



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102056941 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 11

(21) 申请号 200980120773. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 06. 22

C07K 14/54 (2006. 01)

(30) 优先权数据

08158788. 3 2008. 06. 23 EP

08158920. 2 2008. 06. 25 EP

61/075, 079 2008. 06. 24 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 12. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/057746 2009. 06. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02009/156367 EN 2009. 12. 30

(71) 申请人 英特威国际有限公司

地址 荷兰博克斯梅尔

(72) 发明人 W·G·J·德根

V·E·J·C·希恩斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李瑛

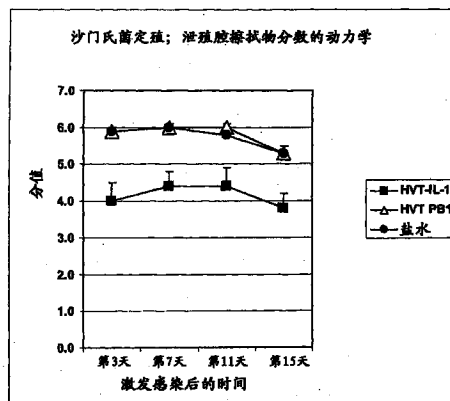
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

编码白细胞介素-12的重组火鸡疱疹病毒

(57) 摘要

本发明涉及含有编码白细胞介素-12的异源核酸序列的重组火鸡疱疹病毒(HVT)用于制造保护禽类对抗马立克氏病病毒和降低其对微生物感染的敏感性的药物的用途。



1. 含有编码白细胞介素-12的异源核酸序列的重组火鸡疱疹病毒(HVT)用于制造保护禽类对抗马立克氏病病毒和降低其对微生物感染的敏感性的药物的用途。

2. 根据权利要求1的用途,其特征在于所述微生物感染是细菌或病毒感染。

3. 根据权利要求2的用途,其特征在于所述细菌感染是沙门氏菌感染,而所述病毒感染是禽流感感染。

4. 根据之前任一项权利要求的用途,其特征在于所述白细胞介素-12是禽白细胞介素。

5. 根据之前任一项权利要求的用途,其特征在于所述禽类是鸡并且所述白细胞介素是鸡白细胞介素。

6. 根据之前任一项权利要求的用途,其特征在于所述药物是用于卵内给药或给药于一日龄动物的。

7. 含有编码白细胞介素-12的异源核酸序列的重组火鸡疱疹病毒(HVT),用于保护禽类对抗马立克氏病病毒和降低其对微生物感染的敏感性的药物中。

8. 含有编码白细胞介素-12的异源核酸序列的重组火鸡疱疹病毒(HVT)用于降低禽类对微生物感染的敏感性的用途。

编码白细胞介素 -12 的重组火鸡疱疹病毒

[0001] 本发明涉及在 HVT 基因组中含有异源核酸序列的重组火鸡疱疹病毒 (HVT)。

[0002] 重组 HVT 例如是从 EP431668 已知的。HVT 是公知的马立克氏病病毒 (MDV) 并且广泛用于安全疫苗中,用于有效控制家禽中的马立克氏病 (MD)。重组 HVT,其也是公知的并且用于对抗马立克氏病,例如,通过引入编码一个或多个所述其他病原体的抗原的异源基因给予了另外提供对抗其他病原体的保护的可能性。此外,重组 HVT 可以是包含来自另一个马立克氏病病毒血清型的基因的 HVT。这样的重组 HVT 例如在 US 5,965,138 中有描述,并且也称为重组嵌合病毒或新的禽疱疹病毒。

