



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109675026 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201910169631.9

(22)申请日 2014.09.19

(30)优先权数据

61/879,959 2013.09.19 US

(62)分案原申请数据

201480057805.8 2014.09.19

(71)申请人 硕腾服务有限责任公司

地址 美国新泽西

(72)发明人 P·J·多明诺夫斯基

L·威尔梅斯 D·L·福斯

K·莫尔 G·加洛

J·M·哈德汉姆 R·L·克雷布斯

S·A·M·莱特勒 S·马汉

S·梅迪拉塔 D·姆旺吉

S·K·雷 S·A·萨蒙 S·沃拉

M·C·方丹 D·G·E·史密斯

J·L·菲茨帕特里克 W·多纳基

A·D·亚格拉兹

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 张小勇

(51)Int.Cl.

A61K 39/155(2006.01)

A61K 39/39(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书61页
序列表5页

(54)发明名称

油基佐剂

(57)摘要

本发明提供了包含免疫刺激寡核苷酸、多聚阳离子载剂、固醇、皂苷、季胺、TLR-3激动剂、糖脂以及MPL-A或其类似物于油乳液中的组合的各种配方,其制备免疫原性组合物和疫苗的用途,以及其治疗动物的用途。

1. 一种疫苗组合物,其包含尼帕病毒(Nipah virus)和/或亨德拉病毒(Hendra virus)抗原和佐剂配方,所述疫苗组合物包含以所述疫苗组合物的至少36%v/v的量存在的油相、免疫刺激寡核苷酸以及多聚阳离子载剂,其中进一步地所述疫苗组合物是油包水乳液。
2. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其中油相以组合物的至少50%v/v的量存在。
3. 根据权利要求1或2所述的疫苗组合物,其中免疫刺激寡核苷酸是CpG,并且多聚阳离子载剂是DEAE葡聚糖。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的疫苗组合物,其中抗原是亨德拉病毒的可溶性G蛋白。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的疫苗组合物,其中抗原以每剂量50-200 μ g的量存在。
6. 根据权利要求5所述的疫苗组合物,其中抗原以每剂量约100 μ g的量存在。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的疫苗组合物的用途,其用于治疗或预防受试者中的亨德拉病毒感染。
8. 根据权利要求7所述的用途,其中受试者是马。
9. 根据权利要求1-6中任一项所述的疫苗组合物的用途,其用于治疗或预防受试者中的尼帕病毒感染。
10. 根据权利要求9所述的用途,其中受试者是猪。

油基佐剂

本申请是中国发明专利申请号201480057805.8的分案申请。

技术领域

[0001] 本发明一般涉及新颖佐剂配方,其用于增强对用于免疫原性和疫苗组合物中的抗原的免疫反应。本发明还涉及佐剂、免疫原性和疫苗组合物的制备和使用方法。

背景技术

[0002] 细菌、病毒以及寄生虫感染在人类和动物中广泛传播。由这些传染剂引起的疾病通常对抗微生物医药疗法具抗性,而没有留下有效的治疗方式。因此,疫苗学方法越来越多地用于控制传染病。整个传染病原体在化学灭活或适当基因操纵之后可以适合用于疫苗配方中。或者,病原体的蛋白质亚单位可以在重组表达系统中表达并且加以纯化用于疫苗配方中。疫苗可以通过在组合物中包括适当的佐剂而更有效。

[0003] 术语‘佐剂’一般指的是增加对抗原的体液或细胞免疫反应的任何物质。佐剂用于实现两个目的:其减缓抗原从注射部位的释放,并且其增强免疫系统的刺激。传统的疫苗一般由灭活或杀灭或修饰的活病原微生物的粗制剂组成。与病理微生物的这些培养物相关的杂质可以充当佐剂以增强免疫反应。然而,由使用病理微生物的均质制剂或纯化的蛋白质亚单位作为抗原的疫苗引起的免疫性通常很弱。因此,添加诸如佐剂的某些外源物质变得有必要。此外,在一些情况下,合成和亚单位疫苗对于生产来说可能很昂贵。而且,在一些情况下,病原体无法在商业规模上生长,并且因此,合成/亚单位疫苗代表唯一可行的选项。佐剂的添加可以允许使用较小剂量的抗原来刺激类似的免疫反应,从而降低疫苗的生产成本。因此,当一些可注射医药剂与佐剂组合时,这种药剂的有效性可以显著增加。

[0004] 在佐剂的选择中必须考虑到许多因素。佐剂应促使抗原以有效的方式以相对缓慢的速率释放和吸收,而对宿主具有最小的毒性、过敏原性、刺激性以及其它不合需要的作用。为了合乎需要,佐剂应是非杀病毒的,可生物降解的,能够始终形成高水平的免疫性,能够刺激交叉保护,与多个抗原相容,在多个物种中有效,无毒,并且对宿主安全(例如,无注射部位反应)。佐剂的其它理想特征在于其能够微量给药,节省剂量,具有极佳的贮存稳定性,可经受干燥,可以制成无油的,可以呈固体或液体存在,是等张的,容易制造,并且对于生产来说是不昂贵。最后,对于佐剂非常理想的是可配置的以诱导体液或细胞免疫反应或两者,这取决于接种疫苗情形的需求。然而,可以满足上述需求的佐剂的数量是有限的。

[0005] 佐剂的选择取决于对疫苗的需要,无论是抗体反应的量级或功能的增加、细胞介导的免疫反应的增加、粘膜免疫性的诱导或抗原剂量的降低。已经提出了许多佐剂,然而,没有一者已经显示理想地适于所有疫苗。在文献中报道的第一个佐剂是弗氏完全佐剂(Freund's Complete Adjuvant, FCA),其含有油包水乳液和分枝杆菌的提取物。不幸的是, FCA耐受性很差并且其可以引起不受控的发炎。自从80多年前发现FCA以来,已经努力降低佐剂的不当副作用。

[0006] 已经用作佐剂的一些其它物质包括金属氧化物(例如,氢氧化铝)、明矾、盐的无机

螯合物、明胶、各种石蜡型油、合成树脂、海藻酸盐、类粘蛋白和多糖化合物、酪氨酸盐,以及源自血液的物质,诸如纤维蛋白凝块。虽然这些物质对刺激免疫系统一般是有效的,但没有一者已经发现完全令人满意,这归因于在宿主中的不利作用(例如,产生无菌脓肿、器官损伤、致癌性或过敏原反应)或不合需要的医药特性(例如,从注射部位快速分散或分散控制很差,或物质膨胀)。

发明内容

[0007] 本发明提供了新颖疫苗组合物和适用于疫苗的佐剂配方。

[0008] 在第一个方面,本发明提供了一种包含油相和水相的佐剂配方,其中油相包含这种配方的至少50%v/v,其中所述配方包含单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物和免疫刺激寡核苷酸中的至少一者,限制条件是:a) 如果所述免疫刺激寡核苷酸不存在,那么这种配方包含多聚I:C、糖脂以及任选地季胺;或多聚阳离子载体;以及b) 如果所述单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物不存在,那么这种配方包含铝来源和任选地多聚阳离子载体。

[0009] 在不同实施方案中,油相可以包含油和任选地油溶性乳化剂。

[0010] 在一些实施方案中,所述单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物存在于佐剂配方中。在这些实施方案中,配方进一步包含固醇(例如,胆固醇)、多聚I:C或其组合。

[0011] 在某一组实施方案中,除了油和任选的乳化剂以外,佐剂配方包括单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物、固醇以及免疫刺激寡核苷酸的组合(“TCMO”)。佐剂配方还可以任选地包含多聚I:C(“TCMYO”)和/或皂苷(分别是“QTCMO”或“QTCMYO”)。

[0012] 在其它替代性实施方案中,除了油和任选的乳化剂以外,佐剂配方还包括季胺、糖脂、MPL-A或其类似物以及多聚I:C的组合(“ODYRM”)。

[0013] 在另一组实施方案中,除了油和任选的乳化剂以外,佐剂配方还包括皂苷、固醇、季胺、多聚阳离子载体的组合,限制条件是如果所述多聚阳离子载体是葡聚糖DEAE,那么抗原不是大肠杆菌J-5菌苗(“QCDXO”)。

[0014] 在其它实施方案中,除了油和任选的乳化剂以外,佐剂可以包括免疫刺激寡核苷酸、铝来源以及任选地多聚阳离子载体(分别是“TOA”和“TXO-A”)。

[0015] 在第二个方面,根据上文所叙述的实施方案中的任一者的佐剂配方可以包括抗原组分,由此形成疫苗组合物,限制条件是如果佐剂配方由DEAE葡聚糖、Quil A、胆固醇以及DDA组成(或基本上由其组成),或如果佐剂配方由DEAE葡聚糖和免疫刺激寡核苷酸组成(或基本上由其组成),那么抗原不是大肠杆菌J-5蛋白。在某些实施方案中,这个方面的疫苗含有来源于影响牛、绵羊、马或猪的病原体的抗原。在其它实施方案中,这个方面的疫苗含有来源于影响家禽或猫科动物的病原体的抗原。

[0016] 在本发明的额外方面,提供了抗原化合物和佐剂配方的不同组合。

[0017] 更具体地说,在第三个方面,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含巨型艾美耳球虫(*Eimeria maxima*)和/或产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)抗原和佐剂配方。在这第三个方面的不同实施方案中,佐剂配方可以包括油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;多聚阳离子载体,以及任选地免疫刺激寡核苷酸。在本发明的这个方面的其它实施方案中,本发明提供了一种包含佐剂组分的疫苗组合物,这种佐剂组分包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;免疫刺激寡核苷酸、固醇以及单磷酸脂质A (MPL-

A) 或其类似物。

[0018] 在第四个方面,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含新孢子虫 (*Neospora*) 抗原和佐剂配方。在根据这个方面的本发明的不同实施方案中,佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;以及单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物。在其它实施方案中,佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在,免疫刺激寡核苷酸以及多聚阳离子载剂。

[0019] 在第五个方面,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含流产嗜衣原体 (*Chlamydia abortus*) 抗原和佐剂配方,这种佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;固醇;免疫刺激寡核苷酸;单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物;以及多聚I:C。

[0020] 在第六个方面,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*, *S.uberis*) 抗原和佐剂配方,这种佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;以及多聚阳离子载剂。在本发明的这第六个方面的不同实施方案中,佐剂配方还包括免疫刺激寡核苷酸。或者或另外,佐剂配方可以包括皂苷、固醇以及季胺。

[0021] 在第七个方面,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含肌肉生长抑制素 (myostatin) 作为抗原组分,和佐剂配方,所述佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;免疫刺激寡核苷酸,以及以下任一者:多聚阳离子载剂;或MPL-A或其类似物。在根据本发明的这个方面的一组实施方案中,佐剂配方包含MPL-A或其类似物。在这一组的一些实施方案中,佐剂配方含有每50 μ l所述疫苗组合物小于0.5 μ g的固醇,并且优选地不含有胆固醇。肌肉生长抑制素的选择取决于受试物种。在一个所选实施方案中,选择的物种是鸡并且肌肉生长抑制素的来源是鸡的肌肉生长抑制素。

[0022] 在第八个方面,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含化脓秘密杆菌 (*A. pyogenes*) (原称为化脓秘密杆菌 (*Arcanobacterium pyogenes*))、化脓放线菌 (*Actinomyces pyogenes*) 或化脓棒状杆菌 (*Corynebacterium pyogenes*);现称为化脓隐秘杆菌 (*Trueperella pyogenes*)) 抗原和佐剂配方,其中这种佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;免疫刺激寡核苷酸以及多聚阳离子载剂。

[0023] 在第九个方面,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含大肠杆菌抗原、BRV抗原或BCV抗原和佐剂配方,其中所述佐剂配方包含以所述疫苗组合物的至少50%v/v的量存在的油相、免疫刺激寡核苷酸、以及多聚阳离子载剂和铝来源中的至少一者。

[0024] 在第十个方面,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含微小扇头蜱 (*Rhipicephalus microplus*) 抗原和佐剂,所述佐剂选自由以下组成的群组:a) 水性佐剂,其包含免疫刺激寡核苷酸、皂苷、固醇、季胺、聚丙烯酸聚合物以及糖脂;以及b) 油基佐剂,其包含以疫苗组合物的至少50%v/v的量存在的油相并且包含免疫刺激寡核苷酸和多聚阳离子载剂。

[0025] 在第十一个方面,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含口蹄疫病毒 (FMDV) 抗原和佐剂配方,所述佐剂配方包含以所述疫苗组合物的至少50%v/v的量存在的油相、免疫刺激寡核苷酸以及多聚阳离子载剂。在不同实施方案中,口蹄疫病毒抗原可以是以下的抗原:野生型FMDV,遗传修饰和/或减弱的FMDV病毒株,或重组表达的FMDV结构蛋白,诸如血清型

A、C、O、Asia1、SAT1、SAT2或SAT3的病毒样粒子(VLP)。

[0026] 在第十二个方面,本发明提供了一种产生诊断或治疗抗体的方法,这种方法包括用根据本发明的第一个方面的实施方案中的任一者的佐剂配方、和抗原使来源动物免疫,继而从来源动物提取抗体来源以及必要时纯化抗体。

[0027] 在某些实施方案中,来源动物是大鼠、小鼠、天竺鼠、仓鼠、牛类动物、山羊、兔、马、猪类动物或绵羊。在一些其它实施方案中,来源动物是猫或犬。

[0028] 在特别适用于多克隆抗体的一些实施方案中,抗体来源是血清或乳奶。在适用于单克隆抗体的实施方案中,适合的抗体来源是脾细胞。

[0029] 在某些实施方案中,佐剂配方包含免疫刺激寡核苷酸和多聚阳离子载剂。佐剂可以任选地含有铝来源,其包含可以是氢氧化铝凝胶的铝来源。在某些实施方案中,免疫刺激寡核苷酸是CpG并且多聚阳离子载剂是DEAE葡聚糖。

[0030] 在某些实施方案中,抗原可以选自FeLVgp70、牛副流感-3BPI-3(HN蛋白)、睡眠嗜组织菌(*Histophilus somni*) p31、波氏杆菌(*Bordetella*) FHA、副痘(Parapox)、BVDV1 gp53、BVDV2 gp53、梭状芽孢杆菌(*Clostridia*) 毒素、犬圆环病毒(*Canine Circovirus*)、猪痢疾短螺旋体(*Brachyspira hyodysenteriae*) (猪物种) 抗原;灭活的全细胞和灭活的胃蛋白酶消化物。

[0031] 本发明还提供了使用根据本发明的第三个至第十二个方面的疫苗的方法。

具体实施方式

[0032] “约”或“近似”当结合可测量的数值变量使用时,指的是变量的指定值和在该指定值的实验误差内(例如,在平均值的95%置信区间内)或在指定值的10%内的变量的所有值,以较大值为准,除非约是关于以周为单位的时间间隔使用,其中“约3周”是17至25天,并且约2至约4周是10至40天。

[0033] “佐剂”意指增加对抗原的体液或细胞免疫反应的任何物质。佐剂一般用于实现两个目的:抗原从注射部位的控制释放,和免疫系统的刺激。

[0034] “佐剂配方”指的是具有辅助特性的配方。

[0035] “烷基”指的是直链与支链饱和烃部分。

[0036] “胺”指的是含有氮的化合物。胺是通过用烃基取代氢原子而从氨得到的一组化合物。“季胺”指的是具有四个烃基的基于铵的化合物。

[0037] “抗体”指的是由于对特异性抗原的免疫反应的结果而可以结合至那种抗原的免疫球蛋白分子。免疫球蛋白是由具有“恒定”和“可变”区的“轻”和“重”多肽链组成的血清蛋白并且基于恒定区的组成分类(例如,IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM)。

[0038] “抗原”或“免疫原”指的是由动物的免疫系统识别并且产生免疫反应的任何物质。这个术语包括杀灭、灭活、减弱或修饰的活细菌、病毒或寄生虫。术语“抗原”还个别地或以任何组合形式包括多核苷酸、多肽、重组蛋白、合成肽、蛋白提取物、细胞(包括肿瘤细胞)、组织、多糖或脂质,或其片段。术语抗原还包括抗体,诸如抗独特型抗体或其片段,以及可以模拟抗原或抗原决定簇(表位)的合成肽模拟表位。

[0039] “菌苗”意指可以用作疫苗或免疫原性组合物的组分的一种或多种杀灭细菌的悬浮液。

[0040] “缓冲液”意指防止另一种化学物质的浓度变化的化学系统,例如,质子供体和接受系统充当防止氢离子浓度 (pH) 明显变化的缓冲液。缓冲液的另一个实例是含有弱酸和其盐 (共轭碱) 或弱碱和其盐 (共轭酸) 的混合物的溶液。

[0041] “细胞免疫反应”或“细胞介导的免疫反应”是由T淋巴细胞或其它白血细胞或两者介导的免疫反应,并且包括由活化的T细胞、白血细胞或两者产生的细胞因子、趋化因子以及类似分子的产生;或杀死受感染细胞的T淋巴细胞或其它免疫细胞反应。

[0042] “伴侣动物”指的是犬、猫以及马。

[0043] 如应用于佐剂配方的“基本上由……组成”指的是不以所述试剂发挥可测量的辅助或免疫调节作用的量含有未叙述的额外辅助或免疫调节剂的配方。

[0044] “迟发型超敏反应 (DTH)”指的是在暴露于免疫系统识别为外来的抗原之后24至72小时发展的发炎反应。这种类型的免疫反应主要涉及T细胞而不是抗体 (由B细胞获得的)。

[0045] “剂量”指的是给予受试者的疫苗或免疫原性组合物。“第一剂量”或“引发疫苗”指的是第0天给予的这种组合物的剂量。“第二剂量”或“第三剂量”或“年剂量”指的是继第一剂量之后给予的这种组合物的量,其可能是或可能不是与第一剂量相同的疫苗或免疫原性组合物。

[0046] 术语“乳化剂”在本公开中广泛使用。其包括一般被接受作为乳化剂的物质,例如, **TWEEN®** 或 **SPAN®** 产品线 (分别是聚乙氧基化山梨糖醇脂肪酸酯和脂肪酸取代的脱水山梨糖醇表面活性剂) 的不同产品,以及不同溶解度增强剂,诸如PEG-40蓖麻油或另一种聚乙二醇化氢化油。

[0047] “体液免疫反应”指的是由抗体介导的免疫反应。

[0048] 受试者中的“免疫反应”指的是对抗原的体液免疫反应、细胞免疫反应、或体液和细胞免疫反应的发展。免疫反应通常可以使用本领域中已知的标准免疫试验和中和试验来测定。

[0049] 抗原的“免疫保护量”或“免疫有效量”或“产生免疫反应的有效量”是在接受者中有效诱导免疫原性反应的量。免疫原性反应可能足以用于诊断目的或其它测试,或可能足以预防由致病剂感染引起的疾病的征象或症状,包括对健康不利的影响或其并发症。可以诱导体液免疫性或细胞介导的免疫性或两者。动物对免疫原性组合物的免疫原性反应可以例如间接地经由抗体滴度的测量、淋巴细胞增殖试验,或直接地经由在用野生型病毒株攻击后监测征象和症状来评估,而由疫苗赋予的保护免疫性可以通过测量例如受试者的临床征象 (诸如死亡率、发病率) 的减少、温度数、整体身体状况以及整体健康和表现来评估。免疫反应可以包含 (但不限于) 细胞和/或体液免疫性的诱导。

[0050] “免疫原性”意指引出免疫或抗原反应。因此,免疫原性组合物将是诱导免疫反应的任何组合物。

[0051] “免疫刺激分子”指的是刺激非抗原特异性免疫反应的分子。

[0052] “脂质”指的是不溶于水但可溶于非极性有机溶剂,触摸感是油性的,并且与碳水化合物和蛋白质一起构成活细胞的主要结构物质的一组有机化合物中的任一者,包括脂肪、油、蜡、固醇以及三酸甘油酯。

[0053] “医药学上可接受的”指的是在合理医学判断的范围内适合用于与受试者的组织接触而没有不当毒性、刺激、过敏反应等等,与合理的效益风险比相配,并且有效用于其预

期用途的物质。

[0054] 术语“多聚I:C”指的是天然存在的多聚肌苷酸:多聚胞苷酸聚合物以及其合成形式,例如,具有稳定化骨架并且优选地具有TLR-3激动剂活性。

[0055] “反应原性”指的是在受试者中响应佐剂、免疫原性或疫苗组合物的施用而引起的副作用。其可以在施用部位发生,并且通常依据许多症状的发展来评价。这些症状可以包括发炎、发红以及脓肿。其还依据发生率、持续时间以及严重性来评价。“低”反应将例如涉及仅可由心悸检测到并且眼睛无法检测,或持续时间将很短的肿胀。更严重的反应将是例如眼睛可见或持续时间更长的反应。

[0056] “室温”意指18℃至25℃的温度。

[0057] “皂苷”指的是由与类固醇或三萜结构的疏水区缔合的亲水区(通常是几个糖链)组成的植物来源的一组表面活性糖苷。

[0058] “类固醇”指的是属于脂质的生物化学种类的一组有机化合物中的任一者,其易溶于有机溶剂并且微溶于水。类固醇包括三个稠合环己烷(六碳)环加上第四个环戊烷(五碳)环的四稠合环系统。

[0059] “固醇”指的是在动物中从萜类前体以生物方式产生的化合物。其包含类固醇环结构,具有通常附接至碳-3的羟基(OH)基团。脂肪酸取代基的烃链长度通常从16个变化至20个碳原子,并且可以是饱和或不饱和的。固醇通常含有环结构中的一个或多个双键以及附接至环的多种取代基。固醇和其脂肪酸酯基本上不溶于水。

[0060] “受试者”指的是需要施用佐剂组合物的任何动物。其包括哺乳动物和非哺乳动物,包括灵长类动物、牲畜、伴侣动物、实验室测试动物、圈养野生动物、禽类(包括卵中)、爬行动物以及鱼。因此,这个术语包括(但不限于)猴、人类、猪、牛、绵羊、山羊、马、小鼠、大鼠、天竺鼠、仓鼠、兔、猫、犬、鸡、火鸡、鸭、其它家禽、青蛙以及蜥蜴。

[0061] “TCID₅₀”指的是“组织培养感染剂量”并且定义为感染50%的给定批次的接种细胞培养物所需的病毒稀释度。各种方法可以用于计算TCID₅₀,包括在本说明书通篇利用的斯皮尔曼-卡伯法(Spearman-Kärber method)。对于斯皮尔曼-卡伯法的描述,参看B.W.Mahy和H.O.Kangro,病毒学方法指南(Virology Methods Manual),第25-46页(1996)。

[0062] “治疗有效量”指的是将在接受抗原或疫苗的受试者中诱导免疫反应的抗原或疫苗的量,这足以预防或减少由诸如病毒或细菌的病原体感染引起的疾病的征象或症状,包括对健康不利的影响或其并发症。可以诱导体液免疫性或细胞介导的免疫性或体液与细胞介导的免疫性。动物对疫苗的免疫原性反应可以例如间接地经由抗体滴度的测量、淋巴细胞增殖试验,或直接地经由在用野生型病毒株攻击后监测征象和症状来评估。由疫苗赋予的保护免疫性可以通过测量例如受试者的临床征象(诸如死亡率、发病率)的减少、温度数、整体身体状况以及整体健康和表现来评估。治疗有效的疫苗量可以取决于所使用的特定佐剂、所使用的特定抗原或受试者的病状而变化,并且可以由本领域的技术人员确定。

[0063] “治疗(treat)”指的是预防这种术语所应用的病症、病状或疾病,或预防或减少这种病症、病状或疾病的一种或多种症状。

[0064] “治疗(treatment)”指的是如上文所定义的“治疗(treat)”的动作。

[0065] “三萜”指的是来源于六个五碳异戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)单元的一类庞大和多样化的天然存在的有机分子,其可以按数千种方式组装和修饰。大多数是在官能团和其

基本碳骨架方面彼此不同的多环结构。这些分子可以在所有种类的活物中发现。

[0066] “疫苗”指的是如本文所定义的包括抗原的组合物。将疫苗施用于受试者引起一般针对一种或多种特定疾病的免疫反应。治疗有效的疫苗量可以取决于所使用的特定抗原或受试者的病状而变化,并且可以由本领域的技术人员确定。

佐剂配方和制造方法

[0067] 本申请公开了适用于本发明的若干佐剂配方。这些佐剂的常见特征是油和一种或多种乳化剂的存在,其中油相包含大于包涵本文所公开的佐剂配方的疫苗组合物的50%。

[0068] 多种油和其组合适合用于本发明。这些油包括(但不限于)动物油、植物油以及非代谢性油。适用于本发明的植物油的非限制性实例是玉米油、花生油、大豆油、椰子油以及橄榄油。动物油的非限制性实例是角鲨烷。非代谢性油的适合的非限制性实例包括轻矿物油、直链或支链饱和油等等。

[0069] 在一组实施方案中,本发明的佐剂配方中所用的油是轻矿物油。如本文所用的术语“矿物油”指的是经由蒸馏技术从矿脂获得的液态烃的混合物。这个术语与“液化石蜡”、“液态矿脂”以及“白矿物油”同义。这个术语还预期包括“轻矿物油”,即,通过矿脂的蒸馏以类似方式获得,但具有比白矿物油稍低的比重的油。参看例如雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版(Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1990, 第788页和第1323页)。矿物油可以获自各种商业来源,例如, J.T. Baker (Phillipsburg, Pa.)、USB Corporation (Cleveland, Ohio)。优选的矿物油是以名称 **DRAKEOL**[®] 可商购的轻矿物油。

