



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/12 (2019.08); A61P 31/12 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2016126392, 02.12.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.12.2014

Дата регистрации:
24.01.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
03.12.2013 EP 13195515.5

(43) Дата публикации заявки: 12.01.2018 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 24.01.2020 Бюл. № 3

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 04.07.2016

(86) Заявка РСТ:
EP 2014/076224 (02.12.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/082458 (11.06.2015)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ФАХИНГЕР Викки (NL),
СНО Мелани (NL),
ВИТВЛИТ Мартен Хендрик (NL)

(73) Патентообладатель(и):

ИНТЕРВЕТ ИНТЕРНЭШНЛ Б.В. (NL)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013152083 A2, 10.10.2013.
EP1958644 A1, 20.08.2008. WO 2005009462 A2,
03.02.2005. WO0001409 A2, 13.01.2000. US6217883
B1, 17.04.2001.

(54) ВАКЦИНА ПРОТИВ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ 2 ТИПА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к иммунологии, а именно к ветеринарии, и может быть использована для применения вакцины против цирковируса свиней 2 типа. Вакцину, содержащую рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок цирковируса свиней 2 типа, применяют для профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа, путем введения единственной дозы вакцины в кожу животного. Введение единственной дозы включает менее чем 0,5 мл вакцины, и вакцину

вводят безыгольным вакцинирующим устройством. Группа изобретений также включает способ профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа. Использование данной группы изобретений приводит к улучшенному иммунному ответу, а именно повышенному образованию антител и продолжительности ответа, при однократном внутрикожном введении вакцины сероположительным животным. 5 н. и 10 з.п. ф-лы, 8 ил., 2 табл., 5 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/12 (2019.08); A61P 31/12 (2019.08)(21)(22) Application: **2016126392, 02.12.2014**(24) Effective date for property rights:
02.12.2014Registration date:
24.01.2020

Priority:

(30) Convention priority:
03.12.2013 EP 13195515.5(43) Application published: **12.01.2018 Bull. № 2**(45) Date of publication: **24.01.2020 Bull. № 3**(85) Commencement of national phase: **04.07.2016**(86) PCT application:
EP 2014/076224 (02.12.2014)(87) PCT publication:
WO 2015/082458 (11.06.2015)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**FAKHINGER Vikki (NL),
SNO Melani (NL),
VITVLIT Marten Khendrik (NL)**

(73) Proprietor(s):

INTERVET INTERNESHNL B.V. (NL)(54) **PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 VACCINE**

(57) Abstract:

FIELD: veterinary medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to immunology, namely to veterinary science, and can be used for use of type 2 swine circovirus vaccine. Vaccine containing a recombinant expressive ORF2 porcine circovirus protein of type 2 is used for prophylactic treatment of an animal which has circulating antibodies directed against type 2 swine circovirus by administering a single dose of the vaccine into the animal's skin. Single dose administration involves less than 0.5 ml of the vaccine, and the vaccine is introduced

with a needle-free vaccination device. Group of inventions also includes a method for preventive treatment of animal, which has circulating antibodies directed against type 2 swine circovirus.

EFFECT: use of the given group of inventions results in an improved immune response, namely increased antibody production and response duration, with single intradermal administration of the vaccine to a seropositive animal.

15 cl, 8 dwg, 2 tbl, 5 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к вакцине против цирковируса свиней 2 типа (PCV-2) и к способу защиты животного от данной инфекции с применением вакцины.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 5 PCV-2 связан с мультисистемным синдромом истощения после отъема (PMWS), наблюдаемым у молодых поросят. Данное заболевание впервые встретили в Канаде в 1991 году. Клинические проявления и патология были опубликованы в 1996 году и включают прогрессирующее истощение, одышку, учащенное дыхание и иногда желтушность и желтуху.
- 10 Nayar et al., Can. Vet. J. Volume 38, June 1997, выявил цирковирус свиней у свиней с клиническими симптомами PMWS и пришел к выводу, что PCV, не являющийся известным PCV, признанным в качестве природного обитателя клеток PK-15, мог быть связан с PMWS. Более поздние публикации (Hamel et al., J. Virol., 72(6), 5262-5267, 1998; Meehan et al., J. gen. Virol., 79, 2171-2179, 1998) подтвердили эти данные, и было
- 15 предложено (Meehan et al., supra) относить его к новому патогенному PCV в качестве PCV-2, тогда как первоначальный изолят клеточной культуры PK-15 (Tischer et al., Nature 295, 64-66, 1982) следует упоминать как PCV-1. PCV-2 представляет собой маленький (17-22 нм) икосаэдрический не имеющий оболочки вирус, содержащий геном из кольцевой одноцепочечной ДНК. Длина генома PCV-2 составляет приблизительно
- 20 1768 пар оснований. Изоляты PCV-2, происходящие из различных регионов в мире, судя по всему, тесно связаны друг с другом и демонстрируют 95-99% идентичность нуклеотидных последовательностей (Fenaux et al., J. Clin. Microbiol., 38(7), 2494-2503, 2000). ORF-2 PCV кодирует капсидный белок вируса. ORF 2 PCV 2 кодирует белок 233 аминокислот. ORF 2 всех изолятов PCV-2 имеет 91-100% идентичность нуклеотидных
- 25 последовательностей и 90-100% идентичность расшифрованных аминокислотных последовательностей.

- Общепринятая вакцина для профилактической обработки животных, в частности свиней, против заражения патогенным цирковирусом свиней 2 типа в качестве (нереплицируемого) иммуногена может быть основана на цельном вирусе PCV-2. Однако
- 30 в случае PCV-2 дело осложняется тем, что PCV-2 не реплицируется в клеточной культуре до высоких титров. Вследствие этого, вакцина, основанная в качестве иммуногена на цельном вирусе, является менее идеальной с практической (экономической) точки зрения. В области изобретения было показано, что кодируемый ORF2 капсидный белок (даже экспрессируемый, рекомбинантный) подходит в качестве субъединичного
- 35 иммуногена цирковируса свиней 2 типа для применения в адекватной вакцине. Это можно понять, поскольку данная субъединица в системе циркуляции проявляется таким же образом, как сам вирус, отличаясь по существу в том, что внутри капсида не имеется ДНК и неструктурных белков.

- В области изобретения известны и коммерчески доступны несколько вакцин против
- 40 PCV2.

- Porcilis® PCV (доступный от MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands) представляет собой вакцину для защиты свиней от цирковируса свиней 2 типа, для применения у свиней от трех недель и старше. При применении в виде двухинъекционной (двухдозовой) вакцины продолжительность иммунитета (DOI) составляет 22 недели, почти полностью
- 45 охватывая период откорма свиней. Вакцинация может приводить к гипертермии и другим системным реакциям.

Ingelvac CicroFlex® (доступный от Boehringer Ingelheim, Ingelheim) представляет собой вакцину для защиты свиней против цирковируса свиней 2 типа для применения у свиней

от двух недель и старше. При применении в виде одноинъекционной (одноразовой) вакцины DOI составляет 17 недель. Вакцинация может приводить к гипертермии, а в редких случаях к анафилактическим реакциям.

Circovac® (доступный от Merial, Lyon, France) представляет собой вакцину для защиты свиней против цирковируса свиней 2 типа для применения у свиней от трех недель и старше. При применении в виде двухинъекционной вакцины DOI составляет только 14 недель. вакцинация может приводить к гипертермии и другим системным реакциям, таким как уменьшенное потребление корма.

