



(21) 申请号 201910422717.8

(22) 申请日 2013.12.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110227151 A

(43) 申请公布日 2019.09.13

(30) 优先权数据
61/747,026 2012.12.28 US

(62) 分案原申请数据
201380065991.5 2013.12.20

(73) 专利权人 勃林格殷格翰动物保健有限公司
地址 德国英格尔海姆

(72) 发明人 D·M·M·乔丹 B·T·马丁森
C·M·米伦塞勒 A·纽鲍尔
A·V·耶尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

专利代理师 左路 林晓红

(51) Int.Cl.

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2005037027 A1,2005.02.17

Volokhov DV et al..“Biological
Enrichment of Mycoplasma Agents by
Cocultivation with Permissive Cell
Cultures”.《Applied and environmental
microbiology》.2008,第74卷(第17期),第5383-
5391页.

A I Sobko et al..“Development of
specific technics for the prevention of
mycoplasma infections in swine”.《Arch Exp
Veterinarmed》.1989,第43卷(第5期),第645-
655页.

审查员 陈媛媛

权利要求书2页 说明书26页

(54) 发明名称

包含支原体抗原的免疫原性组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种免疫原性组合物,其包含:

a) 一或多种猪鼻支原体(M.hyorhinis)抗原及一
或多种猪滑液支原体(M.hyosynoviae)抗原;及
b) 医药上可接受的载剂。进一步,本发明涉及一
种免疫原性组合物,其包含:a) 一或多种选自以
下组的支原体菌的支原体抗原:猪鼻支原体、猪
肺炎支原体及猪滑液支原体;及b) 真核细胞系统
的一或多种组份。而且,本发明还提供了一种免
疫原性组合物,其通过包含以下的方法获得:a)
在低血清真核细胞系统中培养选自以下组的支
原体菌:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原
体及其任一组合;b) 获得所述支原体菌的抗原;
及c) 添加医药上可接受的载剂。

1. 一种免疫原性组合物,其包含a)猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*) 抗原;及b)真核细胞系统,其中所述猪鼻支原体抗原通过所述真核细胞系统的培养获得;所述真核细胞系统为MDCK细胞或McCoy细胞;其中所述猪鼻支原体抗原为完整灭活死菌苗。

2. 一种免疫原性组合物,其通过包含以下的方法获得:a)在低血清真核细胞系统中培养猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*);b)获得猪鼻支原体抗原;及c)添加医药上可接受的载剂,其中所述真核细胞系统为MDCK细胞或McCoy细胞;其中所述猪鼻支原体抗原为完整灭活死菌苗。

3. 如权利要求1的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物进一步包含a)猪肺炎支原体 (*M. hyopneumoniae*) 抗原。

4. 如权利要求2的免疫原性组合物,其中步骤a)进一步包含在低血清真核细胞系统中培养猪肺炎支原体 (*M. hyopneumoniae*) 抗原。

5. 如权利要求1至4中任一项的免疫原性组合物,其中所述完整灭活死菌苗为福尔马林灭活死菌苗。

6. 如权利要求1至4中任一项的免疫原性组合物,其中所述真核细胞系统为McCoy细胞。

7. 如权利要求5的免疫原性组合物,其中所述真核细胞系统为McCoy细胞。

8. 如权利要求1至4中任一项的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物不含猪血清。

9. 如权利要求5的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物不含猪血清。

10. 如权利要求6的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物不含猪血清。

11. 如权利要求7的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物不含猪血清。

12. 如权利要求1至4中任一项的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物与包含得自在无细胞培养系统中培养的支原体的相同支原体抗原的免疫原性组合物相比具有增强的免疫原性。

13. 如权利要求5的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物与包含得自在无细胞培养系统中培养的支原体的相同支原体抗原的免疫原性组合物相比具有增强的免疫原性。

14. 如权利要求6的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物与包含得自在无细胞培养系统中培养的支原体的相同支原体抗原的免疫原性组合物相比具有增强的免疫原性。

15. 如权利要求7的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物与包含得自在无细胞培养系统中培养的支原体的相同支原体抗原的免疫原性组合物相比具有增强的免疫原性。

16. 如权利要求1至4中任一项的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物为疫苗。

17. 如权利要求1至4中任一项的免疫原性组合物,其中免疫原性组合物进一步包括医药上可接受的载剂,其选自以下的佐剂:氢氧化铝、磷酸铝、皂苷、油包水乳液、水包油乳液、水包油包水乳液、卡波姆、丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物、马来酸酐与烯基衍生物的共聚物、RIBI佐剂系统、嵌段共聚物、SAF-M、单磷酸脂质A、阿夫立定脂质-胺、来自大肠杆菌的不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS1314、胞壁酰二肽及其组合。

18. 如权利要求5的免疫原性组合物,其中免疫原性组合物进一步包括医药上可接受的载剂,其选自以下的佐剂:氢氧化铝、磷酸铝、皂苷、油包水乳液、水包油乳液、水包油包水乳液、卡波姆、丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物、马来酸酐与烯基衍生物的共聚物、RIBI佐剂系统、嵌段共聚物、SAF-M、单磷酸脂质A、阿夫立定脂质-胺、来自大肠杆菌的不耐热肠毒素、霍乱

毒素、IMS1314、胞壁酰二肽及其组合。

19. 如权利要求6的免疫原性组合物,其中免疫原性组合物进一步包括医药上可接受的载剂,其选自以下的佐剂:氢氧化铝、磷酸铝、皂苷、油包水乳液、水包油乳液、水包油包水乳液、卡波姆、丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物、马来酸酐与烯基衍生物的共聚物、RIBI佐剂系统、嵌段共聚物、SAF-M、单磷酸脂质A、阿夫立定脂质-胺、来自大肠杆菌的不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS1314、胞壁酰二肽及其组合。

20. 如权利要求7的免疫原性组合物,其中免疫原性组合物进一步包括医药上可接受的载剂,其选自以下的佐剂:氢氧化铝、磷酸铝、皂苷、油包水乳液、水包油乳液、水包油包水乳液、卡波姆、丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物、马来酸酐与烯基衍生物的共聚物、RIBI佐剂系统、嵌段共聚物、SAF-M、单磷酸脂质A、阿夫立定脂质-胺、来自大肠杆菌的不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS1314、胞壁酰二肽及其组合。

21. 如权利要求1至4中任一项的免疫原性组合物,其中免疫原性组合物进一步包括医药上可接受的载剂,其为水包油包水乳液Montanide ISA207 VG。

22. 如权利要求5的免疫原性组合物,其中免疫原性组合物进一步包括医药上可接受的载剂,其为水包油包水乳液Montanide ISA207 VG。

23. 如权利要求6的免疫原性组合物,其中免疫原性组合物进一步包括医药上可接受的载剂,其为水包油包水乳液Montanide ISA207 VG。

24. 如权利要求7的免疫原性组合物,其中免疫原性组合物进一步包括医药上可接受的载剂,其为水包油包水乳液Montanide ISA207 VG。

25. 如权利要求1至24中任一项的免疫原性组合物在制备用于预防对象的支原体感染的药物中的用途;

所述支原体感染是由猪鼻支原体所引起,或者由猪鼻支原体和猪肺炎支原体所引起。

26. 如权利要求25的用途,其中所述对象选自:猪、牛、猫和狗。

27. 如权利要求25的用途,其中与相同物种的未免疫对照组的对象相比,所述预防导致改进选自以下组的功效参数:缩短菌血症持续时间和减少菌负荷、或其组合。

包含支原体抗原的免疫原性组合物

[0001] 本申请是申请日为2013年12月20日的第201380065991.5号发明名称为“包含支原体抗原的免疫原性组合物”的中国专利申请的分案申请。

背景技术

[0002] 支原体(Mycoplasma)属菌属于柔膜菌纲(Mollicutes)且代表一组源自厚壁菌门(Firmicutes)谱系之生物体。柔膜菌纲系最小自主复制生物体,其在结构上与其它真细菌之不同之处在于其缺少细胞壁。业内认为其单膜表面系在复杂免疫活性宿主环境中介导适应及存活之关键界面。此外,柔膜菌纲具有小基因组及数目有限之代谢路径。因此,亦将支原体属成员描述为“最小自我复制生物体”。然而,尽管其非常简单,多种支原体菌系人类及多种动物之病原体。与其它毒力主要取决于毒素、侵袭素及细胞溶素之病原性细菌相比,病原性支原体菌似乎不具有该等典型主要毒力因子(Chambaud, I.等人,2001, Nucleic Acids Res. 29:2145-2153, Fraser等人,1995, Science 270:397-403)。目前可获得之对容许病原性支原体引起宿主细胞损伤、发炎及疾病之分子机制及效应物之了解极少。

[0003] 病原性支原体主要引起人类及动物之非典型肺炎、泌尿生殖道感染及关节炎(Blanchard, A. 及 G. F. Browning (编辑). 2005. Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control. Horizon Bioscience, Wymondham U.K.; Kobisch M. 及 Friis N. F. 1996, Swine mycoplasmoses, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1569-1605)。已知该等症状之再活化或加重会反复并逐渐转变成慢性疾病,且因此藉由早期诊断及早期治疗预防或治疗加重或再活化非常重要。猪肺炎支原体(M. hyopneumoniae)系地方性肺炎之病因。在猪中,其因体重增长降低及饲料效率低而系最常见且经济上最重要之疾病之一。该疾病引起肺损害、慢性咳嗽、毛色无光、生长迟滞及持续数周之不兴旺外观。肺损害、尤其在腹侧顶叶及心叶中之损害之特征在于上皮细胞增生及单核细胞之血管周及细支气管周累积增加。猪呼吸道之另一常见支原体猪鼻支原体(M. hyorhinis)可引起仔猪之多发性浆膜炎及关节炎。猪滑液支原体(M. hyosynoviae)一般位于扁桃体中且可引起关节炎疾病,从而导致经济损失。猪滑液支原体系自关节及咽/扁桃体样品分离且可在血液及关节液中诱导抗体。牛支原体(M. bovis)被认为系致病性更强之支原体物种中之一者且在世界上造成显著经济损失。支原体引起所有年龄之牛之严重临床病征。牛支原体系发现引起牛之肺炎、乳腺炎及关节炎之最常见支原体病原体,且其病因学作用与母牛及公牛之耳炎、角膜结膜炎、滑膜炎及生殖障碍有关。

[0004] 由于支原体缺少细胞壁,许多靶向细胞壁合成之常见抗生素(例如青霉素或其它 β -内酰胺抗生素)对其无影响。实际使用之支原体感染之治疗剂系一些抗生素,例如基于大环内酯或基于新喹诺酮或基于四环素之抗生素,但该等抗生素具有严重不良效应,例如抗药性菌株之出现,其导致支原体感染变严重同时预期治疗效应不足,且成为转变成慢性疾病的病因。