[0070] 油相通常以疫苗组合物的50%至95% (以体积计) 的量,优选地以大于50%至85%的量,更优选地以大于50%至60%的量,并且更优选地以大于50-52% v/v 的量存在。如果任何这类乳化剂存在,那么油相包括油和乳化剂(例如, **SPAN**[®]80、**TWEEN**[®]80等等)。油相的体积以油和乳化剂的体积的总和计算。因此,举例来说,如果油的体积为40%并且乳化剂的体积为组合物的12%,那么油相将以组合物的52% v/v 存在。类似地,如果油以约45%的量存在并且乳化剂以组合物的约6%的量存在,那么油相以组合物的约51% v/v 存在。

[0071] 还应了解,因为本发明的佐剂仅形成本发明的疫苗的一部分,所以油相以本发明佐剂中的每一者的50%至95% (以体积计) 的量,优选地以大于50%至85%的量,更优选地以50%至60%的量,并且更优选地以50-52% v/v 的量存在。

[0072] 在适用于本发明的所有佐剂/疫苗的一个子组的实施方案中,油和油溶性乳化剂一起的体积百分比为疫苗组合物的至少50%,例如,50%至95% (以体积计),优选地以50%至85%的量,更优选地以50%至60%的量,并且更优选地以50-52% v/v 的量。因此,举例来说并且不受限制,油可以按45%的量存在并且脂溶性乳化剂将以大于5% v/v 的量存在。因此,油和油溶性乳化剂一起的体积百分比将为至少50%。

[0073] 在适用于本发明的所有疫苗的另一个子组中,油的体积百分比超过疫苗组合物的40%,例如,40%至90% (以体积计)、40%至85%、43%至60%、44-50% v/v。

[0074] 适合用于本发明乳液中的乳化剂包括天然生物相容性乳化剂和非天然合成表面活性剂。生物相容性乳化剂包括磷脂化合物或磷脂混合物。优选的磷脂是磷脂酰胆碱(卵磷脂),诸如大豆或蛋卵磷脂。卵磷脂可以通过水洗粗植物油并且分离和干燥所得水合胶而作为磷脂和三酸甘油酯的混合物获得。精炼产品可以通过分馏在通过丙酮洗涤去除三酸甘油

酯和植物油之后剩余的丙酮不溶性磷脂和糖脂的混合物而获得。或者,卵磷脂可以获自各种商业来源。其它适合的磷脂包括磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、心磷脂以及磷脂酰乙醇胺。磷脂可以从天然来源分离或以常规方式合成。

[0075] 在额外实施方案中,本文所用的乳化剂不包括卵磷脂,或以免疫无效的量使用卵磷脂。

[0076] 适合用于本发明的佐剂配方中的非天然合成乳化剂包括基于脱水山梨糖醇的非离子表面活性剂,例如,脂肪酸取代的脱水山梨糖醇表面活性剂(以名称SPAN[®]或ARLACEL[®]可商购)、聚乙氧基化山梨糖醇脂肪酸酯(TWEEN[®])、来自诸如蓖麻油的来源的脂肪酸聚乙二醇酯(EMULFOR[®]);聚乙氧基化脂肪酸(例如,以名称SIMULSOL[®] M-53可得的硬脂酸)、聚乙氧基化异辛基苯酚/甲醛聚合物(TYLOXAPOL[®])、聚氧乙烯脂肪醇醚(BRIJ[®]);聚氧乙烯壬苯基醚(TRITON[®]N)、聚氧乙烯异辛基苯基醚(TRITON[®]X)。优选的合成表面活性剂是以名称SPAN[®]和TWEEN[®]可得的表面活性剂,诸如TWEEN[®]-80(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯)和SPAN[®]-80(脱水山梨糖醇单油酸酯)。

[0077] 一般来说,乳化剂可以按0.01%至40%(以体积计)、优选地0.1%至15%、更优选地2%至10%的量存在于疫苗组合物中。

[0078] 存在于本发明佐剂配方中的额外成分包括阳离子载剂、免疫刺激寡核苷酸、单磷脂A和其类似物(MPL-A)、多聚肌苷酸:多聚胞苷酸(多聚I:C)、皂苷、季铵、固醇、糖脂、铝来源(例如,REHYDRAGEL[®]或VAC20[®]湿凝胶)以及其组合。

[0079] 适合的阳离子载剂包括(但不限于)葡聚糖、葡聚糖DEAE(和其衍生物)、PEG、瓜尔胶、壳聚糖衍生物、多聚纤维素衍生物如羟乙基纤维素(HEC)、聚乙烯亚胺、聚氨基化物如聚赖氨酸,等等。

[0080] 适合的免疫刺激寡核苷酸包括ODN(基于DNA)、ORN(基于RNA)寡核苷酸或嵌合ODN-ORN结构,其可以具有修饰的骨架,包括(但不限于)硫代磷酸酯修饰、卤化、烷基化(例如,乙基或甲基修饰)以及磷酸二酯修饰。在一些实施方案中,可以使用多聚肌苷酸-胞苷酸或其衍生物(多聚I:C)。

[0081] CpG寡核苷酸是最近描述的一类医药治疗剂,其特征为在特定的碱基序列情形中未甲基化的CG二核苷酸的存在(CpG基序)。(Hansel TT, Barnes PJ(编):用于哮喘、过敏以及COPD的新药(New Drugs for Asthma, Allergy and COPD). Prog Respir Res. Basel, Karger, 2001, 第31卷, 第229-232页, 其以引用的方式并入本文中)。这些CpG基序在CG二核苷酸受抑制并且当存在时通常是甲基化的真核DNA中未见到,但存在于其赋予免疫刺激特性的细菌DNA中。

[0082] 在所选实施方案中,本发明的佐剂利用所谓的P类免疫刺激寡核苷酸,更优选地修饰的P类免疫刺激寡核苷酸,甚至更优选地E修饰的P类寡核苷酸。P类免疫刺激寡核苷酸是CpG寡核苷酸,其特征为一般6-20个核苷酸长的回文结构的存在。P类寡核苷酸具有在体外和/或体内自发地自组装成串联体的能力。这些寡核苷酸在严格意义上是单股的,但回文结

构的存在允许形成串联体或可能形成茎-环结构。P类免疫刺激寡核苷酸的总长度介于19个与100个核苷酸之间,例如,19-30个核苷酸、30-40个核苷酸、40-50个核苷酸、50-60个核苷酸、60-70个核苷酸、70-80个核苷酸、80-90个核苷酸、90-100个核苷酸。

[0083] 在本发明的一个方面,免疫刺激寡核苷酸含有5' TLR活化域和至少两个回文区,一个回文区是至少6个核苷酸长度的5'回文区并且直接地或经由间隔子连接至至少8个核苷酸长度的3'回文区。

[0084] P类免疫刺激寡核苷酸可以根据本领域中已知的技术修饰。举例来说,J修饰指的是碘修饰的核苷酸。E修饰指的是乙基修饰的核苷酸。因此,E修饰的P类免疫刺激寡核苷酸是P类免疫刺激寡核苷酸,其中至少一个核苷酸(优选地5'核苷酸)是乙基化的。额外修饰包括6-硝基-苯并咪唑附接、O-甲基化、用丙炔基-dU修饰、肌苷修饰、2-溴乙烯基附接(优选地附接至尿苷)。

[0085] P类免疫刺激寡核苷酸还可以含有修饰的核苷酸间键联,包括(但不限于)磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联。本发明的寡核苷酸可以合成得到或获自商业来源。

[0086] P类寡核苷酸和修饰的P类寡核苷酸在公布的PCT申请号W02008/068638中进一步公开,于2008年6月12日公布。修饰的P类免疫刺激寡核苷酸的适合的非限制性实例提供如下(在SEQ ID NO 1-10中,“*”指的是硫代磷酸酯键并且“-”指的是磷酸二酯键)。在SEQ ID NO 11-14中,所有键都是磷酸二酯键。

SEQ ID NO:1 5'T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'

SEQ ID NO:2 5'T*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3'

SEQ ID NO:3 5'T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO:4 5'JU*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3'

SEQ ID NO:5 5'JU*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO:6 5'JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO:7 5'EU*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3'

SEQ ID NO:8 5'JU*C_G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO:9 5'JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO:10 5'T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'

SEQ ID NO:11 5'-UUGUUGUUGUUGUUGUUGU-3'

SEQ ID NO:12 5'-UUAUUAUUAUUAUUAUUAU-3'

SEQ ID NO:13 5'-AAACGCUCAGCCAAAGCAG-3'

SEQ ID NO:14 5'-dTdCdGdTdCdGdTdTdTTrGrUrUrGrUrGrUdTdTdT-3'

[0087] 用于佐剂组合物中的P类免疫刺激寡核苷酸的量取决于所使用的P类免疫刺激寡核苷酸的性质和预期的物种。

[0088] 适合的MPL-A类似物可以包括(但不限于)结构改变或未改变的源自细菌的天然LPS、或合成吡喃葡萄糖基脂质佐剂(GLA)、百日咳杆菌粘附素(pertactin)、在还原糖的3-0位置处的变化的取代、具有低内毒性的脂质A类似物的合成形式。

[0089] 固醇共享通用的化学核心,其为类固醇环结构,具有通常附接至碳-3的羟基(OH)基团。脂肪酸取代基的烃链长度通常从16个变化至20个碳原子,并且可以是饱和或不饱和的。固醇通常含有环结构中的一个或多个双键以及附接至环的多种取代基。固醇和其脂肪

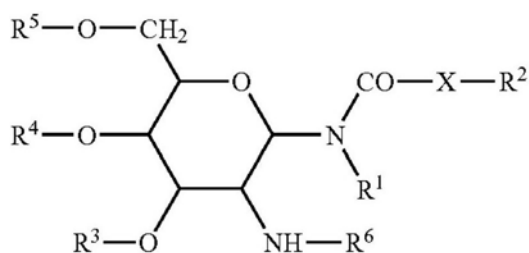
酸酯基本上不溶于水。鉴于这些化学类似性,因此有可能的是,共享这种化学核心的固醇当用于本发明的疫苗组合物中时将具有类似特性。固醇在本领域中是众所周知的并且可以商购。举例来说,胆固醇在默克索引(Merck Index),第12版,第369页中公开。适合的固醇包括(但不限于) β -谷固醇、豆固醇、麦角固醇、麦角钙化醇以及胆固醇。

[0090] 适合的皂苷包括三萜皂苷。这些三萜是植物来源的一组表面活性糖苷并且共享由与类固醇或三萜结构的疏水区缔合的亲水区(通常是几个糖链)组成的通用化学核心。由于这些类似性,因此共享这种化学核心的皂苷可能具有类似的辅助特性。适合用于佐剂组合物中的三萜可以来自许多来源,源自植物或合成等效物,包括(但不限于)皂皮树(*Quillaja saponaria*)、番茄碱、人参提取物、蘑菇,以及结构上类似于类固醇皂苷的生物碱糖苷。

[0091] 如果使用皂苷,那么佐剂组合物一般含有来自皂皮树的树皮的免疫活性皂苷部分。皂苷可以是例如Quil A或另一种纯化或部分纯化的皂苷制剂,其可以在商业上获得。因此,皂苷提取物可以作为混合物或纯化的个别组分,诸如QS-7、QS-17、QS-18以及QS-21使用。在一个实施方案中,Quil A是至少85%纯的。在其它实施方案中,Quil A是至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%纯的。

[0092] 季胺化合物是具有四个烃基的基于铵的化合物。实际上,烃基一般限于烷基或芳基。在一组实施方案中,季胺化合物由四个烷基链组成,其中两个是C10-C20烷基并且其余两个是C1-C4烷基。在一组实施方案中,季胺是二甲基双十八基铵溴化物、氯化物或医药学上可接受的平衡离子(DDA)。

[0093] 适合的糖脂一般是活化Th2反应的那些。糖脂包括(但不限于)由式I涵盖并且一般描述于美国公布20070196384 (Ramasamy等)中的那些。



式 I

[0094] 在式I的结构中, R^1 和 R^2 独立地为氢,或具有至多20个碳原子的饱和烷基;X为 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 或 $-NH-$; R^2 为氢,或具有至多20个碳原子的饱和或不饱和烷基; R^3 、 R^4 以及 R^5 独立地为氢、 $-SO_4^{2-}$ 、 $-PO_4^{2-}$ 、 $-COC_{1-10}$ 烷基; R^6 为L-丙氨酰基、L- α -氨基丁基、L-精氨酰基、L-天冬酰胺酰基、L-天冬氨酰基、L-半胱氨酰基、L-谷氨酰基、L-甘氨酰基、L-组氨酰基、L-羟脯氨酰基、L-异亮氨酰基、L-亮氨酰基、L-赖氨酰基、L-甲硫氨酰基、L-鸟氨酰基、L-苯丙氨酰基、L-脯氨酰基、L-丝氨酰基、L-苏氨酰基、L-酪氨酰基、L-色氨酰基以及L-缬氨酰基,或其D-异构体。

[0095] 在一组实施方案中,适合的糖脂是N-(2-脱氧-2-L-亮氨酰基氨基-b-D-吡喃葡萄糖基)-N-十八基月桂酰胺或其乙酸盐。

[0096] 铝是已知的佐剂或佐剂配方的组分并且以诸如Reheis, Inc, Brentag铝胶REHYDRAGEL[®]或VAC20[®]湿凝胶的形式可商购。REHYDRAGEL[®]是结晶氢氧化铝,在矿物学上称为勃姆石。当需要结合带负电的蛋白质时,其在疫苗中是有效的。 Al_2O_3 的

含量取决于等级在2%至10%的范围内,并且其粘度为1000-1300cP。其一般可以被描述为吸附剂氢氧化铝凝胶。VAC[®] 20湿凝胶是白色或近乎白色、半透明、粘性胶态凝胶。在某些实施方案中,Al₂O₃的含量为约2%w/v。

[0097] 在其它实施方案中,铝来源还可以通过沉淀氢氧化铝工艺制备。

[0098] 在某一组实施方案中,除了油和任选的一种或多种乳化剂以外,佐剂配方还包含单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物、固醇以及免疫刺激寡核苷酸的组合(或基本上由其组成或由其组成)。含有这些成分的佐剂称作“TCM0”。TCM0佐剂配方还可以任选地包括多聚I:C (“TCMY0”) 和/或皂苷。因此,包含单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物、固醇以及免疫刺激寡核苷酸和皂苷的组合或基本上由其组成或由其组成的佐剂配方称作“QTCM0”。另外,佐剂配方还可以包括多聚I:C。这类佐剂称作“QTCMY0”。

[0099] 在一组实施方案中,TCM0佐剂以疫苗组合物的总体积的40%至50%v/v的量包含轻矿物油。乳化剂包括TWEEN-80和SPAN-80,总量为疫苗组合物的总体积的0.1%至40%v/v,条件是脱水山梨糖醇单油酸酯和油一起包含组合物的约50.5%至52%v/v。免疫刺激寡核苷酸是ODN,优选地含有ODN的回文结构,任选地具有修饰的骨架。

[0100] 在某些实施方案中,TCM0的一个剂量含有介于约1μg与约400μg之间的免疫刺激寡核苷酸、介于约1μg与约1000μg之间的固醇、介于约0.1μg与500μg之间的MPL-A或其类似物。

[0101] 每剂的其它化合物的量基于受试者的物种来选择。

[0102] 举例来说,在适用于牛、绵羊或成年猪的一些实施方案中,TCM0的一个剂量将含有介于约50与400μg之间(例如,对于成年猪50-300、或100-250μg、或约50至约100μg并且对于牛约100至约250μg)的免疫刺激寡核苷酸,介于约100与约1000μg(例如,200-1000、250-700μg、或约400-500μg)的固醇,诸如胆固醇,以及介于约5与约500μg之间(例如,5-100μg、或5-50μg、或10-25μg)的MPL-A或其类似物。

[0103] 在适用于伴侣动物或仔猪的一些实施方案中,TCM0的一个剂量将含有介于约5与100μg之间(例如,10-80或20-50μg)的免疫刺激寡核苷酸,介于约5与100μg之间(例如,10-80或20-50μg)的固醇,诸如胆固醇,以及介于约0.5与约200μg之间(例如,1-100μg、或5-50μg、或5-20μg)的MPL-A或其类似物。

[0104] 在适用于家禽的一些实施方案中,TCM0佐剂的一个剂量将含有介于约0.1与约5μg之间(例如,0.5-3μg或0.9-1.1μg)的免疫刺激寡核苷酸,介于约0.5与约50μg之间(例如,1-20μg或1-10μg)的固醇,诸如胆固醇,以及介于约0.1至10μg之间(例如,0.5-5μg或1-5μg)的MPLA或其类似物。MPL-A以0.1微克/剂至2,000微克/剂的量存在。

[0105] 在某些实施方案中,TCM0佐剂如下制备:

a) 将脱水山梨糖醇单油酸酯、MPL-A以及胆固醇溶解于轻矿物油中。对所得油溶液进行无菌过滤;

b) 将免疫刺激寡核苷酸和聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯溶解于水相中,由此形成水溶液;

c) 在连续均化下将水溶液添加至油溶液中,由此形成佐剂配方TCM0。

[0106] 在TCMY0佐剂中,胆固醇、油、任选的乳化剂、MPL-A以及免疫刺激寡核苷酸如同在TCM0佐剂配方中一样存在用于相应的物种。多聚I:C可以一般以介于每剂约1μg与约100μg之间的量存在。

[0107] 更具体地说,在适用于牛、成年猪或绵羊的某些实施方案中,多聚I:C可以按每剂5-100 μ g(例如,5-50 μ g或10-30 μ g)的量存在。在适用于伴侣动物或仔猪的某些实施方案中,TCMY0的一个剂量含有介于约1与约50 μ g之间(例如,5-50 μ g或10-20 μ g)的多聚I:C。在适用于家禽疫苗的某些实施方案中,TCMY0的一个剂量含有介于约1与约10 μ g之间(例如,1-5 μ g或3-5 μ g)的多聚I:C。

[0108] 在某些实施方案中,TCMY0佐剂类似于TCM0佐剂来制备,并且将多聚I:C添加至水溶液中。

[0109] 在一组实施方案中,在QTCM0佐剂中,胆固醇、油、任选的乳化剂、MPL-A以及免疫刺激寡核苷酸如同在TCM0佐剂配方中一样存在用于相应的物种。皂苷优选地是Quil A或其纯化部分,并且可以按介于每剂约0.1 μ g与约1000 μ g之间的量存在。

[0110] 更具体地说,在适用于家禽疫苗的某些实施方案中,每剂的皂苷可以按每50 μ l疫苗组合物0.1至5 μ g(例如,每50 μ l组合物0.5-30 μ g,或更优选地1-10 μ g)的量存在。在适合应用于伴侣动物和仔猪中的某些实施方案中,皂苷,例如Quil A或其纯化部分,以介于每剂约10与约100 μ g之间(例如,每剂10-50 μ g或20-50 μ g)的量存在。在适用于牛、成年猪或绵羊的某些实施方案中,皂苷,诸如Quil A或其纯化部分,以介于每剂约100与约1000 μ g之间(例如,每剂200-800 μ g或250-500 μ g)的量存在。

[0111] 在某些实施方案中,QTCM0佐剂类似于TCM0佐剂来制备,并且将皂苷添加至水溶液中。

[0112] 在一组实施方案中,在QTCMY0佐剂中,皂苷如同在QTCM0佐剂中一样存在,并且其余的成分如同在TCMY0中一样存在,用于相应的物种。

[0113] 在某些实施方案中,QTCMY0佐剂类似于TCMY0佐剂来制备,并且将皂苷添加至水溶液中。

[0114] 在替代性实施方案中,除了油和任选的乳化剂以外,佐剂配方还包含单磷酸脂质A(MPL-A)或其类似物和多聚阳离子载剂的组合(或基本上由其组成或由其组成)。这些佐剂称作“XOM”。

[0115] 在一组实施方案中,在用于伴侣动物或仔猪的XOM佐剂中,多聚阳离子载剂以每剂1-50mg(例如,每剂1-25mg,或每剂10-25mg)的量存在,并且MPL-A或其类似物以介于每剂约1-50 μ g之间(例如,每剂1-25 μ g,或每剂10-25 μ g)的量存在。

[0116] 在适用于牛、绵羊以及成年猪的某些实施方案中,多聚阳离子载剂以介于每剂约5与约500mg之间(例如,每剂10-500mg、或10-300mg、或50-200mg)的量存在,并且MPL-A或其类似物以介于每剂约1与约100 μ g之间(例如,5-100 μ g、或5-50 μ g、或10-30 μ g)的量存在。

[0117] 在适用于伴侣动物和仔猪的某些实施方案中,多聚阳离子载剂以介于每剂约1与约50mg之间(例如,每剂1-25mg,或每剂10-25mg)的量存在,并且MPL-A或其类似物以介于每剂约0.5与约200 μ g之间(例如,1-100 μ g、或5-50 μ g、或5-20 μ g)的量存在。

[0118] 在适用于家禽疫苗的某些实施方案中,多聚阳离子载剂以介于每剂0.5与25mg之间(例如,1-20mg、或1-10mg、或5-10mg)的量存在,并且MPL-A或其类似物以介于每剂约0.5与10 μ g之间(例如,1-10 μ g、或1-5 μ g、或2-5 μ g)的量存在。

[0119] 在某些实施方案中,XOM佐剂如下制备:

a) 将脱水山梨糖醇单油酸酯、MPL-A以及胆固醇溶解于轻矿物油中。对所得油溶液进行

无菌过滤；

b) 将葡聚糖DEAE和聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯溶解于水相中，由此形成水溶液；

c) 在连续均化下将水溶液添加至油溶液中，由此形成佐剂配方XOM。

[0120] 在额外替代性实施方案中，除了油和乳化剂以外，佐剂配方还包含免疫刺激寡核苷酸和多聚阳离子载剂的组合(或基本上由其组成或由其组成)，限制条件是如果所述多聚阳离子载剂是葡聚糖DEAE，那么抗原不是大肠杆菌J-5菌苗。这些佐剂称作“TX0”。在某些实施方案中，用TX0辅助的疫苗含有包含影响牛、绵羊、马或猪的病原体的抗原。在其它实施方案中，抗原来源于所述病原体。在其它实施方案中，用TX0辅助的疫苗含有包含影响家禽或猫的病原体的抗原，或抗原可以来源于这类病原体。在一组实施方案中，TX0佐剂还可以包括铝来源，诸如Al(OH)₃凝胶。具有铝的TX0佐剂称作“TX0-A”。

[0121] 在一组实施方案中，在TX0佐剂中，免疫刺激寡核苷酸，优选地ODN，优选地含有回文序列，并且任选地具有修饰的骨架，可以按每剂0.5-400μg的量存在，并且多聚阳离子载剂可以按每剂0.5-400mg的量存在。剂量取决于受试物种而变化。

[0122] 举例来说，在适用于牛、绵羊或成年猪的某些实施方案中，TX0的一个剂量将包含介于约50与400μg之间(例如，对于成年猪50-300、或100-250μg、或约50至约100μg并且对于牛约100至约250μg)的免疫刺激寡核苷酸，并且多聚阳离子载剂可以按介于每剂约5与约500mg之间(例如，每剂10-500mg、或10-300mg、或50-200mg)的量存在。

[0123] 在适用于伴侣动物或仔猪的某些实施方案中，TX0的一个剂量将包含介于约5与100μg之间(例如，10-80μg或20-50μg)的免疫刺激寡核苷酸，而多聚阳离子载剂可以按每剂1-50mg(例如，每剂1-25mg，或每剂10-25mg)的量存在。

[0124] 在适用于家禽的某些实施方案中，TX0佐剂的一个剂量将介于约0.1与约5μg之间(例如，0.5-3μg或0.9-1.1μg)的免疫刺激寡核苷酸，并且多聚阳离子载剂可以按介于每剂0.5与25mg之间(例如，1-20mg、或1-10mg、或5-10mg)的量存在。

[0125] 在某些实施方案中，TX0佐剂如下制备：

a) 将脱水山梨糖醇单油酸酯溶解于轻矿物油中。对所得油溶液进行无菌过滤；

b) 将免疫刺激寡核苷酸、葡聚糖DEAE以及聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯溶解于水相中，由此形成水溶液；以及

c) 在连续均化下将水溶液添加至油溶液中，由此形成佐剂配方TX0。

[0126] 在一组实施方案中，在TX0-A佐剂中，免疫刺激寡核苷酸如同在TX0佐剂中一样存在，铝来源以至多40%v/v(例如，35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%)的量存在。在一组实施方案中，铝来源以疫苗组合物的2%-20%v/v存在，更优选地介于约5%与约17%v/v之间。

[0127] 在某些实施方案中，TX0-A佐剂类似于TX0佐剂来制备，并且将铝来源添加至水溶液中。

[0128] 在额外实施方案中，本发明的佐剂含有油、任选的乳化剂、免疫刺激寡核苷酸以及铝来源。这些化合物在针对TX0-A佐剂所公开的范围内存在，但其中多聚阳离子载剂不存在于TOA中。TOA佐剂类似于TX0佐剂来制备，但其中水相含有铝来源而不是DEAE葡聚糖。

[0129] 在某些实施方案中，除了油和乳化剂以外，佐剂配方还包含多聚阳离子载剂和铝

来源的组合(或基本上由其组成或由其组成)。这种佐剂称作AX0。这些化合物可以按与存在于佐剂TX0-A中的那些类似的量存在用于相应的物种,并且佐剂AX0可以类似于TX0-A来制备,但不添加免疫刺激寡核苷酸。