Suvaxyn® PCV (доступный от Zoetis, Capelle a/d IJssel, The Netherlands) представляет собой вакцину для защиты свиней против цирковируса свиней 2 типа для применения у свиней от трех недель и старше. При применении в виде одноинъекционной вакцины DOI составляет 19 недель. Вакцинация может приводить к гипертермии и другим системным реакциям, таким как рвота.

Другие вакцины описаны, например, в WO2007/028823, WO 2007/094893 и WO2008/076915. Ни одна из них не показывает DOI более длительную, чем известно для коммерчески доступных вакцин.

ЦЕЛЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Цель представленного изобретения состоит в разработке вакцины, которая может обеспечивать DOI против заражения патогенным цирковирусом свиней 2 типа по меньшей мере столь же длительную, что и существующие вакцины, даже когда животное во время вакцинации имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа, причем вакцина в то же самое время является удобной для применения и безопасной для животных, вызывая в частности небольшие системные побочные эффекты, такие как гипертермия, или не вызывая их.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для того, чтобы соответствовать цели изобретения, была разработана новая вакцина, вакцина, содержащая нереплицируемый иммуноген цирковируса свиней 2 типа, в частности рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок цирковируса свиней 2 типа, для применения при профилактической обработке животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа, в частности материнские антитела, против заражения патогенным цирковирусом свиней 2 типа за счет введения единственной дозы вакцины в дерму животного.

Неожиданно было обнаружено, что при вакцинации животного в дерму только одной дозой вакцины, содержащей нереплицируемый иммуноген цирковируса свиней 2 типа, может быть получена очень долгая DOI, равная 23 недели, против заражения патогенным цирковирусом свиней 2 типа, даже когда животное имеет циркулирующие антитела против цирковируса свиней 2 типа от среднего до большого уровня, без каких-либо или почти без каких-либо системных побочных эффектов. Таким образом, может быть получена DOI, которая даже по существу дольше, чем DOI какой-либо существующей одноразовой вакцины. Это было особенно неожиданно, поскольку было обнаружено, что данные антитела могут быть материнскими антителами.

Изобретение также обеспечивает способ профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа, против заражения патогенным цирковирусом свиней 2 типа за счет введения в дерму животного единственной дозы вакцины, содержащей нереплицируемый иммуноген цирковируса свиней 2 типа, в частности рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок цирковируса свиней 2 типа. Другими способами, обеспечиваемыми изобретением, являются: способ, в котором вакцина в дополнение содержит неживой иммуноген

Mycoplasma hyopneumoniae для обработки животного против заражения патогенными бактериями *Mycoplasma hyopneumoniae*; и дополнительный способ, в котором вакцина в дополнение содержит неживой иммуноген *Lawsonia intracellularis* для обработки животного против заражения патогенными бактериями *Lawsonia intracellularis*; способ профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа против заражения цирковирусом свиней 2 типа и *Mycoplasma hyopneumoniae*, при этом способ включает введение в дерму животному единственной дозы вакцины, содержащей нереплицируемый иммуноген цирковируса свиней 2 типа, в частности рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок цирковируса свиней 2 типа, и одновременно введение в дерму животному единственной дозы вакцины, содержащей неживой иммуноген *Mycoplasma hyopneumoniae*; и способ профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа против заражения цирковирусом свиней 2 типа и *Lawsonia intracellularis*, при этом способ включает введение в дерму животному единственной дозы вакцины, содержащей нереплицируемый иммуноген цирковируса свиней 2 типа, в частности рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок цирковируса свиней 2 типа, и одновременно введение в дерму животному единственной дозы вакцины, содержащей неживой иммуноген *Lawsonia intracellularis*.

Необходимо заметить, что Opriessnig et al. в *Veterinary Microbiology* 131 (2008) 103-114, сообщает об исследовательской программе, направленной на установление, существует ли различие между внутрикожной и внутримышечной вакцинацией PCV2. Вывод, сделанный Opriessnig, состоит в том, что «различия между внутрикожным и внутримышечным путями введения вакцины не были обнаружены». В свете данного документа выглядит еще более удивительным, что заявители обнаружили существенное различие между внутрикожной и внутримышечной вакцинациями, в частности значительно отличающийся гуморальный иммунный ответ. С имеющимся знанием настоящего изобретения возможным объяснением факта, что Opriessnig не нашла какого-либо различия, может являться то, что, по незнанию, обе вакцины просто были применены внутримышечно. Это может быть понято следующим образом: для применения вакцины Opriessnig использовала безыгольную инъекционную систему Pulse 250™ (Pulse NeedleFree Systems Inc. Lenexa, KS, USA). Данное устройство, хотя и является безыгольным, не выполнено специально для внутрикожного применения. В брошюре для данного устройства изготовитель данной системы указывает (см. http://www.pulse-nfs.com/pdfs/250_swine.pdf), что устройство было выполнено с возможностью введения «через кожу и в мышечную ткань». Инъецируемый объем, используемый Opriessnig, а именно 2 мл, является достаточно высоким и обычным для внутримышечной вакцинации. Всемирная организация здравоохранения в статье от 27 августа 2009 года под названием «Intradermal Delivery of Vaccines; A review of the literature and the potential for development for use in low- and middle-income countries» также указывает, что «безыгольная» вакцинация не является необходимым средством «внутрикожной» вакцинации (см. Таблица 1, Страница 3 обзора). Только когда безыгольное устройство «выполнено для внутрикожной вакцинации», тогда вакцина в самом деле может быть доставлена в дерму. В противном случае она может быть доставлена подкожно или внутримышечно. Поэтому учитывая тот факт, что Opriessnig использовала устройство, которое выполнено не специально для внутрикожной вакцинации, что она использовала большой инъецируемый объем и более важно, что она не нашла различия между внутрикожной вакцинацией и внутримышечной вакцинацией, тогда как авторы представленного изобретения обнаружили существенное различие (в частности в

отношении титров IgM), можно сделать вывод только, что Opriessnig просто применила вакцину, о которой сообщается в статье, в «доставляемом внутривенно» виде в мышцу животных.

Также необходимо отметить, что в последнее время сообщалось, что влияние материнских антител (MDA) на эффективность вакцинации не было хорошо изучено, хотя есть основания полагать, что общее влияние является несущественным (см. APVS Vietnam, 23-25 September 2013; Brad Tacker et al: Diagnostic Laboratory Survey of Porcine Circovirus Type 2 and Mycoplasma Hyopneumoniae Maternally derived Antibodies). Также, в то же самое время сообщалось, что при вакцинации в присутствии уровней антител от среднего до большого используют две вакцинации, чтобы быть уверенным, что материнские антитела не оказывают влияния на эффективность вакцинации против PCV2.

WO 2008/076915 (Fachinger et al) описывает подход с однократной вакциной против PCV2 с использованием CircoFLEX® для приобретения активного иммунитета против цирковируса свиней 2 типа, в котором вакцину вводят внутримышечно. Приобретенный иммунитет тестировали спустя 9 недель после вакцинации. WO 2009/126356 (Roof et al.) описывает подход с однократной вакциной против PCV2 с использованием CircoFLEX®, в котором вакцину вводят внутримышечно. Вакцину вводят MDA-негативным животным, и иммунизация происходит через 4½ недели после вакцинации.

