(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101198352 B
(45)授权公告日 2011.07.27

(21)申请号 200680021810.9

(22)申请日 2006.04.17

(30)优先权数据
60/672,289 2005.04.18 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2007.12.17

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2006/014669 2006.04.17

(87)PCT申请的公布数据
WO2006/113772 EN 2006.10.26

(73)专利权人 谢尔英·普劳有限公司
地址 瑞士卢塞恩

(72)发明人 H·杰雅帕 K·傲康诺

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 刘冬 刘玥

(51)Int.Cl.
A61K 39/08(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)

(56)对比文件
WO 9323543 A1,1993.11.25,参见WPI摘要.
US 4292307 A,1981.09.29,参见WPI摘要.
SCHOEPE H ET AL:."Naturally occurring clostridiumperfringens nontoxic alpha-toxin variant as a potentialvaccine candidate against alpha-toxin-associateddiseases".INFECTION AND IMMUNITY69 11.2001,69(11),7194-7196.
AUCOUTURIER JEROME ET AL:."Montanide ISA 720 and 51: a newgeneration of water in oil emulsions as adjuvants forhumanvaccines".EXPERT REVIEW OF VACCINES1 1.2002,1(1),111-118.
STEVENS DENNIS L ET AL:."Immunization with the C-domain ofalpha-toxin prevents lethalinfection, localizes tissueinjury, and promotes host response tochallenge withClostridium perfringens".JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES190 4.2004,190(4),767-773.
SCHOEPE ET AL:."Immunization with an alphatoxin variant121A/91-R212H protects mice against Clostridiumperfringensalphatoxin".ANAEROBE12 1.2006,12(1),44-48.
LOVLAND ATLE ET AL:."Maternal vaccination againstsubclinical necrotic enteritis in broilers.".AVIAN PATHOLOGY33 1.2004,33(1),83-92.

审查员 周洋

权利要求书 2 页 说明书 34 页

(54)发明名称

产气荚膜梭菌 α 类毒素疫苗

(57)摘要

本发明描述包含产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)类型 α 类毒素、其抗原片段、产气荚膜梭菌类型 α 毒素的灭活抗原片段、或其任何组合的疫苗。本发明还描述用这些疫苗来保护动物以免感染梭菌疾病的使用方法。本发明也描述这些疫苗的制备方法。

CN 101198352 B

1. 一种抗产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)疫苗,其包含产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液,所述上清液是通过超滤浓缩的并且其总结合力单位(TCP)为 2 或更高;

其中产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液包含 α 类毒素抗原;前提条件是所述疫苗中仅存在单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素;并且其中所述疫苗用来保护抵抗梭菌疾病。

2. 权利要求 1 的疫苗,其中所述抗原是无细胞制剂。

3. 权利要求 1 的疫苗,其中所述疫苗用于施用于鸡。

4. 权利要求 1 的疫苗,其中所述抗原是重组多肽。

5. 权利要求 3 的疫苗,其中一至两剂、每剂 0.25-0.6ml 的所述疫苗足以诱导已接种所述疫苗的鸡的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体有至少四抗毒素单位(A.U.)。

6. 权利要求 1 的疫苗,其中所述抗原选自产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素和产气荚膜梭菌 C 型 α 类毒素。

7. 权利要求 1 的疫苗,所述疫苗还包含佐剂。

8. 权利要求 7 的疫苗,其中油包水乳剂包含所述抗原。

9. 权利要求 8 的疫苗,其中按 70%油相和 30%水相制备所述油包水乳剂。

10. 权利要求 6 的疫苗,其中所述抗原是产气荚膜梭菌类型 α 类毒素。

11. 一种鸡用抗产气荚膜梭菌疫苗,其包含产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素上清液,所述上清液是通过超滤浓缩的并且其总结合力单位(TCP)为 2 或更高;

其中产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素上清液包含 α 类毒素抗原;

其中油包水乳剂包含所述抗原;和

其中一至两剂、每剂 0.25-0.6ml 的所述疫苗足以诱导已接种所述疫苗的鸡的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体有至少四抗毒素单位(A.U.);前提条件是所述疫苗中仅存在单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素。

12. 权利要求 1 的疫苗,所述疫苗是还包含一种或多种以下毒素的多价疫苗:产气荚膜梭菌 B 毒素、产气荚膜梭菌 β 2 毒素、产气荚膜梭菌肠毒素、产气荚膜梭菌 ε 毒素、产气荚膜梭菌 ι 毒素、产气荚膜梭菌 κ 毒素、产气荚膜梭菌 λ 毒素、产气荚膜梭菌 θ 毒素、索氏梭菌(Clostridium sordellii)出血毒素、索氏梭菌致死毒素、艰难梭菌(Clostridium difficile)A 毒素、艰难梭菌 B 毒素、败毒梭菌(Clostridiumsepticum)α 毒素、诺氏梭菌(Clostridium novyi)α 毒素和诺氏梭菌 β 毒素。

13. 权利要求 12 的疫苗,其中所述多价疫苗还包含一种或多种病毒抗原、一种或多种细菌抗原和一种或多种寄生虫抗原;

其中所述一种或多种病毒抗原来自一个或多个以下来源:传染性法氏囊病病毒、传染性支气管炎病毒、呼肠孤病毒和新城疫病毒;

其中所述一种或多种细菌抗原来自一个或多个以下来源:大肠杆菌(E.coli)、沙门氏菌属(Salmonella)和弯曲杆菌属(Campylobacter);和

其中所述一种或多种寄生虫抗原来自艾美球虫属(Eimeria)。

14. 权利要求 1 的疫苗,所述疫苗是还包含一种或多种其它抗原的多价疫苗;

其中所述其它抗原来自一个或多个以下来源:传染性法氏囊病病毒、传染性支气管炎病毒、呼肠孤病毒、新城疫病毒、大肠杆菌、沙门氏菌属、弯曲杆菌属和艾美球虫属。

15. 一种基本上由选自以下的抗原组成的疫苗:单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素、所

述 α 类毒素的抗原片段、单一产气荚膜梭菌类型 α 毒素的灭活抗原片段及其任何组合；

其中所述单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素与所述单一产气荚膜梭菌类型 α 毒素的灭活抗原片段是同一类型；和

其中一至两剂、每剂 0.25-0.6ml 的所述疫苗足以诱导已接种所述疫苗的鸡的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体有至少四抗毒素单位 (A.U.)。

16. 权利要求 13 的疫苗在制备用于通过在雌性鸟类产下包含后代的蛋之前将所述疫苗给予雌性鸟类从而给雌性鸟类的后代提供针对多种家禽疾病的被动免疫的疫苗中的应用。

17. 权利要求 1 的疫苗在制备用于通过在雌性鸟类产下包含后代的蛋之前将所述疫苗给予雌性鸟类从而给雌性鸟类的后代提供针对梭菌疾病的被动免疫的疫苗中的应用。

18. 权利要求 17 的应用，其中所述鸟类是鸡或火鸡。

19. 权利要求 17 的应用，其中所述梭菌疾病是梭菌肠疾病。

20. 权利要求 19 的应用，其中所述梭菌肠疾病是坏死性肠炎。

21. 权利要求 17 的应用，其中所述梭菌疾病选自胆管肝炎、坏疽性皮炎和蜂窝织炎。

22. 一种制备产气荚膜梭菌 α 类毒素疫苗的方法，所述方法包括：

(a) 在培养基中培养产气荚膜梭菌细胞，以产生一定量的培养细胞；其中所述量的培养细胞将产气荚膜梭菌 α 毒素分泌到细胞培养基中；

(b) 灭活所分泌的 α 毒素，产生产气荚膜梭菌 α 类毒素；

(c) 自所述培养基去除大部分所述量的培养细胞，以形成产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液；和

(d) 调节所述产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液的浓度，使其足以诱导已接种一剂或两剂、每剂 0.25-0.6ml 所述疫苗的鸟类的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体有至少四抗毒素单位 (A.U.)。

23. 权利要求 22 的方法，所述方法还包括将该产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液与油包水乳剂混合。

24. 权利要求 23 的方法，其中按 70％油相和 30％水相制备所述油包水乳剂。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述产气荚膜梭菌细胞是单一产气荚膜梭菌类型细胞。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述单一产气荚膜梭菌类型细胞选自产气荚膜梭菌 A 型细胞和产气荚膜梭菌 C 型细胞。

产气荚膜梭菌 α 类毒素疫苗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请为非临时申请，根据 35 U.S.C. §119(e)，要求于 2005 年 4 月 18 日申请的美国临时申请顺序号 60/672,289 的优先权，所述临时中请的全部公开内容通过引用结合到本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及包含产气荚膜梭菌类型 α 类毒素、其抗原片段、α 毒素的灭活抗原片段及其任何组合的疫苗。本发明还涉及用这些疫苗来保护动物以免感染梭菌疾病的使用方法。本发明也涉及这些疫苗的制备方法。

[0004] 背景

[0005] 产气荚膜梭菌 (Clostridium perfringens) 是土壤、腐烂有机质中天然存在的厌氧细菌，并且是包括人类在内的动物正常肠道菌群 (gutflora) 的组成部分。产气荚膜梭菌也是在有经济价值的家畜中发现的众多梭菌疾病的病原体。产气荚膜梭菌产生多种导致动物病理作用的毒素，包括 α 毒素、β 毒素、β2 毒素、ε 毒素、θ 毒素、μ 毒素、δ 毒素、ι 毒素、κ 毒素和 λ 毒素。此外，产气荚膜梭菌编码其它可导致病理作用的生物活性物质，包括透明质酸酶、酸性磷酸酶、蛋白酶、胶原蛋白酶、硫酸酯酶和神经氨酸酶。

[0006] 根据特定细菌所产生的毒素谱，将产气荚膜梭菌不同菌株命名为 A 至 E 生物型 [Justin 等，Biochemistry 41 :6253-6262(2002) ;McDonel，PHARMACOLOGY OF BACTERIAL TOXINS ;F Dorner 和 J Drews(编著)Pergamon Press,Oxford(1986)]。最初这样的分型是根据小鼠或豚鼠的血清学中和测定。最近，分子分型方法采用以编码产气荚膜梭菌的众多毒素之一的遗传序列为目标的聚合酶链式反应 (PCR)。

[0007] 已经知道，马的肠内梭菌病与肠道中高浓度产气荚膜梭菌 A 型相关。患病的马具有大量水样腹泻和高死亡率。也已知道产气荚膜梭菌 A 型与仔猪和架子猪的肠疾病相关，症状包括轻度坏死性肠炎和绒毛萎缩 [Songer，Clin.Micro.Rev,9(2) :216-234(1996)]。

[0008] 由产气荚膜梭菌引起的梭菌疾病的特征在于小肠内具有融合性纤维蛋白坏死性病变 (“土耳其毛巾”(Turkish towel)) 的良好育肥的鸟类突然死亡 (肠形式 (enteric forms))，和 / 或肝脏内具有胆管肝炎或纤维蛋白样坏死的产气荚膜梭菌相关性肝炎。患病的鸟经历精神委顿、腹泻和脱水的快速进程。死亡率在 2％至 50％范围内。肝病变造成适于屠宰的家畜的肉不能食用。

[0009] 坏死性肠炎 (NE) 就是由产气荚膜梭菌引起的梭菌肠疾病的一个实例，给养禽业带来重大经济后果。尽管该病在火鸡或笼养产蛋鸡中已有报导，但该病在 2-10 周龄的平饲法饲养的肉用鸡中尤为常见。坏死性肠炎通常在家禽中发生，或者作为继发病，或者在正常肠道微生物菌群被改变而导致致病性产气荚膜梭菌异常增殖的情况下发病。亚临床坏死性肠炎的发病率尚未知道，因为病灶仅可通过尸体剖检才能观察到。然而，已有报导认为饲料转化率不佳和体重下降就是由亚临床疾病引起的 [Lovland 和 Kadhusdal，Avian Path.30 : 73-81(2001)]。在自然暴发和实验模型中都引起坏死性肠炎的诱发因素包括 :(a) 球虫病，

(b) 寄生幼虫的迁移,(c) 喂食高含量鱼粉或小麦,和 (d) 免疫抑制性疾病。此外,按照以下方法可实验性重现坏死性肠炎 :(i) 给动物提供被产气荚膜梭菌污染的饲料,(ii) 采用口服或填喂至嗉囊方式给予动物营养体培养物 (vegetatiVe culture),或 (iii) 经十二指肠给予动物无细菌的粗制毒素的肉汤培养物。