[0005] 此外,疫苗接种系控制支原体感染之有效方法。先前文献中已阐述有效抵抗若干种支原体菌之疫苗。W02009058833 (A2) 例示性地阐述用于疫苗接种之减毒无毒力牛支原体

菌菌株。此外, W02009126356 (A2) 阐述抵抗猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 之免疫原性组合物。然而, 业内需要针对多种病原体提供保护之有效组合疫苗。业内非常需要该等组合疫苗来使针对多种病原体提供保护所需之免疫数目降至最低, 降低施用成本, 并提高接受率及覆盖率。然而, 抗原干扰问题使多组份疫苗之研发更加复杂。特定而言, 抗原干扰系指观察到施用多种抗原经常导致对某些抗原之反应相对于在个别施用该等抗原时观察到之免疫反应有所减小。

[0006] 因此, 业内需要针对多种病原体提供保护之有效组合疫苗。

[0007] 发明详述

[0008] 在阐述本发明各方面之前, 必须注意, 除非上下文明确指示其它含义, 否则如在本文中及在随附申请专利范围中使用之单数形式“一 (a)”、“一 (an)”及“该 (the)”包括复数。因此, 例如, 在提及“一抗原”时包括复数种抗原, 在提及“细胞”时系指一或多个细胞及本领域技术人员已知之其等效物, 等等。除非另有定义, 否则本文中所使用之所有技术及科学术语皆具有熟习本发明所属领域技术者一般理解之相同意义。尽管在本发明之实践或测试中可使用任何与本文所述之方法及材料类似或等效之彼等, 但现在阐述较佳方法、装置及材料。本文所提及之所有出版物皆系以引用方式并入本文中, 用于阐述及揭示该等出版物中所报导可结合本发明使用之细胞系、载体及方法之目的。本文中所有内容皆不应视为承认该揭示内容由于先前发明而有资格先于本发明。

[0009] 本发明解决先前技术中固有之问题并提供技术现况之独特进步。概言之, 本发明提供免疫原性组合物, 其包含: a) 一或多种猪滑液支原体抗原及一或多种选自由猪肺炎支原体及猪鼻支原体组成之群之抗原及其组合; 以及 b) 医药上可接受之载剂。

[0010] 此外, 本发明提供免疫原性组合物, 其包含: a) 一或多种猪鼻支原体抗原及一或多种猪滑液支原体抗原; 以及 b) 医药上可接受之载剂。

[0011] 有利地, 本发明所提供之实验数据揭示本文所提供免疫原性组合物之功效及没有抗原干扰。特定而言, 在施用包含猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体抗原之免疫原性组合物后, 已显示关于猪鼻支原体及猪肺炎支原体之功效没有干扰。

[0012] 因此, 根据一方面, 本申请提供免疫原性组合物, 其包含 a) 一或多种猪鼻支原体抗原; 一或多种猪滑液支原体抗原; b) 一或多种猪肺炎支原体抗原; 以及 c) 医药上可接受之载剂。

[0013] 术语“免疫原性组合物”系指包含至少一种抗原之组合物, 其引发被施用该免疫原性组合物之宿主之免疫反应。该免疫反应可为细胞和/或抗体介导之针对本发明免疫原性组合物之免疫反应。该宿主亦被称为“对象”。较佳地, 本文所阐述或提及之任一宿主或对象系动物。

[0014] 通常, “免疫反应”包括 (但不限于) 以下效应中之一或多者: 特异性指向本发明免疫原性组合物中所包括抗原之抗体、B细胞、辅助性T细胞、抑制性T细胞和/或细胞毒性T细胞和/或 γ - δ T细胞之产生或活化。较佳地, 宿主将展示保护性免疫反应或治疗反应。

[0015] “保护性免疫反应”将显示为受感染宿主通常展示之临床病征之减少或缺少、较短恢复时间和/或缩短之感染性持续时间或组织或体液中降低之病原体效价或受感染宿主之排泄。

[0016] 若宿主展示保护性免疫反应而使得对新感染之抗性将增强和/或疾病之临床严重

度降低,则将免疫原性组合物称为“疫苗”。

[0017] 术语“感染”或“受感染的”系指对象被病原体(即猪鼻支原体或猪鼻支原体及猪滑液支原体或猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体)感染。

[0018] “治疗反应”将显示为在宿主已被通常引起临床病征之病原体(例如支原体)感染时该宿主通常展示之该(等)临床病征之减少和/或治愈。

[0019] 术语“支原体”为本领域技术人员已知。“支原体”系指一细菌属,例如如以下文献中所述:Blanchard, A. 及 G. F. Browning (编辑). 2005. *Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham U.K.; Kobisch M. 及 Friis N. F. 1996, *Swine mycoplasmoses*, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1569-1605。可基于细菌之生物化学及微生物性质以及其形态对其加以分类。该等分类准则为业内所熟知。一般而言,支原体感染与本说明中其它地方阐述之临床病征有关。

[0020] 如本文所用术语“支原体”系指猪鼻支原体,或猪鼻支原体及猪滑液支原体,或猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体。猪鼻支原体之全基因组序列例示性地由例如 Liu, W. 等人, *J. Bacteriol.* 2010, 第192卷(21), 5844-45 doi:10.1128/JB.00946-10. Epub 2010年8月27日或 Calcutt M. J. 等人, 2012, *J. Bacteriol.*, 第194卷(7), 1848 doi:10.1128/JB.00033-12 提供。猪滑液支原体之分离物例示性地以登录号 ATCC 25591 或 ATCC 27095 存放于美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection)。猪肺炎支原体之分离物例示性地以登录号 ATCC 25095、ATCC 25617 及 ATCC 25934 存放于美国组织培养物保藏中心。猪肺炎支原体 J-菌株之基因组 DNA 以登录号 ATCC 25934D 存放于美国组织培养物保藏中心。

[0021] 如本文所用“抗原”系指(但不限于)引发宿主对包含该抗原或其免疫活性组份之所关注免疫原性组合物或疫苗之免疫反应之组份。抗原或免疫活性组份可为完整微生物(呈灭活或改良活形式)或其任何碎片或部分,若将其施用宿主可引发宿主之免疫反应。抗原可为或可包含呈其原始形式或作为所谓改良活疫苗(MLV)中之减毒生物体之完整的活生物体。抗原可进一步包含该等生物体之适当组件(亚单位疫苗),其中该等组件系藉由以下方式生成:破坏完整生物体或该等生物体之生长培养物且实施后续纯化步骤以产生期望结构;或藉由对适宜系统(如但不限于细菌、昆虫、哺乳动物或其它物种)进行适当操作来诱导合成过程,且随后视情况实施分离及纯化程序;或藉由使用适宜医药组合物直接加入遗传物质在需要疫苗之动物中诱导该等合成过程(多核苷酸疫苗接种)。抗原可包含所谓的死菌疫苗(KV)中之藉由适当方法灭活之完整生物体。若生物体系细菌,则死菌疫苗称为死菌苗(bacterin)。

[0022] 术语“医药上可接受之载剂”包括任何及所有溶剂、分散介质、包衣、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗细菌及抗真菌剂、等渗剂、吸附延迟剂、佐剂、免疫刺激剂及其组合。

[0023] 在本发明之一方面中,一或多种抗原系完整灭活死菌苗。一或多种完整灭活抗原可为选自由以下组成之群之完整灭活死菌苗:猪鼻支原体;猪滑液支原体;猪肺炎支原体;猪鼻支原体及猪滑液支原体;及猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体。

[0024] 因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a)一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b)医药上可接受之载剂,其中猪鼻支原体;猪滑液支原体;或猪鼻支原体及猪滑液支原体抗原系完整灭活死菌苗。

[0025] 根据另一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a)一或多种猪鼻支原体抗原;一或多种猪滑液支原体抗原及一或多种猪肺炎支原体抗原;b)医药上可接受之载剂,其中猪鼻支原体、猪滑液支原体和/或猪肺炎支原体抗原系完整灭活死菌苗。本发明之此方面涵盖,猪鼻支原体抗原系完整灭活死菌苗,或猪肺炎支原体抗原系完整灭活死菌苗,或猪滑液支原体抗原系完整灭活死菌苗。然而,本发明之此方面亦涵盖本发明免疫原性组合物中之所有抗原皆系完整灭活死菌苗,即猪鼻支原体及猪滑液支原体抗原或猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体抗原系完整灭活死菌苗。

[0026] 任何习用灭活方法皆可用于本发明之目的。因此,灭活可藉由本领域技术人员已知之化学和/或物理处理来实施。较佳灭活方法包括添加环化二乙烯亚胺(BEI),包括添加已环化为二乙烯亚胺(BEI)之2-溴乙烯胺氢溴化物(BEA)。其它较佳化学灭活剂包含(但不限于)曲拉通(Triton) X-100、脱氧胆酸钠、溴化十六烷基三甲铵、 β -丙内酯、硫柳汞(Thimerosal)、酚及甲醛(福尔马林)。然而,灭活亦可包含中和步骤。较佳中和剂包括(但不限于)硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠及诸如此类。

[0027] 较佳福尔马林灭活条件包括介于约0.02% (v/v) -2.0% (v/v) 之间、更佳约0.1% (v/v) -1.0% (v/v)、更佳约0.15% (v/v) -0.8% (v/v)、甚至更佳约0.16% (v/v) -0.6% (v/v) 且最佳约0.2% (v/v) -0.4% (v/v) 之福尔马林浓度。培育时间取决于支原体之抗性。一般而言,实施灭活过程直至适宜培养系统中检测不到支原体生长。

[0028] 在本发明之一方面中,完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗,较佳使用如上文所述之浓度。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a)一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b)医药上可接受之载剂,其中一或多种抗原系完整灭活死菌苗,且其中一或多种完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,该免疫原性组合物进一步包含一或多种猪肺炎支原体抗原。本发明之此方面涵盖,猪鼻支原体抗原系福尔马林灭活死菌苗,或猪肺炎支原体抗原系福尔马林灭活死菌苗,或猪滑液支原体抗原系福尔马林灭活死菌苗。然而,本发明之此方面亦涵盖,本发明免疫原性组合物中之所有支原体抗原皆系福尔马林灭活死菌苗,即猪鼻支原体及猪滑液支原体抗原或猪鼻支原体及猪肺炎支原体及猪滑液支原体抗原系福尔马林灭活死菌苗。

