

發明專利說明書 200418874

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：93111042 (931082021分第1)

※申請日期：89年04月29日

※IPC分類：C07K 14/205

壹、發明名稱：

A61K 39/16

A61P 31/04

(中) 預防彎曲桿菌移生之被動式疫苗、及其製備方法

(外) Passive vaccine for the prevention of campylobacter colonization,
and its preparation method

貳、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) 艾克佐諾貝爾公司

(英) AKZO NOBEL N.V.

代表人：(中) 1. 佛 赫曼 2. 赫 派格特

(英) 1. HERMANS, F. G. M. 2. PEGT, H.

地 址：(中) 荷蘭六八二四亞漢維普路七十六號

(英) Velperweg 76, 6824 BM Arnhem, The Netherlands

國籍：(中英) 荷蘭 NETHERLANDS

參、發明人：(共 3 人)

1. 姓 名：(中) 安東尼斯 約克斯

(英) JACOBS, ANTONIUS ARNOLDUS CHRISTIAAN

地 址：(中) 荷蘭克索五九九五·奧德斯街二號

(英) Ondersteweg 2, 5995 PS KESSEL, The Netherlands

2. 姓 名：(中) 喬哈尼斯 丹保思

(英) VAN DEN BOSCH, JOHANNES FRANCISCUS

地 址：(中) 荷蘭包米爾·史波斯街九號

(英) Spoorstraat 9, 5831 CH Boxmeer, The Netherlands

3. 姓 名：(中) 派圖斯 紐坦

(英) NUIJTEN, PETRUS JOHANNES MARIA

地 址：(中) 荷蘭霸克斯米爾林迪十號

(英) De Linde 10, 5831 RD Boxmeer, the Netherlands

肆、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 歐洲 ; 1999/04/09 ; 99 201086.8 ☒ 無主張優先權

(1)

玖、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於對抗彎曲桿菌移生之疫苗、彎曲桿菌蛋白質與抗彎曲桿菌抗體在製備上述疫苗上的用途及此疫苗製備之方法。

【先前技術】

彎曲桿菌屬細菌為革蘭氏陰性螺旋形病原性細菌，具有高運動性並在細胞之一端或兩端帶有鞭毛。已發現數種彎曲桿菌菌種。空腸彎曲桿菌最常發現於家禽。在豬隻中經常發現結腸彎曲桿菌及近期發現的（較低程度）豬腸彎曲桿菌。

當然，空腸彎曲桿菌是與人類腹瀉相關的彎曲桿菌中最常被分離者。有愈來愈多的證據說明人類受彎曲桿菌感染的數目超過受沙門氏菌感染的數目（Griffiths et al., Journ. Of Applied Bacteriology 1990, 69:281-301, Walker et al., Microbiological reviews 1986, 50: 81-84, Butzler, J.-P., ISBN 0-8493-5446-3, RIVM Report No. 216852002, Bilthoven, the Netherlands）。避免人類受彎曲桿菌感染是困難的，因為，首先，彎曲感菌為經食物傳輸之人畜共同傳染之細菌，不論野生及馴養、健康及患病的動物皆為其帶菌者。再者，該菌有多種不同的傳播途徑。細菌可在如屍體的表面及水中以休眠球菌形式生存數週。因此，該菌可經與動物直接接觸或藉污染的水或食物如奶或肉而輕

(2)

易地傳播於人。空腸彎曲桿菌出現於許多健康動物，例如鳥類如火雞與雞、牛、羊、馬及齧齒類。已知作為世界上許多國家重要營養源之雞肉是經常受彎曲桿菌污染的（Shane(1992), S.M., *Avian Pathology* 21: 189-213）。開發中國家不是唯一的例子，如歐洲亦然。彎曲桿菌寄居於家禽腸中。肉類污染經常發生於屠宰場中，在通常受彎曲桿菌污染的腸道自動物清出時。屠宰時的污染是難以避免的。在荷蘭，雖在肉食工業上採用高度衛生標準，仍有約 50% 的雞肉受污染。C.M. Karssen 的論文提出近期家禽彎曲桿菌流行病學綜述（ISBN 90-71463-72-9）。在這種高污染壓力下，因處理或食用未烹煮之家禽肉，僅荷蘭每年就有約 300,000 人遭受彎曲桿菌感染。這種狀況在其他歐洲國家並無顯著差異。以全球計，估計每年發生超過 400,000,000 起病例（Pace et al., *Vaccine* 1998, 16: 1563-1574）。彎曲桿菌造成人類腸感染，及偶發更嚴重疾病如流產、腦膜炎、闌尾炎與尿道感染（Blaser et al., *New Engl. J. Med.* 1981, 305: 1444-1452, Butzlet et al., *Clinics in Gastroenterol.* 1979, 8: 737-765）。並且，有時亦可見到神經性併發症如 Guillain-Barre 症及 Miller-Fisher 症（Schwerer et al., 1995, *J. Endotox. Res.* 2: 395-403 和 Salloway et al., 1996, *Infect. Immun.* 64: 2945-2949）。空腸彎曲桿菌所致腹瀉通常為自我限制性感染，持續約 2 至 7 日。對於幼童、老人及免疫缺乏患者，該疾病則為非自我限制性而需抗生素治療。

(3)

很清楚地，若得到人類用之對抗彎曲桿菌的潛力疫苗，將可避免人類遭受感染。然而這將需要一種能與對抗如腮腺炎和麻疹之接種法相比較的標準接種法。很明顯的這並不實際。較合邏輯的作法在於避免由動物至人的傳播，特別是由家禽至人。最容易的方法是對家禽接種對抗彎曲桿菌感染之疫苗。然而家禽接種（人類接種亦然）之結果較最初預期複雜許多。這是因為彎曲桿菌即使移生於腸，對家禽並不致病。最常測試的疫苗是不活化全細胞製劑，全身性或口服投給，有時與佐劑併用。在某種程度上可減少部分病例之腸移生作用，但無避免移生作用之疫苗實例。這些疫苗中沒有任何一種可停止彎曲桿菌的散布。若與次單位疫苗相較，死體全細胞疫苗曾被考慮作最好的疫苗候選者，因理論上其仍具有所有可能的免疫原性決定位。對比全細胞疫苗的開發，鞭毛基礎次單位疫苗的開發投入了更多努力。在公認的感染過程中，鞭毛被認為是免疫決定性抗原，且多數研究曾指出此種蛋白質在保護作用中的角色（Martin et al., Inf. And Immun. 1989, 57: 2542 – 2546, Wenman et al., J. Clin. Microbiol. 1985, 21: 108 – 112）。無鞭毛突變體已知不會移生於腸，其在一或二週內由受感染動物中消失，而野生型細菌則仍然出現在腸中。從而鞭毛顯然為最可能的疫苗製劑用候選者，特別是因為，它們在腸移生作用中所扮演的關鍵角色，若非其唯一角色。若能預防移生作用，第一步是排除家禽的污染。然而，基於彎曲桿菌鞭毛之潛力疫苗卻未曾發揮可接受