[0010] 产气荚膜梭菌 A 型或 C 型是引起禽坏死性肠炎的两种生物型,其中 α 毒素是所检测到的最常见毒素 [Wages 和 Opengart,NecroticEnteritis. 第 781-785 页,载于 :Disease of Poultry,第 11 版,(Saif 等编著),Iowa State Press,Ames,IA(2003)]。事实上,从 42 只感染 A 型的鸡中得到的产气荚膜梭菌分离株中,有超过 90%产生致死 α 毒素,并产生唾液酸酶及 θ 和 μ 毒素 [Daube 等,AJVR 54 :496-501(1996)]。此外,已在患有坏死性肠炎的鸡中鉴定出由产气荚膜梭菌 A 型所产生的肠毒素,该肠毒素可在肠道疾病中起作用 [Niilo,Can. J. Comp. Med. 42 :357-363(1978)]。

[0011] 最近,已报导产气荚膜梭菌 A 型或 C 型可编码 cpb2 基因 [Gilbert 等,Gene 203 :56-73(1997)] 并表达其产物,即 β2 毒素。已在猪中观察到 β2 毒素的表达与新生幼畜肠炎间的高度相关性 [Bueschel 等,VetMicro 94 :121-129(2003)]。也已认为 β2 毒素是马和牛的肠炎致病因子。Bueschel 等 (出处同上) 还报导他们所获得的 3020 株产气荚膜梭菌分离株中有 37.2%编码 β2 毒素,在所检查的产气荚膜梭菌 A 型中,35.1%编码 β2 毒素。在鸟类产气荚膜梭菌 A 型野生分离株的有限样本 (n = 5) 中,发现≈ 35%是 cpb2 基因型呈阳性,而且其中的 40%也表达 β2 毒素。此外,采用 PCR,Engstrom 等 [Vet Micro 94 :225-235(2003)] 发现,得自患有肝炎的鸡的产气荚膜梭菌分离株中有 12%也为 cpb2 阳性。已经知道产气荚膜梭菌 A 型的肠毒素也是鸡的致病因素,在经结扎的肠环模型中导致流体积聚 [Niilo,Appl. Micro. 28 :889-891(1974)]。

[0012] 目前,防治产气荚膜梭菌的工作依赖于卫生措施以及在动物饲料中添加抗生素。疾病的梭菌组分对抗生素反应良好,通常会被抗生素饲料添加剂和离子载体性药物、抗球虫药物所抑制。然而,抗生素成本高,而且人们对细菌抗药性增加的相关问题越来越关注。

[0013] 因为许多产气荚膜梭菌相关性疾病发展迅速且通常会致命,所以家畜的疫苗接种也已成为重要的防治措施。例如,美国专利第 4,292,307 号中定义了一种“通用”多价疫苗,由产气荚膜梭菌 A 型、B 型和 D 型的类毒素制备,并且还包括水肿梭菌 (Cl. oedematiens) 和败毒梭菌 (Cl. septicum) 的类毒素。此外,市售疫苗通常是多价疫苗,由灭活细胞、毒素或这两者组合而成 [参见 Songer,Clin. Micro. Rev,9(2) :216-234(1996)]。

[0014] 对雌性家畜进行疫苗接种也可引起对其随后出生的后代的被动保护作用。哺乳动物新生幼仔抗致病性梭菌感染的被动保护作用,依赖于以初乳抗体形式的特异性抗体的转移。例如,Smith 和 Matsuoka[Am. J. Vet. Res. 20 :91-93(1959)] 用灭活疫苗接种怀孕绵羊,并报导羔羊针对产气荚膜梭菌 ε 毒素的经母体诱导的保护作用。幼小哺乳动物的被动免疫通常会持续 2-3 周 [Songer,Clin. Micro. Rev,9(2) :216-234(1996)]。

[0015] 与哺乳动物幼畜相反,鸟类被动免疫具有几个明显缺点,最突出的就是 :完全没有得自乳汁的母体抗体。尽管被动免疫仅仅是所观察到的相关性的一种可能解释,但是 Heier 等 [Avian Diseases45 :724-732(2001)] 的确报导过,在具有较高效价的抗产气荚膜梭菌 α 毒素的天然存在的特异性母体抗体的挪威 (Norwegian) 肉用禽群中,鸡存活率显著高于具有低效价的所述禽群的鸡存活率。此外,与未接种疫苗的母鸡后代相比,Lovland 等

[Avian Pathology 33(1):83-92(2004)]所报导的结果与已接种基于产气荚膜梭菌A型或C型类毒素的疫苗的母鸡后代的适度被动保护一致。

[0016] 迄今为止,抗产气荚膜梭菌的商业重要保护作用似乎难以达到,除非接种物中存在针对大多数(如果不是全部的话)产气荚膜梭菌所产生的致病组分的母体抗体。例如,用不含肠毒素的产品对母畜进行疫苗接种仅给仔猪提供部分保护,母山羊的抗 ε 毒素抗体保护其不死于毒血症,但并不针对小肠结肠炎[Songer, Clin.Micro.Rev,9(2):216-234(1996)]。

[0017] 事实上,尽管拥有关于产气荚膜梭菌各种生物型及其相应毒素和有害生物活性物质的大量数据列表,但对农民而言,食用动物的梭菌疾病仍是重大经济难题。因此,需要提供针对产气荚膜梭菌的致病作用而保护家畜的其它手段。更具体地讲,仍然需要给家禽提供针对产气荚膜梭菌的安全有效的疫苗。此外,需要提供针对产气荚膜梭菌的简单疫苗,该疫苗可给予雌性动物(尤其是可生育和/或怀孕雌性家畜),以被动保护其后代。

[0018] 本文引用的任何参考文献都不应视为允许将该参考文献周作本申请的"现有技术"。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明提供针对产气荚膜梭菌的疫苗,所述疫苗包含作为抗原的产气荚膜梭菌 α 类毒素,和/或产气荚膜梭菌 α 类毒素的抗原片段,和/或产气荚膜梭菌 α 毒素的灭活抗原片段、和/或其任何组合。本发明还提供基本上由作为抗原的单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素,和/或产气荚膜梭菌 α 类毒素的抗原片段,和/或产气荚膜梭菌 α 毒素的灭活抗原片段,和/或其任何组合组成的疫苗。

[0021] 优选一至两剂、每剂0.25-0.6ml的本发明疫苗足以诱导已接种该疫苗的动物(例如鸡)的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体有至少四抗毒素单位(A.U.)。在此类型的一个实施方案中,对已接种疫苗的动物的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体的抗毒素单位(A.U.)进行测定,是在免疫后6-7周进行。在一个具体的实施方案中,单剂疫苗足以诱导已接种疫苗的动物的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体有至少四抗毒素单位(A.U.),而在一个替代实施方案中,两剂疫苗是必需的。在一个实施方案中,抗原的总结合力单位(Total Combining Power unit,TCP)为≥2。

[0022] 在一个这样的实施方案中,动物为鸟类。在一个具体实施方案中,鸟类为鸡。在另一个实施方案中,鸟类为火鸡。

[0023] 在一个实施方案中,抗原来自产气荚膜梭菌A型细胞,例如产气荚膜梭菌A型 α 类毒素。在另一个实施方案中,抗原来自产气荚膜梭菌C型细胞,例如产气荚膜梭菌C型 α 毒素的灭活抗原片段。在又一个实施方案中,抗原来自产气荚膜梭菌B型。在再一个实施方案中,抗原来自产气荚膜梭菌D型。在又一个实施方案中,抗原来自产气荚膜梭菌E型。在再一个实施方案中,疫苗包含来自产气荚膜梭菌亚型的抗原。

[0024] 在一个实施方案中,本发明的疫苗包含作为单一产气荚膜梭菌型抗原的抗原,前提条件是疫苗中仅存在单一产气荚膜梭菌型抗原。在此类型的一个具体实施方案中,产气荚膜梭菌为A型。在一个相关实施方案中,产气荚膜梭菌为C型。在一个实施方案中,抗原是 α 类毒素。在此类型的一个具体实施方案中,α 类毒素包含在产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液中。在一个具体实施方案中,疫苗包含单一产气荚膜梭菌类型(A型)的 α 类毒素

上清液。

[0025] 在本发明的一种疫苗中，抗原是由产气荚膜梭菌细胞天然编码的 α 毒素的 α 类毒素。在本发明的另一疫苗中，抗原是重组多肽，即由已进行遗传操作的基因所编码的重组多肽。在此类型的一个实施方案中，重组多肽为 α 类毒素，其中相应 α 毒素的酶区域已经遗传去除或改变，但保留了一个或多个抗原表位。

[0026] 在一个具体实施方案中，抗原在完整细胞制剂中。在另一个实施方案中，抗原在无细胞制剂中。在又一个实施方案中，抗原是产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液中的 α 类毒素。在此类型的一个具体实施方案中，产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液也是无细胞制剂。

[0027] 在本发明的另一方面，疫苗也可含多种抗原，当将所述抗原给予动物受试者时会产生多种特异性的抗体。并非所有这些抗体必需具有针对疾病的保护性。在此类型的一个具体实施方案中，所述抗原也来自产气荚膜梭菌。因此，本发明的疫苗可含有各种其它活性或灭活致病因素以及 α 类毒素。因此，根据本发明，可将 α 类毒素与其它梭菌和非梭菌细胞、类毒素和提取物以及 α 毒素的灭活抗原片段组合在一起。

[0028] 本发明一种这样的多价疫苗包含产气荚膜梭菌 α 类毒素，和 / 或产气荚膜梭菌 α 类毒素的抗原片段，和 / 或产气荚膜梭菌 α 毒素的灭活抗原片段，和 / 或其任何组合，并且还包含病毒抗原和 / 或细菌抗原和 / 或寄生虫抗原。在此类型的一个具体实施方案中，该抗原的病毒来源是传染性法氏囊病病毒。在另一个实施方案中，抗原的病毒来源是传染性支气管炎病毒。在又一个实施方案中，抗原的病毒来源是呼肠孤病毒。在再一个实施方案中，抗原的病毒来源是新城疫病毒。在又一个实施方案中，抗原的细菌来源是大肠杆菌 (E.coli)。在再一个实施方案中，抗原的细菌来源是沙门氏菌属 (Salmonella)。在又一个实施方案中，抗原的细菌来源是弯曲杆菌属 (Campylobacter)。在再一个实施方案中，抗原的寄生虫来源是艾美球虫属 (Eimeria)。在此类型的一个具体实施方案中，疫苗所用的抗原是艾美球虫裂殖子、艾美球虫卵囊或其混合物的部分。在一个相关实施方案中，寄生虫的天然宿主是鸟类。在此类型的一个具体实施方案中，寄生虫是艾美球虫属，该寄生虫的天然宿主是鸡。

[0029] 本发明的多价疫苗也可包含一种或多种以下抗原 :产气荚膜梭菌 β 毒素、产气荚膜梭菌 β2 毒素、产气荚膜梭菌肠毒素、产气荚膜梭菌 ε 毒素、产气荚膜梭菌 ι 毒素、产气荚膜梭菌 κ 毒素、产气荚膜梭菌 λ 毒素、产气荚膜梭菌 θ 毒素、索氏梭菌 (C.sordellii) 出血毒素、索氏梭菌致死毒素、艰难梭菌 (C.difficile)A 毒素、艰难梭菌 B 毒素、败毒梭菌 (C.septicum)α 毒素、诺氏梭菌 (C.novyi)α 毒素和诺氏梭菌 β 毒素。

[0030] 在一种具体的本发明多价疫苗中，疫苗包含产气荚膜梭菌 α 类毒素，和 / 或产气荚膜梭菌 α 类毒素的抗原片段，和 / 或产气荚膜梭菌 α 毒素的灭活抗原片段，和 / 或其任何组合，而且还包含来自传染性法氏囊病病毒、和 / 或传染性支气管炎病毒和 / 或呼肠孤病毒、和 / 或新城疫病毒的一种或多种病毒抗原，和 / 或来自大肠杆菌、和 / 或沙门氏菌属、和 / 或弯曲杆菌属的细菌抗原，和 / 或来自艾美球虫属的寄生虫抗原。

[0031] 在一个替代实施方案中，本发明的多价疫苗基本上由单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素，和 / 或产气荚膜梭菌 α 类毒素的抗原片段，和 / 或产气荚膜梭菌 α 毒素的灭活抗原片段，和 / 或其任何组合组成。在一个相关实施方案中，疫苗还含有如本文所提供的病毒抗原和 / 或细菌抗原和 / 或寄生虫抗原。

[0032] 本发明的疫苗也可包含佐剂。一种常用动物佐剂是氢氧化铝佐剂。替代性佐剂可由油包水乳剂以及抗原组成。在此类型的一种具体疫苗中，按 70％油相和 30％水相制备油包水乳剂。在另一个实施方案中，佐剂尤其不是氢氧化铝佐剂。在一个这样的实施方案中，将包含非氢氧化铝佐剂的疫苗给予家禽。在一个具体实施方案中，疫苗包含产气荚膜梭菌 α 类毒素、佐剂和一种或多种得自病毒、细菌和 / 或细菌提取物的保护性抗原，所述保护性抗原可以是重组抗原或天然抗原。