[0003] 从现有技术,已知多种方法来获得含有引入到 HVT 基因组中的异源核酸序列的重组 HVT 载体。例如,在 US 5,965,138 ('138 专利)中,公开了将外源 DNA 引入到唯一的长病毒区域的非必需区域中,该长病毒区域是火鸡疱疹病毒中天然存在的基因组的一部分。迄今为止,通常的一般知识是将异源核酸与功能性启动子,例如,HVT 中天然存在的启动子或异源启动子可操作地连接,使得异源 DNA 在宿主中得到真正的表达。这样的方法从上述的 '138 专利是已知的,但也可以例如从以下文献中获知:Sondermeijer 等(在:Vaccine, 1993;11(3):349-58),Djeraba 等(在:Journal of Virology,2002年2月,p.1062-1070)和Mohr 等(在:International Journal of Medical Microbiology 298,2008,115-125)。在欧洲专利 431668 中,描述了异源核酸序列可以源自任何病原体,优选禽病原体,在插入 HVT 基因组后,其可以用于诱发对抗由该病原体引起的疾病或障碍的免疫力。这样的病原体例如可以是传染性支气管炎病毒 (IBV)、新城鸡瘟病毒 (NDV)、传染性法氏囊病病毒 (IBDV)、鸡贫血因子 (CAA)、Reo 病毒、禽逆转录病毒、禽腺病毒、火鸡鼻气管炎病毒、艾美虫属种、沙门氏菌属种、大肠杆菌、鸡毒霉形体 (*Mycoplasma gallisepticum*) 和滑液囊支原体 (*Mycoplasma synoviae*)、鼻气管鸟杆菌 (*Ornithobacterium rhinotracheale*)、弯曲杆菌 (*Campylobacter*) 等。

[0004] 然而,已知重组 HVT 具有缺点。对于每种疫苗,接着对抗马立克氏病的保护,必需提供对抗另一种疾病或障碍的保护,因此一个疫苗必须插入诱发其他疾病或障碍的病原体的异源核酸序列(从现在开始,术语“障碍”也将用于涵盖“疾病”)。这从经济学的观点看是没有吸引力的,并且还降低了在疫苗中使用重组 HVT 的安全性。

[0005] 本发明的目的是克服或至少减轻上述的缺点。为此,已经设计了根据序言的重组 HVT,其中异源核酸编码 IL-12 蛋白,将其用于制造保护禽类对抗马立克氏病病毒并降低其对微生物感染的敏感性的药物。

[0006] 令申请人惊讶的是通过给药编码 IL-12 的 HVT 载体可以降低禽类对微生物感染的敏感性(即,马立克氏病病毒感染以外的感染,对马立克氏病病毒 HVT 自身已经提供了保护),而不需要给药源自相应微生物的抗原。实际上,通常从文献中获知 IL-12 在对抗微生物(即,如细菌、病毒或寄生物的微生物)感染的免疫应答中起作用。还知道缺乏 IL-12(即,不能产生 IL-12)的哺乳动物在接受病原体时具有不太有效的免疫应答,并且通过直接给予外源 IL-12 可以使其达到正常水平。然而,现在显示出在健康的禽类中(即,不是 IL-12 缺乏的),可以使得禽类对任何微生物的感染不太敏感,而不需要同时(或无论如

何,在实际感染野生型微生物发生之前)必须给予源自该微生物的抗原,即使在没有同样给予 IL-12 时,而是给予通过 HVT 载体表达的 DNA 形式。这可以获得非常方便和廉价的降低禽类对马立克氏病病毒以外的微生物感染的敏感性的方法(注意到表达的 IL-12 也可以增强对抗马立克氏病的保护)。此外,该药物是非常安全的,因为它不需要含有除 HVT 自身以外的任何其他的抗原材料,因此可以完全防止不同抗原组合的不利相互干扰的风险。然而,如果希望,该药物可以含有其他抗原材料。当希望获得对抗多种 MDV 的最佳保护时,这种附加材料例如可以是源自其他马立克氏病病毒(MDV)的材料,乃至源自非-MDV 微生物。

[0007] 白细胞介素-12(缩写为 IL-12 或 IL12)是公知的细胞因子,即通过在 1 型 T- 辅助细胞和细胞毒性淋巴细胞的产生中具有免疫调节功能的抗原呈递细胞产生的(Blood, Vol. 84, No 12, 1994 年 12 月 15 日; pp4008-2027)。IL-12 是具有杂二聚结构的细胞因子,具有约 70kD 的分子量。通过大约 40kD 和 35kD 的两条连接的链形成。在不同的物种中,各种 IL-12 之间的同源性百分比可以低至例如 20-40% (例如,将哺乳动物 IL-12 与禽 IL-12 比较时),而同时保持细胞因子的功能性(Degen 等; The Journal of Immunology, 2004, 172 : 4371-4380)。