WO 2005/009462 (Parisot et al) описывает несколько подходов к вакцинации против PCV2, основанных на инактивированном вирусе PCV2. Во-первых, подход однократной IM вакцинации MDA-негативных животных (Пример 5). Подход двукратной вакцины против PCV2, в котором вакцину вводят внутримышечно MDA-негативным животным, а иммунизация происходит через 5 недель после вакцинации (Пример 6). Подход однократной в/м вакцинации у свиней с циркулирующими антителами, приводящий к поросётам, защищенным против PCV2 (Пример 7). Не раскрыта вакцина, содержащая рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок, для подхода с однократным введением животным, имеющим циркулирующие антитела против PCV2, в частности материнские антитела, посредством внутривенного введения. Не говоря уже о том, что вообще нет никакого ожидания, что это может привести к очень долгой DOI. Хотя на странице 19 упоминается несколько устройств безыгольного введения, не показано, что они могут быть использованы для внутривенного введения. Например, как широко известно, упоминаемый Biojector разработан в частности для в/м и п/к введения.

WO 00/01409 упоминает в примере 17 препарат вакцины, содержащий инактивированный вирус PCV2, который может быть введен посредством внутривенного пути. Однако данный документ не показывает вакцину, содержащую рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок для подхода с однократным введением животным, имеющим циркулирующие антитела против PCV2, в частности материнские антитела, посредством внутривенного введения.

Gamage в Vaccine 27 (2009) 6595-6604 упоминает, что сыворотки свиней, вакцинированных три раза фагом, демонстрирующим капсидный белок PVC, способны нейтрализовывать вирус PCV2. У Gamage не показано, что после первой вакцинации имеется защитная реакция, также у Gamage не ясно, на самом ли деле используемый пистолет для инъекций способен к внутривенному введению. Как показано выше в отношении Opriessnig, в области изобретения часто утверждается, что безыгольные пистолеты делают инъекцию в дерму, но только некоторые инъекторы способны доставлять вакцину фактически в дерму.

EP 1 958 644 упоминает признаки представленного изобретения в виде отдельных

признаков, разбросанных по всему описанию, но не показывает все признаки представленного изобретения в комбинации.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Нереплицируемым иммуногеном вируса является любое вещество или соединение, соответствующее вирусу, не являющееся реплицирующимся («живым») вирусом в целом, против которого должен быть вызван иммунологический ответ таким образом, чтобы соответствующий вирулентный вирус или один или более факторов его вирулентности распознавались иммунной системой хозяина в результате данного иммунного ответа и в конце концов нейтрализовывались. Типичные примеры нереплицируемых иммуногенов убивают цельные вирусы и субъединицы данных вирусов, такие как капсиды и поверхностные экспрессируемые белки, например, рекомбинантные экспрессируемые. Вакцина, содержащая нереплицируемый иммуноген вируса, отличается не только от вакцины с «живым» вирусом, но также от вакцины с ДНК, в которой ДНК как таковая не является иммуногеном, но после включения в клетку-хозяина экспрессирует соответствующий иммуноген.

Профилактической обработкой против заражения вирусом является помощь в предотвращении или ослаблении инфекции, обусловленная иммунизацией после обработки патогенным вирусом, в частности для уменьшения вирусной нагрузки хозяина после подобной иммунизации.

Профилактической обработкой против заболевания, обусловленного заражением вирусом, является помощь в предотвращении или ослаблении одного или более клинических проявлений, обусловленных заражением вирусом после обработки.

Введение вакцины в дерму означает помещение в дерме достаточного количества вакцины, приводящее к иммунологическому ответу, значительно отличающемуся (в частности: при использовании критерия суммы рангов Уилкоксона в схеме проведения испытания, как описано в примере 3, р-значение должно быть менее чем 0,10, предпочтительно менее чем 0,05) от внутримышечного введения той же самой вакцины и ее объема. Для внутрикожной вакцинации коммерчески доступно несколько устройств, например инструмент для вакцинации IDAL® (MSD Animal Health), Pulse 50 MicroDose (Pulse Needle Free Systems) или другие устройства, которые описаны в Vaccine, 2012 Jan 11;30(3):523-38 (см. в частности Таблица 1, страница 525: «An overview of different devices for liquid and solid formulation administration»)

Введение единственной дозы вакцины для применения в профилактической обработке означает, что для того, чтобы получить защитный иммунитет, вакцинация не должна усиливаться за счет второго введения. В двухдозовом режиме первую (первичную) вакцинацию обычно бустируют в пределах 6 недель от первого введения, обычно в пределах 3 или даже 2 недель от первого введения, и только после второго (усиливающего) введения может быть получен защитный иммунитет.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом варианте осуществления введение единственной дозы содержит менее чем 0,5 мл вакцины, предпочтительно 0,2 мл вакцины. Похоже, что дозировка ниже 0,5 мл является подходящей для внутрикожной вакцинации. При подобной низкой дозировке дерма остается по меньшей мере в значительной степени интактной и доступной для получения вакцины, тогда как при существенно более высокой дозировке имеется риск разрыва дермы, оставляя дерму недоступной для получения вакцины.

В следующем варианте осуществления вакцину вводят с помощью безыгольного вакцинирующего устройства с использованием струи вакцины для достижения дермы через кожу животного. Вакцинация в дерму в данном варианте осуществления

обеспечивается с помощью безыгольного вакцинирующего устройства с использованием жидкой струи вакцины (струи текучей среды под высоким давлением), обычно с использованием очень низкого объема вакцины в диапазоне от 0,05 до 0,2 мл. Это дополнительно повышает безопасность вакцины и способа введения.

5 В еще одном варианте осуществления нереплицируемым иммуногеном является рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок цирковируса свиней 2 типа, например, экспрессируемый бакуловирусом, как известно в области изобретения, или в химерном вирусе PCV1-PCV2. Доказано, что данный рекомбинантный белок является подходящим для применения в настоящем изобретении. В частности, ORF2 белок может
10 экспрессироваться в экспрессирующей системе бакуловируса, такой как описана в WO2007/028823, WO 2007/094893 или WO2008/076915.

В еще одном варианте осуществления животное во время введения имеет циркулирующие антитела с титром, равным $7 \log_2$ (7 единиц $\log_2$) или выше (установленным согласно способу, который описан в данном документе ниже под
15 примером 1, «Серология»). Было обнаружено, что даже в данном титре антител от среднего до высокого настоящее изобретение все-таки является эффективным.

В варианте осуществления единственная доза вакцины содержит менее чем 5000 AU иммуногена (минимальное количество, представляющее собой количество, все-таки приводящее к эффективному иммунному ответу). Было обнаружено, что с данной
20 дозой, более низкой, чем доза в существующей вакцине Porcilis PCV (лицензированной с двудозовым режимом вакцинации для достижения DOI, равного 22 недели), все-таки можно получить DOI более чем 23 недели только после одной вакцинации. В варианте осуществления единственная доза вакцины содержит приблизительно 2000 AU иммуногена. Похоже, что данное количество является достаточным для получения
25 преимуществ представленного изобретения.

