(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118139640 A
(43)申请公布日 2024.06.04

(21)申请号 202280071347.8
(22)申请日 2022.10.24
(30)优先权数据
21204364.0 2021.10.25 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.04.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/079532 2022.10.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/072805 EN 2023.05.04
(71)申请人 英特维特国际股份有限公司
地址 荷兰博克斯梅尔
(72)发明人 B·H·纳加拉杰 M·A·莫勒
R·P·A·M·西格斯
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平
(51)Int.Cl.
A61K 39/12(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图4页

(54)发明名称

保护仔猪抵抗甲型猪流感病毒感染的疫苗

(57)摘要

本发明涉及基于编码IAV-S的抗原的甲病毒RNA复制子颗粒(αRP)载体的疫苗用于被动疫苗接种仔猪以抵抗猪流感病毒的病原体感染的用途。

CN 118139640 A

1.一种包含免疫原和药学上可接受的载体的疫苗,其用于通过经由摄入来自用所述疫苗主动免疫的雌性猪的初乳或乳汁对仔猪的被动免疫保护所述仔猪免受甲型猪流感病毒(IAV-S)的病原体感染的方法中,其中所述免疫原为编码IAV-S的抗原的甲病毒RNA复制子颗粒(αRP)载体。

2.根据权利要求1所述的用途的疫苗,其特征在于,所述雌性猪是母猪或小母猪。

3.根据权利要求1或2所述的用途的疫苗,其特征在于,所述抗原是IAV-S血凝素(HA)蛋白。

4.根据前述权利要求中任一项所述的用途的疫苗,其特征在于,所述αRP载体编码两种或更多种不同的IAV-S抗原。

5.根据前述权利要求中任一项所述的用途的疫苗,其特征在于,所述疫苗包含编码不同IAV-S抗原的两种或更多种不同的αRP载体。

6.根据前述权利要求中任一项所述的用途的疫苗,其特征在于,一种或多种所述抗原是IAV-S毒株的抗原,所述IAV-S毒株属于选自由Scot/94H1N2、欧亚类禽H1N1、Gent1984 H3N2和2009大流行H1N1组成的组的谱系。

7.根据权利要求6所述的用途的疫苗,其特征在于,所述疫苗包含第一αRP载体和第二αRP载体,所述第一αRP载体编码选自由Scot/94H1N2、欧亚类禽H1N1、Gent1984 H3N2和2009大流行H1N1组成的组的两种谱系的IAV-S毒株的HA抗原,所述第二αRP载体编码该组的两种其它谱系的IAV-S毒株的HA抗原。

8.根据权利要求7所述的用途的疫苗,其特征在于,所述第一αRP载体编码所述谱系Scot/94H1N2和欧亚类禽H1N1的IAV-S毒株的HA抗原,并且所述第二αRP载体编码所述谱系Gent1984 H3N2和2009大流行H1N1的IAV-S毒株的HA抗原。

9.根据前述权利要求中任一项所述的用途的疫苗,其特征在于,所述药学上可接受的载体包括油-水乳液佐剂。

10.根据前述权利要求任一项所述的用途的疫苗,其特征在于,所述疫苗肌肉内施用。

11.根据前述权利要求中任一项所述的用途的疫苗,其特征在于,所述疫苗还包含大肠杆菌的抗原。

12.根据前述权利要求中任一项所述的用途的疫苗,其特征在于,所述疫苗还包含产气荚膜梭菌的抗原。

13.编码IAV-S的抗原的甲病毒RNA复制子颗粒(αRP)载体在疫苗制备中的用途,所述疫苗通过经由对雌性猪的主动免疫而对所述雌性猪的仔猪后代进行被动免疫来保护所述仔猪免受IAV-S的病原体感染。

14.一种通过用疫苗主动免疫雌性猪来被动免疫所述雌性猪的仔猪后代以抵抗IAV-S的病原体感染的方法,所述疫苗包含编码IAV-S的抗原的甲病毒RNA复制子颗粒(αRP)载体。

保护仔猪抵抗甲型猪流感病毒感染的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及甲型猪流感病毒(IAV-S)疫苗,其可用于通过雌性猪的主动免疫来被动免疫后代仔猪。

背景技术

[0002] 甲型流感病毒(IAV)在世界范围内对人类和动物的健康造成了重大负担。IAV基于其病毒表面糖蛋白、血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)被分类为不同的亚型。IAV感染家禽、猪、马、猫、狗、海洋哺乳动物(例如,鲸)、蝙蝠和人。野生水禽和滨鸟(鸭、鹅、天鹅和鸥)是天然携带者,并且它们可以感染16种不同的HA和9种不同的NA亚型(Webster等,Microbiol Rev 56:152-179,1992)。

[0003] 甲型猪流感病毒(IAV-S)是家养猪的严重呼吸道病原体,已证明其在全球范围内造成经济损失,特别是畜牧业(Holtkamp等,The American Association of猪Veterinarians Annual Meeting,2007)。该病毒的特征在于呼吸道疾病的突然发作,并且通常伴有厌食、嗜睡和发烧。除了与生产动物中的IAV-S相关的临床并发症之外,已经发表了多篇报道表示猪将流感病毒传播至人类(Myers等,Clin Infect Dis,2007;44(8),1084-8;Krueger和Gray,Curr Top Microbiol Immunol370:201-225,2013),这代表了重大公共卫生威胁,其为控制猪群中的IAV-S提供了更大的动机。

[0004] 为了应对这一问题,许多养猪户现在使用市售疫苗接种他们的猪以使其抵抗IAV-S。然而,用常规疫苗控制IAV-S是困难的,因为许多不同的IAV-S毒株在田间互相转染并继续进化(Gao等,J Gen Virol 98(8),2001-2010,2017)。IAV-S的多样性和可变性是由病毒的遗传结构引起的。与其它甲型流感病毒一样,IAV-S具有在八个RNA片段上编码的基因和引入频繁突变的基因组复制机制。这些遗传特征使得IAV-S能够进行快速适应,其中包括逃避由暴露于以前毒株诱导的现有中和抗体。

[0005] 甲型流感病毒的分类始于HA和NA的亚分型,HA和NA是病毒表面上的两种主要糖蛋白。HA蛋白介导病毒对于宿主细胞的附着和融合。神经氨酸酶是在流感病毒复制周期的最后阶段中发挥作用的酶,其通过裂解宿主细胞中新形成的病毒颗粒,从而使新的子代病毒能够传播并感染其它细胞。

[0006] 尽管人甲型流感在特定的流感季节通常具有全球内传播的1或2个主要毒株,但更多的IAV-S毒株同时互相转染,并且这些毒株具有地理区域差异。类似地,IAV-S毒株也是抗原性可变的,但主要包括HA的H1或H3亚型以及NA的N1或N2亚型。在IAV-S的每种HA和NA亚型内存在进一步的系统发生多样性。

[0007] 在美国的猪群中,存在四种主要的H1系统发育簇(γ、δ1、δ2、大流行),两种主要的H3簇(IV簇和类人簇),两种主要的N1簇(经典的、大流行)和两种主要的N2簇(N2-1998和N2-2002)。(参见,Anderson等,Influenza and other Respiratory Viruses 7(Suppl.4),42-51,2013;和Anderson等,mSphere 1(6)e00275-16:1-14(2016))。

[0008] 在欧洲,有三种主要的H1谱系(欧亚类禽、Scotland/410440/1994-like H1和大流

行),一种主要的H3谱系(Gent/1/1984-like H3),两种主要的N1谱系,两种主要的N2谱系和两种次要的N2谱系(Watson等,J.Virol.,89:9920-9931(2015);doi:10.1128/JVI.00840-15)。

[0009] 由于变体IAV-S病毒株的不断出现,市售的全病毒灭活疫苗通常不能抵抗新的和新出现的病毒亚型/簇,并且针对抗异亚型挑战仅提供有限的保护,因为抗原不匹配在该领域中传播的全部当代病毒株(Lee等,Can J Vet Res 71(3),207-12,2007;Vincent等,Vaccine28(15),2782-2787,2010)。因此,这种疫苗必须定期更新以匹配当前循环的毒株。

[0010] 预防仔猪感染疾病的常见策略包括用全病毒灭活疫苗接种产前怀孕母猪和/或仔猪后代。接种疫苗的怀孕雌性猪通过初乳和随后的乳汁将它们的保护转移至仔猪中(被动免疫)。实际上,仔猪的被动免疫可以获取自其雌性母本或从产仔前接种疫苗的不同雌性猪。初乳包含一组免疫系统成分以帮助仔猪存活,直到其产生自身的主动免疫。初乳中的抗体水平比乳汁中的抗体水平高60倍。这些抗体的约65-90%由IgG型组成,其提供全身保护。仔猪对这些IgG免疫球蛋白通的摄入不是选择性的;它们在初乳摄入后2小时出现在血浆中,并在12小时达到峰值。初乳的抗体谱和仔猪中诱导的被动保护取决于母猪暴露的抗原和抗原暴露与产仔之间的持续时间。在哺乳期间,IgG免疫球蛋白逐渐被IgA替代,其功能是保护仔猪的肠粘膜。大约36小时后,肠道停止对抗体和细胞的吸收,仔猪继续在它们的胃肠道中从乳汁中接受被动粘膜IgA抗体。

[0011] 在本领域中,除了全病毒灭活疫苗之外,还描述了用于猪的几种其它类型的疫苗(由Opriessnig等人综述,Porcine Health Management,2021,7)。广义上,这些疫苗可分为全病原体减毒活疫苗、嵌合(减毒活疫苗或灭活)疫苗、亚单位疫苗、活哺乳动物病毒载体(复制或复制缺陷型)疫苗和基于核酸的疫苗(DNA质粒或mRNA)。

