



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103394080 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 20

(21) 申请号 201310083947. 9

(72) 发明人 杰里米·克罗尔

(22) 申请日 2007. 05. 24

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30) 优先权数据

60/803, 207 2006. 05. 25 US

11/750, 458 2007. 05. 18 US

代理人 岑晓东

(62) 分案原申请数据

200780019257. X 2007. 05. 24

(51) Int. Cl.

A61K 39/02 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

A61P 1/00 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

PTA-4927 2003. 01. 09

ATCC 55672 1995. 05. 19

PTA-4926 2003. 01. 09

ATCC 55783 1996. 05. 22

ECACC 04092201 2004. 09. 22

ECACC 04092202 2004. 09. 22

ECACC 04092203 2004. 09. 22

ECACC 04092204 2004. 09. 22

ECACC 04092205 2004. 09. 22

ECACC 04092206 2004. 09. 22

(71) 申请人 贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司

地址 美国密苏里州

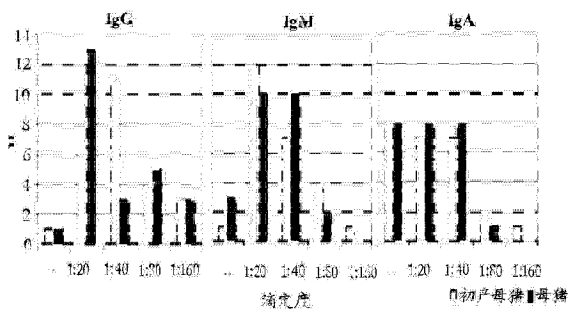
权利要求书1页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

对年幼动物免疫接种以抵抗胞内劳森菌感染

(57) 摘要

本发明涉及对年幼动物免疫接种以抵抗胞内劳森菌感染。本发明提供了对年幼动物进行免疫接种以抵抗胞内劳森菌的方法, 包括对该动物给予有效量的胞内劳森菌抗原的步骤。本发明还提供了对具有抗胞内劳森菌抗体或已暴露于抗胞内劳森菌抗体的动物、尤其是年幼动物进行免疫接种的方法。尤其是, 这些抗胞内劳森菌抗体是来自母体的抗体。



1. 一种方法,其用于接种年幼动物以对抗胞内劳森菌 (*L. intracellularis*) 感染或用于接种具有抗胞内劳森菌抗体或暴露于抗胞内劳森菌抗体的动物,该方法包括投予有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤。

2. 权利要求 1 的方法,其中该等动物在 1 天大至 9 天大时接种。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中该等动物在 1 天大至 6 天大时接种。

4. 权利要求 1-3 之一的方法,其中该等动物在 1 或 2 天大时接种。

5. 权利要求 1-4 之一的方法,其中该等动物具有或暴露于每毫升血清或流体至少 1:4 的可检测的抗胞内劳森菌抗体滴定度。

6. 权利要求 1-4 之一的方法,其中该等动物具有或暴露于每毫升血清或流体至少 1:64 的可检测的抗胞内劳森菌抗体滴定度。

7. 权利要求 1-6 之一的方法,其中该胞内劳森菌抗原是选自由活的经修饰的胞内劳森菌细菌、杀死的胞内劳森菌细菌、或胞内劳森菌细菌的一或多个亚单位组成的组。

8. 权利要求 1-6 之一的方法,其中该胞内劳森菌抗原为活的经修饰的胞内劳森菌细菌。

9. 权利要求 8 的方法,其中该年幼动物是投予约 3.0TCID₅₀ 至约 6.0TCID₅₀ 的剂量的该活的经修饰的胞内劳森菌细菌。

10. 权利要求 1-9 之一的方法,其中该等动物为鸟、鱼、及哺乳动物诸如牛、猪、马及灵长类动物之类。

11. 权利要求 10 的方法,其中该等动物为猪。

12. 胞内劳森菌抗原的用途,其用于制备接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染或接种具有抗胞内劳森菌抗体或暴露于抗胞内劳森菌抗体的动物的药剂,其中该等动物被接种有效剂量的该胞内劳森菌抗原。

13. 权利要求 12 的用途,该等动物在 1 天大至 9 天大时接种。

14. 权利要求 12 或 13 的用途,该等动物在 1 天大至 6 天大时接种。

15. 权利要求 12-14 之一的用途,其中该等动物在 1 天或 2 天大时接种。

16. 权利要求 12-15 之一的用途,其中该等动物具有或暴露于每毫升血清或流体至少 1:4 的可检测的抗胞内劳森菌抗体滴定度。

17. 权利要求 12-16 之一的用途,其中该等动物具有或暴露于每毫升血清或流体至少 1:64 的可检测的抗胞内劳森菌抗体滴定度。

18. 权利要求 12-17 之一的用途,其中该胞内劳森菌抗原是选自由活的经修饰的胞内劳森菌细菌、杀死的胞内劳森菌细菌、或胞内劳森菌细菌的一或多个亚单位组成的组。

19. 权利要求 12-18 之一的用途,其中该胞内劳森菌抗原为活的经修饰的胞内劳森菌细菌。

20. 权利要求 19 的用途,其中该年幼动物是投予约 3.0TCID₅₀ 至约 6.0TCID₅₀ 的剂量的该活的经修饰的胞内劳森菌细菌。

21. 权利要求 12-20 之一的用途,其中该等动物为鸟、鱼、及哺乳动物诸如牛、猪、马及灵长类动物。

22. 权利要求 21 的用途,其中该等动物为猪。

对年幼动物免疫接种以抵抗胞内劳森菌感染

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 05 月 24 日、中国申请号为 200780019257. X、发明名称为“对年幼动物免疫接种以抵抗胞内劳森菌感染”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求 2006 年 5 月 25 日提交的美国流水号 60/803, 207 的优先权, 该专利的教导和内容全部引入本文作为参考。

技术领域

[0004] 本发明概言之是关于用于免疫接种以对抗由专性胞内细菌胞内劳森菌 (*Lawsonia Intracellularis*) 引起的称作回肠炎 (ileitis) 的增生性肠炎, 优选为猪增生性回肠炎的改良接种方法。特别是, 本发明提供一种藉由自一 (1) 天大开始接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染来提供对抗胞内劳森菌的增强性保护的方法。该等年幼动物优选在 1 天大至 21 天大, 更优选在 1 天大至 10 天大, 更优选在 1 天大至 9 天大, 更优选在 1 天大至 6 天大, 更优选在 1 或 2 天大, 且最优选在 1 天大时接受接种。特别是, 该年幼动物为年幼小猪 (young piglet), 优选为断奶前小猪 (pre-weaned piglet)。

现有技术

[0005] 猪增生性肠炎 (Porcine proliferative enteropathy, PPE) 是天然发生的疾病, 其可影响断奶至成年期早年 (young adult) 的猪。已确定其病原体为胞内劳森菌。胞内劳森菌是专性胞内菌, 不能在不含细胞的常规培养基上用普通的细菌学方法培养, 一般认为其生长需要有细胞。S. McOrist et al., *Infection and Immunity*, Vol. 61, No. 19, 4286-4292 (1993) 和 G. Lawson et al., *J. of Clinical Microbiology*, Vol. 31, No. 5, 1136-1142 (1993) 讨论了在常规组织培养瓶中、用 IEC-18 大鼠单层肠上皮细胞培养胞内劳森菌。美国专利 5, 714, 375 和 5, 885, 823 (都全文引入作参考) 描述了在悬浮宿主细胞中培养胞内劳森菌。

[0006] 胞内劳森菌的致病株和非致病减毒株是本领域熟知的。例如, W096/39629 和 W005/011731 描述了胞内劳森菌的非致病减毒株。胞内劳森菌的减毒株可参见 W002/26250 和 W003/00665。

[0007] 该疾病的特征首先在于其肉眼及微观病理, 且随后在于受感染细胞内证实有胞内细菌。该疾病的典型病理特征为在回肠 (小肠的末端部分)、大肠或两者的隐窝 (crypt) 中未成熟上皮细胞的增生。受感染组织的切片特征为类似“橡胶软管 (garden hose)”的变红增厚粘膜及肠损害。肠增厚最终阻止正常肠功能、吸收能力及营养转移。该疾病的临床表现为慢性重量减轻、不壮实 (unthriftiness)、腹泻及死亡。该疾病由于受感染动物死亡造成损失、医疗成本增加、增重困难及食物转化率降低而具有经济学重要性。最值得注意的为在 6-20 周龄的猪中观察到回肠炎的临床病例。然而, 已在刚断奶不久的猪 (3-4 周龄) 中证实 (藉由 PCR) 胞内劳森菌的存在, 此表明暴露于胞内劳森菌的情况发生在养殖场且可能源于劳森菌阳性母畜 (Mauch 及 Bilkei (2004) *Vet Rec* 155 :532 ;Marsteller 等人 (2003)。

Swine Health Prod11:127-130; Stege 等人 (2004). Vet Micro104:197-206)。此等观察结果强调在生产系统中引入预防策略（诸如及早接种）的重要性。