[0008] 在本专利意义上的保护意思是诱导有助于预防、缓解或治疗由微生物感染引起的疾病或障碍的免疫应答,作为给药一种或多种源自该微生物的抗原(含有一种或多种源自该微生物的抗原的组合物)的结果,如减毒或杀灭的微生物和/或其亚基,或任何其他物质,如微生物的代谢产物。在本专利意义上的降低对微生物感染的敏感性意思是患有该微生物感染时,使动物显示出较少的临床体征和/或显示出降低的微生物定殖和/或显示出降低的定殖影响,例如,降低的损伤。

[0009] 含有源自微生物的抗原的组合物通常被称为对抗该微生物的疫苗,即,如果抗原以免疫有效量存在(即,能够刺激目标动物的免疫系统足以至少降低用野生型微生物激发的负面作用)。通常将抗原结合药物学上可接受的载体,如含有水的液体,任选包含免疫刺激剂(佐剂),在给药于动物时,免疫刺激剂提供了对抗相应微生物的保护。

[0010] 一般而言,可以使用本领域已知的方法来制造药物,这些方法基本上包括将活性化合物(或含有活性化合物的组合物)与药物学上可接受的载体混合,例如,液体载体,如(任选缓冲的)水,或固体载体,如通常用于获得冻干疫苗或片剂、栓剂或胶囊的那些。根据例如打算的用途、所需的特性或药物的给药方式,任选地加入其他物质,如佐剂、稳定剂、防腐剂、润湿剂、粘度调节剂、填充剂或其他成分。对于口服和非肠道给药,许多合适的形式是本领域已知的。对于非肠道给药,特别使用液体制剂(含有溶解的、乳化的或悬浮的抗原),但固体制剂也是已知的,如植入物或媒介物形式,如用于将抗原悬浮于液体中的固体载体。对于所用药物的非肠道给药和合适的(物理)形式已经知道了数百年。

[0011] 注意到从 W02004/003017 获知了 IL-12 可以增大微生物诱发的免疫应答或接种疫苗诱发的免疫应答,基于细胞和体液免疫。然而,根据 IL-12 在对抗病原体的疫苗中的用途,仍然必须添加源自病原体的抗原(致免疫材料),疫苗提供了对抗该病原体的保护。该参考文献仍然没有记载关于这样使用 IL-12 来降低对病原体感染的敏感性(即,没有另外结合给药源自该病原体的抗原),更不用说使用编码 IL-12 的载体病毒。

[0012] 还注意到 Kincy-Cain 等(Infection and Immunity, 1996 年 4 月, pp1437-1440)已经公开了外源(即,不是由主体动物自身产生的)白细胞介素-12 可以增大用都柏林沙

门氏菌 (*Salmonella dublin*) 口服激发的小鼠中的保护性免疫应答。然而,该参考文献教导了应当通过使用皮下植入的渗透泵来直接给药 IL-12。清楚的是这是可靠的,但在经济上是没有吸引力的提供外源 IL-12 的方式。注意到该参考文献仍然没有记载在禽类中的作用。公知哺乳动物和禽类免疫系统有着实质性的不同,并且不能合理地预期在哺乳动物中获得的免疫效果也可以在禽类物种中获得。此外,Kincy-Cain 仍然没有记载间接提供外源 IL-12 的选择,特别是通过载体,更别说是火鸡的疱疹病毒。基于 Kincy-Cain 的公开内容,不能合理地预测或预期使用编码 IL-12 的 HVT,特别是在健康(即,没有 IL-12 缺乏)的禽类中使用时,可以降低这些禽类对微生物感染的敏感性。

[0013] 在一个实施方案中,微生物感染是细菌或病毒感染。显示出本发明特别适用于降低对这些感染的敏感性,特别是沙门氏菌和禽流感感染。

[0014] 在另一个实施方案中,白细胞介素 -12 是禽白细胞介素。尽管可以使用非禽白细胞介素 -12(已知白细胞介素 -12 是通过其功能性来限定的事实),但认为禽白细胞介素 -12 的使用降低了对抗 IL-12 的自体免疫应答的风险,并提供了最佳的引发结果。