[0012] WO2019/121513和WO2019/110481描述了复制缺陷型甲病毒RNA复制子颗粒载体用于仔猪抗IAV-S的主动疫苗接种的用途。

[0013] 本发明的一个目的是开发用于猪的新策略和疫苗,其可安全且有效地抵抗IAV-S的毒性挑战,并且可以快速改变以抗原性地匹配新出现的毒株。

发明内容

[0014] 为了满足本发明的目的,提供了包含免疫原和药学上可接受的载体的疫苗,其用于通过经由摄入来自用所述疫苗主动免疫的雌性猪的初乳或乳汁对仔猪的被动免疫保护所述仔猪免受甲型猪流感病毒(IAV-S)的病原体感染的方法中,其中所述免疫原为编码IAV-S的抗原的甲病毒RNA复制子颗粒(αRP)载体。

[0015] 直到断奶,仔猪针对局部病原体(例如猪流行性腹泻病毒(PEDV)、大肠杆菌、梭菌、细小病毒、PCV2、轮状病毒、TGE病毒)的保护主要是通过乳汁赋予的免疫(乳源性免疫)。这种免疫依赖于母猪诱导部位的免疫激活和活化的B细胞转移到乳腺中并局部产生分泌性IgA。在母猪中,免疫激活发生在具有肠道和乳腺之间的淋巴细胞再循环的GALT(肠道相关淋巴组织)中和具有呼吸系统和乳腺之间的B细胞再循环的BALT(支气管相关淋巴组织)中。

[0016] 为了在猪的局部粘膜中获得最佳的乳源性免疫,除了全身免疫之外,疫苗中的免疫抗原还必须主要通过作用于肠道的淋巴组织(“派伊尔结(Peyer’s patches)”)来刺激局部免疫。这导致恰好在粘膜组织表面层下例如在肠道和呼吸道中产生IgA。IgA穿过粘膜细

胞并附着于称为分泌成分的另一种分子。它被称为分泌性IgA,由通过分泌成分连接在一起的两个IgA抗体分子组成。这种组合增强了它们的效力,使它们抵抗肠道酶的消化,并且更容易被粘液吸收。因为粘液覆盖了肠道和呼吸道的整个内层,所以分泌性IgA充当抵抗潜在病原性感染的屏障。

[0017] 本发明来自意外的发现,尽管实验显示基于αRP载体的疫苗不能在仔猪中提供针对猪病原体的病原体感染的被动保护,所述猪病原体也在粘膜组织(例如IAV-S、PEDV)中局部复制(实施例3),相反,用基于αRP IAV-S载体的疫苗主动疫苗接种的母猪确实在母猪的仔猪中提供了被动保护(实施例2)。

附图说明

[0018] 图1.小母猪初乳、母猪血清和仔猪血清中的IAV-S血细胞凝集抑制(HI)滴度。在产仔时收集的母猪初乳(n=3)、产仔时收集的母猪血清(n=3)和1周龄时收集的仔猪血清(n=18-27)中测量的欧亚类禽(法国/53-130065)谱系IAV-S毒株特异性HI滴度(log2)。

[0019] 图2.挑战后3天测量仔猪的加权肺病变评分(平均值±SD)。平均值±SD基于14只(IAV-S RP+ColiClos IM)、16只(IAV-S RP XSolve50 IM)、16只(IAV-S RP XSolve50 ID)和15只(PBS+ColiClos IM)动物,每组属于三窝。在出生前6周和2周时对每组3只小母猪进行免疫接种,在4WOA时感染后代,并在感染后3天进行尸检以评估肺病变评分。

[0020] 图3.挑战后3天收集的仔猪肺组织的IAV-S滴度(平均值±SD)。平均值±SD基于14只(IAV-S RP+ColiClos IM)、16只(IAV-S RP XSolve50 IM)、16只(IAV-S RP XSolve50 ID)和15只(PBS+ColiClos IM)动物,每组属于三窝。在出生前6周和2周时对每组3只小母猪进行免疫接种,在4WOA时感染后代,并在感染后3天进行尸检以测量肺中的病毒载量。

[0021] 图4.用RP-PEDV或安慰剂免疫接种的母猪血清中的PEDV中和抗体滴度。使用针对细胞培养采用的PEDV毒株USA/Colorado/2013的FFN测定作为FFN滴度,测定PEDV中和滴度或血清中和滴度。DPV=疫苗接种后天数,DPF=产仔后天数。虚线以下的值被认为没有PEDV中和活性。

[0022] 图5.用RP-PEDV或安慰剂免疫接种的母猪生产的猪血清样品中的PEDV中和抗体滴度。使用针对细胞培养采用的PEDV毒株USA/Colorado/2013的FFN测定作为挑战当天(3-5天龄)收集的猪血清中的FFN滴度,测定PEDV中和滴度或血清中和滴度。

[0023] 图6.PEDV挑战引起的猪的死亡率百分比。被RP-PEDV或安慰剂接种的母猪生产的三至五日龄的猪被胃内接种10^6TCID50的PEDV/Colorado/2013挑战毒株,总体积为3mL/猪。记录每窝被感染猪的死亡率直到挑战后14天,每窝猪的死亡率百分比示于图中。

[0024] 定义

[0025] 疫苗是适用于施用于动物的组合物,其包含免疫学有效量的传染性病原体(infectious agent)的一种或多种抗原,通常与药学上可接受的载体组合,其在施用于动物后诱导保护动物抵抗传染性病原体的病原体感染的免疫应答。

[0026] 针对传染性病原体的病原体感染的保护或抵抗传染性病原体的病原体感染是指在动物中实现保护性免疫,即旨在例如通过减少动物中病毒复制的次数或持续时间、通过缩短或减少组织病变的数量、强度或严重性或通过预防一种或多种临床症状来预防、改善或治愈由该传染性病原体的感染引起的副作用。

[0027] 家猪或猪是指猪科的任何动物,特别是指猪属的动物,例如:野生或家养猪、野猪、鹿豚(babirusa)巴贝虫或疣猪(warthog)。

[0028] 仔猪是雌性猪的幼小后代。

[0029] 母猪是已经生产过一窝仔猪的成年雌性猪。

[0030] 小母猪是还未生产过一窝产仔的年轻雌性猪。

[0031] 初乳是每窝仔猪后由母猪或小母猪生产的第一乳汁。

[0032] 本文所用的主动免疫是猪的身体暴露于外源抗原后,刺激猪的免疫系统,导致抗体和免疫细胞的产生。抗原可以是传染性病原体的形式、病原体的灭活形式或病原体的免疫原性成分。

[0033] 本文所用的被动免疫涉及通过摄取初乳以及优选地随后的乳汁,将雌性猪的免疫力(抗体和/或免疫细胞)转移至新生仔猪后代。实际上,仔猪后代的被动免疫可以获取自其雌性母本或从产仔前接种疫苗的不同雌性猪。

[0034] 甲病毒属是RNA病毒属,其属于披膜病毒科(Togaviridae family),它们是小的、球形的、有包膜的正义ssRNA病毒(Fields Virology:Emerging Viruses,authors:Howley,Knipe and Whelan,ISBN/ISSN 9781975112547,2020)。

[0035] 如本文所用,术语甲病毒RNA复制子颗粒(αRP)是包含经修饰的RNA病毒基因组的甲病毒样颗粒,所述经修饰的RNA病毒基因组缺乏结构蛋白的一个或多个编码序列,如果它们存在,则能够使亲本病毒在细胞培养物或动物宿主中成功增殖,被包装在病毒结构蛋白例如衣壳和糖蛋白中,所述病毒结构蛋白也来源于甲病毒,例如Pushko等,(Virology 239,389-401,1997)所描述。因此,αRP能够进入动物的宿主细胞并进行一轮病毒基因组扩增当不具有形成新颗粒的能力。复制子颗粒不繁殖于感染的细胞中,因为它缺乏必需的结构蛋白编码序列颗粒(还参见:Vander Veen等,2012,Anim.Health.Res.Rev.,vol.13,p.1-9;和Kamrud等,2010,J.Gen.Virol.91,1723-1727)。

[0036] 一些甲病毒种已经用于开发基于αRP的疫苗,例如:委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)(Pushko等,1997,Virology 239,389-401),辛德比斯病毒(Bredenbeek等,1993,J.of Virol.67,6439-6446)和塞姆利基森林病毒(Liljestrom和Garoff,1991,Biotechnology 9,1356-1361)。

[0037] αRP载体包含插入至病毒基因组中的编码目标抗原的异源核酸分子。编码包含在αRP载体中的抗原的核酸分子的转录和翻译导致抗原在用αRP载体感染的细胞中表达但不产生子代,并且以此方式使异源抗原被递送至受感染动物的免疫系统并表达。核酸分子可以包含开放阅读框(ORF)或编码完整蛋白质的完整基因,或者可以是编码蛋白质片段的片段。编码抗原的核酸分子可从甲病毒亚基因组启动子(例如26S甲病毒亚基因组启动子)转录和表达。可通过包装细胞系的结构蛋白的表达或通过将复制子RNA和编码结构蛋白的一种或多种“辅助”RNA共转染到合适的宿主细胞中,将转录的复制子RNA包装到RP中。

[0038] αRP载体可包含插入其基因组中的编码相同或不同目的抗原的两种或更多种异源核酸分子。这可以通过多种方式实现。例如,这类αRP载体可以编码多顺反子阅读框,或者可以编码单独的基因,例如通过使用亚基因组启动子的一个或多个另外的拷贝以允许单独的其他蛋白质的表达。

