



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101802176 B

(45) 授权公告日 2013.05.08

(21) 申请号 200880106797.6

代理人 李瑛

(22) 申请日 2008.09.11

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

60/971,716 2007.09.12 US

60/971,726 2007.09.12 US

61/031,428 2008.02.26 US

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.12

(56) 对比文件

US 5976860 A, 1999.11.02, 参见摘要.

BROUQUI P, ET AL.: Cytopathic effect.

《INFECTION AND IMMUNITY》. 1994, 第 62 卷 (第 2 期), 405-411.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/076025 2008.09.11

审查员 曾繁辉

(87) PCT申请的公布数据

W02009/036177 EN 2009.03.19

(73) 专利权人 英特威国际有限公司

地址 荷兰博克斯梅尔

(72) 发明人 J·K·L·巴特雷斯

K·D·普罗德福特 B·L·梅丁

P·G·方克 R·M·瓦尔森

(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

权利要求书1页 说明书15页

(54) 发明名称

培养无形体科细菌种的方法

(57) 摘要

本发明涉及在哺乳动物胚细胞或胎细胞中培养属于无形体科 (Anaplasmataceae) 的细菌生物体的方法。特别地, 本发明涉及属于无形体科的细菌生物体的生长, 包括属于无形体属 (Anaplasma)、埃里希氏体属 (Ehrlichia) 和新立克次氏体属 (Neorickettsia) 的生物体。细菌生物体可以在哺乳动物胚或胎宿主细胞中培养, 包括猫胚宿主细胞。根据在此所述的方法培养的细菌材料可以用作抵抗无形体科细菌相关疾病的疫苗的基础, 或作为诊断应用的基础, 可用于诊断与无形体科细菌相关的疾病。

1. 培养来自埃里希氏体属 (*Ehrlichia*) 或里氏新立克次氏体 (*Neorickettsia risticii*) 的细菌种的方法, 包括:

i) 获得来自埃里希氏体属 (*Ehrlichia*) 或里氏新立克次氏体 (*Neorickettsia risticii*) 的细菌种;

ii) 用所述细菌种感染猫或猴胚细胞; 和

iii) 在有助于繁殖猫或猴胚细胞的条件下培养所述猫或猴胚细胞, 由此培养所述细菌种。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述细菌种是犬埃里希氏体 (*Ehrlichia canis*) 种。

3. 权利要求 1 的方法, 其中所述猫胚细胞是猫胚成纤维细胞。

4. 权利要求 1 的方法, 其中所述猫胚细胞是 FEA 猫胚细胞。

5. 权利要求 1 的方法, 其中所述猫胚细胞是猫全胎细胞。

6. 权利要求 1 的方法, 其中所述猫或猴胚细胞是未分化的。

7. 权利要求 1 的方法, 其中所述猫或猴胚细胞是永生化的。

8. 含有用来自埃里希氏体属 (*Ehrlichia*) 或里氏新立克次氏体 (*Neorickettsia risticii*) 的细菌种感染的猫或猴胚细胞的组合物。

9. 权利要求 8 的组合物, 其中所述细菌种是犬埃里希氏体 (*Ehrlichia canis*) 种。

10. 权利要求 8 的组合物, 其中所述猫胚细胞是猫胚成纤维细胞。

11. 权利要求 8 的组合物, 其中所述猫胚细胞是 FEA 猫胚细胞。

12. 权利要求 8 的组合物, 其中所述猫胚细胞是猫全胎细胞。

13. 权利要求 8 的组合物, 其中所述猫或猴胚细胞是未分化的。

14. 权利要求 8 的组合物, 其中所述猫或猴胚细胞是永生化的。

15. 权利要求 1 的方法, 其中所述猴胚细胞是猴胚肾上皮细胞。

16. 权利要求 8 的组合物, 其中所述猴胚细胞是猴胚肾上皮细胞。

培养无形体科细菌种的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及在哺乳动物胚细胞或胎细胞（如猫胚细胞或胎细胞）中培养属于无形体科（Anaplasmataceae）的细菌生物体的方法。特别地，本发明涉及属于无形体科的细菌生物体的生长，包括属于无形体属（*Anaplasma*）、埃里希氏体属（*Ehrlichia*）、新立克次氏体属（*Neorickettsia*）和沃尔巴克氏体属（*Wolbachiae*）的生物体。细菌生物体可以在哺乳动物胚细胞或胎细胞，如猫胚或胎宿主细胞中培养。根据在此所述的方法培养的细菌材料可以用作抵抗无形体科细菌相关疾病的疫苗的基础。

[0002] 发明背景

[0003] 无形体科的细菌是专性胞内寄生物。因此，这些生物体通常难以培养，并且由它们引起的疾病难以诊断。由于培养这些微生物的困难性，疫苗抗原的大规模制备是昂贵的，并且有时是不可能的。无形体科的细菌是人和动物的媒介传播疾病的病原体。通常通过无脊椎动物媒介如壁虱来传播。在无形体科内，无形体属、埃里希氏体属、新立克次氏体属和沃尔巴克氏体属的微生物是媒介传播疾病的病原体并且难以培养，尤其是大规模。属于立克次氏体属（*Rickettsiae*）的细菌种不包括在无形体科内。

[0004] 无形体病是美国主要的牛地方病的壁虱携带的疾病。病原体，边缘无形体（*Anaplasma marginale*），侵入牛的红血球并在其中繁殖，引起中度至严重的贫血。由于每年影响肉牛群的无形体病引起的死亡率和发病率已经导致数百万美元价值的损失，由于，例如，急性感染过程中的体重减轻和增加的兽医成本。参见，例如，Palmer in *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccine*, J.G. Wright (编辑), CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. 1989。

[0005] 嗜吞噬细胞无形体（*Anaplasma phagocytophilum*）引起绵羊、牛和野牛中壁虱携带的发烧，并通过 *I. ricinus* 携带。参见美国专利 6, 284, 238，在此将其全部引入作为参考。与感染红血球的边缘无形体相反，嗜吞噬细胞无形体感染粒细胞。

[0006] 埃里希氏体属细菌与无形体属种非常相关。已知其生物媒介的那些物种通过壁虱传播，如，犬埃里希氏体（*E. canis*）。尽管嗜吞噬细胞无形体优选感染其哺乳动物宿主中的粒细胞，而犬埃里希氏体优选感染单核白细胞。通常，无形体和埃里希氏体包含在它们各自宿主细胞的膜结合空泡中。

[0007] 识别的第一个埃里希氏体物种是犬埃里希氏体。其存在于媒介壁虱，血红扇头蜱（*Rhipicephalus sanguineus*）（褐色狗壁虱）生活的世界各地。有时候，将其引起的疾病称为犬热带全血细胞减少症。这在世界所有的温热地区尤其是个问题，例如，美国南部，中美洲和南美洲，地中海和南亚。可以在狗细胞系 DH82 以及人-狗杂交细胞系中培养犬埃里希氏体（参见，Rikihisa, Y. 1991, *Clinical Microbiology Reviews*, 4 :286）。犬埃里希氏体的各种菌株列于美国专利申请 2006/0188524 中，在此将其整体引入作为参考。恰菲埃里希氏体（*Ehrlichia chaffeensis*）与人类埃里希氏体病相关。参见 Maeda, K. 等, 1987, *N. Eng. J. Med.* 316 :853 ;Dawson, J. E. 等, 1991, *J. Clin. Microbiol.* 29 :2741。也可以在 DH82 细胞中培养恰菲埃里希氏体。

[0008] 新立克次氏体细菌与埃里希氏体和无形体细菌密切相关。新立克次氏体种包括里氏新立克次氏体 (*N. risticii*) 和腺热新立克次氏体 (*N. sennetsu*) (两者之前都归于埃里希氏体属)。里氏新立克次氏体是波特麦克马热病的病原体。已知这种疾病发生在北美洲、法国和印度。可以在巨噬细胞-单核细胞细胞系如 P388D₁、T-84 和 U937 中培养里氏新立克次氏体。腺热新立克次氏体是人类腺热埃里希氏体病的病原体。可以在鼠和人细胞系如 P388D、L929 和 HeLa 中培养腺热新立克次氏体。