[0033] 另一方面，本发明提供通过用本发明疫苗免疫鸟类以给鸟类提供主动免疫的方法。在一个具体实施方案中，用于这种主动免疫的疫苗剂量为约 0.05ml 至约 0.1ml。在一个实施方案中，鸟类为火鸡。在另一个实施方案中，鸟类为鸡。在再一个实施方案中，鸟类为雉。本发明也提供将本发明多价疫苗给予鸟类以保护其抵抗多种疾病的方法。

[0034] 本发明也提供给雌性动物（例如怀孕雌性动物）后代提供被动免疫的方法，所述方法包括在雌性动物后代出生之前将本发明疫苗给予雌性动物（例如母的动物）。在一个实施方案中，雌性动物为鸟类，在该雌性鸟类产下含有后代的卵之前将疫苗给予该雌性鸟类。按此方式对其后代提供被动免疫。在一个这样的实施方案中，鸟类为鸡。在另一个实施方案中，鸟类为火鸡。在再一个实施方案中，鸟类为雉。

[0035] 在一个具体实施方案中，所述方法对已接种疫苗的动物的后代提供针对梭菌疾病的被动免疫。在一个这样的方法中，梭菌疾病是梭菌肠病。在该类型的一个具体方法中，梭菌肠病是坏死性肠炎。在另一个这样的方法中，梭菌疾病是胆管肝炎。在再一个实施方案中，所述方法给已接种疫苗的动物的后代提供针对梭菌疾病的被动免疫，以及提供针对坏疽性皮炎、败血症和 / 或肝炎的保护作用。

[0036] 在一个实施方案中，给雌性动物后代提供被动免疫的方法，包括给予雌性动物多价疫苗以保护其后代抵抗多种疾病。在此类型的一个具体实施方案中，雌性动物在家禽家族中，而且其后代得到针对多种家禽疾病的保护性。

[0037] 在一个具体实施方案中，给雌性动物后代提供被动免疫的剂量为每剂约 0.25ml 疫苗。在另一个实施方案中，剂量为每剂约 0.4ml 疫苗。在再一个实施方案中，剂量为每剂约 0.6ml 疫苗。在以下说明性实施方案中，剂量为每剂约 0.5ml 疫苗。

[0038] 本发明还提供本发明的产气荚膜梭菌 α 类毒素疫苗的制备方法。一种这样的方法包括在培养基中培养产气荚膜梭菌细胞，以产生一定数量的培养细胞，使培养细胞将产气荚膜梭菌 α 毒素分泌到细胞培养基中。随后通过灭活所分泌的 α 毒素，制备产气荚膜梭菌 α 类毒素。从培养基中去除大部分培养细胞，形成产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液。在该方法的一个具体实施方案中，调节产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液的浓度，使其足以诱导已接种一剂或两剂、每剂 0.25-0.6ml 疫苗的动物（例如鸡）的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体有至少四抗毒素单位 (A.U.)。在一个这样的实施方案中，浓缩过程包括针对缓冲液的渗滤，以去除低分子量污染物。

[0039] 本发明产气荚膜梭菌 α 类毒素疫苗的制备方法还可包括将产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液与佐剂混合。在一个这样的实施方案中，产气荚膜梭菌 α 类毒素上清液在油包水乳剂中进行混合。在此类型的一个具体实施方案中，按 70％油相和 30％水相制备油包水乳剂。

[0040] 该方法所采用的产气荚膜梭菌细胞可来自单一产气荚膜梭菌类型细胞。在此类型

的一个具体实施方案中，单一产气荚膜梭菌类型细胞是产气荚膜梭菌 A 型细胞。在一个替代实施方案中，单一产气荚膜梭菌类型细胞是产气荚膜梭菌 C 型细胞。

[0041] 根据下面的发明详述，可更好地理解本发明的这些方面和其它方面。

[0042] 发明详述

[0043] 本发明提供针对产气荚膜梭菌的独特疫苗，这些疫苗能安全有效地预防动物梭菌疾病。在一个具体实施方案中，将本发明疫苗给予雌性动物受试者，导致雌性动物免疫并产生抗体，这些抗体可被动转移至其随后出生的后代。在一个实施方案中，本发明提供包含最小量的特异性单一产气荚膜梭菌类型的 α 类毒素的疫苗，该疫苗有效针对有害的产气荚膜梭菌感染。在一个具体实施方案中，疫苗包含本发明 α 类毒素与药学上可接受的佐剂的安全和免疫学上有效的组合。

[0044] 本发明的疫苗可用于保护动物以抵抗产气荚膜梭菌起作用的任何病症或疾病。这类疾病包括梭菌疾病。在此类型的一个实施方案中，梭菌疾病是梭菌肠疾病。因此，在一个具体实施方案中，本发明提供对预防家禽的称为坏死性肠炎的梭菌肠病有效的疫苗。本发明的疫苗也可预防其它疾病综合征，包括但不限于梭菌相关性肝炎、胆管肝炎和坏疽性皮炎。

[0045] 本发明公开了包含特异性的最小量的得自单一产气荚膜梭菌类型的 α 类毒素（即具有特异性的最小 TCP）的疫苗，所述疫苗保护已接种疫苗的雌性动物受试者的后代以免患坏死性肠炎等梭菌疾病，而无论任何其它致死毒素是否因攻击产气荚膜梭菌而表达。本发明还公开了引起已接种疫苗的雌性动物的特异性最小量抗 α 毒素反应的疫苗，该疫苗也保护已接种疫苗的雌性动物的后代以免感染梭菌疾病，无论天然存在的产气荚膜梭菌是否表达任何其它致死毒素。也可将本发明疫苗与可接受的佐剂一起给予。

[0046] 如下举例说明，出乎意料的是，用来自表达 α 毒素而非相应 β2 毒素的灭活产气荚膜梭菌 A 型分离株的疫苗给母鸡接种，导致三周龄后代鸡具有针对同时表达 α 毒素和 β2 毒素的产气荚膜梭菌菌株攻击的被动免疫。迄今为止，尚无针对这两种独特毒素的交叉保护的证据。因此，本发明提供能够刺激特异性最小量的抗 α 毒素的相对简单的疫苗，并因此保护动物以免感染梭菌疾病（例如坏死性肠炎），而不管产气荚膜梭菌攻击菌株所表达的其它毒素如何。

[0047] 事实上，尽管已证明产气荚膜梭菌产生的多种毒素和其它生物活性蛋白对动物具有致病作用，而且文献中关于这类不同毒素和其它蛋白质对坏死性肠炎的病理学作用也有多个引证，但是本文公开的独特疫苗给已接种疫苗的肉用母鸡提供针对产气荚膜梭菌的重要免疫反应，并对其随后出生的后代提供被动免疫。

[0048] 尽管本发明完全独立于任何理论或模型，但本文所提供的结果与产气荚膜梭菌 α 毒素作为必需和充分保护动物抗坏死性肠炎的抗原组分是一致的。尽管 β 毒素、β2 毒素和肠毒素对坏死性肠炎病理至关重要，但本文所提供的结果与 α 类毒素作为坏死性肠炎疫苗中必需仅有的类毒素是一致的。此外，由于 α 毒素通常在 A 型菌株中产量最高，所以产气荚膜梭菌 A 型菌株尤其可用作产气荚膜梭菌 α 毒素的来源。然而，也已成功地使用其它产气荚膜梭菌类型，尤其是当已经采用遗传修饰以增加这些其它类型的 α 毒素产生水平时。

[0049] 本文中所用的以下术语具有以下阐明的定义：本文所用的“保护性抗原”是使已接

种疫苗的动物和/或其后代产生抗感染和/或疾病的保护性特异性抗体的抗原。含有该保护性抗原的疫苗称为“免疫学有效”疫苗。

[0050] 对于特定蛋白质而言，本文所用的术语“抗原片段”是具有抗原性的蛋白质片段。例如，α 毒素或 α 类毒素的抗原片段是具有抗原性的 α 毒素或 α 类毒素的片段。本文所用的 α 毒素或 α 类毒素的抗原片段可分别为 α 毒素或 α 类毒素的任何片段，包括从全长蛋白质中丢失小至单个氨基酸的大片段。在一个具体实施方案中，α 毒素或 α 类毒素的抗原片段含有介于 6 至 120 个氨基酸残基。此外，给定 α 毒素的抗原片段可从重组来源获取，从天然来源分离的蛋白质中获取或通过化学合成获得。此外，可在 α 毒素、α 类毒素或其片段的蛋白水解消化后获得抗原片段，通过重组体表达获得抗原片段，或者通过从头合成（例如肽合成）而产生抗原片段。

[0051] 本文所用的产气荚膜梭菌 α 毒素的“灭活抗原片段”是保留至少一个抗原表位的产气荚膜梭菌 α 毒素抗原片段，但并不拥有使其有害的 α 毒素的充分催化活性。可单独使用这样的灭活抗原片段，或者可将其掺入融合蛋白中。

[0052] 本文所用的术语“α 类毒素”是指任何灭活 α 毒素（例如灭活全长 α 毒素），但并不以任何方式限制自灭活 α 毒素产生 α 类毒素的具体方法。这类灭活方法包括：(i) 修饰完整蛋白质的化学方法，例如甲醛或戊二醛处理；(ii) 加热等物理方法；(iii) 改变蛋白质的酶学方法，例如将毒素剪切成片段的蛋白酶；(iv) 重组方法，例如对 α 毒素基因进行遗传操作以去除或改变蛋白质的酶区域，但保留一个或多个抗原表位（参见例如 US 5,817,317，所述文献的内容都通过引用结合到本文中）；和/或上述的任何或所有方法的组合。

[0053] 本文所用的术语产气荚膜梭菌“α 类毒素上清液”是包含灭活产气荚膜梭菌 α 毒素的溶液，其中已去除至少大部分产生毒素的细胞（即去除 70％以上的细胞，而在一个具体实施方案中，去除 90％以上的细胞）。在一个具体实施方案中，已添加和/或培养/生长于培养基中的产气荚膜梭菌细胞已经将灭活产气荚膜梭菌 α 毒素分泌到培养基中，再将其灭活。在另一个实施方案中，灭活产气荚膜梭菌 α 毒素包括与细胞缔合的产气荚膜梭菌 α 毒素，已通过细胞溶解将其释放，再灭活。“α 类毒素上清液”的制备方法并不意味着限于从溶液中去除细胞或细胞碎片的任何具体方法，包括离心、柱色谱、超滤等。

[0054] 本文所用的“无细胞”溶液是已从培养物中去除 90％以上细胞的溶液。“无细胞”溶液的制备方法并不意味着限于从溶液中去除细胞或细胞碎片的任何具体方法，包括离心、柱色谱、超滤等。

[0055] 本文所用的术语“单一产气荚膜梭菌类型”是指一种产气荚膜梭菌类型（例如 A 型或 B 型或 C 型等），而不是多种类型（例如 A 型和 B 型和 C 型）。因此，包含“单一产气荚膜梭菌类型”的 α 类毒素的细胞、上清液、组合物、制剂、疫苗等是含有仅来自一种特定产气荚膜梭菌类型的 α 类毒素且不含来自任何其它产气荚膜梭菌类型的 α 类毒素的细胞、上清液、组合物、制剂、疫苗等。另一方面，这样的细胞、上清液、组合物、制剂、疫苗等可含有其它非 α 类毒素组分，包括其它产气荚膜梭菌类毒素和/或佐剂和/或免疫刺激物等。

[0056] 本文所用的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体的“抗毒素单位”即“A.U.”与“抗 α 毒素中和测试”单位即“TNT”单位可互换使用，根据小鼠生物测定中血清中和 α 毒素的毒性效应的能力来定义。在该测定中，将由国际标准［欧洲药典 (EU Pharmacopoeia)5.0.：

01/2005 :0088,第 803-804 页］建立的已知量的 α 毒素与来自已接种疫苗的动物的血清的连续稀释液混合。在室温下将该混合物孵育一小时,再经静脉内注射至小鼠体内。如果毒素被血清完全中和,则小鼠将会存活,否则就会死亡。求出抗毒素单位或效价,等于中和毒素的血清的最高稀释度的倒数。

[0057] 本文所用的术语“总结合力”缩写为“TCP”,按照 Batty[Toxin-Antitoxin Assay, Methods in Microbiology,第 8 章,第 5A 卷 (1971), JR Norris 和 DW Ribbons 编著］的描述来定义。在此测定中,将一定体积的 α 类毒素上清液与已知量的抗毒素单位接触。在提供合适培养时期以使抗毒素与 α 类毒素结合之后（例如在室温下一小时）,添加已知量的 α 毒素。再给予残余的游离抗毒素合适时期以使其与 α 毒素结合（例如在室温下一小时）。然后根据向溶液中添加底物以测定 α 毒素的酶活性,求出游离 α 毒素的量。合适底物包括红细胞（尤其是绵羊红细胞）和卵磷脂。随后可通过根据所求出的酶活性的数量计算,求出 α 类毒素的数量。测定液中含有的 α 类毒素量越大,则该测定所测得的酶活性的量也越高。