[0008] 目前对抗回肠炎的免疫法的接种策略涉及仅对来自三周龄及三周龄以上的未接触过劳森菌的猪进行疫苗口服投予，此是因为低于此年龄组的仔猪由于先前母猪的暴露或接种而可能具有对胞内劳森菌呈阳性的母体抗体。在本发明的方法之前，一般认为母体抗体或其他催乳因子的存在可潜在地干扰该等仔猪中接种的功效，因为在仔猪的免疫系统可识别疫苗且开始分泌其自身抗体之前，母体抗体具有中和疫苗的能力。因此，已在面临母体免疫时避免接种年幼仔猪。

附图说明

[0009] 图 1 展示在 IFAT 中对 IgG、IgM 及 IgA 呈阳性的初乳样品的数目。

[0010] 图 2 展示在具有不同 Ig 含量的母猪乳液样品中胞内劳森菌培养物的滴定度（两次滴定的平均值）。

发明内容

[0011] 本发明是基于两种令人惊奇的观测结果。首先，在途经胃肠道期间，母体抗体及母猪乳液并未显现有效于灭活胞内劳森菌。在室温 4 小时培育期间以母猪初乳或乳液培育胞内劳森菌不影响胞内劳森菌培养物的滴定度。具有高或低 Ig 含量的样品之间无差异。即使在 1:20 稀释度（5% 胞内劳森菌培养物 / 95% 乳液）下未观测到对培养物滴定度的影响。总之，活体外未检测到任何受测试母猪乳液样品对胞内劳森菌培养物的滴定度的直接影响。然而，由于年幼小猪通常不罹患回肠炎，因此已讨论对抗胞内劳森菌的母体免疫性 (Holyoake, P. K. 等人 (1994) J Clin Microbiol 32, 第 1980-1985 页; Mauch, C. H. Y. 及 G. Bilkei (2004) Vet. Rec. 155, 532)。如此研究中所示，在途经胃肠道期间，母体抗体及母猪乳液并未显现有效于灭活胞内劳森菌。

[0012] 其次，母体抗体及母猪乳液并不干扰胞内劳森菌抗原，且因此不防止由接种提供的对抗胞内劳森菌感染的主动保护的建立。事实上，与未接种小猪相比，在 1 天大时接种的小猪的与该疾病有关的肉眼可见病理表现已有减少。

[0013] 因此，本发明克服先前技术的不足且提供新方法用于对动物提供对抗回肠炎（胞内劳森菌感染）的增强性保护。详言之，本发明提供一种接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法，该方法包含投予该年幼动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤。该年幼动物的年龄优选为一（1）天大或一天大以上。此外，根据另一方面，本发明提供一种用于接种具有或暴露于抗胞内劳森菌抗体，尤其为母体来源的抗胞内劳森菌抗体的年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法，该方法包含投予该年幼动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤。该年幼动物的年龄优选为一（1）天大或一天大以上。

[0014] 根据另一方面，本发明提供一种用于接种具有或暴露于抗胞内劳森菌抗体，尤其为母体来源的抗胞内劳森菌抗体的动物以对抗胞内劳森菌感染的方法，该方法包含投予该动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤。

[0015] 如本文中所用的术语“接种”（“vaccination”或“vaccinating”）意谓（但不限于）一种包括对动物投予胞内劳森菌抗原的方法，其中该胞内劳森菌抗原在投予该动物时

在该动物体内引发或能够引发对抗胞内劳森菌的免疫反应。

[0016] 如本文中所述的术语“动物”意谓（但不限于）鸟、鱼及诸如牛、猪、马或灵长类动物等哺乳动物。然而，根据本发明的优选实施例，该动物为猪，优选为断奶前小猪。

[0017] 因此，根据另一方面，本发明是关于一种接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法，该方法包含自一（1）天大开始授予该年幼动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤，其中该动物为鸟、鱼或诸如牛、猪、马或灵长类动物等哺乳动物。该动物优选为哺乳动物。该动物更优选为猪。该动物最优选为断奶前小猪。

[0018] 如本文中所述的术语“年幼动物”是指 1 天大至 20 天大的动物。术语“年幼动物”优选是指 1 天大至 10 天大的动物。术语“年幼动物”更优选是指 1 天大至 9 天大，更优选为 1 天大至 8 天大，更优选为 1 天大至 7 天大，更优选为 1 天大至 6 天大，更优选为 1 天大至 5 天大，更优选为 1 天大至 4 天大，更优选为 1 天大至 3 天大，更优选为 1 或 2 天大的动物，最优选是指 1 天大的动物。术语“年幼动物”的个别含义（respective meaning）亦是指当以胞内劳森菌抗原第一次接种动物时其年龄。

[0019] 因此，本发明的另一方面是关于一种接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法，该方法包含授予该年幼动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤，其中该动物在 1 天大至 20 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 天大至 10 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 天大至 9 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 天大至 8 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 天大至 7 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 天大至 6 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 天大至 5 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 天大至 4 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 天大至 3 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 或 2 天大时接受接种。根据另一实施例，本发明是关于该接种方法，其中该动物在 1 天大时接受接种。

[0020] 术语“具有或暴露于抗胞内劳森菌抗体”意谓（但不限于）具有或暴露于优选为每毫升至少 1:4，更优选为 1:16 以上，更优选为 1:64 以上，更优选为 1:128 以上，更优选为 1:256 以上，更优选为 1:512 以上，且最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度的动物。彼抗胞内劳森菌抗体滴定度 优选在特异性抗胞内劳森菌免疫试验中，优选在如实施例 4 中所述的试验中是可检测及量化的。彼等抗胞内劳森菌抗体更优选为母体来源的抗体。

[0021] 术语“暴露于抗胞内劳森菌抗体”意谓（但不限于）以例如初乳或乳液等营养物饲喂动物获得优选为每毫升或每克营养物至少 1:4，更优选为 1:16 以上，更优选为 1:64 以上，更优选为 1:128 以上，更优选为 1:256 以上，更优选为 1:512 以上，且最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度的事实。

[0022] 术语“具有抗胞内劳森菌抗体”应意谓（但不限于）在该动物的 1ml 血清中具有优选为至少 1:4，更优选为 1:16 以上，更优选为 1:64 以上，更优选为 1:128 以上，更优选为 1:256 以上，更优选为 1:512 以上，且最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度。

[0023] 因此,根据另一方面,本发明提供一种用于接种动物以对抗胞内劳森菌感染的方法,该方法包含授予该动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤,其中该动物具有或暴露于优选为每毫升至少 1:4,更优选为 1:16 以上,更优选为 1:64 以上,更优选为 1:128 以上,更优选为 1:256 以上,更优选为 1:512 以上,且最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度。彼等抗体优选为母体来源的抗体。彼等抗体滴定度更优选在接种日存在于被动物体内。

[0024] 因此,根据另一方面,本发明提供一种用于接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法,该方法包含授予该年幼动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤,其中该年幼动物具有或暴露于优选为每毫升至少 1:4,更优选为 1:16 以上,更优选为 1:64 以上,更优选为 1:128 以上,更优选为 1:256 以上,更优选为 1:512 以上,最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度。彼等抗体优选为母体来源的抗体。该年幼动物的年龄优选为 1 天大至 20 天大之间。该年幼动物的年龄更优选为 1 天大至 10 天大之间,更优选为 1 天大至 9 天大之间,更优选为 1 天大至 8 天大之间,更优选为 1 天大至 7 天大之间,更优选为 1 天大至 6 天大之间,更优选为 1 天大至 5 天大之间,更优选为 1 天大至 4 天大之间,更优选为 1 天大至 3 天大之间,更优选为 1 或 2 天大,最优选为 1 天大。

[0025] 如本文中所述的术语“有效剂量”(“an effective dose”)意谓(但不限于)在授予该有效剂量的胞内劳森菌抗原的动物中引发或能够引发该动物的免疫反应的抗原的量。

[0026] 对组合物或疫苗的“免疫学反应或免疫反应”为在宿主中对所关注的组合物或疫苗发生细胞免疫反应及/或抗体介导的免疫反应。因此,术语“引发或能够引发免疫反应”意谓(但不限于)宿主内的免疫学过程,其特征在于该宿主发生对所关注的组合物或疫苗的细胞免疫反应及/或抗体介导的免疫反应。通常,“免疫反应”包括(但不限于)以下作用中的一或多者:产生或激活特异性针对于包括在所关注的组合物或疫苗中的抗原的抗体、B 细胞、辅助性 T 细胞、抑制性 T 细胞及/或细胞毒 T 细胞及/或 $\gamma\delta$ T 细胞。宿主优选将展现治疗或保护性免疫学反应以便增强对新感染的抵抗力及/或降低疾病的临床严重性。该保护作用将藉由与如上文所述的宿主感染相关的症状的量或严重性减少或缺乏来证实。

[0027] 在动物体内有效于引发免疫反应或能够引发免疫反应的抗原量视疫苗的成份及授予进程而定。通常,当杀死的细菌抗原用于疫苗时,疫苗每剂量含有约 10^3 至约 10^9 个菌落形成单位(CFU)的量的细菌,优选每剂量含有约 10^4 至约 10^8 个(CFU)的细菌,更优选每剂量含有约 10^5 至约 10^6 个(CFU)。