В еще одном варианте осуществления вакцина содержит неживой иммуноген *Mycoplasma hyopneumoniae* для обработки животного против заражения патогенными бактериями *Mycoplasma hyopneumoniae*, и/или вакцина содержит неживой иммуноген *Lawsonia intracellularis* для обработки животного против заражения патогенными
30 бактериями *Lawsonia intracellularis*.

В еще одном варианте осуществления вакцина содержит адъювант, содержащий минеральное масло, отличающийся тем, что количество минерального масла в вакцине составляет между 1 и 10% о/о (объем масла на общий объем вакцины). Широко известно, что минеральное масло представляет собой очень хороший усилитель иммунного ответа
35 (также упоминаемое как «адъювант»). Однако, у свиней оно часто приводит к тяжелым местным реакциям (припухлостям, имеющим средний диаметр более чем 5 см), в частности при внутрикожном введении. Неожиданно обнаружили, что при текущем внутрикожном пути вакцинации подобные тяжелые локальные реакции могут не возникать совсем, а средний диаметр припухлостей может оставаться даже ниже 3 см, что признается приемлемым. В дополнительном варианте осуществления количество
40 минерального масла составляет между 2,5 и 5% о/о. Было обнаружено, что даже в данной очень низкой концентрации минерального масла иммунный ответ был эффективным.

В вариантах осуществления способа согласно изобретению животное получает введение единственной дозы вакцины, содержащей нереплицируемый иммуноген цирковируса свиней 2 типа в дерму, и одновременно (то есть в пределах одного дня, предпочтительно в пределах нескольких часов, минут или секунд) получает введение единственной дозы вакцины, содержащей неживой иммуноген *Mycoplasma hyopneumoniae*

(Mhyo) в дерму для обработки в одно и то же время заражения цирковирусом свиней 2 типа и заражения *Mycoplasma hyopneumoniae*. в области изобретения известно несколько неживых иммуногенов *Mycoplasma hyopneumoniae* для использования в данном или любом из других вариантов осуществления изобретения, таких как бактерины (Swine Health and Production. 1998; 6(3):107-112), рекомбинантные экспрессируемые антигены Mhyo (Infection and Immunity, June 1997 vol. 65 no. 6 2502-2507), растворимая фракция культуры Mhyo (WO 2013/152083) и т.д.

В еще одном варианте осуществления животное получает введение в дерму единственной дозы вакцины, содержащей нереплицируемый иммуноген цирковируса свиней 2 типа, и одновременно получает введение в дерму единственной дозы вакцины, содержащей неживой иммуноген *Lawsonia intracellularis* для обработки в одно и то же время заражения цирковирусом свиней 2 типа и заражения *Lawsonia intracellularis*. Что касается иммуногенов *Lawsonia intracellularis* для использования в данном или любом из других вариантов осуществления изобретения, в области изобретения известно несколько типов неживого иммуногена, которые описаны, например, в WO2009/144088 (убитый цельноклеточный иммуноген), W02005/070958 (субъединицы) и WO97/20050 (убитый цельноклеточный иммуноген). В WO2009/144088 описана комбинация с антигенами PCV и Mhyo как таковыми.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 представляет собой эксперимент, чтобы показать, что внутрикожная вакцинация единственной дозой может обеспечивать двадцать три недели иммунитета против заражения цирковирусом свиней 2 типа.

Пример 2 представляет собой еще один эксперимент с подходом с разовой вакцинацией PCV2 ID, показывающий, что вакцинация является безопасной и ведет к защитным титрам.

Пример 3 представляет собой прямое сравнение между внутрикожной и внутримышечной вакцинацией.

Пример 4 описывает эксперименты с комбинированной внутрикожной вакцинацией.

Пример 5 описывает эксперимент с комбинированными вакцинами, различными дозировками антигенов и различными адъювантами.

Фигура 1 Серология в исследовании DOI

Фигура 2 Вирусная нагрузка в сыворотке, фекалиях и органах

Фигура 3 Средние температуры тела

Фигура 4 Средние результаты общего PCV2 Ig Ab

Фигура 5 Средние результаты PCV2 IgM Ab

Фигура 6 Титры антител в исследовании на продолжительность

Фигура 7 Вирусная нагрузка в органах

Фигура 8 Вирусная нагрузка в органах

Пример 1

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Для данного исследования использовали потомство 10 свиней с антителами против PCV2. Поросят разделили по приплодам на 2 группы по 15 животных. В возрасте 3 недель поросят группы 1 вакцинировали внутрикожно с правой стороны шеи 0,2 мл вакцины, содержащей рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок цирковируса свиней 2 типа (см. WO 2007/028823 для предоставления белка) с использованием коммерчески доступного внутрикожного вакцинирующего устройства IDAL® (доступный от MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands), тогда как группа 2 была оставлена невакцинированной и служила в качестве контрольной группы. Всех

исследуемых животных ежедневно осматривали на клинические проявления. Образцы крови всех животных брали во время вакцинации, спустя 9, 17, 19 и 21 неделю. Через двадцать три недели после вакцинации каждое животное инфицировали с использованием инфицирующего штамма вируса PCV2 дикого типа, нанесенного интраназально.

5 Образцы сыворотки и фекальные мазки брали за один день перед иммунизацией и через одну, две и три недели после иммунизации и исследовали на нуклеиновую кислоту вируса PCV2 посредством количественной ПЦР. В дополнение образцы сыворотки исследовали на антитела к PCV2. Через три недели после иммунизации всех животных вскрывали и паховый лимфатический узел, миндалины и легкие брали на образцы для
10 определения антигена и нуклеиновой кислоты вируса PCV2.

Используемую вакцину давали в виде эмульсии масло-в-воде, содержащей 5% о/о минерального масла Marcol® 52 (Exxon), 0,30% м/о ацетата витамина Е и 0,32% полисорбата 80 (Tween 80; Sigma Aldrich), воду для инъекции и 2000 AU белка PCV2 на 0,2 мл. Единицы AU рассчитывают на основании теста AlphaLISA PerkinElmer. Для
15 данного теста лунки полистиролового микротитрационного планшета наполняют серийными разведениями тестируемого образца, содержащего антиген ORF2 PCV2 наряду с серийными разведениями эталонного стандарта. Данные разведения инкубируют с акцепторными шариками (покрытыми моноклональным антителом, направленным против ORF2 PCV2) и меченым биотином вторичными антителами,
20 которые также направлены против ORF2 PCV2. количество связанных вторичных антител затем количественно определяют посредством инкубирования с покрытыми стрептавидином донорными шариками и обнаружения хемотрюминисценции. таким образом, эталонный стандарт является таким, чтобы коммерчески доступную вакцину Porcilis® PCV принять равной содержанию 5000 AU на (2 мл) дозу.

25 МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Ежедневное наблюдение

Всех свиней ежедневно осматривали на клинические проявления заболевания. Наблюдения состояли из системных реакций, включая потерю аппетита, стремление
лечь, вялость или сонливость, озноб, ошестинивание, отек (особенно вокруг глаз), рвоту,
30 диарею и одышку.

Взятие образцов крови

Образцы крови собирали перед вакцинацией, спустя 9, 17, 19 и 21 неделю. Образцы крови собирали за один день перед иммунизацией и через 7, 13 и 19 дней после иммунизации. Это делали для всех свиней по отдельности.