[0058] 术语“类型”和“生物型”可在本文中互换使用,是指根据各种毒素基因表达的产气荚膜梭菌的具体表型。根据四种主要毒素（α、β、ε 和 ι）的产生,对产气荚膜梭菌进行分型。产气荚膜梭菌 A 型产生 α 毒素 ;B 型产生 α、β 和 ε 毒素 ;C 型产生 α 和 β 毒素 ;D 型产生 α 和 ε 毒素 ;E 型产生 α 和 ι 毒素。已经描述了多达 17 种的产气荚膜梭菌外毒素。根据某些或所有其它梭菌毒素和 / 或酶的产生,对产气荚膜梭菌生物型进行分类。例如,产气荚膜梭菌 A 型的产肠毒素的致病型除产生 α 毒素之外,还可产生 θ 和 μ 毒素。

[0059] 本文所用的多价疫苗是包含两种或两种以上不同抗原的疫苗。在此类型的一个具体实施方案中,多价疫苗刺激接受者的免疫系统针对两种或两种以上不同病原体。

[0060] 术语“佐剂”和“免疫刺激物”可在本文中互换使用,定义为一种或多种引起免疫系统刺激的物质。在此情况下,用佐剂来增强针对一种或多种疫苗抗原的免疫反应。可在给予疫苗之前、与疫苗组合、或在给予疫苗之后,将佐剂给予目标动物。本发明的佐剂可从任何多种来源获得,包括从天然来源、重组来源获得和 / 或经化学合成获得等。用作佐剂的化合物实例包括但不限于铝化合物、可代谢和不可代谢的油、嵌段聚合物、ISCOM（免疫刺激复合物）、维生素和矿物质（包括但不限于 :维生素 E、维生素 A、硒和维生素 B12)、Quil A（皂苷 (saponin)) 和 CARBOPOL_。有时已被具体称为免疫刺激物的佐剂的其它实例包括细菌和真菌细胞壁组分（例如脂多糖、脂蛋白、糖蛋白、胞壁酰肽、β-1,3/1,6- 葡聚糖）、植物来源的各种复合碳水化合物（例如聚糖、乙酰化甘露聚糖 (acemannan)）、动物来源的各种蛋白质和肽（例如激素、细胞因子、共刺激因子）和病毒及其它来源获得的新核酸（例如双链 RNA、CpG)。此外,上述物质的任何数量的组合可提供佐剂效应,因此可构成本发明的佐剂。

[0061] 本文所用的“抗 α 毒素”是与 α 毒素结合的抗体（单克隆或多克隆）。α 毒素的抗体可通过如上所述的 TNT 测定来检测。或者,可通过它们对 α 毒素溶血效应的阻断能力来测定抗体。在溶血抑制测定中,将足以催化给定的绵羊红细胞制剂完全溶解的已知量 α 毒素与血清的连续稀释液混合,再在 36±2℃孵育一小时。然后将所得混合物与 0.5% 绵羊红细胞一起在 36±2℃孵育三小时。当抗体与 α 毒素结合时,该毒素不能使红细胞溶血。根据导致无溶血的血清的最高稀释度的倒数求出效价。在类似测定中,可通过测定阻断卵磷脂的酶促切割的抗血清的最高稀释度,来求出抗体与 α 毒素结合以抑制磷脂酶活

性的能力。

[0062] 本文所用的术语“多肽”与术语“蛋白质”可互换使用，并且还包括肽。因此，本文所用的多肽是两个或两个以上氨基酸通过肽键连接在一起的多聚体。本发明的多肽包括天然存在的蛋白质；重组蛋白；经化学合成的蛋白质；任何天然存在、重组或经化学合成的蛋白质的片段；以及包含任何天然存在、重组和/或经化学合成的蛋白质和/或其任何片段的融合蛋白。术语多肽优选用于表示包含 20 个或 20 个以上氨基酸残基通过肽键连接在一起的多聚体，而术语肽则用于表示包含 2-20 个氨基酸残基通过肽键连接在一起的多聚体。

[0063] 本文所用的“异源核苷酸序列”是通过重组方法添加到编码本发明蛋白质（例如本发明 α 毒素）或编码其片段（例如灭活抗原片段）的核苷酸序列中以形成并非自然界天然形成的核酸的核苷酸序列。这类核酸可编码融合蛋白。此外，本文所用的异源核苷酸序列不一定是单一的毗邻核苷酸序列，而可包括多个已与编码本发明多肽或其部分的核苷酸序列组合的非毗邻核苷酸序列。异源核苷酸序列可包含非编码序列，包括限制位点、调节位点、启动子等。在再一个实施方案中，异源核苷酸可用作检测本发明核苷酸序列的手段。本发明提供异源核苷酸序列，当与编码本发明多肽或其片段的核苷酸序列组合时，该异源核苷酸序列对编码本发明的所有融合蛋白而言是必需且充分的。

[0064] 本文所用的“基本上”由单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素和/或产气荚膜梭菌 α 类毒素的抗原片段、和/或相应 α 毒素的灭活抗原片段组成的疫苗，是含有免疫学有效量的单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素和/或产气荚膜梭菌 α 类毒素的抗原片段、和/或相应 α 毒素的灭活抗原片段以预防梭菌疾病的疫苗，但该疫苗不含免疫学有效量的任何其它已知预防梭菌疾病的抗原（例如另一产气荚膜梭菌抗原）或替代的产气荚膜梭菌类型 α 毒素、α 类毒素或其片段。这类疫苗还可包括与其它疾病有关的抗原，例如来自传染性法氏囊病病毒、呼肠孤病毒和新城疫病毒的病毒抗原；来自大肠杆菌、沙门氏菌属和弯曲杆菌属的细菌抗原；和例如来自艾美球虫属的寄生虫抗原。

[0065] 本文所用的术语“约”当用于特定剂量值时表示该剂量值是在指示值的 20％内，例如，约 0.5ml 的剂量可包括介于 0.4ml-0.6ml 间的剂量。

[0066] 产气荚膜梭菌 A 型的分离

[0067] 产气荚膜梭菌分离株（例如产气荚膜梭菌 A 型）可从感染动物的粪便样本和/或肠道刮取样本中获得。这些样本/刮取样本可在血琼脂板上划线，在 35±1℃厌氧条件下培养 24-48 小时，再单独挑取类似产气荚膜梭菌 A 型的菌落。为了证实它们就是产气荚膜梭菌 A 型分离株，进一步测定所选菌落的特征性产气荚膜梭菌 A 型生化特性，包括遗传组成。

[0068] 分离株中 α 毒素基因的存在可经遗传分析（例如 PCR）测定。通过使用卵黄的测定中卵磷脂酶活性和/或由采用绵羊红细胞的溶血测定来显示 α 毒素的表达。在一个具体实施方案中，在本发明疫苗的制备中使用表达高水平 α 毒素的产气荚膜梭菌分离株。所选产气荚膜梭菌分离株可在营养肉汤中厌氧条件下培养 4-24 小时。培养物可用例如福尔马林灭活，浓缩并掺混到该疫苗中。

[0069] 产气荚膜梭菌毒素

[0070] α 毒素-α 毒素由所有类型的产气荚膜梭菌产生。α 毒素是裂解卵磷脂生成磷酸胆碱和甘油二酯的多功能磷脂酶 C。当经静脉内给药时，已知 α 毒素对小鼠致死。α 毒素也能明显溶血。然而，红细胞的敏感性按红细胞来源的动物物种的不同而有很大差异。α

毒素也引起血小板聚集，血小板、白血球和其它体细胞溶解，以及导致血管通透性增加。

[0071] β 毒素 - β 毒素由产气荚膜梭菌 B 型和 C 型产生。β 毒素是肠道炎症和粘膜的大量损失、以及肠运动抑制的原因。β 毒素是分子量为 35kDa 的蛋白质，对蛋白水解酶（例如胰蛋白酶）远比其它产气荚膜梭菌毒素更为敏感。已报导 β 毒素对动物致死，其中小鼠最为敏感而鸡最不敏感。

[0072] β 2 毒素 - β 2 毒素是新近发现的产气荚膜梭菌毒素。尽管 β 2 毒素与 β 毒素名称相似，但两者氨基酸序列并无同源性。文献已显示 β 2 毒素与某些动物坏死性肠炎之间的高度相关性 [Garmory 等，Epidemiol. Infect. 124 :61-67(2000)，Herholz 等，J. Clin. Morco，二月 :358-361(1999)]。β 2 毒素的分子量为 28kDa。已发现 β 2 毒素对小鼠致死，对某些细胞系有细胞毒性，诱导细胞变圆并溶解而不影响肌动蛋白细胞骨架 [Manteca 等，Vet. Microb. 86 :191-202(2002)，Schotte 等，J. VetMed B 51 :423-416(2004)，Gilbert 等，Gene 203 :65-73(1997)]。

[0073] 肠毒素 - 肠毒素通常由产气荚膜梭菌 A 型菌株产生。传统上肠毒素的存在用于区分肠疾病相关性菌株和组织气性坏疽相关性菌株。引起气性坏疽的菌株通常没有肠毒素。肠毒素是分子量为 34kDa 的热敏蛋白。对小鼠的致死剂量约为 10 微克。肠毒素最初的作用是在宿主细胞中形成孔洞，继而改变细胞通透性，抑制大分子合成，破坏细胞骨架，最终导致溶解 [参见 Songer，Clin. Micro. Rev，9(2) :216-234(1996)]。肠毒素导致肠道细胞净运输的逆转。

[0074] ε 毒素 - ε 毒素由产气荚膜梭菌 B 型和 D 型产生。ε 毒素是以前毒素形式分泌的，由内源胰蛋白酶转化为强效的神经毒素。当经静脉内给予时，ε 毒素可使小鼠快速致死。ε 毒素对神经组织具有高亲和力，具有引起血管通透性的作用。ε 毒素也引起肠壁通透性，使大分子（包括 ε 毒素自身）进入血流。随后 ε 毒素通过血流流向脑部，在此破坏渗透平衡。这样的脑部渗透平衡的破坏导致在患病动物死亡之前所见的神经学症状。

[0075] κ 毒素 - κ 毒素是产气荚膜梭菌 A 型、D 型、E 型以及某些 B 型和 C 型所产生的胶原水解酶。K 毒素的分子量为 80kDa，对小鼠致死。小鼠经静脉内注射 K 毒素，因肺部大量出血而在一小时内死亡。

[0076] θ 毒素 - 大部分产气荚膜梭菌菌株都产生 θ 毒素。θ 毒素是 74kDa 蛋白质，是在血琼脂板上菌落周围形成可见溶血透明带的原因。纯化 θ 毒素可使小鼠快速致死，在数分钟内导致死亡。θ 毒素被某些甾体抑制，其中胆固醇是最有效的抑制剂。

[0077] 被动免疫

[0078] 本发明包括由最小量的本发明抗原（例如 α 类毒素）的安全和免疫学有效的制剂组成的疫苗，该疫苗用于对非人类雌性动物进行疫苗接种，尤其是对可生育和 / 或怀孕雌性动物，它们随后可将该疫苗的效应转移给其新生动物。从母体至后代的这类免疫转移称为“被动免疫”。被动免疫尤其可通过吮食初乳（例如在哺乳动物中发生）或从卵黄中将抗体吸收至血流中（如在家禽中发生）来完成。此外，如本文所公开，家禽可吸收卵内 (in ovo) 抗体，导致循环系统抗体水平升高。

[0079] 如本文所示，将特定量的抗 α 毒素被动转移至新生动物可保护新生动物抵抗烈性产气荚膜梭菌的攻击。如下文所公开，保护程度完全并非如迄今所预期的那样，据信肠道必须经过抗体浴 (bathed withantibody)，以便显著保护以抵抗口服产气荚膜梭菌 A 型的

攻击。同样，相当令人惊讶的是，在通过新生哺乳动物的初乳摄取与卵中母体抗体的吸收的粘膜免疫性的母体抗体转移之间存在相关性。如下文在鸡中所证明的那样，卵内抗 α 毒素抗体被吸收至血流中。此外，本发明公开了在母鸡血流中诱导的特异性、最小量的确定抗 α 毒素抗体效价，足以保护母鸡的经疫苗接种后代以免在其后代出生后数周内遭受产气荚膜梭菌 A 型攻击。

