



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103261214 B

(45)授权公告日 2016.10.26

(21)申请号 201180061881.2

(22)申请日 2011.12.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103261214 A

(43)申请公布日 2013.08.21

(30)优先权数据
11152829.5 2011.02.01 EP
61/425855 2010.12.22 US
61/556975 2011.11.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.06.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2011/003100 2011.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/085642 EN 2012.06.28

(73)专利权人 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 K.A.奥康内尔 R.拉夫勒尔
G.J.胡查帕 T.L.瓦斯莫恩

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 刘健 万雪松

(51)Int.Cl.

C07K 14/235(2006.01)

C12N 1/00(2006.01)

A61K 39/10(2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

A61K 39/155(2006.01)

A61K 39/295(2006.01)

(56)对比文件

CN 1246867 A,2000.03.08,

KR 20080082883 A,2008.09.12,

陈伟等.减毒沙门氏菌作为DNA疫苗载体的
研究进展.《生物技术通报》.2010,(第2期),

Jason D Mearthur et al.An aromatic
amino acid auxothrophic mutant of
Bordetella bronchiseptica is attenuated
and immunogenic in a mouse model of
infection.《FEMS microbiology letters》
.2003,第221卷(第1期),

审查员 黎舒婷

权利要求书1页 说明书24页

(54)发明名称

具有活细菌分离物的用于全身施用的疫苗

(57)摘要

本发明涉及包含活的aro突变细菌、佐剂、芳香族添加剂、或佐剂和芳香族添加剂二者的适于全身施用的疫苗。本发明还涉及该疫苗的制造和通过施用该疫苗而保护动物的方法。

1. 用于保护动物免于支气管败血性博德特氏菌(*B. bronchiseptica*)感染导致的临床疾病的疫苗,所述疫苗包含活的aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株和芳香族添加剂;其中所述疫苗适于全身施用;其中所述活的aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株是活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株;且其中所述芳香族添加剂包含酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。

2. 权利要求1的疫苗,其中所述芳香族添加剂进一步包含对氨基苯甲酸。

3. 权利要求2的疫苗,其中所述芳香族添加剂进一步包含2,3-二羟基苯甲酸。

4. 权利要求1的疫苗,其进一步包含佐剂。

5. 权利要求4的疫苗,其中所述佐剂包含铝盐。

6. 权利要求5的疫苗,其中所述铝盐选自磷酸铝、硫酸铝钾和氢氧化铝。

7. 权利要求6的疫苗,其进一步包含犬流感病毒抗原、犬副流感病毒抗原,或犬流感病毒抗原和犬副流感病毒抗原两者。

8. 权利要求1的疫苗,其中所述芳香族添加剂进一步包含对氨基苯甲酸和2,3-二羟基苯甲酸。

9. 权利要求1的疫苗,其进一步包含犬流感病毒抗原、犬副流感病毒抗原,或犬流感病毒抗原和犬副流感病毒抗原两者。

10. 权利要求9的疫苗,其中所述犬流感病毒抗原是灭活的犬流感病毒,并且所述犬副流感病毒抗原是修饰的活犬副流感病毒。

11. 权利要求10的疫苗,其中所述活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株和所述修饰的活犬副流感病毒在冻干球中,并且所述灭活的犬流感病毒在稀释液中。

12. 活的aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株和芳香族添加剂在制备药物中的用途,所述药物用于帮助保护犬免于支气管败血性博德特氏菌感染导致的临床疾病;其中所述活的aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株是活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株;且其中所述芳香族添加剂包含酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。

13. 活的aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株和芳香族添加剂在制备药物中的用途,所述药物用于帮助保护动物免于支气管败血性博德特氏菌感染导致的临床疾病;其中所述活的aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株是活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株;且其中所述芳香族添加剂包含酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。

具有活细菌分离物的用于全身施用的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及包含活的减毒细菌分离物的用于全身施用的疫苗。本发明还涉及这些疫苗的制造和接种动物受试者的方法。

技术背景

[0002] 支气管败血性博德特氏杆菌(*B. bronchiseptica*) 是一种高度感染性革兰氏阴性细菌,其可以有效地在健康的纤毛呼吸道粘膜形成菌落,以便在广泛的宿主物种中导致呼吸道感染。因此,支气管败血性博德特氏杆菌是在猪中萎缩性鼻炎和狗中犬舍咳(kennel cough)两者的病原体。

[0003] 但值得注意的是,人类远远更容易被更有名的百日咳博德特氏杆菌(*B. pertussis*)感染,对其人类是唯一的天然目标[参见,Stevenson和Roberts, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 37:121-128 (2003)]。另外,与百日咳博德特氏杆菌不同,支气管败血性博德特氏菌不表达百日咳毒素。并且,虽然不知道百日咳博德特氏杆菌感染导致在上呼吸道中长期的定殖,但是支气管败血性博德特氏菌在很多不同的动物物种的上呼吸道中导致慢性感染。一致地,虽然活的百日咳博德特氏杆菌疫苗的全身施用最近被建议用于人受试者[参见,美国公开号2009/0246222A1],但是直到目前,活的减毒支气管败血性博德特氏菌疫苗尚未被设计用于局部鼻内施用于非人动物,例如Nobivac® KC和Intra-Trac II (来自Merck Animal Health), Recombitek® KC2 (来自Merial)和Bronchi-Shield III (来自Fort Dodge)。