[0009] 可以通过直接的显微镜检查和 / 或血清诊断来诊断无形体科细菌生物体的感染。用抗体的治疗是有效的。抵抗里氏新立克次氏体的马疫苗是可购得的。参见 Compendium of Veterinary Products, 第 6 版, Aurora Arrioja 编辑, North American Compendiums, Ltd., PortHuron, MI (2001)。至少一种抵抗无形体病的牛疫苗也是可购得的。参见同上。然而,对于由例如犬埃里希氏体的细菌生物体引起的其他疾病的大规模预防,尚未有疫苗制造和销售。

[0010] 已经进行了努力在各种宿主细胞中培养特定的立克次氏体生物体。美国专利 5, 192, 679, 在此将其整体引入作为参考, 涉及在支持 DH82 细胞生长的体外培养基中在犬单核细胞巨噬细胞细胞系 DH82 中连续繁殖犬埃里希氏体。美国公开的申请 2005/0202046, 在此将其整体引入作为参考, 涉及犬埃里希氏体疫苗, 其中在 DH82 细胞中培养犬埃里希氏体。美国专利 5, 401, 656, 在此将其整体引入作为参考, 涉及在永生化的人内皮细胞系中繁殖恰菲埃里希氏体和犬埃里希氏体。美国专利 5, 869, 335, 在此将其整体引入作为参考, 涉及在黑脚硬蜱 (*Ixodes scapularis*) 细胞系中培养某些立克次氏体目的细菌。美国专利 5, 989, 848, 在此将其整体引入作为参考, 涉及在永生化的人内皮细胞系上培养某些埃里希氏体种。美国专利 3, 616, 202, 在此将其整体引入作为参考, 涉及在兔骨髓组织培养物中培养边缘无形体。美国公开的专利申请 2006/0057699, 在此将其整体引入作为参考, 涉及在哺乳动物细胞中培养某些无形体种。美国公开的专利申请 2003/0003508, 在此将其整体引入作为参考, 涉及在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 细胞系上培养 *Rickettsia pulicis*。美国专利 5, 955, 359 和 5, 976, 860, 在此将其整体引入作为参考, 涉及在某些哺乳动物细胞系中培养属于立克次氏体目 (*Rickettsiales*) 的某些细菌种。美国专利 5, 877, 159, 在此将其整体引入作为参考, 涉及使用某些活的入侵性细菌载体在动物细胞中引入并表达基因的方法。

[0011] 已经提交了讨论使用灭活的犬埃里希氏体生物体免疫狗以抵抗犬埃里希氏体病的论文。Sunita Mahan, Immunisation of German shepherd dogs against canine ehrlichiosis using inactivated Ehrlichia canis organisms, 提交给津巴布韦大学的兽医科学系的论文 (1997 年 5 月)。该论文讨论了 β -丙内酯灭活的犬埃里希氏体生物体与 Quill A 结合的用途。

[0012] 因为属于无形体科的细菌种在宿主细胞中的培养只获得了有限的成功并且显然尚未转化成大量的疫苗供应, 因此对研发用于培养这样的细菌种以促进这些致病微生物的研究和用于研发疫苗以抵抗其所引起的疾病的培养系统仍然存在着全面的需要。还需要研发大规模的培养系统, 用于从这些微生物中制备大量的抗原, 用于诊断和疫苗中。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明广泛地涉及在哺乳动物胚或胎宿主细胞中培养属于无形体科的细菌生物体。所培养的细菌生物体可以用作抵抗由该细菌生物体引起的疾病的疫苗。可以从分离自

哺乳动物宿主细胞的细菌生物体中制得用于疫苗中的抗原。或者,可以从由细菌生物体感染的哺乳动物宿主细胞的培养物中制得用于疫苗中的抗原。可以将细菌生物体(或宿主细胞,如果存在)灭活。或者,细菌生物体可以是减毒存活的,使得它们在给予了一次或多次的动物体内复制但不引起该细菌生物体未减毒致病形式典型的病状。

[0015] 更特别地,本发明涉及在为哺乳动物胚细胞的宿主细胞中培养无形体科的细菌生物体。在本发明的一个实施方案中,在非人哺乳动物胚细胞中培养细胞。这样的宿主细胞可以获自非人动物胚胎或胎儿的任何部分。宿主胚细胞可以源自猫、犬、鼠、猪、牛、绵羊、猿或马胚胎或胎儿。在本发明的一个实施方案中,宿主胚细胞源自猫胚胎或胎儿。

[0016] 在本发明的一个实施方案中,无形体科的细菌生物体属于无形体属、埃里希氏体属或新立克次氏体属。属于无形体科的细菌生物体不包括属于立克次氏体科的那些细菌生物体。(立克次氏体科包括立克次氏体属,其包括种东方立克次氏体(*R. orientia*)和立氏立克次氏体(*R. rickettsia*))。属于无形体属的特定细菌生物体可以是牛无形体(*A. bovis*)、红血球内生无形体(*A. centrale*)、边缘无形体和嗜吞噬细胞无形体。属于埃里希氏体属的特定细菌生物体可以是犬埃里希氏体。属于新立克次氏体属的特定细菌生物体可以是里氏新立克次氏体。

[0017] 本发明涉及从无形体科培养细菌种的方法,包括:i) 获得来自无形体科的细菌种;ii) 用所述细菌种感染非人哺乳动物胚细胞;和 iii) 在有助于繁殖非人哺乳动物胚细胞的条件下培养所述非人哺乳动物胚细胞,由此培养细菌种。可以获得以无任何宿主细胞的纯化状态、存在于宿主细胞中的状态或存在于受感染动物组织匀浆中的状态的细菌种。在一个实施方案中,用分离自由无形体科生物体感染的动物的哺乳动物细胞匀浆感染非人哺乳动物胚细胞。在另一个实施方案中,通过将胚细胞暴露于无形体科生物体来感染非人哺乳动物胚细胞。无形体科细菌种可以来自无形体属、埃里希氏体属或新立克次氏体属。在一个实施方案中,非人哺乳动物胚细胞是猫细胞。猫细胞可以是猫胚成纤维细胞、FEA 猫胚细胞或猫全胎细胞。非人哺乳动物胚细胞可以是未分化的和/或永生化的。在另一个实施方案中,非人哺乳动物胚细胞是猴胚肾上皮细胞。

[0018] 本发明还涉及含有由来自无形体科的细菌种感染的非人哺乳动物胚细胞的组合物。细菌种可以来自无形体属、埃里希氏体属或新立克次氏体属。无形体科细菌种可以是本领域已知的任何种,包括但不限于,牛无形体、嗜吞噬细胞无形体、犬埃里希氏体或里氏新立克次氏体。非人哺乳动物胚细胞可以是猫胚成纤维细胞(FEF)、FEA 猫胚细胞或猫全胎细胞。非人哺乳动物胚细胞可以是未分化的和/或永生化的。非人哺乳动物胚细胞还可以是猴胚肾上皮细胞。

[0019] 本发明还涉及通过将基于根据在此所述方法培养的材料疫苗给予哺乳动物来预防哺乳动物感染的方法。本发明还涉及通过将基于根据在此所述方法培养的材料疫苗给予哺乳动物来保护哺乳动物的方法。本发明还涉及通过将基于根据在此所述方法培养的材料疫苗给予哺乳动物来治疗哺乳动物的方法。特别地,本发明涉及通过给哺乳动物提供治疗有效量的无形体科细菌抗原来保护哺乳动物抵抗由属于无形体科的生物体引起的疾病。哺乳动物可以是人、猴、猫、狗、马、牛、猪、绵羊或山羊。在本发明的一个实施方案中,动物是狗。

[0020] 本发明还涉及将免疫保护量的根据在此所述方法培养的材料给予哺乳动物;或将

有效量的根据在此所述方法培养的材料给予哺乳动物以产生免疫应答。

[0021] 发明详述

[0022] 除非另外指出,在此所用的所有术语都具有本领域技术人员将会理解的常规含义。以下提供了其显定义的术语除了它们的直接含义之外,还具有通常由本领域普通技术人员归纳的含义。

[0023] 本发明涉及培养微生物的方法。更特别地,本发明涉及培养属于无形体科的细菌生物体的方法。更特别地,本发明涉及连续培养属于无形体属、埃里希氏体属或新立克次氏体属的生物体的方法。