[0039] αRP载体可以是已经是可获得的,例如以下提及的可商购的基于VEEV的αRP载体,

可以使用众所周知的技术通过将编码抗原的异源核酸分子引入病毒复制子主链中来产生载体。

[0040] 如本文所用,IAV-S的抗原是能够在猪中诱发免疫应答的蛋白质或其片段,所述免疫应答保护动物抵抗IAV-S的病原体感染。

[0041] IAV基因组由编码至少12种蛋白质的8个片段组成。这些蛋白质中的三种被引入病毒的包膜:病毒血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)和基质2(M2)蛋白。基于HA和/或NA的疫苗能够对猪提供保护性免疫。HA蛋白负责流感病毒病毒体与宿主细胞的结合。IAV-S NA蛋白的功能是裂解宿主细胞上的唾液酸,以允许新制备的病毒体从感染细胞中有效释放。跨膜基质2(M2)蛋白是质子选择性离子通道,并且是甲型流感病毒有效脱壳所需的(参见,Sandbulte等,Vaccines 2015,3,22-73;doi:10.3390and Aguilar-Yáñez等,PLOS ONE 2010;doi.org/10.1371/journal.pone.0011694)。

[0042] IAV-S蛋白抗原的氨基酸和核苷酸序列可容易地从公众可获得的文献和序列数据库获得,例如从NCBI(流感数据库)、流感研究数据库(IRD)或基因库(GB)获得。

[0043] 本发明中使用的IAV-S抗原可以是任何IAV-S(亚)型、系统发育分支、簇、谱系、毒株等。

[0044] 如本文所用,术语谱系是指一组流感病毒血凝素或神经氨酸酶,它们在进化树中(在同一枝条上)分组在一起,所述进化树发根回相似(同源)祖先。已经对欧洲血凝素和神经氨酸酶进行了这些分组,并且这些分组与美国病毒的系统发育分支相似,但不等同。使用容易获得的软件,即Clustal Omega(Sievers等,2011,Mol.Syst.Biol.7,539)或用于H1 HA序列的网络可访问注释工具(Anderson等,mSphere,2016,1(6):e00275-16),通过使用预先建立的参考序列对有问题的HA或NA序列进行系统发育分析可以获得谱系测定。在欧洲,有三种主要的H1谱系(欧亚类禽、Scotland/410440/1994-like H1和2009大流行-like H1),一种主要的H3谱系(Gent/1/1984-like H3),两种主要的N1谱系(欧亚类禽-like N1、2009大流行-like N1),两种主要的N2谱系(Gent/1/1984-like N2、Scotland/410440/1994-like N2)和两种次要的N2谱系(Italy/4675/2003like N2、Human seasonal like N2)。用于评估分类的IAV-S分类规则和工具被描述于Watson等,(J.Virol.,89,9920-9931,2015,doi:10.1128/JVI.00840-15)、https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00275-16和https://www.fludb.org/brc/h1CladeClassifier.spg?method=ShowCleanInputPage&decorator=influenza。

[0045] 药学上可接受的载体是生物相容的介质,即在施用后在所治疗的受试者中不诱导显著的不良反应,在施用包含载体的组合物后能够将抗原呈递给动物的免疫系统的介质。这类药学上可接受的载体可以是例如含有水和/或任何其它生物相容性溶剂的液体或附体猜题,例如通常用于获得冻干疫苗(基于糖和/或蛋白质)的固体载体,任选地包含佐剂。

[0046] 佐剂是能够对动物的免疫系统提供非特异性刺激的化合物或组合物。佐剂通常用于基于灭活抗原或亚单位抗原的疫苗中。存在多种佐剂类型和组合物,例如:铝盐如氢氧化铝或磷酸铝,脂质体,葡聚糖,藻酸盐,细菌组分如细胞壁组分,矿物油或非矿物油的油-水乳液,合成佐剂例如:非离子嵌段聚合物,多胺如硫酸葡聚糖,Carbopol™、吡喃和皂苷如:Quil A™或Qvac™。皂苷和疫苗组分可以组合在ISCOM™中。此外,肽例如胞壁酰二肽、二甲基甘氨酸、吞噬素(tuftsin)通常用作佐剂。类似地,组合产品如ISA™组合物(Seppic,

France)。

[0047] 关于助剂的更多详细信息,它们的用途和效果可以在手册中找到:Vaccine adjuvants(Methods in molecular medicine,vol.42,D.O'Hagan ed.,2000,Humana press,NJ,ISBN:0896037355)。关于用于猪的佐剂的详细综述,请参见Charerntantanakul W.,Vaccine,2020;38(43),6659-81。

[0048] 本发明的其它实施方案

[0049] 在根据本发明的用途的疫苗的一个实施方案中,αRP是委内瑞拉马脑炎(VEE)αRP。在更具体的实施方案中,αRP是TC-83VEEαRP。VEE TC-83αRP的产生例如被描述于US 9,441,247和US 8,460,913。基于VEE的αRP疫苗也是几种USDA许可的疫苗的基础,其中包括:猪流行性腹泻疫苗、RNA(产品代码19U5.P1)、猪流感疫苗、RNA(产品代码19A5.D0)、禽流感疫苗、RNA(产品代码1905.D0)和处方产品,RNA颗粒(产品代码9PP0.00)。

[0050] 在如上所述的用途的疫苗的优选实施方案中,雌性猪是母猪或小母猪。

[0051] 在另一个实施方案中,雌性猪被疫苗接种两次。疫苗接种雌性动物两次可增加通过摄取初乳最终到达仔猪的抗体水平,并且这种策略在每天饲养成年动物的实践中不会造成严重问题。在这种两次给药方案中,第一次(初次)疫苗接种通常在预期分娩前5-8周施用,3-4周后通过第二次疫苗接种加强。

[0052] 在另一个优选的实施方案中,雌性猪在怀孕时被免疫。

[0053] 尽管可以预见,为了将抗体水平(连续地)保持在足够的高度,雌性猪可以在怀孕之间接受足够的疫苗接种,但是已经表明在怀孕期间对动物进行疫苗接种(至少一次)是有用的。特别地,已经表明在分娩前5-8周对怀孕的雌性猪进行疫苗接种,然后进行加强免疫接种是有用的,特别是在预期分娩前2-6周,两种情况下通常在预期分娩前至少1或3周接受疫苗。

[0054] 对于在先前妊娠期间已疫苗接种过的雌性猪,可在预期分娩前1至4周进行单次的再疫苗接种。

[0055] 在另一个优选的实施方案中,如上所述的用途的疫苗中由αRP载体编码的IAV-S的抗原是HA抗原。本文的实施例证实了IAV-S的HA抗原可以有利地用于疫苗以通过主动接种在雌性猪中诱发强的血凝素抑制(HI)抗体应答,从而在怀孕的雌性猪的血清和初乳中产生高水平的这些抗体。这些HI抗体被动转移到它们的后代仔猪中,在仔猪血清中达到高水平的(全身)HI抗体滴度。重要的是,母源性抗体还能够在仔猪的肺中诱导局部保护,如通过肺中的病毒载量和肺病变(乳源性免疫)均降低所证明的。

[0056] 在本发明的背景下,可以使用任何IAV-S的HA抗原,如本领域中公开的那些,例如在提供大量IAV-S HA抗原的氨基酸序列和编码这类HA抗原的核苷酸序列的公众可获得的序列数据库(例如,NCBI(流感数据库)、流感研究数据库(IRD)或基因库(GB))。

[0057] IAV-S HA的四种主要谱系的任何一种的HA抗原是特定目标。这些谱系被称为Scot/94H1N2、欧亚类禽H1N1、Gent1984 H3N2和2009大流行H1N1(Watson等,J.Virol.,89,9920-9931,2015,doi:10.1128/JVI.00840-15)。如上所述的用途的疫苗可包含来自任何这些谱系的HA抗原。

[0058] Scot/94谱系的HA抗原可以是任何毒株,例如来自毒株A/猪/意大利/3033-1/2015(H1N2)或A/猪/法国/35-140041(H1N2)。在一个优选的实施方案中,Scot/94谱系的HA抗原

来自毒株A/猪/意大利/3033-1/2015(H1N2)。

[0059] 在另一个优选的实施方案中,HA抗原包含与Scot/94参照毒株A/猪/意大利/3033-1/2015(H1N2):GB#ALX30160.1的HA抗原具有至少90%,优选至少93%,更优选至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0060] EA谱系的HA抗原可以是任何毒株,例如来自毒株A/猪/丹麦/101048-2/2011(H1N1)、A/猪/意大利/28762-3/2013(H1N1)或A/猪/法国/44-120070/2012(H1N1)。在一个优选的实施方案中,EA谱系的HA抗原来自毒株A/猪/意大利/28762-3/2013(H1N1)。

[0061] 在另一个优选的实施方案中,HA抗原包含与EA参照毒株A/猪/意大利/28762-3/2013(H1N1):GB#AKJ81667.1的HA抗原具有至少90%,优选至少93%,更优选至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0062] Gent/84谱系的HA抗原可以是任何毒株,优选毒株A/猪/意大利/240849/2015(H3N2)。

[0063] 在另一个优选的实施方案中,HA抗原包含与Gent/84参照毒株A/猪/意大利/240849/2015(H3N2):GB#ALX30415.1的HA抗原具有至少90%,优选至少93%,更优选至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0064] pdm09谱系的HA抗原可以是任何毒株,优选毒株A/猪/英格兰/373/2010(H1N1)。

[0065] 在另一个优选的实施方案中,HA抗原包含与pdm09参照毒株A/猪/英格兰/373/2010(H1N1):GB#AFR76205.1的HA抗原具有至少90%,优选至少93%,更优选至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0066] 在特别优选的实施方案中,本文使用的IAV-S的HA抗原是表1(下文)中描述的任何HA抗原。