[0015] 在再另一个实施方案中,禽类是鸡,并且白细胞介素是鸡白细胞介素。

[0016] 在不同的实施方案中,药物是用于卵内 (in-ovo) 给药或给药于一日龄(孵化那天)动物。这些给药类型具有如下优点:从孵化那一刻起,可以预期提高的对抗马立克氏病的保护(如与未接种疫苗的动物相比)和降低的对其他微生物敏感性。尤其是对童子鸡(除 MD-疫苗以外,其通常在其生命过程中将不接受任何其他疫苗接种,通常为 6 至 8 周),这种孵化后降低的对其他病原体感染的敏感性在经济上是非常有吸引力的。

[0017] 本发明还涉及含有引入到 HVT 基因组中的异源核酸序列的重组火鸡疱疹病毒 (HVT),异源核酸编码白细胞介素 -12,用于提供保护禽类对抗马立克氏病病毒和降低对微生物感染的敏感性的药物中。还涉及含有引入 HVT 基因组中的异源核酸序列的重组火鸡疱疹病毒 (HVT) 的用途,该异源核酸编码白细胞介素 -12,用于保护禽类对抗马立克氏病病毒和降低对微生物感染的敏感性。

[0018] 本发明已经显示出适用于获得降低的对感染并定殖目标动物的方式非常不同的微生物感染的敏感性。特别地,对于细菌,特别是肠杆菌科沙门氏菌,以及病毒,特别是呼吸道禽流感病毒,已经明确地将有利的作用具体化。因为这些微生物的感染、定殖方式以及引发免疫应答的方式真正地完全不相关。因此,可以合理地预期本发明适用于任何微生物,特别是术语肠杆菌科的任何细菌,特别是沙门氏菌,或任何病毒,特别是任何呼吸道病毒,特别是任何流感病毒,或任何其他微生物,如属于立克次氏体的微生物。现在将使用以下非限制性实施例来更详细地解释本发明。

[0019] 材料和方法

[0020] 重组鸡 IL-12 (recChIL-12) 的表达和纯化

[0021] 产生了单链 IL-12 p40-p35 杂二聚体分子(对于氨基酸序列,参见 Degen 等, *The Journal of Immunology*, 2004, 172 :4371-4380),其中 p40 链通过框内 (G4S) 3- 连接物与 p35 链连接;该分子在 Degen 等中被称为 ChFlexi-IL-12。使用 EP 0431668 中所述的方法,在 HVT 中表达该单链构建体。

[0022] 制造 HVT-IL-12 病毒和含有该病毒的药物

[0023] 使用 EP 0431668 中所述的方法,使用从 Degen 等 (*The Journal of Immunology*,

2004, 172 :4371-4380) 已知的 IL-12DNA, 制得具有插入的鸡 IL-12 的 HVT。将重组病毒以 30.000pfu/ml 悬浮于磷酸盐缓冲盐水 (也称为“PBS”或简单地称为“盐水”) 连接, 以构成药物。

[0024] RecChIL-12 的体外生物活性: 通过鸡脾细胞的 ChIFN- γ 合成的增殖和诱导

[0025] 将鸡初级脾细胞以 100 μ l 中 0.5×10^6 细胞 / 孔的密度接种于 96-孔平板中, 重复三份, 并用所示量的 recChIL-12 或热灭活的 recChIL-12 (100°C 下, 10 分钟) 培养。加入蛋白质后四十八小时, 在 18-20 小时 [甲基- 3 H]-胸苷 (在 25 μ l / 孔下 18.5kBq) 吸收后测定细胞的增殖。使用 LKB β 计数器 (LKB Instruments, Gaithersburg, MD) 计算结合的放射性。ChIL-12 激活的脾细胞也显示出增加的 ChIFN- γ 产生 (参见, Degen 等; The Journal of Immunology, 2004, 172 :4371-4380)。

[0026] HVT-Ch IL-12 生物活性

[0027] 与通过空 HVT 载体病毒感染的细胞和模拟感染的细胞的上清液相比时, HVT-ChIL-12 感染的细胞的上清液显示出明显的 ChIL-12 生物活性的迹象, 如通过增加的新鲜分离的脾细胞的增殖所测量的。