[0080] 主动免疫性

[0081] 本发明包括对雏鸡（例如肉用仔鸡）和 / 或火鸡雏进行疫苗接种，以提供针对坏死性肠炎、坏死性皮炎和坏疽性皮炎的主动免疫。在雏鸡和 / 或火鸡雏的生命早期进行疫苗接种，用单剂或两剂疫苗在约一日龄或略长（在生命第一周之内）时进行接种。达到主动免疫目的的合适疫苗剂量可在约 0.05ml 至约 0.5ml 范围内变化。在一个具体实施方案中，疫苗剂量为约 0.05ml 至约 0.1ml。

[0082] 细胞培养

[0083] 产气荚膜梭菌在生长期将 α 毒素分泌到培养基中。在灭活并从生长培养基中去除至少大部分细胞之后，所得溶液称为 α 类毒素上清液。通常去除细胞以尽量减少疫苗中的外源抗原，否则会促进反应性并降低免疫应答。然而，也存在少量与细胞缔合的 α 毒素。因此，α 毒素抗原可来自细胞和 / 或浓缩或非浓缩形式的培养基。

[0084] 产气荚膜梭菌可在烧瓶、瓶、壶或机械发酵罐等任何适当容器中进行培养。在培养期间可监控发酵，以便在 α 毒素产量达到峰值时收获发酵物。典型方法包括亲和色谱、凝胶电泳 (PHAST 系统等)、免疫测定、溶血素和卵磷脂酶活性测定。可用甲醛 (0.1-2.0％) 或甲醛与加热的组合来灭活细胞培养液或细胞提取物。通常用于蛋白质变性并可使用的其它化学试剂包括但不限于 :戊二醛、苯酚、各种去垢剂（例如 Triton X-100、十二烷基硫酸钠 (SDS)) 和醇类。灭活期间可监控残留的甲醛水平，以保持最佳水平而不高于或低于类毒素化水平。测定游离甲醛的典型方法见欧洲药典 (01/2005 :20418) 或 9 CFR(113.100)。类似方法可用于测定其它类型的毒素灭活剂。在某些实例中，可有意使 α 毒素处于低于类毒素化条件下，以便尽量减少对产生抗毒素至关重要的表位变性，接着在该方法的稍后时间里为脱毒而进一步处理。也可使用能够灭活毒素的其它合适化学或生物试剂，例如戊二醛、苯酚、各种去垢剂（例如 Triton X-100、十二烷基硫酸钠 (SDS)) 和醇类。

[0085] 在任何其它加工之前，可将所得 α 类毒素贮存一段时期，而没有有害作用。通常最佳贮存条件是在 2-8℃。然而，灭活梭菌类毒素极为稳定，也可在更高温度下贮存。对超过 6 个月的贮存期和高于 8℃的贮存温度而言，最好通过总结合力测试 (TCP) 或其它类似的免疫学测定，重新测定类毒素的功效以确定类毒素的免疫原性稳定性。

[0086] 可通过离心和 / 或过滤从灭活培养基中去除细胞，获得类毒素上清液。去除细胞的作用是降低由细胞组分导致的组织反应性，而且从制剂中去除外源抗原有助于免疫反应集中于疫苗的类毒素组分。

[0087] 可通过超滤（优选使用不大于 30,000 分子量截止值的超滤膜）或冻干等任何多种手段来浓缩灭活培养基。浓缩方法可包括针对水溶液（例如磷酸缓冲盐溶液）的渗滤，以从制剂中去除低分子量污染物。可一次或多次用甲醛和 / 或加热重新处理浓缩流体，直至合适测定表明该流体无残留毒性。这样的测定包括小鼠生物测定，即给小鼠注射流体并观察流体对小鼠的作用 ;或者测定溶血素活性或卵磷脂酶活性等。

[0088] 在混合之前可能要调节溶液 pH，以确保与佐剂结合、与油乳化和 / 或溶液稳定性最佳。α 毒素的等电点 (pI) 约为 5.5[Smith 等，ThePathogenic Anaerobic Bacteria，(第 3 版） Charles Thomas Publishers，第 116 页 (1984)]。类毒素溶液的 pH 调节可改变蛋白质上的净电荷，这有利于增强与某些佐剂（例如铝佐剂）的结合。也可将 pH 调节至在延长贮藏期后增加 α 类毒素稳定性的水平。例如，蛋白质在其 pI 下更可能从溶液中沉淀下来，但通常在此值以上或以下 1pH 单位下稳定。

[0089] 本发明多肽的编码核酸

[0090] 可将编码本发明多肽的核酸（例如 cDNA）用于产生表达本发明蛋白质和 / 或抗原（例如 α 毒素）的重组细菌宿主细胞。可使这样的重组宿主细胞灭活，也就是说，将其转化为菌苗，用于免疫原组合物，例如疫苗。

[0091] 此外，获得和 / 或构建编码本发明多肽的核酸（包括编码本发明 α 毒素或其灭活抗原片段的核酸）可有助于产生 α 毒素、α 类毒素或其片段。α 毒素、α 类毒素和 / 或两者任一的抗原片段可用于制备本发明的某些疫苗。

[0092] 因此，本发明包括允许本发明蛋白质和 / 或抗原片段表达和分离的核酸构建体。本领域技术人员熟知用于本发明这一方面的抗原的所述核酸序列及相应重组蛋白序列。下文提供可用于本发明疫苗的抗原小样品，及其 GenBank 检索号和公开其氨基酸序列的科学论文。

[0093] 可用于疫苗的抗原实例

[0094]

来源抗原	检索号	[1] 论文
产气荚膜梭菌		
α 毒素	CAA35186	Saint-Joanis 等，Mol.Gen.Genet.219 (3) :453-460(1989)
β 毒素	CAA58246	Steinthorsdottir 等，FEMS Microbiol.Lett. 130(2-3) :273-278(1995)
β2 毒素	NP_150010	Shimizu 等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 99(2) :996-1001(2002)
肠毒素	BAE79112	Miyamoto 等，J.Bacteriol.188(4) :1585-1598(2006)
ε 毒素	AAA23236	Havard 等，FEMS Microbiol.Lett.97 :77-

[0095] [1] 这些论文中提供的序列通过引用结合到本文中。

[0096]

		82(1992)

ι 毒素	CAA51959	Perelle 等，Infect. Immun. 61(12) :5147-5156(1993)
κ 毒素	NP 561089	Shimizu 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99(2) :996-1001(2002)
λ 毒素	CAA35187	Saint-Joanis 等，Mol. Gen. Genet. 219 (3) :453-460(1989)
θ 毒素	NP_561079	Shimizu 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99(2) :996-1001(2002)
艰难梭菌		
A 毒素	A37052	Wren 等，FEMS Microbiol. Lett. 70 :1-6 (1990)
B 毒素	CAA43299	von Eichel-Streiber 等，Mol. Gen. Genet. 233 :(1-2),260-268(1992)
败毒梭菌		
α 毒素	AAB32892	Ballard 等，Infect. Immun. 63(1) :340-344 (1995)
诺氏梭菌		
α 毒素	AAB27213	Ball 等，Infect. Immun. 61(7) :2912-2918 (1993)

[0097] [1] 这些论文中提供的序列通过引用结合到本文中。

[0098] 本发明疫苗所用的蛋白质抗原的编码核酸还可含有异源核苷酸序列。为了在宿主细胞中表达本发明重组蛋白，可构建包含相应 cDNA 的表达载体。因此本发明包括含有编码本发明重组蛋白（包括其变异体）的核酸的表达载体。

[0099] 由于核苷酸编码序列具有简并性，所以可将编码与本发明多肽的编码核酸所编码的氨基酸序列基本上相同的其它核苷酸序列用于本发明的实施中。这些包括但不限于等位基因、来自其它菌株的同源基因、和 / 或通过编码序列内同一氨基酸残基的不同密码子取代而改变的核苷酸序列，由此产生沉默改变。也包括含有本发明表达载体的宿主细胞。一种常用宿主细胞是大肠杆菌细胞。

[0100] 已经描述了克隆 cDNA 及表达其相应重组蛋白的通用方法 [参见 Sambrook 和 Russell，Molecular Cloning，A laboratory Manual， 第 3 版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor L. I. (2000)]。

[0101] 此外，可将本领域已知的任何诱变技术用于修饰本发明的天然 α 毒素，所述技术包括但不限于体外定点诱变 [Hutchinson 等，J. Biol. Chem.，253 :6551(1978) ;Zoller

和 Smith, DNA,3 :479-488(1984) ;Oliphant 等, Gene,44 :177(1986) ;Hutchinson 等, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,83 :710(1986) ;Wang 和 Malcolm, BioTechniques 26 : 680-682(1999),所述文献的内容全都通过引用结合到本文中]。TAB@ 接头 (Pharmacia) 等的使用和 PCR 技术也可用于定点诱变 [参见 Higuchi, " Using PCR to Engineer DNA" , 载于 PCR Technology :Principles andApplications for DNA Amplification, H.Erlich 编著, Stockton Press, 第 6 章, 第 61-70 页 (1989)]。

[0102] 本发明的多肽

[0103] 本发明包括分离和 / 或重组多肽,包括本发明的 α 毒素和 α 类毒素、其菌株变异体、其灭活抗原片段及其融合蛋白。此外,本发明也包括含有已改变序列的多肽,其中用功能等同的氨基酸残基来取代野生型氨基酸序列内的氨基酸残基,导致保守氨基酸取代。

[0104] 例如,序列内一个或多个氨基酸残基可被功能等同、极性相似的其它氨基酸取代,导致沉默变更。序列内的氨基酸取代可选自该氨基酸所属家族的其它成员。

[0105] 例如,非极性氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷 (碱性) 的氨基酸包括精氨酸和赖氨酸。带负电荷 (酸性) 的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。

[0106] 尤其优选的保守氨基酸交换为 :

[0107] (a)Lys 交换 Arg 或反之亦然,以保持正电荷 ;

[0108] (b)Glu 交换 Asp 或反之亦然,以保持负电荷 ;

[0109] (c)Ser 交换 Thr 或反之亦然,以保持游离 -OH ;

[0110] (d)Gin 交换 Asn 或反之亦然,以保持游离 NH_2 ;和

[0111] (e)Ile 交换 Leu 或交换 Val 或反之亦然,因为都是大致等同的疏水氨基酸。

[0112] 本发明的所有多肽 (包括抗原片段) 可作为融合蛋白的组成部分。在一个具体实施方案中,融合多肽在原核细胞中表达。例如,可将该融合蛋白用于增强抗原或其片段的抗原性,用于降低或去除其毒性而不消除其抗原性,或用于分离本发明的抗原。在后一情况下,可通过使用与抗原融合的蛋白质 / 多肽有特异性的亲和柱,以便分离融合蛋白。这样的融合蛋白包括谷胱甘肽 -S- 转移酶 (GST) 融合蛋白、麦芽糖结合蛋白 (MBP) 融合蛋白、FLAG 标记融合蛋白或聚组氨酸标记融合蛋白。Ser-Gly 接头等特异性接头序列也可作为该融合蛋白的组成部分。

[0113] 事实上,融合多肽的表达可促进稳定表达和 / 或允许根据融合配偶体的特性进行纯化。因此,本发明重组多肽的纯化可通过使用具有亲和力标记的融合蛋白而简化。例如, GST 与缀合在固相支持基质上的谷胱甘肽结合, MBP 与麦芽糖基质结合,而聚组氨酸与 Ni- 螯合支持基质螯合 [参见 Hochuli 等, Biotechnology 6 :1321-1325(1998)]。

[0114] 可用合适缓冲剂或通过用蛋白酶处理从特定基质上洗脱融合蛋白,该蛋白酶对已遗传操作而介于例如 α 毒素与其融合配偶体间的切割位点具有特异性。或者,可将 α 毒素与绿色荧光蛋白等标记蛋白结合 [Waldo 等, Nature Biotech.17 :691-695(1999) ;美国专利第 5,625,048 号和 WO97/26333,所述文献的内容通过引用全部结合到本文中]。

[0115] 或者,可将其它柱色谱步骤 (例如凝胶过滤、离子交换、亲和色谱等) 用于纯化本发明的天然或重组多肽 (见下文)。在许多情况下,这样的柱色谱步骤采用高效液相色谱或

类似方法来代替更为经典的基于重力的方法。

[0116] 此外，本发明的多肽（包括 α 毒素及其灭活抗原片段）可通过化学合成［参见例如 Synthetic Peptides：A User′ s Guide，W.H.Freeman & Co.，New York，N.Y.，第 382 页，Grant 编著 (1992)］。

[0117] 多肽纯化的通用程序

[0118] 一般而言，本发明多肽的起始纯化步骤可包括盐溶或盐析，例如硫酸铵分级分离；溶剂排阻分级分离（例如乙醇沉淀）。此外，高速超速离心可单独使用或与其它提取技术结合使用。