[0067] 在一个实施方案中,本发明还提供了如上所述的用途的疫苗,其特征在于所述疫苗包含至少一种αRP载体,其编码两种或更多种不同的IAV-S的抗原,特别是不同的HA抗原,更优选来自不同谱系的HA抗原,甚至更优选属于选自下组的谱系的IAV-S毒株的不同的HA抗原:Scot/94H1N2、欧亚类禽H1N1、Gent1984 H3N2和2009大流行H1N1。

[0068] 在该实施方案的更具体的形式中,疫苗包含第一αRP载体和第二αRP载体,所述第一αRP载体编码选自属于Scot/94H1N2、欧亚类禽H1N1、Gent1984 H3N2和2009大流行H1N1的组的两种谱系的IAV-S毒株的HA抗原,所述第二αRP载体编码属于该组的两种其它谱系的IAV-S毒株的HA抗原。特别地,所述疫苗包含第一αRP载体和第二αRP载体,所述第一αRP载体编码属于谱系Scot/94H1N2和欧亚类禽H1N1的IAV-S毒株的HA抗原,并且所述第二αRP载体编码属于谱系Gent1984 H3N2和2009大流行H1N1的IAV-S毒株的HA抗原。

[0069] 在如上所述的根据本发明所述的用途的疫苗的另一个有利的实施方案中,药学上可接受的载体包括油-水乳液佐剂。实施例证实了,疫苗中作为抗原的药学上可接受的载体的油-水乳液佐剂的存在对雌性猪和其仔猪后代中HI抗体滴度的产生具有积极作用。

[0070] 乳液可以是油包水(W/O)乳液,其中油是连续的外相。优选地,乳液是水包油(O/W)乳液,其中油是分散的内相。通过选择合适的乳化剂的种类和浓度,可以使用标准乳化技术形成和稳定维持这类乳液(参见,"Remington:the science and practice of pharmacy",2000,Lippincot,USA,ISBN:683306472),和Veterinary Vaccinology,Pastoret et al.ed.,1997,Elsevier,Amsterdam,ISBN 0444819681)。

[0071] 当呈优选的O/W乳液形式时,油-水乳液佐剂促进乳液与αRP载体的混合。例如,通过将包含αRP载体的水性或冻干组合物与O/W乳液混合。然后简单手摇约1分钟足以适当地混合两种含水组合物。

[0072] 在一个更具体的实施方案中,油-水乳液佐剂可包含矿物油或非矿物的可生物降解的油。优选地,矿物油是液体石蜡(例如CAS号:8042-47-5,一般为Drakeol® 6VR(Penreco)、Marcol® 52(Exxon Mobile)和Klearol®(Sonneborn))。优选地,非矿物的可生物降解的油选自下组:角鲨烷、角鲨烯、维生素E、维生素E-乙酸酯、油酸酯和油酸乙酯,最优选维生素E-乙酸酯。

[0073] 在另一个实施方案中,油-水乳液佐剂包含两种或更多种矿物油和/或非矿物的可生物降解的油,优选所述油-水乳液佐剂包含液体石蜡油和维生素E-乙酸酯。

[0074] 在如上所述的用途的疫苗中有用的佐剂的实例是以下专有的O/W佐剂:(micro)Diluvac Forte™(基于乙酸dl-α-生育酚的W/O乳液)、XSolve™(两种O/W乳液佐剂组分的组合:基于维生素E乙酸酯的Diluvac Forte(参见EP382.271)和基于液体石蜡油的Microsol™(参见WO2009/144,088)、SVEA™(角鲨烷和维生素E-乙酸酯的W/O乳液,WO2018/115.435)和ImpranFLEX™(油包水佐剂)。

[0075] 根据本发明所述的用途的疫苗包含免疫有效量的油乳液佐剂,其增强由疫苗抗原诱发的免疫应答。在一个实施方案中,疫苗包含油乳液佐剂,其量为疫苗的约10%-90%v/v。更优选地,疫苗包含油佐剂,其量为疫苗的约20%-80%v/v、30-70%v/v或甚至40-60%v/v。最优选地,疫苗包含油佐剂,其量为疫苗的约50%v/v。

[0076] 如上所述的用途的疫苗包含免疫有效量的αRP载体,从而保护仔猪后代免受IAV-S的病原体感染。在一个实施方案中,疫苗包含约1x 10^3至约1x 10^11RP。在更具体的实施方案中,疫苗包含约1x 10^4至约1x 10^10RP。在甚至更具体的实施方案中,疫苗包含约1x 10^5至约1x 10^9RP。

[0077] 在另一个实施方案中,如上所述的用途的疫苗以0.05ml至3ml的剂量施用。在更具体的实施方案中,施用的剂量为0.1ml至2ml。在更具体的实施方案中,施用的剂量为0.2至2ml。

[0078] 本发明还提供了如上所述的用途的抗多种猪病原体的疫苗。例如,疫苗可包含除IAV-S病毒和/或细菌猪病原体之外的另外的、灭活的、减毒的或亚单位抗原。此类猪病原体的实例包括猪繁殖和呼吸综合征病毒(PRRS)、猪环状病毒(PCV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGE)、猪伪狂犬病病毒(PPRV)、猪细小病毒(PPV)、猪轮状病毒(PRV)、猪流行性腹泻病毒(PED)、多种血清型的多杀巴斯德氏菌、沙门氏菌属(Salmonella spp.)、大肠杆菌,例如(血清型K99、K88、987P或F41)、副猪嗜血菌、胞内劳森氏菌(Lawsonia intracellularis)、支原体属(例如,猪肺炎支原体(Mycoplasma hyopneumoniae))、支气管炎博德特菌(Bordetella bronchiseptica)、丹毒菌属(Erysipelas spp.)、弯曲杆菌属(Campylobacter spp.)、胸膜肺炎放线杆菌(Actinobacillus pleuropneumoniae)、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)和艰难梭菌(Clostridium difficile)。

[0079] 在一个特别优选的实施方案中,疫苗另外包含大肠杆菌和产气荚膜梭菌的抗原。

[0080] 在根据本发明所述的用途的疫苗的另一个实施方案中,疫苗通过猪的疫苗接种的常规途径施用。特别地,通过肠胃外施用的方式。这包括皮下、肌肉内和皮内注射,优选肌肉

内注射。

[0081] 在另一个方面,本发明提供了编码IAV-S的抗原的甲病毒RNA复制子颗粒(αRP)载体在疫苗制备中的用途,所述疫苗通过经由对雌性猪进行的主动免疫而对所述雌性猪的仔猪进行被动免疫来保护所述雌性猪的仔猪后代免受IAV-S的病原体感染。该方面的全部(组合)特征如上所述。

[0082] 在另一个方面,本发明提供了通过用疫苗主动免疫雌性猪来被动免疫所述雌性猪的仔猪后代以抵抗IAV-S的病原体感染的方法,所述疫苗包含编码IAV-S的抗原的甲病毒RNA复制子颗粒(αRP)载体。该方面的全部(组合)特征如上所述。

[0083] 现在将使用以下具体的实施例进一步阐述本发明。

实施例

[0084] 实施例1基于HAαRP载体的IAV-S疫苗的制备

[0085] 1.多HA基因αRP载体的产生。

[0086] 如先前所描述的(U.S.9,441,247、U.S.8,460,913、WO 2019/121513和WO2019110481)以及以下修改来构建用于表达HA和NA基因的VEE复制子载体。用限制性内切酶AscI和PacI消化TC-83来源的复制子载体“pVEK”。对于双基因HA构建体,选定的开放阅读框序列被密码子优化并与两侧的AscI和PacI位点合成。此外,两个合成的HA开放阅读框之间的间隙序列由非编码异源序列的47个核苷酸和天然TC-83亚基因组(sg)RNA启动子和5’非翻译sgRNA区域序列的第二拷贝组成。将这些双基因构建体称为“pVDG”,以区分它们和具有单个sgRNA启动子序列的亲本载体。

[0087] 构建以下复制子颗粒:

[0088] 表1.RNA颗粒、HA来源毒株、谱系、分支和GenBank#)

[0089]

RP 代码	RP 供体毒株	谱系	分支	登记号#
EUH1-1	A/猪/丹麦/10802-1/2012(H1N2)	欧亚类禽(EA)	1C.2 样	AKC43997.1
EUH1-2	A/猪/丹麦	欧亚类禽(EA)	1C.2	AKC43996.1

[0090]

	/10-1048-2/2011(H1N1)			
EUH1-3	A/猪/意大利/28762-3/2013(H1N1)	欧亚类禽(EA)	1C.2.1	AKJ81667.1
EUH1-4	A/猪/法国/29-120326/2012(H1N1)	欧亚类禽(EA)	1C.2.1	AKJ82257.1
EUH1-5	A/猪/法国/44-120070/2012(H1N1)	欧亚类禽(EA)	1C.2.1	AIL24876.1
EUH1-13	A/猪/法国/56-140048-2014(H1N1)	欧亚类禽(EA)	1C.2.1	AJW32121.1
EUH1-9	A/猪/Moeglingen/IDT14859/2012(H1N2)	2009 大流行(pdm09)	1A.3.3.2	AGG86840.1
EUH1-11	A/猪/英格兰/373/2010(H1N1)	2009 大流行(pdm09)	1A.3.3.2	AFR76205.1
EUH1-12	A/猪/意大利/290271/2009(H1N1)	2009 大流行(pdm09)	1A.3.3.2	ADA70669.1
EUH1-8	A/猪/英格兰/9953/2012(H1N2)	苏格兰 1994-分支 1(Scot94-1)	1B.1.1	AKJ81533.1
EUH1-6	A/猪/意大利/186822/2011(H1N2)	苏格兰 1994-分支 2(Scot94-2.2)	1B.1.2.2	AGR45140.1
EUH1-17	A/猪/意大利/3033-1/2015(H1N2)	苏格兰 1994-分支 2(Scot94-2.2)	1B.1.2.2	ALX30160.1
EUH1-7	A/猪/法国/22-130212/2013(H1N2)	苏格兰 1994-分支 3(Scot94-2.3)	1B.1.2.3	AHI43247.1
EUH1-15	A/猪/法国/35-140041/2014(H1N2)	苏格兰 1994-分支 3(Scot94-2.3)	1B.1.2.3	AIL24895.1