[0130] 在某些其它实施方案中,除了油和乳化剂以外,佐剂配方还包含皂苷和固醇的组合(或基本上由其组成或由其组成)。这种佐剂称作QC0。QC0的成分的性质和量类似于佐剂QTCM0中的皂苷、固醇、油以及乳化剂的量。QC0可以通过在连续均化下将包含皂苷和固醇以及优选地水溶性乳化剂的水溶液添加至包含油和优选地油溶性乳化剂的油相中来制备。

[0131] 在其它替代性实施方案中,除了油和乳化剂以外,佐剂配方还包含季胺、糖脂、MPL-A或其类似物以及多聚I:C的组合(或基本上由其组成或由其组成)。这些佐剂称作“ODYRM”。

[0132] 在ODYRM佐剂中,油一般是诸如磷脂酰胆碱的磷脂的混合物。**AMPHIGEN[®]**是这种油的适合的实例,并且将以类似于如上文所描述的油量的量存在。

[0133] 在一组实施方案中,在ODYRM佐剂中,季胺,例如DDA,以介于每剂约1 μ g与约200 μ g之间的量存在,多聚I:C以介于每剂约0.5 μ g与100 μ g之间的量存在,糖脂以介于每剂约0.5 μ g与约2000 μ g之间的量存在,并且MPL-A或其类似物以介于每剂约0.5 μ g与100 μ g之间的量存在。

[0134] 更具体地说,在适合施用于牛、成年猪或绵羊的某些实施方案中,季胺可以按介于每剂约50 μ g与约200 μ g之间(例如,50-150 μ g,或约100 μ g)的量存在,多聚I:C可以按介于每剂约1 μ g与约100 μ g之间(例如,1-50 μ g或5-50 μ g)的量存在,糖脂可以按介于每剂约500 μ g与约2000 μ g之间(例如,500-1000 μ g,或约1000 μ g)的量存在,并且MPLA或其类似物可以按介于每剂约5 μ g与约100 μ g之间(例如,5-50 μ g或10-50 μ g)的量存在。

[0135] 在适合施用于伴侣动物和仔猪的某些实施方案中,季胺可以按介于每剂约5与约500 μ g之间(例如,每剂10-100 μ g,或每剂20-50 μ g)的量存在,多聚I:C可以按介于每剂约5 μ g与约25 μ g之间(例如,5-20 μ g,或约10 μ g)的量存在,糖脂可以按介于每剂约10与约100 μ g之间(例如,20-100 μ g或25-50 μ g)的量存在,并且MPL-A或其类似物可以按介于每剂约5与约50 μ g之间(例如,5-20 μ g或10-20 μ g)的量存在。

[0136] 在适用于家禽疫苗的某些其它实施方案中,一个剂量将含有介于约1 μ g与约10 μ g之间的季胺化合物(例如,5-10 μ g,或约5 μ g)、介于约0.5与约10 μ g之间的多聚I:C(例如,1-10 μ g或1-5 μ g)、介于约0.5与10 μ g之间的糖脂(例如,1-10 μ g、或5-10 μ g、或1-5 μ g)、以及介于约0.5 μ g与约5 μ g之间的MPL-A或其类似物(例如,0.5-5 μ g或1-5 μ g)。

[0137] 在某些实施方案中,ODYRM佐剂如下制备:

a) 将脱水山梨糖醇单油酸酯、MPL-A溶解于轻矿物油中。对所得油溶液进行无菌过滤并且分散于具有一些表面活性剂、乙醇以及乙酸的水中;

b) 将聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯、季胺(例如,DDA)以及多聚I:C溶解于水相中,由此形成水溶液;以及

c) 在连续均化下将水溶液添加至油溶液中,由此形成佐剂配方ODYRM。

[0138] 在另一组实施方案中,除了油和乳化剂以外,佐剂配方还包含皂苷、固醇、季胺、多聚阳离子载剂的组合(或基本上由其组成或由其组成),限制条件是如果所述多聚阳离子载剂是葡聚糖DEAE,那么抗原不是大肠杆菌J-5菌苗。这些佐剂称作“QCDX0”。

[0139] 在QCDX0佐剂中,在某些实施方案中,皂苷,例如Quil A,可以按介于每剂约0.1 μ g与约1000 μ g之间的量存在,固醇,例如胆固醇,以介于每剂约1 μ g与约1000 μ g之间存在,季胺,例如DDA,以介于每剂约1 μ g与约200 μ g之间的量存在,并且多聚阳离子载剂可以按每剂0.5-400mg的量存在。剂量取决于受试物种而变化。

[0140] 在适用于牛、绵羊以及成年猪的某些实施方案中,皂苷以介于每剂约100与约1000 μ g之间(例如,每剂200-800 μ g或250-500 μ g)的量存在,固醇以介于约100与约1000 μ g之间(例如,200-1000、250-700 μ g或约400-500 μ g)的量存在,季胺可以按介于每剂约50 μ g与约200 μ g之间(例如,50-150 μ g,或约100 μ g)的量存在,并且多聚阳离子载剂可以按介于每剂约5与约500mg之间(例如,每剂10-500mg、或10-300mg、或50-200mg)的量存在。

[0141] 在适合应用于伴侣动物和仔猪中的某些实施方案中,皂苷,例如Quil A或其纯化部分,以介于每剂约10与约100 μ g之间(例如,每剂10-50 μ g或20-50 μ g)的量存在,固醇以介于约5与100 μ g之间(例如,10-80或20-50 μ g)的量存在,季胺可以按介于每剂约5与约500 μ g之间(例如,每剂10-100 μ g,或每剂20-50 μ g)的量存在,并且多聚阳离子载剂可以按每剂1-50mg(例如,每剂1-25mg,或每剂10-25mg)的量存在。

[0142] 在适用于家禽疫苗的一些实施方案中,每剂的皂苷可以按每50 μ l疫苗组合物0.1至5 μ g(例如,每50 μ l组合物0.5-30 μ g,或更优选地1-10 μ g)的量存在,固醇可以按介于约0.5与约50 μ g之间(例如,1-20 μ g或1-10 μ g)的量存在,季胺可以按介于每剂约5与约500 μ g之间(例如,每剂10-100 μ g,或每剂20-50 μ g)的量存在,并且多聚阳离子载剂可以按介于每剂0.5与25mg之间(例如,1-20mg、或1-10mg、或5-10mg)的量存在。

[0143] 在某些实施方案中,QCDX0佐剂如下制备:

- a) 将脱水山梨糖醇单油酸酯溶解于油中。对所得油溶液进行无菌过滤;
- b) 将聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯、季胺(例如,DDA)、多聚阳离子载剂、固醇以及皂苷溶解于水相中,由此形成水溶液;以及
- c) 在连续均化下将水溶液添加至油溶液中,由此形成佐剂配方QCDX0。

[0144] 有时,浓缩抗原是不可能或不可行的,特别是在按比例放大的商业应用中,并且不得不使用低浓度的抗原溶液。因此,在一些实施方案中,本发明的疫苗组合物包含如上文所描述的佐剂配方,其中这些佐剂配方中油相的含量经过稀释并且其中疫苗组合物是油包水乳液。

[0145] 实际上,有可能形成油相小于50%v/v的油包水乳液。

[0146] 简单地说,首先,如上文所描述制备本发明的佐剂配方。在所述佐剂配方中,油相包含超过佐剂配方的50%v/v。基于最终目标浓度和所需稀释度,除了油和乳化剂之外的成分的量分别按比例放大。举例来说,如果目的是制备佐剂配方包含80%v/v的疫苗组合物,那么除了油之外的成分的量按比例放大1.25倍(1/0.8)。乳化剂(如果有的话)(例如,TWEEN[®]80和/或SPAN[®]80)的量不一定需要按比例放大,但优选地,油与乳化剂之间的体积比在佐剂配方中和最终疫苗组合物中保持相同。

[0147] 然后将抗原溶液添加至佐剂配方中。

[0148] 可以维持油包水乳液的完整性,只要分散的球形水滴不以比单分散液滴的无规堆积的最大堆积分数(即:0.64)更集中的形式存在。参看Tadros,乳液形成、稳定性以及流变学(Emulsion Formation, Stability and Rheology),第1版2013,Wiley-VCH GmbH&Co

KGaA。只要水滴所占据的总体积分数不超过0.64,即:64%v/v。相反地,这暗示油相不应降至低于36%v/v。

[0149] 因此,在本发明的这个方面的不同实施方案中,提供了疫苗配方,其包含抗原化合物和根据先前描述的实施方案的稀释的佐剂配方,其中油相包含超过疫苗组合物的36%v/v,并且其中疫苗组合物是油包水乳液。不受限制地,适用于本发明的这个方面的佐剂配方包括TCMO、TCMYO、QTCMO、QTCMYO、XOM、TXO、TXO-A、TAO、AXO、QCO、ODYRM、QCDXO。在不同实施方案中,油相的体积为疫苗组合物的37%v/v、38%v/v、39%v/v、40%v/v、41%v/v、42%v/v、43%v/v、44%v/v、45%v/v、46%v/v、47%v/v、48%v/v、49%v/v或50%v/v。

[0150] 油相的浓度应足够高以形成储库效应并且保护抗原和免疫调节剂免于被宿主的免疫系统快速降解,优选地疫苗组合物的20%或更大v/v。

[0151] 因此,在另一个方面,在本发明的疫苗组合物中,佐剂配方中油相的量经过稀释以使得疫苗配方是水包油乳液或水包油包水乳液,其中油相包含疫苗组合物的20%或更大v/v。基于最终目标浓度和所需稀释度,除了油和乳化剂之外的成分的量按比例放大。举例来说,为了制备佐剂配方包含33.3%v/v的疫苗组合物,除了油和乳化剂之外的成分的量按比例放大3倍(1/0.333)。乳化剂(如果有的话)(例如,TWEEN[®]80和/或SPAN[®]80)的量不需要按比例放大,但优选地,油与乳化剂之间的体积比在佐剂配方中和最终疫苗组合物中保持相同。

[0152] 在不同实施方案中,疫苗组合物是水包油乳液或水包油包水乳液,其中油相包含疫苗组合物的21%v/v、22%v/v、23%v/v、24%v/v、25%v/v、26%v/v、27%v/v、28%v/v、29%v/v、30%v/v、31%v/v、32%v/v、33%v/v、34%v/v、35%v/v、36%v/v、37%v/v、38%v/v、39%v/v、40%v/v、41%v/v、42%v/v、43%v/v、44%v/v、45%v/v、46%v/v、47%v/v、48%v/v、49%v/v或50%v/v。

[0153] 适用于本发明的这个方面的佐剂配方包括TCMO、TCMYO、QTCMO、QTCMYO、XOM、TXO、TXO-A、TAO、AXO、QCO、ODYRM、QCDXO,限制条件是佐剂配方中的油相可以低于最终疫苗组合物的50%v/v,但高于20%v/v。

抗原和疾病

[0154] 组合物可以含有一种或多种抗原。抗原可以是能够在受试者中产生所需免疫反应的多种物质中的任一者,个别地或以任何组合形式包括(但不限于)以下一者或多者:病毒(灭活、减弱以及修饰的活的)、细菌、寄生虫、核苷酸(包括(但不限于)基于核酸的抗原,例如DNA疫苗)、多核苷酸、肽、多肽、重组蛋白、合成肽、蛋白提取物、细胞(包括肿瘤细胞)、组织、多糖、碳水化合物、脂肪酸、磷壁酸、肽聚糖、脂质或糖脂。

[0155] 与本发明的佐剂一起使用的抗原还包括核苷酸、多核苷酸、肽、多肽的免疫原性片段,其可以从本文所提及的生物体分离。

[0156] 在受试者中不引起疾病的活的、修饰的活的以及减弱的病毒株已经以无毒形式分离或已经使用本领域中熟知的方法减弱,包括在适合的细胞系中连续传代或暴露于紫外光或化学诱变剂。灭活或杀灭的病毒株是已经通过本领域的技术人员已知的方法灭活的那些,包括用福尔马林(formalin)、β-丙内酯(betapropiolactone, BPL)、双乙烯亚胺(BEI)、灭菌辐射、热处理,或其它这类方法。

[0157] 两种或更多种抗原可以组合以产生多价组合物,其可以保护受试者免受病原体引

起的多种疾病。当前,疫苗的商业制造商以及最终使用者偏好多价疫苗产品。虽然常规佐剂通常在可以一起有效使用(单价地或多价地)的抗原种类方面受限,但本文所描述的佐剂可以与大范围的抗原一起单价地与多价地有效使用。因此,本文所描述的抗原可以在包含本文所描述的佐剂的单一组合物中组合。

[0158] 可以作为抗原与佐剂组合物一起使用的细菌的一些实例包括(但不限于)醋酸钙不动杆菌(*Aceinetobacter calcoaceticus*)、巴氏醋杆菌(*Acetobacter paseruianus*)、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、酸热脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、闪烁古生球菌(*Arhaeglobus fulgidus*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜热链状芽孢杆菌(*Bacillus thermocatenulatus*)、支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、荚壳伯克霍尔德菌(*Burkholderia glumae*)、结肠弯曲杆菌(*Campylobacter coli*)、胎儿弯曲杆菌(*Campylobacter fetus*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、豚肠弯曲杆菌(*Campylobacter hyointestinalis*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、嗜衣原体属(*Chlamydophila* spp.)、粘质色杆菌(*Chromobacterium viscosum*)、猪红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、单核细胞增多性李斯特杆菌(*Listeria monocytogenes*)、犬埃立克体(*Ehrlichia canis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、睡眠嗜血杆菌(*Haemophilus somnus*)、猪螺杆菌(*Helicobacter suis*)、胞内劳森菌(*Lawsonia intracellularis*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、莫拉克斯氏菌属(*Moraxella* sp.)、牛型结核分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*)、丝状支原体丝状亚种LC(*Mycoplasma mycoides* subsp.*mycoides* LC)、产气荚膜梭菌、犬牙周臭味菌(*Odoribacter denticanis*)、溶血巴斯德菌(曼海姆菌)(*Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*)、多杀巴斯德菌(*Pasteurella multocida*)、发光杆菌(*Photobacterium luminescens*)、喉管卟啉单胞菌(*Porphyromonas gulae*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、唾液卟啉单胞菌(*Porphyromonas salivosa*)、痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、威斯康里假单胞菌(*Pseudomonas wisconsinensis*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌C9(*Pseudomonas fluorescens* C9)、荧光假单胞菌SIKW1(*Pseudomonas fluorescens* SIKW1)、草莓假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)、浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)、食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)、假单胞菌属B11-1(*Pseudomonas* sp B11-1)、富养产碱菌(*Alcaligenes eutrophus*)、静止嗜冷杆菌(*Psychrobacter immobilis*)、普氏立克次体(*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次体(*Rickettsia rickettsia*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)所有血清变型(包括例如:鼠伤寒肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica* Typhimurium)、邦戈肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica* Bongori)、都柏林肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica* Dublin)、霍乱肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica* Choleraesuis)以及新港肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica* Newport))、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)、金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、猪葡萄球菌(*Staphylococcus hyicus*)、白色链霉菌(*Streptomyces albus*)、肉桂链霉菌(*Streptomyces cinnamomeus*)、乳房链球菌、猪链球菌(*Streptococcus suis*)、脱叶链霉菌(*Streptomyces exfoliates*)、疮痂病链霉菌(*Streptomyces scabies*)、嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)、集胞藻属(*Syechocystis* sp.)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、微小密螺旋体(*Treponema minutum*)、蚀疮溃疡密螺旋体(*Treponema phagedenis*)、屈曲密螺旋体(*Treponema refringens*)、文氏密螺旋体(*Treponema vincentii*)、梅毒密螺旋体(*Treponema palladium*)、化脓隐秘杆菌,以及钩端螺旋体属(*Leptospira* species),诸如已知的病原体犬钩端螺旋体(*Leptospira canicola*)、感冒伤寒型钩端螺旋体(*Leptospira grippotyposa*)、哈德焦钩端螺旋体(*Leptospira hardjo*)、博氏哈德焦-牛型钩端螺旋体(*Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*)、博氏哈德焦-普拉伊特诺钩端螺旋体(*Leptospira borgpetersenii hardjo-prajitno*)、问号钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)、出血性黄疸钩端螺旋体(*Leptospira icterohaemorrhagiae*)、波摩那钩端螺旋体(*Leptospira pomona*)和布拉迪斯拉发钩端螺旋体(*Leptospira bratislava*),以及其组合。

[0159] 灭活的病毒与减弱的活病毒都可以用于佐剂组合物中。可以用作抗原的病毒的一些实例包括(但不限于)禽疱疹病毒、牛疱疹病毒、犬疱疹病毒、马疱疹病毒、猫病毒性鼻气管炎病毒、马立克氏病(Marek's disease)病毒、绵羊疱疹病毒、猪疱疹病毒、猪流行性腹泻病毒(PEDv)、伪狂犬病病毒、禽副粘病毒、牛呼吸道合胞体病毒、犬瘟热病毒、犬副流感病毒、犬腺病毒、犬细小病毒、牛副流感病毒3、绵羊副流感病毒3、牛瘟病毒、边界病病毒、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、I型BVDV、II型BVDV、古典猪瘟病毒、禽白血病毒、牛免疫缺陷病毒、牛白血病毒、牛结核病、马传染性贫血病毒、猫免疫缺陷病毒、猫白血病毒(FeLV)、新城疫病毒、绵羊进行性肺炎病毒、绵羊肺腺癌病毒、犬冠状病毒(CCV)、泛嗜性CCV、犬呼吸道冠状病毒、牛冠状病毒、猫杯状病毒、猫肠内冠状病毒、猫传染性腹膜炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、猪细小病毒、I型猪圆环病毒(PCV)、II型PCV、猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)病毒、传染性胃肠炎病毒、火鸡冠状病毒、牛暂时热病毒、狂犬病、轮状病毒、水泡性口炎病毒、慢病毒、禽流感、鼻病毒、马流感病毒、猪流感病毒、犬流感病毒、猫流感病毒、人流感病毒、东部马脑炎病毒(EEE)、委内瑞拉马脑炎病毒、西尼罗病毒、西部马脑炎病毒、人免疫缺陷病毒、人乳头状瘤病毒、水痘带状疱疹病毒、B型肝炎病毒、鼻病毒和麻疹病毒,以及其组合。

[0160] 肽抗原的实例包括支气管败血波氏杆菌p68、GnRH、IgE肽、Fel d1和癌抗原,以及其组合。其它抗原的实例包括核苷酸、碳水化合物、脂质、糖脂、肽、脂肪酸、脂磷壁酸和磷壁酸以及肽聚糖,以及其组合。

[0161] 可以作为抗原与佐剂组合物一起使用的寄生虫的一些实例包括(但不限于)红孢子虫(*Anaplasma*)、肝片吸虫(*Fasciola hepatica*) (肝蛭)、球虫(*Coccidia*)、艾美耳球虫属(*Eimeria* spp.)、犬新孢子虫(*Neospora caninum*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、贾第鞭毛虫(*Giardia*)、恶丝虫(*Dirofilaria*) (心丝虫)、钩口线虫(*Ancylostoma*) (钩虫)、古柏线虫(*Cooperia*)、捻转血矛线虫(*Haemonchus contortus*) (捻转胃虫(Barber pole

worm))、奥氏奥斯特他线虫 (*Ostertagia ostertagi*) (胃虫)、胎生网尾线虫 (*Dictyocaulus viviparus*) (肺虫)、锥虫属 (*Trypanosoma* spp.)、利什曼原虫属 (*Leishmania* spp.)、毛滴虫属 (*Trichomonas* spp.)、小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*)、巴贝西虫 (*Babesia*)、血吸虫 (*Schistosoma*)、绦虫 (*Taenia*)、类圆线虫 (*Strongyloides*)、蛔虫 (*Ascaris*)、旋毛虫 (*Trichinella*)、肉孢子虫 (*Sarcocystis*)、哈蒙德虫 (*Hammondia*) 和等孢子球虫 (*Isopora*)，以及其组合。还涵盖外寄生虫，包括 (但不限于) 蜱，包括硬蜱 (*Ixodes*)、扇头蜱 (*Rhipicephalus*)、革蜱 (*Dermacentor*)、花蜱 (*Amblyomma*)、牛蜱 (*Boophilus*)、璃眼蜱 (*Hyalomma*) 和血蜱 (*Haemaphysalis*) 属，以及其组合。

[0162] 用于诱导免疫反应的抗原的量将取决于所使用的抗原、受试者以及所需反应水平而发生相当大的变化，并且可以由本领域的技术人员确定。对于含有修饰的活病毒或减弱的病毒的疫苗，抗原的治疗有效量一般在约 10^2 组织培养感染剂量 ($TCID_{50}$) 至约 $10^{10}TCID_{50}$ (包括首末) 的范围内。对于许多这类病毒，治疗有效剂量一般在约 10^2TCID_{50} 至约 10^8TCID_{50} (包括首末) 的范围内。在一些实施方案中，治疗有效剂量的范围为约 10^3TCID_{50} 至约 10^6TCID_{50} (包括首末)。在一些其它实施方案中，治疗有效剂量的范围为约 10^4TCID_{50} 至约 10^5TCID_{50} (包括首末)。

[0163] 对于含有灭活的病毒的疫苗，抗原的治疗有效量一般为每剂至少约100个相对单位，并且通常在每剂约1,000个至约4,500个相对单位 (包括首末) 的范围内。在其它实施方案中，抗原的治疗有效量在每剂约250个至约4,000个相对单位 (包括首末)、每剂约500个至约3,000个相对单位 (包括首末)、每剂约750个至约2,000个相对单位 (包括首末)、或每剂约1,000个至约1,500个相对单位 (包括首末) 的范围内。

[0164] 含有灭活的病毒的疫苗中抗原的治疗有效量还可以依据相对效力 (RP) /mL来测量。治疗有效量通常在约0.1至约50RP/mL (包括首末) 的范围内。在其它实施方案中，抗原的治疗有效量在约0.5至约30RP/mL (包括首末)、约1至约25RP/mL (包括首末)、约2至约20RP/mL (包括首末)、约3至约15RP/mL (包括首末)、或约5至约10RP/mL (包括首末) 的范围内。

[0165] 在疫苗中施用的细菌抗原的细胞数在每剂约 1×10^6 至约 5×10^{10} 集落形成单位 (CFU) (包括首末) 的范围内。在其它实施方案中，细胞数在约 1×10^7 至 $5 \times 10^{10}CFU$ /剂 (包括首末)、或约 1×10^8 至 $5 \times 10^{10}CFU$ /剂 (包括首末) 的范围内。在其它实施方案中，细胞数在约 1×10^2 至 $5 \times 10^{10}CFU$ /剂 (包括首末)、或约 1×10^4 至 5×10^9CFU /剂 (包括首末)、或约 1×10^5 至 5×10^9CFU /剂 (包括首末)、或约 1×10^6 至 5×10^9CFU /剂 (包括首末)、或约 1×10^6 至 5×10^8CFU /剂 (包括首末)、或约 1×10^7 至 5×10^9CFU /剂 (包括首末) 的范围内。

[0166] 在疫苗中施用的寄生虫抗原的细胞数在每剂约 1×10^2 至约 1×10^{10} (包括首末) 的范围内。在其它实施方案中，细胞数在每剂约 1×10^3 至约 1×10^9 (包括首末)、或每剂约 1×10^4 至约 1×10^8 (包括首末)、或每剂约 1×10^5 至约 1×10^7 (包括首末)、或每剂约 1×10^6 至约 1×10^8 (包括首末) 的范围内。

[0167] 在本领域中众所周知的是，使用常规佐剂，需要比修饰的活的或减弱的病毒实质上更大量的灭活的病毒来刺激可比水平的血清学反应。然而，已经令人惊讶地发现，使用本文所描述的佐剂组合物，大致相同量的灭活的病毒和修饰的活病毒刺激类似水平的血清学反应。另外，与使用常规佐剂相比时使用本文所描述的佐剂需要更少量的修饰的活的、减弱的以及灭活的病毒来达成相同水平的血清学反应。这些意想不到的发现展示在制备免疫原

性和疫苗组合物期间的资源保护和成本降低。对于具有广泛效用的疫苗,每年需要制造数百万剂量,因此这些节约可以是相当大的。

组合物的施用

[0168] 取决于受试者和抗原,组合物的剂量大小通常在约1mL至约5mL(包括首末)的范围内。举例来说,对于犬或猫,通常使用约1mL的剂量,而在牛中,通常使用约2-5mL的剂量。然而,这些佐剂还可以按微剂量配制,其中可以使用约100μL的剂量。

[0169] 佐剂组合物的施用途径包括肠道外、经口、经口鼻、鼻内、气管内、局部、皮下、肌肉内、经皮、皮内、腹膜内、眼内、静脉内施用以及卵中。可以使用任何适合的装置来施用组合物,包括注射器、滴管、无针注射装置、贴片等等。选择使用的途径和装置将取决于佐剂的组成、抗原以及受试者,并且这为技术人员所熟知。

组合物的用途

[0170] 用于商业用途的任何疫苗佐剂制剂的要求之一是确立佐剂溶液历时长储存期的稳定性。本文提供了容易制造并且稳定至少18个月的佐剂配方。在一个实施方案中,配方稳定约18个月。在另一个实施方案中,配方稳定约18个至约24个月。在另一个实施方案中,配方稳定约24个月。加速测试程序也指示本文所描述的配方是稳定的。