[0119] 通常良好的二次分离或纯化步骤包括使用磷酸钙凝胶、羟基磷灰石的固相吸收，或固相结合。可通过用阴离子交换剂（例如二乙氨基乙基 (DEAE)SEPHADEX 或二乙氨基乙基纤维素，或二乙基［2- 羟丙基］氨基乙基 (QAE)SEPHADEX 或二乙基［2- 羟丙基］氨基乙基纤维素）；或者用阳离子交换剂（例如羧甲基 (CM)SEPHADEX 或羧甲基纤维素，或磺酸基丙基 (SP)SEPHADEX 或磺酸基丙基纤维素）的离子键合来进行固相结合。固相结合的替代方法包括利用疏水相互作用，例如使用固相支持体（例如苯基琼脂糖凝胶）和高盐缓冲剂；亲和力结合免疫结合，使用例如与活化支持体结合的 α 毒素抗体。其它固相支持体包括含有特定染料或凝集素等的固相支持体。

[0120] 常在纯化过程结束时使用的其它固相支持体技术依赖于尺寸排阻，例如 SEPHADEX 和 SEPHAROSE 凝胶。或者，可采用使用尺寸排阻膜滤器的加压或离心膜技术。这两种方法通常串联使用。

[0121] 固相支持体分离通常用低速离心或通过柱色谱分批进行。高效液相色谱 (HPLC)（包括 FPLC 等相关技术）是进行液相色谱的目前最常用手段。也可借助于低速离心来完成尺寸排阻技术。此外，可采用尺寸渗透技术，例如凝胶电泳技术。通常在管、平板中或通过毛细管电泳实施这些技术。

[0122] 几乎所有涉及多肽纯化的步骤都采用缓冲溶液。除非另有说明，否则通常使用 25-100mM 的缓冲盐浓度。低浓度缓冲剂通常是指 5-25mM 浓度。高浓度缓冲剂通常是指介于 0.1-2.0M 浓度间的缓冲剂浓度。典型缓冲剂可从大多数生化目录购得，包括经典缓冲剂，例如三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、焦磷酸盐、单磷酸盐和二磷酸盐及 Good 缓冲剂，例如 Mes、Hepes、Mops、Tricine 和 Ches［Good 等，Biochemistry，5：467(1966)；Good 和 Izawa，Meth. Enzymol.，24B：53(1972)；Fergunson 和 Good，Anal.Biochem.，104：300(1980)］。

[0123] 实施所有这些技术的材料可购自多个商业来源，例如在 Missouri，St.Louis 的 Sigma Chemical Company。

[0124] 疫苗组分

[0125] 产气荚膜梭菌 α 类毒素：在具体实施方案中，动物疫苗最好是含有保护动物免患坏死性肠炎所需的最小量的 α 类毒素。下文所示的特定条件下该水平经测定为每剂 2 总结合力单位 (TCP)。根据内标设定 TCP 单位［Batty，Toxin-Antitoxin Assay，Methods in Microbiology，第 8 章，第 5A 卷 (1971)JR Norris 和 DW Ribbons 编著］，本发明疫苗容易混合以具有所需功效。如果疫苗还包含免疫刺激物，则甚至在这些条件下都可使用小于 2 TCP 单位。在任何情况下，优选该疫苗诱导每毫升动物血清中有四个以上的抗毒素单位。

[0126] 定量测定 α 类毒素：通常需要定量测定 α 类毒素以确保该疫苗包含优化水平。

一种定量测定类毒素的常规方法采用总结合力 (TCP) 测定。在此测定中，使指定体积的 α 类毒素上清液与已知量的抗毒素单位接触。在提供合适培养时间以使抗毒素与 α 类毒素结合之后（例如 0.5-2 小时），添加已知量的 α 毒素。随后给予合适时间使残余游离抗毒素与 α 毒素结合。随后通过向溶液中添加 α 毒素的磷脂酶 C 活性的底物，测定游离 α 毒素含量。合适底物包括红细胞（尤其是绵羊红细胞）和卵磷脂。随后可通过基于磷脂酶 C 活性的量的计算，定量测定 α 类毒素。测定液中 α 毒素含量越多，则该测定中所检测的磷脂酶 C 活性的量越大。或者，可在不测定磷脂酶 C 活性的情况下进行测定，例如可使用任何竞争性抗体结合分析，包括结合色谱步骤、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或通过 Biacore 仪器等的竞争性结合分析。

[0127] 其它抗原：梭菌疾病通常作为混合感染而发生，因此添加其它梭菌类毒素可进一步减少病理及临床症状。来自已知引起胃肠炎的有机体的其它梭菌类毒素（包括来自产气荚膜梭菌的梭菌类毒素）的非限制性实例包括：产气荚膜梭菌 β 毒素、β2 毒素、θ 毒素、ε 毒素、肠毒素、κ 毒素、λ 毒素和 ι 毒素；索氏梭菌出血毒素 (HT) 和致死毒素 (LT)；艰难梭菌 A 毒素和 B 毒素；败毒梭菌 α 毒素；以及诺氏梭菌 α (A) 毒素和 β (B) 毒素，可将它们添加到本发明疫苗中以增加抗混合感染的功效。

[0128] 本发明的疫苗也可包括来自其它细菌、病毒、真菌或寄生虫的抗原。这些抗原包括其它毒素或类毒素；细菌和 / 或细菌提取物；真菌和 / 或真菌提取物；病毒和 / 或病毒蛋白；和 / 或寄生虫或来自寄生虫的蛋白质。来自本文所提供的来源的合适病毒、细菌和寄生虫抗原是本领域众所周知的。

[0129] 细菌有机体的非限制性实例为：大肠埃希氏菌 (Escherichia coli)、弯曲杆菌 (Camplobacter spp.)、巴斯德氏菌 (Pasteurella spp.)、葡萄球菌 (Staphylococcus spp.)、链球菌 (Streptococcus spp.)、肠球菌 (Enterococcus spp.)、衣原体、丹毒 (Erysipelas spp.)、巴斯德氏菌属 (Pasteurella)、博德特氏菌属 (Bordetella) 和鸟杆菌属 (Ornithobacterium)。

[0130] 相关毒素的非限制性实例为：革兰氏阴性菌脂多糖 (LPS)，已知它增强疫苗的免疫反应并因此提高针对产气荚膜梭菌 α 毒素和霉菌毒素的抗毒素的产生。

[0131] 合适病毒的非限制性实例为：冠状病毒 (Coronavirus)、轮状病毒 (Rotavirus)、星状病毒 (Astrovirus)、类肠道病毒的病毒 (Enteroviruslikevirus)、环状病毒 (Torovirus)、腺病毒 (Adenovirus)、呼肠孤病毒 (Reovirus)、双 RNA 病毒 (Birnavirus)、疱疹病毒 (Herpesvims)、副粘病毒 (Paramyxovirus)、小核糖核酸病毒 (Picornavirus)、马立克氏病病毒 (Mareks Disease Virus)、出血性肠炎病毒 (Hemorrhagic Enteritis Virus) 和新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus)。

[0132] 寄生虫的非限制性实例为：球虫 (Coccidia)（例如艾美球虫 (Eimeria sp.)）和隐孢子虫 (Cryptosporidia)，[参见 US 2004/0018215A1，所述文献的内容通过引用全部结合到本文中]。

[0133] 佐剂

[0134] 佐剂也可用于改善免疫应答和 / 或增加疫苗制剂的稳定性。通常将佐剂描述为免疫系统的非特异性刺激物，但它也可用于靶向免疫系统的特异性臂 (arm)。可将一种或多种具有该活性的化合物添加到疫苗中。因此，具体的本发明疫苗还包含佐剂。可用作佐剂的化

合物的实例包括但不限于铝化合物（例如氢氧化铝）、可代谢和不可代谢的油、矿物油（包括二缩甘露醇油酸酯衍生物／矿物油溶液）（例如 MONTANIDE ISA 70,Seppic SA,France）和轻质矿物油（例如 DRAKEOL 6VR）、嵌段聚合物、ISCOM（免疫刺激复合物）、维生素和矿物质（包括但不限于：维生素 E、维生素 A、硒和维生素 B12）以及 CARBOPOL_。

[0135] 有时称为免疫刺激物的佐剂的其它合适实例包括但不限于：细胞因子，生长因子，趋化因子，来自淋巴细胞、单核细胞的细胞培养物上清液，来自淋巴器官的细胞，细胞制剂和／或来自植物、细菌或寄生虫的提取物（金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 或脂多糖制剂）或促分裂原。

[0136] 通常将佐剂与本发明抗原同时给药。然而，也可在疫苗接种之前两周的时期内和／或在疫苗接种之后的一段时期内给予佐剂，也就是说，只要抗原（例如 α 类毒素）保持在组织中即可。

[0137] 疫苗的制备

[0138] 也提供本发明疫苗的制备方法。在一个实施方案中，疫苗包含本发明抗原（例如单一产气荚膜梭菌类型的 α 类毒素上清液）与药学上可接受的佐剂的安全而免疫学有效的组合。α 类毒素的量可定为每剂疫苗含有至少 2 总结合力 (TCP) 单位。可浓缩 α 类毒素上清液以尽量减小所需剂量的体积，以获得已接种疫苗的动物的每毫升抗血清中有至少 4.0 抗毒素单位 (A.U.)。添加其它药学上可接受的免疫调节剂可使 TCP 需求降至每剂 2 单位以下，只要疫苗接种仍能使已接种疫苗的动物的每毫升抗血清中抗 α 毒素抗体有必需的 4.0 A.U. 即可。在某些实施方案中，通过例如但不限于浓缩／超滤、色谱和离心等技术，从 α 类毒素上清液进一步纯化产气荚膜梭菌 α 类毒素。

[0139] 疫苗的给予

[0140] 可按以下方式给予疫苗：液体制剂、乳剂、干粉和／或在喷雾中通过任何胃肠外途径、静脉内、腹膜内、皮内、通过划痕、皮下、肌内或通过粘膜途径（例如口服、鼻内）接种、作为气溶胶、通过滴眼剂、通过卵内给药、或作为冻干粉末植入。

[0141] 动物受试者

[0142] 术语“动物受试者”指能够被致病菌感染的动物物种，在一个具体实施方案中包括人类。合适的动物受试者也包括野生动物、家畜（例如为了获取肉、乳、油、蛋、毛皮、皮革、羽毛和／或羊毛而饲养的家畜）、驮畜、研究用动物、伴侣动物，以及在动物园、野生栖息地和／或马戏团中饲养的动物。

[0143] 在一个具体实施方案中，本发明的动物受试者为“食用”动物。为了本发明的目的，术语“食用”动物应理解为包括为了由人类和／或其它动物直接消费（例如火鸡、肉用鸡）或为了可消费（例如乳牛、产蛋母鸡等）而繁殖的所有动物。这些动物的非限制性实例包括鸟类，例如家禽（即鸡、火鸡、鹅、鸭、鸵鸟等）、牛 (bovine)（例如牛 (cattle)、乳牛、水牛）、羊（例如山羊或绵羊）、猪 (porcine)（例如家猪 (swine)、公猪 (hog)、仔猪 (pig)）和马 (equine)（例如马 (horse)）等。

[0144] 在另一个实施方案中，动物受试者为伴侣动物。为了本发明的目的，术语“伴侣”动物应理解为包括猫、狗（犬）、兔、马、啮齿类动物（例如豚鼠、松鼠、大鼠、小鼠、沙鼠和仓鼠）、灵长类动物（例如猴）和鸟类（例如鸽 (pigeon)、鸠 (dove)、鹦鹉 (parrot)、长尾鹦鹉 (parakeet)、金刚鹦鹉 (macaw)、金丝雀等）。

[0145] 也可包括其它动物以便受益于本发明疫苗，包括有袋类（例如袋鼠）、爬行类（例如饲养海龟）、猎鸟、天鹅、平胸类鸟以及其它经济上重要的家畜。

[0146] 以下实施例仅用于说明本发明，不得视为以任何方式限制本发明的范围。

[0147] 实施例

[0148] 实施例 1

[0149] 在通过皮下途径进行疫苗接种的肉用母鸡中的疫苗功效

[0150] 概述

[0151] 使用包含单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素（A 型）的疫苗通过皮下途径对肉用母鸡进行疫苗接种，导致 (i) 已接种疫苗的肉用母鸡中的免疫原性反应，(ii) 已接种疫苗肉用母鸡的卵中明显的抗 α 类毒素抗体，和 (iii) 对已接种疫苗的肉用母鸡的随后出生后代的被动保护。