[0028] 特别是,当经修饰的活胞内劳森菌细菌用于疫苗时(例如,命名为分离株 B3903 的细菌分离株,ATCC 保藏编号 PTA-4926;及命名为分离株 N34NP40wk 的细菌分离株,ATCC 保藏编号 55783,二者描述于 W096/39629 及 W005/011731 中),待授予易感动物的推荐剂量优选为约 3.0TCID_{50} (组织培养半数感染剂量终点)/剂至约 6.0TCID_{50} /剂且最优选为约 4.0TCID_{50} /剂至约 5.0TCID_{50} /剂。在一优选实施例中,如藉由组织培养半数感染剂量终点稀释试验法(TCID_{50})所测定,疫苗的滴定度为约 4.9TCID_{50} /剂。一般而言,免疫原的量将在 5 与 5000 微克之间且在 $10^{2.0}$ 与 $10^{9.0}\text{TCID}_{50}$ 之间,优选在 $10^{3.0}$ 与 $10^{6.0}\text{TCID}_{50}$ 之间,更优选在 $10^{4.0}$ 与 $10^{5.0}\text{TCID}_{50}$ 之间(当使用纯化细菌时)。

[0029] 通常以每剂至少 $0.2\mu\text{g}$ 抗原、优选以每剂约 0.2 至约 $400\mu\text{g}$ 、更优选以每剂约

0.3 至约 200 μ g、更优选以每剂约 0.35 至约 100 μ g、更优选以每剂约 0.4 至约 50 μ g、更优选以每剂约 0.45 至约 30 μ g、更优选以每剂约 0.6 至约 15 μ g、更优选以每剂约 0.75 至约 8 μ g、更优选以每剂约 1.0 至约 6 μ g 且更优选以每剂约 1.3 至约 3.0 μ g 的抗原内含量投予亚单位疫苗。

[0030] 如本文中所述的术语“增强性保护”意谓（但不限于）经接种动物组与未接种对照动物组相比较，在前者中一或多种与胞内劳森菌感染有关的临床症状（交叉损害频率等）在统计上显著的降低。术语“临床症状在统计上显著的降低”意谓（但不限于）在以传染性胞内劳森菌攻击后，在经接种动物组中至少一种临床症状的发生频率比在未接种对照组中低至少 20%，优选 30%，更优选 50%，最优选 70%。

[0031] 如本文中所述的术语“胞内劳森菌”意谓由 C. Gebhart 等人, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, 第 43 卷, 第 3 期, 533-538 (1993) 及 S. McOrist 等人, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, 第 45 卷, 第 4 期, 820-825 (1995)（各文献以引用的方式全文并入本文中）详述的胞内弯曲革兰氏阴性细菌且包括（但不限于）W096/39629 及 W005/011731 中所述的分离株。详言之，术语“胞内劳森菌”亦意谓（但不限于）根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 且 ATCC 保藏编号为 PTA4926 或 ATCC 保藏编号为 55783 的分离株。分别在 W096/39629 及 W005/011731 中描述两种分离株。术语“胞内劳森菌”亦意谓（但不限于）任何其他胞内劳森菌细菌株或分离株，该等细菌株或分离株优选具有 W096/39629 及 W005/011731 中所述的胞内劳森菌菌株中的至少一者的免疫原性性质，尤其具有根据布达佩斯条约保藏于 ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 且 ATCC 保藏编号为 PTA4926 或 ATCC 保藏编号为 55783 的分离株中的至少一者的免疫原性性质。

[0032] 当一种菌株或分离株可至少以 W006/01294 中所述的抗胞内劳森菌特异性抗体之一在一种亦描述于 W006/01294 的检测试验中得以检测时，该菌株或分离株具有 W096/39629 及 W005/011731 中所述的胞内劳森菌菌株，尤其以 ATCC 保藏编号 PTA4926 或 ATCC 保藏编号 55783 保藏的分离株中至少一者的“免疫原性性质”。该等抗体优选是选自编号为 301:39、287:6、268:29、110:9、113:2 及 268:18 的抗体。该检测试验优选为如 W006/12949 的实施例 2 及 3 中所述的三明治 ELISA，而抗体 110:9 用作捕捉抗体及抗体 268:29 用作偶联抗体。W006/12949 中所揭示的所有抗体是藉由杂交瘤细胞制造，该等杂交瘤细胞根据布达佩斯条约作为专利保藏物保藏于应用微生物学研究中心 (Centre for Applied Microbiology and Research, CAMR) 及欧洲细胞培养物保藏中心 (ECACC), Salisbury, Wiltshire SP40JG, UK。保藏日期为 2004 年 9 月 22 日。以 ECACC 保藏编号 04092204 成功地保藏杂交瘤细胞系 110:9。以 ECACC 保藏编号 04092201 成功地保藏杂交瘤细胞系 113:2。以 ECACC 保藏编号 04092202 成功地保藏杂交瘤细胞系 268:18。以 ECACC 保藏编号 04092206 成功地保藏杂交瘤细胞系 268:29。以 ECACC 保藏编号 04092203 成功地保藏杂交瘤细胞系 287:6。以 ECACC 保藏编号 04092205 成功地保藏杂交瘤细胞系 301:39。

[0033] 如本文中所述的术语“胞内劳森菌抗原”意谓（但不限于）包含至少一种抗原的物质的任何组合物，该抗原在投予动物时可诱发、刺激或增强对抗胞内劳森菌引起的感染的免疫反应。该胞内劳森菌抗原优选为完全胞内劳森菌细菌（尤其为灭活形式）（所谓杀死

的细菌)、经修饰的活的或减毒的胞内劳森菌细菌(所谓MLB)、胞内劳森菌的任何亚单位、多肽或组分或任何嵌合载体(各自包含胞内劳森菌的至少一个免疫原性氨基酸序列)。如本文中所用的术语“免疫原性蛋白”、“免疫原性多肽”或“免疫原性氨基酸序列”是指在宿主中引发对抗包含该免疫原性蛋白、免疫原性多肽或免疫原性氨基酸序列的病原体的免疫反应的任何氨基酸序列。特别是,胞内劳森菌的“免疫原性蛋白”、“免疫原性多肽”或“免疫原性氨基酸序列”意谓编码在授予该“免疫原性蛋白”、“免疫原性多肽”或“免疫原性氨基酸序列”的宿主中引发对抗胞内劳森菌的免疫学反应的抗原的任何氨基酸序列。

[0034] 如本文中所用的“免疫原性蛋白”、“免疫原性多肽”或“免疫原性氨基酸序列”包括(但不限于)任何蛋白的全长序列、其类似物或其免疫原性片段。术语“免疫原性片段”意谓包括一或多个表位,且因此引发对抗相关病原体的免疫学反应的蛋白的片段。可使用本领域熟知的多种表位定位技术来识别此等片段。例如,参见Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷(Glenn E.Morris编,1996)Humana Press, Totowa, New Jersey。(其教示及内容以引用方式并入本文中。)举例而言,藉由在固体支持物上同时合成大量肽(该等肽对应于蛋白分子的部分)及当该等肽仍附着至该等支持物时使该等肽与抗体反应可测定线性表位。此等技术在领域已知且描述于例如美国专利第4,708,871号;Geysen等人(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. USA81:3998-4002;Geysen等人(1986)Molec. Immunol. 23:709-715中。(其教示及内容以引用方式并入本文中。)类似地,藉由测定氨基酸的空间构象(诸如藉由例如X光晶体分析术及二维核磁共振)来容易地确定构象表位(conformational epitope)。例如参见上述Epitope Mapping Protocol。在该定义中亦包括合成抗原,例如多表位(polyepitope)、侧翼表位及其它重组或合成得到的抗原。例如,参见Bergmann等人(1993)Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann等人(1996), J. Immunol. 157:3242-3249;Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408;Gardner等人,(1998)12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, 6月28日-7月3日,1998。(其教示及内容以引用方式并入本文中。)

[0035] 合适胞内劳森菌抗原包括(但不限于)彼等在EP1219711、US6,605,696、W096/39629、W097/20050、W000/69903、W000/69904、W000/69905、W000/69906、W002/38594、W002/26250、W003/006665、W004/033631、W005/026200及W005/011731中所述的抗原。

[0036] 因此,根据本发明供使用的疫苗包括如上所述的任何胞内劳森菌抗原,其引起或能够引起对抗胞内劳森菌的免疫反应。该疫苗优选至少提供对抗胞内劳森菌的增强性保护。

[0037] 因此,根据另一方面,本发明是关于一种接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法,该方法包含自一(1)天大开始授予该年幼动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤,其中该胞内劳森菌抗原是选自由活的经修饰的胞内劳森菌细菌、杀死的胞内劳森菌细菌或胞内劳森菌细菌的一或多个亚单位组成的组。该疫苗优选包含经修饰的活胞内劳森菌细菌。疫苗更优选为Enterisol® Ileitis B3903(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.)。如上所述,接种优选在1天大至20天大时,更优选在1天大至10天大时,更优选在1天大至9天大时,更优选在1天大至8天大时,更优选在1天大至7天大时,更优选在1天大至6天大时,更优选在1天大至5天大时,更优选在1天大至4天大时,更优选在1天大至3天大时,更优选在1或2天大时,且最优选在1天大时发生。