[0091]

EUH3-1	A/猪/荷兰/Ysselsteyn-CVI8864A/2012(H3N2)	Gent 1984 (Gent/84)	3.1970.1	AKJ83041.1
EUH3-2	A/猪/比利时/Glabbeek-284/2012(H3N2)	Gent 1984 (Gent/84)	3.1970.1	AKJ82900.1
EUH3-3	A/猪/西班牙/33936/2012(H3N2)	Gent 1984 (Gent/84)	3.1970.1	AKJ83006.1
EUH3-4	A/猪/意大利/240849/2015(H3N2)	Gent 1984 (Gent/84)	3.1970.1	ALX30415.1
EUSIV-K	A/猪/意大利/240849/2015(H3N2)/ A/猪/英格兰/373/2010(H1N1)	Gent1984 /2009 大流行	3.1970.1/ 1A.3.3.2	ALX30415.1/ AFR76205.1
EUSIV-T8	A/猪/意大利/3033-1/2015(H1N2)/ A/猪/意大利/28762-3/2013(H1N1)	Scot94-2.3/EA	1B.1.2.2/ 1C.2.1	ALX30160.1/ AKJ81667.1

[0092] αRP载体EUSIV-K和RP EUSIV-T8用于测定包含两个双HA RP的多价IAV-S疫苗的免疫原性和效力。

[0093] 2.基于αRP载体的疫苗的制备。

[0094] 将溶于含有酚红的PBS 0.01M中的RP颗粒(批号RP EUSIV-K和RP EUSIV-T8)与X-Solve®佐剂(21%v/v不可代谢的油Marcol®52和1.25%v/v可代谢的油维生素E乙酸酯的O/W乳液,购自MSD Animal Health,Boxmeer,荷兰)或Micro Diluvac Forte®佐剂(7.5%v/v可代谢的油维生素E乙酸酯的O/W乳液)在Porcilis®ColiClos疫苗(购自MSD Animal Health,Boxmeer,荷兰)中以1:1(v/v)混合。Porcilis®ColiClos疫苗包含多种大肠杆菌抗原(F4ab/F4ac/F5/F6菌毛粘附素)和产气荚膜梭菌的LT类毒素抗原。

[0095] 实施例2仔猪抵抗流感病毒的乳源性/被动免疫保护

[0096] 本实验评估了由与50%(v/v)Xsolve佐剂或Porcilis®ColiClos疫苗(micro Diluvac Forte®佐剂)混合的多基因IAV-S HA RNA颗粒诱导的仔猪抵抗甲型流感病毒的乳源性免疫保护。

[0097] 研究设计

[0098] 预期生产8至10只仔猪的12只非常健康的怀孕小母猪(先前未针对C型产气荚膜梭菌和/或大肠杆菌进行过免疫接种,且不具有抗IAV-S的抗体/具有抗IAV-S的低抗体水平)购自合适的商业农场。小母猪在产仔前6周和2周时进行皮内(i.d.)或肌肉内(i.m.)疫苗接种($5*10^6$RP/剂量/RP)。表1。在产仔前6周和2周(WPF)以及产仔当天收集来自全部小母猪的血液样品,以测定抗原特异性HI滴度。此外,在产仔当天收集初乳样品,在产仔后3天收集乳

汁样品。

[0099] 仔猪:在大约1周龄(WOA)(90)和挑战当天(88)收集全部仔猪的血液样品以测定抗原特异性HI滴度。一旦仔猪到达约4WOA,它被气管内(i.t.)接种IAV-S挑战毒株A/猪/法国/53-130065/2013(H1N1),(5mL PBS中,10^5TCID50/猪)。每窝仔猪最多挑战10只。在挑战当天(即0天)和挑战后1、2和3天从猪处收集鼻拭子以确定病毒脱落。

[0100] 一部分仔猪(24)在挑战后24小时进行尸检,另一部分(61)在挑战后72小时进行尸检。在尸检时,对肺病变进行评分,并从每只猪处收集6份肺部样品(左颅、中叶和尾叶各一份,以及3个相应的右肺叶各一份)以测量肺部里面的病毒载量。

[0101] 表2.实验组

[0102]

组	仔猪数量	产仔日期的仔猪数量	疫苗(产仔前6周和2周)	O/W乳液佐剂	施用
1	3	22	IAV-S RP + ColiClos	μDF	2 mL/i.m.
2	3	33	IAV-S RP	XSolve50	2 mL/i.m.
3	3	20	IAV-S RP	XSolve50	200 μl/i.d.
4	3	22	PBS + ColiClos	μDF	2 mL/i.m.

[0103] 实验步骤。

[0104] 1.血清和初乳中的IAV-S HI抗体滴度。

[0105] 通过监测接种疫苗的猪的血清中的HI滴度来测试两种双HA基因RP的体内功能性。在HI试验中使用来自与HA-RP具有>85%氨基酸同一性的四种IAV-S谱系的代表性IAV-S毒株。除了谱系和毒株名称,表2中列举了用于定量HI滴度的IAV-S毒株与相应疫苗组分的分支分类和氨基酸同一性百分比。通过标准程序的HI试验测定猪血清样品中的IAV-S特异性抗体。简言之,用高碘酸盐预处理血清以去除非特异性抑制剂。随后,将预处理的血清连续稀释两倍并用流感病毒株孵育(表2)。孵育步骤后,加入鸡红细胞,孵育并读取平板的凝集抑制。将完全抑制红细胞凝集的最高血清稀释度的倒数指定为HI滴度并以log base2值表示。

[0106] 表3.HI测试中使用的异源IAV-S毒株

[0107]

RP编号	HA序列毒株	用于HI测定的毒株	分支(fludb)	%同一性
EUH1-3	A/猪/意大利/28762-3/2013(H1N1)	A/猪/法国/53-130065/2013(H1N1)	1C.2.1	97.0
EUH1-17	A/猪/意大利/3033-1/2015(H1N2)	A/猪/法国/22-130212/2013(H1N2)	1B.1.2.3	91.7
EUH1-11	A/猪/英格兰/373/2010(H1N1)	A/猪/Mn/A01483170/2014(H1N1 pdm)	1A.3.3.2	97.5
EUH3-4	A/猪/意大利/240849/2015(H3N2)	A/猪/比利时/113/2013(H3N2)	3.1970.1	97.5

[0108] 2.血清和初乳中抗大肠杆菌的抗体滴度。

[0109] 根据标准程序,通过ELISA测定血清中抗疫苗中的大肠杆菌抗原(K88ab、K88ac、K99、987P和LT类型)的抗体滴度。

[0110] 3.血清和初乳中抗产气荚膜梭菌的抗体滴度。

[0111] 根据标准程序,通过ELISA测定血清中抗产气荚膜梭菌C型毒素的抗体滴度。

[0112] 4.临床样本中的病毒定量。

[0113] 通过连续稀释原始鼻拭子和20%肺组织匀浆样品来测试鼻拭子和肺组织的感染滴度。测试每只动物的两份肺部匀浆(其中一份是通过等量合并从左颅、中叶和尾叶收集的样品来制备,另一份是通过从相应的右肺叶处收集的样品来制备)。简言之,用IAV-S感染培养基将样品连续稀释10倍。将每份稀释液接种至融合MDCK单层的三个重复孔中。将板在37℃、5% CO_2下孵育4天,并通过血细胞凝集检测上清液中病毒的存在。使用Spearman-Kärber方法计算IAV-S滴度,并以$\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL表示。

[0114] 5.肉眼可见的肺评分。

[0115] 基于每个肺叶的异常肺组织的百分比对指示猪流感的肉眼可见的肺病变进行评分,并且根据肺叶的相对重量对肺的七个肺叶中的每一个分别进行加权评分。

[0116] 结果。

[0117] 1.小母猪的血清、初乳和乳汁中的IAV-S血细胞凝集抑制滴度。

[0118] 在产仔前6周和2周(WPF)和产仔当天(FD)从全部小母猪收集血液样品以测定抗原特异性HI滴度。在产仔当天收集初乳样品,在产仔后3天收集乳汁样品。测试的IAV-S疫苗(基于EUSIV-T8和EUSIV-K)诱导针对来自血清、初乳和乳汁中相应谱系的全部代表性异源毒株的HI滴度。(小母猪血清的IAV-SHI滴度为:8$\log_2$欧亚类禽、9$\log_2$ Gent84、11$\log_2$大流行、5$\log_2$ Scot94 Clu1和7$\log_2$抗Scot94 Clu2)。在图1中给出了小母猪中针对EUIAV-S毒株测定的每组的平均HI滴度和标准偏差。

[0119] 通常,当与XSolve50佐剂混合并施用时,IAV-S疫苗针对全部四种IAV-S毒株诱导的HI滴度高于使用Porcilis®ColiClos佐剂时的HI滴度。