[0004] 产生活的减毒细菌的一个特别的途径是修饰该细菌的一个或多个关键基因。在很多微生物中,分支酸是重要的芳香族化合物,包括叶酸和三种芳香族氨基酸:苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的生物合成中的关键中间体[Moat等, *Microbial Physiology* (2002) Wiley-Liss, 第15章, 第525-527页]。因此,分支酸生物合成途径中基因,例如aroA的失活,已被用于产生活的减毒细菌。相应地,很多在其aroA基因中包含缺失的细菌已被构建,包括:溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)、出血败血性巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)、催眠嗜血杆菌(*Hemophilus somnus*) [参见,例如 Briggs, 和Tatum, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11) 7187-7195 (2005); Tatum 和 Briggs, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11) 7196-7202. (2005); 美国专利号5,840,556]、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) [Dougan 等, *Molecular and General Genetics*, 207(2-3) 402-405 (1987)、和百日咳博德特氏杆菌 [Roberts et al., *Infectious Immunology* 58:732-739 (1990)]。然而迄今为止,含有这种aroA突变细菌的疫苗,在大多数情况下,表现出最小限度的成功,如果有的话,参见例如,美国公开号2009/0246222 A1第[0133]段,其具体提到包含具有aroA缺失的百日咳博德特氏杆菌疫苗的相当有限的成功,并且其反而强烈推荐使用在编码三种主要的百日咳博德特氏杆菌毒素中一种的基因内具有突变的无毒的活的百日咳博德特氏杆菌构建体。

[0005] 支气管败血性博德特氏菌的一种aroA缺失菌株也已被构建[Stevenson 和

Roberts, Vaccine 20, 2325-2335 (2002)]。这些工作者只是将他们的缺失aroA支气管败血性博德特氏菌菌株用于鼻内疫苗中。然而鼻内疫苗不便于施用,尤其不便于施用于成体动物,例如犬或猫,其经常抵制任何物质的施用到它们的鼻孔中。施用这些鼻内疫苗还产生风险,即如果动物在施用时打喷嚏,动物摄入的疫苗量将显著少于显示有保护性的剂量。另一方面,迄今为止,活疫苗的全身施用尚未被认为是安全的选择,因为已知活的支气管败血性博德特氏菌的全身施用,即使当减毒时,可以导致严重的脓肿形成[参见,例如Toshach等, J Am Anim Hosp Assoc 33:126-128 (1997)]。

[0006] 几个灭活的全细胞和亚单位支气管败血性博德特氏菌疫苗也已描述用于对狗的肠胃外施用,包括灭活的全细胞支气管败血性博德特氏菌疫苗Bronchicine® CAe,其来自Pfizer Animal Health。不幸的是,这些灭活的支气管败血性博德特氏菌疫苗也有几个缺点。例如,脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌固有的,并且因此,灭活的支气管败血性博德特氏菌疫苗的全身施用可能导致LPS引起的内毒素休克。因此,灭活疫苗需要高度纯化以最小化LPS的量。这些纯化使疫苗的制造更加复杂,经常导致有效抗原的丢失,并从而增加生产的总体成本。因此,仍然有获得安全和有效的针对支气管败血性博德特氏菌用于全身施用疫苗的需要。

[0007] 本文任何参考文献的引用不应解释为承认这些参考文献作为本申请的现有技术。

[0008] 发明概述

[0009] 为了克服上文示例的目前疫苗的缺陷,本发明提供了针对细菌感染的新疫苗,及其相应的免疫原性组合物。本发明还提供向动物施用这些疫苗的方法。本发明进一步提供通过施用本发明的疫苗,在动物中预防疾病的方法。在特定的实施方案中,动物是犬。在其它的实施方案中,动物是猫。在另一些其它的实施方案中,动物是猪。

[0010] 在特定的实施方案中,疫苗包含适于全身施用的形式的活的aro突变细菌。在某些实施方案中,活的aro突变细菌是活的aroA突变细菌。在特定的实施方案中,细菌为支气管败血性博德特氏菌。在此类的某些实施方案中,疫苗包含活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株。在本发明特定的实施方案中,疫苗可以帮助保护动物和/或保护动物免于支气管败血性博德特氏菌感染导致的病症和/或临床疾病。

[0011] 本发明的疫苗可以包含活的aro突变细菌和芳香族添加剂。在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含酪氨酸。在某些实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含色氨酸。在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸。在某些实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含对氨基苯甲酸。在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含2,3-二羟基苯甲酸。在某些实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含叶酸。在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含肠杆菌素。

[0012] 在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含多种芳香族化合物。本发明疫苗的芳香族添加剂可以包含两种或更多种这些芳香族化合物的任意组合的实施方案。在某些实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸和色氨酸。在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸和酪氨酸。在某些实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含酪氨酸和色氨酸。在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。

[0013] 在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含对氨基苯甲酸和2,3-二羟

基苯甲酸。在某些实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含2,3-二羟基苯甲酸和叶酸。在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含叶酸和肠杆菌素。在某些实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含对氨基苯甲酸和肠杆菌素。

[0014] 在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和对氨基苯甲酸。在某些实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和叶酸。在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和2,3-二羟基苯甲酸。在某些实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和肠杆菌素。在特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、对氨基苯甲酸和2,3-二羟基苯甲酸。

[0015] 在某些实施方案中,本发明疫苗包含佐剂。在此类的特定的实施方案中,佐剂为铝盐。在某些实施方案中,铝盐为磷酸铝。在其它实施方案中,铝盐为氢氧化铝。在另一些其它实施方案中,铝盐为硫酸铝钾。在特定的实施方案中,本发明疫苗包含芳香族添加剂和佐剂。在具体实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和对氨基苯甲酸,并且佐剂为氢氧化铝。在此类的特定的实施方案中,本发明疫苗的芳香族添加剂包含苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、对氨基苯甲酸和2,3-二羟基苯甲酸,并且佐剂为氢氧化铝。