[0024] 根据本发明可以使用的属于无形体属的种的非限制性实例包括牛无形体、红血球内生无形体、边缘无形体、绵羊无形体 (*A. ovis*)、血小板无形体 (*A. platys*) 和嗜吞噬细胞无形体 (之前称为嗜吞噬细胞埃里希氏体 (*Ehrlichia phagocytophila*)、马埃里希氏体 (*Ehrlichia equi*)、人粒细胞埃里希氏体病物质或 HGE 物质)。根据本发明可以使用的属于埃里希氏体属的种的非限制性实例包括犬埃里希氏体、恰菲埃里希氏体和鼠埃里希氏体 (*E. muris*)。根据本发明可以使用的属于新立克次氏体属的种的非限制性实例包括蠕虫新立克次氏体 (*N. helminthoeca*)、里氏新立克次氏体 (波特麦克马热病,之前称为里氏埃里希氏体) 和腺热新立克次氏体。

[0025] 根据本发明,在哺乳动物胚或胎宿主细胞种培养无形体科的细菌生物体。如在此所用的,“宿主细胞”是无形体科的细菌生物体可以感染并且细菌生物体在其中可以复制的细胞。哺乳动物胚或胎宿主细胞的非限制性实例包括人、猫、犬、鼠、猪、牛、猿或马胚或胎细胞。如在此所用的,“感染的宿主细胞”指的是含有一个或多个无形体科细菌的宿主细胞。

[0026] 宿主细胞可以源自分离自哺乳动物胚或胎组织的单个细胞。例如,该细胞可以源自猫、犬、牛、马、鼠、猪、猿和人的胚组织。

[0027] 在本发明的一个实施方案中,在源自非人哺乳动物胚或胎组织的宿主细胞中培养属于无形体科的细菌种。根据本发明可以使用的猫胚或胎细胞的非限制性实例包括猫胚成纤维细胞 (FEF) 细胞、FEA 猫胚细胞 (格拉斯哥大学,格拉斯哥,苏格兰;如描述于 Jarrett, O. 等, *J. gen. Virol.* 20 :169-175 (1973)) 和猫全胎细胞 (FCWF-4, 美国典型培养物保藏中心, P. O. Box 1549 Manassas, VA 20108, 美国 (下文中称为 “ATCC”) 保藏 CRL-2787)。

[0028] 根据本发明培养的细菌生物体可以用于疫苗、诊断或进一步的研究,包括例如,用于分离和研究的大量生物分子的生产。因此,根据本发明培养的细菌可以配制于疫苗中,用于给予哺乳动物以防止感染或缓解由该生物体引起的疾病。例如,宿主细胞中培养的细菌可以是用于疫苗中的犬埃里希氏体,该疫苗将被给予狗以防止或缓解犬埃里希氏体病。

[0029] 因此,本发明还涉及基于根据本发明培养的材料免疫组合物或疫苗。可以用作疫苗基础的治疗剂 (也称为抗原、活性剂或免疫组合物) 可以是以下的一种或多种:

[0030] a) 收集的用无形体科细菌感染的宿主细胞的培养物;

[0031] b) 受感染宿主细胞内所含无形体科细菌浓度提高的 (a) 的提取物或级分;

[0032] c) 含有宿主细胞残余物的 (a) 的无形体科细菌浓缩提取物;

[0033] d) 不含宿主细胞残余物的 (a) 的无形体科细菌提取物;

[0034] e) 分离的无形体科细菌免疫原。

[0035] 在此使用时,“分离的”意指从其天然产生的环境中取出。因此,分离的无形体科细

菌细胞广义地包括已经从其天然产生环境中取出的那些,该环境可以包括节肢动物、昆虫或完整的活的或死的受感染哺乳动物。分离的无形体科细菌细胞包括已经从无形体科细菌感染的哺乳动物中取出的哺乳动物组织内所含的那些。分裂的无形体科细菌细胞还包括从无形体科细菌感染的哺乳动物的哺乳动物细胞中完全或部分分离出来的那些,如来自裂解宿主细胞。分离的无形体科细菌细胞还包括如在此所述的宿主细胞内所含的那些,或从其完全或部分分离的。分离的无形体科细菌细胞还包括基本上无其他微生物的那些,例如,在培养物中。

[0036] 如“分离的无形体科细菌免疫原”中所用的“分离的”指的是已经从其各自的来源无形体科细菌完全或部分分离的细菌免疫原。分离的无形体科细菌免疫原的组合物可以包括一些完整的无破坏无形体科细菌、无形体科细菌的一部分或成分、完整的无破坏宿主细胞和/或宿主细胞的一部分或成分。分离的无形体科细菌免疫原还包括一种或多种无形体科细菌生物分子富集的组合物。

[0037] 如在此所用的“无形体科细菌免疫原”包括灭活的或改良的活细菌的完整无形体科细菌。如在此所用的无形体科细菌免疫原还可以包括源自无形体科细菌的蛋白(脂蛋白、膜蛋白、胞浆蛋白)、这些蛋白的致免疫片段、核酸、脂质、糖类、脂多糖或其他生物分子。无形体科细菌免疫原可以是存在于宿主细胞中的完整无形体科细菌细胞或其一部分,其中细菌和宿主细胞两者都是被杀灭或灭活的。无形体科细菌免疫原还可以是存在于宿主细胞中的完整无形体科细菌细胞或其一部分,其中细菌或宿主细胞没有被杀灭或灭活。

[0038] 本领域技术人员通常熟知可以将细菌或宿主细胞杀灭或灭活的技术。这样的技术包括物理、化学和生物方法。灭活技术的非限制性实例包括超声波处理、冻-融技术、压力、用热、化学药品或酶处理。化学灭活剂的非限制性实例包括用二元乙二胺(BEA)和福尔马林(甲醛溶液)处理。

[0039] 如上所述,根据本发明培养的材料可以用于制备用于疫苗的抗原。如在此所用的,术语“疫苗”意指一种产品,它的给药是用来引发可以预防和/或减轻一种或多种传染病严重程度的免疫应答。疫苗含有用于刺激动物体内免疫系统的抗原(或“活性剂”、“免疫原”、“治疗剂”或“免疫组合物”),其是根据本发明培养的材料,包括用无形体科细菌感染的宿主细胞、完整的未破坏无形体科细菌或无形体科细菌的细菌级分或一部分或生物分子。抗原可以是活的减毒或杀灭的无形体科细菌感染宿主细胞的制剂、活的辐射过的细胞、粗制级分或纯化的无形体科细菌免疫原。因此,疫苗可以包含富集的、分离的或纯化的抗原。疫苗可以从灭活或杀灭的无形体科细菌感染的宿主细胞的培养物制得,或从灭活或杀灭的无形体科细菌制得。

[0040] 疫苗还可以包括来自超过一个无形体科细菌种或来自以下将进一步描述的其他病原体(例如,病毒、细菌寄生物或真菌)的抗原的组合。

[0041] 从根据本发明所培养材料制得的疫苗含有治疗有效量的抗原。在本发明公开的内容中,“治疗有效量”指的是可以诱导接受了抗原或疫苗的哺乳动物体内免疫应答的抗原或疫苗的量,其足以防止或缓解由致病无形体科细菌感染引起的疾病的病征或症状,包括不利的健康影响或其并发症。可以诱导体液免疫或细胞介导免疫或体液和细胞介导免疫两者。可以评价动物对疫苗的免疫应答,例如,通过抗原滴度测量、通过显微镜分析间接评价或通过监控用野生型菌株激发后的病征和症状直接评价。可以通过测量,例如,患者临床病

征如死亡率、发病率的降低、体温和整体身体状况以及整体健康和性能来评价疫苗给予的保护性免疫。治疗有效的疫苗的量可以根据所用的特定病毒或患者的状况而改变,或可以由本领域技术人员来确定。

[0042] 根据本发明培养的材料还可以用于制备刺激给予该组合物的受试哺乳动物体内免疫应答的免疫组合物。这样的组合物可以用于鉴定用作疫苗基础的抗原。因此,例如,可以将含有根据本发明方法培养的材料免疫组合物给予受试哺乳动物。此后,可以监控受试哺乳动物的抗体滴度,并且可以选择候选无形体科细菌抗原,以在疫苗中使用或进行进一步的研究。本发明的免疫活性组合物包括刺激接受了疫苗的受试者体内的体液免疫应答和/或细胞介导免疫应答的组合物。