(4)

程度的保護作用。

對比上述主動免疫接種，被動免疫接種亦曾受測作為降低彎曲桿菌感染之工具。Tsubokura 等人（1997，Clin. Exp. Immunol. 108：451－455）曾口服施給以空腸彎曲桿菌攻擊之對抗完整空腸彎曲桿菌細胞之抗體。他們宣稱在經此接種之雞排泄物中所發現之細菌數目減少了 1 至 2 個數量級。迄今全部所做努力尚未導致任何活體的、不活化的或以次單位為基礎的疫苗，其能顯著減低移生的程度及排泄物中所散布細菌數量。很清楚地，仍有可靠且安全的疫苗或替代性治療法的需要。

原則上，並不需要在家禽的整個生命期保護其對抗彎曲桿菌感染。牠們不會因感染而致病已解釋如前。因此，若某治療法能在屠宰前短暫減低細菌數量之感染壓力，則其為抑制隨後在屠宰時肉品污染之有效治療法。而如此將預防肉類傳播的人類彎曲桿菌感染。

【發明內容】

本發明之目標為提供一種疫苗，其可降低移生與散布兩者之程度，甚或由家禽盲腸消除彎曲桿菌。如此可避免肉品在屠宰時受彎曲桿菌污染而避免隨後感染人類。

現在有令人驚訝的發現，具有這些特徵的疫苗可植基於對抗彎曲桿菌無鞭毛突變體的抗體。這是高度意外的，因為如同上述，鞭毛被視為參與黏附與移生的關鍵蛋白質。更令人驚訝的是，此種疫苗會減低野生型具鞭毛之彎曲

(5)

桿菌的移生與散布。這是首次報告有疫苗甚至可由盲腸消除彎曲桿菌至偵測程度以下。

從而，本發明之一種具體實施例係關於避免彎曲桿菌在動物中移生之疫苗，該疫苗包含對抗無鞭毛彎曲桿菌菌株之抗血清。

此種疫苗之非常簡單型式可僅包含分離的對抗彎曲桿菌之抗血清或含稀釋液。若抗體力價過高，可添加此種稀釋液以稀釋抗血清。稀釋液可簡單如蒸餾水，或生理性鹽溶液。實際上可使用任何醫藥上可接受的稀釋液。

本發明同樣可用於家禽、豬和其他動物之彎曲桿菌污染。

然而已知雞肉之高污染壓力，此類具體實施例之較佳型式係關於空腸彎曲桿菌品種之無鞭毛彎曲桿菌菌株，及關於家禽。

任何無鞭毛彎曲桿菌菌株皆可用於製作抗血清。特別是生長速率可媲美野生型菌株之無鞭毛彎曲桿菌為其較佳者。某非常適於製作抗體的無鞭毛彎曲桿菌菌株曾述於 Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M.C. and van der Zeijst, B.A.M. 1991 EMBO Journal 10: 2055 – 2061。

從而，無鞭毛彎曲桿菌菌株用以製作對抗該菌株之抗體，其較佳型式為菌株 R 2。

適用於依據本發明之疫苗之抗體，可由多株血清、單特異性血清或由單株抗體培養而取得。多株血清所具優點為其能依標準技術容易地製造。生產及處理多株血清之技

(6)

術已周知於此項技藝（例如 Mayer and Walter, eds. *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Academic Press, London, 1987）。適於製作抗體的動物為如母牛、兔、小鼠及雞。取得對抗彎曲桿菌之牛抗血清之有效方法已述於 Hilpert et al., 1987, *J. Inf. Diseases* 156: 158-166。另一種吸引人的抗體大量生產方法，即在卵黃中生產，已述於 Hatta et al., 1993, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 450-454。

本發明之另一種具體實施例係關於，對抗無鞭毛空腸桿菌菌株抗體之用途，該抗體用於製備對抗空腸彎曲桿菌移生之疫苗。

更令人驚訝的是發現到，對抗無鞭毛空腸桿菌突變體所製抗血清，確認出三個主要蛋白質帶。由空腸彎曲桿菌全部蛋白質所做西方吸漬法，有 97kD (± 5 kD)、60kD (± 5 kD) 帶及 13kD (± 3 kD) 帶，這是使用對抗野生型空腸桿菌之抗血清所未見到的。這種現象可同時見於野生型彎曲桿菌及無鞭毛彎曲桿菌之西方吸漬法。從而，這三種蛋白質同時存在於野生型及無鞭毛之彎曲桿菌菌株。因此可下結論，免疫系統對這些特異性蛋白質所作之確認動作，只發生在缺乏鞭毛之狀況下。

如上所述，對抗無鞭毛彎曲桿菌突變體之抗血清，可由盲腸消除彎曲桿菌至偵測量以下。這種抗血清不同於對抗野生型彎曲桿菌之抗血清（不能消除彎曲桿菌）之處在於其額外含有對抗 97kD、60kD 及 13kD 蛋白質之抗體。

(7)

若無鞭毛，則很明顯地這三種蛋白質只誘導抗體，因此可下結論，這三種蛋白質能誘導在由盲腸消除彎曲桿菌中扮演基本角色之抗體。因而，所製對抗 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質中任一種或其組合之抗體，同樣能由盲腸消除彎曲桿菌菌株。

從而本發明之另一種具體實施例係關於具分子量 97kD、60kD 或 13kD 之抗原性蛋白質，這些抗原性蛋白質在以對抗空腸彎曲桿菌無鞭毛突變體之抗體浸置西方吸漬片後，可見於空腸彎曲桿菌蛋白質之西方吸漬片上，而不可見於以對抗野生型空腸彎曲桿菌之抗體浸置該吸漬片者。

進一步分析 60kD 蛋白質及 13kD 蛋白質，決定出其胺基酸序列。

60kD 蛋白質之胺基酸序列如下所示，且稱之為 SEQ ID NO 1。

60kD 蛋白質之胺基酸序列為：“MAKEIIFSDEARNK-LYEGVKKLNDVAVKVTMGPRGRNVLIQKSFGAPSITKDGVSVAKEVELKD-SLENMGASLVREVASKTADQAGDGTATVLAHAIFKEGLRNITAGANPIEVK-RGMDKACEAIVAE LKKLSREVKDKKEIAQVATISANSDEKIGNLIADA-MEKVGKDG VITVEEPKSINDELNVVEGMQFDRGYLSPYFITNAEKMTVEL-SSPYILLFDKKITNLKD LLPVLEQIQKTGKPLLI AEDIEGEALATLVVNKLRGV-LNISAVKAPGFGDRRKAMLEDIAILTGGEVISEELGRTLESATIQLGQASS-VIIDKDNTTIVNGAGEKANIDARVNQIKAQIAETTS DYDREKLQERLAKLSG-GVAVIKVGATTETEMKEKKDRVDDALSATKA AVEEGIVIGGGAALIKAKAKIKLDLQGDEAIGAAIVERALRAPLRQIAENAGFDAGVVVNSVENAK-DENTGFDAAKGEYVNMLES GIIDPVKVERVALLNAVSVASMLLT-TEATISEIKEDKPTMPDMSGMGGMGGMGGMM”