[0171] 本发明佐剂组合物的一个有利特征是可以将其安全而有效地施用于大范围的受试者。在本领域中预期,佐剂的组合将展示比个别的组分更大的反应原性。然而,本文所描述的组合物当与使用组分中的任何一者或两者的组合物相比时显示降低的反应原性,同时维持佐剂效应。还已经惊讶地发现,本文所描述的佐剂组合物当与其它佐剂组合物相比时展示安全性改善。

[0172] 本文所描述的佐剂组合物适用于在受试者中诱导所需免疫反应。其在多个物种中是有效的。适合的受试者是需要施用佐剂组合物的任何动物。受试者包括哺乳动物和非哺乳动物,包括灵长类动物、牲畜、伴侣动物、实验室测试动物、圈养野生动物、禽类(包括卵中)、爬行动物以及鱼。因此,这个术语包括(但不限于)猴、人类、猪、牛、绵羊、山羊、马、小鼠、大鼠、天竺鼠、仓鼠、兔、猫、犬、鸡、火鸡、鸭、其它家禽、青蛙以及蜥蜴。

[0173] 本文所描述的佐剂可以用于显示感染的与接种疫苗的动物之间的血清学差异。因此,这些佐剂可以用于标志疫苗中,其中疫苗中的抗原在接种疫苗的动物中引起与野生型病毒不同的抗体模式。标志疫苗一般结合伴侣诊断测试使用,这个测试测量抗体模式的差异并且展示哪些动物已经接种疫苗并且哪些动物受野生型病毒感染。这种技术适用于来自受试群体的病毒的控制和根除。

[0174] 本发明还提供了适用于使用从亨德拉病毒(Hendra virus)G蛋白(和其片段、二聚体、多聚体以及修饰的形式)提供的抗原防御由尼帕病毒(Nipah virus)和/或亨德拉病毒引起的感染和疾病的新颖疫苗组合物,其全部如本文所描述加佐剂。在某些实施方案中,佐剂选自TX0、TA0以及TX0-A组成的群组。这类疫苗适用于预防例如马、犬、猪以及人类的感染和疾病。在最优选的实施方案中,猪与犬都免受亨德拉与尼帕病毒。

[0175] 导致相当数量的人类死亡的NiV的周期性爆发最近已经成问题,参看例如Butler,自然(Nature),第429卷,第7页(2000);以及Gurley等,新发传染病(Emerging Infectious Diseases),第13卷(7),第1031-1037页(2007)。病例研究已经将人类的疾病与从猪的人畜共患传播相关联,参看Parashar等,传染病杂志(J.Infect.Dis.)第181卷,第1755-1759页

(2000)。亨德拉病毒还已经明确地与经由从马传播所致的人类死亡相关联。目前存在一种经批准用于马中以预防由亨德拉病毒引起的感染或疾病的得到许可的疫苗(Equivac[®] HeV; Zoetis), 不过不存在用于预防尼帕病毒感染的得到许可的疫苗。仍然需要可以在临床上有效的尼帕病毒或亨德拉病毒疫苗。

[0176] 诸如亨德拉病毒和尼帕病毒的副粘病毒在病毒粒子的包膜中具有两种主要的膜锚定糖蛋白。一种糖蛋白是病毒体附着至宿主细胞上的受体所需的并且指定为血凝素-神经氨酸酶蛋白(HN)或血凝素蛋白(H), 并且另一种是不具有血凝集也不具有神经氨酸酶活性的糖蛋白(G)。附着糖蛋白是II型膜蛋白, 其中分子的氨基(N)端朝着细胞质定向并且蛋白质的羧基(C)端在细胞外。另一种主要糖蛋白是融合(F)糖蛋白, 其为含有两个七肽重复(HR)区和疏水融合肽的三聚I类融合包膜糖蛋白。亨德拉病毒和尼帕病毒经由至接受宿主细胞中的pH非依赖性膜融合过程, 在受体结合之后经由其附着G糖蛋白和F糖蛋白的协同作用来感染细胞。

[0177] 那种亨德拉病毒G糖蛋白可以潜在地交叉防御由尼帕病毒引起的感染和疾病, 由K. Bossart等, 病毒学杂志(Journal of Virology), 第79卷, 第6690-6702页(2005), 以及B. Mungall等, 病毒学杂志(Journal of Virology), 第80卷, 第12293-12302页(2006)提出。然而, 先前的工作并未提供对于任何哺乳动物物种, 在这方面实际上临床有效的疫苗组合物。因此, 本发明涵盖一种包含亨德拉病毒G蛋白、如根据本发明的实施所描述的佐剂以及一种或多种赋形剂的免疫原性组合物, 其量有效地引起针对亨德拉和/或尼帕病毒的临床有效保护。

[0178] 关于适用于本发明的实施的亨德拉病毒G糖蛋白多肽和其重组表达, 参考公布的国际专利申请W0 2012/158643和W02006/085979的全部公开内容, 其中明确地阐述这种信息。适用于本文的特定亨德拉病毒G蛋白多肽的优选实例在W0 2012/158643中公开, 并且包括例如: 全长G蛋白(其SEQ ID NO:2); 其可溶性片段(编码W0 2012/158643的SEQ ID NO:2的氨基酸73-604); 以及其中所公开的具有Ig(κ)前导序列(W0 2012/158643的SEQ ID NO 16)的额外片段。一般来说, 可溶形式的亨德拉病毒G糖蛋白包含胞外域的全部或一部分, 并且通过缺失G糖蛋白的跨膜域的全部或一部分和胞质尾区的全部或一部分而产生。优选地, 编码基因序列针对表达进行密码子优化。

[0179] 在一些实施方案中, 亨德拉G糖蛋白可以呈二聚和/或四聚形式。这类二聚体取决于在G糖蛋白中的半胱氨酸残基之间形成的二硫键的形成。这类二硫键可以对应于在原生G糖蛋白中形成的那些, 或可以形成不同二硫键, 从而产生增强抗原性的不同二聚和/或四聚形式的G糖蛋白。另外, 非二聚和四聚形式根据本发明的实施也是适用的, 这再一次考虑到G糖蛋白提供众多构象依赖性表位(即, 从三级三维结构产生)并且众多这类天然表位的保存因此是非常优选的以赋予中和抗体反应。

[0180] 一般来说, 用于亨德拉G蛋白的表达载体的构建可以如W0 2012/158643的实施例1中所描述, 其中来自CHO细胞的所得蛋白质表达如其实施例2中所描述, 或者, 使用痘苗系统(参看其实施例3)或293细胞(参看其实施例4)。在特定优选的实例中, 可溶性G蛋白作为原生亨德拉病毒G糖蛋白的氨基酸73-604提供(参看W0 2012/158643中的SEQ ID NO:2)。其二聚自发地发生, 伴随从CHO细胞表达, 并且所得G蛋白为约50%二聚体和50%四聚体, 具有极少的残余单体。在293F细胞中的表达得到约70%二聚体。将所得蛋白质部分与如本说明书

通篇所描述的佐剂混合。如W02012/158643中所描述,用于大型动物的抗原的优选剂量在每剂50-200微克的范围内,其中100微克是最优选的剂量。如本领域的技术人员应了解,对于较小动物,诸如犬,需要较少量,诸如25-50微克。

[0181] 另外,根据上文所描述的实施方案中的任一者的佐剂可以用于产生诊断或治疗抗体。在本发明的这个方面,用含有本发明佐剂组合物和抗原的配方使来源动物免疫。抗原的选择由需要获得所述治疗或诊断抗体的人员确定并且包括(但不限于)病毒、细菌、病毒粒子、提取物、重组抗原、细胞壁结构等等。抗原还可以包括用于制备针对蛇咬伤的药物的毒液。

[0182] 适用于本发明的这个方面的抗原可以是猫、犬、马、猪、牛、绵羊或禽来源的抗原。在某些实施方案中,抗原可以选自FeLVgp70、牛副流感-3BPI-3(HN蛋白)、睡眠嗜组织菌p31、波氏杆菌FHA、副痘、BVDV1 gp5、BVDV2 gp53、梭状芽孢杆菌毒素、犬圆环病毒、猪痢疾短螺旋体(猪物种)抗原;灭活的全细胞和灭活的胃蛋白酶消化物。

[0183] 在免疫后的一定时间,从来源动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠、猪、天竺鼠、兔、山羊、绵羊、家禽、牛、马)提取抗体来源。在某些其它实施方案中,来源动物是猫或犬。抗体来源最终取决于需要单克隆还是多克隆抗体。对于多克隆抗体,可以考虑使用血清或乳奶。对于单克隆抗体,脾细胞是适合的来源。这类抗体可以用于诊断、研究或治疗目的,包括(但不限于)抗毒液、移植排斥药物、血清中和试验、ELISA、ELISPOT、西方墨点法、基于细胞的试验、效力试验以及免疫组织化学。本发明提供了从来源动物提取的单克隆和多克隆抗体,其用于诊断和治疗应用,包括(但不限于)抗毒液、移植排斥药物、血清中和试验、ELISA、ELISPOT、西方墨点法、基于细胞的试验、效力试验以及免疫组织化学。

[0184] 在某些实施方案中,用本发明的组合物免疫将在至少一只动物中(优选地至少2只动物,或至少三只动物,或在50%的处理动物中,或在至少75%的处理动物中,或最优选地在每个处理动物中)产生针对所需抗原的足够高的血清学滴度(超过1000,或更优选地超过5000,或更优选地超过10000,或更优选地超过50000,或更优选地超过100000,或更优选地超过250000,或更优选地超过500000,或更优选地超过1000000),由此得到足够量的抗体用于诊断或研究应用。

[0185] 通常,免疫球蛋白G(IgG)同型的抗体用于这些应用中,不过也采用其它同型,例如免疫球蛋白M(IgM)的抗体。抗体来源最终取决于需要多克隆还是单克隆抗体。对于多克隆抗体,可以使用血清或乳奶作为抗体来源。对于单克隆抗体,脾细胞是适当的抗体来源。抗体的进一步纯化(必要时)或单克隆抗体的制备已经广泛描述于文献中并且本领域的一般技术人员将在执行这些程序方面没有不当的难度。此外,必要时,抗体可以针对目标物种加以修改(例如,犬源化或猫源化)。此外,用于此的技术在本领域中是众所周知的并且不需要描述于本申请中。

抗体的应用

[0186] 抗体将适合作为用于血清中和试验、ELISA、ELISPOT、西方墨点法、基于细胞的试验、效力试验以及免疫组织化学的试剂。这些技术已经在本领域中已知。

[0187] 本发明的抗体还可以用作治疗剂,例如在移植排斥反应中,例如用于产生抗胸腺细胞球蛋白(ATG)药剂。当前,两种这样的药剂在市场上:Atgam[®]和Thymoglobulin[®]。制造抗胸腺细胞球蛋白的方法一般已经描述于US20040023340中。

[0188] 抗体还可以用于制备抗毒液药物。在这些实施方案中,蛇毒液组分将用作抗原。毒液和其组分在本领域中也是众所周知的。

[0189] 许多物种的动物可以用作来源动物,包括(但不限于)家禽、小鼠、大鼠、仓鼠、天竺鼠、兔、犬、猫、绵羊、山羊、猪、牛以及马物种。来源动物的选择取决于即将进行的任务和本领域的一般技术人员的判断。

[0190] 特定的非限制性实施方案如下:

[0191] 在第一个实施方案中,本发明提供了一种包含油相和水相的佐剂配方,其中油相包含这种配方的至少50%v/v,其中所述配方包含单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物和免疫刺激寡核苷酸中的至少一者,限制条件是:

a) 如果所述免疫刺激寡核苷酸不存在,那么这种配方包含:

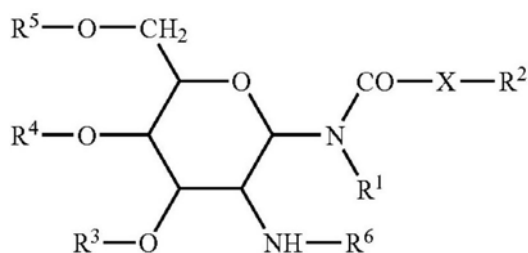
- i. 多聚I:C、糖脂以及任选地季胺;或
- ii. 多聚阳离子载体;

b) 如果所述单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物不存在,那么这种配方包含铝来源。

[0192] 在第二个实施方案中,本发明提供了第一个实施方案的佐剂配方,其中免疫刺激寡核苷酸如果存在的话,是CpG或寡核糖核苷酸;多聚阳离子载体如果存在的话,选自由葡聚糖、葡聚糖DEAE (和其衍生物)、PEG、瓜尔胶、壳聚糖衍生物、多聚纤维素衍生物如羟乙基纤维素 (HEC)、聚乙烯亚胺、聚氨基化物组成的群组;并且季胺如果存在的话,选自由DDA和阿夫立定 (avridine) 组成的群组。

[0193] 在第三个实施方案中,本发明提供了根据第一个或第二个实施方案的佐剂配方,其中免疫刺激寡核苷酸如果存在的话,是CpG;多聚阳离子载体如果存在的话,是葡聚糖DEAE;并且季胺如果存在的话,是DDA。

[0194] 在第四个实施方案中,本发明提供了根据第一个至第三个实施方案中的任一者的佐剂配方,其中糖脂如果存在的话,包含式I的化合物



式 I

其中, R^1 和 R^2 独立地为氢,或具有至多20个碳原子的饱和烷基;X为 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 或 $-NH-$; R^2 为氢,或具有至多20个碳原子的饱和或不饱和烷基; R^3 、 R^4 以及 R^5 独立地为氢、 $-SO_4^{2-}$ 、 $-PO_4^{2-}$ 、 $-COC_{1-10}$ 烷基; R^6 为L-丙氨酰基、L- α -氨基丁基、L-精氨酰基、L-天冬酰胺酰基、L-天冬氨酰基、L-半胱氨酰基、L-谷氨酰基、L-甘氨酰基、L-组氨酰基、L-羟脯氨酰基、L-异亮氨酰基、L-亮氨酰基、L-赖氨酰基、L-甲硫氨酰基、L-鸟氨酰基、L-苯丙氨酰基、L-脯氨酰基、L-丝氨酰基、L-苏氨酰基、L-酪氨酰基、L-色氨酰基以及L-缬氨酰基,或其D-异构体。

[0195] 在第五个实施方案中,本发明提供了第四个实施方案的佐剂配方,其中糖脂是N-(2-脱氧-2-L-亮氨酰基氨基-b-D-吡喃葡萄糖基)-N-十八基月桂酰胺或其盐。

[0196] 在第六个实施方案中,本发明提供了第五个实施方案的佐剂配方,其中盐是乙酸

盐。

[0197] 在第七个实施方案中,本发明提供了第一个至第四个实施方案中的任一者的佐剂配方,其包含所述单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物,并且进一步包含固醇和多聚I:C中的至少一者。

[0198] 在第八个实施方案中,本发明提供了根据第七个实施方案的佐剂配方,其包含固醇并且进一步包含皂苷。

[0199] 在第九个实施方案中,本发明提供了第七个和第八个实施方案中的任一者的佐剂配方,其中皂苷如果存在的话,是三萜皂苷;并且固醇如果存在的话,选自由麦角固醇、羊毛固醇以及胆固醇组成的群组。

[0200] 在第十个实施方案中,本发明提供了根据第九个实施方案的佐剂配方,其中皂苷如果存在的话,是Quil A;并且固醇如果存在的话,是胆固醇。

[0201] 在第十一个实施方案中,本发明提供了根据第七个实施方案的佐剂配方,其包含多聚I:C,并且进一步包含季胺和糖脂中的至少一者。

[0202] 在第十二个实施方案中,本发明提供了第一个至第十一个实施方案中的任一者的佐剂配方,其以每剂0.5-100 μ g的量包含MPL-A或其类似物。

[0203] 在第十三个实施方案中,本发明提供了根据第十二个实施方案的佐剂配方,其中MPL-A或其类似物以每剂5-50 μ g、或每剂5-20 μ g、或每剂1-5 μ g的量存在。

[0204] 在第十四个实施方案中,本发明提供了第一个至第十三个实施方案中的任一者的佐剂配方,其以每剂0.5至400 μ g的量包含免疫刺激寡核苷酸。

[0205] 在第十五个实施方案中,本发明提供了第十四个实施方案的佐剂配方,其中免疫刺激寡核苷酸以每剂约100至约250 μ g、或每剂约20至约50 μ g、或每剂约1 μ g的量存在。

[0206] 在第十六个实施方案中,本发明提供了第一个至第十五个实施方案中的任一者的佐剂配方,其以介于每剂约0.5与约400mg之间的量包含多聚阳离子载剂。

[0207] 在第十七个实施方案中,本发明提供了第十六个实施方案的佐剂配方,其中所述多聚阳离子载剂以每剂50-300mg、或每剂1-25mg、或每剂1-10mg的量存在。

[0208] 在第十八个实施方案中,本发明提供了第一个至第十七个实施方案中的任一者的佐剂配方,其以介于每剂约0.5与约2000 μ g之间的量包含糖脂。

[0209] 在第十九个实施方案中,本发明提供了第十八个实施方案的佐剂配方,其中糖脂以每剂约1000 μ g、或每剂25-50 μ g、或每剂1-10 μ g的量存在。

[0210] 在第二十个实施方案中,本发明提供了第一个至第十九个实施方案中的任一者的佐剂配方,其以介于每剂约0.1与约1000 μ g之间的量包含固醇。

[0211] 在第二十个实施方案中,本发明提供了根据第二十个实施方案的佐剂配方,其中固醇以每剂250-500 μ g、或每剂20-50 μ g、或每剂1-10 μ g的量存在。

[0212] 在第二十二个实施方案中,本发明提供了第一个至第二十个实施方案中的任一者的佐剂配方,其以介于每剂0.1与1000 μ g之间的量包含皂苷。

[0213] 在第二十二个实施方案中,本发明提供了第二十二个实施方案的佐剂配方,其中皂苷以每剂250-500 μ g、或每剂20-50 μ g、或每剂1-10 μ g的量存在。

[0214] 在第二十二个实施方案中,本发明提供了第一个至第二十二个实施方案中的任一者的佐剂配方,其以介于每剂约0.5与约100 μ g之间的量包含多聚I:C。

[0215] 在第二十五个实施方案中,本发明提供了第二十四个实施方案的佐剂配方,其中多聚I:C以每剂5-50 μ g、或每剂5-20 μ g、或每剂1-5 μ g的量存在。

[0216] 在第二十六个实施方案中,本发明提供了第一个至第二十五个实施方案中的任一者的佐剂配方,其包含铝来源,这种铝来源是氢氧化铝凝胶。

[0217] 在第二十七个实施方案中,本发明提供了第二十六个实施方案的佐剂配方,其中所述铝来源以这种配方的5%-20%v/v的量存在。

[0218] 在第二十八个实施方案中,本发明提供了第二十七个实施方案的佐剂配方,其中所述铝来源以这种配方的10%v/v的量存在。

[0219] 在第二十九个实施方案中,本发明提供了第一个至第二十八个实施方案中的任一者的佐剂配方,其中油相包含油和油溶性乳化剂。

[0220] 在第三十个实施方案中,本发明提供了第一个至第二十九个实施方案中的任一者的佐剂配方,其中所述油相以至多85%v/v的量存在。

[0221] 在第三十一个实施方案中,本发明提供了根据第三十个实施方案的佐剂配方,其中所述油相以51%的量存在。

[0222] 在第三十二个实施方案中,本发明提供了第二十九个至第三十一个实施方案中的任一者的佐剂配方,其中油包含这种配方的40-84%v/v,并且油溶性乳化剂包含这种配方的1-11%v/v。

[0223] 在第三十三个实施方案中,本发明提供了第三十二个实施方案的佐剂配方,其中油包含这种配方的45%v/v,并且油溶性乳化剂包含这种配方的6%v/v。

[0224] 在第三十四个实施方案中,本发明提供了根据第一个至第三十三个实施方案中的任一者的佐剂配方,其中所述油选自角鲨烷、植物油、三酸甘油酯、非代谢性直链烷烃油以及其任何组合组成的群组。

[0225] 在第三十五个实施方案中,本发明提供了根据第三十四个实施方案的佐剂配方,其中所述油是轻矿物油。

[0226] 在第三十六个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含有效量的抗原和根据第一个至第三十五个实施方案中的任一者的佐剂配方,其中组合物的油相为至少50%v/v。

[0227] 在第三十七个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含有效量的抗原和佐剂配方,这种佐剂配方包含油相和水相,其中油相包含这种配方的至少50%v/v,多聚阳离子载剂,以及

a. 皂苷和固醇以及任选地季胺的组合;限制条件是如果所述佐剂配方基本上由DEAE葡聚糖、Quil A、胆固醇以及DDA组成,那么抗原不是大肠杆菌J-5菌苗;或

b. 免疫刺激寡核苷酸,限制条件是如果所述佐剂配方基本上由DEAE葡聚糖和免疫刺激寡核苷酸组成,那么抗原包含影响牛、绵羊、马或猪的病原体或来源于所述病原体,并且不是大肠杆菌J-5菌苗。

[0228] 在第三十八个实施方案中,本发明提供了根据第三十七个实施方案的疫苗组合物,其中皂苷如果存在的话,是三萜皂苷;固醇如果存在的话,选自由麦角固醇、羊毛固醇以及胆固醇组成的群组;多聚阳离子载剂如果存在的话,选自由葡聚糖、葡聚糖DEAE(和其衍生物)、PEG、瓜尔胶、壳聚糖衍生物、多聚纤维素衍生物如羟乙基纤维素(HEC)、聚乙烯亚胺、

聚氨基化物组成的群组;并且季胺如果存在的话,选自DDA和阿夫立定组成的群组。

[0229] 在第三十九个实施方案中,本发明提供了根据第三十八个实施方案的疫苗组合物,其中皂苷是Qui1 A,固醇是胆固醇,多聚阳离子载剂是葡聚糖DEAE,并且季胺是DDA。

[0230] 在第四十个实施方案中,本发明提供了第三十七个至第三十九个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其中免疫刺激寡核苷酸是CpG。

[0231] 在第四十一个实施方案中,本发明提供了第三十七个至第四十个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其中所述多聚阳离子载剂以介于每剂约0.5与约400mg之间的量存在。

[0232] 在第四十二个实施方案中,本发明提供了第四十一个实施方案的疫苗组合物,其中所述多聚阳离子载剂以每剂50-300mg、或每剂1-25mg、或每剂1-10mg的量存在。

[0233] 在第四十三个实施方案中,本发明提供了第三十七个至第四十二个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其以介于每剂约0.1与约1000 μ g之间的量包含皂苷。

[0234] 在第四十四个实施方案中,本发明提供了第四十三个实施方案的疫苗组合物,其中皂苷以每剂250-500 μ g、或每剂20-50 μ g、或每剂1-10 μ g的量存在。

[0235] 在第四十五个实施方案中,本发明提供了第三十七个至第四十四个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其以介于每剂约0.1与约1000 μ g之间的量包含固醇。

[0236] 在第四十六个实施方案中,本发明提供了第四十五个实施方案的疫苗组合物,其中固醇以每剂250-500 μ g、或每剂20-50 μ g、或每剂1-10 μ g的量存在。

[0237] 在第四十七个实施方案中,本发明提供了第三十七个至第四十六个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其以介于每剂约1与约200 μ g之间的量包含季胺。

[0238] 在第四十八个实施方案中,本发明提供了第四十七个实施方案的疫苗组合物,其中季胺以每剂约100 μ g、或介于每剂约10与约100 μ g之间、或每剂约5 μ g的量存在。

[0239] 在第四十九个实施方案中,本发明提供了第三十七个至第四十八个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其以介于每剂约0.5 μ g与约400 μ g之间的量包含免疫刺激寡核苷酸。

[0240] 在第五十个实施方案中,本发明提供了第四十九个实施方案的疫苗组合物,其中免疫刺激寡核苷酸以每剂100-250 μ g、或每剂20-50 μ g、或每剂约1 μ g的量存在。

[0241] 在第五十一个实施方案中,本发明提供了第三十七个至第五十个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其中油相包含油和油溶性乳化剂。

[0242] 在第五十二个实施方案中,本发明提供了第三十七个至第五十一个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其中所述油相以至多85%v/v的量存在。

[0243] 在第五十三个实施方案中,本发明提供了第五十二个实施方案的疫苗组合物,其中所述油相以51%v/v的量存在。

[0244] 在第五十四个实施方案中,本发明提供了第五十一个至第五十三个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其中油包含疫苗组合物的40-84%v/v,并且油溶性乳化剂包含疫苗组合物的1-11%v/v。

[0245] 在第五十五个实施方案中,本发明提供了第五十三个实施方案的疫苗组合物,其中油包含配方的45%v/v,并且油溶性乳化剂包含配方的6%v/v。

[0246] 在第五十六个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含巨型艾美耳球虫或产气荚膜梭菌抗原和佐剂配方,这种佐剂配方包含:

a) 油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;多聚阳离子载剂,以及任选地免

疫刺激寡核苷酸;或

b) 油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;免疫刺激寡核苷酸、固醇以及单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物。

[0247] 在第五十七个实施方案中,本发明提供了第五十六个实施方案的疫苗组合物,其包含针对巨型艾美耳球虫和产气荚膜梭菌的抗原。

[0248] 在第五十八个实施方案中,本发明提供了第五十六个实施方案或第五十七个实施方案的疫苗组合物,其中所述多聚阳离子载剂是DEAE-葡聚糖。

[0249] 在第五十九个实施方案中,本发明提供了根据第五十六个至第五十八个实施方案的疫苗组合物的用途,其用于治疗或预防家禽中由巨型艾美耳球虫或产气荚膜梭菌引起的感染。