[0016] 本发明还提供多价疫苗。像本发明的所有疫苗一样,本发明的多价疫苗可以包含芳香族添加剂和/或佐剂。在某些实施方案中,疫苗包含活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌和犬副流感病毒(CPI)抗原。在特定的实施方案中,犬副流感病毒抗原是修饰的活的副流感病毒。在某些实施方案中,疫苗包含活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌和犬流感病毒(CIV)抗原。在特定的实施方案中,犬流感病毒抗原是灭活的犬流感病毒。在某些实施方案中,疫苗包含活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌以及犬流感病毒抗原和犬副流感病毒抗原两者。在此类的具体实施方案中,犬流感病毒抗原是灭活的犬流感病毒,并且犬副流感病毒抗原是修饰的活的副流感病毒。

[0017] 具体的本发明多价疫苗抗原可以包含活的支气管败血性博德特氏菌aroA突变体,其包含编码外源抗原(如来自另一个病原体的抗原)的异源核酸。异源核酸可操作地连接到启动子,从而允许支气管败血性博德特氏菌aroA突变体表达该外源抗原。在此类的某些实施方案中,异源核酸编码病毒抗原。在此类的特定的实施方案中,病毒抗原为流感病毒抗原。在相关的实施方案中,流感病毒抗原来自犬流感病毒。在其它的实施方案中,流感病毒抗原来自猫流感病毒。在另一些其它实施方案中,流感病毒抗原来自猪流感病毒。在某些实施方案中,流感病毒抗原是血凝素。在其它实施方案中,流感病毒抗原是神经氨酸酶。

[0018] 在更具体的实施方案中,病毒抗原是犬流感病毒H3血凝素。在其它实施方案中,异源核酸编码犬流感病毒H3血凝素的抗原片段。在另一些其它实施方案中,异源核酸编码犬流感病毒N8神经氨酸酶。在又一些其它实施方案中,异源核酸编码犬流感病毒N2神经氨酸酶。在另一些其它实施方案中,支气管败血性博德特氏菌aroA突变体包含多个异源核酸。在此类的特定的实施方案中,支气管败血性博德特氏菌aroA突变体包含编码犬流感病毒H3血凝素的异源核酸和编码犬流感病毒N8神经氨酸酶的异源核酸两者。在此类的另一些其它实施方案中,异源核酸编码犬流感病毒的H3血凝素和N2神经氨酸酶两者。

[0019] 在更具体的实施方案中,这些多价疫苗进一步包含芳香族添加剂和/或铝盐佐剂。在一个这种实施方案中,多价疫苗包含芳香族添加剂和/或铝盐佐剂,和包含与启动子可操

作地连接的犬流感病毒H3血凝素的活的支气管败血性博德特氏菌aroA突变体。在某些实施方案中,这些多价疫苗进一步包含修饰的活的副流感病毒。

[0020] 本发明所有的疫苗可以被冻干和/或具有冻干的其中部分(如,级分)。在特定的实施方案中,冻干的疫苗或其部分是以冻干饼的形式。在相关的实施方案中,冻干的疫苗或其部分是以冻干球的形式。在另一些其它的实施方案中,冻干的疫苗或其部分是以冻干椭圆和/或椭球的形式。

[0021] 因此,本发明的疫苗可以包括两个或更多个不同部分(如,级分)并且至少一部分是冻干级分。在此类的相关实施方案中,至少一个其它部分是液体。在此类的某些实施方案中,至少一部分是冻干的并且至少一个其它部分是液体稀释液。在特定的实施方案中,本发明多价疫苗的冻干部分包含一种或多种抗原,稀释液包含一种或多种不同的抗原。在此类的更特定的实施方案中,多价疫苗的冻干部分包含活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌。在此类的具体实施方案中,多价疫苗的冻干部分包含活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌和修饰的活的犬副流感病毒。

[0022] 在相关的实施方案中,稀释液包含灭活的犬流感病毒。在特定的实施方案中,稀释液包含芳香族添加剂和/或佐剂。在某些实施方案中,多价疫苗的冻干部分进一步包含芳香族添加剂和/或佐剂。在特定的实施方案中,多价疫苗的冻干部分和稀释液两者均包含芳香族添加剂和/或佐剂。在具体的实施方案中,多价疫苗冻干的部分包含活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌和犬副流感病毒,以及芳香族添加剂,而稀释液包含灭活的犬流感病毒和佐剂。在更具体的实施方案中,佐剂是2到5%氢氧化铝。

[0023] 本发明进一步提供了帮助保护动物(包括人)免于支气管败血性博德特氏菌感染导致的临床疾病的方法。在特定的实施方案中,所述方法包含向动物全身施用本发明的疫苗。在此类的某些实施方案中,动物为哺乳动物。在特定的实施方案中,哺乳动物为猪。在其它实施方案中,哺乳动物为犬。在另一些其它的实施方案中,哺乳动物为猫。在某些实施方案中,全身施用本发明的疫苗是通过皮下疫苗接种进行的。

[0024] 本发明还提供了活的aro突变支气管败血性博德特氏菌在制造疫苗中的用途,所述疫苗用于保护动物免于支气管败血性博德特氏菌感染导致的临床疾病。优选地,疫苗是适于全身施用的形式。在此类的某些实施方案中,疫苗进一步包含佐剂。在特定的实施方案中,佐剂为铝盐。在更特定的实施方案中,铝盐为氢氧化铝。在更多其它的实施方案中,铝盐为磷酸铝。在其它实施方案中,铝盐为硫酸铝钾。

[0025] 在某些实施方案中,疫苗进一步包含芳香族添加剂。在特定的实施方案中,疫苗包含佐剂和芳香族添加剂两者。在更具体的实施方案中,佐剂是氢氧化铝,并且芳香族添加剂包含苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、对氨基苯甲酸和2,3-二羟基苯甲酸。