13kD 蛋白質之胺基酸序列如下所示，且稱之為 SEQ ID NO 2。

(8)

13kD 蛋白質之胺基酸序列為：

“MAISKEDVLEYISNLSVLELSELVKE-
FEEKFGVSAAPVMVAGGAVAGGAVAAAEKTEFDIVLTDGGAKKIEVI-
KIVRALTGGLKEAKDAVEQTPSTLKEGVAKAEAEAKKQLEEAGAKVELK”

60kD 和 13kD 蛋白質之胺基酸序列可經小幅修飾。胺基酸序列之變異可能是一個或多個胺基酸被功能性均等物所取代的結果。常見功能性均等物之置換作用，述於 Neurath et al(The Proteins, Academic Press, New York (1979), 第 14 頁，第 6 圖)之實例為絲胺酸取代丙胺酸；Ala/Ser, Val/Ile, 或 Asp/Glu 等。除了上述由功能性均等胺基酸取代而致變異外，變異亦可見於其胺基酸被非功能性均等物之另一胺基酸所取代。此種變異與以功能性均等物所取代者之差別僅在於，其所產蛋白質在立體摺疊上具小幅修飾。這兩型變異常可見於蛋白質，且已知其屬生物性變異。

無庸贅言，60kD 和 13kD 蛋白質之胺基酸序列以此種方式變異而保留其多肽之免疫原活性，此變異亦屬本發明之範圍。

用於生產抗體之 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質，其可為多株、單特異性、單株（或其衍生物）。97kD、60kD 及 13kD 蛋白質可依此項技藝中周知之多種蛋白質分離程序進行分離。一種簡單的方法是將這些蛋白質由配製膠切除出來。若需多株抗體，生產及處理多株血清之技術已為此項技藝中所知（例如 Mayer and Walter, eds.見上述）。依據本發明對 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質（或其變異

(9)

物或片段)具反應性之單株抗體，可由此項技藝中已知技術將近親交配小鼠經免疫接種而製備 (Kohler and Milstein, Nature, 256, 495-497, 1975)。

使用對抗這三種蛋白質中任一種之抗體而非對抗整體無鞭毛彎曲桿菌之抗血清的一個好處是，對抗這三種蛋白質的特異性單株抗體，可由發酵槽中大規模的融合瘤生長而容易地取得。如此可使抗體在低成本／勞力下大量生產而無須使用動物。

從而，本發明之另一具體實施例係關於，含有對抗彎曲桿菌 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質之疫苗。

甚有本發明之另一具體實施例係關於，對抗依本發明之 97kD 和／或 60kD 和／或 13kD 蛋白質之抗體，其係用於製備對抗空腸彎曲桿菌移生之疫苗。

製備本發明之疫苗之方法不必複雜。原則上，該法能滿足在如動物體內製造對抗無鞭毛突變體或對抗 97kD 和／或 60kD 和／或 13kD 蛋白質之抗體，接著依標準技術收集血液並分離其抗血清。適於製造此種抗體的動物是如兔及雞。當使用雞時，抗體可替代地由受全身性接種之雞之卵黃中取得。原則上抗體不須稀釋。抗體能以未稀釋型式施打，在需要時甚至可用濃縮型式。或者，若抗體濃度很高，則所得抗血清可在投給前稀釋。

從而，本發明之另一具體實施例係關於依本發明之疫苗之製備方法。此種方法包括在宿主動物中製造對抗空腸彎曲桿菌菌株抗原性物質之抗體，而後分離其抗體。原則

(10)

上，此法通常包括由宿主動物取出血液，而後純化其抗血清，例如以離心法或過濾法。

亦可取得直接製造對抗 97kD、60kD 和 13kD 蛋白質所需抗體之細胞，該細胞能生長於如發酵槽中。抗體可稍後收集，若需要並可與醫藥上可接受的載劑混合。此法的優點是製備抗體不須使用動物。

本發明非常適合在屠宰前用於燒烤用之肉雞。此種燒烤肉品通常在六週大時被屠宰。因而，在屠宰前約一週以本發明之疫苗處理該動物，能顯著降低彎曲桿菌污染程度。很清楚地，疫苗用量應決定於該疫苗中抗體之濃度。一個有用的指標是，抗體之最適用量出現在 0.1 與 1 毫升粗製抗血清之間。

在如卵黃製劑之中抗體力價，可由此項技藝中周知的標準技術如 E L I S A 技術容易地決定。

抗體可容易地以較粗製劑施打。一種可行的給藥法舉例為對雞餵食粗製抗血清。替代的投藥途徑舉例為將該血清與飲用水摻合。抗體亦可直接與雞食混合。為達此目的，替代作法是將抗體冷凍乾燥，如此在將其與食物或水混合前能增加其長期安定性。抗體在加入雞食之前亦可裝於膠囊。

尚有本發明之另一具體實施例，係關於使用如本發明之抗血清或抗體於接種目的。或者可直接使用如本發明之 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質於接種目的。當 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質直接投給家禽時，其能直接誘導對抗 97kD

(11)

、60kD 或 13kD 蛋白質之抗體。該動物接著產生其自有的對抗彎曲桿菌之保護性抗體。這也是令人驚訝的，投給完整野生型彎曲桿菌菌株無法致使彎曲桿菌由盲腸消除，因為野生型彎曲桿菌抑制對抗 97kD、60kD 和 13kD 蛋白質之抗體的誘導作用。因此，當 97kD、60kD 及 13kD 蛋白質以分離型式施給，卻為完整野生型彎曲桿菌細胞之一部分時，它們是無效的。因而，另一具體實施例係關於含特异性抗原性 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質之疫苗，其可見於空腸彎曲桿菌蛋白質之西方吸漬片，該西方吸漬片曾先由對抗空腸彎曲桿菌無鞭毛突變體浸置，而不可見於先以對抗野生型彎曲桿菌之抗體浸置該吸漬片者。

將此蛋白質與醫藥上可接受的載劑摻合即可容易地製備此種疫苗。醫藥上可接受的載劑可理解為，對被接種動物健康無不良作用的化合物，至少其不良作用的程度不能比見於未接種動物之作用更差。醫藥上可接受的載劑可為無菌水或無菌生理鹽溶液。較複雜的載劑可如緩衝劑。