[0250] 在第六十个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含新孢子虫抗原和佐剂配方,这种佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;以及

a) 单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物;或

b) 免疫刺激寡核苷酸和多聚阳离子载剂的组合。

[0251] 在第六十一个实施方案中,本发明提供了第六十个实施方案的疫苗组合物,其包含免疫刺激寡核苷酸和葡聚糖DEAE的组合。

[0252] 在第六十二个实施方案中,本发明提供了第六十个实施方案的疫苗组合物,其包含单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物,并且进一步包含免疫刺激寡核苷酸。

[0253] 在第六十三个实施方案中,本发明提供了第六十二个实施方案的疫苗,其进一步包含固醇。

[0254] 在第六十四个实施方案中,本发明提供了第六十三个实施方案的疫苗,其中固醇是胆固醇。

[0255] 在第六十五个实施方案中,本发明提供了根据第六十个至第六十四个实施方案中的任一者的疫苗,其中新孢子虫抗原是犬新孢子虫抗原。

[0256] 在第六十六个实施方案中,本发明提供了根据第六十个至第六十五个实施方案中的任一者的疫苗的用途,其用于治疗或预防由新孢子虫引起的感染。

[0257] 在第六十七个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含流产嗜衣原体抗原和佐剂配方,这种佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;固醇;免疫刺激寡核苷酸;单磷酸脂质A (MPL-A) 或其类似物;以及多聚I:C。

[0258] 在第六十八个实施方案中,本发明提供了根据第六十七个实施方案的疫苗的用途,其用于治疗或预防母羊中由流产嗜衣原体 (C.abortis) 引起的流产。

[0259] 在第六十九个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含肌肉生长抑制素和佐剂配方,所述佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在,免疫刺激寡核苷酸,以及以下任一者:

a) 多聚阳离子载剂;或

b) MPL-A或其类似物。

[0260] 在第七十个实施方案中,本发明提供了第六十九个实施方案的疫苗组合物,其包含MPL-A或其类似物,其中所述配方含有每50 μ l所述组合物小于0.5 μ g的固醇。

[0261] 在第七十一个实施方案中,本发明提供了第七十个实施方案的疫苗组合物,其不

含有固醇。

[0262] 在第七十二个实施方案中,本发明提供了第七十个实施方案的疫苗组合物,其中固醇是胆固醇。

[0263] 在第七十三个实施方案中,本发明提供了根据实施方案69至72中的任一者的疫苗的用途,其用于降低动物中肌肉生长抑制素的量。

[0264] 在第七十四个实施方案中,本发明提供了根据第七十三个实施方案的用途,其中所述动物是家禽动物。

[0265] 在第七十五个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含化脓隐秘杆菌抗原和佐剂配方,其中这种佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;免疫刺激寡核苷酸以及多聚阳离子载剂。

[0266] 在第七十六个实施方案中,本发明提供了第七十五个实施方案的疫苗组合物,其中化脓隐秘杆菌抗原是溶血素(pyolysin)。

[0267] 在第七十七个实施方案中,本发明提供了第七十四或第七十五个实施方案的疫苗组合物的用途,其用于治疗或预防由化脓隐秘杆菌引起的感染。

[0268] 在第七十八个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含大肠杆菌抗原、BRV抗原或BCV抗原和佐剂配方,其中所述佐剂配方包含以所述疫苗组合物的至少50%v/v的量存在的油相、免疫刺激寡核苷酸、以及多聚阳离子载剂和铝来源中的至少一者。

[0269] 在第七十九个实施方案中,本发明提供了第七十八个实施方案的疫苗组合物,其包含大肠杆菌抗原、BRV抗原以及BCV抗原。

[0270] 在第八十个实施方案中,本发明提供了第七十八或第七十九个实施方案的疫苗组合物,其中

a. 大肠杆菌抗原如果存在的话,选自由大肠杆菌K99、大肠杆菌F41以及其组合组成的群组;

b. BRV抗原如果存在的话,选自由BRV G6、BRV G10以及其组合组成的群组。

[0271] 在第八十一个实施方案中,本发明提供了根据第七十八个至第八十个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其中多聚阳离子载剂如果存在的话,是葡聚糖DEAE,并且免疫刺激寡核苷酸是CpG。

[0272] 在第八十二个实施方案中,本发明提供了根据第七十八个至第八十一个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其包含铝来源,这种铝来源是氢氧化铝凝胶。

[0273] 在第八十三个实施方案中,本发明提供了第八十二个实施方案的疫苗组合物,其中所述铝来源以5%-20%v/v的量存在。

[0274] 在第八十四个实施方案中,本发明提供了第八十三个实施方案的疫苗组合物,其中所述铝来源以10%-17%v/v的量存在。

[0275] 在第八十五个实施方案中,本发明提供了根据第七十八个至第八十四个实施方案中的任一者的疫苗组合物的用途,其用于治疗或预防牛类动物中由大肠杆菌、BCV或BRV引起的肠炎。

[0276] 在第八十六个实施方案中,本发明提供了根据第九十一个实施方案的用途,其中所述疫苗引起针对所述抗原的至少六个月长的免疫性。

[0277] 在第八十七个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含微小扇头蜱抗

原和佐剂,所述佐剂选自由以下组成的群组:

a) 水性佐剂,其包含免疫刺激寡核苷酸、皂苷、固醇、季胺、聚丙烯酸聚合物以及糖脂;以及

b) 油基佐剂,其包含以疫苗组合物的至少50%v/v的量存在的油相并且包含免疫刺激寡核苷酸和多聚阳离子载剂。

[0278] 在第八十八个实施方案中,本发明提供了第八十七个实施方案的疫苗组合物,其中皂苷是Quil A,固醇是胆固醇,季胺是DDA,糖脂是N-(2-脱氧-2-L-亮氨酰基氨基-b-D-吡喃葡萄糖基)-N-十八基月桂酰胺或其盐,并且免疫刺激寡核苷酸是CpG。

[0279] 在第八十九个实施方案中,本发明提供了第八十七个实施方案的疫苗组合物,其中多聚阳离子载剂是葡聚糖DEAE并且免疫刺激寡核苷酸是CpG。

[0280] 在第九十个实施方案中,本发明提供了第八十七个至第八十九个实施方案中的任一者的疫苗组合物,其中微小扇头蜱抗原是Bm86蛋白。

[0281] 在第九十一个实施方案中,本发明提供了根据第八十七个至第九十个实施方案中的任一者的疫苗组合物的用途,其用于治疗或预防由微小扇头蜱引起的感染。

[0282] 在第九十二个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含口蹄疫(FMD)抗原和佐剂配方,所述佐剂配方包含以所述疫苗组合物的至少36%v/v的量存在的油相、免疫刺激寡核苷酸以及多聚阳离子载剂,其中所述疫苗组合物是油包水乳液。在不同实施方案中,所述口蹄疫病毒抗原可以是以下的抗原:野生型FMDV,遗传修饰和/或减弱的FMDV病毒株,或重组表达的FMDV结构蛋白,诸如血清型A、C、O、Asia1、SAT1、SAT2或SAT3的病毒样粒子(VLP)。

[0283] 在第九十三个实施方案中,本发明提供了第九十二个实施方案的疫苗组合物,其中免疫刺激寡核苷酸是CpG,并且多聚阳离子载剂是DEAE葡聚糖。

[0284] 在第九十四个实施方案中,本发明提供了第九十二个或第九十三个实施方案的疫苗组合物,其中抗原是本发明提供了第九十八个或第九十九个实施方案的疫苗组合物,其中抗原来源于在牛和猪中减弱的遗传修饰的FMD-LL3B3D平台病毒,特别是FMD-LL3B3D-A24 Cruzeiro。

[0285] 在第九十五个实施方案中,本发明提供了第九十二个或第九十四个实施方案中的任一者的疫苗组合物的用途,其用于治疗或预防牛的FMD。

[0286] 在第九十六个实施方案中,本发明提供了一种疫苗组合物,其包含乳房链球菌(*S.uberis*)抗原和佐剂配方,这种佐剂配方包含油相,所述油相以组合物的至少50%v/v的量存在;多聚阳离子载剂;以及

a) 免疫刺激寡核苷酸;

b) 包含皂苷、固醇以及季胺的组合;或

c) 其组合。

[0287] 在第九十七个实施方案中,本发明提供了第九十六个实施方案的疫苗组合物,其中抗原是乳房链球菌粘附分子或其免疫原性片段。

[0288] 在第九十八个实施方案中,本发明提供了根据第九十六个或第九十七个实施方案中的任一者的疫苗的用途,其用于治疗或预防由乳房链球菌引起的感染。

[0289] 以下实施例作为说明性实施方案呈现,但不应视为限制本发明的范围。本发明的

许多变化、变更、修改以及其它用途和应用将为本领域的技术人员显而易见。

实施例.

实施例1. 开发增强对坏死性肠炎的免疫性的重组接种疫苗策略.

[0290] 研究的目的在于评估用加佐剂的重组梭状芽孢杆菌疫苗体内接种疫苗对坏死性肠炎疾病模型中巨型艾美耳球虫和产气荚膜梭菌的活攻击感染的作用。

材料和方法

[0291] 重组蛋白:将编码产气荚膜梭菌 (*C.perfringens*) (ATCC 13124, 美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection), Manassas, VA) NetB和EF-Tu的基因的全长编码序列通过PCR克隆至具有NH₂端多聚组氨酸表位标签的pET32a (+) 载体中。将克隆的基因转化至感受态大肠杆菌中, 在37℃下培养细菌16小时, 并且在37℃下用1.0mM异丙基β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷 (Amresco, Cleveland, OH) 诱导5小时。通过在4℃下以10,000rpm离心10分钟收获细菌, 再悬浮于PBS中, 通过超声处理使其破裂, 并且以10,000rpm离心15分钟。在22℃下将上清液与Ni-NTA琼脂糖 (Qiagen, Valencia, CA) 一起孵育1小时, 用PBS洗涤树脂, 并且用含250mM咪唑的PBS (pH 9.2) 洗脱纯化的梭状芽孢杆菌蛋白。在考马斯蓝 (Coomassie blue) 染色的SDS-聚丙烯酰胺凝胶上确认蛋白质纯度。使用来自Sigma的商业试剂盒确认蛋白质浓度。

[0292] 动物:将在Longeneckers孵化场 (Elizabethtown, PA) 孵化的一天大的肉幼禽 (Broiler bird) (Ross/Ross) 运输至BARC-East, Building 1082, 并且根据BARC小动物护理委员会 (Small Animal Care Committee) 的确立准则将仔鸡圈养于Petersime启动育雏室单元中。将幼禽保持于无艾美耳球虫设施中的育雏室围栏中并且转移至独立场所中的大悬挂笼中, 在此其被感染并保持直至活攻击感染研究的实验期结束。关于运输、测量体重、感染以及收集血液和脾的所有程序都获BARC小动物护理委员会 (附有SOP) 批准。ARS BARC小动物护理委员会确立了用于BARC的动物实验的准则并且进行所有动物设施的定期检查。

[0293] 免疫:通过向一天大的肉仔鸡皮下注射100μl疫苗 (Ag 100微克/剂) 进行初次免疫。通过向七天大的肉仔鸡皮下注射100μl疫苗 (Ag 100微克/剂) 进行二次免疫。

[0294] 艾美耳球虫攻击:已经维持于动物寄生虫病实验室 (Animal Parasitic Diseases Laboratory) 中并且根据确立的程序繁殖的艾美耳球虫属的BARC病毒株。通过在5%次氯酸钠上漂浮来清洁巨型艾美耳球虫 (*E.maxima*) (41A), 用PBS洗涤三次, 并且使用血球计由锥虫蓝对生存力进行计数。卵囊数仅基于孢子化卵囊。在加强免疫之后六天, 使用接种针向鸡经食管接种10,000个巨型艾美耳球虫。

[0295] 产气荚膜梭菌攻击:在艾美耳球虫感染之后四天, 各自使用接种针向NE组的幼禽经食管接种 1×10^9 CFU的产气荚膜梭菌。

[0296] 分析:在到达当天、在即将用EM攻击之前、在用产气荚膜梭菌攻击之前、在C.P.之后2天、以及在C.P.攻击之后10天对幼禽进行称重以计算体重增加。

[0297] 为了对肠病变进行评分, 在C.P.感染之后两天将幼禽 (5只幼禽/组) 处死。获得向憩室前部和后部延伸10cm的约20cm肠段并且纵向切割。由2个独立的观察员从0至4以病变严重性的递升次序评估病变记分。

[0298] 鸡中的两个主要产气荚膜梭菌毒力因子是α毒素和NetB (坏死性肠炎B样) 毒素, 这两者都牵涉于NE的发病机理中。可能涉及于细菌发病机理和宿主保护免疫性中的额外产气

荚膜梭菌蛋白,包括丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(PFO)和延长因子G(EF-G),先前有报道诱导针对产气荚膜梭菌的实验攻击感染的保护免疫性。因此,如下文所描述测定针对这些因子的抗体滴度。

[0299] 随机选择每组五只幼禽用于在无痛致死之后立即通过心脏穿刺收集血液。通过低速离心获得血清并且用于酶联免疫吸附试验(ELISA)中以测量 α -毒素、NetB、EF以及PFO特异性抗体水平。简单地说,将96孔微量滴定板用1.0微克/孔的纯化的重组 α -毒素、NetB、EF以及PFO蛋白涂布过夜。用含有0.05% Tween的PBS (PBS-T) 洗涤板并且用含有1% BSA的PBS阻断。在室温下在缓缓搅动下孵育血清(100微升/孔) 2小时。用PBS-T洗涤板,并且用过氧化物酶偶联的兔抗鸡IgG (Sigma, St. Louis, MO) 和过氧化物酶特异性底物检测结合的抗体。用自动微量板读取器(Bio-Rad, Richmond, CA) 测量450nm下的光密度(OD)。

[0300] 统计分析:所有值都表示为平均值 $\pm$ SEM。在ANOVA之后使用Windows的SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) 通过图基检验(Turkey test)在组之间比较体重增加和病变记分的平均值。平均值之间的差异在 $p < 0.05$ 下将视为显著的。

[0301] 实验设计在表1中说明。

表1.

组编号	幼禽 (数目)	蛋白质 (100 微克/幼禽)	佐剂	针对 NE 的感染 (EM + CP) *
1	15	-	10 mM 缓冲液	-
2	15	-	10 mM 缓冲液	+
3	15	NetB (50 μ g) + EF-Tu (50 μ g)	10 mM 缓冲液	+
4	15	"	1. TXO	+
5	15	"	2. TCMO	+
6	15	"	3. XO	+
7	15	"	4. XOM	+
8	15	"	5. SP-OIL	+
9	15	"	6. 5% AMPHIGEN [®]	+
10	15	"	7. 5% AMPHIGEN [®] + 多聚 I:C	+
11	15	"	8. 5% AMPHIGEN [®] + CpG	+
12	15	"	9. 5% AMPHIGEN [®] + DEAE 葡聚糖	+
13	15	"	10. 5% AMPHIGEN [®] + DDA	+

*在孵化后第14天用 1.0×10^4 个卵囊/幼禽的巨型艾美耳球虫(EM)并且在第18天用 1.0×10^9 CFU/幼禽的产气荚膜梭菌(CP)经口感染鸡。

[0302] 佐剂的组成如下(每50 μ l):

[0303] TXO:SEQ ID NO:8以1μg的量存在,葡聚糖DEAE以5μg的量存在,轻矿物油以组合物的51%v/v的量存在。

[0304] TCM0:SEQ ID NO:8以1μg的量存在,胆固醇以1μg的量存在,MPL-A以1μg/50μl剂量的量存在,轻矿物油以组合物的51%v/v的量存在。

[0305] XO:葡聚糖DEAE以5μg的量存在,轻矿物油以组合物的51%v/v的量存在。

[0306] XOM:葡聚糖DEAE以5μg的量存在,轻矿物油以组合物的51%v/v的量存在,MPL-A以1μg的量存在。

[0307] 5%AMPHIGEN[®]+多聚I:C:多聚I:C以1μg的量存在。

[0308] 5%AMPHIGEN[®]+CpG:SEQ ID NO:8以1μg的量存在。

[0309] 5%AMPHIGEN[®]+DEAE葡聚糖:DEAE葡聚糖以25μg的量存在。

[0310] 5%AMPHIGEN[®]+DDA:DDA以1μg的量存在。

[0311] 体重增加在NE对照组中因EM和CP感染而显著减小(P<0.05)。然而,体重增加在用重组CP蛋白(Net B+EF)免疫的组中一般增大4%至21%。与NE对照的显著差异在用与TCM0佐剂偶联的CP蛋白免疫的蛋白质TCM0组中发现。

表2:体重增加

组	处理	平均值	SEM
1	对照	347.93	9.387
2	NE 对照	286.36	14.436
3	蛋白质	317.86	7.828
4	蛋白质 TXO	316.42	8.826
5	蛋白质 TCMO	345.73	11.745
6	蛋白质 XO	334.67	8.605
7	蛋白质 XOM	331.17	11.387
8	蛋白质 SPO	304.09	10.330
9	蛋白质 AMP	310.09	9.479
10	蛋白质 AMPPIC	314.86	9.571
11	蛋白质 AMP CPG	313.82	11.976
12	蛋白质 AMP DEAE	299.20	15.000
13	蛋白质 AMP DDA	301.25	10.440

表3.病变记分

组		平均值	SEM
2	NE 对照	3.0	0.0
3	蛋白质	2.7	0.2
4	蛋白质 TXO	2.5	0.2
5	蛋白质 TCMO	2.6	0.2
6	蛋白质 XO	1.7	0.2
7	蛋白质 XOM	2.4	0.2
8	蛋白质 SPO	2.4	0.2
9	蛋白质 AMP	1.7	0.1
10	蛋白质 AMPPIC	2.1	0.1
11	蛋白质 AMP CPG	2.3	0.2
12	蛋白质 AMP DEAE	2.1	0.1
13	蛋白质 AMP DDA	2.2	0.2

[0312] 在EM感染之后六天和CP感染之后2天,评估针对 α -毒素、Net-B、EF以及PFO的血清抗体反应。结果提供于表4中。简单地说,CP蛋白在用CP蛋白免疫的幼禽中一般增加针对CP抗原的Ab滴度。对Net B、EF以及PFO抗原的Ab反应比对 α -毒素的反应大得多。

表4.对Net B、EF以及PFO抗原的Ab反应

组	α -毒素 平均值 SEM	Net B 平均值 SEM	EF 平均值 SEM	PFO 平均值 SEM
2 NE 对照	.36 .02	.33 .01	.21 .01	.22 .01
3 蛋白质	.40 .04	.44 .05	.40 .09	.36 .05
4 蛋白质 TXO	.39 .03	.41 .04	.56 .05	.40 .03
5 蛋白质 TCMO	.34 .02	.42 .03	.48 .06	.40 .06
6 蛋白质 XO	.34 .02	.53 .05	.38 .07	.36 .04
7 蛋白质 XOM	.33 .02	.40 .04	.55 .03	.41 .04
8 蛋白质 SPO	.30 .01	.33 .02	.19 .02	.20 .02
9 蛋白质 AMP	.37 .01	.33 .00	.22 .03	.32 .07
10 蛋白质 AMPPIC	.32 .02	.53 .06	.36 .10	.33 .02
11 蛋白质 AMP CPG	.42 .02	.41 .02	.24 .08	.28 .01
12 蛋白质 AMP DEAE	.38 .02	.53 .05	.17 .02	.23 .03
13 蛋白质 AMP DDA	.41 .01	.58 .02	.45 .03	.36 .03

实施例2:母鸡抗肌肉生长抑制素疫苗.

[0313] 肌肉生长抑制素是分泌的生长分化因子,其为抑制肌肉分化和生长的TGF β 蛋白家族的成员。肌肉生长抑制素主要在骨骼肌细胞中产生,在血液中循环,并且通过结合称为活化素II型受体的细胞结合受体来对肌肉组织起作用。因此,肌肉生长抑制素的抑制使得动物具有增加的肉/肌肉量。一种降低动物中肌肉生长抑制素的量的方法是产生抗肌肉生长抑制素免疫反应,其可以由抗肌肉生长抑制素抗体的滴度来便利地测量。在这个实施例中,使用母鸡模型。

[0314] 用含有肌肉生长抑制素偶联肽和佐剂配方的疫苗引发Cobb 500Parent Stock和Ross 308母鸡(分别是12至10周龄)。研究中所用的佐剂配方示于表5中。

表5.处理组.

处理	佐剂	载体	剂量
----	----	----	----

T01	CFA/IFA	CRM	50μg
T02	IFA/CFA	CRM	50μg
T03	CFA/IFA	KLH/CRM	50μg
T04	TCMO	KLH/CRM	50μg
T05	TCMO	CRM	200μg/50μg
T06	TMO	CRM	200μg/50μg
T07	TCMO	CRM	50μg
T08	MO	CRM	50μg
T09	TMO	CRM	50μg
T10	TXO	CRM	50μg

标示“200μg/50μg”指的是引发/加强剂量中抗原的量,体积0.2ml。

[0315] 佐剂中的组分如表6中所描述。

[0316] 在第12周或第10周引发Cobb 500Parent Stock和Ross 308母鸡并且并在第18周加强。在接种疫苗之前并且在引发之后每两周直至分别22和20周龄,通过ELISA测量抗肌肉生长抑制素抗体的血清滴度。

[0317] 组T06、T07、T09以及T10产生最高反应(第22周抗体平均几何滴度介于50000与15000之间)。在这四个组当中,组T06和T07中的Cobb 500幼禽展示高于100,000的平均几何滴度。

表6.

佐剂名称	佐剂组分	佐剂浓度/剂
TCMO	SEQ ID NO: 8/胆固醇/MPLA/油	10 μg/10 μg/5 μg/Drakeol 5 油 (45%)、SPAN [®] 80 (6.3%) 以及 TWEEN [®] 80 (1.45%)
MO (20:80 W:O)	MPLA (20:80 W:O) 低粘度乳液	MPLA-5 μg/Drakeol 6 矿物油、SPAN 以及 TWEEN 80
TMO (20:80 W:O) 使用 MO 乳液并且混合 CpG 和 偶联肽	SEQ ID NO: 8/MPLA (20:80 W:O) 低粘度乳液	10 μg/5 μg/Drakeol 6 矿物油、SPAN 以及 TWEEN 80
TXO	SEQ ID NO: 8/DEAE-葡聚糖	10 μg/20 μg/Drakeol 5 矿物油 (45%)、SPAN [®] 80 (6.3%) 以及 TWEEN [®] 80 (1.45%)

实施例3. 针对化脓隐秘杆菌 (*T. pyogenes*) 的疫苗

[0318] 化脓隐秘杆菌(原称化脓秘密杆菌,并且原称化脓放线菌以及化脓棒状杆菌)通常导致牛的严重临床子宫炎,其特征为浓稠的脓性分泌物。有时与这种病状相关的恶臭可能由厌氧菌引起,这些厌氧菌也存在,但通过常规培养方法无法检测。这种疾病在产犊之前或产犊时的不产乳母牛或小母牛中最常见,并且在泌乳动物中由于乳头或乳房损伤而偶尔发生。由这种生物体引起的经济上重要的疾病包括奶牛的子宫炎和流产以及饲牛的肝脓肿。溶血素 (PLO), 一种由化脓隐秘杆菌表达的胆固醇依赖性溶细胞素,是重要的宿主保护性抗

原。

[0319] 约14月龄的安格斯杂交牛 (Angus crossbred cattle) 用于这项研究中。动物处于整体良好的健康状况下并且在录入时没有任何并发症。动物已经随意获取饲料和水。

[0320] 配方：每剂 1×10^9 的所有细菌 (大肠杆菌和化脓隐秘杆菌)。将溶血素以每剂150微克施用于组T02-T07中的动物。组T01用作对照。

[0321] 在这项研究中测试的佐剂配方如下：

ISC/多聚IC-ISC 1000 μ g/多聚I:C 50 μ g, 在2mL剂量中

ISC/CpG-ISC 1000 μ g/100 μ g CpG (SEQ ID NO:8), 在2mL剂量中

TXO-CpG 100 μ g (SEQ ID NO:8) /DEAE葡聚糖/矿物油5LT NF, 在2mL剂量中

QCDCRT-Quil A 150 μ g/胆固醇150 μ g/DDA 100 μ g/**CARBOPOL**[®] (聚丙烯酸聚合物) 0.0375%/R1005 1000 μ g/CpG (SEQ ID NO:8) 100 μ g, 在2mL剂量中

QAC-Quil A 500 μ g/胆固醇500 μ g/**AMPHIGEN**[®] (卵磷脂油乳液) 2.5%, 在2mL剂量中

[0322] 使用间接ELISA测量溶血素抗体, 第0天、第28天以及第56天测量板上的抗原、继之以血清样品 (初级抗体)、继之以抗牛IgG偶联物。

[0323] 以1:2000稀释所有样品和对照, 并且通过计算样品的OD与阳性对照 (阳性对照是来自康复动物的血清的汇集物) 的OD的比率来测定反应。由HRP偶联的绵羊抗牛IgG检测抗体。