[0043] 如在此所用的,“免疫应答”指的是由于已经接受了一种或多种基于根据在此所述方法培养的材料疫苗所引起的受试哺乳动物的主动免疫应答。免疫应答可以包括应答存在于疫苗中的抗原或免疫原的一种或多种抗体的产生。患者体内的“免疫应答”指的是产生抵抗抗原的体液免疫应答、细胞免疫应答或体液和细胞免疫应答。可以使用本领域已知的标准免疫测定法和中和测定法来测定免疫应答。

[0044] 由根据本发明培养的材料制得的疫苗可以用于预防受试哺乳动物体内的感染,保护受试哺乳动物或治疗受试哺乳动物。

[0045] “预防感染”和类似的术语意指防止或抑制引起所述疾病的细菌复制,抑制细菌或病毒的传播,或防止细菌在其宿主动物中建立自身,或缓解由感染引起的疾病的症状。如果存在细菌载荷的降低,则认为处理是治疗性的。

[0046] 如在此对于细菌所用的“保护”意指疫苗防止或减轻了由生物体引起的疾病的症状,从该生物体产生了用于疫苗中的抗原。术语“保护”还表示疫苗可以用于“治疗”患者体内已经存在的疾病或疾病的一种或多种症状。

[0047] “治疗”指的是逆转、缓解、抑制该术语适用的失调、病症或疾病的进展,或防止该术语适用的失调、病症或疾病,或防止这样的失调、病症或疾病的一种或多种症状。治疗还指的是加快从一种或多种无形体科生物体感染中恢复过来。“治疗”指的是“治疗”的行为。

[0048] 因此,由根据本发明培养的材料制得的疫苗可以用于预防受试哺乳动物体内的无形体科细菌感染,保护受试哺乳动物抵抗无形体科细菌和治疗受试哺乳动物的无形体科细菌感染。这样的预防、保护或治疗可以包括(但不限于)降低或消除致病无形体科生物体感染的风险,改善或缓解这种无形体科生物体感染的症状,即,无形体科细菌载荷的下降,降低无形体科感染的发病率或持续时间,降低无形体科细菌的急性期血清蛋白水平,例如,降低的直肠温度和/或食物摄入的增加和/或生长。

[0049] 如在此所用的“药物学上可接受的”指的是在合理的医学判断范围内的,适用于接触受试者的组织而没有不当的毒性、刺激、过敏反应等,与合理的利益风险相匹配以及对于其预期的用途是有效的物质(例如,佐剂、免疫刺激剂、载体、稀释剂、乳化剂或稳定剂)。药物学上可接受的物质不干扰治疗剂的功效并且对于给予其的受试者是无毒的。

[0050] “受试者”或“受试哺乳动物”指的是具有免疫系统的任何动物,包括哺乳动物,如人、猫、牛、马、猪和狗。

[0051] 根据本发明培养的材料还可以用于诊断应用中以诊断由无形体科细菌引起的疾病或病症的存在。这样的诊断应用的非限制性实例包括细菌级分、蛋白质或其他生物分子

在抗体结合测定中的用途。细菌级分、蛋白质或其他生物分子也可以用于产生用于这样的测定中的多克隆或单克隆抗体。

[0052] 宿主细胞生长

[0053] 在用所需的细菌生物体感染之前,首先制备用于根据本发明培养细菌生物体的宿主细胞。将分离的猫胚细胞系的样品接种于培养基中,用以悬浮或贴壁生长。如在此所用的贴壁生长条件,其中细胞层覆盖细胞在其中得到培养的泡囊内包含的表面。表面可以包括泡囊自身的内表面,或泡囊内所含的用于增加表面积 of 玻璃或聚合体珠子的表面。微载体也可以用来增加表面积和宿主细胞生长。与贴壁生长相反,可以使宿主细胞在悬浮液中生长,其中宿主细胞不需要结合培养泡囊内的表面。

[0054] 本领域技术人员通常熟知可以用于培养宿主细胞的各种培养基。宿主细胞生长培养基可以源自动物。或者,宿主细胞生长培养基可以是基于植物或酵母的,并且可以是无动物蛋白的。生长培养基可以源自大豆提取物或其他富含蛋白的植物或富含蛋白的植物食品,包括,例如,豆类。用于培养宿主细胞的特定培养基的非限制性实例包括 Eagle' s 最小必需培养基 (MEM)、Glasgow- 最小必需培养基、RPMI1640、OptiMEM、AIM V。

[0055] 生长培养基可以含有或补充胎牛血清 (FBS)、胰蛋白溶液、乳清蛋白水解产物溶液、L- 谷氨酰胺、碳酸氢钠;乳清蛋白水解产物,多链丝霉素 B,丙酮酸钠,葡萄糖,硫酸镁。

[0056] 可以在宿主细胞感染或暴露于无形体科细菌之前或之后,将新鲜生长培养基重新加入或补充至宿主细胞中。

[0057] 可以使细胞在 36-38°C, 5% CO₂ 下生长 2-9 天。

[0058] 感染宿主细胞

[0059] 可以通过使宿主细胞接触已知用细菌生物体感染的其他真核细胞,将宿主细胞暴露于无形体科的细菌生物体或用无形体的细菌生物体感染。本领域技术人员熟知确定例如是否用这些细菌生物体感染了这些来自哺乳动物的其他真核细胞。受感染的哺乳动物细胞可以源自任何组织,包括脾、肝、胰腺、肺、心脏或其他肌肉组织、大脑、胆囊、血液、肾脏、淋巴结或胃。可以在合适的等渗溶液中通过搅拌机均质从组织提取物中制得受感染的哺乳动物细胞。然后将匀浆用于接种(即,感染)宿主细胞的培养物,作为覆盖宿主细胞的涂层来施加或简单地与它们接触。

[0060] 或者,可以将宿主细胞暴露于分离的无形体科的细菌生物体或用分离的无形体科的细菌生物体感染。本领域技术人员熟知分离这些细菌生物体的技术,或可以从生物保藏单位获得分离的细菌生物体的原种。

[0061] 在接触无形体科细菌之前,用于制备宿主细胞的生长培养基可以与在这样的接触后用于繁殖宿主细胞的培养基相同。无形体科细菌暴露的(或感染的)宿主细胞可以培养长达 95 天,长达 35 天,或约 5 至 10 天,以获得 $\geq 1 \times 10^4$ TCID₅₀ (组织培养感染剂量) 的滴度,然后可以收集并处理培养物。

[0062] 收集

[0063] 可以通过收集组织细胞培养物流体和 / 或细胞来收集无形体科细菌感染的宿主细胞。可以从含有宿主细胞壁的无形体科细菌细胞的培养基(和培养泡囊)中收集宿主细胞。或者,在收集过程中,可以通过改善感染性细菌细胞从生长基质中的释放的技术来提高无形体科细菌的浓度,这些技术例如为真核宿主细胞的超声波处理、冻融、加热或化学或选

择性酶促裂解。无形体科细菌的富集收集可以包括无宿主细胞的材料或宿主细胞材料。或者,无形体科细菌的富集收集可以包括含有宿主细胞的材料或宿主细胞材料。

[0064] 灭活

[0065] 本领域技术人员通常熟知可以将细菌或宿主细胞杀灭或灭活的技术。这样的技术包括,物理、化学和生物方法。灭活技术的非限制性实例包括超声波处理、冻-融技术、压力、用热、化学药品或酶处理。化学灭活剂的非限制性实例包括用二元乙二胺(BEI)、福尔马林(甲醛溶液)、 β -丙内酯、硫柳汞、戊二醛、十二烷基硫酸钠等或其混合物处理。还可以在紫外线存在下的热或补骨脂素将宿主细胞灭活。这些化学灭活剂或物理灭活方法也可以在将无形体科细菌从宿主细胞中提取或分离出来后用于灭活无形体科细菌细胞。

[0066] 配制

[0067] 灭活的、感染的宿主细胞或富集的无形体科细菌细胞可以用作抗原和配制成液体悬浮液或可以将其冻干,用于制备抵抗由无形体科生物体所引起疾病的疫苗。根据本发明培养的材料可以和任何药物学上可接受的佐剂、免疫刺激剂、载体、稀释剂、乳化剂或稳定剂一起配制,以下将讨论其非限制性实例。然而,本领域技术人员将认识到其他佐剂、免疫刺激剂、载体、稀释剂、乳化剂或稳定剂也可以用于配制基于根据本发明培养的材料疫苗中。