尚有本發明之另一具體實施例，係有關用於疫苗之 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質。

本具體實施例之較佳型式，係關於使用如本發明之抗原性 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質，製造對抗空腸彎曲桿菌移生之醫藥組合物。

製備疫苗之適當蛋白質用量依投藥方法而改變。全身性使用時，較適用用量在 1 至 1000 微克之間。口服疫苗之用量亦可在此範圍。然而若考慮經飲用水以口服接種，因

(12)

水的溢出，可能要施用較多量之蛋白質。

如本發明之疫苗之較佳型式可含佐劑。佐劑一般含有以非特異方式促進宿主免疫反應之物質。佐劑例如有佛氏完全及不完全佐劑、維生素 E、非離子性團聯聚合物及多元胺類如硫酸葡萄聚糖、carbopol 及 pyran。表面活性物質如 Span、Tween、十六醯胺、脫脂酸卵磷脂、甲氧基十六醯甘油及皂素（如 Quil A®）亦非常適用。再者，肽類如 muramyl dipeptides、二甲基甘油、tuftsin 是常用的。對比這些佐劑，免疫刺激性複合體（ISCOMS）、礦油如 Bayol®或 Markol®、蔬菜油或其乳液及 Diluvac®Forte 可視其優點使用。疫苗亦可含所謂「媒劑」。媒劑是一種受多肽接附而無共價鍵結的化合物。常用的媒劑化合物有鋁之氫氧化物、磷酸鹽、硫酸鹽或氧化物、高嶺土、膠黏土等。此媒劑之特別型式稱為 ISCOM（EP 109.942、EP 180.564、EP 242.380），該媒劑將抗原部分地包埋於其中。

通常，將疫苗與安定劑混合，以保護容易降解的多肽類免於降解、延長疫苗保存期限或增加冷凍乾燥之效果。有用的安定劑如 SPGA（Bovarnik et al; J. Bacteriology 59: 509（1950））、脫脂奶、明膠、牛血清白蛋白質，碳水化合物如山梨醇、甘露醇、漏蘆糖、澱粉、蔗糖、葡萄聚糖或葡萄糖，蛋白質如白蛋白質或酪蛋白質或其降解產物，和緩衝劑如鹼金屬磷酸鹽。冷凍乾燥法是保存的有效方法。經冷凍乾燥的物質可穩定地儲存數年。經冷凍乾

(13)

燥的物質其儲存溫度可在零度以上而不損害該物質。冷凍乾燥可依所有已知等凍乾造程序來完成。

含有 97kD、60kD 或 13kD 蛋白質之疫苗最好經黏膜給藥。可藉由將疫苗摻合飲水以口服方式投給。特別對家禽而言，附加方法如眼內接種及鼻內接種亦為非常適合的黏膜接種方式。

【實施方式】

實例 1：97kD、60kD 及 13kD 蛋白質之偵測。

菌株：

野生型 81116：空腸彎曲桿菌，野生型，人體分離，鞭毛表現型 $A^+ B^+$ ，體外有運動性且無侵襲性（Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M.C. and van der Zeijst, B.A.M. 1991, EMBO Journal 10：2055－2061）。

突變體 81116－R2：FlaA 及 FlaB 刪除突變體（+ 康絲菌素插入），鞭毛表現型 $A^- B^-$ ，體外無運動性且無侵襲性（Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M.C. and van der Zeijst, B.A.M. 1991, EMBO Journal 10：2055－2061）。

細胞生長：將空腸彎曲桿菌 81116 菌株接種於 Blaser 彎曲桿菌瓊脂，並將空腸彎曲桿菌 81116－R2 菌株接種於 Blaser 彎曲桿菌瓊脂 + 40 微克／毫升康斯菌素。培養皿在微好氣條件下於 41℃ 培養 48 小時。由瓊脂皿取少數菌落，將 81116 菌株培養於 Brucella 汁 + 1% 酵母萃取物，

(14)

並將 81116-2 R 菌株培養於 Brucella 汁 + 1% 酵母萃取物 + 40 微克 / 毫升康斯菌素。在微好氣條件下於 41℃ 培養 24 小時後，測定培養物之細菌總數，並加入 0.2% 福馬林使其不活化（室溫下 24 小時）。以離心法收集不活化的細菌。細胞團塊以 0.01 M Tris pH 7.4 使其再懸浮而達 1.0 毫克 / 毫升蛋白質濃度。

而後進行標準 PAGE，每槽加入 20 微升之該懸浮液，並於 NuPage 明膠 4 至 12% Bis-Tris 上執行。西方吸漬法係以 NuPage 轉移緩衝劑 / 10% 甲醇完成。

對 2-D 明膠電泳而言，標準方法已由 Adessi, C. (Electrophoresis 1997, 18127-135) 及 Gorg, A. (Electrophoresis 1995, 16, 1079-1086) 描述，且使用 Pharmacia 之指導手冊 18-1038-63。

雞抗血清之製備

將 4 週大的雞以肌肉注射接種 81116 或 81116-R2 菌株之 1 毫升完整細胞疫苗（見於下）。一組雞不使接種。在接種後第 4 週將所有的雞放血至死。收集每組血清並用於 4 天大的雞之接種。

將所得血清稀釋為 20、200 或 400 倍，並以如標準方法之西方吸漬法浸置。

結果：圖 1 左側之西方吸漬片包括野生型彎曲桿菌 81116 菌株之全部抗原，右側之西方吸漬片包含無鞭毛彎曲桿菌 81116-2 R 菌株之抗原。第 1 和 7 排，第 2 和 8

(15)

排，第 3 和 9 排，分別以對抗野生型彎曲桿菌 81116 菌株之 20、200 或 400 倍稀釋抗血清浸置。第 4 和 10 排，第 5 和 11 排，第 6 和 12 排，分別以對抗無鞭毛彎曲桿菌 81116-2 R 菌株之 20、200 或 400 倍稀釋抗血清浸置。

可清楚地見到如第 4 至 6 排及第 10 至 12 排，各具分子量 97 和 60kD 之兩可見帶，此帶在第 1 至 3 排及第 7 至 9 排是不可見的（在各排間有些模糊且較擴散之帶為分子量標記）。

圖 2 顯示含野生型彎曲桿菌 81116 菌株全部抗原之 2-D 明膠。2-D 明膠較適於較小蛋白質之偵測，因而，該法較標準 1-D PAGE 更適於偵測 13kD 蛋白質（對抗該蛋白質之抗體）的存在。圖 3 顯示此明膠之西方吸漬片。吸漬／浸置程序相較於圖 1 所使用者，係屬標準程序。圖 3 b 顯示相同的西方吸漬片，是以對抗野生形彎曲桿菌 81116 菌株之抗血清浸置的。圖 3 a 中之西方吸漬片清楚地顯示，在對抗無鞭毛彎曲桿菌之受激血清中，存在對抗 60kD（箭號 1）及 13kD 蛋白質（箭號 2）之抗體，該抗體不見於對抗野生型彎曲桿菌之受激血清中（圖 3 b）。