[0120] 此外,观察到通过肌肉内途径施用IAV-S疫苗比通过肌肉内途径施用诱导的HI滴度更高。

[0121] 2.仔猪血清中IAV-S血细胞凝集抑制滴度。

[0122] 在大约1周龄时和挑战当天(大约4WOA)从全部仔猪收集血液样品。在约1周龄时以及挑战当天测量针对来自后代中相应谱系的全部代表性异源毒株的HI滴度。与小母猪血清中的IAV-S HI滴度相似,在全部三个测试组中,用IAV-S疫苗Xsolve50佐剂接种疫苗的小母猪的后代具有抗全部谱系的最高HI滴度,随后是经由i.m途径接受与Porcilis®ColiClos疫苗混合的IAV-S疫苗的组和经由i.d.途径接受含有Xsolve50佐剂的IAV-S疫苗的组。此外,在1周龄时收集的血清中的抗体滴度高于4WOA时收集的血清。在1WOA时测定的IAV-S HI抗体滴度(EA谱系)的总结示于图1。

[0123] 3.仔猪血清中抗大肠杆菌和C型产气荚膜梭菌的抗体滴度。

[0124] 在约1周龄时以及第1组和第4组挑战当天,检测仔猪血清样品中抗大肠杆菌5种抗原和产气荚膜梭菌的抗体滴度(分别用IAV-S疫苗与Porcilis®ColiClos的组合或仅用Porcilis®ColiClos疫苗)。在大约1WOA和4WOA(挑战当天)从全部仔猪收集血液样品。

[0125] 当与其它实验组比较时,单独接受Porcilis®ColiClos疫苗或接受Porcilis®ColiClos疫苗与IAV-S疫苗的组合的小母猪的仔猪的血清样品具有抗全部大肠杆菌类型的

最高抗体滴度。通常,在单独接受Porcilis®ColiClos的组或接受Porcilis®ColiClos与IAV-S疫苗的组合的组之间观察到所测得的大肠杆菌抗体滴度之间无显著差异。此外,在1周龄时收集的血清中的抗体滴度高于在4WOA时收集的血清。

[0126] 当与其它实验组比较时,单独接受Porcilis®ColiClos疫苗或接受Porcilis®ColiClos疫苗与IAV-S疫苗的组合的小母猪的仔猪的血清样品具有抗全部大肠杆菌类型的最高抗体滴度。通常,在单独接受Porcilis®ColiClos的组或接受Porcilis®ColiClos与IAV-S疫苗的组合的组之间观察到所测得的产气荚膜梭菌抗体滴度之间无显著差异。此外,在1周龄时收集的血清中的抗体滴度高于在4WOA时收集的血清。

[0127] 4.在IAV-S挑战后保护仔猪抵抗肺病变。

[0128] 用IAV-S EA谱系毒株A/猪/法国/53-130065/2013(H1N1)气管内感染疫苗接种的小母猪的4周龄后代,并在感染后1天或3天进行尸检,以评估IAV-S感染诱导的肺病变。图2总结了感染后3天评估的肺病变评分。

[0129] 数据显示,与未进行IAV-S疫苗接种的组相比,接受单独IAV-S疫苗或接受IAV-S疫苗与Porcilis®ColiClos疫苗的组合的小母猪的全部后代具有较低的LLS。经由i.m途径接受含有XSolve50佐剂的IAV-S疫苗的组(第2组)的后代具有最低的肺病变评分,随后是经由i.d.接受含有XSolve50佐剂的IAV-S疫苗的组(第3组)或Porcilis®ColiClos与IAV-S疫苗组合的组(第1组)。

[0130] 5.IAV-S挑战后仔猪的肺中的病毒载量降低。

[0131] 在感染后3天获取自肺部匀浆的测量的滴定数据总结在图3中。数据显示,与未进行IAV-S疫苗接种的组相比,接受单独IAV-S疫苗或接受IAV-S疫苗与Porcilis®ColiClos疫苗的组合的小母猪的全部后代的肺部匀浆中的病毒水平较低。经由i.m途径接受含有XSolve50佐剂的IAV-S疫苗的组(第2组)的后代的肺部匀浆中的病毒载量最低,随后是经由i.d.途径接受含有XSolve50佐剂的IAV-S疫苗的组(第3组)或Porcilis®ColiClos与IAV-S疫苗组合的组(第1组)。

[0132] 结论

[0133] IAV-S RP(EUSIV-T8和EUSIV-K)疫苗诱导的针对来自相应谱系的全部测试的代表性异源IAV-S毒株的高血清和初乳HI滴度。观察到小母猪血清、初乳和仔猪血清中的HI滴度之间的直接相关性。

[0134] 当与XSolve50佐剂(而不是Porcilis®ColiClos)混合并施用时,IAV-S疫苗诱导更高的抗全部四种IAV-S毒株的HI滴度。

[0135] 当与IAV-S RP疫苗组合使用时,由Porcilis®ColiClos诱导的抗全部5种大肠杆菌类型和梭菌β-毒素的抗体滴度的大小不受影响。

[0136] 与皮内途径相比,IAV-S疫苗的肌肉内施用途径诱导更高的抗全部四种毒株的HI滴度(在血清和初乳中)。

[0137] 仔猪血清中测量的HI滴度与肺中病变和病毒载量的降低相关。实施例3仔猪抵抗猪流行性腹泻病毒(PEDV)的乳源性/被动免疫保护

[0138] 该实验评估了仔猪抵抗PEDV的乳源性/被动免疫保护,该PEDV是通过使用Xsolve50佐剂中的含有编码PEDV刺突糖蛋白基因的RNA颗粒的疫苗接种诱导的。

[0139] 研究设计。

[0140] 在第8、4和2周,用编码PEDV刺突糖蛋白基因的RNA颗粒(基于冻干T9RNA的疫苗,其包含基于来自VEEV毒株TC-83的复制子构建体的甲病毒RNA RP,其被构建为包含US强毒PEDV毒株AH2012(参见,GenBank登记号KC210145)的刺突蛋白的编码序列。1mL/剂,并在使用时与X-solve混合至50%)对24只血清学上和临床上无PED的母猪进行肌肉内接种疫苗以产仔。在3-5日龄时,用CO/2013毒株(10^6TCID50/猪)对猪进行挑战。

[0141] 表4.实验组

[0142]

组	目标 (Log 10 拷贝/mL)	效价 (Log 10 拷贝/mL)
疫苗	6.3	6.1

[0143]

安慰剂	-	-

[0144] 结果

[0145] 在3次疫苗接种后,疫苗诱导中等水平(80-160)的血清PED中和(PED SN)滴度(图4)。FFN(荧光聚焦中和)测定法被用于测定PEDV血清中和滴度。在挑战前的时间点,疫苗接种过的母猪生产的仔猪具有抗PED挑战毒株的PED母源性抗体(80-640)(图5)。

[0146] 结论

[0147] 然而,尽管在母猪中产生SN抗体并将其转移至其仔猪,但疫苗不能保护哺乳仔猪抵抗PED诱导的死亡(表5和图6)。

[0148] 表5.死亡率数据

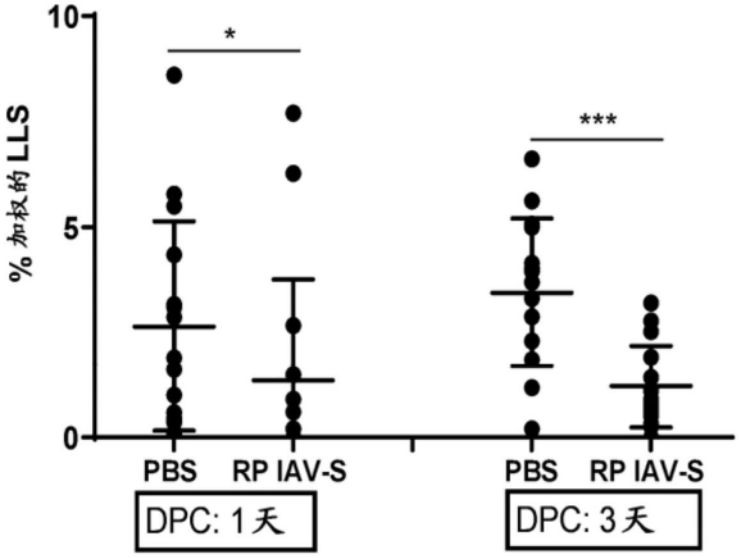
[0149]

组	猪死亡率	
	平均值	中位数
接种疫苗	76%	87%
安慰剂	86.6%	100%

[0150] 实施例4仔猪抵抗流感病毒的乳源性/被动免疫保护

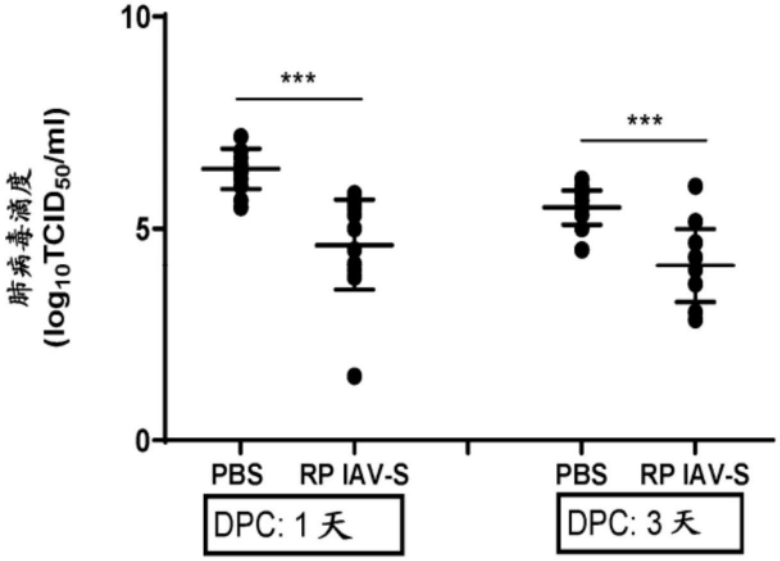
[0151] 完全对应于实施例2,本实验通过疫苗接种多胎产母猪被证实被动保护,以评估6WOA仔猪针对由50%(v/v)Xsolve佐剂混合的多基因IAV-S HA RNA颗粒诱导的但抗替代IAV-S挑战毒株(即,A/猪/比利时/113/2013(H3N2))甲型流感病毒的乳源性免疫保护。