[0068] 佐剂 & 免疫刺激剂

[0069] 一般而言,佐剂是以非特异性方式增强目标免疫应答的物质。许多不同的佐剂是本领域已知的。可以用于由根据本发明所培养材料制得的疫苗配制中的佐剂的非限制性实例包括铝盐(例如,明矾、氢氧化铝、磷酸铝、氧化铝)、胆固醇、单磷酸脂质 A 佐剂、白榴石(amphigen)、生育酚、单苯磷脂质 A、胞壁酰二肽、油乳浊液、葡聚糖、卡波姆、嵌段共聚物、阿夫立定脂质-胺佐剂、来自大肠杆菌的热不稳定性肠毒素(重组的或其他的)、霍乱毒素或胞壁酰二肽、弗氏完全和不完全佐剂、微生物 E、无毒嵌段聚合物和聚胺如硫酸葡聚糖、聚羧乙烯、吡喃、皂苷和皂苷衍生物、嵌段共聚物以及如美国专利 4,578,269、4,744,983、5,254,339 中鉴定的那些佐剂,在此将其全部引入作为参考。可以用作佐剂的肽的非限制性实例包括胞壁酰二肽、二甲基甘氨酸或特夫素。可以用作佐剂的油的非限制性实例包括矿物油、植物油或其乳浊液。

[0070] 从根据本发明培养的材料制得的疫苗可以配制成水包油型乳浊液或油包水型乳浊液。水包油型乳浊液的非限制性实例包括石蜡水包油型乳浊液或从角鲨烯、环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物、聚山梨酸酯表面活性剂和/或胞壁酰二肽的苏氨酸类似物中的一种或多种制得的乳浊液。

[0071] 用作佐剂的油可以通过接受疫苗的受试者代谢,如植物油或动物油。这样的油通常主要由三酰基甘油的混合物组成,也称为甘油三酯或中性脂肪。这些非极性的、水不溶性的物质是甘油的脂肪酸三酯。三酰基甘油根据其三个脂肪酸残基的性质和位置而有所不同。

[0072] 佐剂还可以是不可代谢的,由给予了乳浊液的动物受试者身体不能代谢的成分组成。适用于本发明乳浊液的不可代谢的油包括烷烃、烯烃、炔烃及其相应的酸和醇,其醚和酯,及其混合物。油单独的化合物可以是轻质烃化合物,例如,具有 6 至 30 各碳原子的化合物。油可以是合成制得的或从石油产品纯化的。用于制备基于根据本发明培养的材料疫苗

苗的不可代谢的油的非限制性实例包括,例如,矿物油、石蜡油和环烷烃。术语“矿物油”指的是不可代谢的佐剂油,其是通过蒸馏技术从矿脂获得的液体烃的混合物。该术语与“液体石蜡”、“液体矿脂”和“石蜡油”同义。该术语还用来包括“轻质矿物油”,即,相似地通过矿脂的蒸馏获得的油,但其比石蜡油具有略低的比重。

[0073] 可以用于根据本发明培养的材料疫苗的配制中的能够提高体液免疫应答的其他化合物包括但不限于乙烯马来酸酐(EMA)共聚物,苯乙烯与丙烯酸和甲基丙烯酸的混合物的共聚物的橡胶乳浊液。

[0074] 除了佐剂,基于根据本发明培养的材料疫苗可以包括免疫调节剂,如例如,白细胞间介素、干扰素或其他细胞因子(例如,Th1-相关细胞因子,如白细胞间介素-12(IL-12)、白细胞间介素-18(IL-18)或 γ -干扰素)。

[0075] 加入基于根据本发明所培养材料的疫苗制剂中的佐剂或免疫刺激剂的含量取决于佐剂或免疫刺激剂自身的性质。本领域技术人员能够选择足以增强对无形体科细菌免疫剂的免疫应答的含量。

[0076] 载体

[0077] 适用于基于根据本发明所培养材料配制的疫苗的药物学上可接受的载体可以是任何常规的适用于兽医药物组合物的液体载体,包括平衡盐溶液,如适用于组织培养基的那些。可以理解药物学上可接受的载体是没有不利地影响接种动物健康的化合物,至少没有至不利影响比动物未接种时看到的影响更严重的程度。合适的载体还可包括无菌水、盐水、含水缓冲液如PBS、溶剂、稀释剂、等渗剂、缓冲剂、葡萄糖、乙醇、甘露醇、山梨糖醇、乳糖和甘油等。

[0078] 媒介物

[0079] 从根据本发明培养的材料制得的疫苗还可以含有媒介物。媒介物是宿主细胞、无形体科细菌细胞或其蛋白、蛋白片段、核酸或部分粘附但没有共价结合的化合物。这样的媒介物的非限制性实例包括生物微胶囊、微-海藻酸盐、脂质体和macroSol。用作佐剂的一些材料也可以用作介质,如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝或氧化铝、硅胶、高岭土和膨润土,全部都是本领域已知的。

[0080] 稳定剂

[0081] 通常,将疫苗与稳定剂混合,例如,以保护易于降解的成分免于降解,提高疫苗的货架期,或提高冻-融效率。可以加入基于根据本发明培养的材料疫苗的制剂的稳定剂的非限制性实例包括SPGA(Bovarnik等,1950, J. Bacteriology, vol. 59, p. 509)、脱脂奶、明胶、牛血清白蛋白、碳水化合物(例如,山梨糖醇、甘露糖醇、海藻糖、淀粉、蔗糖、葡聚糖或葡萄糖)、蛋白(例如,白蛋白、酪蛋白或其降解产物)、非动物来源稳定剂和缓冲剂(例如,碱金属磷酸盐)。在冻干疫苗组合物中,可以加入一种或多种稳定剂。

[0082] 多价疫苗

[0083] 可以将根据本发明培养的材料收集的免疫原配入含有一种或多种其他免疫原的疫苗中。其他免疫活性成分可以是完整的寄生物、细菌或病毒(灭活或改良的活的),或其分级的部分或提取物(例如,蛋白、脂质、脂多糖、碳水化合物或核酸)。

[0084] 将从根据本发明培养的材料收集的免疫原用于犬疫苗中的情况中,可以将其他犬病原体的抗原加入制剂中。对于可以加入的其他抗原的其他病原体的非限制性实例是

支气管炎博德特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、犬瘟热病毒 (CDV)、1 型和 2 型犬腺病毒 (CAV-1、CAV-2)、犬副流感病毒 (CPI)、犬冠状病毒 (CCV)、犬细小病毒 (CPV)、问号钩端螺旋体犬血清型 (*Leptospira interrogans serovar canicola*)、问号钩端螺旋体出血黄疸血清型 (*Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae*)、问号钩端螺旋体布拉迪斯拉发血清型 (*Leptospira interrogans serovar bratislava*)、问号钩端螺旋体波莫纳血清型 (*Leptospira interrogans serovar pomona*)、科氏钩端螺旋体流感伤寒血清型 (*Leptospira kirschneri serovar grippityphosa*)、狂犬病病毒、布氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、犬轮状病毒 (CRV)、犬疱疹病毒 (CHV) 和犬细小病毒 (MVC)、犬巴贝氏菌 (*Babesia canis*)、贾第鞭毛虫属 (*Giardia*) 和利什曼虫属 (*Leishmania*)。

[0085] 或者,基于根据本发明培养的材料疫苗可以与其他活的或灭活的疫苗同时或伴随给予。

[0086] 冻-融/重建

[0087] 出于稳定性或经济的原因,可以将根据本发明培养的材料疫苗冻干。通常,这使得可以在超过 0°C 的温度下,例如在 4°C 下延长保存。用于冻干的程序是本领域技术人员已知的;用于不同规模冻干的设备是可购得的。为了重建冻干的疫苗,可以将其悬浮于生理上可接受的稀释剂中。这样的稀释剂可以简单地如无菌水,或生理盐溶液或其他上述载体。

[0088] 用量

[0089] 可以将根据本发明培养的材料疫苗配制成单位剂型,以利于给药和确保剂量的均一性。在此,关于疫苗组合物的剂量单位指的是适于作为用于动物的单位剂量的物理上分开的单位,每个单位含有计算了以产生所需免疫效果的预定量的无形体科细菌免疫原,并结合所需的佐剂系统和载体或介质。