[0028] 表达 HVT 的细胞因子的给予

[0029] 将一 (1) 日龄的雌性非 IL-12 缺乏 SPF 小鸡 (20 只动物 / 组) 在腿部肌肉中肌内注射 0.1ml 如上所述的药物。给予对照动物含有作为空对照载体的 HVT-PB1 的磷酸盐缓冲盐水 (剂量为 3000pfu / 动物), 或只给予盐水。值得注意的是替代小鸡的肌内注射, 还可以使用卵内给药, 因为已知如下事实: 公知可以通过卵内给药成功地获得用 HVT 对抗马立克氏病的疫苗接种。

[0030] 沙门氏菌感染和抵抗力测定

[0031] 在激发感染前一天, 通过常规程序从冻干储备制剂将肠炎沙门氏菌 (SE) (肠炎沙门氏菌 subsp. enterica serovar Entertidis) 株在绵羊血琼脂培养基上新鲜培养过夜。在无菌肉提取物肉汤中制备激发接种物并在细胞计数后适当稀释。通过绵羊血琼脂上的菌落计数来证实接种物的活细胞浓度。在 7 日龄时 (注射 HVT 构建体后 6 天), 通过管饲 0.5ml (含有 10^6 cfu 沙门氏菌 / ml) 来口服感染动物。

[0032] 对于对沙门氏菌感染的抵抗力的分析, 在感染后 3、7、11 和 15 天时获取泄殖腔拭物。此外, 在第 15 天时, 将动物牺牲, 用于监控沙门氏菌在肝脏、脾脏和盲肠内含物中的定殖。通过如下所述的取样来确定实体器官 (肝脏和脾脏) 中的定殖 (cfu 定量)。

[0033] 用热的刮铲将肝脏、脾脏和盲肠的表面局部消毒。使用棉签将盲肠和泄殖腔取样。将该棉签直接接种于 +60 μ g/ml 萘啶酸 (BGAm+nal) 改良的亮绿琼脂上, 并在 37°C 下 16-24 小时富集后, 再次接种于 9ml 含有 60 μ g/ml 萘啶酸的缓冲蛋白胨水 (BPW+nal) 中。使用无菌一次性接种环, 将肝脏和脾脏接种于 BGAm+nal 上。将器官浸泡在沸水中, 加入 9ml BPW+nal, 在胃托中碾碎, 并在 37°C 下 16-24 小时富集后在 BGAm+nal 上培养。将泄殖腔擦拭物直接接种于 BGAm 上并在 37°C 下 16-24 小时富集后再次接种于 9ml BPW+nal 中。在 37°C 下 16-24 小时接种后, 对所有 BGAm 平板筛选怀疑是肠炎沙门氏菌的菌落 (红色菌落) 的存在。用 D₁-抗血清 (Difco Laboratories, Detroit, MI, 抗 -01, 9 和 12) 使怀疑的菌落凝集。以以下方式对激发菌株的重新分离半定量评分:

[0034] 直接接种后每个平板的 SE 菌落的数量:

[0035] > 100 = 6, 11-100 = 5, 1-10 = 4。

[0036] 富集后每个平板的 SE 菌落的数量：

[0037] > 100 = 3, 11-100 = 2, 1-10 = 1。

[0038] 禽流感感染和抵抗力测定

[0039] 使用常规程序在蛋中生产禽流感 A 亚型 H9N2 病毒（分离物 A/ 鸡 / 阿拉伯联合酋长国 / 99）。将含有病毒悬浮液的水相在 0.01M 磷酸盐缓冲盐水中稀释并用作激发材料。在 14 日龄（HVT 构建体注射后 13 天）时，通过喷雾途径用 $10E8.8$ EID₅₀/ml H9N2 病毒激发禽类。对于喷雾激发，将 10ml H9N2 病毒（ $10E8.8$ EID₅₀/ml）与等体积的盐水混合，并将所得到的 20ml 病毒悬浮液喷入隔离器中（隔离器容积： 0.79cm^3 ），使用带有压缩器的喷枪（1.5 大气压；平均液滴大小 $50\ \mu\text{m}$ ），使用封闭式空气环流。在 10 分钟后将空气环流重新打开。