表7: 研究设计

处理组	动物数	处理*	天	剂量	剂量单位	途径†	子宫攻击
T01	8	盐水	0、28	2	mL	SC、SC	第56天 5×10^8
T02	8	大肠杆菌+化脓隐秘杆菌 +含 PLO 的 ISC/多聚:IC	0、28	2	mL	IN、SC	第56天 5×10^8
T03	8	大肠杆菌+化脓隐秘杆菌 +含 PLO 的 ISC/CpG	0、28	2	mL	IN、SC	第56天 5×10^8
T04	8	大肠杆菌+化脓隐秘杆菌 +含 PLO 的 TXO	0、28	2	mL	SC、SC	第56天 5×10^8
T05	8	大肠杆菌+化脓隐秘杆菌 +含 PLO 的 QCDCRT	0、28	2	mL	IN、SC	第56天 5×10^8
T06	8	大肠杆菌+化脓隐秘杆菌 +含 PLO 的 QAC	0、28	2	mL	SC、SC	第56天 5×10^8
T07	8	含 PLO 的 ISC/多聚:IC	0、28	2	mL	IN、SC	第56天 5×10^8
*大肠杆菌菌株 51323+化脓隐秘杆菌菌株 51496, PLO=溶血素 † SC=皮下, IN=鼻内。							

[0324] 结果示于表8中。

表8

	IgG 对 PLO 的 LSM (时间点是研究天数)		
处理编号	第 00 天	第 28 天	第 56 天
T01	0.216	0.226	0.208
T02	0.274	0.245	0.444
T03	0.252	0.229	0.451
T04	0.205	0.506*	0.590*
T05	0.291	0.246	0.373
T06	0.243	0.512*	0.687*
T07	0.315	0.280	0.624

[0325] 组T04和T06(佐剂TX0和QAC)表现显著好于对照($P<0.05$)。另外,已经发现在不同处理组当中的多样化趋势(在 $P<0.1$ 下选作差异)。这些趋势总结于表9中。

表9.第0天(第一个参数)、第28天(第二个参数)、第56天(第三个参数)在组之间的差异。“Y”指示 $P<0.1$ 。

	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07
T01	X	X	X	X	X	X	X
T02	N、N、Y	X	X	X	X	X	X
T03	N、N、Y	N、N、N	X	X	X	X	X
T04	N、Y、Y	Y、Y、Y	N、Y、N	X	X	X	X
T05	Y、N、Y	N、N、N	N、N、N	Y、Y、N	X	X	X
T06	N、Y、Y	N、Y、Y	N、Y、Y	N、N、Y	N、Y、Y	X	X
T07	Y、N、Y	N、N、Y	N、N、N	Y、Y、N	N、N、N	Y、Y、Y	X

实施例4.评估泌乳奶牛中针对子宫炎攻击的溶血素疫苗配方。

[0326] 这项研究的目的在于使用人工子宫炎攻击模型,在非怀孕的泌乳荷斯坦(Holstein)或荷斯坦杂交奶牛中评估用TX0辅助的原生和重组溶血素疫苗配方的功效。

[0327] 动物处于整体良好的健康状况下,没有任何并发疾病,并且在接种疫苗和攻击之前和之后的七(7)天期间不接受任何化学疗法、全身抗生素或其它消炎药物。这些动物处于其第一胎至第三胎,没有先前的子宫炎病史,并且在攻击前(第-1天或第0天)对于化脓隐秘杆菌不呈培养阳性。去除在研究期间发展临床显著的并存疾病的动物。

[0328] 在每个24小时时段中动物已经随意获取饲料至少20小时,只有当其被挤奶时除外。使用基础定制的掺合饲料配给量,这是泌乳工业的代表。在研究开始之前使动物适应至少7天。施用于母牛(每组 $n=20$)的配制疫苗含有以下组分:T01-盐水;T02-TX0+原生溶血素(nPLO);T03-TX0+重组溶血素(rPLO)。通过从谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)克隆、表达以及纯化抗原来获得重组溶血素。然后通过用福尔马林处理使纯化的蛋白质灭活。通过用福尔马林处理也使从化脓隐秘杆菌表达和纯化的原生溶血素灭活。TX0佐剂含有CpG寡核苷酸、DEAE-葡聚糖、矿物油以及表面活性剂Span 80和Tween 80。

[0329] 在接种疫苗当天,经由皮下途径施用适当的IVP(表10)。第0天在颈部,并且第28天在颈部的相反侧施用疫苗。在研究第0天、第1天、第2天、第3天、第7天、第28天、第29天、第30天、第31天、第35天、第49天以及第77天针对注射部位反应来评估疫苗施用部位。在接种疫苗当天,评估施用部位以确认在疫苗施用之前不存在肿胀。在研究第28天、第49天以及第77

天,观测颈部的两侧。记录注射部位评估结果。在接种疫苗期期间,在研究第0天(在第1次接种疫苗之前)、第1天、第2天、第3天、第7天、第28天(在第2次接种疫苗之前)、第29天、第30天、第31天以及第35天还测量并记录直肠温度。在攻击第0天至第28天还测量并记录直肠温度。

[0330] 在研究第0天、第1天、第2天、第3天、第7天、第28天、第29天、第30天、第31天以及第35天(在接种疫苗期期间)记录接种疫苗后的临床观测结果。另外,在始于第49天至第77天的攻击期期间观测并记录临床观测结果。

[0331] 在研究第0天、第28天、第49天以及研究最后一天(第77天)通过ELISA测定对溶血素的抗体反应。对每个血清样品还进行溶血抑制试验。这个试验测量与生物活性(保护)相关联的抗溶血素抗体反应。

表10.

组	动物数	处理	天	途径
T01	20	盐水	0、28	SQ
T02	20	TX0+原生溶血素	0、28	SQ
T03	20	TX0+重组溶血素	0、28	SQ

[0332] 在攻击之前,使所有母牛的卵巢周期同步。在攻击之前并且在整个28天攻击期中每天施用孕酮。使用类似于育种套管的无菌套管,在攻击第0天将各自在独立的注射器中吸取的10mL大肠杆菌攻击菌株和10mL化脓隐秘杆菌攻击菌株(预定攻击剂量)输注至所有母牛的子宫中。为了确保攻击物质的完全递送,用10mL无菌培养基冲洗套管。

[0333] 如果处理组T01(对照组)中至少60%的动物发展子宫炎,那么攻击被视为成功的。子宫炎的存在将由记分 ≥ 2 的粘液脓性子宫/阴道排出物的存在指示。(这个评分系统是从Sheldon等,Theriogenology,65:1516-1530,2006所描述的方法中采用;其中0和1的记分被视为正常。)

[0334] 主要变量是记分 ≥ 2 的粘液脓性子宫/阴道排出物的存在,其指示子宫炎的存在。使用具有无菌杯的无菌Simcro MetriCheck™装置收集子宫/阴道排出物,并且在攻击第0天开始至第28天(研究第49天至第77天)进行评分。

[0335] 如果只有T01母牛发展临床子宫炎,或如果粘液脓性阴道排出物(记分 ≥ 2)的持续时间和/或天数比例与对照相比显著更短($p < 0.1$),那么处理被视为有效的。如果在组之间关于子宫炎的持续时间和天数比例不存在显著差异,那么从子宫细菌拭子分离化脓隐秘杆菌的频率用作疫苗功效的支持数据。基于注射部位评估、直肠温度以及对泌乳的任何不利影响来评价相应疫苗的安全性。

[0336] 在每个时间点对于每只动物总结所收集的子宫炎数据(阴道/子宫排出物存在,是/否;阴道/子宫排出物记分),并且用于确定在每个时间点对于每个处理的每种类别的频率分布。通过处理和时间点来总结动物对于每个子宫炎征象(例如,阴道/子宫排出物记分)是正常还是异常(正常是记分=0或1,异常是记分 ≥ 2)的频率分布。通过处理,使用具有二项式误差分布和罗吉连结函数(logit link function)的广义线性混合模型(Proc Glimmix)来总结动物是否曾经具有异常(记分 ≥ 2)子宫排出物记分。统计模型包括处理的固定效应和批次的随机效应。在处理组之间进行对比。这针对这一段中所描述的每个子宫炎变量进行重复。如果Proc Glimmix对于子宫炎变量并不收敛,那么替代地利用费氏精确

检验 (Fisher's Exact Test) 来比较处理组。

[0337] 对于每只动物确定异常记分 (对于每个子宫炎变量) 的持续时间, 并且以“(异常的最后一个时间点减去异常的第一个时间点)+1”计算。对于不具有那个子宫炎变量的异常记分的时点的动物, 将异常记分的持续时间设定为零。对于在那个子宫炎变量的最后一个预定数据收集时间点之前从研究中去掉的动物, 异常记分的持续时间以“(数据收集的最后一个预定时间点减去异常的第一个时间点)+1”计算。对异常记分 (对于每个子宫炎变量) 的持续时间进行对数变换, 并且然后用广义线性混合模型分析, 这个模型具有固定效应: 处理, 和随机效应: 剩余。在测试显著 ($P \leq 0.10$) 的处理效应之后在先验的对比中使用参数估算值的线性组合。在处理之间进行比较。对于每个处理组从获自分析的最小二乘参数估算值计算反变换最小二乘均数、其标准误差以及其90%置信区间。

[0338] 对于每只动物确定异常记分 (对于每个子宫炎变量) 的天数比例以及正常大肠杆菌与化脓隐秘杆菌不存在于排出物中 (不存在被视为值 $\leq 1+$) 的天数比例。然后在分析之前使用反正弦平方根变换对每一者进行变换。然后用广义线性混合模型各自分析这些变换的天数比例变量, 这个模型具有固定效应: 处理, 和随机效应: 剩余。在测试显著 ($P \leq 0.10$) 的处理效应之后在先验的对比中使用参数估算值的线性组合。在处理之间进行比较。对于每个处理组从获自分析的最小二乘参数估算值计算反变换最小二乘均数、其标准误差以及其90%置信区间。通过处理在每个时间点总结动物是否存在大肠杆菌 (存在被视为值 $>1+$)、存在化脓隐秘杆菌 (存在被视为值 $>1+$)、以及存在大肠杆菌与化脓隐秘杆菌 (存在被视为值 $>1+$) 的频率分布。

[0339] 结果. 通过ELISA, 测量血清IgG水平来评价对溶血素的抗体反应。以最小二乘均数 (LSM) 滴度呈现的结果 (表11) 指示, 在研究第28天、第49天以及第77天, 在T02和T03的母牛中的滴度相对T01显著更高。结果还表明, 在组T02与T03的滴度之间不存在统计显著差异。关于也通过ELISA评价的子宫中的抗体滴度, 结果 (表12) 展示, 第49天和第77天在T02和T03内的母牛中的滴度相对在相同天数在T01中的那些滴度显著更高。对于溶血抑制抗体, 表13中的结果指示, 在研究第49天和第77天, T02中的动物具有比组T01和T03中的那些滴度显著更高的滴度。

表11.

血清 IgG 滴度 S:P 比率的 LSM ¹				
	第 0 天	第 28 天	第 49 天	第 77 天
T01	0.250 ^a	0.197 ^a	0.178 ^a	0.366 ^a
T02	0.226 ^a	0.645 ^b	0.782 ^b	0.820 ^b
T03	0.224 ^a	0.626 ^b	0.725 ^b	0.746 ^b

¹不同上标代表组之间的显著差异。

表12.

子宫中的 IgG 抗 PLO 的 LSM ¹		
	第 49 天	第 77 天
T01	0.033 ^a	0.120 ^a
T02	0.433 ^b	0.353 ^b
T03	0.444 ^b	0.382 ^b

¹不同上标代表组之间的显著差异。

表13.

血清中的 HI 抗体 S:P 比率的 LSM ¹				
	第 0 天	第 28 天	第 49 天	第 77 天
T01	0.09 ^a	0.10 ^a	0.11 ^a	0.12 ^a
T02	0.08 ^a	0.78 ^b	2.75 ^c	1.12 ^c
T03	0.09 ^a	0.77 ^b	2.13 ^b	0.84 ^b

¹不同上标代表组之间的显著差异。

[0340] 关于所评价的主要变量,粘液脓性子宫/阴道排出物水平(阴道排出物记分,或 VDS),当测量子宫炎的持续时间时,如在用细菌攻击之后第7天和第10天测量,其在组T02中相对组T01和T03显著更短(表14、15)。

表14.

	子宫炎 (VDS ≥ 2) 的持续时间; LSM ¹	
	第 1 周 (第 50 天至第 56 天)	攻击第 0 天至第 10 天
T01	4.2 ^a	7.1 ^a
T02 n-PLO	2.2 ^b	4.2 ^b
T03 r-PLO	4.3 ^{a,c}	7.4 ^{a,c}

¹不同上标代表组之间的显著差异。

表15.

	P 值; 前 7 天	P 值; 前 10 天	处理差异
T01 相对 T02	0.0096	0.0276	是
T01 相对 T03	0.8658	0.6962	否
T02 相对 T03	0.0063	0.0109	是

[0341] 对于在攻击之后10天内子宫炎明显(即, $VDS \geq 2$)的天数%(表16和17),显而易见的是,组T02与组T01和T03相比具有更少的异常天数。而且,展示了化脓隐秘杆菌从组T03的母牛中最频繁地分离(数据未示出)。因此,疫苗效果在组T02(原生溶血素+TX0)中最突出。

表16.

	正常天数%	
	第 1 周	攻击第 0 天至第 10 天
T01	$70 \pm 6.7\%$	$75 \pm 6.1\%$ (25%)
T02	$44.3 \pm 10.4\%$	$53.1 \pm 9.7\%$ (46.9%)
T03	$67.2 \pm 6.4\%$	$73.4 \pm 5.7\%$ (26.6%)

表17.

	P 值; 前 7 天	P 值; 前 10 天
T01 相对 T02	0.0472	0.0594
T01 相对 T03	0.7712	0.8204
T02 相对 T03	0.0699	0.0790

[0342] 进行额外的研究以评估新颖佐剂配方中的实验性子宫炎疫苗在怀孕奶牛中的功效。在这项研究中,在干乳期期间对怀孕母牛接种疫苗。在产犊(分娩)之后前10天期间测量功效。

[0343] 选择处于第1至第3泌乳期的怀孕荷斯坦或荷斯坦杂交母牛用于研究。所有选择的母牛都处于整体良好的健康状况下,没有先前的子宫炎病史,并且具有已知的预期产犊日期。这些母牛也没有任何并发疾病,并且在接种疫苗之前和之后的七(7)天期间不接受任何化学疗法、全身抗生素或其它消炎药物。去除在研究期间的任何时间发展临床显著的并存疾病的动物。在研究的过程中,在每个24小时时段中动物已经随意获取饲料至少20小时,只有在挤奶期间除外。在整个研究中动物也已经随意获取水。

[0344] 施用于组(n=15/组)的疫苗如下:T01中的动物接受2ml由盐水组成的疫苗;T02中的那些接受2ml由ISCOMS/多聚I:C+nPL0组成的疫苗;T03中的那些接受2ml由TX0+nPL0组成的疫苗;T04中的那些接受2ml由TX0+大肠杆菌+化脓隐秘杆菌+nPL0组成的疫苗。(所有疫苗抗原都经过福尔马林灭活。)

[0345] 在到达之后,使动物适应7天。在产犊(研究第0天)之前约2个月,动物在颈部的左侧皮下接受首次接种疫苗,除了组T02中的动物鼻内接受疫苗(表18)。二十八天后,所有动物在颈部的右侧皮下接受二次接种疫苗(表18)。从首次接种疫苗开始,使所有母牛不产乳。

表18.

组	动物数	处理	天	途径
T01	15	盐水	0、28	SC、SC
T02	15	ISC + 溶血素 (PLO)	0、28	IN、SC
T03	15	TXO + 溶血素 (PLO)	0、28	SC、SC
T04	15	TXO + 大肠杆菌 + 化脓隐秘杆菌 + 溶血素 (PLO)	0、28	SC、SC

[0346] 在产犊当天开始并且之后持续21天,评价子宫/阴道排出物的存在,并且如果存在的话,收集并指定记分,其中记分 ≥ 2 指示子宫炎的存在。收集约30mL血液(研究第0天、第28天以及第49天),用于通过ELISA确定对大肠杆菌、化脓隐秘杆菌以及溶血素的抗体反应。并未以其它方式作为程序数据收集的一部分捕获的任何不良反应有文献记载。

[0347] 主要变量是粘液脓性子宫/阴道排出物的存在;记分 ≥ 2 将指示子宫炎的存在。如果只有T01母牛发展临床子宫炎,或如果粘液脓性阴道排出物(记分 ≥ 2)的持续时间与对照相比显著更短($p < 0.1$),那么处理被视为有效的。如果存在的话,那么在分娩后收集粘液脓性排出物。

[0348] 在每个时间点在处理之间进行比较。从获自分析的最小二乘参数估算值计算最小二乘均数(对于血清学数据进行反变换)、其标准误差以及其90%置信区间。在每个时间点对于每个处理组计算具有数据的动物的范围和数目。

[0349] 在每个时间点对于每只动物总结所收集的子宫炎数据(阴道/子宫排出物存在,是/否;阴道/子宫排出物记分;临床征象),并且用于确定在每个时间点对于每个处理的每种类别的频率分布。通过处理和时间点来总结动物对于每个子宫炎征象(例如,阴道/子宫排出物记分)是正常还是异常(正常是记分=0或1;异常是记分 ≥ 2)的频率分布。通过处理来总结动物是否曾经具有异常(记分 ≥ 2)子宫排出物记分,并且使用具有二项式误差分布和罗吉连结函数的广义线性混合模型(Proc Glimmix)分析。统计模型包括处理的固定效应和批次的随机效应以及批次内的区块。在处理组之间进行对比(这针对这一段中所描述的每个子宫炎变量进行重复)。如果Proc Glimmix对于子宫炎变量并不收敛,那么替代地利用费氏精确检验来比较处理组。

[0350] 对于每只动物确定异常记分(对于每个子宫炎变量)的持续时间,并且以“(异常的最后一个时间点减去异常的第一个时间点)+1”计算。对于不具有那个子宫炎变量的异常记分的时点的动物,将异常记分的持续时间设定为零。对于在那个子宫炎变量的最后一个预定数据收集时间点之前从研究中去除的动物,异常记分的持续时间以“(数据收集的最后一个预定时间点减去异常的第一个时间点)+1”计算。用广义线性混合模型分析异常记分的持续时间,这个模型具有固定效应:处理,和随机效应:批次、批次内的区块、以及剩余。在测试显著($P \leq 0.10$)的处理效应之后在先验的对比中使用参数估算值的线性组合。在处理之间进行比较。对于每个处理组从获自分析的最小二乘参数估算值计算最小二乘均数、其标准误差以及其90%置信区间。

[0351] 结果.从研究中去掉产下双胞胎的所有母牛,因为这样的情况使母牛易患上子宫炎,并且可能使数据扭曲。去掉的母牛包括来自对照组T01的6只、各自来自组T02和T03的2只、以及来自组T04的1只。在每个组中的剩余母牛当中,计算子宫炎的发生率和子宫炎的估算天数。如表19中可见,组T03和T04中子宫炎的发生率与其它组相比在数值上更低。数据还指示,组T03和T04在分娩之后前10天中比组T01和T02中的动物具有更短的子宫炎持续时间。因此,可以推断,单独或与大肠杆菌和化脓隐秘杆菌菌苗组合的原生溶血素当用TX0辅助时,有效降低牛中天然子宫炎的发生率。

表19.

组 (动物数)	子宫炎发生率 (%)	估算天数 LSM	下 90% CI	上 90% CI
T01 (8)	100	5.2	3.6	17.3
T02 (13)	100	6.7	5.1	8.7
T03 (13)	84.6	3.7	2.1	6.2
T04 (14)	78.6	3.5	2.0	5.7

实施例5.牛中的乳腺炎疫苗

[0352] 大肠杆菌菌苗J-5是用于治疗乳腺炎的已知抗原。在这项研究中,已经评估与J-5菌苗组合的不同佐剂的抗乳腺炎作用。

[0353] 研究设计总结于表20中。产犊大约在第49天发生。第0天、第7天、第28天、第35天、第49天、第63天、第70天以及第84天获取血液和乳奶的样品。第70天攻击母牛。

表20.

处理组	动物数	处理	天	剂量	剂量单位	途径
T01	20	盐水	0、28	5.0	mL	SC
T02	20	大肠杆菌菌苗 J-5 菌株 (ENVIROCOR®)	0、28	5.0	mL	SC
T03	20	大肠杆菌 TXO	0、28	5.0	mL	SC

处理组	动物数	处理	天	剂量	剂量单位	途径
T04	20	大肠杆菌 VACCIMAX®-CpG	0	2.0	mL	SC
T05	20	大肠杆菌 VACCIMAX®-多聚 I:C	0	2.0	mL	SC

[0354] 在组T01-T06中由大肠杆菌引起的感染的持续时间如下:T01-252.1小时、T02-213小时、T03-191.6小时、T04-190.2小时、T05-198.7小时。使用VACCIMAX®的处理提供最短的感染持续时间。VACCIMAX®是包含复层脂质体的水包油乳液,其中抗原包裹于脂质体的双层之间。

[0355] 处理的保护作用也通过确定分层缓和分数来评价。分层缓和分数越高,保护作用

越大。此外,使用VACCIMAX[®]的配方具有最大作用(超过对照13.95-17.19倍),但使用TX0的处理也是有效的(超过对照6.24倍)。

[0356] 使用间接捕获ELISA测量全细胞血清J-5特异性IgG总抗体反应。结果总结于表21和22中。

表21

对比	分层缓和分数	90%置信区间
T01相对T02	2.1	-14.9至33.3
T01相对T03	13.1	-15.4至62.9
T01相对T04	30.5	6.4至47.9
T01相对T05	36.1	7.6至68

表22

	时间点				
	时段0	时段1	时段2	时段3	时段4
T01	4996 ^a	6787 ^a	4457 ^a	4049 ^a	16303 ^a
T02	4425 ^a	15106 ^b	12498 ^{bc}	20281 ^c	51040 ^c
T03	4815 ^a	27806 ^c	28982 ^d	27612 ^c	49968 ^c
T04	3465 ^a	17969 ^{bc}	7495 ^{ab}	6318 ^{ab}	22010 ^{ab}
T05	4477 ^a	18012 ^{bc}	18404 ^{cd}	7805 ^b	17626 ^{ab}

时段0=在首次接种疫苗时,1=第28天,2=第49天,3=在攻击之前,4=在攻击结束时。在每个时间点内具有相同字母的处理组在 $\alpha=0.10$ 下没有显著差异。

实施例6:犬新孢子虫疫苗。

[0357] 犬新孢子虫是在1988年鉴别为物种的球虫寄生虫。其为受感染的牲畜自发流产的重要原因。除了是牛流产的重要原因以外,新孢子虫病是遍及全世界的犬的重大疾病。如果这种疾病及早发现,那么可以用克林霉素(clindamycin)和其它抗原生动物药成功地治疗犬。然而,这种疾病通常对幼犬是致命的。已经对牛测试预防性疫苗。灭活的疫苗是可商购的,但具有混合的结果。使用减弱的犬新孢子虫(*N.caninum*)速殖子的活疫苗已经更加成功,但生产很昂贵。在这项研究中,发明者确定不同佐剂对使用犬新孢子虫亲环蛋白(cyclophilin)(NcCYP)和前纤维蛋白(profilin)(NcPro)作为抗原的针对犬新孢子虫的疫苗的特性的影响。

[0358] 8至10周大的雌性BALB/c小鼠用于这个实验。以3周时间间隔,使用rNcCyP和rNcProf在指定佐剂存在下使所有动物免疫两次。在二次免疫之后三周,对所有动物施以无痛致死术并且收集脾和血液。使用增殖试验(3至4天)测定NcCyP/NcProf特异性脾细胞增殖反应。通过用新孢子虫抗原刺激脾细胞48小时来测定NcCyP/NcProf特异性脾细胞细胞因子反应,并且通过细胞因子特异性ELISA来测定上清液中的细胞因子水平。通过ELISA测定血清抗体水平。如表23中所总结来处理动物。

表23

处理	佐剂	量 (制备成 2 ml 剂量并且每个小鼠剂量使用 2 ml 的 1/10)	抗原 (犬新孢子虫亲环蛋白 (NcCyP))	一次施用于小鼠的量, μ l
T01	QCDCRT	Quil-A (250 μ g/2 ml)、胆固醇 (250 μ g/2 ml)、DDA (100 μ g/2 ml)、Carbopol (0.075% v/v/2 ml)、R1005 (1,000 μ g/2 ml)、CpG (SEQ ID NO: 8; 250 μ g/2 ml)	(100 μ g/2 ml 剂量)	100
T02	TXO	CpG (SEQ ID NO: 8; 250 μ g/2 ml)、DEAE-葡聚糖 (100 mg/2 ml)、矿物油 (50% v/v/2 ml)、SPAN (1.5% v/v/2 ml)、TWEEN 80 (7% v/v/2 ml)	NcCyP (100 μ g/2 ml 剂量)	100
T03	TCMO	CpG (SEQ ID NO: 8; 250 μ g/2 ml)、矿物油 (50% v/v/2 ml)、SPAN (1.5% v/v/2 ml)、TWEEN 80 (7% v/v/2 ml)、MPLA (25 μ g/2 ml)	NcCyP (100 μ g/2 ml 剂量)	100
T04	QCDCRT c	Quil-A (250 μ g/2 ml)、胆固醇 (250 μ g/2 ml)、DDA (100 μ g/2 ml)、Carbopol (0.075% v/v/2 ml)、R1005 (1,000 μ g/2 ml), 其中“Tc”= 嵌合 ODN/ORN SEQ	NcCyP (100 μ g/2 ml 剂量)	100
		ID NO: 14 (250 μ g/2 ml)		
T05	ISCX	ISC = ISCOM(100 μ g/2 ml)、DEAE-葡聚糖(100 mg/2 ml)	NcCyP (100 μ g/2 ml 剂量)	100
T06	阴性对照	生理盐水	N/A	N/A