[0090] 无形体科细菌免疫原的有效免疫量可以根据选定的菌株而改变,并且可以是足以引起保护性免疫应答的任何量。例如,其中剂量单位含有至少约 1×10^4 TCID₅₀ 灭活无形体科细菌的含量是合适的。

[0091] 给药

[0092] 将疫苗给予受试者导致刺激了受试哺乳动物体内的免疫应答。可以根据本领域已知的方法将用于基于根据本发明培养的材料疫苗的给药途径给予哺乳动物目标。这样的方法包括,但不限于,皮内、肌肉、眼内、腹膜内、静脉内、口服、口鼻和皮下,以及吸入、栓剂或经皮。给药途径包括皮内、肌肉、腹膜内、口鼻和皮下注射。可以通过任何装置来给予疫苗,这些装置包括但不限于,注射器、喷雾器、弥雾机、无针注射装置或微弹轰击基因枪 (Biolistic 轰击)。

[0093] 可行的备选施用途径是作为滴剂、喷雾、凝胶或膏剂局部施用于眼睛、鼻子、嘴、肛门或阴道的粘膜上皮,或施用于至身体任何部位的外层皮表皮上;作为气溶胶或粉末进行喷雾。或者,可以通过饮食途径来施用,通过结合食物、饲料或饮用水,例如,作为粉末、液体或片剂,或通过作为液体、凝胶、片剂或胶囊直接给予口腔,或作为栓剂直接施用肛门。优选的施用途径是通过肌肉或通过皮下注射。

[0094] 根据本发明的疫苗可以是几种形式,例如:液体、凝胶、膏剂、粉末、片剂或胶囊,这取决于所需的施用于靶的方法。

[0095] 根据本发明的疫苗施用于靶哺乳动物的方案可以是单剂量或多剂量,可以同时或

按序给予,以与剂量和制剂相适的方式,并且这样的量将是免疫有效的。

[0096] 激发模型

[0097] 为了有效地研究和评价无形体科细菌的致病机理和宿主哺乳动物的防御机制并因此提升疫苗和改进疫苗产品,应当使用有效的激发模型。

[0098] 用于犬埃里希氏体病的激发模型,例如,可以基于测试动物的百分比,以证实通常与犬埃里希氏体病相关的持久且严重的临床症状,如发热、血小板减少、粘脓性眼分泌物、脱水等。或者,可以使用公开的美国申请 2006/0188524(在此将其全部引入作为参考)中描述的激发模型。可以通过给予所述测试动物含有活犬埃里希氏体细菌的毒性培养物的外周血单核细胞(PBMC)的激发储液在测试动物体内获得这种犬埃里希氏体激发。通过以下方法来制得毒性犬埃里希氏体培养物:在宿主中重复繁殖犬埃里希氏体微生物如犬埃里希氏体 Ebony、犬埃里希氏体 Broadfoot 等;从宿主血液样品中分离出 PBMC;并将分离的 PBMC 与 20%胎牛血清和 10%二甲亚砷混合。

[0099] 在测试动物中诱发临床犬埃里希氏体病的方法包括给予所述动物有效量的犬埃里希氏体激发储液,该储液主要由外周血单核细胞中的毒性犬埃里希氏体微生物组成。犬埃里希氏体 Broadfoot(有时候称为犬埃里希氏体 BF,活 Broadfoot)和犬埃里希氏体 Ebony(有时候称为 Ebony)的存活培养物已经保藏于 ATCC(2004 年 2 月 11 日),10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 U. S. A., 并且各自给定了 ATCC 保藏号,对于 Broadfoot 株为 PTA-5811,对于 Ebony 菌株为 PTA-5812。

[0100] 存在几种其他的细胞诊断方法来确定感染的存在。例如,可以通过直接的免疫荧光来确定感染的存在。检测感染的其他方法包括染色,例如,Giemsa,Wright/Giemsa。吡啶橙也可以用于将生物体染色。

[0101] 除非另外限定,在此所用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。因此将在此提及的所有出版物全部引入作为参考。

[0102] 为了更清楚地理解本发明,以下列出了如下的实施例。这些实施例只是说明性的并且应当理解不以任何方式来限制本发明的范围或基本原理。实际上,除了在此所示和所述的那些之外,从以下所示的实施例和之前的描述看,本发明的各种改变对本领域技术人员而言都是显而易见的。这样的改变也落入所附权利要求的范围内。

实施例

[0103] 实施例 1:在 DH82 细胞存在下在 FEF 细胞上培养犬埃里希氏体

[0104] 1.1 未感染 DH82 的繁殖

[0105] 将一冷冻小瓶的未感染 DH82 细胞(美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏号 CRL-10389, P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108)融化、澄清并用于接种含有 DH82 生长培养基的 75-cm² 细胞培养烧瓶,在 37°C 下用 5% CO₂ 培养。DH82 生长培养基由补充了 10%胎牛血清(FBS)和 1% HEPES 的 Dulbecco's MEM 基料组成。在形成单层时,将细胞刮入生长培养基中,收集,并在 1,500rpm 下离心 10 分钟。将细胞沉淀物重悬浮于 5ml 新鲜 DH82 生长培养基中并以 1:3 至 1:5 的比例分流。

[0106] 1.2 用犬埃里希氏体感染的 DH82 细胞感染未感染的 DH82 细胞

[0107] 将一冷冻小瓶的犬埃里希氏体感染的 DH82 细胞(ATCC 保藏号 no. CRL-10390)融

化、澄清并用于接种在 DH82 生长培养基中含有大约 10^7 个未感染 DH82 细胞的单层 (80–90% 汇合) 的 175-cm^2 细胞培养烧瓶。通过重新给料来维持犬埃里希氏体感染的 DH82 培养物, 即, 用如上所述的新鲜 DH82 培养基替换 50% 用过的培养基。使用以下方法监控犬埃里希氏体感染培养物: 根据制造商的指导 (VWR, West Chester, PA#47733–150) 在含有丙酮固定的细胞的载波片上的 Diff-Quik 染色方法或标准的免疫荧光抗体 (IFA) 技术。简而言之, 用多克隆犬埃里希氏体狗血清培养含有来自犬埃里希氏体感染的和未感染的 DH82 培养物的丙酮固定细胞的平板, 用 PBS 洗涤, 用荧光素标记的山羊抗-狗 IgG γ 培养 (Kirkegaard 和 Perry#02–19–02), 用 PBS 洗涤, 并用荧光显微镜检测。

[0108] 1.3 未感染 FEF 细胞的繁殖

[0109] 将一小瓶冷冻猫胚成纤维细胞 (FEF) 融化, 澄清并用于接种含有 FEF 生长培养基的 175-cm^2 细胞培养烧瓶, 在 37°C 下用 5% CO_2 培养。FEF 生长培养基由 M6B8 培养基 (MEM 基料, Glasgow-MEM 基料, 胰蛋白磷酸盐, 胰蛋白, 乳清蛋白水解产物, L-谷氨酰胺和碳酸氢钠) 和 5% FBS 组成。在培养 4–5 天后, 当单层为 90–95% 汇合时, 将培养物用于传代。用 0.25% 胰蛋白酶处理后, 将细胞以 1 : 5 至 1 : 10 的比例分流。

[0110] 1.4 用犬埃里希氏体感染的 DH82 细胞感染未感染的 FEF 细胞

[0111] 通过刮入培养基中来收集犬埃里希氏体感染的 DH82 细胞, 在 1,500rpm 下离心 10 分钟, 并以 1×10^6 细胞/ml 重悬浮于新鲜 DH82 生长培养基中。将 6×10^6 细胞/ 175cm^2 细胞培养烧瓶接种于 FEF 生长培养基中并在 37°C 下用 5% CO_2 培养 18–24 小时的未感染 FEF 培养物悬浮于培养基中并以 1 : 3 的分流比置于 75-cm^2 细胞培养烧瓶中。然后将 6ml 重悬浮的犬埃里希氏体感染的 DH82 细胞用于感染每个在悬浮液中含有未感染 FEF 细胞的 75-cm^2 细胞培养烧瓶, 并在 37°C 下用 5% CO_2 培养。通过每三天用新鲜的 FEF 生长培养基替换用过的培养基来补给犬埃里希氏体感染的 DH82/FEF 混合培养物。感染后 14 天时, 将混合物培养物以 1 : 2 分流, 并将细胞悬浮液转移至 24-孔细胞培养平板的孔中, 1ml/孔。在 37°C 下用 5% CO_2 培养 16 小时后, 将孔中的培养物上清液转移至载波片上, 用丙酮固定, 并如上所述使用 IFA 犬埃里希氏体感染的存在。