[0038] 根据另一方面,本发明提供一种用于接种动物以对抗胞内劳森菌感染的方法,该方法包含授予该动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤,其中该动物具有或暴露于优选为每毫升至少 1:4,更优选为 1:16 以上,更优选为 1:64 以上,更优选为 1:128 以上,更优选为 1:256 以上,更优选为 1:512 以上,且最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度,且其中该胞内劳森菌抗原是选自由活的经修饰的胞内劳森菌细菌、杀死的胞内劳森菌细菌或胞内劳森菌细菌的一或多个亚单位组成的组。该疫苗优选包含经修饰的活胞内劳森菌细菌。疫苗更优选为 **Enterisol® Ileitis B3903** (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.)。此外,彼等抗体优选为母体来源的抗体。彼等抗体滴定度更优选在接种日存在于被动物体内。

[0039] 根据另一方面,本发明提供一种用于接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法,该方法包含授予该年幼动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤,其中该年幼动物具有或暴露于优选为每毫升至少 1:4,更优选为 1:16 以上,更优选为 1:64 以上,更优选为 1:128 以上,更优选为 1:256,更优选为 1:512 以上,最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度,且其中该胞内劳森菌抗原是选自由活的经修饰的胞内劳森菌细菌、杀死的胞内劳森菌细菌或胞内劳森菌细菌的一或多个亚单位组成的组。该疫苗优选包含经修饰的活胞内劳森菌细菌。疫苗更优选为 **Enterisol® Ileitis B3903** (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.)。此外,彼等抗体优选为母体来源的抗体。彼等抗体滴定度更优选在接种日存在于被动物体内。该年幼动物的年龄优选为 1 天大至 20 天大之间。该年幼动物的年龄更优选为 1 天大至 10 天大之间,更优选为 1 天大至 9 天大之间,更优选为 1 天大至 8 天大之间,更优选为 1 天大至 7 天大之间,更优选为 1 天大至 6 天大之间,更优选为 1 天大至 5 天大之间,更优选为 1 天大至 4 天大之间,更优选为 1 天大至 3 天大之间,更优选为 1 或 2 天大,最优选为 1 天大。

[0040] 根据另一方面,本发明是关于一种接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法,该方法包含以下步骤:自一 (1) 天大开始授予该年幼动物约 3.0TCID₅₀ 至约 6.0TCID₅₀ 的剂量的活的经修饰的胞内劳森菌细菌。优选地,该细菌为疫苗 **Enterisol® Ileitis B3903** (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.) 中所包括的细菌。如上所述,接种优选在 1 天大至 20 天大时,更优选在 1 天大至 10 天大时,更优选在 1 天大至 9 天大时,更优选在 1 天大至 8 天大时,更优选在 1 天大至 7 天大时,更优选在 1 天大至 6 天大时,更优选在 1 天大至 5 天大时,更优选在 1 天大至 4 天大时,更优选在 1 天大至 3 天大时,更优选在 1 或 2 天大时,且最优选在 1 天大时发生。

[0041] 因此,根据另一方面,本发明是关于一种接种动物以对抗胞内劳森菌感染的方法,该方法包含以下步骤:授予该动物约 3.0TCID₅₀ 至约 6.0TCID₅₀ 的剂量的活的经修饰的胞内劳森菌细菌,其中该动物具有或暴露于优选为每 毫升至少 1:4,更优选为 1:16 以上,更优选为 1:64 以上,更优选为 1:128 以上,更优选为 1:256,更优选为 1:512 以上,且最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度。该细菌优选为疫苗 **Enterisol® Ileitis B3903** (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.) 中所包括的细菌。

[0042] 因此,根据另一方面,本发明是关于一种接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法,该方法包含以下步骤:授予该年幼动物约 3.0TCID₅₀ 至约 6.0TCID₅₀ 的剂量的活的经修饰的胞内劳森菌细菌,其中该年幼动物具有或暴露于优选为每毫升至少 1:4,更优选

为 1:16 以上,更优选为 1:64 以上,更优选为 1:128 以上,更优选为 1:256,更优选为 1:512 以上,且最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度。该细菌优选为疫苗 **Enterisol® Ileitis B3903**(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.) 中所包括的细菌。如上所述,接种优选在 1 天大至 20 天大时,更优选在 1 天大至 10 天大时,更优选在 1 天大至 9 天大时,更优选在 1 天大至 8 天大时,更优选在 1 天大至 7 天大时,更优选在 1 天大至 6 天大时,更优选在 1 天大至 5 天大时,更优选在 1 天大至 4 天大时,更优选在 1 天大至 3 天大时,更优选在 1 或 2 天大时,且最优选在 1 天大时发生。

[0043] 根据另一方面,本发明是关于一种接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的方法,该方法包含自一 (1) 天大开始授予该年幼动物有效剂量的胞内劳森菌抗原的步骤,其中该年幼动物对胞内劳森菌及抗胞内劳森菌母体抗体呈阴性。如上所述,接种优选在 1 天大至 20 天大时,更优选在 1 天大至 10 天大时,更优选在 1 天大至 9 天大时,更优选在 1 天大至 8 天大时,更优选在 1 天大至 7 天大时,更优选在 1 天大至 6 天大时,更优选在 1 天大至 5 天大时,更优选在 1 天大至 4 天大时,更优选在 1 天大至 3 天大时,更优选在 1 或 2 天大时,且最优选在 1 天大时发生。

[0044] 根据另一方面,本发明亦是关于一种胞内劳森菌抗原的新颖医疗用途,其用于制备在一 (1) 天大时开始对年幼动物接种以对抗胞内劳森菌感染的药剂(优选为疫苗组合物),其中该年幼动物是在一 (1) 天大或一天大以上时经有效剂量的该胞内劳森菌抗原接种。该接种优选在 1 天大至 20 天大时,更优选在 1 天大至 10 天大时,更优选在 1 天大至 9 天大时,更优选在 1 天大至 8 天大时,更优选在 1 天大至 7 天大时,更优选在 1 天大至 6 天大时,更优选在 1 天大至 5 天大时,更优选在 1 天大至 4 天大时,更优选在 1 天大至 3 天大时,更优选在 1 或 2 天大时,且最优选在 1 天大时发生。

[0045] 根据另一方面,本发明亦是关于一种胞内劳森菌抗原的新医疗用途,其用于制备接种动物以对抗胞内劳森菌感染的药剂(优选为疫苗组合物),其中该动物具有或暴露于优选为每毫升至少 1:4,更优选为 1:16 以上,更优选为 1:64 以上,更优选为 1:128 以上,更优选为 1:256,更优选为 1:512 以上,且最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度。

[0046] 根据另一方面,本发明亦是关于一种胞内劳森菌抗原的新颖医疗用途,其用于制备接种年幼动物以对抗胞内劳森菌感染的药剂(优选为疫苗组合物),其中该年幼动物具有或暴露于优选为每毫升至少 1:4,更优选为 1:16 以上,更优选为 1:64 以上,更优选为 1:128 以上,更优选为 1:256,更优选为 1:512 以上,且最优选为 1:1024 以上的可检测抗胞内劳森菌抗体滴定度。该接种优选在 1 天大至 20 天大时,更优选在 1 天大至 10 天大时,更优选在 1 天大至 9 天大时,更优选在 1 天大至 8 天大时,更优选在 1 天大至 7 天大时,更优选在 1 天大至 6 天大时,更优选在 1 天大至 5 天大时,更优选在 1 天大至 4 天大时,更优选在 1 天大至 3 天大时,更优选在 1 或 2 天大时,且最优选在 1 天大时发生。

[0047] 根据上述该等医疗用途的另一方面,该胞内劳森菌抗原是选自由活的经修饰的胞内劳森菌细菌、杀死的胞内劳森菌细菌或胞内劳森菌细菌的一或多个亚单位组成的组。该胞内劳森菌抗原优选为活的经修饰的胞内劳森菌细菌。更优选地,该等动物是经约 3.0TCID₅₀ 至约 6.0TCID₅₀ 的剂量的活的经修饰的胞内劳森菌细菌授予。

[0048] 包含胞内劳森菌抗原的疫苗组合物的制备是现有技术且为本领域技术人员所知。

举例而言,熟习此项技术者能够确定该组合物中可包含的额外组分(亦参见 Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 第 18 版, Mack Publ., Easton)。专业人员可使用已知的可注射、生理学上可接受的无菌溶液。对于制备适于非经肠注射或灌注的即用(ready-to-use)溶液而言,诸如盐水或相应血浆蛋白溶液之类等渗水溶液可容易地获得。该等疫苗组合物可以冻干态或干燥制剂形式存在,例如,作为组配试剂盒(kits of parts),其可在使用之前在无菌条件下直接用已知的可注射溶液重建。

[0049] 此外,本发明的免疫原性及疫苗组合物可包括一或多种兽医可接受的载剂。如本文中所述的“兽医可接受的载剂”包括任何溶剂、分散介质、包衣剂、佐剂、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗细菌剂及抗真菌剂、等渗剂、吸附延迟剂及其类似物。

[0050] “稀释剂”可包括水、盐水(saline)、葡萄糖、乙醇、甘油及其类似物。等渗剂可包括氯化钠、葡萄糖、甘露糖醇、山梨糖醇及乳糖等。稳定剂包括白蛋白及乙二胺四乙酸的碱盐等。