[0040] 对于对禽流感的抵抗力的分析，监控禽类的临床呼吸体征并在激发后 7 天时进行评分。患有严重（明显）呼吸困难的禽类评分为阳性，其他评分为阴性。

[0041] 结果

[0042] 表达细胞因子的重组 HVT 的体外生物活性

[0043] 在每只动物实验前，使用 IL-12 活性标记之一，将所有批次的 HVT-ChIL-12 在体外测试生物活性；即，新鲜分离的脾细胞的增殖，如对于哺乳动物报道的和最近对于鸡报道的（Degen 等；The Journal of Immunology, 2004, 172 :4371-4380）。

[0044] 孵化后对沙门氏菌感染的抵抗力

[0045] 将 HVT-ChIL-12 降低对感染的敏感性的作用与空对照载体 HVT-PB1 相比较。对于每个组，测定沙门氏菌感染的动力学，如通过在感染后几个时间点的泄殖腔擦拭物中发现的 cfu 水平所反映的。如图 1 中所示，与空 HVT 载体（PB1）或盐水组引起的应答相比较时，HVT-ChIL-12 给予了明显（ $P < 0.05$ ）降低的定殖（大约 10-100 倍）。

[0046] 图 2 显示了 HVT-ChIL-12 明显（ $P < 0.05$ ）降低了肝脏（图 2A）和盲肠扁桃体（图 2B）中的定殖。

[0047] 孵化后对禽流感感染的抵抗力

[0048] 将 HVT-ChIL-12 降低对感染的敏感性的作用与空对照载体 HVT-PB1 相比较。如图 3 中所示的，与空 HVT 载体（PB1）或盐水组引起的应答相比较时，通过给药 HVT-ChIL-12 明显降低了激发后的临床呼吸体征。

[0049] 附图描述

[0050] 图 1. HVT-ChIL-12 在肠炎沙门氏菌感染过程中对泄殖腔擦拭物评分的影响。将感染后不同时间点的泄殖腔擦拭物中的 cfu 计数表示为平均 \pm SD。

[0051] 图 2. HVT-ChIL-12 在肠炎沙门氏菌感染过程中对定殖的影响。显示了感染后 15 天时肝脏 (A) 和盲肠 (B) 的定殖水平。

[0052] 图 3. HVT-ChIL-12 在禽流感感染过程中对临床体征的影响。显示了第 7 天时的阳性临床呼吸体征。

[0053] 结论

[0054] 这些观察在一起显示了 IL-12 通过 HVT 表达时作为安全的源自宿主的禽类对微生物感染敏感性的降低剂。该数据使得清楚：HVT 表达的 IL-12 可以用作抗生素预防性使用的替代品或用作对抗感染的疫苗接种的替代品。总体而言，使用新的构建体，可以制得明显

降低禽类对微生物感染的敏感性的药物,通常在发生这些微生物实际感染之前不需要给药相应微生物的抗原。因为新的构建体是基于 HVT,其固有地提供了对抗马立克氏病的保护。如果除了一般的对微生物感染的敏感性的降低,新构建体使用的目的是保护对抗马立克氏病,药物可以另外包含来自其他血清型 MDV 的抗原,如活减毒的血清型 1MDV,以提供较好的对抗 MD 的保护。如从 US 5,965,138 所知的,这些来自其他血清型 MDV 的抗原也可形成重组 HVT 自身的一部分。