[0112] 实施例 2: 犬埃里希氏体在 FEF 细胞的同源群体上的生长

[0113] 用 0.5–2mL 如上所述从 ATCC 获得的细胞扩大的犬埃里希氏体感染的 DH82 细胞静脉内感染狗。这样的犬埃里希氏体感染的 DH82 细胞描述于美国专利 5,192,679 中, 在此将其全部引入作为参考。通过脾脏或血液 DNA 的 PCR 将阳性的狗鉴定为受犬埃里希氏体感染的。使用 QIAamp DNA Mini 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 根据制造商的说明从血液和组织样品中纯化 DNA。使用 25- μl 反应物在 RoboCycler[®] 机器人热循环器 (Stratagene, Cedar Creek, TX) 上的热循环实验方案中进行 PCR, 该反应物由 2.5 μl 10X 反应缓冲液 (Genscript Corporation, Piscataway, NJ), 0.2 μl 100mM dNTP (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), 1 μl 10 μM 寡核苷酸引物 1 (5' -AGA ACG AACGCT GGC GGC AAG C-3') 和寡核苷酸引物 2 (5' -CGT ATT ACC GCG GCTGGC A-3') 和 0.2 μl 5U/1 Taq 聚合酶 (Genscript Corp.) 组成, 该热循环实验方案由以下步骤组成: 94°C 初步变性步骤 5 分钟, 接着 94°C 1 分钟, 60°C 1 分钟和 72°C 1 分钟的 35 个循环, 接着为 72°C 10 分钟的最终延伸步骤。从犬埃里希氏体感染的狗获得的脾脏、淋巴结或外周血单核细胞 (PBMC) 的样品制备新鲜生长培养基中的匀浆, 并用作感染 FEF 细胞的覆盖层。

[0114] 将犬埃里希氏体感染的脾脏匀浆接种两个分开的 75-cm² 细胞培养烧瓶中的为感染 FEF 细胞,烧瓶中含有 30ml 以 2×10^5 细胞 /ml/ 烧瓶接种的 FEF 细胞悬浮液,使匀浆至最终 1 : 10 至 1 : 100 的稀释度。在 37℃ 下用 5% CO₂ 培养 18-24 小时后,用 30mL 新鲜 FEF 生长培养基更换培养基。在培养 5-7 天后,将细胞单层用胰蛋白酶处理并重悬浮于 5-10ml 新鲜 FEF 生长培养基中。然后将 5ml 该悬浮液接种于两个含有 50mL FEF 生长培养基的 175-cm² 细胞培养烧瓶中。然后将细胞在 37℃ 下用 5% CO₂ 培养 7-10 天。为了维持存活力,培养物需要“喂养”,这通过用新鲜的 FEF 培养基替换 50% 用过的培养基来实现。在 37℃ 下用 5% CO₂ 再培养 10-14 天后,如上所述将细胞用胰蛋白酶处理并重悬浮。为了维持连续繁殖,将 1 至 2mL 感染的 FEF 细胞悬浮液流过未感染的 FEF 细胞上并在 37℃ 下用 5% CO₂ 培养。使用 4 至 14 天的培养时间,将感染的培养物传代 7 至 13 次。如上所述通过使用 IFA 和 PCR 来证实培养的 FEF 细胞中犬埃里希氏体的存在。

[0115] 实施例 3 :犬埃里希氏体再 FCWF-4 细胞的同源群体上的生长

[0116] 3.1 来感染 FCWF-4 细胞 (ATCC#CRL-2787) 的繁殖

[0117] 将一冷冻小瓶的未感染猫全肽 -4 (FCWF-4) 细胞 (ATCC 登录号 no. CRL-2787),澄清并用于接种含有 FCWF 生长培养基的 75-cm² 细胞培养烧瓶,并在 37℃ 下用 5% CO₂ 培养。FCWF 生长培养基由 E-MEM (Eagle' s 最小必需培养基,含有 Earle' s 平衡盐溶液和 2mM L- 谷氨酰胺)、1.0mM 丙酮酸钠、0.1mM 非必需氨基酸、1.5g/ 升碳酸氢钠和 10% FBS 组成。4-5 天培养后,用 0.25% 胰蛋白酶处理 90-95% 汇合的单层,并以 1 : 4 至 1 : 6 的比例分流。

[0118] 3.2 犬埃里希氏体 FCWF-4 细胞的同源群体的制备

[0119] 在用犬埃里希氏体感染之前,将未感染的 FCWF-4 细胞以 6×10^6 细胞 / 烧瓶接种于 175-cm² 烧瓶中并培养 18-24 小时。按照对于 FEF 细胞所述的将犬埃里希氏体感染的脾脏匀浆用于感染 FCWF-4 细胞,不同的是替代 FEF 生长培养基使用了 FCWF 生长培养基。如上所述通过使用 IFA 和 PCR 来证实培养的 FCWF-4 细胞中犬埃里希氏体的存在。

[0120] 实施例 4 :鼠埃里希氏体在 FEA 细胞的同源群体上的生长

[0121] 4.1 未感染 FEA 猫胚细胞的繁殖

[0122] 将一小瓶冷冻的未感染 FEA 猫胚细胞融化,澄清并用于接种含有 FEA 生长培养基的 75cm² 烧瓶,并 37℃ 下用 5% CO₂ 培养。FEA 生长培养基由 Dulbeccos MEM、2mM L- 谷氨酰胺、1.0mM 丙酮酸钠和 10% FBS 组成。在培养 7 天后,用 0.25% 胰蛋白酶处理汇合的单层并以 1 : 2 的分流比传代。

[0123] 4.2 鼠埃里希氏体感染的 FEA 猫胚细胞的同源群体的制备

[0124] 如上所述将未感染的 DH82 细胞进行繁殖,并使用鼠埃里希氏体感染的 DH82 细胞 (ATCC 保藏号 VR-1411-Asuke 菌株) 用鼠埃里希氏体来感染。用于材料的繁殖和感染的实验方案基本上按照如上对于犬埃里希氏体感染的 DH82 细胞所述的实验方案,不同的是用鼠埃里希氏体感染的 DH82 细胞替代犬埃里希氏体感染的 DH82 细胞。给小鼠腹膜内注射 0.5mL 鼠埃里希氏体感染的 DH82 细胞。

[0125] 通过脾脏和血液 DNA 的 PCR 将阳性小鼠鉴定为受鼠埃里希氏体感染的。使用 Qiagen QIAamp DNA Mini 试剂盒根据制造商的说明从血液和组织样品中纯化 DNA。使用 25-μl 反应物在 RoboCycler[®] 机器人热循环器 (Stratagene) 上的热循环实

验方案中进行 PCR, 该反应物由 2.5 μ l 10X 反应缓冲液 (Genscript), 0.2 μ l 100mM dNTP (Invitrogen), 1 μ l 10 μ M 寡核苷酸引物 1 (5' -AGA ACG AAC GCTGGC GGC AAG C-3') 和寡核苷酸引物 2 (5' -CGT ATT ACC GCG GCT GCTGGC A-3') 和 0.2 μ l 5U/ μ l Taq 聚合酶 (Genscript) 组成, 该热循环实验方案由以下步骤组成: 94°C 初步变性步骤 5 分钟, 接着 94°C 1 分钟, 60°C 1 分钟和 72°C 1 分钟的 35 个循环, 接着为 72°C 10 分钟的最终延伸步骤。