[0051] 如本文中所使用的“佐剂”可包括氢氧化铝及硫酸铝,皂素例如 Quil A、QS-21(Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA)、GPI-0100(Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL),油包水乳液,水包油乳液,水包油包水乳液。乳液可特别地基于下列物质:轻液态石蜡油(欧洲药典类型);类异戊二烯油诸如角鲨烷或角鲨烯;由烯烃,尤其为异丁烯或癸烯低聚得到的油;含有直链烷基的酸类或醇类的酯类,更尤其为植物油、油酸乙酯、丙二醇二(辛酸/癸酸)酯、三(辛酸/癸酸)甘油酯或丙二醇二油酸酯;支链脂肪酸或醇的酯类,尤其为异硬脂酸酯类。将油与乳化剂组合使用以形成乳液。该等乳化剂优选为非离子表现活性剂,尤其为视情况经乙氧基化的脱水山梨糖醇酯、二缩甘露醇酯(例如无水甘露糖醇油酸酯)、乙二醇酯、聚甘油酯、丙二醇酯及油酸、异硬脂酸、蓖麻酸或羟基硬脂酸的酯,以及聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物(尤其为 Pluronic 产物,特别为 L121)。参见 Hunter 等人, The Theory and Practical Application of Adjuvants(Stewart-Tull, D. E. S. 编)。John Wiley 及 Sons, NY, 第 51-94 页(1995)及 Todd 等人, Vaccine 15: 564-570(1997)。(其教示及内容据此以引用方式并入本文。)

[0052] 举例而言,有可能使用由 M. Powell 及 M. Newman 所编的“Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach”, Plenum Press, 1995 的第 147 页上所述的 SPT 乳液及同一本书的第 183 页上所述的乳液 MF59。(其教示及内容据此以引用方式并入本文。)

[0053] 佐剂的另一实例为选自丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物及顺丁烯二酸酐与烯基衍生物的共聚物的化合物。有利的佐剂化合物为联的丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物,尤其与糖类或多元醇类的聚烯基醚交联的丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物。此等化合物藉由术语卡波姆(carbomer)而为人所知(Pharmeuropa 第 8 卷,第 2 期,1996 年 6 月)。熟悉此项技术者亦可参考美国专利第 2,909,462 号,其描述此类与具有至少 3 个羟基,优选为不超过 8 个羟基的多羟基化合物交联的丙烯酸聚合物,至少 3 个羟基的氢原子被具有至少 2 个碳原子的不饱和脂族基团置换。优选基团为彼等含有 2 至 4 个碳原子的基团,例如乙烯基、烯丙基及其他烯系不饱和基团。该等不饱和基团本身可含有诸如甲基等其他取代基。以卡巴浦尔(Carbopol)为名称所出售的产品(BF Goodrich, Ohio, USA)特别适合。其与烯丙基蔗糖或与烯丙基异戊四醇交联。其中,可提及 Carbopol 1974P、934P 及 971P。最优选使用 Carbopol 1971P。在顺丁烯二酸酐与烯基衍生物的共聚物中,有共聚物 EMA(Monsanto),其为

顺丁烯二酸酐与乙烯的共聚物。此等聚合物在水中的溶解产生酸性溶液,其将被中和,优选中和至生理 pH 值以产生佐剂溶液,再向该佐剂溶液中并入免疫原性组合物、免疫组合物或疫苗组合物本身。

[0054] 另外合适的佐剂包括(但不限于)RIBI 佐剂系统(Ribi Inc.)、嵌段共聚物(CytRx, Atlanta GA)、SAF-M(Chiron, Emeryville CA)、单磷酸基脂质 A、阿夫立定(Avridine)脂质-胺佐剂、来自大肠杆菌(*E. coli*)的热不稳定肠毒素(重组或其他方式)、霍乱毒素、IMS1314 或胞壁酰基二肽等。

[0055] 优选以每剂量约 100 μ g 至约 10mg 的量添加佐剂。更优选以每剂量约 100 μ g 至约 10mg 的量添加佐剂。更优选以每剂量约 500 μ g 至约 5mg 的量添加佐剂。更优选以每剂量约 750 μ g 至约 2.5mg 的量添加佐剂。最优选以每剂量约 1mg 的量添加佐剂。

[0056] 疫苗组合物可进一步包括一或多种其他免疫调节剂,诸如白介素、干扰素或其他细胞因子。疫苗组合物亦可包括遗传霉素(Gentamicin)及硫柳汞(Merthiolate)。虽然熟习技工可容易地确定适用于本发明的上下文中的佐剂及添加剂的量及浓度,但本发明涵盖了在每毫升疫苗组合物剂量中包含约 50 μ g 至约 2000 μ g 佐剂且优选为约 250 μ g 佐剂的组合物。在另一优选实施例中,本发明涵盖包含约 1 μ g/ml 至约 60 μ g/ml 的抗生素且更优选为小于约 30 μ g/ml 的抗生素的疫苗组合物。

[0057] 以任何习知方式,最优选经由经口灌服(oral drench)将疫苗投予动物,优选为哺乳动物且更优选为猪。待投予的剂量将视具体病例而定,但在任何情况下,其为足以诱发对抗回肠炎的保护性抗体或细胞介导的免疫反应的量。

[0058] 通常将本发明的疫苗以一或多个剂量投予易感动物,优选投予年幼小猪及/或具有抗胞内劳森菌抗体或暴露于抗胞内劳森菌抗体的小猪。可在最初接种之后以 2 至 4 周间隔 1 或 2 次投予活的或杀死的疫苗。对于减毒活疫苗而言,一剂为优选。如上所述,第一次或单一投予优选在 1 天大至 20 天大时,更优选在 1 天大至 10 天大时,更优选在 1 天大至 9 天大时,更优选在 1 天大至 8 天大时,更优选在 1 天大至 7 天大时,更优选在 1 天大至 6 天大时,更优选在 1 天大至 5 天大时,更优选在 1 天大至 4 天大时,更优选在 1 天大至 3 天大时,更优选在 1 或 2 天大时,且最优选在 1 天大时进行。

[0059] 若需要或必需第二次投予,则在第一次投予疫苗之后约 1 至约 4 周进行第二次投予。根据另一方面,在任何先前接种投予之后以 3 至 12 个月的间隔进行再接种。优选以 6 个月至一年的间隔进行随后疫苗剂量的投予。在另一优选方面中,在约 2 至 3 周龄之前接种的动物应再接种。优选以一年的间隔进行随后疫苗剂量的投予。

[0060] 在以下实施例中进一步描述本发明,提供以下实施例仅为说明的目的,不应解释为具有限制性。实际上,本发明的其他变体应为熟习此项技术者显而易见。

[0061] 本文中所引用的所有公开案及专利是以引用的方式全文并入。

实施例

[0062] 实施例 1

[0063] 在来自母猪(生育不止 1 窝)及初产母猪(第一窝)的初乳及乳液样品中检测对胞内劳森菌具特异性的抗体

[0064] 材料与方法

[0065] 在产仔后 24h 内自 25 只母猪及 25 只初产母猪 (gilt) 取得初乳样品。在哺乳期第一周及第二周自相同猪取得乳液样品。在 4℃ 两次将样品以 2000g 离心 10min 以分离乳液的脂肪部分。将样品的水样部分储存在 -20℃ 下直至分析。在 IFAT 中自 1:20 最初稀释度开始连续 2 倍稀释后,检测抗胞内劳森菌的特异性抗体。除对于各样品而言,将 FITC 标记抗猪 IgG、IgM 及 IgA 抗体用于检测不同类 Ig 之外,如实施例 5 中及别处所述进行 IFAT。在产仔后 24 小时内取得来自母猪及初产母猪的平行血样。根据制造商的指示以 Enterisol® Ileitis ELISA 检验此等样品。

[0066] 结果

[0067] 图 1 中概述在初乳样品中抗体检测的结果。该图展示在 IFAT 中对于不同稀释度的 IgG、IgM 及 IgA 得到阳性结果的样品数目。在所有检验中初乳样品都不是阴性。仅一个来自母猪的初乳样品及一个来自初产母猪的初乳样品为 IgG 阴性,而在一个来自初产母猪的样品中及三个来自母猪的样品未检测出特异性 IgM。分别自初产母猪及母猪获得的 25 个样品中八个的对胞内劳森菌具特异性的 IgA 得分为阴性。在哺乳期第二周获得的乳液样品中,仅两个来自母猪的样品的 IgG 得到 1:20 的滴定度,而一个来自初产母猪的样品的 IgA 得分为阳性 (1:20)。在哺乳期第三周,来自一只母猪及三只初产母猪的样品在 1:20 的稀释度得到 IgG 阳性结果。所有其他来自哺乳期第二周及第三周的样品测得为 IgG、IgM 及 IgA 阴性。所有在产仔后 24h 内取自母猪的血样在 Enterisol® Ileitis ELISA 中为阳性,而自初产母猪获得的 25 个样品中 2 个样品得到阴性结果。来自血样的结果与来自初乳样品的结果之间无明显相关性。可总结出,在来自母猪及初产母猪的初乳中,存在对胞内劳森菌具特异性的 IgG、IgM 及 IgA 抗体。然而,在产仔后一周取得的乳液样品中,仅在 6% 的样品中可检测到低滴定度的胞内劳森菌特异性抗体。