[0026] 本发明的这些和其它方面将通过参考下面详述更好的被理解。

[0027] 发明详述

[0028] 与灭活抗原不同,本发明的活的aro突变细菌是减毒的。因此,必须注意,当配制疫苗时,保持减毒细菌的滴度安全地低于可以导致显著不良事件的水平。但是,达到该安全水平经常导致活的减毒疫苗的效价实质的下降。本发明通过增加疫苗的效价而不增加加入疫苗的活的减毒细菌的滴度克服了此问题。另外,本发明通过显著地减少制造安全和有效的疫苗必需的活的减毒细菌的量,提供了降低提供的疫苗制造成本的手段。

[0029] 因此,本发明提供包含活的aro突变细菌的适于全身施用的形式的安全和有效的疫苗。在一方面,本发明提供包含活的aro突变细菌和芳香族添加剂的疫苗。在特定的实施方案中,活的aro突变细菌是aroA突变细菌。令人惊讶地,当芳香族添加剂加入该疫苗组合物时,包含活的aroA突变细菌的疫苗的效价被发现显著增加,而不导致不可接受的注射部位反应。

[0030] 在另一方面,本发明提供活的减毒疫苗,其由于佐剂的存在显示更高的效价。经常地,这种通过加入佐剂获得的效价的增加严重放大负面的副作用。因此,预料不到地发现包含支气管败血性博德特氏菌aro突变体的疫苗效价可以通过加入佐剂而改善,但其安全性仍然保持在可接受的水平。此结果尤其导致这些疫苗的有效剂量的范围增加。

[0031] 在另一个方面,本发明提供活的减毒的aro突变细菌疫苗,其由于佐剂和芳香族添加剂两者的存在而显示更高的效价,但疫苗安全性仍然保持在可接受的水平。

[0032] 本发明进一步提供使用活的支气管败血性博德特氏菌aro突变体制造用于全身施用的疫苗的方法,所述疫苗用于保护动物免于支气管败血性博德特氏菌感染导致的临床疾病。本发明还涉及保护动物免于支气管败血性博德特氏菌感染导致的临床疾病的方法,其包括全身施用包含活的aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株的疫苗。

[0033] 如本文所用的下列术语应具有下文所列的定义:

[0034] 如本文所用,“疫苗”是一种适于应用到动物(包括,在某些实施方案中,人)的组合物,包含一种或多种抗原典型地连同药学可接受的载体,例如含水的液体,其在施用于动物后诱导免疫应答,所述免疫应答足够强烈以最低限度的帮助保护免于野生型微生物感染引起的临床疾病,即足够强烈以帮助预防临床疾病,和/或预防、改善或治疗临床疾病。

[0035] 如本文所用,“多价疫苗”是包含两种或更多种不同抗原的疫苗。在此类的特定的实施方案中,多价疫苗刺激受体的免疫系统抵抗两种或更多种不同病原体。

[0036] 如本文所用,术语“保护”或“提供保护”和“帮助保护”不需要完全保护免于感染的任何适应症。例如,“帮助保护”可以指保护足以使攻击后,潜在感染的症状至少减少,和/或导致症状的一种或多种潜在的细胞的、生理的或生物化学的原因或机制减少和/或消除。可以理解,如本文所用,“减少”指相对于感染的状态,包括感染的分子状态,不仅是感染的生理状态。

[0037] 如本文所用,术语“药学可接受的”是作形容词使用以指被修饰的名词适合用在药学产品中。当其用于,例如,描述药学疫苗中的赋形剂时,其表征该赋形剂是与组合物的其它成分相容,并且不会对意向受体不利地有害。

[0038] 术语“载体”指与化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。药学可接受的载体是无菌液体,例如水和/或油,包括那些石油、动物、植物或合成的来源,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。水或含水溶液盐溶液和含水葡萄糖和甘油溶液可以用作载体,特别是对于可注射的溶液。

[0039] 如本文所用,“佐剂”是一种物质,其能够促进或增大免疫事件的级联,最终导致更好的免疫应答,即对抗原的综合的机体应答。佐剂通常对于免疫应答的发生是不需要的,但是促进或增大此应答。

[0040] 如本文所用,“全身施用”是施用到机体的循环系统(包括心血管和淋巴系统),从而影响机体整体,而不是特定位置例如胃肠道(经由,例如口或直肠施用)和呼吸系统(经由

如鼻内施用)。全身施用可以进行例如,通过施用到肌肉组织(肌肉内),到真皮(皮内,经皮,或皮上),到皮肤下面(皮下),到粘膜下面(粘膜下),到静脉内(静脉内)等。

[0041] “肠胃外施用”包括皮下注射、粘膜下注射、静脉内注射、肌肉内注射、真皮内注射和输注。

[0042] 如本文所用,术语“犬”包括所有的家养的狗,狼犬科(*Canis Lupus familiaries*)或家狗科(*Canis familiaries*),除非另有说明。

[0043] 如本文所用,术语“猫”指猫科的任何成员。此科的成员包括野生、动物园、和家养成员,如任何猫亚科的成员,例如,猫、狮、虎、美洲狮、美洲虎、豹、雪豹、黑豹、北美山地狮、猎豹、猢狲、山猫、野猫或其任何杂交品种。猫还包括家猫,纯种和/或杂种的伴猫、表演猫、实验室猫、克隆猫、和野生的或流浪猫。

[0044] 如本文所用,细菌中基因的“遗传改变”可以由于突变和/或缺失和/或插入基因并可以包括天然发生,和/或实验室设置中和通过设计如通过细胞传代,和/或通过一个或多个重组遗传方法发生的遗传事件。

[0045] 如本文所用,“aro突变”细菌是不能合成分支酸或比相应的野生型细菌合成显著更少的分支酸的细菌,从而结果导致在非添加的培养基、环境,或背景中细菌生长的显著抑制和/或阻断。aroA突变细菌可以产生于分支酸生物合成途径中基因的遗传改变和/或导致其相应基因产物(即该基因编码的酶)相当的抑制和/或失活的翻译后功能失常。