35 Взятие фекальных мазков

Фекальные мазки брали у всех животных с использованием одного сухого тампона на животное за один день перед иммунизацией, через 7, 13 и 18 дней после иммунизации. Мазки брали с использованием стандартных методик, в среду, содержащую антибиотики. Суспензии взятого материала мазка в среде очищали посредством центрифугирования,
40 аликвотировали и хранили при $\leq -18^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего использования.

Серология

Все образцы сыворотки исследовали на антитела против PCV2, с использованием стандартных методик ELISA. Кратко, серийно разведенные образцы сыворотки инкубировали на микротитрационных планшетах, покрытых антигеном к ORF2 PCV2,
45 экспрессируемому бакуловирусом. После удаления сыворотки все лунки инкубировали с фиксированным количеством меченого биотином PCV2-специфических моноклональных антител. Связанный МоАб затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой стрептавидином с последующим выявлением хромофоров. Титры

экспрессировали, как титры $\log_2$.

Патологоанатомическое исследование

В конце эксперимента всех животных умерщвляли посредством кровопускания после оглушения. В процессе аутопсии животное вскрывали и на месте осматривали внутренние органы, обращая особое внимание на следующие органы: легкие, паховые и мезентериальные лимфатические узлы, миндалины, тимус, селезенку, печень и почки. После этого, извлекали образцы из миндалины, легких (lobus accessories) и пахового лимфатического узла для быстрого замораживания и последующего анализа с помощью количественной ПЦР (кПЦР).

Количественная ПЦР

Количественную ПЦР (кПЦР) проводили на всех сывороточных и фекальных мазках, и на 10% тканевых гомогенатов миндалин, легких и паховых лимфатических узлов. Вкратце, ДНК экстрагировали из образцов с использованием коммерческого набора. Геномную ДНК PCV2 в каждом образце количественно определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров и дважды меченого гидролизного зонда, специфического для PCV2. Число циклов, где удельная флуоресценция превышала пороговое значение коррелировало с числом циклов для набора образцов, содержащих известные количества содержащих PCV2 плазмид. Результаты выражали в виде $\log_{10}$ копий/мкл реакционной смеси ($\log_{10}$ с/мкл).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В начале эксперимента все животные были признаны здоровыми. Через 6 недель после вакцинации (wrv) в контрольной группе одно животное было обнаружено мертвым. Два вакцинированных животных имели небольшие локальные проблемы, а именно, небольшую двигательную дисфункцию (тугоподвижность в одной ноге). Учитывая небольшую проблему, этих животных не обрабатывали. Ни одно из вакцинированных животных не показало каких-либо признаков заболевания или системных реакций, таких как гипертермия, снижение потребления корма, анафилактический шок или рвота.

Результаты серологии приведены на фигуре 1. Очевидно, что вакцинированные животные содержали анти-PCV2 титр, уровень которого, похоже, составляет приблизительно до $4,0 \log_2$, в то время как у контрольных животных титр снижается ниже предела обнаружения. После иммунизации (23 wrv, в возрасте 26 недель) в вакцинированной группе титры слегка поднимаются. В контрольной группе титры поднимаются до того же самого уровня.

Результаты кПЦР показаны на фигурах 2A, 2B и 2C («dpc»=дней после заражения). Похоже, что вакцинированные животные 23 недели после вакцинации были защищены от заражения инфекцией PCV2, как показано, за счет значительного сокращения нуклеиновой кислоты PCV2 в сыворотке, лимфоидных органах и легких. Кроме того, вакцина была способна уменьшить распространение вируса, как показано значительным снижением вирусной нагрузки в фекальных мазках против PCV2, по крайней мере 23 недели. Это было сделано у опытных животных, имеющих титры циркулирующих антител против PCV2 приблизительно $7 \log_2$, что считается средним уровнем.

Пример 2

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

В общей сложности 46 поросят из одной партии опороса было выделено в 4 группы обработки: две вакцинированных группы по 13 поросят в каждой и две контрольные группы по 10 поросят. Первая группа была вакцинирована, как указано выше в примере 1, когда поросятам было около двух недель, вторая группа была вакцинирована, когда

пороссятам были около трех недель. Поросят вакцинировали внутривенно в правой стороне шеи одной дозой вакцины. Группы 3 (контрольная группа 2-недельных животных) и 4 (контрольная группа 3-недельных животных) не вакцинировали. Образцы сыворотки собирали у всех животных в день вакцинации, через 2, 3 и 4 недели после вакцинации. Температуры измеряли за один день до вакцинации, в день вакцинации и через четыре часа и в 1, 2, 3, 4 дни после вакцинации.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Перед вакцинацией поросят осматривали на общее состояние здоровья. Температуры тела измеряли у всех поросят в день $T=-1$, день $T=0$ в 0 и 4 ч после вакцинации, и в день $T=1$, 2, 3, 4 после вакцинации.

Образцы крови собирали в день вакцинации и 2, 3 и 4 недели спустя. Это было сделано у всех свиней в индивидуальном порядке в соответствии со стандартными методиками. Образцы крови собирали без добавления антикоагулянта. Сыворотку получали из образцов свернувшейся крови, и аликвоты заполняли и хранили при -20°C до проведения анализа.

ELISA всех антител Ig к PCV2 и антител IgM к PCV2 провели, как указано в данном документе выше, в примере 1 («серология»), за исключением того, что в случае антител IgM по ELISA планшеты покрывали антителами IgM, а затем инкубировали с антигенами к ORF2PCV2 перед инкубированием с фиксированным количеством меченных биотином PCV2-специфических моноклональных антител.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В начале эксперимента все животные были признаны здоровыми. На фигуре 3 показаны средние результаты температур тела. Никаких различий не было видно в среднем повышении температуры тела между либо двух-, либо трехнедельных животных (максимальное среднее увеличение составило между $0,0-0,3^{\circ}\text{C}$). Кроме того, максимальное повышение температуры тела отдельных животных в группе 1 и в группе 2 было сравнимо с максимальным повышением температуры отдельных животных в двух контрольных группах.

ELISA всех антител Ig к PCV2

На фигуре 4 приведены средние результаты гуморального иммунного ответа всех антител Ig к PCV2. Во время вакцинации поросята, иммунизированные в возрасте 2 недель, имели более высокие титры антител к PCV2 (полученных, скорее всего, от матери), чем поросята, иммунизированные в 3-х недельном возрасте. Вакцинированные животные показали увеличение титра значительно выше, чем контрольные животные.

ELISA IgM-антител к PCV2

На фигуре 4 показаны средние результаты гуморального иммунного ответа антител IgM к PCV2. На момент вакцинации все животные были отрицательными на антитела IgM. После вакцинации трехнедельные животные имели намного более быстрый и более высокий гуморальный иммунный ответ антител IgM, чем двухнедельные животные.

Контрольные животные оставались негативными на протяжении всего исследования.

На основании этих результатов можно сделать вывод о том, что однократная внутривенная вакцинация поросят в 2- и 3-недельном возрасте приводила к приемлемому профилю безопасности и хорошему серологическому ответу. Сравнимые результаты были получены в другом эксперименте (данные не показаны), где начальный уровень титров циркулирующих антител был еще выше, а именно до $9,4 \log 2$, что считается высоким концом среднего диапазона.