[0029] 可使用已知技术将本发明灭活死菌苗组份纳入脂质体中,例如Nature, 1974, 252, 252-254或Journal of Immunology, 1978, 120, 1109-13中所述之技术。在本发明之另一实施例中,可将本发明灭活死菌苗组份偶联至适宜生物化合物,例如多糖、肽、蛋白质或诸如此类或其组合。

[0030] 在另一方面中,如本文所提供之免疫原性组合物可有效治疗和/或预防有需要对象中由猪鼻支原体引起之临床病征。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a)一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b)医药上可接受之载剂,其中免疫原性组合物可有效治疗和/或预防有需要对象中由猪鼻支原体引起之临床病征。根据另一方面,该免疫原性组合物进一步包含一或多种猪肺炎支原体抗原。根据另一方面,一或多种支原体抗原系如上文所述该等支原体之完整灭活死菌苗。

[0031] 在另一方面中,如本文所提供且亦包含一或多种猪肺炎支原体抗原之免疫原性组合物可有效治疗和/或预防有需要对象中由猪肺炎支原体引起之临床病征。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a)一或多种猪鼻支原体抗原;一或多种猪滑液支原

体抗原;b) 一或多种猪肺炎支原体抗原;及c) 医药上可接受之载剂,其中该免疫原性组合物可有效治疗和/或预防有需要对象中由猪肺炎支原体引起之临床病征。根据另一方面,该免疫原性组合物可有效治疗和/或预防有需要对象中由猪鼻支原体及猪肺炎支原体引起之临床病征。根据另一方面,一或多种支原体抗原系如上文所述该等支原体之完整灭活死菌苗。

[0032] 术语“治疗和/或预防”系指减小畜群中具体支原体感染之发病率或降低由具体支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之严重度。因此,术语“治疗和/或预防”亦系指减小畜群中受具体支原体菌感染之动物数(=减小具体支原体感染之发病率),或与动物未接受如本文所提供免疫原性组合物之动物组相比,在动物已接受有效量之该免疫原性组合物之动物组中降低通常与支原体感染相关或由该感染引起之临床病征之严重度。

[0033] “治疗和/或预防”一般涉及向需要或可受益于此一治疗/预防之对象或对象群施用有效量之本发明免疫原性组合物。术语“治疗”系指一旦对象或畜群中之至少一些动物已被该支原体感染且其中该等动物已显示一些由该支原体感染引起或与该感染相关之临床病征,则施用有效量之免疫原性组合物。术语“预防”系指在对象之任何支原体感染之前,或至少在该动物或动物组中动物不显示任何由该支原体感染引起或与该感染相关之临床病征时,向该对象施用。

[0034] 如本文所用术语“有效量”意指(但不限于)引发或能引发对象之免疫反应之抗原之量。该有效量能减小畜群中具体支原体感染之发病率或降低具体支原体感染之临床病征之严重度。

[0035] 较佳地,与未经治疗或经在本发明之前可获得之免疫原性组合物治疗但随后被具体支原体菌感染之对象相比,临床病征之发病率或严重度减小至少10%、更佳至少20%、更佳至少30%、甚至更佳至少40%、更佳至少50%、甚至更佳至少60%、更佳至少70%、甚至更佳至少80%、更佳至少90%且最佳至少95%。

[0036] 如本文所用术语“临床病征”系指对象来自支原体菌之感染病征。感染之临床病征取决于所选病原体。该等临床病征之实施例包括(但不限于)呼吸窘迫、多发性浆膜炎(如腹膜炎、肋膜炎、心包炎)、关节炎(跛行及关节肿胀)、耳炎、被毛粗化、微热、抑郁症、食欲下降及菌血症。然而,临床病征亦包括(但不限于)可自活动物直接观察到之临床病征。可自活动物直接观察到之临床病征之实施例包括鼻排出物及眼分泌物、嗜睡、咳嗽、喘鸣、膈痉挛性呼吸(thumping)、高热、体重增加或减少、脱水、腹泻、关节肿胀、跛行、消瘦、皮肤苍白、羸弱、腹泻及诸如此类。

[0037] 可藉由向有需要对象施用一或多个剂量之本发明免疫原性组合物来降低对象中由具体支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之发病率或严重度。如实施例2及3中所显示,已证实如本文所提供免疫原性组合物在向有需要对象施用单一剂量后有效。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a) 一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b) 医药上可接受之载剂,其中该免疫原性组合物可在施用单一剂量后有效治疗和/或预防有需要对象中由猪鼻支原体引起之临床病征。该单一剂量仅施用一次。根据另一方面,该免疫原性组合物进一步包含一或多种猪肺炎支原体抗原。根据另一方面,一或多种支原体抗原系如上文所述该等支原体之完整灭活死菌苗。

[0038] 另外已显示,一个剂量之包含猪肺炎支原体之免疫原性组合物在施用该单一剂量之该免疫原性组合物之后亦有效。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含

a) 一或多种猪鼻支原体抗原;一或多种猪滑液支原体抗原;b) 一或多种猪肺炎支原体抗原;及c) 医药上可接受之载剂,其中该免疫原性组合物可在施用单一剂量后有效治疗和/或预防有需要对象中由猪肺炎支原体引起之临床病征。该单一剂量仅施用一次。根据另一方面,该免疫原性组合物可有效治疗和/或预防有需要对象中由猪鼻支原体及猪肺炎支原体引起之临床病征。根据另一方面,一或多种支原体抗原系如上文所述该等支原体之完整灭活死菌苗。

[0039] 在本发明之一方面中,制备免疫原性组合物以供施用单一剂量之该免疫原性组合物。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a) 一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b) 医药上可接受之载剂,其中制备免疫原性组合物以供施用呈单一剂量之该免疫原性组合物。该免疫原性组合物亦可包含一或多种猪肺炎支原体抗原,其中制备或提供包含以下之该免疫原性组合物以供施用单一剂量:a) 一或多种猪鼻支原体抗原及一或多种猪滑液支原体抗原;b) 一或多种猪肺炎支原体抗原;及c) 医药上可接受之载剂。根据另一方面,一或多种支原体抗原可为如本文所述之该等支原体之完整灭活死菌苗。此外,该免疫原性组合物可在施用单一剂量之猪鼻支原体抗原后有效治疗和/或预防有需要对象中由猪鼻支原体或猪鼻支原体及猪肺炎支原体引起之临床病征(其各自取决于组合物是否包含一或多种猪肺炎支原体抗原)。有利地,本发明所提供实验数据揭示,施用单一剂量之本发明免疫原性组合物可靠且有效地刺激保护性免疫反应。特定而言,已显示针对猪鼻支原体及猪肺炎支原体之可测量抗体反应。

[0040] 如上文所提及,如本文所用术语对象或宿主系指动物,较佳系指哺乳动物,例如小鼠、大鼠、天竺鼠、兔、仓鼠、猪、绵羊、狗、猫、马、猴或牛,且亦较佳系指人类。

[0041] 因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a) 一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b) 医药上可接受之载剂,其中免疫原性组合物可有效治疗和/或预防猪中由猪鼻支原体引起之临床病征。根据另一方面,该免疫原性组合物可有效治疗和/或预防猪中由猪鼻支原体引起之临床病征。在该免疫原性组合物进一步包含一或多种猪肺炎支原体抗原时,根据另一方面,其可有效治疗和/或预防猪中由猪肺炎支原体引起之临床病征。根据另一方面,包含一或多种猪鼻支原体及猪肺炎支原体抗原之该免疫原性组合物可有效治疗和/或预防猪中由猪鼻支原体及猪肺炎支原体引起之临床病征。同样,一或多种支原体抗原可为如上文所述该等支原体之完整灭活死菌苗。

[0042] 在本发明另一方面中,免疫原性组合物系疫苗。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a) 一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b) 医药上可接受之载剂,其中免疫原性组合物系疫苗。该疫苗亦可包含一或多种猪肺炎支原体抗原。本发明疫苗在施用有需要对象时具有与针对免疫原性组合物所述相同之有益性质。

[0043] 在本发明之一方面中,医药上可接受之载剂选自由以下组成之群:溶剂、分散介质、包衣、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂、吸附延迟剂、佐剂、免疫刺激剂及其组合。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a) 一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b) 医药上可接受之载剂,其中医药上可接受之载剂选自由以下组成之群:溶剂、分散介质、包衣、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂、吸附延迟剂、佐剂、免疫刺激剂及其组合。如上文所提及,该疫苗亦可包含一或多种猪肺炎支原体抗原。此外,该等支原体之一或多种支原体抗原可作为如上文所述之完

整灭活死菌苗来提供。

[0044] 如本文所用“佐剂”可包括氢氧化铝及磷酸铝;皂苷,例如Qui 1A, QS-21 (Cambridge Biotech公司, Cambridge MA)、GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals公司, Birmingham, AL);油包水乳液;水包油乳液;水包油包水乳液。乳液可尤其基于轻质液体石蜡油(欧洲药典类型(European Pharmacopea type));类异戊二烯油,例如角鲨烷或角鲨烯;由烯烃(尤其异丁烯或癸烯)寡聚产生之油;含有直链烷基之酸或醇之酯,更具体而言植物油、油酸乙酯、丙二醇二-(辛酸酯/癸酸酯)、甘油三-(辛酸酯/癸酸酯)或丙二醇二油酸酯;具有支链脂肪酸或脂肪醇之酯,尤其异硬脂酸酯。油可与乳化剂组合使用以形成乳液。乳化剂较佳为非离子型表面活性剂,尤其山梨醇酐、二缩甘露醇(例如无水甘露醇油酸酯)、二醇、聚甘油、丙二醇与油酸、异硬脂酸、蓖麻油酸或羟基硬脂酸之视情况经乙氧基化之酯,以及聚氧丙烯-聚氧乙烯共聚物嵌段,具体而言普流尼克(Pluronic)产品,尤其L121。参见Hunter等人, *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (编辑Stewart-Tull, D.E.S.), John Wiley and Sons, NY, 第51-94页(1995)及Todd等人, *Vaccine* 15:564-570(1997)。举例而言,可使用M.Powell及M.Newman编辑之“*Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*”, Plenum Press, 1995第147页阐述之SPT乳液及同一本书的第183页阐述之乳液MF59。其它适宜佐剂尤其包括(但不限于)RIBI佐剂系统(Ribi公司)、嵌段共聚物(CytRx, Atlanta GA)、SAFM(Chiron, Emeryville CA)、单磷酰脂质A、阿夫立定(Avridine)脂质-胺佐剂、来自大肠杆菌(*E.coli*, 重组或其它)之不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS 1314或胞壁酰二肽。在马来酸酐与烯基衍生物之共聚物中包括共聚物EMA(Monsanto), 其为马来酸酐与乙烯之共聚物。将该等聚合物溶解于水中产生酸溶液, 较佳将其中和至生理pH以得到佐剂溶液, 将免疫原性组合物、免疫原性组合物或疫苗组合物本身纳入该佐剂溶液中。