[0046] 如本文所用,“aroA突变”细菌是aro突变细菌,其中遗传改变是在aroA基因中和/或由于导致类似的相应aroA基因产物的抑制和/或失活的翻译后功能失常。

[0047] 如本文所用,“芳香族添加剂”是包含一种或多种芳香族化合物的组合物,所述芳香族化合物能补偿,至少部分补偿,aro突变细菌(如aroA突变体)的低效生长。从而,在培养基、环境、和/或背景中芳香族添加剂的存在使aro突变细菌可以更有效地生长。因此,芳香族添加剂可以包括一个或多个其中分支酸为中间体的生物合成途径中的终产物(例如,芳香族氨基酸如丙氨酸)和/或另外的在包含分支酸的生物合成途径中将被后续生物合成为分支酸的中间体(例如,对氨基苯甲酸,其为叶酸生物合成途径的一个中间体)。芳香族添加剂还可以包含分支酸的另外来源和/或aro突变细菌中已被不良影响的分支酸生物合成途径内一种或多种中间体的另外来源。

[0048] 分支酸途径:分支酸是苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、叶酸、泛醌和肠杆菌素(一种铁载体)生物合成中的重要中间体[参见,Moat等, *Microbial Physiology* (2002) Wiley-Liss, 第15章, 第525-527页]。反应物,编码相关酶的基因,和从D-赤藓糖-4-磷酸与磷酸烯醇式丙酮酸组合开始,到分支酸的生物合成结束的前分支酸生物合成代谢途径产物提供如下:

[0049] 其中:

[0050] PEP是磷酸烯醇式丙酮酸;

[0051] DAHP是3-羟基-L-阿拉伯-庚酮糖酸 7-磷酸;

[0052] 3-P-莽草酸是3-磷酸-莽草酸;并且

[0053] EEPK是3-烯酰-丙酮酰-3-磷酸莽草酸。

	一种或多种 反应物(s)	一种或多种 基因(s)	一种或多种 产物(s)
	* <u>D-赤藓糖-4-磷酸 + PEP</u>	-- aro (F, G, H) ->	DAHP
	* DAHP	-- aro B ->	3-二氢奎尼酸
[0054]	* 3-二氢奎尼酸	-- aro D ->	3-二氢-莽草酸
	* 3-二氢-莽草酸	-- aro E ->	莽草酸
	* 莽草酸 + ATP	-- aro (K, L) ->	3-P- 莽草酸 + ADP
	* 3-P- 莽草酸 + PEP	-- aro A ->	EEPK
	* EEPK	-- aro C ->	分支酸

[0055] 如可以看到,下列顺序的aro基因(编码来自F、G、H的同工酶)、B、D、E、(编码来自K、L的同工酶)、A、和C参与支气管败血性博德特氏菌中分支酸的合成。在支气管败血性博德特氏菌中,分支酸的生物合成似乎没有旁路。因此,这些aro基因中任意一个或相应基因产物的失活会导致关键的芳香族化合物的生物合成中同样的阻断。

[0056] 在特定的实施方案中,支气管败血性博德特氏菌细菌的aro突变体是aroA突变体,尽管如上文提到,支气管败血性博德特氏菌的其它aro基因中的缺失可以导致分支酸合成中同样的阻断,并且从而导致同样的突变细菌的表型。

[0057] 疫苗

[0058] 本发明提供包含活的减毒细菌用于全身施用的安全有效的疫苗。可以预期到该疫苗可以进一步包含一种或多种常规的药学可接受的载体,包括佐剂(参见下文),其它免疫应答增强剂,和/或媒介物(统称为“赋形剂”)。这些赋形剂通常选择为与疫苗中的一种或多种活性成分是相容的。赋形剂的使用对于疫苗开发领域的技术人员是普遍知晓的。

[0059] 稳定剂成分可包括:糖和糖醇(如蔗糖,葡萄糖,海藻糖,山梨糖醇),明胶蛋白水解物(乳清蛋白水解物,NZ Amine),血清白蛋白(牛血清白蛋白,卵清蛋白),和缓冲化合物。任选地和/或另外,其它物质如稳定剂和粘度改进剂可以加入疫苗,取决于疫苗的目的用途或所需性质。疫苗的很多形式适于全身施用,例如具有溶解的、乳化的或悬浮的抗原的液体制剂,和固体制剂,例如植入物或液体中悬浮的固体抗原载体。疫苗的全身疫苗接种和用于这种疫苗接种的适合的物理形式已经为人所知很多年了。

[0060] 还可以预期疫苗可以冷冻干燥(冻干的)或另外减少液体体积用于储存,然后在施用前或施用时重构在液体稀释剂中。这些重构可以使用例如疫苗级的水实现。在某些实施方案中,如下文示例,多价疫苗的冻干部分可以包含一种或多种抗原,而稀释液可以包含一种或多种不同抗原。

[0061] 在特定的实施方案中,本发明的疫苗(或其部分)可以是冻干形式。这些冻干形式的实例包括:饼、片、球、和/或椭球,后三种形式能够通过W02010/125084中所述方法生产,在此通过引用整体并入。特别地,实例参照W02010/125084的从第15页,第28行到第27页第9行,描述了生产这些快速崩解片/球/椭球的方法。这些冻干形式可以易于溶解在稀释液中,使疫苗能够全身施用。这些稀释液也可以进一步包含一种或多种额外的疫苗活性成分。

[0062] 佐剂:如上文所表明,本发明的疫苗可以包含佐剂。在更特定的实施方案中,佐剂包含铝盐。铝盐作为佐剂的用途对于疫苗开发领域的技术人员是熟知的。铝盐已开发特别用于基于类毒素的疫苗,但是还没有用于涉及其它亚单位疫苗和含灭活(全)微生物的疫