[0152] 材料

[0153] 产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素：如下制备产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素：在厌氧条件下，在大规模发酵罐 (5000L) 中，于 37℃ ±2℃温度培养产气荚膜梭菌 A 型培养物。发酵期间添加氢氧化钠以维持 pH 为 7.8±2。发酵期间也添加碳水化合物（糊精）（最多 1％重量 / 体积）以促进生长。让培养物生长 3-6 小时。生长期结束时，向发酵罐内添加甲醛溶液至终水平不超过 0.5％。离心去除细胞，所得上清液用孔径范围为 0.25-2.0μm 的深层滤器过滤。在此过程中，将温度保持在 5℃ ±3℃。然后，将灭活培养物上清液渗滤，用不大于 20,000 分子量截止值的滤器进行超滤，将上清液浓缩 10-30 倍。浓缩上清液贮存在 2-8℃，用于随后掺合到疫苗中。在掺合之前，通过使用上述结合力测试 (TCP) 来测定浓缩上清液的效力。各批类毒素的效力均采用 TCP 单位 / 毫升。

[0154] 疫苗：将包含灭活产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素的上清液混合制成每毫升油包水乳剂含有 4 结合力单位 (TCP)。该乳剂按 70％油相和 30％水相制成。

[0155] 油相制备如下：

[0156] 矿物油 89.20％

[0157] 司盘 (Span)80 10.00％

[0158] 苯甲醇 0.75％

[0159] 三乙醇胺 0.05％

[0160] 水相制备如下：

[0161] 产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素 + 盐水 88％

[0162] 33％吐温 (Tween)80/ 盐水溶液 12％

[0163] 将总共 30％水相缓慢加入到 70％油相中，用 Silverson 均浆器乳化。（也可使用其它联机均浆器）。匀浆时间视乳剂体积而定，并根据乳剂在 37℃至少三天的粘度、粒度和稳定性来确定。向水相加入庆大霉素以使终浓度达到 30μg/ml 连续体积。向水相加入硫柳汞 (Thimerosol) 以使终浓度达到 0.01％连续体积。

[0164] 疫苗接种：用每剂 0.5ml 的掺合疫苗经皮下对第一年产蛋母鸡进行疫苗接种。在 14 周龄给予第一剂疫苗，在 20 周龄给予第二剂量。用每剂含有 1TCP 的上述掺合疫苗对 20 只肉用第一年产蛋母鸡进行疫苗接种。用每剂含有 2TCP 的上述掺合疫苗对第二组 20 只肉用第一年产蛋母鸡进行疫苗接种。将第三组 20 只肉用第一年产蛋母鸡作为对照，未对其进

行疫苗接种。将总共 2-3 只公鸡与各组第一年产蛋母鸡混养以产生受精卵。

[0165] 被动免疫性

[0166] 从 32、52 和 65 周龄的已接种疫苗和对照母鸡中收集鸡蛋。将这些蛋所孵化的后代鸡用于评价被动保护作用，见表 1。

[0167] 表 1

[0168] 在各时间点所用的后代鸡数目

[0169]

母鸡龄期	接种组的后代鸡	攻击对照组的后代鸡
32 周	9	9
52 周	30	20
65 周	14	18

[0170] 最初两周用未加药的高蛋白膳食喂养鸡，随后在试验剩余时间内改为正常喂养。用同时表达 α 毒素和 β 2 毒素的烈性产气荚膜梭菌 A 型对各鸡进行口服攻击。在 3ml 剂量中，攻击剂量含有每毫升 6.3×10^{7} 至 6.3×10^{8} 菌落形成单位。在 18 或 19 日龄开始对鸡连续攻击 3 天。在攻击最后一天后的两天，处死鸡，并检查坏死性肠炎病变。后代鸡的效力结果单独列于表 2-4，表示个体鸡的母亲的疫苗接种状态，以及按照以下等级量表评价的坏死性肠炎病变的程度（如果有的话）。表 2 表示来自 32 周龄母鸡的后代鸡，表 3 表示来自 52 周龄母鸡的后代鸡，表 4 表示来自 65 周龄母鸡的后代鸡。表 5 显示来自已接种每剂 2TCP 疫苗的母鸡的后代鸡的中位数评分。如表所示，相对于未接种疫苗母鸡的后代而言，已接种疫苗母鸡的后代显著受到保护能抵抗所给予的细菌攻击。

[0171] 坏死性肠炎 (NE) 病变的等级量表

[0172] 0 ＝小肠内没有坏死性肠炎总体病变 (gross lesion)；肠的弹性正常（打开后卷回其自身上）。

[0173] 1 ＝肠壁薄而松弛（肠打开时保持平整，但不卷回至正常位置）；粘膜上有过量或增稠的粘液覆盖，或者粘膜 (mucosa) 的病灶或多病灶轻微变红，或者浆膜管 (serosal vessel) 充血。

[0174] 2 ＝肠壁上单一或少量多病灶区域红肿；肠粘膜上单一或少量多病灶区域溃疡或坏死。

[0175] 3 ＝肠粘膜的广泛多病灶区域的坏死和溃疡 ± 粘膜表面上显著出血或纤维蛋白层或坏死碎片（土耳其毛巾状外观）。

[0176] 4 ＝死亡动物的坏死性肠炎总体病变评分为 2 以上。

[0177] 表 2

[0178] 32 周龄母鸡的个体后代鸡的坏死性肠炎病变评分

[0179]

未接种 未受攻击的对照	未接种 受攻击的对照	接种疫苗 1TCP/ 剂	接种疫苗 2TCP/ 剂

0 0 0 0	1 2 1 1 2 3 3 1 4	4 1 2 1 1 3 0 4 1 3 1 1 1	1 0 0 1 0 1 1 1 4
平均值＝ 0 中位数＝ 0	2.0 2.0	1.8 1.0	1.0 1.0

[0180] 表 3

[0181] 52 周龄母鸡的个体后代鸡的坏死性肠炎病变评分

[0182]

未接种 未受攻击的对照	未接种 受攻击的对照	接种疫苗 2TCP/ 剂

0	4	0
0	3	1
0	3	1
0	1	1
0	1	0
	2	1
	1	2
	1	1
	1	1
	2	0
	2	0
	2	0
	1	0
	1	1
	2	2
	2	0
	1	1
	2	0
	1	0
	1	0
		0
		2
		1
		0
		1
		0
		1
		0
		2
		0
平均值＝ 0 中位数＝ 0	1.7 1.5	0.6 0.5

[0183] 表 4

[0184] 65 周龄母鸡的个体后代鸡的的坏死性肠炎病变评分

[0185]

未接种 未受攻击的对照	未接种 受攻击的对照	接种疫苗 2TCP/ 剂

0 0 0 0	4 0 0 2 0 0 3 3 2 0 3 2 0 0 0 2 3 3	0 0 0 2 2 0 0 3 0 2 0 0 0 0
平均值＝0 中位数＝0	1.5 2.0	0.6 0.0

[0186] 表 5

[0187] 已接种 2 TCP 剂量疫苗母鸡的后代鸡的中位数评分

[0188] 母鸡后代的中位数坏死性肠类病变评分

[0189]

处理组	32 周龄	52 周龄	65 周龄
接种组 对照组	1 2	0.5 1.5	0 2

[0190] 抗体效价

[0191] 血清：从 33 和 78 周龄母鸡采血样。在室温下，让血液凝结 2-4 小时，离心后获得血清。血清贮存在 -10℃或更低温度下直至测定抗体效价。针对产气荚膜梭菌 α 毒素的抗体效价通过使用连续稀释和绵羊红细胞的溶血抑制测定评价如下：在 V 形底微量滴定板中制备各试验样品的连续稀释液（两倍）。向含有样品稀释液的各孔中加入已知量的 α 毒素。然后，这些滴定板于 36±2℃孵育一小时，使得自血清的抗体与 _ 毒素结合。在此孵育后，向孔中添加 0.5％绵羊红细胞液，这些滴定板于 36℃ ±2℃孵育三小时，使未结合的 α 毒素溶解红细胞。随后检查这些滴定板是否无溶血。显示无溶血的试验样品的最高稀释度的倒数被认为是终点。抗体效价见表 6-8。

[0192] 卵黄：处理卵黄，测定抗体效价。简而言之，分离卵黄，与市售提取缓冲剂 (Promega EGGstract System，Promega 目录号 G1531 和 G2610，Madison，Wisconsin) 混合。提取之后，获得 IgY 沉淀，随后用磷酸缓冲盐溶液重悬浮至卵黄的原体积。合并至少 5 个蛋的卵黄

提取物，使用如上所述的用于血清的溶血抑制（HI）测定来测定抗体效价。按照该方法，对40、52 和 64 周龄产蛋鸡的蛋中所收集的卵黄进行抗体效价评价。卵黄的抗体效价见表 9。

[0193] 表 6

[0194] 33 周龄个体母鸡血清中针对产气荚膜梭菌 A 型 α 毒素的抗体效价

[0195]

已接种的母鸡 (2TCP/ 剂)	对照母鸡 *
1024	1
8192	2
256	1
1024	2
1024	2
256	2
256	2
1024	2
5 12	1
64	1
几何平均值＝ 588	几何平均值≤ 2

[0196] * 为了计算几何平均值，将小于 2 的数值当作 1

[0197] 表 7

[0198] 78 周龄个体母鸡血清中针对产气荚膜梭菌 A 型 α 毒素的抗体效价

[0199]

已接种的母鸡 (2TCP/ 剂)	对照母鸡 *
512	2
32	2
128	2
512	2
128	1
16	1
1024	1
512	2
8192	2
128	4
64	2
512	8
64	16
1024	

[0200]

256 128	
几何平均值＝ 235	几何平均值＝ 2

[0201] * 为了计算几何平均值，将小于 2 的数值当作 1

[0202] 表 8

[0203] 不同时间点母鸡血清中的几何平均溶血抑制效价

[0204]

处理组	血清效价 （样本收集时的龄期）	
	33 周龄	78 周龄
接种组 (2TCP/ 剂）	588	235
对照组	≤ 2	2

[0205] 表 9

[0206] 不同时间点收集母鸡的卵黄溶血抑制效价

[0207]

处理组	卵黄效价 （收集蛋时的龄期）		
	40 周龄	52 周龄	65 周龄
接种组 对照组	515 ≤ 2	2048 2	64 ≤ 2

[0208] 实施例 2

[0209] 经肌内途径接种肉用母鸡的疫苗功效

[0210] 概述

[0211] 使用包含单一产气荚膜梭菌类型 α 类毒素（A 型）的疫苗，经肌肉途径给肉用母鸡接种，也会导致 (i) 已接种疫苗的肉用母鸡中的免疫原性反应，(ii) 已接种疫苗的肉用母鸡的蛋中明显的抗 α 类毒素抗体，和 (iii) 对已接种疫苗的肉用母鸡随后出生后代的被动保护。

[0212] 被动免疫

[0213] 用两剂 0.5ml 上述实施例 1 的疫苗（含 2TCP）给总共 14 只肉用第一年产蛋母鸡肌内接种。将另一组 40 只第一年产蛋母鸡用作对照。如上所述，将 3 只公鸡与各组第一年

产蛋母鸡混养。在 10 周龄给予第一剂疫苗，在 23 周龄给予第二剂。在 32 周龄收集母鸡的鸡蛋并进行孵化，以确定在实验性产气荚膜梭菌攻击之后后代鸡的被动保护。

[0214] 表 10 显示已接种疫苗母鸡和对照母鸡的后代鸡的坏死性肠炎发病率以及按照以上实施例 1 的等级量表所确定的其相应病变的中位数评分。表 11 显示个体后代鸡的坏死性肠炎病变的中位数评分。表 12 列出个体后代鸡的抗产气荚膜梭菌 A 型 α 毒素的抗体效价，而表 13 提供自 32 周龄的已接种疫苗母鸡和对照母鸡收集的鸡蛋的卵黄抗体效价。

[0215] 表 10

[0216] 发病率和坏死性肠炎病变

[0217]

处理组	鸡只数目	发病率 %	中位数评分	平均值评分
接种组	8	0 (0/8)	0	0
对照组	29	76(22/29)	2	1.7

[0218] 表 11

[0219] 32 周龄母鸡的个体后代鸡的坏死性肠炎病变评分

[0220]

未接种未受攻击的对照	未接种受攻击的对照	接种疫苗 2TCP/ 剂
0	1	0
0	2	0
0	1	0
0	0	0
0	0	0
0	1	0
	3	0
	0	0
	1	

[0221]

	0 2 2 1 3 3 3 2 2 3 1 3 0 2 0 0 3 2 4 4	
平均值＝0.0 中位数＝0.0	1.7 2.0	0.0 0.0

[0222] 表 12

[0223] 35 周龄个体母鸡的血清抗体效价 [2]

[0224]

已接种的母鸡 (2TCP/ 剂)	对照母鸡 [3]
128	1
512	1
65536	1
4096	1
1024	1
512	1
2048	1
1024	1
512	2