這些西方吸漬結果清楚地顯示，無鞭毛彎曲桿菌菌株能誘導對抗 97kD、60kD 及 13kD 蛋白質之免疫反應，而野生型彎曲桿菌菌株並未顯示此種現象。

實例 2：疫苗之製備

菌株：

(16)

野生型 81116：見於上。

突變體 81116-R2：見於上。

被動免疫用雞抗血清之製備

將 4 週大的雞以肌肉注射接種 81116 或 81116-R2 菌株之 1 毫升完整細胞疫苗（見於下）。一組雞不予接種。在接種後第 4 週將所有的雞放血至死。收集每組血清並用於 4 天大的雞之接種。

不活化完整細胞疫苗之製備

將空腸彎曲桿菌 81116 菌株接種於 Blaser 彎曲桿菌瓊脂，並將空腸彎曲桿菌 81116-R2 菌株接種於添加 + 40 微克／毫升康斯菌素之 Blaser 彎曲桿菌瓊脂。培養皿在微好氣條件下於 41℃ 培養 48 小時。由瓊脂皿取少數菌落，將 81116 菌株培養於 Brucella 汁 + 1% 酵母萃取物，並將 81116-R2 菌株培養於 Brucella 汁 + 1% 酵母萃取物 + 40 微克／毫升康斯菌素。在微好氣條件下於 41℃ 培養 24 小時後，測定培養物之細菌總數，並加入 0.2% 福馬林使其不活化（室溫下 24 小時）。以離心法收集不活化的細菌，將其懸浮於 PBS 中，並將細胞與水含於油之佛氏不完全型乳液混合用於疫苗製劑。該疫苗乳液每毫升含約 10^9 個細菌。

彎曲桿菌攻擊菌株之製備

(17)

使空腸彎曲桿菌 81116 菌株在微好氣條件下於接種於 41℃ 生長於 Blaser 彎曲桿菌瓊脂皿上 48 小時。將一皿的生長物懸浮於 Brucella 汁 + 1% 酵母萃取物，並在密閉瓶內以 41℃ 培養 48 小時。以 0.2 毫升培養物口服攻擊雞。以皿計數決定攻擊培養物之存活數。

實例 3：接種實驗

本實驗進行以對抗野生型彎曲桿菌和對抗無鞭毛彎曲桿菌抗血清之被動免疫接種及用不活化野生型彎曲桿菌完整細胞製劑之主動免疫接種間之比較。

雞

四天大或二週大的 S P F 雞。

實驗設計實驗 1

每組十隻 4 天大的雞有四組（每天一次）口服施給 0.8 毫升野生型彎曲桿菌 81116 菌株之雞抗血清，或 0.8 毫升無鞭毛突變體 81116-R2 之雞抗血清，或 0.8 毫升未接種之對照雞血清，或不處理作對照用。第一天（即 4 天大）使雞在用 3.2×10^7 CFU/毫升攻擊前及攻擊後 6 小時接受抗血清。處理持續到屍體檢驗。在攻擊後 5 天或 10 天，將每組中的 5 隻雞處死，並測定其每克盲腸內容物之 CFU（見於下：死後處理與細菌學）。

(18)

實驗設計實驗 2

每組十隻 4 天大的雞有四組（每天一次）口服施給 0.8 毫升野生型彎曲桿菌 81116 菌株之雞抗血清，或 0.8 毫升無鞭毛突變體 81116-R2 之雞抗血清，或 0.8 毫升未接種之對照雞血清，或不作處理。第一天（即 4 天大）在用 1.4×10^8 CFU/毫升攻擊前及攻擊後 6 小時施以抗血清。處理持續到屍體檢驗。在攻擊後 5 天，將雞處死，並測定其每克盲腸內容物之 CFU。

實驗設計實驗 3

每組十隻二週大的雞有三組，肌肉注射接種 1 毫升完整細胞疫苗之佛氏不完全型之水含於油乳液，其包含野生型彎曲桿菌 81116 菌株或無鞭毛突變體 81116-R2 菌株之不活化細胞，或不予接種。第 5 週全部雞隻皆以野生型彎曲桿菌 81116 菌株 1.4×10^8 CFU/毫升口服攻擊。在攻擊後一週，將雞隻處死，並測定其每克盲腸內容物之 CFU。

死後處理與細菌學

處死雞隻並將每一盲腸之內容物輕柔地取出、秤重並以 0.04M PBS 稀釋至每毫升 0.1 克。而後將其 10 倍連續稀釋液傾置於選擇性 Blaser 彎曲桿菌瓊脂皿。在微好氣條件下於 41°C 培養 48 小時後，測定其每克盲腸內容物之 CFU。

(19)

結果

實驗 1

由表 1 可得結論為，以對抗野生型彎曲桿菌血清或以未接種之雞對照血清進行重複性每日被動免疫，若與未處理之對照雞（在攻擊後第 5 天及第 10 天）相比，對野生型彎曲桿菌之盲腸移生作用是無效的。三組全部顯示出高程度的彎曲桿菌盲腸移生作用（每克盲腸內容物達 $> 10^8$ CFU）。與此尖銳對比的是，以如本發明之抗血清（即受激對抗鞭毛陰性突變體者）行被動免疫，結果可由盲腸消除野生型彎曲桿菌（或避免移生作用）。

實驗 2

本實驗進行重覆測試（見表 2）。在用如本發明之抗血清被動接種之雞隻中可發現盲腸移生作用再次大幅降低：6/10 的雞隻為完全陰性，且發現平均降低幅度大於 3 個 log。

實驗 3

由於文獻指出以野生型彎曲桿菌行主動免疫，可致彎曲桿菌之移生最多降低 2 個 log（Widders, P.R., Perry, R., Muir, W.I., Husband, A.J. and Long, K.A., 1996, Br. Poultry Sci. 37: 765-778），吾人測試並比較了主動保護模型之野生型與 R 2 基礎的疫苗。

由這些結果（表 3）可明白無任一疫苗對盲腸移生作

(20)

用有效。

空腸彎曲桿菌 81116 之再分離，攻擊後 5 天

	Log CFU／克盲腸內容物			
抗血清	C.jejuni 81116	C.jejuni R2	未經免疫接種	無抗血清
雞				
1	8.1	<3.0	7.8	7.6
2	5.9	<3.0	8.7	5.6
3	8.5	<3.0	8.1	9.1
4	5.5	<3.0	7.7	7.2
5	8.6	<3.0	7.6	8.8
平均值	7.3	<3.0	8.0	7.7
標準偏差	1.5		0.4	1.4

表 1 a

(21)