苗。涉及活的病毒疫苗中铝盐的使用也已经描述,尽管铝盐典型地不用于增加活的细菌疫苗的效价。然而令人惊讶地,铝盐可以结合活的支气管败血性博德特氏菌的事实似乎对于活的支气管败血性博德特氏菌aro突变菌株的这些盐的佐剂性质没有负面的影响。结合熟知的这些佐剂的安全记录,这使其应用相比其它佐剂,例如碳氢化合物油,皂苷等更加优选。在改善的实施方案中,铝盐选自磷酸铝、磷酸铝钾和氢氧化铝。

[0063] 加入特定的本发明疫苗的佐剂的最优量可以取决于一些变量而变化,例如疫苗中存在的抗原和疫苗接种的物种,但是可以被疫苗开发所属领域的技术人员在本公开的帮助下容易的测定。在本发明的某些实施方案中,疫苗中氢氧化铝、磷酸铝钾和/或磷酸铝的量可以在0.5到15%之间。在更特定的实施方案中,氢氧化铝、磷酸铝钾和/或磷酸铝的量可以在1.0到10%之间,并且在甚至更特定的实施方案中,疫苗中氢氧化铝、磷酸铝钾和/或磷酸铝的量可以在1.5到7.5%之间。如下文所示例,疫苗中氢氧化铝或磷酸铝的量是约2%或可选的约5%。

[0064] aroA mix:如上文所表明,本发明的aro突变细菌疫苗可以包含芳香族添加剂。芳香族添加剂可以包含一种或多种芳香族化合物。这些芳香族化合物的实例包括但不限于:苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、预苯酸、邻氨基苯甲酸、吡啶、对氨基苯甲酸、叶酸、2,3-二羟基苯甲酸、和肠杆菌素[参见,例如 Moat等, Microbial Physiology (2002) Wiley-Liss, 第15章, 第525-527页]。芳香族添加剂还可以包含分支酸的另外来源和/或aroA突变菌株中已被不良影响的分支酸生物合成途径内一种或多种中间体的另外来源。在某些实施方案中,抗氧化剂和/或螯合剂可以与芳香族添加剂一起被包含。

[0065] 包含在加入特定的本发明疫苗的芳香族添加剂中的芳香族化合物的最优量可以取决于一些变量而变化,例如芳香族化合物本身、用于芳香族化合物的溶剂系统、疫苗中存在的抗原和疫苗接种的物种,但是可以被疫苗开发所属领域的技术人员在本公开的帮助下容易的测定。在本发明的某些实施方案中,疫苗中芳香族添加剂的每种芳香族氨基酸的量可以从4 μ g/mL到0.4mg/mL变化。在特定的实施方案中,疫苗中每种芳香族氨基酸的量可以从10 μ g/mL到0.2mg/mL变化。在更特定的实施方案中,疫苗中每种芳香族氨基酸的量可以从20 μ g/mL到0.1mg/mL变化。在甚至更特定的实施方案中,疫苗中每种芳香族氨基酸的量可以从30 μ g/mL到60 μ g/mL变化。如下文示例,疫苗中苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的个别的量是约40 μ g/mL。

[0066] 在本发明的某些实施方案中,疫苗中不在芳香族氨基酸生物合成途径中的任何特定的芳香族化合物的量可以从1 μ g/mL到0.1mg/mL变化。在特定的实施方案中,疫苗中这些芳香族化合物的量可以从2.5 μ g/mL到50 μ g/mL变化。在更特定的实施方案中,疫苗中这些芳香族化合物的量在疫苗中可以从5 μ g/mL到20 μ g/mL变化。如下文示例,疫苗中2,3-二羟基苯甲酸和对氨基苯甲酸的个别的量是5到10 μ g/mL。

[0067] 多价疫苗:本发明还提供多价疫苗。在一个实施方案中,包含本发明的活的减毒的支气管败血性博德特氏菌aro突变体的疫苗另外包含犬流感病毒(CIV)抗原和/或犬副流感病毒(CPI)抗原。根据此实施方案的疫苗应提供对狗中犬舍咳和/或犬传染性呼吸道疾病(CIRD)复合物的保护。

[0068] 可以与本发明的活的减毒aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株(和/或另一种活的减毒aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株)和/或犬流感病毒抗原和/或犬副流感病毒

抗原组合形成多价疫苗的其它抗原的实例包括以下一个或多个：犬瘟热病毒、2型犬腺病毒、犬细小病毒、犬肺病毒、犬冠状病毒、犬疱疹病毒、狂犬病病毒、支原体菌种(*Mycoplasma species*)、犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)、红孢子虫属菌种(*Anaplasma species*)、犬钩端螺旋体(*Leptospira canicola*)、感冒伤寒型钩端螺旋体(*Leptospira grippotyphosa*)、哈德焦钩端螺旋体(*Leptospira hardjo*)、出血性黄疸钩端螺旋体(*Leptospira icterohaemorrhagiae*)、波蒙那钩端螺旋体(*Leptospira pomona*)、肾脏钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)、钩端螺旋体autumnalis种(*Leptospira autumnalis*)、布拉迪斯拉发钩端螺旋体(*Leptospira bratislava*)。此外，含有本发明活的减毒aro突变体支气管败血性博德特氏菌菌株的疫苗可包含一种或多种下列猫科动物病原体：猫疱疹病毒(FHV)、猫杯状病毒(FCV)、猫肺炎病毒(FPN)、猫衣原体(*Chlamydia felis*)、猫细小病毒(FPV)、猫白血病毒(FeLV)、猫传染性腹膜炎病毒(FIPV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、博尔纳病病毒(BDV)、猫流感病毒、禽流感、和博德特氏属(*Bartonella spp.*) (例如，汉氏博德特氏菌(如*B. henselae*))。