[0225]

256	1
1024	1
128	1
256	1
256	1
1024	1
1024	2
64	32
681	2
	2
	1
	2
	1
	1
	2
	2
	2
	1
	2
	32
	1
	2
	1
	1
	2
	1
	1
	1
几何平均值＝681	≤ 2

[0226] [2] 按照以上实施例 1 所述的溶血抑制测定所测量的产气荚膜梭菌 A 型 α 毒素的抗体。

[0227] [3] 为了计算几何平均值，将小于 2 的数值当作 1。

[0228] 表 13

[0229] 从 32 周龄母鸡所收集的卵黄的抗体效价

[0230]

处理组	溶血抑制效价
接种组	512
对照组	＜ 2

[0231] 实施例 3

[0232] 经皮下途径接种 SPF 白色来亨 (leghorn) 小母鸡的血清学抗体效价

[0233] 对皮下接种以上实施例 1 的疫苗 (含 1、2 或 3 TCP) 的 SPF 白色来亨小母鸡体内抗体效价进行评价。小母鸡在 15 周龄用 0.5ml 疫苗进行接种，初次接种后 4 周给予加强剂量。加强接种后 6 周采血样。按照以上实施例 1 所述的溶血抑制测定来评价各个体鸟血清的抗体效价。

[0234] 表 14

[0235] 针对产气荚膜梭菌 A 型 α 毒素的个体小母鸡血清抗体效价

[0236]

1 TCP/ 剂		2 TCP/ 剂		3 TCP/ 剂		对照	
鸡编号	效价	鸡编号	效价	鸡编号	效价	鸡编号	效价 *
923	4096	932	1024	922	1024	921	4
924	1024	938	8192	927	64	928	＜ 2
925	4	940	512	931	2048	929	2
926	2048	942	1024	935	4096	933	2
930	512	943	2048	945	1024	937	2
941	1024	948	2048	947	2048	946	2
953	32	949	2048	952	1024	957	2
954	2	950	2048	956	128	966	＜ 2
955	32	951	512	959	512		
962	512	958	512	960	64		
965	4096	961	512	963	2048		
967	512	964	2048	968	2048		
几何平均值	242		1290		724		≤ 2

[0237] * 为测定几何平均效价，将小于 2 的效价当作 1

[0238] 对自 25 周龄白色来亨产蛋鸡收集的鸡蛋的抗体效价进行溶血抑制效价评价。结果见表 15。

[0239] 表 15

[0240] 针对产气荚膜梭菌 A 型 α 毒素的合并卵黄抗体效价

[0241]

组别	疫苗	抗体效价
1	1 TCP	512
2	2 TCP	512
3	3 TCP	512
4	对照	＜2

[0242] 对白色来亨母鸡合并血清的毒素中和效价(TNT)测定

[0243] 用小鼠评价母鸡合并血清中针对产气荚膜梭菌A型α毒素的抗毒素效价。采用美国农业部动植物卫生检疫局联邦法典汇编(Code ofFederal Regulations,Animal and Plant Health Inspection Service,Department of Agriculture)所述方法,测定合并血清的抗毒素效价。用于测定抗毒素的方法类似于现行9 CFR§113.111(c),只是使用α毒素和抗毒素试剂代替β毒素和抗毒素。以下检测试剂用于测定抗毒素效价:

[0244] 1)产气荚膜梭菌A型α抗毒素:IRP 426(得自Center forVeterinary Biologics,USDA)。

[0245] 2)产气荚膜梭菌A型α毒素IRP 446(得自Center for VeterinaryBiologics,USDA)。

[0246] 简而言之,将稀释标准抗毒素或血清与已知量的标准α毒素混合。随后给小鼠注射该混合物,测定未中和毒素的存在。再在生物测定中通过测定保护小鼠免于死亡的标准或试验血清稀释度,来评价已知量的标准α抗毒素对毒素活性作用的比较。白色来亨小母鸡合并血清的抗毒素效价见下表16。

[0247] 表16

[0248] 已接种疫苗小母鸡和对照小母鸡的毒素中和效价(TNT)

[0249]

组别	疫苗	血清抗毒素效价	
		疫苗接种前	疫苗接种后
1	1 TCP	＜1	≥2而＜4
2	2 TCP	＜1	≥4
3	3 TCP	＜1	≥4
4	对照	＜1	＜1

[0250] 实施例4

[0251] 经肌内途径接种的SPF白色来亨小母鸡的血清学抗体效价

[0252] 对使用以上实施例1的疫苗(含1、2或3 TCP)进行两次肌内接种的SPF白色来亨小母鸡进行抗体效价评价。小母鸡在10周龄用0.5ml疫苗进行接种,初次接种后4周给

予加强剂量。加强接种后 7 周采血样。按照以上实施例 1 所述的溶血抑制测定，评价个体小母鸡血清的抗体效价，结果见下表 17 和表 18。

[0253] 表 17

[0254] 针对产气荚膜梭菌 A 型 α 毒素的个体小母鸡血清抗体效价

[0255]

1 TCP		2 TCP		3 TCP		对照	
鸡编号	效价	鸡编号	效价	鸡编号	效价	鸡编号	*效价
951	256	631	1024	646	4096	661	＜2
952	128	632	2048	647	4096	662	＜2
953	1024	633	2048	648	2048	663	8
954	128	634	256	649	2048	664	＜2
955	2048	635	128	650	4096	665	8
956	512	636	2048	651	2048	666	4
957	1024	637	512	652	2048	667	＜2
958	256	638	2048	653	1024	668	＜2
960	512	639	1024	654	4096	669	＜2
961	2048	640	2048	655	4096	670	＜2
962	1024	641	2048	656	4096	671	＜2
964	1024	642	1024	657	4096	672	＜2
965	256	643	1024	658	1024	673	16
		644	512	660	1024	674	16
		645	2048	966	4096	675	16
几何平均值	540		1024		2580		3

[0256] *为了测定几何平均效价，将大于 2 的效价当作 1

[0257] 使用以上实施例 3 所述的程序来评估母鸡合并血清的毒素中和效价 (TNT)，结果见下表 18。

[0258] 表 18

[0259] 已接种疫苗小母鸡和对照小母鸡的毒素中和效价 (TNT)

[0260]

组别	疫苗	血清抗毒素效价	
		疫苗接种前	疫苗接种后
1	1 TCP	＜1	≥4
2	2 TCP	＜1	≥4
3	3 TCP	＜1	≥4
4	对照	＜1	＜1

[0261] 按照以上实施例1所述，对自25周龄白色来亨产蛋鸡收集的鸡蛋的抗体效价进行溶血抑制效价评价。结果概述于下表19。

[0262] 表19

[0263] 针对产气荚膜梭菌A型α毒素的合并卵黄抗体效价

[0264]

组别	疫苗	抗体效价
1	1 TCP	512
2	2 TCP	256
3	3 TCP	512
4	对照	＜2

[0265] 实施例5

[0266] 猪多价和单价产气荚膜梭菌α类毒素疫苗的比较

[0267] 概述

[0268] 描述了通过使用本发明产气荚膜梭菌A型α类毒素疫苗接种怀孕经产母猪(sow)/初产母猪(gilt)而给新生仔猪提供被动保护的方法。结果表明经产母猪抗体应答可通过初乳转移给仔猪。

[0269] 材料

[0270] 产气荚膜梭菌A型α类毒素：按照以上实施例1所述，制备产气荚膜梭菌A型α类毒素。

[0271] 疫苗：可将本发明疫苗与含有＞2总结合力单位的灭活产气荚膜梭菌A型α类毒素混合。可将该疫苗与本文公开的任何佐剂混合，所述佐剂包括含有矿物油、植物油（花生油、大豆油）、角鲨烯、角鲨烷和其它可代谢油类的水包油乳剂。皂苷(Seponin)、CARBOPOL_和含铝佐剂（氢氧化铝、磷酸铝）等其它佐剂也可用于疫苗制备。疫苗还可含其它抗原，包括大肠杆菌(K88、K99、987P、1型)、来自产气荚膜梭菌的类毒素和/或来自包括艰难梭菌、

轮状病毒和 / 或隐孢子虫 (Cryptosporedia) 等其它致病菌在内的类毒素。

[0272] 给药

[0273] 怀孕初产母猪 / 经产母猪在产仔猪之前经肌内或皮下途径接种疫苗，以便通过吮食初乳给新生仔猪提供被动保护。

[0274] 结果

[0275] 在 32 周龄仔猪中进行三种疫苗的比较研究 ：

[0276] 疫苗 #1 ：与含有 4 TCP 产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素的氢氧化铝

[0277] 佐剂混合，每剂 2ml。

[0278] 疫苗 #2 ：与 4 TCP 产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素、大肠杆菌 K88、大肠杆菌 K99、大肠杆菌 987P、大肠杆菌 1 型和产气荚膜梭菌 C 型 β 类毒素混合，每剂 2ml。

[0279] 疫苗 #3 ：制备成不含产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素、但含有大肠杆菌 K88、大肠杆菌 K99、大肠杆菌 987P、大肠杆菌 1 型和产气荚膜梭菌 C 型 β 类毒素的安慰剂 (placebo) 疫苗，每剂 2ml。

[0280] 用 2ml 疫苗 #1 对第一组 10 只仔猪进行肌内接种。用 2ml 疫苗 #2 对第二组 10 只仔猪进行肌内接种。用 2ml 疫苗 #3 对第三组 7 只仔猪进行接种。初次接种后 20 天给予 2ml 的加强剂量。初次接种 (第 0 天)、加强接种后 20 天 (第 40 天) 及加强接种后 41 天 (第 61 天) 时采血样。随后按照以上实施例 1 所述的溶血抑制测定，评价血清样品中针对 α 毒素的抗体效价。三种疫苗的结果分别独立示于表 20-22。

[0281] 表 20

[0282] 单价产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素疫苗

[0283]

溶血抑制效价			
仔猪 #	第 0 天 (接种前)	第 40 天	第 61 天
10268	32	256	256
10277	2	8	8
10278	16	32	32
10295	16	64	128
10307	16	64	128
10312	8	64	64
10316	2	16	16
10317	---	64	64

10324	64	128	256
10331	16	32	32
几何平均值	12	49	60

[0284] 表 21

[0285] 产气荚膜梭菌 A 型 α 类毒素与大肠杆菌 -

[0286] 产气荚膜梭菌 C 型 β 类毒素的联合疫苗

[0287]

溶血抑制效价			
仔猪 #	第 0 天（接种前）	第 40 天	第 61 天
10264	16	64	64
10266	32	128	128
10269	2	32	32
10276	2	256	256
10280	8	32	32
10282	4	32	32
10287	16	64	64
10290	16	256	256
10321	16	128	64
10330	4	64	64
几何平均值	8	79	74

[0288] 表 22

[0289] 大肠杆菌 - 产气荚膜梭菌 C 型 β 类毒素

[0290]

溶血抑制效价			
仔猪 #	第 0 天（接种前）	第 40 天	第 61 天

第 3 组	第 0 天	第 40 天	第 61 天
10272	4	32	32
10292	16	32	32
10303	2	16	16
10305	2	32	32
10313	8	8	8
10318	4	16	16
10319	4	64	64
几何平均值	4	24	24

[0291] 实施例 6

[0292] 已接种疫苗经产母猪的合并血清的毒素中和效价 (TNT) 测定

[0293] 将四只怀孕经产母猪平均分为两个处理组。一组经肌内途径接种 2.0ml 疫苗 (在 2ml 剂量以上实施例 5 的疫苗 #1 中含有 4 TCP)。另一组为未接种的对照。这些经产母猪在产仔猪前大约 6-7 周进行疫苗接种,3 周后给予加强剂量。在疫苗接种之前以及恰好在产仔猪之前采血样。表 23 显示使用以上实施例 3 所述的毒素中和测定 (TNT),评价血清样品中针对 α 毒素的抗毒素效价。

[0294] 表 23

[0295] TNT 效价

[0296]

处理组	经产母猪编号	接种前 (TNT)	加强接种后 (TNT)
接种	10614	＜ 1	＞ 4 ＜ 8
接种	10616	＜ 1	＞ 4 ＜ 8
对照	10615	＜ 2	＜ 2
对照	10617	＜ 1	＜ 2

[0297] 本发明的范围并不受本文所述的具体实施方案的限制。事实上,根据上文描述,除本文所述之外,本发明的各种修改对本领域技术人员将是显而易见的。这些修改将会落入所附权利要求书的范围内。

[0298] 还应理解对核酸或多肽所给出的所有碱基大小或氨基酸大小、以及所有分子量或分子质量值均为近似值,都是为了描述的目的而提供。本文引用的各种出版物的公开内容都通过引用全部结合到本文中。