[0068] 参考文献

[0069] 1. McOrist, S. 等人 (2003) Pig J. 51, 26-35

[0070] 2. Collins, A. M. 等人 (2001) Allen D. Leman Swine, Conference

[0071] 3. Holyoake, P. K. 等人 (1994) J Clin Microbiol 32, 1980-1985, Kruse, P. E. (1983) Ann. Rech. Vet. 14, 349-353

[0072] 4. Bollwein, J. (2004) Doctoral thesis, LMU, Munich

[0073] 5. Knittel, J. P. 等人 (1998) AJVR 59, 722-726

[0074] 实施例 2

[0075] 在途经胃肠道期间乳液抗体对胞内劳森菌的直接影响

[0076] 材料与方法

[0077] 在出生后 24h 内自母猪及初产母猪取得初乳样品。在哺乳期第一周及第二周取得母猪乳液样品。在 4℃ 两次将样品以 2000g 离心 10min 以分离乳液的脂肪部分。将样品的水样部分储存在 -20℃ 直至分析。在 IFAT 中自 1:20 最初稀释度开始连续 2 倍稀释后,检测抗胞内劳森菌的特异性抗体。除对于各样品而言,将 FITC 标记抗猪 IgG、IgM 及 IgA 抗体用于检测不同类 Ig 之外,如实施例 5 中及别处 (5) 所述进行 IFAT。基于 IFAT 结果选择具有不同 Ig 含量的乳液样品。以不同稀释度在初乳或母猪乳液样品中在室温培育胞内劳森菌培养物。将每一样品测试两次。在培育开始时 (0 小时) 及在 4 小时后在室温量测胞内劳森菌的组织培养半数感染剂量 (TCID₅₀)。培养物的未稀释样品充当测试效能的对照。每次

测 $TCID_{50}$ 值时,使样品 20 次通过 20 号针来均质化。McCoy 细胞在 $75cm^2$ 组织培养烧瓶中用 DMEM/HAM's F12 培养基培养至 100% 长满的单层,将细胞用胰蛋白酶消化,分装于四个 96 孔微滴板上。将 10^{-1} 至 10^{-7} 连续稀释的样品各接种六次于新鲜 McCoy 细胞上。在 $37^{\circ}C$ 在微嗜氧性条件下培育 6 天后,藉由冰冷丙酮 / 甲醇 (50:50, v/v) 固定细胞。藉由使用特异性单克隆抗劳森菌抗体且随后用 FITC 标记抗小鼠抗体进行标记,来检测胞内劳森菌的生长。将含有一或多个带 5 个或更多荧光胞内劳森菌的 McCoy 细胞的各孔判为阳性。藉由使用根据 Spearman 及 Karber (6) 的 50% 终点公式求出 $TCID_{50}$ 。

[0078] 结果

[0079] 图 1 中概述来自 $TCID_{50}$ 测试的结果及 8 个初乳 (第 1-5 号) 及乳液 (第 6-8 号) 样品的 IgG、IgA 及 IgM 滴定度。在所有实验中,培养物的对照样品得到所预期的 $TCID_{50}$ 值。在室温培育 4 小时期间,所述测试无一发生胞内劳森菌滴定度的实质变化。因此,如此研究中所示,在途经胃肠道期间,母体抗体及母猪乳液似乎并不有效于灭活胞内劳森菌。

[0080] 参考文献

- [0081] 1. van Aken ;N. 等人 (2002)Proc. 17th IPVS, Ames, Iowa, USA
- [0082] 2. Kruse, P. E. (1983)Ann. Rech. Vet. 14, 349-353
- [0083] 3. Collins, A. M. 等人 (2001)Allen D. Leman Swine, Conference
- [0084] 4. Holyoake, P. K. 等人 (1994)J Clin Microbiol 32, 第 1980-1985 页
- [0085] 5. Knittel, J. P. 等人 (1998)AJVR 59, 722-726.
- [0086] 6. Karber, G. (1931)Arch. exp. Path. Pharma. 162, 480
- [0087] 7. Mauch, C. H. Y. 及 G. Bilkei (2004)Vet. Rec. 155, 532

[0088] 实施例 3

[0089] 接种一天大的小猪的抗胞内劳森菌感染功效

[0090] 材料与方法

[0091] 本研究由三个涉及 1 天大的胞内劳森菌阴性及抗劳森菌母体抗体阴性哺乳小猪的实验组组成。在研究第 0 天,第 1 组的 20 只小猪各自 (被接种) 接受口服剂量的 Enterisol[®] Ileitis (疫苗分离株 B3903) (按说明书 (3) 指示)。第 2 组 (对照) 的二十只小猪接受由生长培养基组成的安慰剂。使所有组的小猪在研究第 20 天断奶。在第 21 天,第 1 组及第 2 组的小猪经由管饲 (gavage) 而接受含有 3.5×10^9 个毒性胞内劳森菌 2688/2685 的小肠匀浆物。第三组的 10 只猪 (严格对照) 在研究期间任何时期未接受疫苗、安慰剂或细菌攻击。在第 42 天,人道地使所有组的猪安乐死且进行尸体解剖。主要功效参数包括特别由胞内劳森菌所引起的回肠、盲肠及结肠的肉眼及微观损害。次要参数包括临床健康状况 (行为、体况及粪便硬度)、平均每日体重增加量、粪便排菌 (PCR) 及血清转化 (IFAT) (1)。

[0092] 结果

[0093] 在尸体解剖 (第 42 天) 时,与未接种的对照猪 (回肠 =1.16、盲肠 =0.42、结肠 =0.16) 相比,受接种者 (第 1 组) 具有显著 ($p < 0.0003$) 较小的平均肉眼损害得分 (回肠 (0.21)、盲肠 (0.0) 及结肠 (0.0))。与经接种猪 (1.42cm) 相比,在对照组中小肠损害平均总长度 (回肠、盲肠及结肠) 显著 ($p < 0.0001$) 较高 (8.89cm)。第 3 组 (严格对照组) 的平均肉眼肠损害得分为 0.22,被认为是正常的。

[0094] 与经接种猪 (0.53) 相比,在对照组中回肠的劳森菌特异性平均微观损害得分显著 ($p<0.02$) 较高 (2.47)。此外,与经接种组相比,在对照组中总微观损害得分 ($p<0.006$) 及 IHC 阳性猪百分比 ($p<0.0001$) 显著较高。在盲肠及结肠方面,对照组具有比经接种组略高一点的平均微观损害得分及 IHC 阳性动物百分比 ($p>0.05$)。显著地 ($p<0.05$),与经接种组相比,细菌攻击 (第 35 天) 2 周后较多对照猪为 PCR 阳性。在研究最后一天 (第 42 天),与彼等经接种组的猪 (3/19) 相比,对照组的猪 (8/19) 排出略多一点的胞内劳森菌 ($p>0.05$)。在研究期间第 1 组与第 2 组之间平均每日体重增加量或平均临床得分无显著 ($p>0.05$) 差异。总而言之,主要功效参数 (肉眼及微观小肠损害进展) 表明,当对 1 天大、母体抗体阴性、未接触过劳森菌的小猪投予时,单一口服剂量的 Enterisol® Ileitis 有效对抗毒性细菌攻击。在此研究中,哺乳期间初乳及乳液中潜在的非劳森菌特异性催乳特性不干扰或妨碍疫苗对抗毒性胞内劳森菌攻击的效力。

[0095] 表 1. 胞内劳森菌粪便排菌者的比率。

[0096]

组	*组 ID	第 0 至 21 日	第 28 日	第 35 日	第 42 日
[0097]					
		PCR 阳性	PCR 阳性	PCR 阳性	PCR 阳性
1	接种	0/19 ^a	0/19 ^a	0/19 ^a	3/19 ^a
2	细菌攻击对照	1/19 ^a	0/19 ^a	5/19 ^b	8/19 ^a
3	Φ 严格对照	1/9	0/9	0/9	0/9

[0098] ^{a, b} 相同字母表示无显著差异 ($p<0.05$)。

[0099] ^Φ 严格对照组未作统计分析。

[0100] * 各组有一只猪由于与胞内劳森菌无关的不良健康状态而被移除。

[0101] 参考文献

[0102] 1. McOrist 等人 (1993) Infection and Immunity 61:4286-4292

[0103] 2. Knittel 等人 (1998) Am J Vet Res 59:722-726.