[0069] aroA突变支气管败血性博德特氏菌作为重组载体的用途。活的无毒突变博德特氏菌载体的构建已被报道[参见，例如US2008/0254062]，包括在疫苗中重组aroA突变支气管败血性博德特氏菌载体的用途[Stevenson和Roberts, *Vaccine* 20, 2325-2335 (2002); Stevenson和Roberts, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 37:121-128 (2003); Stevenson和Roberts, *Vaccine* 22:4300-4305 (2004)]。因此，已经提供了制备这些构建体的方法学。

[0070] 并且，向本发明的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株中插入异源核酸(DNA)以表达相应的异源抗原是容易实现的，例如，当异源核酸和支气管败血性博德特氏菌末端都包含相容的限制性位点时。可选地，有必要修饰异源核酸和/或支气管败血性博德特氏菌的末端，其通过向后消化限制性内切核酸酶切割产生的单链DNA突出端产生平端，或者通过用适当的DNA聚合酶补平单链末端获得相同结果。在另一个方法学中，可以例如通过在末端上连接核苷酸序列(接头)产生所期望的位点。这些接头可以包含定义期望的限制性位点的特定的寡核苷酸序列。限制性位点还可以通过使用聚合酶链式反应(PCR)产生[参见，例如Saiki等, *Science* 239:487 (1988)]。如果需要，切割的载体和核酸片段还可以通过同聚物加尾修饰。

[0071] 异源核酸可以可操作地连接到内源或异源启动子(即重组支气管败血性博德特氏菌内源的)。因此，表达其编码的抗原的异源核酸可以包含其天然存在的启动子，或被修饰以包含启动子(如，细菌启动子，例如大肠杆菌lac启动子，其可以是组成型的)。值得注意地，Stevenson和Roberts, [Vaccine 22:4300-4305 (2004)] 具体示例了源自支气管败血性博德特氏菌丝状血凝素(fha)启动子的使用。可选地，异源核酸可以被置于活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌中，以使已经存在于aroA突变支气管败血性博德特氏菌中的启动子表达异源抗原。

[0072] 异源核酸可编码来自多种病原体的抗原，并包括，但不限于，犬流感病毒、犬副流感病毒、犬瘟热病毒、2型犬腺病毒、犬细小病毒、犬肺病毒、狂犬病病毒、犬冠状病毒、支原体菌种、犬埃里希体、红孢子虫属菌种、猫疱疹病毒(FHV)、猫杯状病毒(FCV)、猫肺炎病毒(FPN)、猫流感病毒、和/或猫衣原体。

[0073] 在本发明预期的实施方案中,异源核酸编码如上文所列的来自猫或犬病原体的蛋白抗原。在更特定的实施方案中,蛋白抗原从犬流感病毒获得[参见, U.S.7,959,929B2, 其内容在此通过引用整体并入]。在其它实施方案中,蛋白抗原从猫流感病毒获得。在此类的某些实施方案中,异源核酸编码犬流感病毒的血凝素。在此类的特定的实施方案中,异源核酸编码犬流感病毒的神经氨酸酶。在此类的另一些其它实施方案中,异源核酸编码犬流感病毒的血凝素和神经氨酸酶。

[0074] 如本文所用,术语“多肽”与术语“蛋白”互换使用,并进一步包括肽的意思。因此,如本文所用,多肽是两个或更多个氨基酸通过肽键连接到一起的聚合物。优选地,术语“多肽”指包含20或更多个通过肽键连接在一起的氨基酸残基的聚合物,其中肽包含两个到20个通过肽键连接在一起的氨基酸残基。

[0075] 如本文所用,涉及特定蛋白的术语“抗原性片段”是该蛋白(包括相比全长蛋白缺失如单个氨基酸的大片段)的片段,其具有抗原性,即能够与免疫系统的抗原识别分子,例如免疫球蛋白(抗体)或T细胞抗原受体特异性相互作用。

[0076] “多核苷酸”或“核酸”是包含核苷酸的分子,包括但不限于RNA、cDNA、基因组DNA和甚至合成的DNA序列。这些术语还预期包括那些包括任何本领域已知的DNA和RNA的碱基类似物的核酸。

[0077] 如本文所用的“异源核苷酸序列”是通过重组方法加到核苷酸序列和/或基因组以形成非自然界中天然形成的构建体的核苷酸序列。这些核酸还可以编码融合(如嵌合)蛋白。异源核苷酸序列可以编码含抗原性、调节性和/或结构性的肽和/或蛋白。异源核苷酸序列可以包含非编码序列,包括限制性位点、调节性位点、启动子等。

[0078] 如本文所用,术语“可操作地连接”和“可操作地连接”是互换使用的,指遗传元件的排列,其中所述组件配置为可以执行其通常的功能。因此,可操作地连接到编码序列的控制元件能够影响编码序列的表达。控制元件不需要邻近编码序列,只要它们发挥引导其表达的功能。例如干扰性的非翻译但转录的序列可以存在于启动子和编码序列之间,启动子可以仍被认为“可操作地连接”到编码序列。

[0079] 如本文所用,术语“控制序列”和“控制元件”是互换使用的。转录和翻译控制序列为DNA调节序列,例如启动子、增强子、终止子等,其提供用于宿主细胞中编码序列的表达。在真核细胞中,多聚腺苷酸化信号是控制序列。编码序列可操作地连接表达控制序列,这时表达控制序列控制或调节该核苷酸序列的转录和翻译。术语可操作地连接可以包括具有适当的起始信号。

[0080] 在细胞中,编码序列是在转录和翻译控制序列的“控制下”,当RNA聚合酶转录编码序列为mRNA时,如果,时间和位置合适,后者可以随后被反式RNA剪切,并翻译成编码序列编码的蛋白。