Пример 3

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

В общей сложности 40 поросят было выделено в четыре группы обработки по 10 поросят в каждой. Поросят из групп 1 и 2 внутрикожно вакцинировали одной дозой вакцины, как указано в данном документе выше в примере 1. Различие между группой 1 и 2 состояло в том, что инструмент для вакцинации IDAL из 2-й группы наращивал давление несколько выше (125% от значения инструмента для вакцинации IDAL, используемого для группы 1). Поросят из группы 3 внутримышечно вакцинировали одной дозой той же вакцины, в том же количестве, в том же месте (в области шеи), а поросят из 4 группы оставляли необработанными. Образцы сыворотки собирали у всех животных в день вакцинации, через три и пять недель после вакцинации.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Перед вакцинацией поросят осматривали на общее состояние здоровья в соответствии со стандартными процедурами. Взятие образцов крови и серологию общих антител к PCV2 и антител IgM, специфических к ORF2 PCV2, проводили в соответствии с процедурой, как указано в данном документе выше в примере 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В начале исследования все животные были признаны здоровыми. Результаты серологии приведены в таблице 1 (Титры выражены как log2). Во время вакцинации средние титры антител были относительно высокими. После вакцинации ни одно из животных не показало увеличение титра Ab к PCV2. На 3 и 5 неделе после вакцинации в группах ID можно было наблюдать более высокие средние титры антител к PCV2, чем в группе IM.

Таблица 1 Средние результаты антител			
Группы	Титр 0 wpv	Титр 3 wpv	Титр 5 wpv
1	8,2	7,3	6,2
2	8,3	7,0	5,9
3	8,6	6,5	5,1
4	8,4	6,2	4,3

Результаты серологии IgM к PCV2 приведены в Таблице 2 (выраженные в виде титра log2). Через три недели после вакцинации титры антител IgM к PCV2 двух групп ID были значительно выше, чем в группе IM и контрольной группе.

Таблица 2 Средние результаты антител IgM к PCV2	
Группа	титр IgM 3 wpv
1	12,7
2	8,9
3	3,4
4	1,0

При применении теста суммы рангов Уилкоксона р-значения для разницы ответа IgM для каждой из групп ID (1 и 2) в сравнении с группой IM (3) были ниже 0,05, а именно 0,0001 и 0,0329, соответственно.

Пример 4

Для этого исследования было доступно потомство нескольких свиноматок с антителами против PCV2. Поросята были разделены по приплодам на 3 группы по 18 животных. В 3-недельном возрасте поросята в группе 1 и 2 были привиты внутрикожно, как указано в данном документе выше в примере 1. Животные в группе 2 были привиты внутрикожно в то же самое время коммерчески доступной вакциной Porcilis® M Нуо ID Once (содержащей бактерин Mhyo) в соответствии с инструкциями изготовителя на

другой стороне шеи. Животные 3 группы (контрольная группа) оставались необработанными. Всех животных исследования ежедневно осматривали. Образцы сыворотки брали во время вакцинации и раз в две недели, пока животные не были отправлены на убой (в 23-25-недельном возрасте). Эти образцы были исследованы на антитела к PCV2.

Методика экспериментов соответствовали указанным в данном документе выше в примере 1. Полученная в результате серология показана на фигуре 6. Из этой фигуры становится ясно, что титры антител к PCV2 остаются значительно выше уровня $4 \log_2$, установленного в экспериментах, которые описаны в примере 1 и признаны защитными. Нет никаких признаков негативного вмешательства между вакцинами.

Этот эксперимент был повторен, чтобы проверить защиту от вирулентных *Mycoplasma hyopneumoniae*. Для данного повторного эксперимента использовали шестьдесят поросят. Сорок животных вакцинировали в возрасте 18-24 дней вакциной Mhyo, и двадцать из этих животных были также вакцинированы вакциной PCV. Двадцать животных не были вакцинированы и служили в качестве контроля заражения. Через три недели после вакцинации всех животных заражали вирулентным штаммом *M. hyopneumoniae*, и через три недели после заражения всех животных посмертно исследовали на поражение легких. Поражение легких в баллах (LLS) сравнивали между группами.

LLS для групп, вакцинированных Porcilis® M Hyo ID Once, были значительно ниже, чем у контрольной группы ($p < 0,05$, тест Данна). Не было никаких существенных различий между группами, которые были привиты Porcilis® M Hyo ID Once, по отдельности или в сочетании с вакциной PCV. Таким образом, можно сделать вывод, что комбинированная вакцинация не оказывает отрицательного влияния на иммунитет, полученный с Porcilis® M Hyo ID Once.

Пример 5

В общей сложности было составлено восемь вакцин, содержащих PCV2 (от 250 до 6000 AU/0,2 мл), M Hyo (на том же уровне, что и в Porcilis® M Hyo ID Once) и антиген Lawsonia (см WO 20089/127684, пример 2 для антигенов к убитым цельным клеткам: на уровне примерно 1×10^9 клеток на 0,2 мл). Вакцины содержат различные адъюванты. В некоторых вакцинах использовали существующий адъювант Diluvac Forte (MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands; под названием «DF»). В других использовали композицию адъювантов, как описано в данном документе выше в примере 1 (называемую «X-solve 12») или адъюванты, составленные с теми же составляющими, как в X-solve 12, но в половинной концентрации (называемую «X-solve 6»), или с концентрацией в 2 с половиной раза выше, чем в X-solve 12 (называемую «X-solve 30»). Полученные вакцины были следующими (антигены Mhyo и Lawsonia не перечисляются, содержание на дозу):

Группа 1: 2000 AU PCV2/X-solve 30

Группа 2: 250 AU PCV2/X-solve 12

Группа 3: 500 AU PCV2/X-solve 12

Группа 4: 2000 AU PCV2/X-solve 12

Группа 5: 2000 AU PCV2/X-solve 6

Группа 6: 500 AU PCV2/DF

Группа 7: 2000 AU PCV2/DF

Группа 8: 6000 AU PCV2/DF

Для этого исследования использовали потомство 8 свиноматок. Поросята имели умеренные (средний уровень) материнские антитела (MDA) против PCV2 (в среднем $6,7 \log_2$). В трех/четырёхнедельном возрасте поросята из групп от одной до восьмой

были внутривенно вакцинированы одной дозой с использованием инструмента для вакцинации IDAL®. Поросята из группы девять остались непривитыми. На седьмой неделе после вакцинации все животные были перевезены на объекты для заражения. Через день все животные были инфицированы штаммом для проверочного заражения PCV2. Всех поросят ежедневно осматривали на клинические проявления. Местные реакции контролировали с помощью пальпации, начиная в день вакцинации и через каждые два дня после вакцинации до двадцати дней после вакцинации.

Образцы крови отбирали у всех животных в день вакцинации и спустя три недели, за один день до заражения, 1 и 2 недели спустя и во время аутопсии. Образцы сыворотки, взятые у каждого животного, были протестированы на наличие антител против PCV2 и М Ню. Во время аутопсии были отобраны образцы брыжеечные и паховые лимфатические узлы, миндалины и легкие для количественного определения нуклеиновых кислот PCV2.