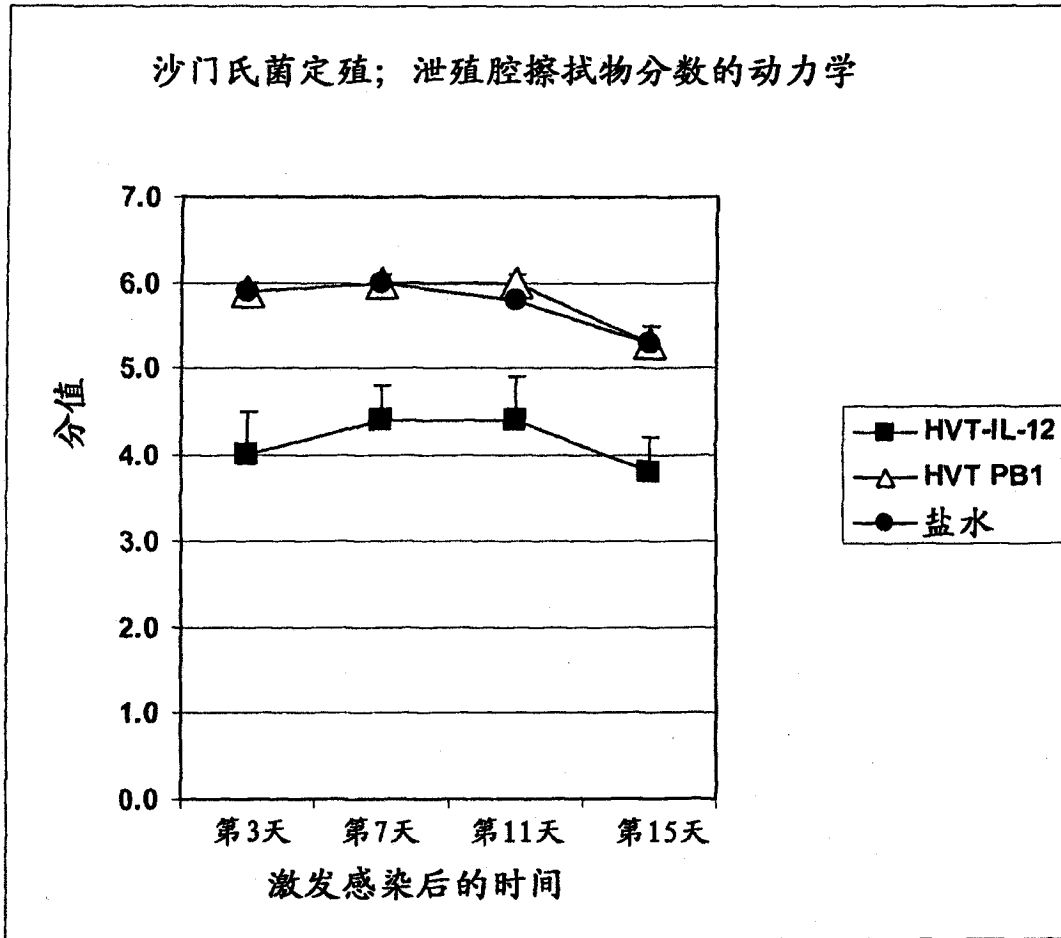


图 1

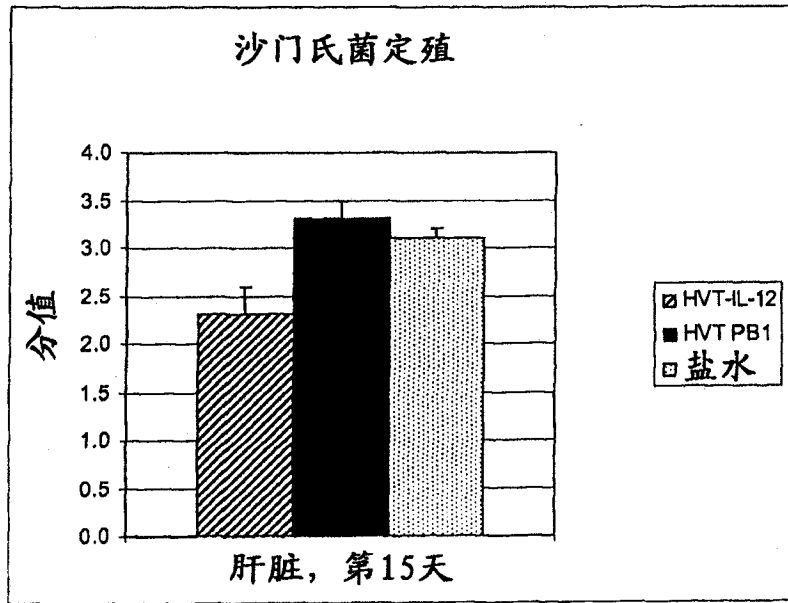


图 2A