空腸彎曲桿菌 81116 之再分離，攻擊後 10 天

	Log CFU／克盲腸內容物			
抗血清	C.jejuni 81116	C.jejuni R2	未經免疫接種	無抗血清
雞				
1	9.0	3.5	7.8	8.1
2	9.1	<3.0	8.9	7.6
3	9.0	<3.0	9.3	7.4
4	9.1	<3.0	7.0	7.8
5	8.5	<3.0	8.7	8.2
平均值	8.9	<3.1	8.3	7.8
標準偏差	0.3	0.2	0.9	0.3

表 1 b

(22)

空腸彎曲桿菌 81116 之分離，攻擊後 5 天

	Log CFU／克盲腸內容物			
抗血清	C.jejuni 81116	C.jejuni R2	未經免疫接種	無抗血清
雞				
1	7.5	3.8	9.5	<3.0
2	<3.0	9.1	7.9	7.5
3	7.4	8.9	7.6	7.9
4	7.5	6.0	8.4	8.5
5	6.0	<3.0	7.3	9.0
6	9.1	<3.0	7.0	5.8
7	8.9	<3.0	6.6	9.0
8	7.6	<3.0	9.1	7.0
9	<3.0	<3.0	7.5	9.0
10	<3.0	<3.0	9.4	9.8
平均值	<6.3 ^a	<4.6 ^b	8.0	<7.7
標準偏差	2.4	2.5	1.0	2.0

表 2

^ap ≤ 0.05 與接受未接種雞隻之抗血清之組別比較（二樣本 t－檢定）

^bp ≤ 0.001 與接受未接種雞隻之抗血清之組別比較（二樣本 t－檢定）

(23)

空腸彎曲桿菌 81116 之再分離，攻擊後 6 天

	Log CFU／克盲腸內容物		
雞	以 C.jejuni 81116 免 疫接種	以 C.jejuni R2 免疫 接種	未經免疫
1	8.3	5.2	8.3
2	8.7	8.0	8.7
3		8.7	
4	7.1	8.5	7.1
5	8.1	7.8	8.1
6	8.4		8.4
7	7.7	7.8	7.7
8	8.5	8.8	8.5
9	9.1	8.3	9.1
10	7.5	7.4	7.5
平均值	8.2	7.8	8.2
標準偏差	0.6	1.1	0.6

表 3

(24)

結論：

基於對抗無鞭毛彎曲桿菌受激抗體之疫苗能由盲腸消除野生型空腸彎曲桿菌。此與具對抗野生型空腸彎曲桿菌受激抗體之對應疫苗呈尖銳對比。此亦與含野生型彎曲桿菌細胞之疫苗呈尖銳對比。

【圖式簡單說明】

圖 1.含野生型彎曲桿菌 81116 菌株全部抗原之西方吸漬片（左側），及含無鞭毛彎曲桿菌 81116-2 R 菌株抗原之西方吸漬片。第 1 和 7 排，第 2 和 8 排，第 3 和 9 排，分別以對抗野生型彎曲桿菌 81116 菌株之 20、200 或 400 倍稀釋抗血清浸置。第 4 和 10 排，第 5 和 11 排，第 6 和 12 排，分別以對抗無鞭毛彎曲桿菌 81116-2R 菌株之 20、200 或 400 倍稀釋抗血清浸置。

圖 2.野生型彎曲桿菌 81116 菌株全部抗原之 2-D 明膠。

圖 3a.以對抗無鞭毛彎曲桿菌 81116-2 R 菌株之抗血清浸置的西方吸漬片。箭號 1 所指處為 60kD 蛋白質，13kD 蛋白質由箭號 2 所指。

圖 3b.以對抗野生形彎曲桿菌 81116 菌株之抗血清浸置的西方吸漬片。

序列表

<110> AKZO Nobel N.V.

<120> Campylobacter vaccine

<130> campylo test

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> Campylobacter jejuni

<400> 1

Met Ala Ile Ser Lys Glu Asp Val Leu Glu Tyr Ile Ser Asn Leu Ser
1 5 10 15

Val Leu Glu Leu Ser Glu Leu Val Lys Glu Phe Glu Glu Lys Phe Gly
20 25 30

Val Ser Ala Ala Pro Val Met Val Ala Gly Gly Ala Val Ala Gly Gly
35 40 45

Ala Val Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Ile Val Leu Thr
50 55 60

Asp Gly Gly Ala Lys Lys Ile Glu Val Ile Lys Ile Val Arg Ala Leu
65 70 75 80

Thr Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ala Val Glu Gln Thr Pro
85 90 95

Ser Thr Leu Lys Glu Gly Val Ala Lys Ala Glu Ala Glu Glu Ala Lys
100 105 110

Lys Gln Leu Glu Glu Ala Gly Ala Lys Val Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 2

<211> 545

<212> PRT

<213> Campylobacter jejuni

<400> 2

Met Ala Lys Glu Ile Ile Phe Ser Asp Glu Ala Arg Asn Lys Leu Tyr
1 5 10 15

Glu Gly Val Lys Lys Leu Asn Asp Ala Val Lys Val Thr Met Gly Pro
20 25 30

Arg Gly Arg Asn Val Leu Ile Gln Lys Ser Phe Gly Ala Pro Ser Ile
 35 40 45
 Thr Lys Asp Gly Val Ser Val Ala Lys Glu Val Glu Leu Lys Asp Ser
 50 55 60
 Leu Glu Asn Met Gly Ala Ser Leu Val Arg Glu Val Ala Ser Lys Thr
 65 70 75 80
 Ala Asp Gln Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala His
 85 90 95
 Ala Ile Phe Lys Glu Gly Leu Arg Asn Ile Thr Ala Gly Ala Asn Pro
 100 105 110
 Ile Glu Val Lys Arg Gly Met Asp Lys Ala Cys Glu Ala Ile Val Ala
 115 120 125
 Glu Leu Lys Lys Leu Ser Arg Glu Val Lys Asp Lys Lys Glu Ile Ala
 130 135 140
 Gln Val Ala Thr Ile Ser Ala Asn Ser Asp Glu Lys Ile Gly Asn Leu
 145 150 155 160
 Ile Ala Asp Ala Met Glu Lys Val Gly Lys Asp Gly Val Ile Thr Val
 165 170 175
 Glu Glu Pro Lys Ser Ile Asn Asp Glu Leu Asn Val Val Glu Gly Met
 180 185 190
 Gln Phe Asp Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Tyr Phe Ile Thr Asn Ala Glu
 195 200 205
 Lys Met Thr Val Glu Leu Ser Ser Pro Tyr Ile Leu Leu Phe Asp Lys
 210 215 220
 Lys Ile Thr Asn Leu Lys Asp Leu Leu Pro Val Leu Glu Gln Ile Gln
 225 230 235 240
 Lys Thr Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Ile Glu Gly Glu
 245 250 255
 Ala Leu Ala Thr Leu Val Val Asn Lys Leu Arg Gly Val Leu Asn Ile
 260 265 270
 Ser Ala Val Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Met Leu
 275 280 285
 Glu Asp Ile Ala Ile Leu Thr Gly Gly Glu Val Ile Ser Glu Glu Leu
 290 295 300
 Gly Arg Thr Leu Glu Ser Ala Thr Ile Gln Asp Leu Gly Gln Ala Ser
 305 310 315 320
 Ser Val Ile Ile Asp Lys Asp Asn Thr Thr Ile Val Asn Gly Ala Gly
 325 330 335
 Glu Lys Ala Asn Ile Asp Ala Arg Val Asn Gln Ile Lys Ala Gln Ile
 340 345 350