[0152]



[0153] 图7显示了挑战后1或3天测量的仔猪的加权肺病变评分(LLS),平均值±SD。平均值±SD基于15只动物,每组属于六窝。在产仔前6周和2周疫苗接种六只母猪/组或作为未接种的对照。出生的后代在6WOA感染A/猪/比利时/113/2013(H3N2)IAV-S,并在感染后1或3天进行尸检以评估肺病变评分。

[0154]



[0155] 图8显示了挑战后1或3天收集的仔猪肺组织的IAV-S滴度,平均值±SD。平均值±SD基于每组15只动物,每组属于六窝。在产仔前6周和2周疫苗接种六只母猪/组或作为未接种的对照。出生的后代在6WOA感染A/猪/比利时/113/2013(H3N2)IAV-S,在感染后1或3天进行尸检以测量肺中的病毒载量。

[0156] 显然,针对挑战毒株诱导了良好的免疫应答和保护。

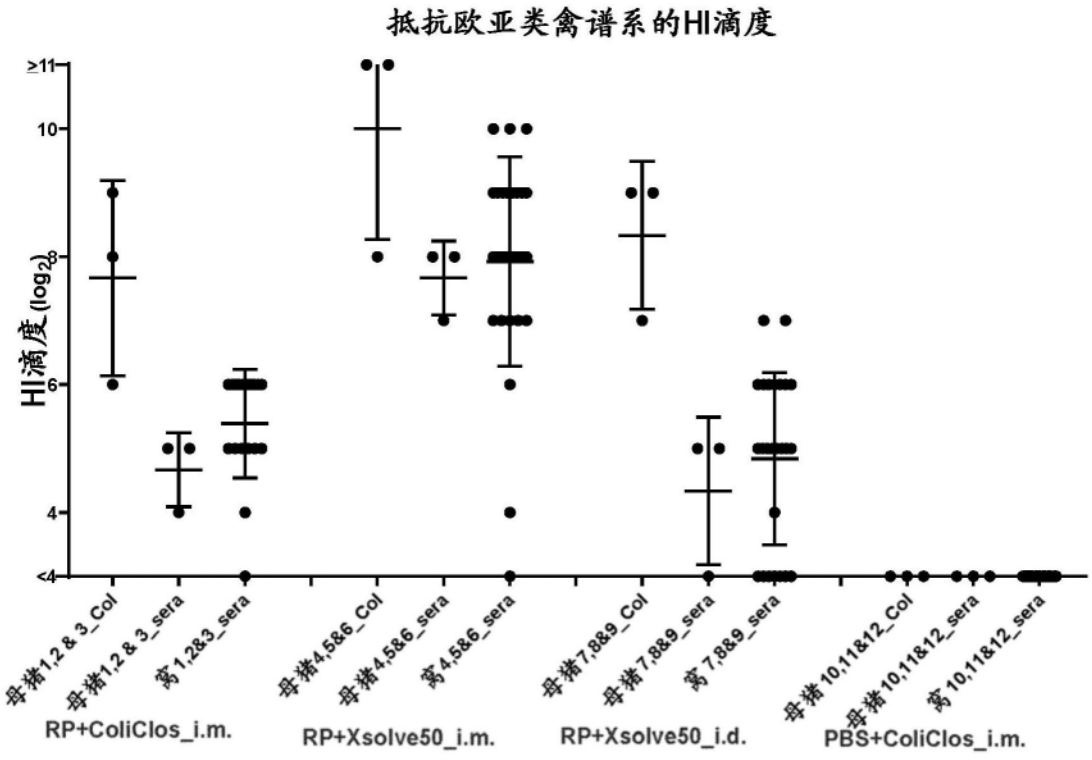

抵抗欧亚类禽谱系的HI滴度
HI滴度(log2)
≥11
10
8
6
4
<4
母猪1,2 & 3_Col
母猪1,2 & 3_sera
窝1,2&3_sera
母猪4,5&6_Col
母猪4,5&6_sera
窝4,5&6_sera
母猪7,8&9_Col
母猪7,8&9_sera
窝7,8&9_sera
母猪10,11&12_Col
母猪10,11&12_sera
窝10,11&12_sera
RP+ColiClos_i.m.
RP+Xsolve50_i.m.
RP+Xsolve50_i.d.
PBS+ColiClos_i.m.

图1

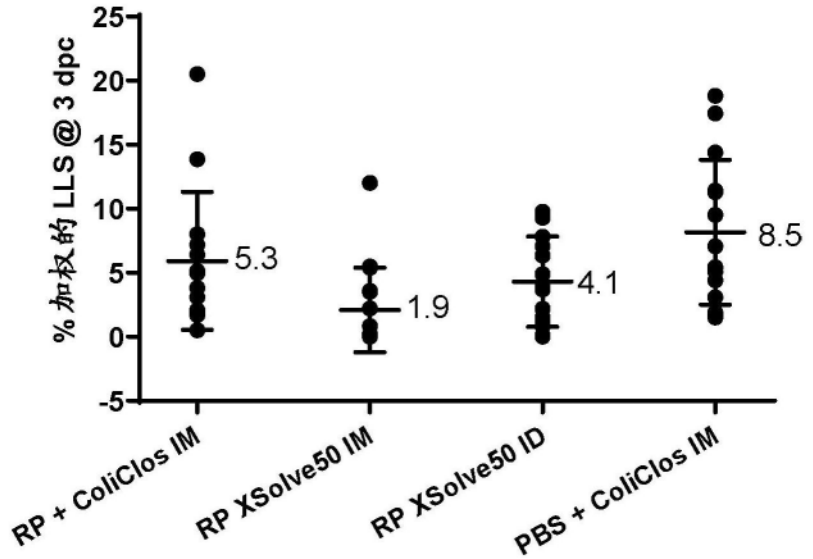

% 加权的 LLS @ 3 dpc
25
20
15
10
5
0
-5
5.3
1.9
4.1
8.5
RP + ColiClos IM
RP XSolve50 IM
RP XSolve50 ID
PBS + ColiClos IM

图2

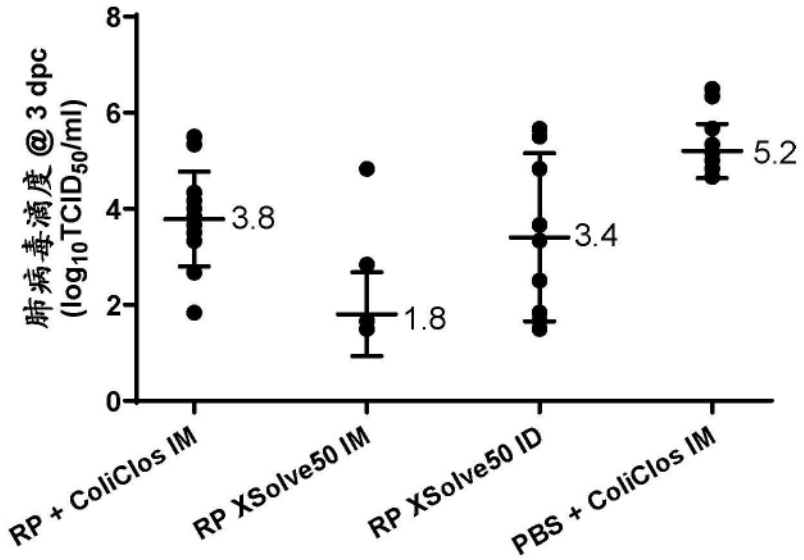

肺病毒滴度 @ 3 dpc
($log_{10}TCID_{50}$/ml)
8
6
4
2
0
3.8
1.8
3.4
5.2
RP + ColiClos IM
RP XSolve50 IM
RP XSolve50 ID
PBS + ColiClos IM

图3

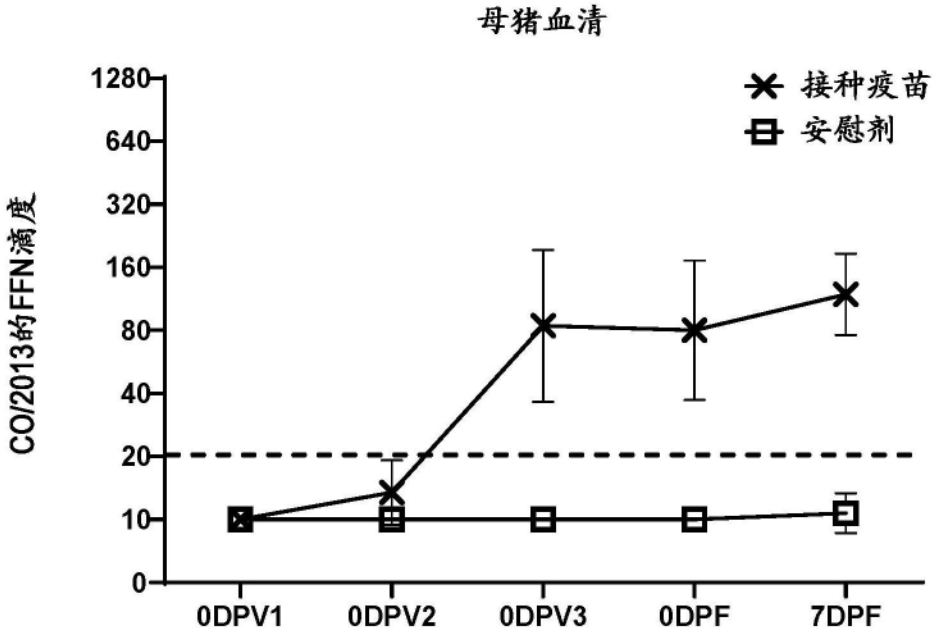

母猪血清
接种疫苗
安慰剂
CO/2013的FFN滴度
1280
640
320
160
80
40
20
10
0
0DPV1
0DPV2
0DPV3
0DPF
7DPF

