използване на еднократна доза от M. hyo бактерин RESPISURE-1, приложен върху прасета на 3 до 8 дневна възраст.

Пет повторения на изследване на силата на ваксината се провеждат по или около времето на ваксинирането. RP се определя чрез относително определяне на антигена в сравнение с контролна ваксина. Контролната ваксина, притежаваща RP=1,0, съдържа приблизително 8000 единици M. hyo аантиген. RP's от тези пет изследвания са 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 и 4,36, съответно.

В деня 0, прасетатата в групата за третиране T02 се ваксинират с 2 ml интрамускулна доза от M. hyo бактерин

RESPISURE-1. прасетата от група T01 се ваксинират интармускулно с 2 ml плацебо. Всяко прасе получава 5 ml интраназална доза (2,5 ml на ноздра) от 1:25 суспенсията от инокулума за заразяване в дните 76, 77 и 78. През всеки от трите дни, една аликвотна част от продукта за заразяване се култивира по времето на инокулирането, за да се потвърди липсата на бактериална контаминация. Втора аликвотна част се титрува повторно, за да се потвърди, че материала за заразяване съдържа приблизително 10^6 CCU/ml M. hyo. Всички прасета ежедневно се наблюдават и проверяват за клинични признаци на заболяване.

Двадесет и девет дни след първия ден на заразяване, всички прасета се подлагат на евтаназия и на аутопсия. Белите дробове се отстраняват и се оценяват. Огледът след настъпването на смъртта включва оценка на обхвата на патологичията, асоциирана с микоплазмено респираторно заболяване. Всеки дял на белия дроб се разглежда и лезиите се скицира, за да се оцени процента на включване на всеки дял. Степента на налични тотални белодробни лезии се записва.

Таблица 5 обобщава проекта на експеримента.

ТАБЛИЦА 5						
Група на третиране	Съед. за ваксиниране	Номер	Ден 0 на ваксиниране	Ден 173 ¹ на заразяване	Ден 174 ¹ на заразяване	Ден 175 ¹ на заразяване
T01	плацебо	26	26	23 ²	23	23
T02	ваксина	26	26	21 ³	21	21

¹ вирулентен *M. hyo*

² прасета 237 и 239 дават положителен тест в деня -1 за *M. hyo pneumoniae*. Тези прасенца се изваждат от изследването на 14-ия ден и се подлагат на евтаназия. Прасе 220 е открито мъртво на 3-тия ден, поради това, че е било смачкано от свинята. на 19-тия ден, поради хроничен сепсисен полиартрит.

³ прасета 238, 240 и 277 дават положителна проба в деня -1 за *M. hyo pneumoniae*. Тези прасенца се изваждат от изследването на 14-тия ден и се подлагат на евтаназия. Прасе 280 се подлага на евтаназия на 7-мия ден след като е с анорексия и преяждане. Прасенце 177 се подлага на евтаназия на 40-тия ден поради хроничен синдром на загуба на тегло.

Резултатите от белодробните лезии са обобщени в таблица 5. Целият анализ показва, че ваксинираните прасета (T02) имат значително ($P=0,0001$) средно квадратичен процент пневмонийни белодробни лезии, отколкото плацебо прасетата (T01) (0,5 vs. 9,9%).

ТАБЛИЦА 6

Сума на процента на тотални белодробни лезии

Третиране	Съединение	Номер на прасе	на LS средно	Граници
T01	Плацебо	23	9,9 ^a	0 до 40,5
T02	Ваксина	21	0,5 ^b	0 до 5

^{a, b} Стойностите с различни степени са статистически различни ($P=0,0001$)

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Използване на *Mycoplasma hyorheumoniae* ваксина, като лекарствено средство, за лечение или предпазване от заболяване или смущение от инфекция с *Mycoplasma hyorheumoniae*, при което на животно на възраст от приблизително 3 до приблизително 10 дни се прилага ефективно количество еднократна доза от *Mycoplasma hyorheumoniae* ваксина.

2. Използване, съгласно претенция 1, при което *Mycoplasma hyorheumoniae* ваксина е инактивирана, цял или частичен *Mycoplasma hyorheumoniae* клетъчен препарат.

3. Използване, съгласно претенция 2, при което еднократната доза на *Mycoplasma hyorheumoniae* ваксината съдържа от приблизително 1×10^6 до приблизително 1×10^{10} променящи оцветяването единици (CCU) на доза.

4. Използване, съгласно претенция 2, при което количеството на посочената приложена ваксина е от приблизително 0,5 до приблизително 3,0 ml.

5. Използване, съгласно претенция 2, при което *Mycoplasma hyorheumoniae* клетъчният препарат е RESPISURE-1.

6. Използване, съгласно претенция 2, при което *Mycoplasma hyorheumoniae* ваксина съдържа, освен това, вирусен или бактериален антиген, различен от *Mycoplasma hyorheumoniae*.

7. Използване, съгласно претенция 6, при което посоченият вирусен или бактериален антиген се избира измежду грип по свинете (SIV), вирус на репродуктивно и респираторно заболяване при свинете (PRRS или мистериозно заболяване по свинете), диариа след отбиване (PWD) и пролиферативен ентерит при прасета (PPE).

8. Използване, съгласно претенция 2, при което посоченият *Mycoplasma hyorheumoniae* препарат се прилага интрамускулно.

9. Използване, съгласно претенция 1, при което посочените свине са предпазени до 25 седмици след след ваксинирането.

10. Използване, съгласно претенция 1, при което *Mycoplasma hyorheumoniae* ваксината включва, също така, инертен пълнител.

11. Използване, съгласно претенция 1, при което *Mycoplasma hyorheumoniae* ваксината е субединична ваксина.

12. Използване, съгласно претенция 12, при което субединичната ваксина включва един или повече имуногенни полипептиди или протеини или имуногенни фрагменти на такива полипептиди или протеини.

13. Използване, съгласно претенция 13, при което полипептидите или протеини се избират измежду група, състояща се от, P46, P65, P97, P102, P70, P50 и P44.

14. Използване, съгласно претенция 1, при което *Mycoplasma hyorheumoniae* ваксината включва един или повече гени или нуклеинови киселини, кодиращи един или повече имуногенни полипептиди или протеини или имуногенни фрагменти на такива полипептиди или протеини, и които гени или нуклеинови киселини могат да се експресират *in vivo*.

15. Използване, съгласно претенция 15, при което гените или нуклеинови киселини се избират измежду група, състояща се от p46, p65, p97, p102, p70, p50 и p44.

14. Използване, съгласно претенция 1, при което *Mycoplasma hyorheumoniae* ваксината включва един или повече гени или нуклеинови киселини, кодиращи един или повече имуногенни полипептиди или протеини или имуногенни фрагменти на такива полипептиди или протеини, и които гени или нуклеинови киселини могат да се експресират *in vivo*.

15. Използване, съгласно претенция 15, при което гените или нуклеинови киселини се избират измежду група, състояща се от p46, p65, p97, p102, p70, p50 и p44.