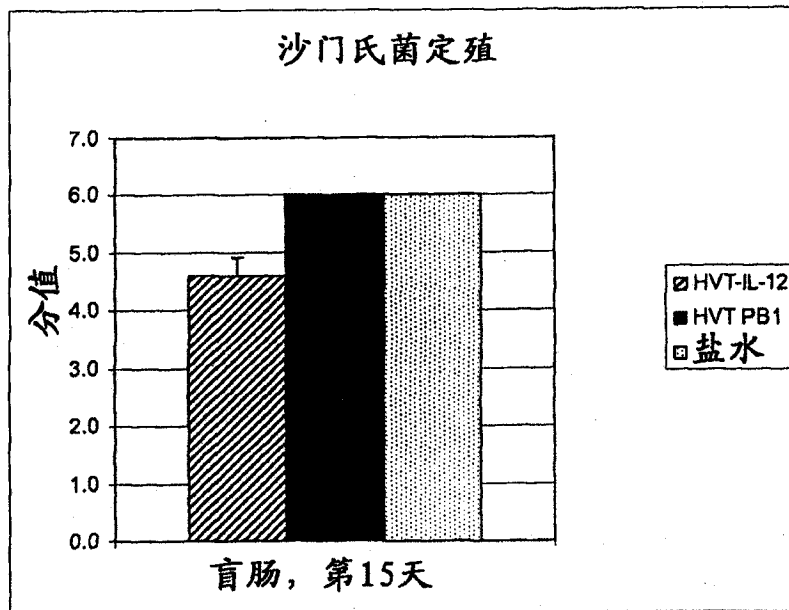


图 2B

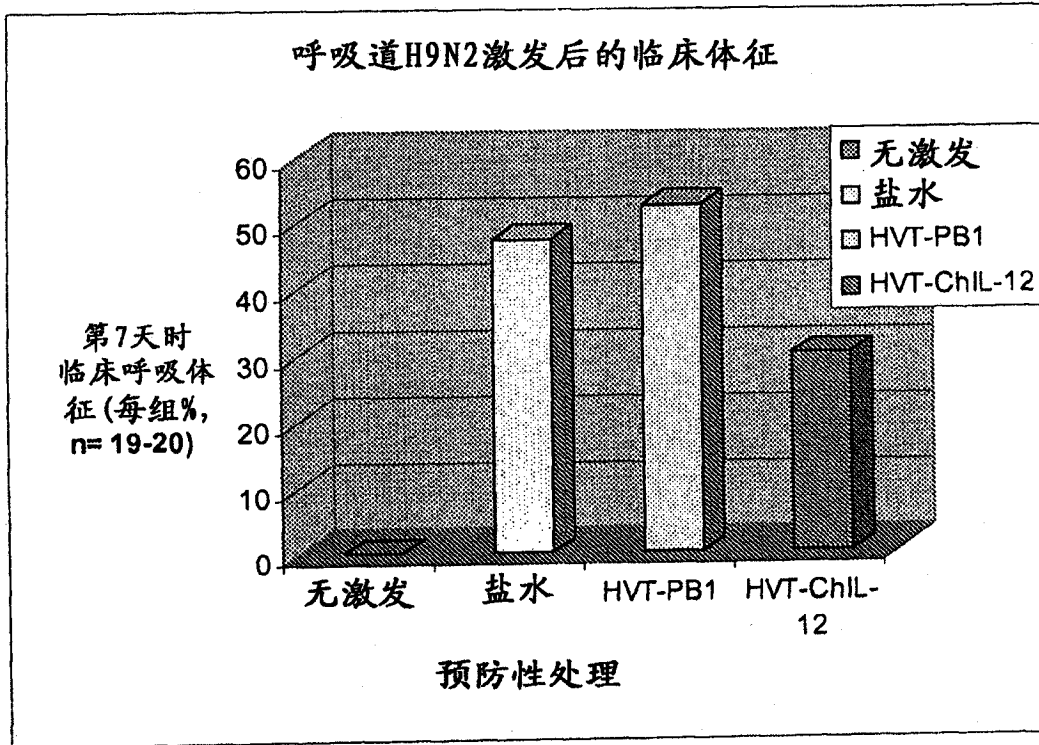


图 3