图4

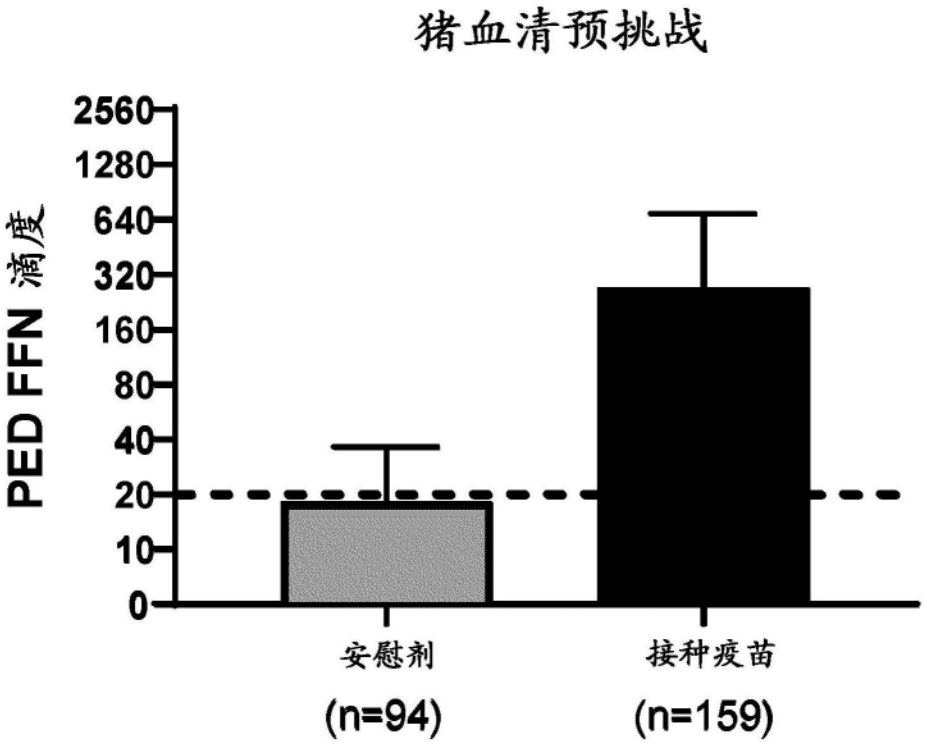

猪血清预挑战
PED FFN 滴度
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
0
安慰剂
(n=94)
接种疫苗
(n=159)

图5

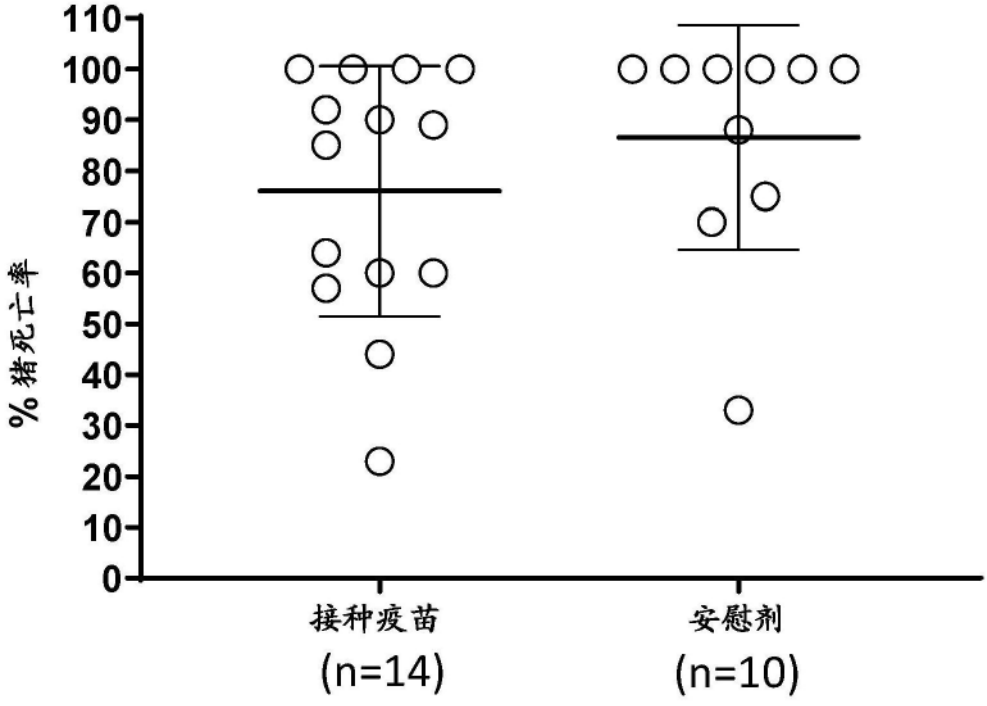

% 猪死亡率
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
接种疫苗
(n=14)
安慰剂
(n=10)

图6

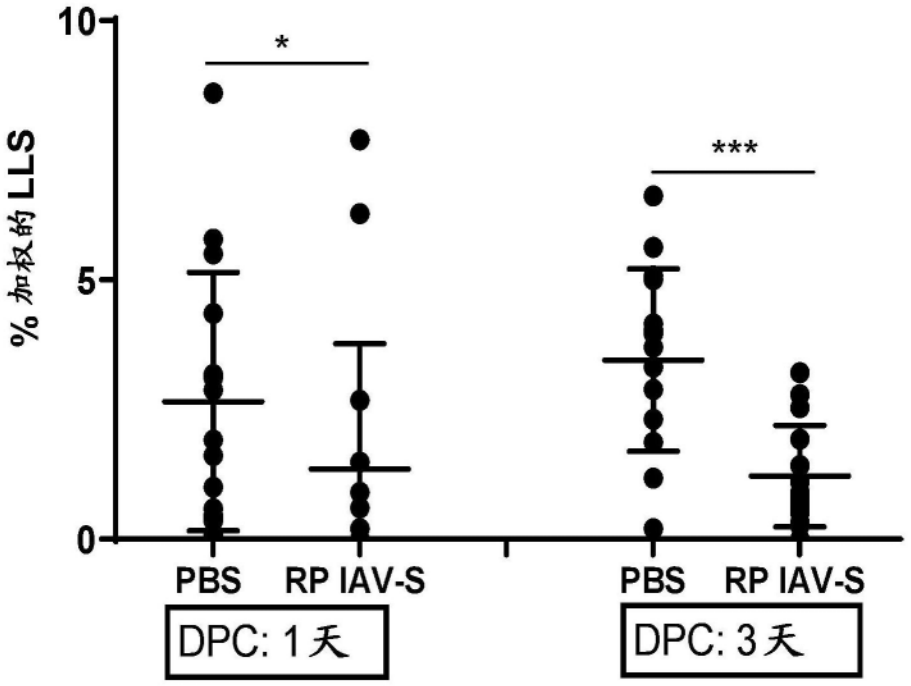

10
5
0
% 加权的 LLS
*
***
PBS
RP IAV-S
PBS
RP IAV-S
DPC: 1 天
DPC: 3 天

图7

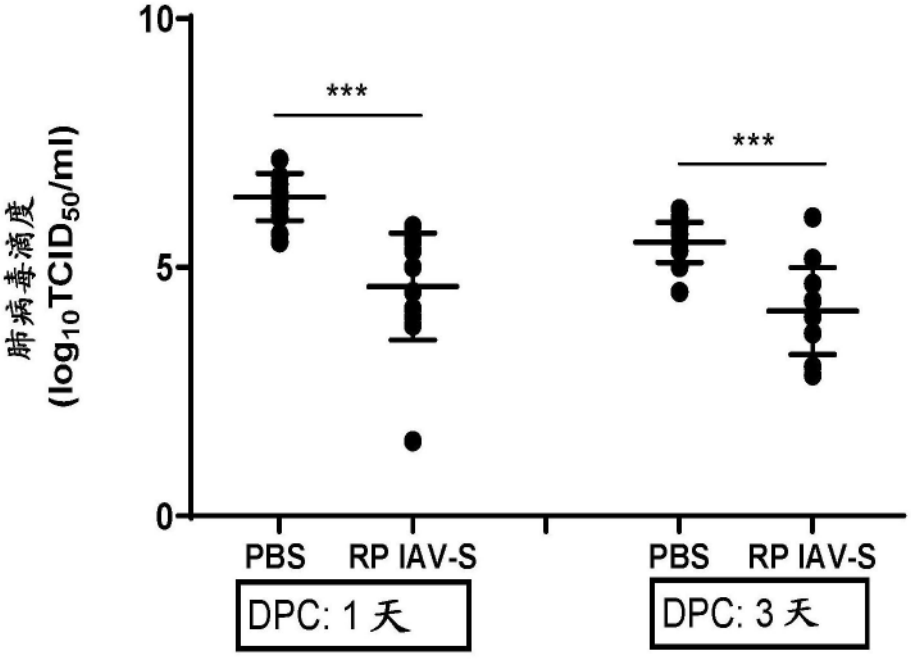

10
5
0
肺病毒滴度
(log10TCID50/ml)
***
***
PBS
RP IAV-S
PBS
RP IAV-S
DPC: 1 天
DPC: 3 天

图8