Методики эксперимента были такими же, как описаны в данном документе выше в примере 2. Гуморальный иммунный ответ антител IgM к PCV2 в момент вакцинации был ниже уровня обнаружения для всех групп (ниже 2,0 Log 2). На 3 неделе после вакцинации титр антител к PCV2 был самым высоким для вакцины 2000AU PCV2/X-solve 30, а именно, 20 log 2. Группы X-solve 12, содержащие 250-, 500- и 2000 AU антигена к PCV2 на дозу, имели титр 9, 16 и 19 log 2, соответственно. Группа, которая получала вакцину 2000 AU /X-solve 6, имела титр 15 log 2. группы DF, содержащие 500-, 2000- и 6000 AU антигена PCV2 на дозу, имели титр 8, 14 и 16 log 2, соответственно. Контроли имели титр ниже уровня обнаружения.

В этом исследовании были оценены системные и местные реакции. Не наблюдалось никаких системных реакций, относимых к вакцинации. Что касается затрагиваемых местных эффектов, не более трех вакцинированных животных (получивших X-solve 12 500 и 2000 AU или DF 6000 AU PCV2 на одну дозу вакцины, соответственно) имели небольшие проблемы моторики, такое же количество, как у контрольных животных. Вследствие этого, данные реакции могут обоснованно рассматриваться как не связанные с вакцинацией. Что касается других местных реакций, многие животные (приблизительно между 60-100%), вакцинированные X-solve, продемонстрировали местные реакции, средний размер припухлостей был менее чем 3 см, а именно, между 1-2 см, и припухлости исчезли в течение 2-6 дней. При использовании DF только около 30% животных продемонстрировали местные припухлости, при этом средний размер составляет менее 0,5 см, и они исчезли в течение дня.

На фигурах 7 и 8 изображена вирусная нагрузка в органах (в среднем) для различных вакцин. Похоже, что все вакцины способны существенно (в данных случаях, по крайней мере, 3 logs) снижать вирусную нагрузку в соответствующих органах.

В этом исследовании оказалось, что все используемые адъюванты были безопасными, индуцировали IgM ответ к PCV2 и были в состоянии лечить животных от инфекции патогенного цирковируса свиней 2 типа. Не было обнаружено отрицательного взаимодействия между различными антигенами.

(57) Формула изобретения

1. Применение вакцины, содержащей рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок цирковируса свиней 2 типа, для профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа, против заражения патогенным цирковирусом свиней 2 типа путем введения единственной дозы вакцины в кожу животного, где введение единственной дозы включает менее чем

0,5 мл вакцины, и где вакцину вводят безыгольным вакцинирующим устройством.

2. Применение по п. 1, отличающееся тем, что введение единственной дозы включает 0,2 мл вакцины.

3. Применение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что животное во время введения имеет циркулирующие антитела с титром, составляющим $7 \log_2$ или выше.

4. Применение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что единственная доза вакцины содержит менее чем 5000 AU иммуногена на 2 мл.

5. Применение по п. 4, отличающееся тем, что единственная доза вакцины содержит 2000 AU иммуногена на 0,2 мл.

6. Применение по любому из пп. 1, 2 или 5, отличающееся тем, что вакцина содержит неживой иммуноген *Mycoplasma hyopneumoniae* для обработки животного против заражения патогенными бактериями *Mycoplasma hyopneumoniae*.

7. Применение по любому из пп. 1, 2 или 5, отличающееся тем, что вакцина содержит неживой иммуноген *Lawsonia intracellularis* для обработки животного против заражения патогенными бактериями *Lawsonia intracellularis*.

8. Применение по любому из пп. 1, 2 или 5, отличающееся тем, что вакцина содержит адъювант, содержащий минеральное масло, отличающаяся тем, что количество минерального масла в вакцине составляет между 1 и 10% о/о.

9. Применение по п. 8, отличающаяся тем, что количество минерального масла составляет между 2,5 и 5% о/о.

10. Способ профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа, против заражения патогенным цирковирусом свиней 2 типа за счет введения в дерму животного единственной дозы вакцины, содержащей рекомбинантный экспрессируемый белок ORF2 цирковируса свиней 2 типа, где введение единственной дозы включает менее чем 0,5 мл вакцины, и где вакцину вводят безыгольным вакцинирующим устройством.

11. Способ профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа, против заболевания, обусловленного заражением патогенным цирковирусом свиней 2 типа за счет введения в дерму животного единственной дозы вакцины, содержащей рекомбинантный экспрессируемый белок ORF2 цирковируса свиней 2 типа, где введение единственной дозы включает менее чем 0,5 мл вакцины, и где вакцину вводят безыгольным вакцинирующим устройством.

12. Способ по п. 10 или 11, отличающийся тем, что вакцина в дополнение содержит неживой иммуноген *Mycoplasma hyopneumoniae* для обработки животного против заражения патогенными бактериями *Mycoplasma hyopneumoniae*.

13. Способ по п. 10 или 11, отличающийся тем, что вакцина в дополнение содержит неживой иммуноген *Lawsonia intracellularis* для обработки животного против заражения патогенными бактериями *Lawsonia intracellularis*.

14. Способ профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа против заражения цирковирусом свиней 2 типа и *Mycoplasma hyopneumoniae*, отличающийся тем, что способ включает введение животному единственной дозы вакцины, содержащей рекомбинантный экспрессируемый белок ORF2 цирковируса свиней 2 типа в кожу, и одновременно введение животному в дерму единственной дозы вакцины, содержащей неживой иммуноген *Mycoplasma hyopneumoniae*, где введение единственной дозы включает менее чем 0,5 мл вакцины, и где вакцину вводят безыгольным вакцинирующим устройством.

15. Способ профилактической обработки животного, которое имеет циркулирующие антитела, направленные против цирковируса свиней 2 типа против заражения цирковирусом свиней 2 типа и *Lawsonia intracellularis*, отличающийся тем, что способ включает введение животному единственной дозы вакцины, содержащей

5 рекомбинантный экспрессируемый ORF2 белок цирковируса свиней 2 типа, и одновременно введение животному в дерму единственной дозы вакцины, содержащей неживой иммуноген *Lawsonia intracellularis*, где введение единственной дозы включает менее чем 0,5 мл вакцины, и где вакцину вводят безыгольным вакцинирующим устройством.