[0359] 上述处理组的特性总结于表24中。

表24

	脾细胞的刺激 指数 (平均值 +/-SEM)	由脾细胞产生的 IFN γ (pg/ml) (平均值 +/-SEM)	在 1:16000 下 总 IgG 的 OD (平均值 +/-SEM)	在 1:2000 下 IgG2a 的 OD (平均值 +/-SEM)	在 1:2000 下 IgG1 的 OD (平均值 +/-SEM)
T01 (QCD CRT)	8.0+/-7.0	23.0+/-15.3	0.2076+/-0.05 47	0.6155+/-0.264	0.3823+/-0.03 145
T02 (TXO)	62.9+/-59.0	680.5+/-446.7	0.279+/-0.068 55	0.6742+/-0.192	0.7675+/-0.08 285
T03 (TCMO)	92.1+/-46.4	961.5+/-205.5	0.2722+/-0.05 81	0.6217+/-0.339 3	0.972+/-0.199 359048
T04 (QCD CRT _c)	2.2+/-0.9	18.1+/-15.0	0.10780+/- 0.01125	0.2584+/-0.033 15	0.4404+/-0.06 93
T05 (ISCX)	5.4+/-3.6	84.4+/-49.4	0.1313+/-0.01 8	0.2255+/-0.020 6	0.6486+/-0.23 585
T06 (对照)	1+/-2	12.0+/-7.3	0.0778+/-0.00 33	0.18127+/-0.00 959	0.22+/-0.012

[0360] 总之,这些数据展示使用TXO和TCMO获得的优良结果。

实施例7.不同佐剂对流产嗜衣原体生殖道感染的免疫反应的作用

[0361] 流产嗜衣原体是导致绵羊和山羊流产的胞内菌。感染一般在天然母羊暴露于流产的物质(例如,胎盘、流体、胎儿)期间发生。细菌潜伏于受感染的母羊中直至育种,并且在怀孕中期或后期,其存在于胎盘中并且甚至尽管有抗体反应仍导致坏死性胎盘炎。在流产之后,母羊通常对再感染免疫。

[0362] 据信,在暴露之前接种疫苗可能是有益的,这是因为其防止初始感染并且防止细菌定居于胎盘。与流产后免疫性中的抗体反应相关的较高IFN γ 是保护的关键关联点。IFN γ 也可能与非怀孕的母羊中所见的持续性相关。

[0363] 第0天和第28天对母羊接种疫苗并且第49天进行攻击。第63天将动物处死并且进行尸检。第0天,获取阴道和全血样品用于qPCR。每周对血液采样以获得血清学结果并且第7天、第28天以及第35天对血液采样用于细胞因子和Elispot测量。

[0364] 处理组呈现于表25中。

表25

组	佐剂	组成
A	TCMYO	CpG (SEQ ID NO: 8, 100 微克/剂)、胆固醇 (100 微克/剂)、MPLA (100 微克/剂)、多聚 I:C (50 微克/剂), 用具有 6.3% SPAN [®] 80 的 45%矿物油以及具有 TWEEN [®] 80(1.45%) 和水的 QS 增稠
B	TCXMO	CpG (SEQ ID NO: 8, 100 微克/剂)、胆固醇 (100 微克/剂)、MPLA (100 微克/剂)、DEAE-葡聚糖 (100 毫克/剂), 用具有 6.3% SPAN [®] 80 的 45%矿物油以及具有 TWEEN [®] 80 (1.45%) 和水的 QS 增稠
C	TCMO	CpG (SEQ ID NO: 8, 100 微克/剂)、胆固醇 (100 微克/剂)、MPLA (100 微克/剂), 用具有 6.3% SPAN [®] 80 的 45%矿物油以及具有 TWEEN [®] 80 (1.45%) 和水的 QS 增稠
D	无佐剂 (盐水)	生理盐水
E	未接种疫苗	N/A
F	未感染或接种疫苗	N/A

[0365] 从流产的胎羊肾制备抗原并且在McCoy细胞上繁殖。通过离心和超声处理纯化原粒体。将抗原以100微克/剂固定于含0.1%甲醛的0.9%氯化钠中用于接种疫苗。

表26

组	以下天数的平均OD:								
	0	7	14	28	35	42	49	56	63
A	0.055	0.090	0.060	0.192	0.266	0.374	0.314	0.315	0.395
B	0.015	0.052	0.073	0.137	0.204	0.234	0.234	0.364	0.460
C	0.057	0.075	0.065	0.217	0.347	0.494	0.481	0.487	0.584
D	0.040	0.079	0.074	0.034	0.079	0.078	0.074	0.044	0.109
E	0.042	0.082	0.056	0.022	0.038	0.032	0.039	0.008	0.170
F	0.051	0.095	0.055	0.016	0.033	0.029	0.038	0.015	0.033

[0366] 使用Chek-it ELISA试剂盒获得血清学结果并且总结于上表26中。

[0367] 测定用衣原体AG刺激的绵羊PMBC中的IFN γ 、IL-2以及IL-4表达水平。结果在表27中。

表27: 用衣原体AG刺激的绵羊PMBC中的IFN γ 、IL-2以及IL-4表达水平

组	IFN γ			IL-2			IL-4		
	第 7 天	第 28 天	第 35 天	第 7 天	第 28 天	第 35 天	第 7 天	第 28 天	第 35 天
A	18.08	4.20	10.77	4.79	7.62	8.53	3.26	3.01	1.53
B	1.67	2.05	2.52	4.08	7.35	5.63	2.26	1.12	3.24
C	1.39	1.77	2.61	1.18	1.78	8.09	1.48	0.94	1.09
D	1.58	4.58	2.70	0.87	2.73	3.27	0.64	1.27	1.24
E	2.52	2.42	2.14	2.53	1.95	1.68	1.44	1.38	1.35
F	0.83	1.20	2.05	0.74	3.13	3.71	1.91	2.11	1.47

[0368] 绵羊PBMC对流产衣原体 (Chlamydia abortus) 抗原的反应总结于表28中。

表28:绵羊PBMC对流产衣原体抗原的反应

组	平均 SFC $\times 10^6$ 细胞			倍数增加		
	第 0 天	第 28 天	第 35 天	第 0 天	第 28 天	第 35 天
A	20.5	50.0	97.0	1.0	12.1	19.5
B	7.5	38.0	14.0	1.0	26.8	14.0
C	1.0	13.0	33.5	1.0	12.8	28.8
D	31.0	49.5	33.5	1.0	33.8	33.8
E	15.5	19.5	6.0	1.0	2.3	0.7
F	10.0	7.0	6.0	1.0	0.8	0.4

[0369] 另外,分析白血细胞的量(数据未示出)。双因素ANOVA指示,组F具有比组A和B显著更高的WBC量并且组E具有比组B显著更高的WBC量。

[0370] 还分析在注射时间的结节。如预期,组A-C具有比组C-D更大的结节。在所用的三种佐剂(组A-C)当中,组C具有最大的结节大小,接着是组B,接着是组A。

[0371] 测定结节的体积。又,组A-C具有比组D-F更大的结节体积。在组A-C当中,组A具有最小体积。组A和B中的结节具有更多出血和/或坏死组织。组C中的结节具有更多纤维化。细胞特征在所有三种结节中是类似的,不过组C可能具有更多淋巴细胞组分。

实施例8.添加铝至TX0中得到改善的稳定性

[0372] 当前的TX0掺合物配方含有50mg/ml DEAE葡聚糖。葡聚糖当以高浓度存在于皮下注射液中时,可以引起动物中的注射部位反应。因此,提出尝试DEAE葡聚糖的不同浓度以检查在不使疫苗配方的稳定性受损的情况下是否可以获得安全性和良好的治疗价值。

[0373] 表征和稳定性测试是重要的,因为其告知我们这种疫苗是否可以一致地并且以良好的制造贮存期配制。在一定范围的剪切速率下进行粘度测试以查看剪切稀化(随着剪切速率上升,表观粘度下降)或剪切稠化(随着剪切速率上升,表观粘度增大),其为非牛顿流体(Non-Newtonian fluid)的流动特征。进行注射力测试以确保疫苗将容易引出并且容易在实地施用大量的剂量。

[0374] 因为免疫刺激寡核苷酸不预期改变配方的稳定性,所以在这个实施例中不将其添加至佐剂混合物中。配制不同REHYDRAGEL[®] (5%至16%)和DEAE葡聚糖(50mg/ml至10mg/ml)浓度的AX0(铝+葡聚糖+油)掺合物,使用X0(葡聚糖+油)掺合物作为对照测试粘度、注射力以及沉降。所测试的组合物如下:

[0375] 将约10ml样品填充至五个15-ml Corning离心管中的每一者中并且静置一周以观测由于管的窄尺寸和锥形底对乳液的加速沉降效应。还测试样品的可注射性和粘度。结果如下所示。

表29

LOT	水相				有机相	
	DEAE 葡聚糖	REHYDRAGEL [®] 2% w/v Al ₂ O ₃	TWEEN80	10 mM PBS	矿物油	SPAN 80
124008-65	50 mg/ml	0	1.45% v/v	足量	45% v/v	6.3% v/v
124008-95	50 mg/ml	5% v/v	1.45% v/v	足量	45% v/v	6.3% v/v
124008-83	20 mg/ml	10% v/v	1.45% v/v	足量	45% v/v	6.3% v/v
124008-89	10 mg/ml	16% v/v	1.45% v/v	足量	45% v/v	6.3% v/v

[0376] 这些数据指示,在离心管中经历加速沉降后,具有16% REHYDRAGEL[®]的掺合物是最稳定的。此外,从发明者的先前工作获知,较高的DEAE葡聚糖浓度与较高的粘度和可能的剪切稀化相关。这些实验的结果指示,REHYDRAGEL[®]的添加更多地补偿由DEAE葡聚糖提供的剪切稀化(假塑性)特性的预计损失。还观测到,即使16% REHYDRAGEL[®]配方具有更高的注射力,其也不会明显地更难注射(水的注射力是3N)。

表30

批号	粘度(cP)	注射力(牛顿)	沉降观测(第7天)
124008-65	180	6.5	在顶部观测到水相的薄层
124008-95	160	6.5	观测到稍有沉降
124008-83	180	6.5	在顶部观测到水相的薄层
124008-89	180	7.5	未观测到沉降

[0377] 从整体数据显而易见,具有16% REHYDRAGEL[®]和10mg/ml DEAE葡聚糖的掺合物用于疫苗配方是最佳的,特别是需要结合游离内毒素的那些和/或在可能需要更长的乳液贮存期的情况下。

实施例9. BRV、BCV以及大肠杆菌抗原

[0378] 在这个实施例中,发明者研究本发明的佐剂在针对肠炎的疫苗中的用途。肠炎由细菌、病毒和/或寄生虫感染引起。牛,特别是新生奶牛犊和肉牛犊易染上犊牛白痢,因为其在生命的前几个小时期间当其免疫系统未完全发育时经受许多应激。因犊牛白痢所致的流体损失导致脱水并且常常导致死亡。存活于犊牛白痢的动物在其整个生命中常常持续虚弱并且表现不良。与白痢相关的作用物包括细菌,特别是大肠杆菌K99和F41;以及病毒,诸如牛冠状病毒(BCV)和牛轮状病毒(BRV)。

[0379] 十个月大的荷斯坦肥育牛用于这项研究中。动物对于大肠杆菌(K99和F41)、BRV(B223和Lincoln)以及BCV呈血清阴性或是低滴度的。

[0380] 处理组如下:

表31

组	N	抗原	佐剂	每剂的量	Rt	体积 (ml)
T01	10	盐水	N/A		SQ	2
T02	10	ROTAVEC [®] (大 肠杆菌 K99、 BRV G6 以及	矿物油+明矾	NA (商业产品)	IM	2
		BCV)				
T03	10	大 肠 杆 菌 K99/F41、BRV G6/G10、BCV (全部灭活)	Quil A + 胆固醇 + REHYDRAGEL [®] (15% v/v、2% Al ₂ O ₃ w/v) + CpG (SEQ ID NO: 8)	Quil-A (500 µg/2.5 ml 剂量)、胆固醇 (200 µg/2.5 ml 剂量)、 REHYDRAGEL [®] (15% v/v)、CpG (100 µg/2.5 ml 剂量)	SQ	2.5
T04	10		Quil A + 胆固醇 + REHYDRAGEL [®] (15% v/v、2% Al ₂ O ₃ w/v) + CpG (SEQ ID NO: 8) + AMPHIGEN [®]	Quil-A (500 µg/2.5 ml 剂量)、胆固醇 (200 µg/2.5 ml 剂量)、 REHYDRAGEL [®] (15% v/v)、CpG (100 µg/2.5 ml 剂量)、Amphigen (2.5% v/v)	SQ	2.5
T05	10		TXO + REHYDRAGEL [®] (15% v/v、2% Al ₂ O ₃ w/v)	CpG (100 µg/5 ml 剂 量)、DEAE-葡聚糖(100 mg/5 ml 剂量)、矿物油 (45% v/v)、Span (6.3%)、Tween(1.45% v/v)	SQ	5
T06	10		TO + REHYDRAGEL [®] (15% v/v、2% Al ₂ O ₃ w/v)	CpG (100 µg/5 ml 剂 量)、矿物油(45% v/v)、 Span (6.3%)、Tween (1.45% v/v)、 REHYDRAGEL [®] (15%)	SQ	5

[0381] 每21天收集血液样品持续六个月用于血清学。第0天(接种疫苗前)、第1天、第2天、第3天、第7天、第14天、第21天以及此后每21天测量注射部位反应。通过定量所选天数的抗体滴度来测量对大肠杆菌K96、大肠杆菌F41、BRV Lincoln、BRV B223以及BCV的反应。结果总结如下(不同字母指示在 $\alpha=0.1$ 下的差异)：

表32

	针对病毒的平均几何滴度 (LSM)								
	BRV G6 (Lincoln), 目标滴度> 1255			BRV G10 (B223), 目标滴度> 1472			BCV, 目标滴度> 1107		
	第 0 天	第 21 天	第 189 天	第 0 天	第 21 天	第 189 天	第 0 天	第 21 天	第 189 天
T01	142.1 ^b	208.1 ^a	152.3 ^a	430.5 ^a	512.1 ^a	588.5 ^a	238.9 ^a	430.6 ^a	548.8 ^a
T02	129.2 ^b	750.5 ^b	349.9 ^b	530.1 ^a	1024.2 ^b	675.7 ^{ab}	349.8 ^b	5997.1 ^b	1398.9 ^b
T03	140.2 ^b	3649.6 ^c	533.9 ^b	532.2 ^a	2681.9 ^c	985.6 ^{ab}	348.4 ^{ab}	7299.1 ^{bc}	1106.1 ^b
T04	91.4 ^{ab}	3128.8 ^c	575.0 ^b	492.7 ^a	3511.8 ^{cd}	1064.3 ^b	298.8 ^{ab}	7023.0 ^{bc}	1448.3 ^b
T05	81.8 ^{ab}	4705.6 ^c	1498.9 ^c	494.6 ^a	9089.6 ^c	2998.6 ^c	326.3 ^{ab}	10085.5 ^c	2521.6 ^c
T06	39.1 ^a	2682.1 ^c	4706.4 ^d	456.2 ^a	6020.2 ^{de}	4683.8 ^c	237.2 ^a	9556.2 ^c	2298.9 ^c

[0382] 处理T05和T06从第21天直至研究结束(第189天)得到最高的抗体滴度。明显地,商业疫苗(ROTAVEC[®])在诱导针对肠炎的病毒组分的抗体方面表现不如T05和T06一样好。

表33

组	抗大肠杆菌的平均几何滴度							
	大肠杆菌 K99 纤毛抗原 (目标> 742)				大肠杆菌 F41 纤毛抗原 (目标未确定)			
	第 0 天	第 21 天	第 106 天	第 189 天	第 0 天	第 21 天	第 106 天	第 189 天
T01	35 ^a	36 ^a	82 ^a	44 ^a	187 ^a	152 ^a	142 ^a	66 ^a
T02	41 ^a	349 ^b	4386 ^c	2986 ^c	152 ^a	12801 ^c	6970 ^d	4223 ^c
T03	43 ^a	588 ^{bc}	686 ^b	467 ^b	200 ^a	3200 ^b	467 ^b	200 ^b
T04	50 ^a	588 ^{bc}	1089 ^b	686 ^b	147 ^a	3734 ^b	800 ^b	400 ^{cd}
T05	50 ^a	1056 ^d	3200 ^c	2986 ^c	264 ^a	12801 ^c	1600 ^c	607 ^d
T06	54 ^a	864 ^{cd}	3456 ^c	1601 ^c	216 ^a	1600 ^b	800 ^b	234 ^{bc}

[0383] 处理T02和T05-T06在引起针对K 99的反应方面类似地表现很好。处理T02引起对大肠杆菌F41的最佳反应。处理T05在引起对那种抗原的反应方面是第二有效的。

[0384] 总之,这些数据展示,T05和T06似乎是最有前景的配方。两者直至第189天已经递送多个部分的目标IgG反应。T05与T06通过SQ施用与ROTAVEC[®] (T02, IM) 相比似乎提供优良或等效的血清学功效。T03和T04保持升高的血清学滴度持续比T05和T06更短的持续时间。使用单次剂量的接种疫苗,T03、T04、T05以及T06递送高于目标水平的BRV G6、BRV G10以及BCV的血清滴度。使用单次剂量的接种疫苗,T04、T05以及T06递送高于目标水平的大肠杆菌K99的血清滴度。T04、T05以及T06保持高于目标水平的抗病毒血清滴度持续6个月。T05和T06保持高于目标水平的抗大肠杆菌K99血清滴度持续6个月。所评估的所有配方在荷斯坦肥育牛中已经展示足够的安全性。

[0385] 第0天、第1天、第2天以及第3天测量直肠温度。虽然组T01(对照)与组T02-T06之间存在统计显著差异,但温度的差异(LSM)不大(在1°F内)。

表34

*	第000天	第001天	第002天	第003天
---	-------	-------	-------	-------

T01	101.1 ^a (38.4)	102.2 ^{ab} (39.0)	102.0 ^a (38.9)	102.3 ^b (39.1)
T02	101.7 ^b (38.7)	102.6 ^{abc} (39.2)	102.2 ^{ab} (39.0)	101.8 ^a (38.8)
T03	101.8 ^b (38.8)	102.7 ^{bc} (39.3)	102.2 ^{ab} (39.0)	101.9 ^a (38.8)
T04	101.3 ^{ab} (38.5)	102.8 ^c (39.3)	102.0 ^a (38.9)	102.0 ^{ab} (38.9)
T05	101.7 ^b (38.7)	102.3 ^{abc} (39.1)	102.5 ^b (39.2)	102.4 ^b (39.1)
T06	101.6 ^{ab} (38.7)	102.1 ^a (38.9)	102.4 ^b (39.1)	102.1 ^{ab} (38.9)

[0386] 在怀孕奶牛中配方的初步测试已经展示安全性。测试组T01、T03以及T05,每个组中5只母牛。15只母牛中的13只已经产犊,12只牛犊是正常的,一只死胎。

实施例10.抗蜱疫苗.

实验设计

[0387] 测试基于Bm86抗原的两种疫苗配方。如下文所总结,一种配方含有水性佐剂(QCDCRT)并且另一种含有油基佐剂(TXO)。

表35

组	抗原	佐剂 (80%体积)	成分的量
T01	N/A	无	N/A
T02	微小扇头蜱(原称为牛蜱) 纯化rBm86蛋白(储备液, 1.16 mg/ml)	QCDCRT	250 µg Quil-A、250 µg胆固醇、100 µg DDA、0.0375% Carbopol、1,000 µg R1005、100 µg SEQ ID NO: 8
T03		TXO	含100 µg SEQ ID NO: 8/100 mg DEAE-葡聚糖的矿物油(45%)、SPAN [®] 80 (6%) 以及TWEEN [®] 80 (1.45%)

[0388] 因为佐剂如上文所描述以80%体积使用,所以施用于组T03的疫苗组合物的一个剂量含有100µg SEQ ID NO:8/100mg DEAE-葡聚糖、36%v/v矿物油、4.8%v/vSPAN[®]80以及1.16%v/vTWEEN[®]80。因为QCDCRT中不存在油,所以成分的浓度与表35中相同。

[0389] 将二十四只牛犊随机分配至三个处理组之一中,每组八只牛犊。用2cc的两种Bm86+佐剂配方之一或盐水(对照组)对每个处理组的牛犊个别地接种疫苗。接种疫苗在第0天和第28天发生。第41天将牛置于拴牛栏中,并且第42天用250mg具环方头蜱(R.annulatus)幼虫感染。这项研究中所用的蜱最初从德克萨斯州巴尔韦德县(Val Verde County,Texas)的大牧场收集。第63天至第84天,每天从个别的牛犊收集所有脱离的饱血雌成虫。第85天从拴牛栏移走牛犊。对收集的蜱进行计数,并且在每天收集时将来自每只牛犊的至多10个蜱称重并置于环境室中持续13天。在收集之后14天弃去已产卵的雌虫并且将所产生的卵块称重。在首次孵化之后十四天,记录孵化和完整卵的数目并且计算孵化百分比的测定值。在用疫苗每次注射之前并且在注射后持续后三天,对每只牛犊监测注射部位的肿块,并且获取直肠温度。第-7天、第0天、第14天、第28天、第42天以及第85天从每只牛犊收集血清用于测定在整个研究中如通过ELISA测定的Bm86抗体滴度。

结果

[0390] 初步结果显示分别来自T02和T03配方的98.6%和99.6%控制,这显著高于T01。这些控制百分比计算只将饱血雌虫和卵块重量的减小考虑在内。在稍后的日期将测定孵化百分比的减小并且添加至最终结果中。在研究中24只牛犊之一在每次注射(含有油佐剂的配

方)之后产生小肿块。肿块长度小于10cm并且深度小于3cm。肿块是软的并且似乎不使动物疼痛。在整个研究中来自处理的动物的直肠温度没有增加。

[0391] 血清学结果展示在相应的时间点在处理中的每一者之间的统计显著差异,除了在14天的时间点在使用QCDCRT与TX0的处理之间不存在统计显著性 ($p=0.114$)。QCDCRT与TX0在所测试的每个时间点都有效增加BM86抗体滴度。TX0在除了第14天 ($p=0.114$) 之外所测试的每个时间点优于QCDCRT ($p<0.05$)。

表36

组	N	BM86 抗体滴度, 反变换最小二乘均数 (平均值 $\pm$ SEM)			
		第 14 天	第 28 天	第 41 天	第 83 天
T01	8	100 $\pm$ 46.42	100 $\pm$ 31.52	100 $\pm$ 17.05	100 $\pm$ 17.31
T02	8	2018 $\pm$ 937	1179 $\pm$ 372	13532 $\pm$ 2308	4082 $\pm$ 707
T03	8	5956 $\pm$ 2765	8404 $\pm$ 2649	28557 $\pm$ 4870	18638 $\pm$ 3227

实施例11. 口蹄疫(天竺鼠)

[0392] 这项研究的目的在于比较用不同佐剂配方辅助的三价FMD疫苗接种疫苗的天竺鼠中的体液免疫反应。如表37中所总结,第0天和第28天对天竺鼠接种疫苗。

[0393] 在T03-T07的每个剂量中,抗原是FMVD 0型 (9 μ g)、A型 (5 μ g) 以及Asia1型 (5 μ g/ml) 的组合。T02中的抗原组成是制造商的专有信息并且因此不可用。

[0394] 第-3天、第25天以及第53天收集血液样品用于血清学研究。下文总结了针对血清型0、A以及Asia 1的抗体的血清滴度。

[0395] 虽然针对血清型0和A的反应甚至在阳性对照组 (T02) 中仍很低,但针对Asia 1的反应在T07 (TX0佐剂) 中比在阳性对照组中更高,并且高于任何其它处理。针对血清型0和A的低反应可能归结于配方中低水平的0和A抗原的存在。

[0396] 明显地,基于脂质体的VACCIMAX[®]组 (T03-T05) 并不展示针对抗原 (0、A、Asia1) 中的任一者的显著反应。

表37

组	N	佐剂/成分		处理天数	剂量	RT
T01	24/22	盐水		0、28	0.2 ml	IM
T02	24/24	商业疫苗 - Raksha 单价 FMDV 疫苗 (vet) (阳性对照)	专有	0、28	0.2 ml	IM
T03	23/22	VACCIMAX [®] S100/多聚 I:C	S100/胆固醇、12% w/v (60 毫克/剂) /多聚 I:C 100 微克/剂油包水、50%水性脂质体 + 50% Marcol 52/Montanide 888	0、28	0.2 ml	IM
T04	23/23	VACCIMAX [®] S100/Pam3Cys	专有	0、28	0.2 ml	IM
T05	23/22	VACCIMAX [®] (Biolipon 95) /Pam3Cys	VacciMax Biolipon 95、100 µg/多聚 I:C/剂、油包水、50%水性脂质体 + 50% Marcol 52/Montanide 888	0、28	0.2 ml	IM
T06	24/24	QCDCRT (80% 体积)	250 µg Quil-A、250 µg 胆固醇、100 µg DDA、0.0375% Carbopol、1,000 µg R1005、100 µg SEQ ID NO: 8	0、28	0.2 ml	IM
T07	24/23	TXO (80% 体积)	100 µg SEQ ID NO: 8、100 mg 葡聚糖 DEAE、45%矿物油、6.3% SPAN [®]	0、28	0.2 ml	IM
			80、1.45% TWEEN [®] 80、QS 水			