[0045] 在本发明之一方面中, 医药上可接受之载剂系选自由以下组成之群之佐剂: 氢氧化铝、磷酸铝、皂苷、油包水乳液、水包油乳液、水包油包水乳液、丙烯酸系或甲基丙烯酸系聚合物、马来酸酐与烯基衍生物之共聚物、RIBI佐剂系统、嵌段共聚物、SAF-M、单磷酰脂质A、阿夫立定脂质-胺、来自大肠杆菌(重组或其它)之不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS 1314、胞壁酰二肽及其组合。因此, 根据一方面, 本申请提供免疫原性组合物, 其包含a) 一或多种猪鼻支原体抗原; 及一或多种猪滑液支原体抗原; 及b) 医药上可接受之载剂, 其中医药上可接受之载剂系选自由以下组成之群之佐剂: 氢氧化铝、磷酸铝、皂苷、油包水乳液、水包油乳液、水包油包水乳液、丙烯酸系或甲基丙烯酸系聚合物、马来酸酐与烯基衍生物之共聚物、RIBI佐剂系统、嵌段共聚物、SAF-M、单磷酰脂质A、阿夫立定脂质-胺、来自大肠杆菌(重组或其它)之不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS 1314、胞壁酰二肽及其组合。该疫苗亦可包含一或多种猪肺炎支原体抗原。此外, 该等支原体之一或多种支原体抗原可作为上文所述之完整灭活死菌苗来提供。

[0046] 佐剂之另一实施例系选自丙烯酸系或甲基丙烯酸系聚合物及马来酸酐与烯基衍生物之共聚物之化合物。有利的佐剂化合物系丙烯酸系或甲基丙烯酸系聚合物, 其尤其与糖或多元醇之聚烯基醚交联。该等化合物被称为术语卡波姆(carbomer) (Pharmeuropa, 第8卷, 第2期, 1996年6月)。本领域技术人员亦可参考美国专利第2,909,462号, 其阐述与聚羟基化化合物交联之该等丙烯酸聚合物, 该聚羟基化化合物具有至少3个、较佳不多于8个羟

基,至少3个羟基之氢原子经具有至少2个碳原子之不饱和脂肪族基团置换。较佳基团系彼等含有2至4个碳原子者,例如乙烯基、烯丙基及其它乙烯系不饱和基团。不饱和基团自身可含有诸如甲基等其它取代基。以名称CARBOPOL® (BF Goodrich, Ohio, USA) 出售之产品尤其适合。其系与聚烯基醚或二烯基二醇交联或与烯丙基蔗糖或与烯丙基新戊四醇交联之丙烯酸聚合物。尤其可提及CARBOPOL® 974P、934P及971P。最佳使用CARBOPOL® 971P。

[0047] 较佳地,佐剂系以约100 μ g至约10mg/剂量之量添加。甚至更佳地,佐剂系以约100 μ g至约10mg/剂量之量添加。更佳地,佐剂系以约500 μ g至约5mg/剂量之量添加。更佳地,佐剂系以约750 μ g至约2.5mg/剂量之量添加。最佳地,佐剂系以约1mg/剂量之量添加。

[0048] 在本发明之一方面中,医药上可接受之载剂系水包油包水乳液或卡波姆。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a) 一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b) 医药上可接受之载剂,其中医药上可接受之载剂系水包油包水乳液或卡波姆。该疫苗亦可包含一或多种猪肺炎支原体抗原。此外,该等支原体之抗原可作为如上文所述之完整灭活死菌苗来提供。

[0049] 在本发明之一方面中,水包油包水乳液系Montanide ISA207VG或CARBOPOL®。Montanide ISA207VG系由无水甘露醇之油酸酯于非矿物油中之溶液组成之佐剂,且经设计以获得水包油包水疫苗乳液。Montanide ISA207VG为本领域技术人员所熟知且可立即使用。因此,根据一方面,本申请提供免疫原性组合物,其包含a) 一或多种猪鼻支原体抗原;及一或多种猪滑液支原体抗原;及b) 医药上可接受之载剂,其中医药上可接受之载剂系Montanide ISA207VG或CARBOPOL®。如上文所提及,该疫苗亦可包含一或多种猪肺炎支原体抗原。此外,该等支原体之抗原可作为如上文所述之完整灭活死菌苗来提供。

[0050] 本发明亦提供藉由包含以下之方法获得之免疫原性组合物:a) 在低血清真核细胞系统中培养选自以下组成之群之支原体菌:猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体; b) 获得该等支原体菌之一或多种抗原;及c) 添加医药上可接受之载剂。

[0051] 术语“培养”为本领域技术人员已知。该术语系指细胞在生物体外之培养物中之增殖。具体而言,术语“培养”系指细胞在生物体外在细胞系统中之增殖。

[0052] 术语“细胞系统”为本领域技术人员已知。具体而言,术语“细胞系统”系用于培养微生物、例如支原体菌之活体外细胞培养系统。该细胞系统包含宿主细胞及适合该等细胞在生物体外增殖之细胞培养基。具体而言,宿主细胞可易受或可不易受支原体菌感染。该等宿主细胞可作为呈灭活形式之活细胞或作为细胞碎片存在。较佳地,该等宿主细胞易受支原体菌感染。可用于实践如本文所述之方法之宿主细胞包括(但不限于)马-达二氏(Madin-Darby)犬肾上皮(MDCK)细胞(例如如美国组织培养物保藏中心以登录号ATCC CCL-34或ATCC CRL-2285存放之马-达二氏犬肾上皮细胞)或McCoy细胞(例如如美国组织培养物保藏中心以登录号ATCC CRL-1696所存放)。适宜细胞培养基为本领域技术人员已知且可商购。其可包含营养素、盐、生长因子、抗生素、血清(例如胎牛血清)及pH指示剂(例如酚红)。

[0053] 术语“真核细胞系统”包含初代真核细胞及源自诸如植物或动物等多细胞生物体之真核细胞。此外,真核细胞系统涵盖真核单细胞生物体(亦称微生物),如细菌或真菌(包括酵母)。然而,应理解真核细胞与支原体菌不同。

[0054] 术语“低血清的”系指与用于在无细胞培养系统中培养支原体菌之血清之量相比,经添加用于在真核细胞系统中培养相同物种之支原体菌之血清之减少量。与用于在无细胞

培养系统中培养支原体菌之血清之量相比,用于在真核细胞系统中培养支原体菌之血清之量减少至少10%、更佳至少20%、更佳至少30%、甚至更佳至少40%、甚至更佳至少50%、甚至更佳至少60%、甚至更佳至少70%、甚至更佳至少80%、甚至更佳至少90%、甚至更佳至少95%、甚至更佳至少96%、甚至更佳至少97%、甚至更佳至少98%、甚至更佳至少99%、最佳100%。因此,必须理解,根据本发明,最佳在缺少任何血清之真核细胞系统中培养支原体菌。

[0055] 如本文所用术语“无细胞培养系统”系指除了支原体菌以外不包括任何细胞之培养系统。

[0056] 用于在真核细胞系统中培养支原体菌之较佳血清含量包括介于约0-10% (v/v) 之间、更佳约1-9% (v/v)、更佳约1-8% (v/v)、甚至更佳约1-7% (v/v)、甚至更佳约1-6% (v/v) 且最佳约2-5% (v/v) 之血清浓度。

[0057] 用于在包含MDCK细胞之真核细胞系统中培养支原体菌之较佳血清含量包括介于约0-6% (v/v) 之间、更佳约1-5% (v/v)、更佳约2-4% (v/v)、甚至更佳约2-3% (v/v) 且最佳约2% (v/v) 之血清浓度。

[0058] 用在包含McCoy细胞之真核细胞系统中培养支原体菌之较佳血清含量包括介于约0-10% (v/v) 之间、更佳约1-9% (v/v)、更佳约2-8% (v/v)、甚至更佳约3-7% (v/v)、甚至更佳约4-6% (v/v) 且最佳约5% (v/v) 之血清浓度。

[0059] 根据本发明,必须理解真核细胞系统之真核细胞可被支原体菌感染。该感染导致支原体菌在真核细胞系统内增殖。支原体菌对真核细胞之感染及容许支原体菌增殖之后培育期之条件为本领域技术人员所熟知。然而,较佳地,转染后将细胞培育长达21天、更佳约2天至约14天、更佳约2天至约8天、更佳约3至5天时期。较佳培育条件包括介于约32-42℃之间、更佳约34-40℃、更佳约35-39℃、甚至更佳约36-38℃且最佳约37℃之温度。较佳培育条件亦包括介于约2%至8%之间、更佳约3%至7%、甚至更佳约4%至6%且最佳约5%之CO₂浓度。较佳地,在转染后观察真核细胞之特征变化,例如细胞密度趋势、在感染后期间活力之下降(包括细胞病变效应)及培养基由于pH变化所致之颜色变化。

[0060] 术语“获得”包含抗原之采集、分离、纯化和/或配制(如灭活和/或掺和)。

[0061] 术语“采集”系指自经转染真核细胞系统收集或回收支原体菌抗原。可使用业内已知之任何习用方法来回收该支原体抗原,例如任何分离方法。业内熟知方法包含离心或过滤,例如使用具有某一孔径之半透膜。

[0062] 术语“分离”包含支原体抗原之分离步骤。用于自经感染真核细胞系统分离支原体菌抗原之方法为本领域技术人员已知。彼等方法包含物理和/或化学方法,包括(但不限于)冷冻-解冻循环、用超音波处理及诸如此类。

[0063] 用于自分离物“纯化”抗原之方法为本领域技术人员已知,例如彼等阐述于Protein purification methods-a practical approach(E.L.V.Harris及S.Angal编辑, IRL Press at Oxford University Press)中之方法。彼等方法包括(但不限于)藉由离心和/或过滤分离、沉淀、粒径筛析(凝胶过滤)层析、亲和层析、金属螯合物层析、离子交换层析、共价层析、疏水相互作用层析及诸如此类。抗原可以经纯化之纯净形式获得,或不含或实质上不含其它细胞物质或培养基等。在该分离和/或纯化后,抗原展现至少80%、更佳80%-90%、更佳90%-97%、最佳大于97%之纯度直至不含任何污染之绝对纯净形式。

[0064] 根据另一方面,如本文所用“获得”可亦包括进一步最后加工步骤,如添加缓冲剂、灭活、中和步骤及诸如此类。

[0065] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种选自以下之群之支原体抗原:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。