Ala Glu Thr Thr Ser Asp Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Gln Glu Arg Leu
 355 360 365

Ala Lys Leu Ser Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Val Gly Ala Thr Thr
 370 375 380

Glu Thr Glu Met Lys Glu Lys Lys Asp Arg Val Asp Asp Ala Leu Ser
 385 390 395 400

Ala Thr Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ile Gly Gly Gly Ala
 405 410 415

Ala Leu Ile Lys Ala Lys Ala Lys Ile Lys Leu Asp Leu Gln Gly Asp
 420 425 430

Glu Ala Ile Gly Ala Ala Ile Val Glu Arg Ala Leu Arg Ala Pro Leu
 435 440 445

Arg Gln Ile Ala Glu Asn Ala Gly Phe Asp Ala Gly Val Val Val Asn
 450 455 460

Ser Val Glu Asn Ala Lys Asp Glu Asn Thr Gly Phe Asp Ala Ala Lys
 465 470 475 480

Gly Glu Tyr Val Asn Met Leu Glu Ser Gly Ile Ile Asp Pro Val Lys
 485 490 495

Val Glu Arg Val Ala Leu Leu Asn Ala Val Ser Val Ala Ser Met Leu
 500 505 510

Leu Thr Thr Glu Ala Thr Ile Ser Glu Ile Lys Glu Asp Lys Pro Thr
 515 520 525

Met Pro Asp Met Ser Gly Met Gly Gly Met Gly Gly Met Gly Gly Met
 530 535 540

Met
 545

伍、中文發明摘要

發明之名稱：彎曲桿菌疫苗

本發明係有關含有避免彎曲桿菌移生之疫苗，其含有對抗無鞭毛彎曲桿菌菌株之受激抗血清。本發明亦有關在以對抗空腸彎曲桿菌無鞭毛突變體之抗體浸置西方吸漬後，於空腸彎曲桿菌蛋白質之西方吸漬片上可見之抗原性彎曲桿菌蛋白質，而該蛋白質不可見於以對抗野生型空腸彎曲桿菌之抗體浸置之吸漬片者，及該蛋白質在疫苗上之用途及製法。本發明尚有關含有此種蛋白質及對抗此種蛋白質之抗體之疫苗。本發明更有關此種彎曲桿菌蛋白質之用途及用於製備疫苗之對抗彎曲桿菌抗原之受激抗血清與抗體。最後，本發明係有關製備此種疫苗之方法。

陸、英文發明摘要

發明之名稱： Passive vaccine for the prevention of *Campylobacter* colonization, and its preparation method

The present invention relates to vaccines comprising antiserum raised against a flagellaless *Campylobacter* strain for the prevention of *Campylobacter* colonisation in animals. The invention also relates to antigenic *Campylobacter* proteins visible in a Western blot of *Campylobacter jejuni* protein after incubation of said Western blot with antibodies against a flagellaless mutant of *Campylobacter jejuni* and not visible after incubation of said blot with antibodies against wild type *Campylobacter jejuni*, and to their use in vaccines and the manufacturing thereof. The invention further relates to vaccines comprising such proteins and antibodies against such proteins. The invention further relates to the use of such *Campylobacter* proteins and to antiserum and antibodies raised against *Campylobacter* antigens for the preparation of vaccines. Finally, the invention relates to methods for the preparation of such vaccines.

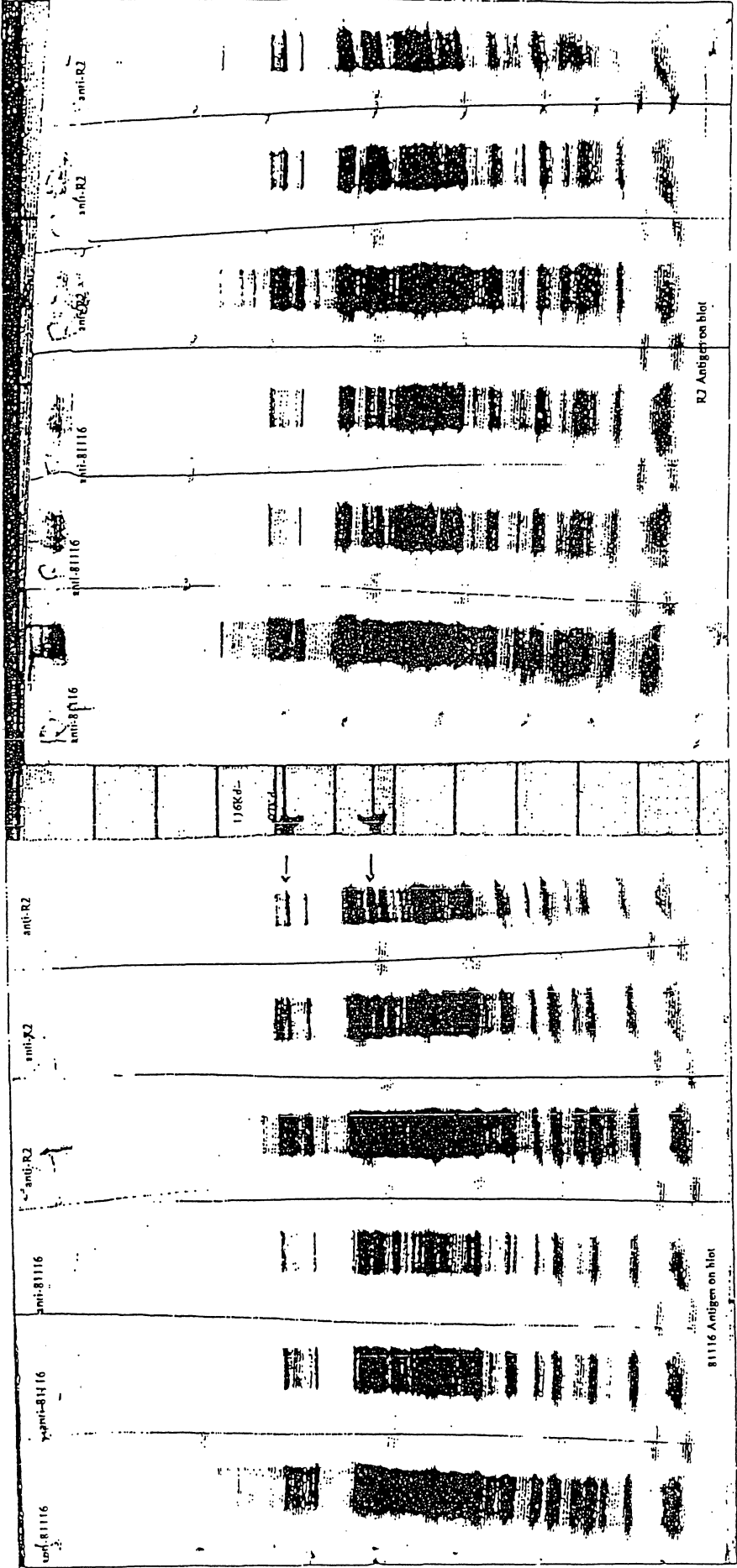
(1)