10

15

20

25

30

35

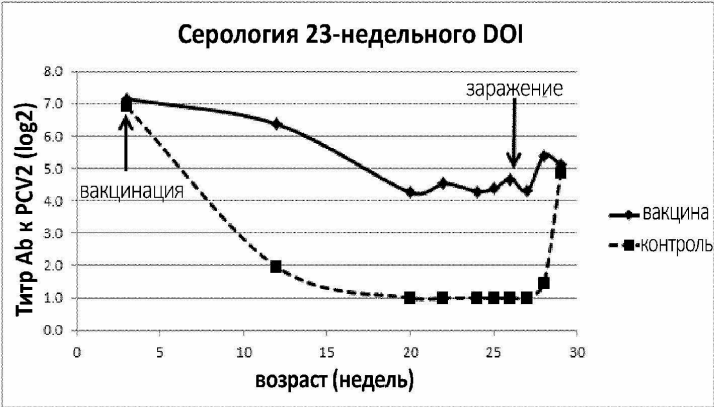
40

45

1

1/6

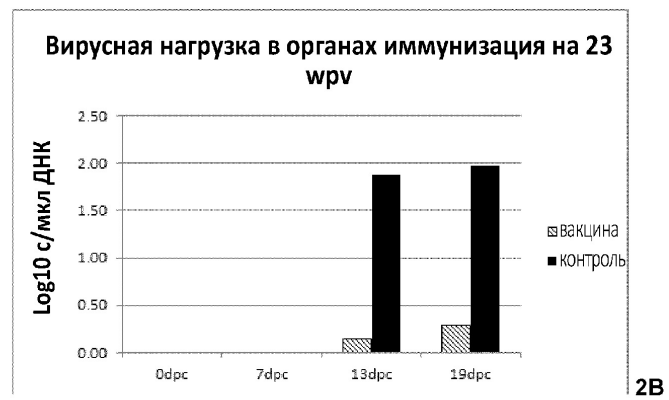
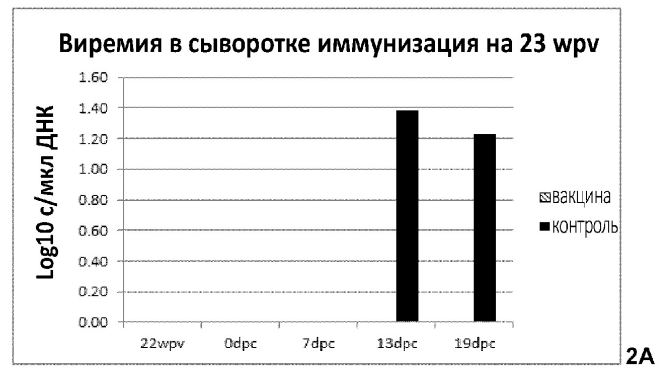
ФИГ. 1



2

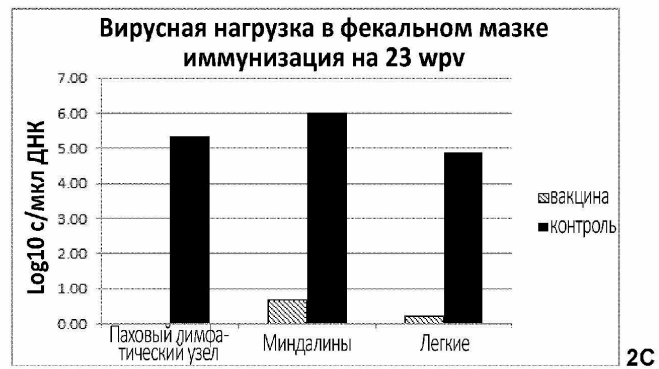
2/6

ФИГ. 2



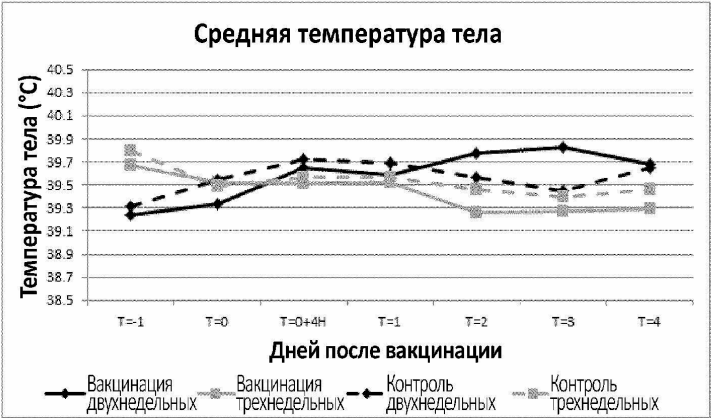
3/6

ФИГ. 2 (продолжение)

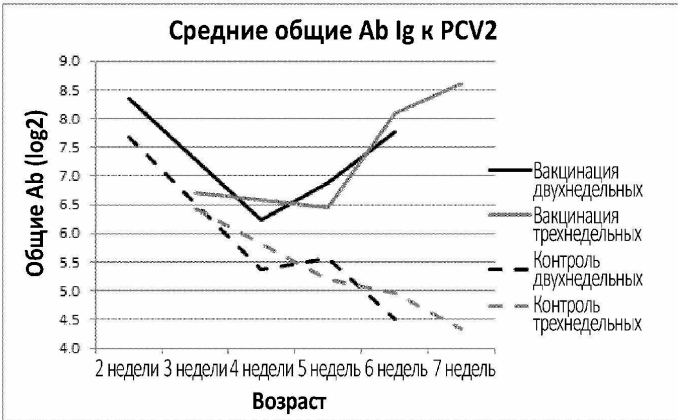


4/6

ФИГ. 3

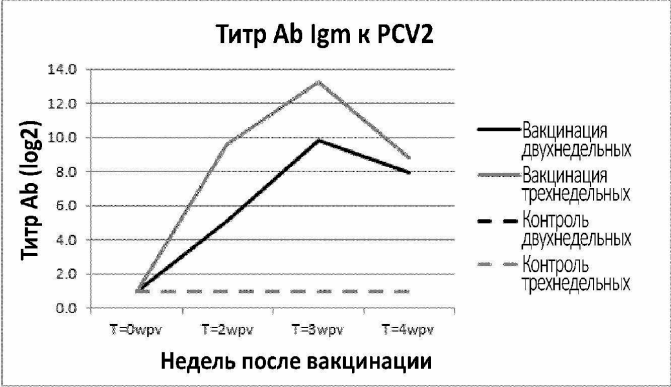


ФИГ. 4

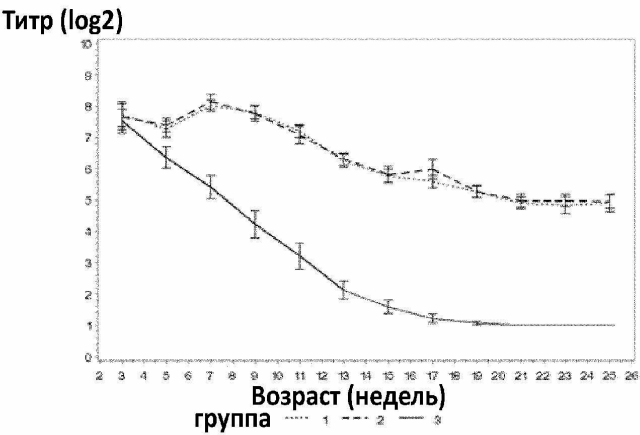


5/6

ФИГ. 5

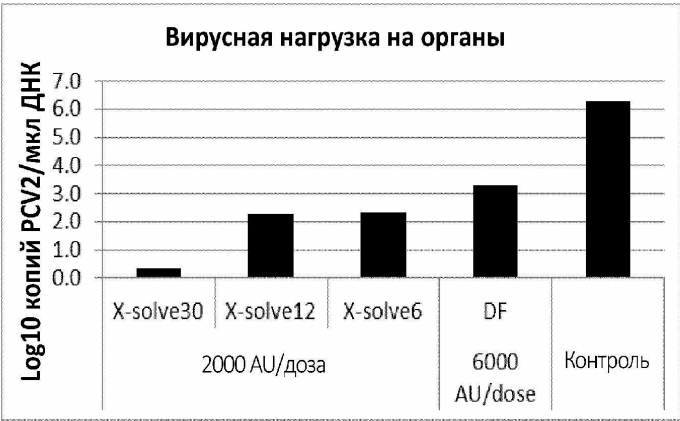


ФИГ. 6



6/6

ФИГ. 7



ФИГ. 8