[0066] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。

[0067] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。

[0068] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。

[0069] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪肺炎支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。

[0070] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。

[0071] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。

[0072] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。

[0073] 一或多种支原体抗原较佳藉由如上文所述之任一方法灭活。根据另一方面,所有支原体抗原较佳藉由如上文所述之任一方法灭活。因此,根据另一方面,本发明提供藉由包含以下之方法制备之免疫原性组合物:a) 在低血清真核细胞系统中培养选自由以下组成之群之支原体菌:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合;b) 获得该等支原体菌之一或多种抗原,其中该获得步骤包括灭活一或多种支原体抗原;及c) 添加医药上可接受之载剂。灭活步骤可藉由如上文所述之任一方法来实施。根据一方面,该灭活产生支原体菌之完整灭活死菌苗。较佳地,支原体菌之该灭活系藉由福尔马林来实施以使得支原体抗原系完整福尔马林灭活死菌苗。在一方面中,灭活支原体抗原系猪鼻支原体之完整灭活死菌苗、猪肺炎支原体之完整灭活死菌苗、猪滑液支原体之完整灭活死菌苗、猪鼻支原体及猪滑液支原体之完整灭活死菌苗、或猪肺炎支原体及猪滑液支原体之完整灭活死菌苗、或猪鼻支原体及猪肺炎支原体之完整灭活死菌苗、或猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体之完整灭活死菌苗。根据另一方面,免疫原性组合物内之所有支原体抗原皆系完整灭

活死菌苗, 较佳系完整福尔马林灭活死菌苗。

[0074] 在一方面中, 支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生, 其中该血清不含猪血清。由于支原体菌猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体皆系猪病原体, 故猪血清可包含可干扰本发明组合物中之支原体抗原之组份, 故不使用猪血清或不使用血清系本发明之较佳方面。因此, 根据一方面, 本申请提供藉由包含以下之方法获得之免疫原性组合物: a) 在低血清真核细胞系统中培养选自以下组成之群之支原体菌: 猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合; b) 获得该等支原体菌之抗原; 及 c) 添加医药上可接受之载剂, 其中真核细胞系统不含猪血清。

[0075] 如上文所提及, 真核细胞系统可包含MDCK细胞系或McCoy细胞系之细胞。因此, 根据一方面, 本申请提供制备免疫原性组合物之方法, 其中该方法包含a) 在低血清真核细胞系统中培养选自以下组成之群之支原体菌: 猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合; b) 获得该等支原体菌之抗原; 及 c) 添加医药上可接受之载剂, 其中真核细胞系统包含MDCK细胞系或McCoy细胞系。

[0076] 在另一方面中, 免疫原性组合物中之支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生, 其中该支原体抗原具有与得自在无细胞培养系统中培养之支原体之相同抗原相比增强之免疫原性。

[0077] 如本文所用术语“增强之免疫原性”意指, 由包含所关注抗原之免疫原性组合物引起之免疫反应与包含相同抗原之参照免疫原性组合物相比有所增强, 其中参照免疫原性组合物中之抗原系由在无细胞培养系统中培养之支原体菌制备。

[0078] 术语“增强的”意指, 细胞和/或抗体介导之免疫反应与由包含相同抗原之参照免疫原性组合物引发之细胞和/或抗体介导之免疫反应相比增强至少10%、较佳至少20%、更佳至少30%、甚至更佳至少40%、甚至更佳至少50%、甚至更佳至少75%、最佳至少100%, 其中参照免疫原性组合物之抗原系由在无细胞培养系统中培养之支原体菌制备。本领域技术人员通常已知如何测量细胞和/或抗体介导之免疫反应。具体而言, 该本领域技术人员了解比较所关注免疫原性组合物之细胞介导之免疫反应与参照之细胞介导之免疫反应, 或比较所关注免疫原性组合物与参照组合物之抗体介导之免疫反应, 但不比较所关注免疫原性组合物之细胞介导之免疫反应与参照之抗体介导之免疫反应, 或反之亦然。此外, 细胞介导之免疫反应可藉由例如测量所关注免疫原性组合物/抗原对细胞毒性T细胞之活化来测量。抗体介导之免疫反应可藉由例如测量因向动物施用包含该抗原之免疫原性组合物而生成之抗原特异性抗体之量来测量。细胞和/或抗体介导之免疫反应可藉由例如使用小鼠模型、猫模型、牛模型或猪模型来测量。然而, 应使用实施例4及5中所述之分析作为参照分析来检测针对猪鼻支原体及猪肺炎支原体之免疫反应。

[0079] 术语“相同抗原”意指抗原之性质相同。因此, 若在低血清真核细胞系统中产生之免疫原性组合物中之支原体抗原系猪鼻支原体之完整灭活死菌苗, 则相同抗原意指无细胞系统之支原体抗原亦系猪鼻支原体之完整灭活死菌苗。此外, 若在低血清真核细胞系统中产生之免疫原性组合物中之支原体抗原系根据特定方法制备或纯化, 则相同抗原意指无细胞系统之支原体抗原系根据相同方法制备或纯化。

[0080] 有利地, 本发明所提供实验数据揭示, 藉由上述方法提供之支原体抗原具有与自在无细胞培养系统中培养之支原体菌获得之抗原相比增强之免疫原性。特定而言, 基于

MDCK之猪鼻支原体疫苗显示较早开始血清转化、较大血清阳性猪数目及较高血清学效价。

[0081] 因此,根据一方面,本申请提供藉由包含以下之方法获得之免疫原性组合物:a)在低血清真核细胞系统中培养选自以下组成之群之支原体菌:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合;b)获得该等支原体菌之抗原;及c)添加医药上可接受之载剂,其中该免疫原性组合物具有与包含得自在无细胞培养系统中培养之支原体之相同抗原之免疫原性组合物相比增强之免疫原性。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0082] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物具有与包含得自在无细胞培养系统中培养之支原体之相同抗原之免疫原性组合物相比增强之免疫原性。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0083] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物具有与包含得自在无细胞培养系统中培养之支原体之相同抗原之免疫原性组合物相比增强之免疫原性。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0084] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物具有与包含得自在无细胞培养系统中培养之支原体之相同抗原之免疫原性组合物相比增强之免疫原性。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0085] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪肺炎支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物具有与包含得自在无细胞培养系统中培养之支原体之相同抗原之免疫原性组合物相比增强之免疫原性。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0086] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物具有与包含得自在无细胞培养系统中培养之支原体之相同抗原之免疫原性组合物相比增强之免疫原性。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活

死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0087] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物具有与包含得自在无细胞培养系统中培养之支原体之相同抗原之免疫原性组合物相比增强之免疫原性。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0088] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物具有与包含得自在无细胞培养系统中培养之支原体之相同抗原之免疫原性组合物相比增强之免疫原性。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0089] 在另一方面中,支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物包含该真核细胞系统中真核细胞之组份。

[0090] 术语“真核细胞之组份”包含完整细胞及该等真核细胞之碎片二者。术语“碎片”包含真核细胞之任何部分,例如作为整体或其部分之细胞膜或细胞内细胞器之部分。然而,术语碎片亦涵盖该真核细胞中包含脂质、蛋白质、糖、DNA、RNA及诸如此类以及其组合之任何部分。此外,真核细胞之组份及支原体抗原可分开存于免疫原性组合物中或彼此附接或其组合。

[0091] 因此,根据一方面,本申请提供藉由包含以下之方法获得之免疫原性组合物:a)在低血清真核细胞系统中培养选自以下组成之群之支原体菌:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合;b)获得该等支原体菌之抗原;及c)添加医药上可接受之载剂,其中该免疫原性组合物包含该真核细胞系统中真核细胞之组份。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0092] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物包含该真核细胞系统中真核细胞之组份。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0093] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物包含该真核细胞系统中真核细胞之组份。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。

该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0094] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物包含该真核细胞系统中真核细胞之组份。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0095] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪肺炎支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物包含该真核细胞系统中真核细胞之组份。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0096] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物包含该真核细胞系统中真核细胞之组份。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0097] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物包含该真核细胞系统中真核细胞之组份。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0098] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中该免疫原性组合物包含该真核细胞系统中真核细胞之组份。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0099] 在另一方面中,支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中真核细胞之该等组份附接至支原体抗原。

[0100] 术语“附接的”系指真核细胞之该等组份对支原体抗原之任何相互作用、缔合、结

合、附着或连接。因此,术语附接的涵盖任何相互作用,包括间接或直接的、不可逆或可逆的、物理及化学的、静电和/或共价键。因此,必须理解真核细胞之组份可(例如)结合至支原体抗原。然而,必须理解真核细胞之组份亦可连接至支原体抗原。该连接可藉由若干种本领域技术人员熟知之方法来产生,例如甲醛处理及诸如此类。

[0101] 因此,根据一方面,本申请提供藉由包含以下之方法获得之免疫原性组合物:a)在低血清真核细胞系统中培养选自以下组成之群之支原体菌:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合;b)获得该等支原体菌之抗原;及c)添加医药上可接受之载剂,其中真核细胞之该等组份附接至支原体抗原。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0102] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中真核细胞之该等组份附接至支原体抗原。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0103] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中真核细胞之该等组份附接至支原体抗原。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0104] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中真核细胞之该等组份附接至支原体抗原。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0105] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪肺炎支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中真核细胞之该等组份附接至支原体抗原。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0106] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中真核细胞之该等组份附接至支原体抗原。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0107] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中真核细胞之该等组份附接至支原体抗原。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0108] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原,其中一或多种支原体抗原系在低血清真核细胞系统中产生,其中真核细胞之该等组份附接至支原体抗原。根据另一方面,所有支原体抗原皆系在低血清真核细胞系统中产生。此外,根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。根据另一方面,所有支原体抗原皆系灭活死菌苗,较佳系福尔马林灭活死菌苗。

[0109] 同样,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种选自以下组成之群之支原体抗原:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合,其中一或多种支原体抗原系自低血清真核细胞系统获得。因此,根据另一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种选自以下组成之群之抗原:猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体;及一或多种真核细胞系统之组份。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0110] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体之支原体抗原;及一或多种真核细胞系统之组份。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0111] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪滑液支原体之支原体抗原;及一或多种真核细胞系统之组份。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0112] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体之支原体抗原;及一或多种真核细胞系统之组份。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0113] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪肺炎支原体之支原体抗原;及一或多种真核细胞系统之组份。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0114] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体及猪滑液支原体之支原体抗原;及一或多种真核细胞系统之组份。根据另一方面,一或多种支原