[0126] 从鼠埃里希氏体感染的小鼠获得的脾脏样品制备新鲜生长培养基中的匀浆并用于 FEA 猫胚细胞中。将 1ml 鼠埃里希氏体感染的小鼠脾脏匀浆接种于 25cm² 细胞培养烧瓶中的未感染 FEA 猫胚细胞中, 烧瓶中含有 24 小时 FEA 猫胚细胞单层 (~80% 汇合) 和 8ml FEA 生长培养基, 使得最终的匀浆稀释为 1 : 9。在 37°C 下用 5% CO₂ 培养 5-24 小时后, 用 8ml 新鲜 FEA 生长培养基更换培养基。在 5-7 天培养后, 将细胞单层进行胰蛋白酶处理并重悬浮于 2ml 新鲜 FEA 生长培养基中。将 1ml 这样的鼠埃里希氏体感染的细胞悬浮液接种于含有 24 小时 FEA 猫胚细胞单层和 30ml FEA 生长培养基的 75cm² 细胞培养烧瓶中。将细胞在 37°C 下用 5% CO₂ 培养 4-7 天。在 37°C 下用 5% CO₂, 使用 4-9 天的培养时间, 将感染的培养物传代 5 次。为了进一步传代, 将 1 至 2ml 用胰蛋白酶处理的并重悬浮于 4 至 8ml 生长培养基中的受感染细胞用于感染其他的未感染 FEA 猫胚细胞。将感染的细胞接种于含有 24- 小时大的 FEA 猫胚细胞单层的烧瓶中, 并 37°C 下用 5% CO₂ 培养 5-48 小时, 重新供给新鲜培养基, 并 37°C 下用 5% CO₂ 再培养 4-9 天。如上所述, 通过使用 IFA 和 PCR 来证实 FEA 猫胚细胞培养物中鼠埃里希氏体的存在。

[0127] 实施例 5 : 鼠埃里希氏体在 FEF 细胞的同源群体上的生长

[0128] 如上所述, 从鼠埃里希氏体感染的小鼠获得的脾脏样品制备生长培养基中的匀浆并用于感染 FEF 细胞, 并如上所述进行培养。用 0.5ml 鼠埃里希氏体感染的脾脏匀浆 / 25cm² 细胞培养烧瓶接种每个未受感染的细胞系, 烧瓶中含有 24 小时单层和 8ml 生长培养基。这使得最终的匀浆稀释度为 1 : 17。在 37°C 下用 5% CO₂ 培养 24 小时后, 用 8ml 合适的新鲜培养基更换培养基。7 天培养后, 将细胞单层用胰蛋白酶处理并将 25cm² 烧瓶的全部感染细胞内含物接种于含有 30ml 新鲜培养基的 75cm² 烧瓶中 (这是 1 : 3.75 的分流)。在 37°C 下用 5% CO₂, 使用 7-8 天的培养时间, 将感染的培养物传代 2 次。如上所述, 通过使用 IFA 和 PCR 来证实细胞培养物中鼠埃里希氏体的存在。

[0129] 实施例 6 : 鼠埃里希氏体在 FCWF-4 细胞同源群体上的生长

[0130] 如上所述, 从鼠埃里希氏体感染的小鼠获得的脾脏样品制备生长培养基中的匀浆并用于感染 FCWF-4 细胞, 并如上所述进行培养。用 0.5ml 鼠埃里希氏体感染的脾脏匀浆 / 25cm² 细胞培养烧瓶接种每个未受感染的细胞系, 烧瓶中含有 24 小时单层和 8ml 生长培养基。这使得最终的匀浆稀释度为 1 : 17。在 37°C 下用 5% CO₂ 培养 24 小时后, 用 8ml 合适的新鲜培养基更换培养基。7 天培养后, 将细胞单层用胰蛋白酶处理并将 25cm² 烧瓶的全部感染细胞内含物接种于含有 30ml 新鲜培养基的 75cm² 烧瓶中 (这是 1 : 3.75 的分流)。在 37°C 下用 5% CO₂, 使用 7-8 天的培养时间, 将感染的培养物传代 2 次。如上所述, 通过使用 IFA 和 PCR 来证实细胞培养物中鼠埃里希氏体的存在。

[0131] 实施例 7 : 用里氏新立克次氏体感染的 P388D1 细胞感染 FEF

[0132] 如上所述制备用来自里氏新立克次氏体感染的 P388D1 细胞的里氏新立克次氏体

感染 FEF 细胞的材料,或按照之前 Vemulapalli, R. 等中所述的, J. Clin. Micro. 33(11) : 2987-2993(1995),或按照之前美国专利 4, 759, 927 中所述的,在此将其全部引入作为参考。

[0133] 将用里氏新立克次氏体 90-12 株感染的 P388D1 细胞(ATCC 保藏号 CCL-46)以 0.0006 至 0.0028 的感染复数(MOI)加入含有 3-4 天大的 FEF 细胞单层的 850-cm² 转瓶中。在感染之前,用 300ml 用于感染的培养基更换转瓶中用过的培养基。在所示的 MOI 下接种后,将转瓶在 37℃ 培养,未用 CO₂。所测试的培养基包括但不限于 D-MEM、MEM Earles 和 M6B8; 使用了 0 至 5% FBS。当细胞病变效应(CPE)达到 75%至 85%时(这根据所用的 MOI 需要 8-16 天),收集感染的培养物。所观察的 CPE 包括感染细胞的膨胀、圆形形状和剥离。通过轻敲转瓶的侧壁将细胞移入培养基中来收集培养物。使用标准 IFA 实验方案对细胞证实了感染的存在,这些细胞在 96-孔平板中已经用 70%丙酮和 30%甲醇固定了,该平板中含有里氏新立克次氏体单克隆抗体和荧光素标记的山羊抗小鼠 IgG(Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX)。

[0134] 实施例 8:用鼠埃里希氏体感染 MA-104

[0135] 8.1 未感染 MA-104 细胞的繁殖

[0136] 将一小瓶冷冻的 MA-104 细胞(猴胚肾上皮细胞,ATCC 保藏号 CRL-2378.1)融化,澄清并用于接种含有 MA-104 生长培养基的 75-cm² 细胞培养烧瓶,并在 37℃ 下用 5% CO₂ 培养。MA-104 生长培养基由含有 Earles BSS 和 2mM L-谷氨酰胺(EMEM)的 Eagles 最小必需培养基组成,其补充了 1.0mM 丙酮酸钠,0.1mM 非必需氨基酸,1.5g/l 碳酸氢钠和另外的 1% L-谷氨酰胺和 10% FBS。培养 5-7 天后,当单层为 90-95%汇合时,即可将培养物用于传代。用 0.25%胰蛋白酶处理后,以 1 : 5 至 1 : 10 的分流比将细胞传代。

[0137] 8.2 鼠埃里希氏体感染的 MA-104 细胞同源群体的繁殖

[0138] 从鼠埃里希氏体感染的小鼠获得的脾脏样品制备匀浆并用于感染 MA-104 细胞。将鼠埃里希氏体感染的小鼠脾匀浆用于覆盖 25-cm² 细胞培养烧瓶中的 MA-104 细胞。用 1 : 91 稀释度的脾匀浆(9ml 现有的 24 小时烧瓶培养基中 0.1ml 脾匀浆)接种~ 85%汇合的二十四小时大的 MA-104 单层。

[0139] MA-104 生长培养基由含有 Earles BSS 和 2mM L-谷氨酰胺(EMEM)的 Eagles 最小必需培养基组成,其补充了 1.0mM 丙酮酸钠,0.1mM 非必需氨基酸,1.5g/l 碳酸氢钠和另外的 1% L-谷氨酰胺和 10% FBS。在 37℃ 下用 5% CO₂ 培养 5 天后,用胰蛋白酶处理细胞并将所有细胞重悬浮于 30ml 新鲜 MA-104 生长培养基中;然后将该 30ml 分配至 75cm² 细胞培养烧瓶中。在 37℃ 下用 5% CO₂ 培养 8 天后,用胰蛋白酶处理这些细胞并将所有细胞重悬浮于 50ml 新鲜 MA-104 生长培养基中;然后将该 50ml 分配至 175cm² 培养烧瓶中。为了进一步传代,将 3ml 胰蛋白酶处理的且重悬浮于 9-10ml 生长培养基中的感染细胞接种到 175cm² 细胞培养烧瓶中的 50ml 新鲜生长培养基中。当受感染细胞中细胞病变效应显现出进展时,在传代过程中加入未感染的 MA-104 细胞,感染细胞变稀少,或感染细胞显示出虚弱。对于感染细胞在 37℃ 下用 5% CO₂ 的培养范围为 5-8 天。通过使用 IFA 来证实所培养的 MA-104 细胞中鼠埃里希氏体的存在。

[0140] * * * * *

[0141] 在此将所有专利、公开的专利申请和其他出版物以其整体引入作为参考。