[0104] 3. Kroll 等人 (2004) Am J Vet Res 65:559-565

[0105] 4. Mauch 及 Bilkei (2004) Vet Rec 155:532

[0106] 5. Marsteller 等人 (2003). Swine Health Prod 11:127-130

[0107] 6. Stege 等人 (2004). Vet Micro 104:197-206

[0108] 实施例 4

[0109] 用于检测及量化抗胞内劳森菌抗体的 IFAT

[0110] 材料与方法：

[0111] 在研究开始之前,将 16 只健康、怀孕及胞内劳森菌阴性母猪随机分为 2 组:8 只为超免疫组 (A 组),8 只为安慰剂投予对照组 (B 组)。在产仔之前倒数第 55、35 及 14 天, A 组的各只母猪以市售 Enterisol® Ileitis 藉由直接经口灌服进行超免疫。用此方法投予疫苗剂涉及使用 10ml 无菌塑料注射器将疫苗应用于口腔后部。对照组 (B 组) 接受等剂量的

由悬浮于生长培养基中的未感染 McCoy 细胞组成的安慰剂。使 A 组怀孕母猪超免疫以求在产仔之前诱导高水平的母体免疫力。使每个怀孕母猪组住在多个分开的室中（以避免交叉污染）但处于相同条件（温度、通风及猪栏（pen）大小）。将每个室的母猪关在相同猪栏中。

[0112] 尽管研究调查者努力使受孕及产仔日期一致，但母猪并不都在同一天产仔。实情为，产仔发生在 10 天期间。为防止出现多个接种日及细菌攻击日以致该研究中猪群之间变动过大，将产仔期间的平均产仔日期确定为研究的第 0 天。因此，在接种时（第 21 天）猪为 3 周 $\pm$ 5 天大。

[0113] 在第 21 天，按窝（litter）拣选 100 只健康、断奶小猪且随机分为六个处理组。住所限制及条件类似于上述母猪组。将超免疫母猪（A 组）所生的小猪随机分至第 1 至 3 组，并在此后研究中称其为“超免疫来源”小猪。将对照母猪（B 组）所生的小猪随机分至第 4 至 6 组，并在此后研究中称其为“安慰剂来源”小猪。第 1 组及第 4 组（分别为 20 只猪 / 组）藉由直接经口灌服给予单一 2ml 剂量的 Enterisol[®] Ileitis。第 2 组及第 5 组（分别为 20 只猪 / 组）给予等剂量的安慰剂（未感染的 McCoy 细胞 + 培养基）。第 3 组及第 6 组（10 只猪 / 组）为“严格阴性对照组”，在此研究期间其不接受疫苗或安慰剂处理，且不受细菌攻击。在断奶期后第 22 天，人道地使母猪安乐死且进行尸体解剖以用于评估由于 PE 引起的小肠损害进展。

[0114] 在研究的第 42 天，第 1、2、4 及 5 组经由胃内管饲接受每剂量 $1 \times 10^{7.3} \text{TCID}_{50}$ 的异源毒性纯培养物胞内劳森菌分离株 N101494。细菌攻击的 21 天后，每天检验所有小猪的与 PE 相关的临床症状、腹泻、行为及体况，根据严重程度给出 1 至 4 级的评分（1=临床正常；4=严重疾病）。在研究第 21、42 及 63 天将猪称重以计算每组猪的平均每日体重增加量。计算平均每日体重增加量（ADWG）以分析与猪正常生长性能有关的处理效果。猪在最初称重以获得在接受疫苗或安慰剂处理之前的组平均体重基数。发现所有组大小均匀（差异 < 0.63 公斤 / 猪）。组间第一关键 ADWG 评估时期发生于第 21 天（接种）至第 42 天（细菌攻击），以测量疫苗接种或安慰剂接种的即刻效果。第二评估时期为第 42 天至 63 天（尸体解剖），以测量以毒性纯培养物胞内劳森菌攻击的效果。

[0115] 在研究第 63 天，人道地使所有猪安乐死且进行尸体解剖以用于评估由于 PE 引起的小肠损害进展。

[0116] 结果

[0117] 母体抗体检测

[0118] A 组（超免疫）母猪在产仔期间在血清及初乳中检测到胞内劳森菌特异性 IgG、IgA 及 IgM 抗体。产仔时，63% 的 A 组母猪（5 只 / 8 只母猪）对抗劳森菌 IgG 抗体为血清抗体阳性，而 B 组（对照）中 0% 的母猪（0/8）为阳性。此外，A 组母猪所生小猪仅在产仔日（第 0 天）至 5 周龄（第 28 天）时检测到血清 IgG 抗体，见图 1。A 组母猪分别有 50%、75% 及 12.5% 在初乳中检测到抗劳森菌 IgG、IgA 及 IgM。A 组母猪的初乳中平均抗体浓度为 1:14（IgG，范围 = 1 至 1:64）、1:10（IgA，范围 = 1 至 1:32）及 1:4（IgM，范围 = 1 至 1:4）。B 组的母猪在此期间在其初乳中不具有任何可检测的抗劳森菌 IgM 或 IgG 抗体。B 组母猪中的一只猪在 1:16 的滴定度为 IgA 阳性。

[0119] 母体保护

[0120] 比较第 2 组 (A 组母猪所生猪) 与第 5 组 (B 组母猪所生猪) 中未接种的对照猪, 以评估经疫苗超免疫的母猪 (A 组母猪) 对抗毒性胞内劳森菌暴露的潜在母体保护作用。

[0121] 表 1 中概述所有组的平均肉眼及微观损害得分。与第 2 组猪 (27.5%) 相比, 第 5 组猪 (77%) 的回肠及结肠中劳森菌特异性损害百分比较高。在研究的第 63 天, 与第 5 组相比, 第 2 组猪的回肠平均肉眼损害得分以及回肠及结肠平均微观 (IHC) 损害得分都显著 ($p < 0.05$) 较低。

[0122] 在研究的第 21 天 (接种) 至第 42 天 (细菌攻击), 在任一组的粪便中由 PCR 未检测到胞内劳森菌排出, 见图 3。第 2 及第 5 组的粪便从第 49 天开始呈 PCR 阳性, 且分别有 5-25% 及 15-72% 的在此期间排出胞内劳森菌的猪保持阳性直至第 63 天 (研究终止)。在研究的第 63 天, 与第 5 组 (72%) 相比, 第 2 组中藉由 PCR 检测到显著 ($p < 0.05$) 较少的粪便排出 (25%)。

[0123] 在研究第 63 天, 与第 2 组 (25%) 相比, 第 5 组猪的回肠中发现较高的组织 PCR 阳性百分比 (45%)。第 2 组猪在扁桃体、肠系膜淋巴结及结肠中为胞内劳森菌 PCR 阴性。如上文第 3.4 节所述, 在第 5 组猪的结肠及肠系膜淋巴组织中观察到不同 PCR 阳性。

[0124] 表 2 中概述所有测试组间平均体重增加量的比较。在第 21 天 (接种), 第 2 组与第 5 组间平均初始体重一致, 猪重分别为 6.35 及 6.10 公斤 / 猪。第 21 天 (接种) 至第 42 天 (细菌攻击), 第 2 组 (0.40 公斤 / 猪) 与第 5 组 (0.41 公斤 / 猪) 间 ADWG 无显著差异。然而, 在研究的第 42 天 (细菌攻击) 至第 63 天 (研究终止) 的 21 天评估期期间, 与第 5 组猪 (0.40 公斤 / 猪) 相比, 第 2 组猪 (0.46 公斤 / 猪) 的 ADWG 显著 ($p < 0.05$) 较高。

[0125] 超免疫猪中的疫苗功效

[0126] 将第 1 组中以 **Enterisol[®]** Ileitis 接种的猪与第 2 组中未接种的对照猪进行比较, 以证实, 可藉由评估 3 周龄的猪接种后对抗 PE 的保护性免疫来实现面临母体免疫时的接种。两个组中的猪都来自经疫苗超免疫的母猪 (A 组母猪)。此外, 分析第 1 组与第 4 组的经疫苗处理的猪之间的主要及次要功效参数, 以判定, 疫苗对抗毒性胞内劳森菌攻击的功效是否类似。

[0127] 表 1 中概述所有组的平均肉眼及微观损害得分。与第 1 组猪 (12.5%) 相比, 第 2 组猪 (27.5%) 的回肠及结肠中劳森菌特异性损害百分比较高。在研究的第 63 天, 与第 2 组相比, 第 1 组猪的平均肉眼损害得分 (回肠) 显著 ($p < 0.05$) 较低, 且平均微观 (IHC) 损害得分 (回肠及结肠) 数值较低。此外, 在接受接种的猪 (第 1 组及第 4 组) 中平均肉眼与微观损害得分或损害严重程度间无显著差异。

[0128] 在研究的第 21 天 (接种) 至第 35 天期间, 在任一组 (1 或 2 组) 的粪便中藉由 PCR 未检测到胞内劳森菌排出, 见图 3。第 1 组猪的粪便从第 42 天 (细菌攻击) 开始呈 PCR 阳性, 在此期间排出胞内劳森菌的猪有 11-16% 保持阳性直至第 63 天 (研究终止)。第 2 组猪的粪便从第 49 天开始呈 PCR 阳性, 在此期间排出胞内劳森菌的猪有 5-25% 保持阳性直至第 63 天 (研究终止)。第 4 组猪直到第 42 天 (细菌攻击) 才变为劳森菌 DNA PCR 阳性, 并将阳性保持至第 63 天 (研究终止), 期间排出者比率从 25% 减少至 5%。在研究期间第 1 组与第 2 组、第 1 组与第 4 组之间胞内劳森菌粪便排菌者比率无显著差异的迹象。

[0129] 在研究的第 63 天 (研究终止), 与第 1 组 (20%) 相比, 第 2 组猪的回肠中发现略高的组织 PCR 阳性百分比 (25%)。在研究终止时, 发现第 4 组的组织 PCR 阳性百分比 (5%) 比

第 1 组及第 2 组低。第 1 组与第 2 组、第 1 组与第 4 组间 PCR 阳性无显著差异。所有三组猪在扁桃体、肠系膜淋巴结及结肠中对胞内劳森菌为 PCR 阴性。