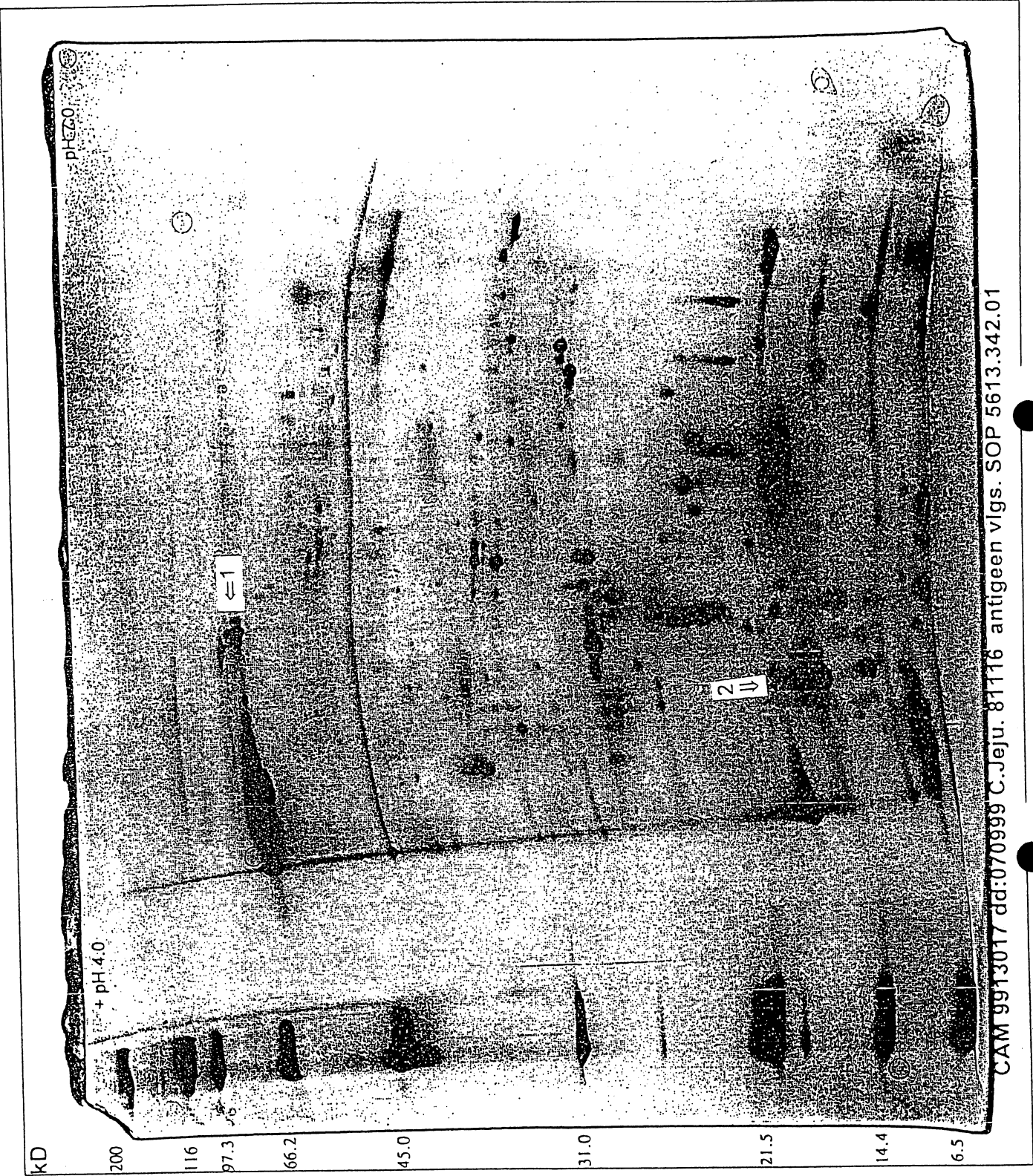
拾、申請專利範圍

1. 一種分子量為 97kD ($\pm$ 5kD) 之彎曲桿菌抗原性蛋白質，其特徵為在經對抗空腸彎曲桿菌無鞭毛突變株之抗體浸漬之西方吸漬片培育後，其可見於空腸彎曲桿菌蛋白質之西方吸漬片上，且其不可見於經對抗野生型空腸彎曲桿菌之抗體浸漬之該吸漬片上。

2. 一種對抗空腸彎曲桿菌移生之藥學組成物，其包含有效量之申請專利範圍第 1 項之抗原性蛋白質。

3. 一種用於家禽預防空腸彎曲桿菌移生之疫苗，其特徵為該疫苗包含申請專利範圍第 1 項之抗原性蛋白質。





Anti-R2 antisera

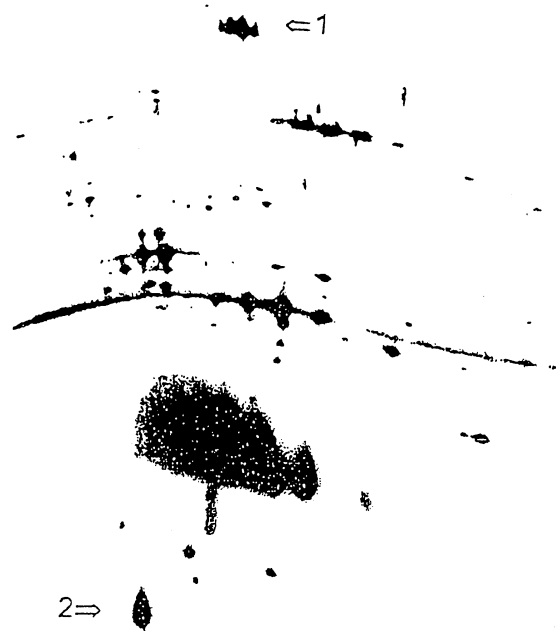


圖 3a

Anti-81116 sera



圖 3b

柒、（一）、本案指定代表圖為：第 1 圖

（二）、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：