体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0115] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原;及一或多种真核细胞系统之组份。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0116] 因此,根据一方面,本发明提供免疫原性组合物,其包含一或多种猪鼻支原体、猪肺炎支原体及猪滑液支原体之支原体抗原;及一或多种真核细胞系统之组份。根据另一方面,一或多种支原体抗原系完整灭活死菌苗。该完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0117] 本发明亦系关于对对象进行免疫之方法,其包含向对象施用如本文所述之任一免疫原性组合物。

[0118] 术语“免疫”系指藉由向欲免疫对象施用免疫原性组合物,由此引起针对该免疫原性组合物中所包括抗原之免疫反应之主动免疫。

[0119] 较佳地,免疫导致减小畜群中具体支原体感染之发病率或降低由具体支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之严重度。

[0120] 根据另一方面,本发明提供用本文所提供免疫原性组合物中之任一种对对象进行免疫之方法,其包含向该对象施用本发明免疫原性组合物。

[0121] 该免疫原性组合物包含a)一或多种猪滑液支原体抗原及一或多种选自由猪肺炎支原体及猪鼻支原体及其组合组成之群之抗原;及b)医药上可接受之载剂。

[0122] 根据另一方面,本发明免疫原性组合物包含:a)一或多种猪鼻支原体抗原及一或多种猪滑液支原体抗原;及b)医药上可接受之载剂。根据另一方面,免疫原性组合物亦包含一或多种猪肺炎支原体抗原。

[0123] 若免疫原性组合物系在如本文所述之低血清真核细胞系统中产生,则免疫原性组合物一般可包含一或多种选自由以下组成之群之支原体菌之抗原:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合,如下文进一步所定义。根据上文所定义之另一方面,该免疫原性组合物可包含一或多种真核细胞系统之组份以及一或多种选自由以下组成之群之支原体菌之抗原:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合。

[0124] 根据另一方面,一或多种用于对有需要对象进行免疫之支原体抗原系完整灭活死菌苗。本发明之此方面涵盖其中任一种支原体抗原系完整灭活死菌苗。然而,本发明之此方面亦涵盖,本发明免疫原性组合物中之所有抗原皆系完整灭活死菌苗,即猪鼻支原体抗原、猪滑液支原体抗原和/或猪肺炎支原体抗原系完整灭活死菌苗。该等完整灭活死菌苗可藉由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该等完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0125] 较佳地,该施用法导致降低畜群中特定支原体感染之发病率或降低由特定支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之严重度。

[0126] 根据另一方面,使用如本文所提供之免疫原性组合物对有需要对象之免疫导致可以预防对象感染支原体感染。甚至更佳地,免疫导致针对支原体感染产生有效的长效免疫反应。应理解,该时间期将持续超过2个月、更佳超过3个月、更佳超过4个月、更佳超过5个月、更佳超过6个月。应理解,免疫法不一定在所有接受免疫对象中皆有效。然而,该术语要

求畜群中之大部分对象系经有效免疫。

[0127] 较佳地,在此情况下设想对象群通常(即不实施免疫)会出现通常由支原体感染引起或与该感染相关之临床病征。本领域技术人员可立即确定畜群中之对象是否进行有效免疫。较佳地,若与未经免疫或用在本发明之前可获得之免疫原性组合物进行免疫但随后被具体支原体菌感染之对象相比,在给定畜群之至少33%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%之对象中,临床病征之发病率或严重度减小至少10%、更佳至少20%、更佳至少30%、甚至更佳至少40%、更佳至少50%、甚至更佳至少60%、更佳至少70%、甚至更佳至少80%、更佳至少90%且最佳至少95%,则免疫应有效。

[0128] 在本发明之一方面中,对象选自猪、牛、猫及狗组成之列表。因此,根据一方面,提供对对象进行免疫之方法,其包含向对象施用本发明免疫原性组合物,其中该对象选自猪、牛、猫及狗组成之列表。

[0129] 在本发明之一方面中,免疫原性组合物施用一次。因此,根据另一方面,提供对对象进行免疫之方法,其包含向对象施用本发明免疫原性组合物,其中该免疫原性组合物可在向该对象施用单一剂量之该免疫原性组合物之后有效减小畜群中具体支原体感染之发病率或降低由具体支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之严重度。应理解,该单一剂量仅施用一次。如实施例2及3中所示,已证实如本文所提供免疫原性组合物在向有需要对象施用单一剂量后有效。

[0130] 因此,在该方法包含施用一或多种猪鼻支原体抗原时,该免疫原性组合物有效减小畜群中猪鼻支原体感染之发病率或降低由猪鼻支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之严重度。在该方法包含施用一或多种猪肺炎支原体抗原时,根据另一方面,其有效减小畜群中猪肺炎支原体感染之发病率或降低由猪肺炎支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之严重度。同样,本发明方法欲施用之一或多种支原体抗原可为如上文所述该等支原体之完整灭活死菌苗。

[0131] 较佳地,单一剂量具有介于约0.5ml与2.5ml之间、更佳介于约0.6ml与2.0ml之间、甚至更佳介于约0.7ml与1.75ml之间、更佳介于约0.8ml与1.5ml之间、甚至更佳介于约0.9ml与1.25ml之间之总体积,且1.0ml单一剂量最佳。

[0132] 然而,免疫原性组合物可施用两次或若干次,且在施用第一剂量之后施用第二(加强)剂量。较佳地,在第一剂量之后至少15天施用第二剂量。更佳地,在第一剂量之后介于15天与40天之间施用第二剂量。甚至更佳地,在第一剂量之后至少17天施用第二剂量。更佳地,在第一剂量之后介于17天与30天之间施用第二剂量。甚至更佳地,在第一剂量之后至少19天施用第二剂量。更佳地,在第一剂量之后介于19天与25天之间施用第二剂量。最佳地,在第一剂量之后至少21天施用第二剂量。在两次施用方案之较佳方面中,第一及第二剂量之免疫原性组合物二者皆以相同量施用。较佳地,每一剂量为上文指定之较佳量,且1ml剂量对于第一及第二剂量皆为最佳。除了第一及第二剂量方案以外,替代实施例包含其它后续剂量。举例而言,在该等方面中可施用第三、第四或第五剂量。较佳地,后续第三、第四及第五剂量方案系以与第一剂量相同之量施用,且该等剂量之间之时间范围与上文所提及第一与第二剂量之间之定时一致。

[0133] 免疫原性组合物较佳系局部或全身施用。常用适宜施用途径系经口或非经肠施用,例如鼻内、静脉内、肌内、腹膜内、皮下以及吸入。然而,根据化合物之性质及作用模式,

免疫原性组合物亦可藉由其它途径来施用。

[0134] 通常,在使用细菌抗原(该支原体死菌苗)时,免疫原性组合物含有约 10^3 至约 10^{10} 菌落形成单位(CFU)之细菌抗原/剂量、较佳约 10^4 至约 10^9 CFU之细菌抗原/剂量、更佳约 10^5 至约 10^6 CFU之细菌抗原/剂量之量。若在免疫原性组合物中使用灭活死菌苗,则CFU值系指支原体菌在灭活之前之量。

[0135] 例如,本发明之包含猪肺炎支原体抗原之免疫原性组合物较佳以约 10^2 至约 10^{10} CFU/剂量、较佳约 10^3 至约 10^9 CFU/剂量之量使用,甚至更佳以约 10^4 至约 10^8 CFU/剂量之量使用,最佳以约 10^5 至约 10^7 CFU/剂量之量使用。本发明之包含猪鼻支原体抗原之免疫原性组合物较佳以约 10^2 至约 10^{10} CFU/剂量、较佳约 10^3 至约 10^9 CFU/剂量之量使用,甚至更佳以约 10^4 至约 10^8 CFU/剂量之量使用,最佳以约 10^5 至约 10^7 CFU/剂量之量使用。本发明之包含猪滑液支原体抗原之免疫原性组合物较佳以约 10^2 至约 10^{10} CFU/剂量、较佳约 10^3 至约 10^9 CFU/剂量之量使用,甚至更佳以约 10^4 至约 10^8 CFU/剂量之量使用,最佳以约 10^5 至约 10^7 CFU/剂量之量使用。

[0136] 因此,根据另一方面,提供对对象进行免疫之方法,其包含向对象施用本发明免疫原性组合物,其中该免疫原性组合物可在向该对象施用单一剂量之该免疫原性组合物之后有效减小畜群中具体支原体感染之发病率或降低由具体支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之严重度,其中该单一剂量包含 10^2 至约 10^{10} CFU之支原体菌/剂量。

[0137] 在本发明之一方面中,与相同物种之未免疫对照组之对象相比,对有需要对象进行免疫之方法导致选自由以下组成之功效参数之改良:较短菌血症持续时间、较低细菌负荷或其组合。

[0138] 术语“较短菌血症持续时间”意指,与未经免疫或用在本发明之前可获得之免疫原性组合物进行免疫但随后被具体支原体菌感染之对象相比,经免疫原性组合物免疫之对象之菌血症持续时间缩短至少10%、更佳至少20%、更佳至少30%、甚至更佳至少40%、更佳至少50%、甚至更佳至少60%、更佳至少70%、甚至更佳至少80%、更佳至少90%且最佳至少100%。应理解,菌血症持续时间系在其比较之前在每一组(未免疫组及免疫组)之代表数目之对象中测定。

[0139] 术语“较低细菌负荷”意指,在用本发明免疫原性组合物进行免疫后,与未经免疫或用在本发明之前可获得之免疫原性组合物进行免疫但随后被具体支原体菌感染之对象相比,在对象中,经野生型支原体菌感染之对象之该等野生型支原体菌之细菌负荷降低至少10%、更佳至少20%、更佳至少30%、甚至更佳至少40%、更佳至少50%、甚至更佳至少60%、更佳至少70%、甚至更佳至少80%、更佳至少90%且最佳至少100%。应理解,“细菌负荷”系在其比较之前在每一组(未免疫组及免疫组)之代表数目之对象中测定。

[0140] 因此,根据另一方面,提供对对象进行免疫之方法,其包含向对象施用本发明免疫原性组合物,对该有需要对象进行免疫,导致其与相同物种之未免疫对照组之对象相比,可改良选自由以下组成之功效参数:缩短菌血症持续时间、减少细菌负荷、或其组合。

[0141] 在本发明之一方面中,该方法适合于约三周龄之对象。因此,根据一方面,本申请提供对对象进行免疫之方法,其包含向对象施用本发明免疫原性组合物,其中该方法适合于约三周龄之对象。