[0130] 表 2 中概述所有测试组间平均体重增加量的比较。在第 21 天（接种），第 1 组与第 2 组间平均初始体重一致，猪重分别为 6.53 及 6.35 公斤 / 猪。第 21 天，在第 1 组与第 4 组间亦观测到一致的平均体重（分别为 6.53 公斤 / 猪及 6.44 公斤 / 猪）。第 21 天（接种）至第 42 天（细菌攻击），第 1 组（0.40 公斤 / 猪）与第 2 组（0.41 公斤 / 猪）间、或第 1 组与第 4 组（0.44 公斤 / 猪）间 ADWG 无显著差异。第 42 天（细菌攻击）至第 63 天（研究终止）的 21 天评估期期间，第 1 组猪（0.45 公斤 / 猪）与第 4 组猪（0.51 公斤 / 猪）的 ADWG 有显著差异（ $p < 0.05$ ）。在此研究的第 21 天至第 63 天，第 1 组与第 2 组间 ADWG 无显著差异。

[0131] 实施例 5

[0132] 用 IFAT 检测及量化抗胞内劳森菌抗体

[0133] 藉由免疫荧光抗体测试（IFAT），使用固定于 96 孔聚苯乙烯微滴板上的劳森菌全抗原及针对猪 IgG 的 FITC 标记抗体（Knittel 等人 1998），测试来自各母猪及猪的血液的血清样品中对抗胞内劳森菌的 IgG 抗体的存在。藉由使用针对猪 IgM 及 IgA 的 FITC 标记抗体略微修改 IFA 测试。将此经修改的方法用于在各母猪初乳中检测除 IgG 外的此等抗体，以用于测定不同劳森菌特异性免疫球蛋白的浓度。将初乳在 PBS 中一式两份作 2 倍稀释，且转移（100 μ l / 孔）至两组如上所述包被了劳森菌的 96 孔培养板中。将这些板在 37°C 培育 30 分钟，接着以 PBS 洗涤 3 次。将事先已在 PBS 中 1:200 稀释的抗猪 IgM 或 IgA FITC 偶联抗体（Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.）添加至培养板中，接着重复培育及洗涤步骤。使用 UV 显微术检测各种特异性抗劳森菌抗体的滴定度。计算各种免疫球蛋白的 IFAT 阳性百分比及平均滴定度值用于组间比较，以求出母猪间 IgG、IgM 及 IgA 初乳抗体的频率及含量。

[0134] 参考文献

[0135] 1. Knittel 等人 (1998) Am J Vet Res 59 :722-726。

保藏信息

下述材料保藏于位于美国弗吉尼亚州的美国典型培养物保藏中心（ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209）。

分类命名	保藏单位	保藏号	保藏日期
胞内劳森菌 (<i>Lawsonia intracellularis</i>) B-3093	ATCC	PTA-4926	2003 年 1 月 9 日
胞内劳森菌 (<i>Lawsonia intracellularis</i>) 15540	ATCC	PTA-4927	2003 年 1 月 9 日

下述材料保藏于位于美国马里兰州的美国典型培养物保藏中心（ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852）。

分类命名	保藏单位	保藏号	保藏日期
Ileal symbiant <i>intracellularis</i>	ATCC	55672	1995 年 5 月 19 日
胞内劳森菌 (<i>Lawsonia intracellularis</i>), N343, NP40wk	ATCC	55783	1996 年 5

月 22 日

下述材料保藏于位于英国威尔特郡的欧洲细胞培养物保藏中心 (ECACC, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP40JG, UK)。

分类命名	保藏单位保藏号	保藏日期
抗-胞内劳森菌(<i>Lawsonia intracellularis</i>)杂交瘤 113:2	ECACC 04092201	2004 年 9 月 22 日
抗-胞内劳森菌(<i>Lawsonia intracellularis</i>)杂交瘤 268:18	ECACC 04092202	2004 年 9 月 22 日
抗-胞内劳森菌(<i>Lawsonia intracellularis</i>)杂交瘤 287:6	ECACC 04092203	2004 年 9 月 22 日
抗-胞内劳森菌(<i>Lawsonia intracellularis</i>)杂交瘤 110:9	ECACC 04092204	2004 年 9 月 22 日
抗-胞内劳森菌(<i>Lawsonia intracellularis</i>)杂交瘤 301:39	ECACC 04092205	2004 年 9 月 22 日
抗-胞内劳森菌(<i>Lawsonia intracellularis</i>)杂交瘤 268:29	ECACC 04092206	2004 年 9 月 22 日

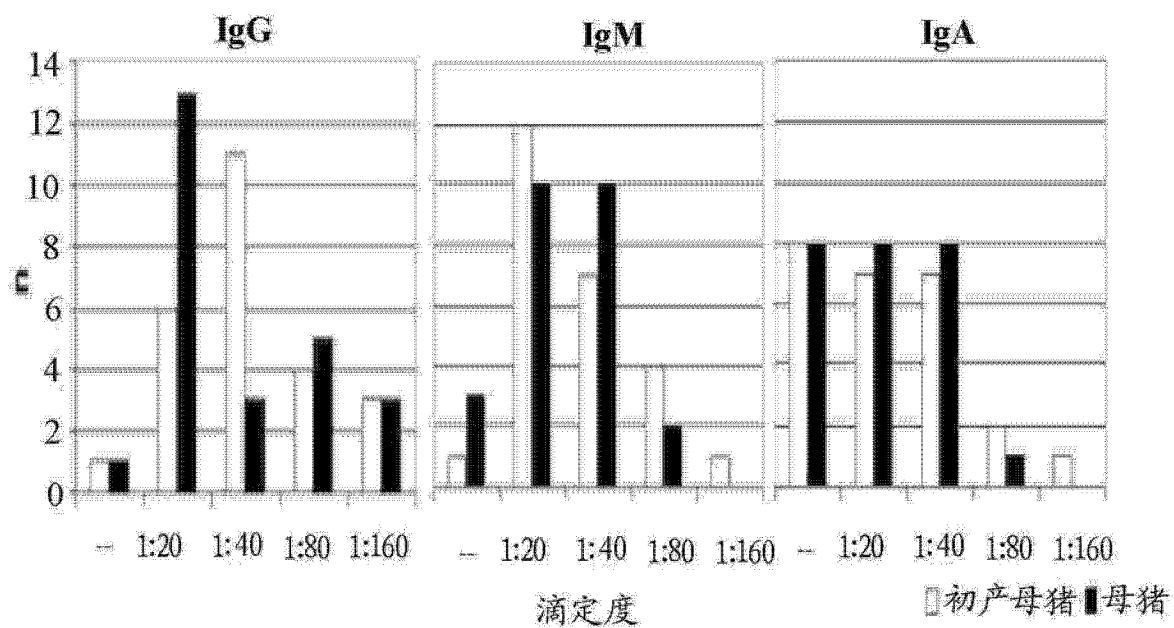


图 1

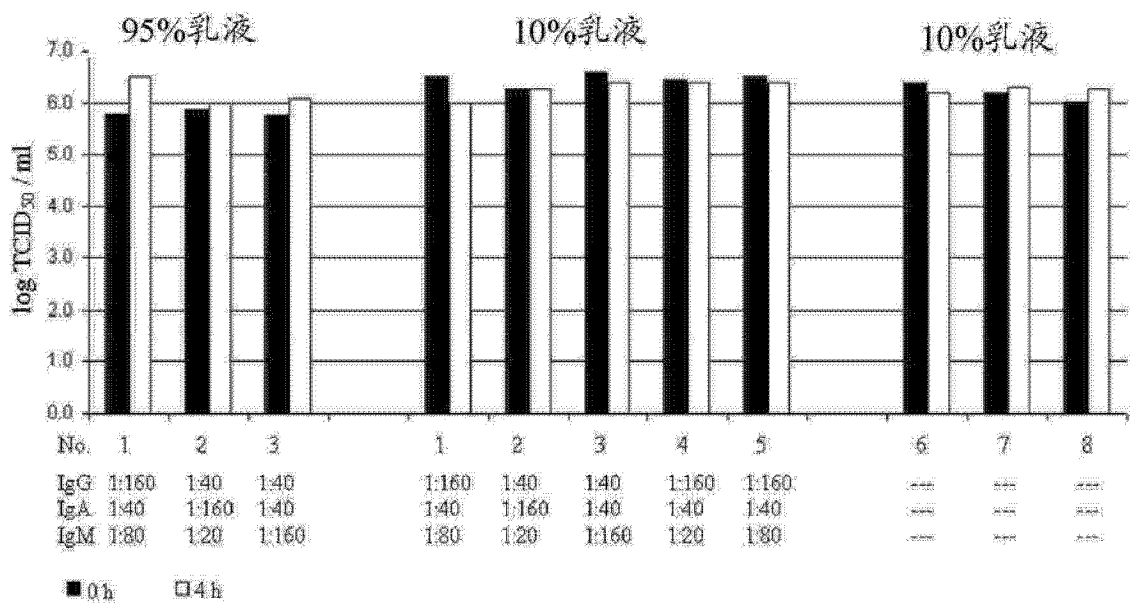


图 2