N代表存活于首次/二次接种疫苗的动物数

[0397] 因为佐剂TXO和QCDCRT如上文所描述以80%体积使用,所以施用于组T07的疫苗组合物的一个剂量含有100µg SEQ ID NO:8/100mg DEAE-葡聚糖、36%v/v矿物油、5.04%v/v SPAN[®]80以及1.16%v/vTWEEN[®]80。因为QCDCRT中不存在油,所以成分的浓度与表37中相同。

表38

组	血清型 O SN 滴度, 几何平均滴度			血清型 A SN 滴度, 几何平均滴度			血清型 Asia1 SN 滴度, 几何平均滴度		
	第-3 天	第 28 天	第 56 天	第-3 天	第 28 天	第 56 天	第-3 天	第 28 天	第 56 天
T01	4	4	4.1	4	4	4	4	4.1	4.1
T02	4	9.6	49.9	4	7	14.1	4	14	266.9
T03	4	4.8	13.8	4	4.1	9	4	5.9	24.3
T04	4	4.1	10.3	4	4.5	5.8	4	4.3	9.7
T05	4	4.1	8.1	4	4.5	4.7	4	4.3	13.6
T06	4	4.1	5	4	4	4	4	4.2	5.1
T07	4	5	9	4	5.6	43.1	4	19.8	320.8

实施例12. 口蹄疫(牛)

[0398] 在这项研究中,测定针对攻击模型中的FMD的疫苗中所用的不同佐剂的作用。研究三种佐剂。疫苗是由PIADC开发的针对攻击模型中的FMD的ARS实验性疫苗。FMD-LL3B3D-A24 Cruzeiro用作疫苗(10µg)的抗原组分并且野生型FMDV A-24 Cruzeiro用作攻击病毒。抗原

先前描述于例如US20120315295 (Rieder等, 2011年6月9日提交并且2012年12月13日公布) 中。简单地说, FMD-LL3B3D-A24 Cruzeiro包含遗传修饰的FMDV(口蹄疫病毒)。FMDV经过遗传修饰, 即, 其为含有前导 (L_{pro}) 蛋白编码区的缺失以使得缺乏这种蛋白质的FMD病毒在牛和猪中减弱的无前导病毒。FMDV还包含引入两个非结构病毒蛋白中的突变(阴性标志物), 从而消除由特异性抗体识别的两个抗原表位, 一个位于蛋白质3B中并且另一个在蛋白质3D中(由在这些蛋白质中充当阴性抗原表位的牛鼻病毒的对应序列置换), 由此提供两个可能的靶用于DIVA(区分自然感染与接种疫苗的动物) 血清学测试。

[0399] 四至七只牛用于每个组中。注射的总体积是2ml。第0天通过IM注射(每剂2.0ml)对动物接种疫苗, 并且第21天通过皮内途径用野生型FMDV攻击。第0天、第3天、第7天以及第10天根据以下标度评价临床记分: 无临床征象: 0, 水疱性蹄病变: 对于每个受感染的蹄1个点。最大记分是4。实验的结果如下:

表39

组	佐剂	细节/每剂	平均临床记分			
			第0天	第3天	第7天	第10天
T01	盐水	N/A	0	3.0	3.5	4.0
T02	MONTANIDE [®] ISA 206 VG	已经开发用于制造水包油包水 (W/O/W) 乳液的基于矿物油的佐剂。其包含高等级的可注射矿物油和获自甘露糖醇和植物来源的纯化油酸的极精炼乳化剂。MONTANIDE [®] ISA 206 VG 不含动物来源的成分。精确组成为制造商 (Seppic Inc) 所专有。	0	0	0	0
T03	QCDCRT (80%体积)	250 μ g Quil-A、250 μ g 胆固醇、100 μ g DDA、0.0375% Carbopol、1,000 μ g R1005、100 μ g SEQ ID NO: 8	0	1.14	2.86	2.43
T04	TXO (80%体积)	含 100 μ g SEQ ID NO: 8/100 mg DEAE-葡聚糖的 WO 乳液	0	0	0	0

[0400] T01与T02之间以及T01与T04之间的差异是统计上显著的。

[0401] 从上表可以推断, 至少基于临床记分, 佐剂TXO和MONTANIDE[®] ISA 206VG是大约同等有效的。然而, 测量针对FMDV-A24的血清中和活性的血清学分析展示, 组T04(佐剂TXO)具有比组T02(MONTANIDE[®] ISA 206VG)更高的滴度。

表40. 血清中和滴度最小二乘均数(反变换)

	时间点			
	第0天	第7天	第14天	第21天
T01	0.45 ^a	0.45 ^a	0.45 ^a	0.45 ^a
T02	0.45 ^a	1.60 ^c	1.13 ^c	1.20 ^b
T03	0.45 ^a	1.10 ^b	0.66 ^b	0.61 ^a
T04	0.45 ^a	2.21 ^d	2.21 ^d	2.21 ^d

不同字母指示统计显著差异 ($p < 0.05$)

[0402] 这些结果展示, TXO佐剂能够提供对抗牛中FMD致病剂的攻击的100%保护并且赋予比盐水对照和所测试的其它两种佐剂更高的抗体滴度。

[0403] 在鼻拭子中和血清中测定FMDV RNA的量(拷贝/毫升)。数据提供于表41-44中。简单地说,这些数据展示,组T02和T04在鼻拭子中得到更少量的FMDV。在T02和T04当中,注意到组T04中的动物展示FMDV RNA量的更早减少(或缺乏增加),由此再次展示佐剂TX0的优良特性。

表41. 鼻拭子中的FMDV (通过rRT-PCR测量的“脱落”FMDV RNA拷贝/毫升;LS均数)

	时间点										
	第 21 天	第 22 天	第 23 天	第 24 天	第 25 天	第 26 天	第 27 天	第 28 天	第 29 天	第 30 天	第 31 天
T01	1.35	1.75	6.16	7.09	6.88	6.13	5.19	4.98	2.51	1.81	1.35
T02	1.35	1.49	4.63	5.31	5.62	4.14	2.21	1.84	1.58	2.66	1.83
T03	1.35	1.92	3.54	4.66	5.39	5.27	3.12	1.87	1.56	1.84	1.84
T04	1.35	1.59	3.97	5.05	4.47	3.75	2.31	1.61	1.56	2.58	1.55

表42. 统计显著性(鼻拭子)

	P <= 0.05?										
	第 21 天	第 22 天	第 23 天	第 24 天	第 25 天	第 26 天	第 27 天	第 28 天	第 29 天	第 30 天	第 31 天
T01 相对 T02	否	否	是	是	否	是	是	是	否	否	否
T01 相对 T03	否	否	是	是	否	否	是	是	否	否	否
T01 相对 T04	否	否	是	是	是	是	是	是	否	否	否
T02 相对 T03	否	否	否	否	否	否	否	否	否	否	否
T02 相对 T04	否	否	否	否	是	否	否	否	否	否	否
T03 相对 T04	否	否	否	否	否	是	否	否	否	否	否

表43. 血清中的FMDV (“病毒血症”,通过rRT-PCR测量的FMDVRNA拷贝数/毫升;LS均数)

	时间点										
	第 21 天	第 22 天	第 23 天	第 24 天	第 25 天	第 26 天	第 27 天	第 28 天	第 29 天	第 30 天	第 31 天
T01	1.35	6.85	8.67	8.56	5.96	3.91	1.77	1.35	1.35	1.35	1.35
T02	1.35	1.58	1.57	1.75	1.83	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
T03	1.35	3.84	3.77	3.20	2.72	1.82	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
T04	1.35	1.59	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35

表44. 统计显著性(血清)

	P ≤ 0.05?										
	第 21 天	第 22 天	第 23 天	第 24 天	第 25 天	第 26 天	第 27 天	第 28 天	第 29 天	第 30 天	第 31 天
T01 相对 T02	否	是	是	是	是	是	是	否	否	否	否
T01 相对 T03	否	是	是	是	是	是	否	否	否	否	否
T01 相对 T04	否	是	是	是	是	是	是	否	否	否	否
T02 相对 T03	否	是	是	是	否	否	否	否	否	否	否
T02 相对 T04	否	否	否	是	是	否	否	否	否	否	否
T03 相对 T04	否	是	是	是	是	否	否	否	否	否	否

[0404] 虽然组T01中的所有动物在攻击之后展现出发热,但组T04中没有一只动物有发热。组T02和T03中的反应是不一致的(一些动物展现出发热并且一些没有)。这种观测确认了TX0与这项研究中所用的其它佐剂相比的一般优越性的结论。

实施例13:TX0活化细胞介导的免疫性

[0405] 使用FMD作为先前的实施例中所描述的动物模型中的例示性抗原,分析佐剂对细胞介导的免疫性的作用。从接种疫苗后第4天、第7天、第14天以及第21天收集的牛全血纯化外周血单核细胞(PBMC)。使用羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色来评价FMDV特异性T细胞增殖反应。

[0406] 结果提供于表45中。

表45.增殖指数(平均值±SD)

处理/天	第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
T01	1 ± 0	1.22 ± 0.365	1.12 ± 0.070	0.965 ± 0.144
T02	1 ± 0	1.633 ± 1.046	1.813 ± 0.860	4.473 ± 4.012
T03	1 ± 0	1.769 ± 0.877	1.850 ± .980	1.549 ± 0.608
T04	1 ± 0	1.589 ± 0.682	2.667 ± 1.424	6.757 ± 4.653

[0407] 这些数据展示第14天与第21天TX0对细胞介导的免疫性的优良作用。这些数据还指示,因为细胞介导的免疫性对免疫性的持续时间负责,所以佐剂TX0可能提供比MONTANIDE®ISA 206VG更长持续时间的免疫性。

实施例14.产生供诊断用的抗体

[0408] 本发明的佐剂TX0用于产生供诊断用的抗体。简单地说,每2-4周已经用包含用TX0

辅助的所选重组抗原的配方使来源动物免疫, TX0的组成如下: SEQ ID NO:8-125 μ g; DEAE葡聚糖-125mg; 矿物油-配方的46.56%v/v; **TWEEN**[®]80-配方的1.5%v/v; **SPAN**[®]80-配方的6.518%v/v。

[0409] 佐剂配方以疫苗组合物的80%v/v使用。因此, 佐剂配方的组分的最终浓度如下: SEQ ID NO:8-100 μ g; DEAE葡聚糖-100mg; 矿物油-疫苗组合物的37.248%v/v; **TWEEN**[®]80-疫苗组合物的1.2%v/v; **SPAN**[®]80-疫苗组合物的5.214%v/v。最终体积是2ml。

[0410] 在注射之后观测到小的可见的注射部位反应, 但在反应的预计大小内。基于每天的观测, 在肋骨上观测到的反应似乎不使山羊疼痛。

[0411] 在每次免疫之后2-3周收集血液样品, 并且进行各种试验以评估抗体滴度。超过1000的血清学ELISA滴度被视为足以开始收获抗体。

[0412] 每周使动物出血(基于体质量的血液体积的7.5%)。在研究结束时, 通过末端放血对山羊施以无痛致死术, 并且也收集那个血液用于收获抗体。如有必要, 重新利用动物用于额外的研究。

表46: 完成的山羊多克隆试剂产生研究的总结

抗原	量(μ g)/ 剂	来源 动物 (N)	AB 的 来源	收集的总 血清体积	免疫, N	注释
FeLV gp70	100-150 μ g	山羊 (6)	血清、 乳奶*	26.7 L 血 清、300 L 乳奶	15	所有山羊达到超过 2000000 的滴度 [#]
睡眠嗜组织菌 (<i>H.</i>	150 μ g	山羊	血清	4.84 L	8	所有山羊达到超过

somni) p31 蛋白		(4)				2500000 的滴度。两只达到超过 5000000 的滴度。
牛副流感-3 (BPI-3) HN 蛋白	61.8 µg	山羊 (4)	血清	3.19 L	4	所有山羊达到超过 2000 的滴度。三只山羊达到超过 8000 的滴度。
rBVD1 E2 (gp53)	150 µg	山羊 (4)	血清	3.93 L	3	所有山羊达到超过 100000 的滴度。一只山羊始终具有超过 1200000 的滴度。
犬圆环病毒抗原	150 µg	山羊 (4)	血清	4.51 L	4	所有山羊达到超过 500000 的滴度。两只达到超过 2000000 的滴度。
波氏杆菌 FHA 蛋白	100 µg	山羊 (4)	血清	2.57 L	4	所有山羊达到超过 800,000 的滴度。两只达到超过 4000000 的滴度。
副痘病毒 (灭活)	150 µg	山羊 (4)	血清	1.35 L	6	所有山羊达到超过 40000 的滴度。

*组中的一只山羊发展假孕并泌乳。从这只山羊收集300L乳奶。

#从所进行的ELISA试验推导的滴度。在那个时间终点未指示滴度并且未足够地稀释血清以确定终点。

[0413] 使用内部蛋白质A或蛋白质G柱用于小规模纯化,或东北部缅因州波特兰 (Portland,ME) 的Maine Biotechnology Services (MBS) 的蛋白质G色谱法用于大规模纯化来成功地纯化FeLV gp70的血清抗体。使用Millipore 30K超滤单元将多克隆抗体浓缩至约1mg/ml的最终浓度。未纯化针对表46中所公开的其它抗原的抗体。

[0414] 根据包括以下步骤的方法,从获自用FeLVgp70免疫的自发泌乳山羊的乳奶中分离抗体:

- 用2M HCl将乳奶的pH滴定至4.6并且在室温下搅拌30分钟以使酪蛋白沉淀;
- 以17,000×g使乳奶离心30分钟并且收集上清液;
- 将平衡缓冲液添加至上清液中达到3.3M NaCl、0.3M甘氨酸以及0.2M Tris碱;
- 通过以3000×g离心15分钟使上清液澄清;
- 将澄清的乳奶上清液施加至用步骤‘c’中的缓冲液平衡的MabSelect柱;
- 用平衡缓冲液洗涤柱并且用0.15M甘氨酸 (pH 3.0) 洗脱;
- 用0.2M磷酸钠中和洗脱部分。

[0415] 作为非限制性实例,下文提供了产生抗PI-3和抗FeLV gp70的方法。

[0416] 目的之一是产生针对纯化的牛副流感-3 (BPI-3) HN蛋白的山羊多克隆抗血清用于体外试验中。设计这项研究以用与用作抗原的TX0佐剂牛副流感-3 (BPI-3) HN蛋白一起配制的纯化的牛副流感-3 (BPI-3) HN蛋白对山羊接种疫苗。

[0417] 在首次注射之后约七周时,确定所有四只山羊具有足够高的血清抗体浓度(SN超过1000)以开始生产出血用于血清。在第四次免疫之后一周开始生产出血。以每周的时间间隔收集血液的血清,持续三周。对于个别的生产出血汇集来自每只山羊的血清。在约3周的生产出血期间收集总共3,187.50mL血清。加工血清并且储存于-80℃下用于在基于BPI-3HN的试验中评估。

[0418] 在室温下解冻从三只山羊(30号、31号以及35号)收集的所有血清。不使用来自34号山羊的血清,这归因于在筛选ELISA中的低抗体反应。参看表47(PI3-NH多克隆抗体产生:SN反应和抗原效力ELISA)。

[0419] 13年11月20日收集的35号山羊具有最低体积的可用血清,117mL。因此,将每次收集的来自每只山羊的117mL汇集于无菌1L Nalgene PETG瓶中。将约1053mL($9 \times 117\text{mL}$)血清分配为20个在无菌60mL Nalgene PETG瓶中的50mL等分试样以及50个1.0mL等分试样。

表47

免疫	具有 PI3 SN 滴度的动物 ID			
	30	31	34	35
0	< 2	76	< 2	< 2
1	215	1218	54	362
2	4096	8192	2435	9192
3	8192	16384	2696	9742

[0420] 因此,在三周时段的生产出血期间,这项研究在完成时成功地产生从用与TX0一起配制的纯化的BPI-3蛋白重复免疫的四只山羊收获的总共3,187.5mL全血。在血清中产生良好的多克隆抗体滴度。获得足够量的纯化试剂用于体外试验应用中。

[0421] 在2010年,USDA向行业通告将不再供应用于LEUKOCELL[®]和VERSIFEL[®]试验的FeLV gp85/70捕获试剂。因此,这项研究的目的在于产生针对重组FeLV gp70蛋白的山羊多克隆抗血清用于体外试验中。

[0422] 在用弗氏佐剂(Freund's adjuvant)接种疫苗后产生抗体的先前尝试是不成功的。设计这项研究以用与佐剂一起配制的重组大肠杆菌表达的FeLV gp70蛋白的444氨基酸片段对山羊接种疫苗。从第4次注射开始,将注射剂量降至100μg FeLV gp70蛋白(替代282μg FeLV gp70蛋白的原始剂量)。因为282μg/mL的初始剂量导致注射部位反应的高发生率,所以作出剂量变化。将剂量初始地降至100μg/mL,而然后升至150μg/mL用于第七次免疫,并且保持在那个水平下直至研究结束(总共15次免疫)。PBS缓冲液用于补足剂量体积的差异,这个体积保持为1mL。

[0423] 从山羊收集血液,并且一旦通过直接和夹心ELISA试验确定抗体滴度足够高,就收获血清并且纯化多克隆抗体。

[0424] 获得1-3岁并且重量>100磅的LaMancha和Alpine品种的六只健康母山羊用于这项研究中。向山羊喂食干草和谷物并且在整个研究中随意获取水。每天一次进行一般健康状况的观测。以21天的时间间隔将1mL剂量的实验性疫苗皮下施用于每只山羊,总共15次免疫

施用于五只山羊中的每一只以完成研究。在颈部或后腿初始地施用免疫,交替侧和部位用于后续免疫。在免疫之后观测到小的可见的注射部位反应。在右后腿的正前部的松弛皮肤中施用于山羊的免疫据报道第二天在所有山羊中引起略微肿胀、触痛以及适度跛瘸。在颈部的交替侧或在肋骨上的区域中施用后续注射并且一般耐受良好。然而,最终发现在肋骨上的区域是山羊最佳耐受的位置。

[0425] 在首次注射之后约八周时,确定六只山羊中的四只(21、22、24、25)具有足够高的血清抗体浓度以开始生产出血用于血清。在五周之后起始从剩余的两只山羊(23、26)生产出血。以每周的时间间隔收集血液的血清。在生产血液收集的六周之后从研究中去掉山羊25。这只山羊在到达时是跛的并且尽管用氟尼辛葡胺(Banamine)治疗仍展现出持久的跛瘸。无痛致死术指定用于末端出血并且按部位程序施用,以确保收集最大血液体积。对于个别的生产出血汇集来自每只山羊的血清。在约7个月的生产出血期间收集总共26.7L血清。

[0426] 意想不到地,山羊24在研究期间发展假孕。从这只山羊收集乳奶持续>3个月,总共300L乳奶可用于收获抗体。开发方案用于从乳奶中高水平纯化FeLV gp70多克隆抗体。

[0427] 在两个不同的日期,使用Maine Biotechnology Services的蛋白质G亲和色谱法从来自山羊24的500mL汇集血清中纯化抗体。制备总共6388mg (321mL, 19.9mg/mL) 和7343mg (348mL, 21.1mg/mL) 的纯化山羊抗FeLV gp70抗体用于在基于FeLV的试验中评估。

[0428] 在每次接种疫苗后十四天将血液样品(约25毫升/样品)收集至12.5mL血清分离管(SST)中以测定针对FeLV gp70的抗体浓度。用山羊ID和收集日期标记SST。一旦试验确定动物的基于ELISA信号强度的FeLV gp70抗体滴度处于可接受的浓度下,就从那只动物开始生产收集。以山羊的重量为基础确定从每只山羊提取的血液体积以获得最大血液体积。IACUC准则允许每周收集血液体积的至多7.5%。

[0429] 将血液收集至12.5mL SST中用于生产收集。在研究结束时,通过末端放血对山羊施以无痛致死术,并且也收集那个血液用于收获抗体。用山羊ID和收集日期标记所有管。

[0430] 在室温下使血液凝结。在离心之后,收获血清并且转移至聚丙烯小瓶中。汇集在收集当天从同一只山羊收集的来自不同SST的血清。将血清保持于冰上直至转运以供纯化。生产的总结提供于表48中。

表48

山羊 ID	每周体积 (ml)	末端出血 (ml)	总产量 (ml)
21	75-125	1000	4430
22	85-150	875	4665
23	85-125	1000	3630
24	110-200	1580	6785
25	80-105	980	1565
26	125-200	1750	6125
总计			26.7 L

[0431] 山羊24产生具有所有山羊的最高抗体浓度的血清。

[0432] 在夹心ELISA试验中使用FeLV gp70 C11D8检测mAb与作为捕获试剂的USDA 94-06相比来自山羊24的纯化血清抗体显示类似的剂量反应。通过西方墨点法比较来自山羊24的纯化血清与USDA 94-06试剂检测FeLV gp85/70蛋白的能力。在当前捕获94-06与新山羊24

捕获之间观测到类似的西方墨点型态,除了山羊24捕获观测到额外的约15kD色带。使用新捕获抗体的数据显示,当用于捕获参考和所测试的系列时,当前参考具有与当前试剂不同的剂量反应曲线形状。

[0433] 从血清与乳奶中纯化的抗FeLV gp70在FeLV ELISA试验中与捕获试剂一样好地发挥功能。

[0434] 如表49中所提供,额外的研究正在进行中。

[0435] 预期配方(表49中所公开并且用TX0辅助的抗原)中的每一者将在至少一只动物中(优选地至少2只动物,或更优选地在至少三只动物中,或最优选地在所处理的每只动物中)产生足够高的血清学滴度(超过1000,或更优选地超过5000,或更优选地超过10000,或更优选地超过50000,或更优选地超过100000,或更优选地超过250000,或更优选地超过500000,或更优选地超过1000000),由此得到足够量的抗体用于诊断或研究应用。

表49

抗原	量 (μg) / 剂	来源动物 (N)	AB 的来源	收集的总血清体积	免疫, N
产气荚膜梭菌 α 毒素 (灭活)	100 μg	山羊 (3)	血清	3.31 L/进行中	10
产气荚膜梭菌 β 毒素 (灭活)	100 μg	山羊 (3)	血清	3.93 L/进行中	9
产气荚膜梭菌 ε 毒素 (灭活)	100 μg	山羊 (3)	血清	4.07 L/进行中	10
rBVD2 E2 (gp53) 纯化蛋白	150 μg	山羊 (4)	血清		6/进行中
灭活的猪痢疾短螺旋体 (菌株 B204) 全细胞	150 μg	山羊 (3)	血清		3/进行中
猪痢疾短螺旋体 (BR2019-12 菌株) 胃蛋白酶消化物	150 μg	山羊 (3)	血清		3/进行中

[0436] 本说明书中所引用的所有公布,即专利公布与非专利公布,指示本发明所属领域的技术人员的技能水平。所有这些公布以引用的方式全部并入本文中,引用的程度如同每个个别的公布特定地并且个别地指示以引用的方式并入一样。

[0437] 尽管已经参考特定实施方案在本文中描述本发明,但应了解,这些实施方案仅仅是本发明的原理和应用的说明。因此,应了解,在不脱离如以上权利要求书所界定的本发明的精神和范围的情况下可以对说明性实施方案作出众多修改并且可以设想出其它安排。

序列表

<110> ZOETIS LLC
MOREDUN RESEARCH INSTITUTE
DOMINOWSKI, Paul Joseph
WILMES, Lauren
FOSS, Dennis L
MOHR, Kaori
GALLO, Guillermo
HARDHAM, John Morgan
KREBS, Richard Lee
LIGHTLE, Sandra Ann Marie
MAHAN, Suman
MEDIRATTA, Sangita
MWANGI, Duncan
RAI, Sharath K
SALMON, Sarah A
VORA, Shaunak
FONTAINE, Michael Christopher
SMITH, David George Emslie
FITZPATRICK, Julie Lydia
DONACHIE, William
JAGLARZ, Anita DorotaAM
<120> 油基佐剂
<130> ZP000025A
<141> 2014-09-19
<150> 61/879959
<151> 2013-09-19
<160> 14
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA
<210> 1
<211> 23
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸
<400> 1
tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23
<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸
<400> 2
tcgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23
<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸
<400> 3
tcgacgtcga tcggcgcgcg ccgt 24
<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸
<220> 特征
<221> 修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 5'-碘-2'-脱氧尿苷
<400> 4
ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23
<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸

<220> 特征
<221> 修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 5'-碘-2'-脱氧尿苷
<400> 5
ncgacgtcga tcggcgcgcg ccgt 24
<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸
<220> 特征
<221> 修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 5'-碘-2'-脱氧尿苷
<400> 6
ncgacgtcga tcggcgcgcg ccgt 24
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸
<220> 特征
<221> 修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 5'-Ethyl-2'-脱氧尿苷
<400> 7
ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23
<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸
<220> 特征
<221> 修饰的碱基
<222> (1) .. (1)

<223> 5'-碘-2'-脱氧尿苷
<400> 8
ncgtcgacga tcggcggccg ccgt 24
<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸
<220> 特征
<221> 修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 5'-碘-2'-脱氧尿苷
<400> 9
ncgtcgacga tcggcggccg ccgt 24
<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG寡核苷酸
<400> 10
tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> RNA
<400> 11
uuguuguugu uguuguuguu 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> RNA
<400> 12
uuauuuuuuu uauuuuuuuu 20

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> RNA
<400> 13
aaacgcucag ccaaagcag 19
<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA/RNA
<220> 特征
<221> 名称/键: misc_feature
<222> (11) .. (17)
<223> 核糖核苷酸
<400> 14
tcgtcgtttt guuguguttt t 21