[0142] 有利地,本发明所提供实验数据揭示免疫原性组合物在约3周龄仔猪中之有效性。

[0143] 较佳地,该欲免疫对象介于1日龄至21日龄之间,更佳地,该欲免疫对象介于1日龄至10日龄之间,甚至更佳地,介于1日龄至9日龄之间,甚至更佳介于1日龄至8日龄之间,甚至更佳介于1日龄至7日龄之间,甚至更佳介于1日龄至6日龄之间,甚至更佳介于1日龄至5日龄之间,甚至更佳介于1日龄至4日龄之间,甚至更佳介于1日龄至3日龄之间,甚至更佳为1或2日龄且最佳为1日龄。

[0144] 因此,根据一方面,提供对对象进行免疫之方法,其包含向对象施用对有需要对象进行免疫之本发明免疫原性组合物,其中该欲免疫对象介于1日龄至21日龄之间。

[0145] 本发明亦系关于本文所提供之任一免疫原性组合物,其用于如本文所述之任一方法,例如用于治疗 and/或预防对象之支原体感染,或用于对对象进行针对该支原体感染之免疫。

[0146] 该免疫原性组合物包含a) 一或多种猪滑液支原体抗原及一或多种选自由以下组成之群之抗原:猪肺炎支原体、猪鼻支原体及其组合;及b) 医药上可接受之载剂。

[0147] 根据另一方面,本发明免疫原性组合物包含:a) 一或多种猪鼻支原体抗原及一或多种猪滑液支原体抗原;及b) 医药上可接受之载剂。根据另一方面,免疫原性组合物亦包含一或多种猪肺炎支原体抗原。

[0148] 若免疫原性组合物系在如本文所述之低血清真核细胞系统中产生,则免疫原性组合物一般可包含一或多种选自由以下组成之群之支原体菌抗原:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合,如下文进一步所定义。根据上文所定义之另一方面,该免疫原性组合物可包含一或多种真核细胞系统之组份以及一或多种选自由以下组成之群之支原体菌抗原:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合。

[0149] 根据另一方面,一或多种用于对有需要对象进行免疫之支原体抗原系完整灭活死菌苗。本发明之此方面涵盖,任一种支原体抗原系完整灭活死菌苗。然而,本发明之此方面亦涵盖本发明免疫原性组合物中之所有抗原皆系完整灭活死菌苗,即猪鼻支原体抗原、猪滑液支原体抗原和/或猪肺炎支原体抗原系完整灭活死菌苗。该等完整灭活死菌苗可由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该等完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0150] 较佳地,该使用导致减小畜群中具体支原体感染之发病率或降低由具体支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之严重度。

[0151] 本发明亦系关于如本文所述之免疫原性组合物之用途,其用于治疗和/或预防对象之支原体感染,或用于对对象进行针对支原体感染之免疫。

[0152] 该免疫原性组合物包含a) 一或多种猪滑液支原体抗原及一或多种选自由以下组成之群之抗原:猪肺炎支原体、猪鼻支原体及其组合;及b) 医药上可接受之载剂。

[0153] 根据另一方面,本发明免疫原性组合物包含:a) 一或多种猪鼻支原体抗原及一或多种猪滑液支原体抗原;及b) 医药上可接受之载剂。根据另一方面,免疫原性组合物亦包含一或多种猪肺炎支原体抗原。

[0154] 若免疫原性组合物系在如本文所述之低血清真核细胞系统中产生,则免疫原性组合物一般可包含一或多种选自由以下组成之群之支原体菌抗原:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合,如下文进一步所定义。根据上文所定义之另一方面,该免疫原性组合物可包含一或多种真核细胞系统之组份以及一或多种选自由以下组成之群之支原体菌抗原:猪鼻支原体、猪肺炎支原体、猪滑液支原体及其任一组合。

[0155] 根据另一方面,一或多种用于对有需要对象进行免疫之支原体抗原系完整灭活死菌苗。本发明之此方面涵盖,任一种支原体抗原系完整灭活死菌苗。然而,本发明之此方面亦涵盖本发明免疫原性组合物中之所有抗原皆系完整灭活死菌苗,即猪鼻支原体抗原、猪滑液支原体抗原和/或猪肺炎支原体抗原系完整灭活死菌苗。该等完整灭活死菌苗可由如本文所述之灭活方法来获得。较佳地,该等完整灭活死菌苗系福尔马林灭活死菌苗。

[0156] 较佳地,该使用导致减小畜群中具体支原体感染之发病率或降低由具体支原体感染引起或与该感染相关之临床病征之严重度。

实施例

[0157] 以下实施例仅意欲阐释本发明。其决不应限制申请专利范围之范畴。

[0158] 实施例1分别在MDCK细胞或McCoy细胞中之支原体菌之培养

[0159] A. 在MDCK细胞中之猪鼻支原体、猪滑液支原体及猪肺炎支原体之培养

[0160] 猪鼻支原体:

[0161] 将汇合T75烧瓶之MDCK细胞用胰蛋白酶处理,并使用MEM+5%FBS继代培养至5个T150烧瓶(1:10分开)中。将烧瓶在37°C+5%CO₂下培育直至观察到约95-100%汇合单层为止。倒出培养基并将烧瓶用1×PBS冲洗两次。然后将4-5ml猪鼻支原体添加至每一烧瓶(MOI=10-100)。在与上文相同之培育条件下将烧瓶感染不超过2小时。在感染期后,将升温至约37°C之足量感染培养基(MEM+2%FBS)添加至每一烧瓶中至每一烧瓶中60ml之总体积。然后培育烧瓶直至记录到>90% CPE为止(约3-7天)。然后自每一烧瓶收集细胞悬浮液并汇集在一起(传代n次)。然后使用此材料以与先前感染相同之方式感染95-100%汇合MDCK细胞之新烧瓶(传代n+1次),增加所用烧瓶数以获得认为需要之足够最终体积(传代n+2次,传代n+3次等)。

[0162] 猪滑液支原体:

[0163] 猪滑液支原体系以与猪鼻支原体相同之方式培养,但略有不同:感染培养基含有DMEM+2%FBS+1%精氨酸溶液;猪滑液支原体通常不展现CPE,故培养基之颜色变化及浊度系继代培养至下一代之关键指示剂。

[0164] 猪肺炎支原体:

[0165] 猪肺炎支原体系以与猪鼻支原体相同之方式培养。根据用于感染之菌株,CPE可存在或可不存在。因此,可使用培养基之颜色变化及浊度作为继代培养至下一代之指示剂。

[0166] B. 在McCoy细胞中用于猪鼻支原体、猪滑液支原体及猪肺炎支原体之培养条件

[0167] 猪鼻支原体:

[0168] McCoy细胞系以悬浮培养物形式在搅拌烧瓶中在补充有10%FBS之改良EMEM中生长。藉由接种新烧瓶以具有10⁵-10⁶细胞/ml之最终计数来对细胞进行继代培养。对于猪鼻支原体,在3L烧瓶中以1ml 10⁷-10⁸CFU接种10⁵-10⁶细胞/ml浓度的500ml细胞悬液。然后将烧瓶在37°C及5%CO₂存在下在磁性搅拌板上培育3-7天。支原体生长系藉由明显酸性pH变化及浊度之增加来确定。亦藉由PFU分析测定计数来评估支原体生长。

[0169] 猪滑液支原体:

[0170] 猪滑液支原体系以与猪鼻支原体类似之方式来培养。在3L烧瓶中以1ml 10⁵-10⁷CFU接种10⁵-10⁶细胞/ml浓度的500ml细胞悬液。然后将烧瓶在37°C及5%CO₂下在磁性搅

拌板上培育约2周。除了使用PFU分析测定计数以外,使用pH变化及浊度之增加二者来测定生长。

[0171] 猪肺炎支原体:

[0172] 猪肺炎支原体系以与猪鼻支原体及猪滑液支原体相同之方式来培养。在3L烧瓶中以1ml 10^5 - 10^7 CFU接种 10^5 - 10^6 细胞/ml浓度的500ml细胞悬液。然后将烧瓶在37℃及5%CO₂下在磁性搅拌板上培育约2周。除了使用PFU分析测定计数以外,可使用pH变化及浊度之增加二者来测定生长。

[0173] C. 使用各种血清型之支原体之培养

[0174] 为评估是否可在不同物种之不同血清型中培养支原体,用猪鼻支原体感染MDCK细胞且分别在胎牛血清、猪血清、兔血清、鸡血清或马血清中培养。对于每种血清型,猪鼻支原体在MDCK细胞中之培养系如上文所述来实施(5%血清用于细胞生长且2%血清用于感染)。根据标准方法在感染后4天采集猪鼻支原体。实施CCU(颜色变化单位)分析以测定猪鼻支原体之活效价。此外,实施qPCR(定量实时聚合酶链式反应)以测定猪鼻支原体之总基因组含量。示例性实验如表1所示。

[0175] 表1:使用各种血清型之猪鼻支原体之培养

血清类型	qPCR log(gc/ μ l)	CCU50(log/ml)
胎牛血清	6.15	8.00
猪血清	6.06	8.50
兔血清	6.11	8.33
鸡血清	6.31	8.00
马血清	6.49	9.00

[0177] 表1显示,通过CCU分析或qPCR测量之各种血清型之效价类似。此外,西方墨点法(western blot)数据(未显示)支持此数据。因此,不管使用何种血清型进行培养,皆可在MDCK细胞中培养猪鼻支原体。

[0178] 实施例2疫苗之制备

[0179] 在最终代备妥以采集(存在>90%CPE)时,藉由以下方式对所有烧瓶实施单一冷冻-解冻循环:将其置入<-60℃冷冻器中保持>2小时,在37℃下快速解冻,收集并汇集裂解物,并上下抽吸若干次以匀浆。概言之,然后将10-20%甘油添加至此悬浮液中并使其匀浆。然后将此悬浮液备妥以等分为工作体积。将母液保持在<-60℃下直至需要。

[0180] 用0.2%福尔马林将适当体积之上述母液灭活。在疫苗掺和时用亚硫酸氢钠中和过量福尔马林。将疫苗与Montanide™ ISA 207VG佐剂或与CARBOPOL®佐剂掺和。将疫苗储存在2-7℃下。

[0181] 实施例3对疫苗有效性之评价

[0182] 在猪中之施用后,基于诱导抗体反应之能力(以及藉由ELISA之效价)评估疫苗功效。

[0183] 动物照护

[0184] 在开始研究之前,动物处于良好健康及营养状态。在随机化程序及记录之前实施健康检查。在整个研究期间使用不加药饲料。根据设施标准操作程序,饲量适合于测试动物之年龄、情况及物种。在整个研究期间随意提供水。

[0185] 在猪中之施用后对猪鼻支原体及猪肺炎支原体疫苗之有效性之评价。

[0186] 猪鼻支原体:

[0187] 在D0以及在D21向6周±5日龄习用仔猪之所有动物肌内施用2ml剂量(7.1-7.3log10CCU/剂量)之猪鼻支原体疫苗。如上文所述在MDCK细胞中培养猪鼻支原体。疫苗加有Montanide ISA207VG或CARBOPOL[®]佐剂。使用PBS作为安慰剂。每天观察猪之一般健康。在疫苗接种之前在D0、7、14、21、28、35及42收集血液。藉由BIVI R&D间接ELISA测试血清之猪鼻支原体特异性抗体。对于BIVI R&D ELISA,认为>0.200之S/P比率为阳性。

[0188] 如表2中所示,猪鼻支原体ELISA指示强抗体反应。在第一剂量后两周(D14),6/6只(100%)猪鼻支原体-MDCK+Montanide ISA207VG疫苗接种动物为阳性。至D42所有动物皆保持阳性,且在第二剂量后一周(D28)记录到效价加强。经猪鼻支原体-MDCK+ CARBOPOL[®]疫苗接种之动物亦显示抗体反应。

[0189] 表2:猪鼻支原体ELISA结果

	Pre	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
[0190] 猪鼻支原体 MDCK + Montanide ISA207VG	0.00	0.003	0.043	0.972	1.123	1.340	1.152	1.133
猪鼻支原体 MDCK +	0.002	0.018	0.059	0.095	0.122	0.354	0.375	0.409
[0191] CARBOPOL [®]								
安慰剂(PBS)	0.001	0.005	0.011	0.015	0.021	0.031	0.057	0.070

[0192] 在McCoy细胞中培养猪鼻支原体获得类似的疫苗接种后抗体反应结果(数据未显示)。此外,在3周±5日龄仔猪中获得类似的疫苗接种后抗体反应结果(数据未显示)。在施用单一剂量后获得类似结果(数据未显示)。

[0193] 猪肺炎支原体:

[0194] 在D0以及在D21向6周±5日龄习用仔猪之所有动物肌内施用2ml剂量(8.0-8.5log10CCU/剂量)之猪肺炎支原体疫苗。疫苗加有Montanide ISA207VG佐剂。使用PBS作为安慰剂。每天观察猪之一般健康。在疫苗接种前在D0、7、14、21、28、35及42收集血液用于测试猪肺炎支原体抗体之存在。在表3所示的实施例中使用市售IDEXX ELISA。对于IDEXX ELISA,认为>0.400之S/P比率为阳性。

[0195] 如表3中所示,猪肺炎支原体ELISA指示强抗体反应。对于猪肺炎支原体MDCK+ISA207疫苗接种动物,在D14有3/6只(50%)动物为阳性,且D21有5/6只(83.3%)为阳性,且D28、35及42有6/6只(100%)为阳性。

[0196] 表3:猪肺炎支原体IDEXX ELISA结果

	Pre	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
[0197] 猪肺炎支原体 MDCK + Montanide ISA207VG	-0.024	-0.022	0.034	0.601	0.949	1.775	1.986	1.895
安慰剂(PBS)	-0.019	0.011	-0.021	-0.015	-0.025	-0.025	0.016	0.016

[0198] 在施用单一剂量后获得类似结果,数据未显示。

[0199] 实施例4自在真核细胞系中培养之支原体菌获得之疫苗对比自在无细胞系统中培养之支原体菌获得之疫苗之有效性

[0200] 将54只8周±5日龄之CD/CD动物分为六组。组V1及V2各自分别接受在MDCK细胞及CM(复合培养基;例如含有猪血清及酵母提取物之基于蛋白蛋白胨之培养基或基于弗瑞斯(Friis)之培养基)中培养之猪鼻支原体之灭活分离物;组V3及V4分别接受在MDCK细胞及CM中培养之猪鼻支原体之灭活分离物。所有疫苗皆加有Montanide ISA207VG佐剂;剂量及途径为肌肉注射2×2ml剂量,在D0给予一个剂量,且在D21给予第二剂量。组CC(对照组)以相同方式接受无抗原安慰剂(PBS)。组SC(严格对照)在整个研究中不接受处理,用作严格对照动物。在D42、43及44,用有毒力猪鼻支原体激发组V1-V4及CC中之猪。施用剂量及途径分别为40ml腹膜内、15ml静脉内及15ml鼻内。自D0至研究结束时(D58)每周收集血液用于猪鼻支原体特异性ELISA测试。对于R&D猪鼻支原体ELISA,认为>0.200之S/P比率为阳性。在表4的示例性研究中,组SC中之所有猪在整个研究中皆保持阴性,表明其未暴露于猪鼻支原体。组V1-V4及CC在D0及7为阴性。然而,在基于CM之疫苗与基于MDCK之疫苗之间,血清学结果显著变化。在与基于CM之疫苗相比时,基于MDCK之疫苗显示较早开始血清转化、较大血清阳性猪数目及较高血清学效价。

[0201] 表4:猪鼻支原体ELISA结果

组	各组猪鼻支原体 ELISA 平均 S/P 比率								
	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D58
MHRN001-	-0.002	0.010	0.199	0.482	0.916	0.971	0.929	1.056	0.991
MHRN001- CM (V2)	0.001	0.009	0.031	0.081	0.395	0.401	0.370	0.793	0.770
MHRN002-	0.004	0.014	0.157	0.424	0.981	1.023	0.953	1.097	1.086
MHRN002-CM (V4)	0.003	0.011	0.017	0.047	0.298	0.299	0.263	0.704	0.608
安慰剂(CC)	0.004	0.004	0.009	0.023	0.021	0.029	0.031	0.262	0.433
严格对照(SC)	-0.003	-0.002	-0.003	0.005	0.008	0.015	0.021	0.031	0.060

[0203] 进行滴定实验以将基于细胞培养物之疫苗与来自无细胞系统中培养之支原体菌之疫苗比较。

[0204] 猪鼻支原体分别系如上文所述在McCoy细胞中培养,或在CM(复合培养基)中培养。

[0205] 用McCoy抗原使用皆1:1掺和Montanide ISA207VG佐剂之未稀释抗原(“McCoy+ISA完全”)、1:10抗原(“McCoy+ISA 1:10”)及1:100抗原(“McCoy+ISA 1:100”)制备疫苗。以相同方式制备使用CM源抗原之疫苗。

[0206] 在第0天用IM施用之单一2mL剂量对猪(在疫苗接种时三周龄)进行疫苗接种。

[0207] 如表5所示,组平均值在激发前(D0-D21)皆为“阴性”,但“McCoy+ISA完全”和“McCoy+ISA 1:10”显示趋向于阳性的反应。在激发后一周(D28),除了CM 1:100以外所有疫苗接种组皆有反应。

[0208] 自表5可了解,每一抗原类型(McCoy、CM)展现标准滴定效应(完全>1:10>1:100)。此外,自表5可知,“McCoy+ISA完全”和“McCoy+ISA 1:10”疫苗接种物平均分高于“CM+ISA完全”抗原,且在D42之结束前始终如此。具有激发后阳性(S/P≥0.200)平均值之组系“McCoy+ISA完全”和“McCoy+ISA 1:10”。因此McCoy完全疫苗及1:10稀释液显示血清反应在激发前

及在激发后皆高于CM完全疫苗。此外,McCoy 1:100接种的动物也在显示与安慰剂(非疫苗接种物)及CM 1:100组(CM 1:100反应或其缺乏等效于非疫苗接种物)不同之反应。滴定实验表明基于细胞培养物之疫苗相比于在无细胞系统中培养之支原体菌之疫苗具有更好的血清学结果。

[0209] 表5:猪鼻支原体ELISA结果

组	各组猪鼻支原体 ELISA 平均 S/P 比率						
	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
McCoy + ISA 完全	0.002	0.012	0.032	0.117	0.312	0.298	0.325
McCoy + ISA 1:10	0.000	0.005	0.065	0.107	0.291	0.193	0.221
McCoy + ISA 1:100	0.001	0.001	-0.001	0.000	0.145	0.118	0.150
CM + ISA 完全	0.002	0.009	0.011	0.034	0.190	0.163	0.190
CM + ISA 1:10	-0.001	0.017	0.003	0.014	0.114	0.132	0.176
CM + ISA 1:100	-0.002	0.000	-0.002	0.001	0.019	0.043	0.093
安慰剂: PBS +ISA	-0.001	0.002	-0.002	-0.002	0.021	0.039	0.081
严格对照	-0.002	-0.001	-0.002	-0.002	-0.002	0.008	0.024

[0211] 实施例5包含猪滑液支原体、猪肺炎支原体及猪鼻支原体之抗原之多价疫苗之有效性

[0212] 在此研究中,向15只11周±5日龄CD/CD动物IM施用单一2mL剂量之三价原型支原体组合疫苗。疫苗由灭活猪鼻支原体、灭活猪肺炎支原体及灭活猪滑液支原体组成。所有物种皆系在MDCK细胞中培养。疫苗加有Montanide ISA207VG佐剂。自第0天至第28天每周收集血样。亦藉由猪鼻支原体BIVI R&D ELISA及猪肺炎支原体IDEXX ELISA监测血清中之抗体含量。在此研究时对猪滑液支原体无可用血清学分析。

[0213] 猪鼻支原体ELISA在疫苗接种后两周(D14)指示强抗体反应,且11/15只(73.3%)猪为阳性,且截至D21有15/15只(100%)为阳性。

[0214] 猪肺炎支原体IDEXX ELISA结果指示,在D0四只猪对于猪肺炎支原体抗体为阳性(S/P>0.400)。若不包括该四只猪,则截至D28有五只不同的猪血清转化为猪肺炎支原体。在D21,该五只猪中之三只为阳性。

[0215] 表4:猪鼻支原体ELISA结果

猪鼻支原体 ELISA 组平均 S/P 比率				
D0	D7	D14	D21	D28
0.043	0.050	0.406	0.873	0.866

[0217] 表5:猪肺炎支原体IDEXX ELISA结果

猪肺炎支原体 IDEXX ELISA 组平均 S/P 比率				
D0	D7	D14	D21	D28
0.294	0.255	0.259	0.287	0.421

[0219] 由猪鼻支原体之结果显示,疫苗其余部分没有干扰。而且,掺和于此研究中所用组合疫苗中之猪鼻支原体抗原含量足以在单一2mL剂量后诱导可测量之抗体反应。猪肺炎支原体结果显示某一血清转化。此部分之较高掺和程度可有益于提高血清转化率。来自猪鼻支原体及猪肺炎支原体部分之结果指示此物种没有干扰。