[0081] 疫苗施用:本发明的疫苗(包括多价疫苗)可以作为联合治疗(即除了疫苗本身以外还包括施用一种或多种额外的活性试剂、治疗等的治疗)的部分被施用,例如全身施用。在这种情况下,应当认识到,组成“治疗有效”量的疫苗的量可以多于或少于疫苗被单独施用时将组成“治疗有效”量的疫苗的量。其它治疗可以包括那些本领域已知的疗法,例如,如抗病毒药疗法、止痛药,解热药疗法,祛痰药,抗炎药疗法,抗组胺药,治疗支气管败血性博德特氏菌感染的抗生素,和/或流体施用。在一些实施方案中,本发明的疫苗与下列一种或

多种疫苗联合施用:流感疫苗,副流感疫苗,猫疱疹病毒疫苗,猫杯状病毒疫苗,衣原体疫苗,鼻气管炎疫苗,泛白血球减少症疫苗,免疫缺陷病毒疫苗,白血病毒疫苗,或狂犬病疫苗。在具体实施方案中,本发明的疫苗皮下(S/C)施用。

[0082] 免疫原性水平可以通过本领域普遍知晓的攻击剂量滴定研究技术,用实验方法确定。这些技术典型地包括用不同剂量的疫苗接种一些动物受试者,然后用有毒力的病毒或细菌攻击动物受试者来确定最低保护剂量。

[0083] 影响优选剂量方案的因素包括,例如受试者的物种或品种(如,犬或猫)、年龄、体重、性别、饮食、活力、肺脏尺寸,和状况;施用途径;所用特定疫苗的效价、安全性,和免疫状态持续情况;是否使用递送系统;以及疫苗是否以药物和/或疫苗组合的部分施用。因此,实际使用的剂量对具体动物可以变化,并且从而,可以偏离上文所述的典型剂量。确定这些剂量调整通常在使用常规手段进行疫苗开发的本领域技术人员的技能内。在下文实施例4使用的具体条件下,在存在佐剂和/或芳香族添加剂的情况下,aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株的安全和有效剂量确定为 5×10^5 到 5×10^7 cfu/mL之间。

[0084] 类似地,该剂量可以施用的体积典型地落入0.1mL(典型的对于真皮内或经真皮应用)和5.0mL之间。对肌肉内或皮下施用,施用体积的典型范围在0.2和2.0mL之间,优选约1.0到2.0mL之间。

[0085] 可以预期,疫苗可以单次或者可选地,两次或更多次经过数天、数周、数月、或数年间向疫苗受体施用。在一些实施方案中,疫苗施用至少两次。在某些该实施方案中,例如,疫苗施用两次,第二个剂量(如,增强剂量)在第一次剂量后至少2周施用。在特定的实施方案中,疫苗施用两次,第二个剂量在第一个剂量后不长于8周施用。在其它实施方案中,第二个剂量在第一个剂量后从1周到2年,第一个剂量后从1.5周到8周,或第一个剂量后从2周到4周施用。在其它实施方案中,第二个剂量在第一个剂量后约3周施用。

[0086] 在上文的实施方案中,第一个和后续剂量可以变化,例如在量和/或形式上。但是经常地,剂量在量和形式上是相同的。当仅施用单个剂量时,该剂量的疫苗的量单独通常包含治疗有效量的该疫苗。但是,当施用超过一个剂量时,那些剂量中疫苗的量共同可以组成治疗有效量。另外,疫苗可以最初施用,并且然后可以从2到12周后施用增强剂量,如上文所讨论。但是,疫苗的后续施用可以基于每年(1-年)或每2年(2-年)进行,无论是否施用增强剂量。

[0087] 本发明可以通过参照下文提供作为本发明示例的非限制性的实施例更好的理解。下文的实施例为了更充分的阐释本发明的实施方案而提出。但是它们决不应被解释为限制本发明的广泛范围。

实施例

[0088] 实施例1

[0089] 支气管败血性博德特氏菌aroA突变菌株的构建

[0090] 构建支气管败血性博德特氏菌aroA缺失突变菌株,目的在于配制具有最少副作用的有效的疫苗。aroA基因的缺失显著地损害了支气管败血性博德特氏菌在没有外源提供一种或多种关键芳香族化合物时生长的能力。

[0091] 所用的支气管败血性博德特氏菌菌株最初从患有上呼吸道疾病的狗中分离。支气

管败血性博德特氏菌中的aroA基因编码合成必需芳香族化合物所需的代谢途径中的酶(参见上文),其与邻近序列一起,通过PCR从支气管败血性博德特氏菌染色体中克隆。随后通过对克隆的基因用Sal I酶限制性消化产生90个碱基对(bp)的缺失。然后使用所述用于产生溶血曼海姆菌(*Mannheimia haemolytica*),多杀巴斯德菌(*Pasteurella multocida*)和催眠嗜血杆菌aroA缺失菌株的载体工具和选择方法将缺失形式的aroA基因(Δ aroA)重新导入支气管败血性博德特氏菌[Briggs和Tatum, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11) 7187-7195 (2005); Tatum和Briggs, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11) 7196-7202. (2005); 美国专利号 5,840,556,其内容在此通过引用整体并入]。

[0092] 简而言之,这些方法依赖于溶血曼海姆菌中发现的质粒中复制起始点温度敏感型(T_s)形式的产生。在升高的温度($\geq 39^\circ\text{C}$)下这些 T_s 质粒不能有效地繁殖。这些质粒进一步修饰以含有卡那霉素抗性并且还含有大肠杆菌ColE1复制起始点以进入大肠杆菌繁殖。一旦含有 Δ aroA的质粒导入支气管败血性博德特氏菌,在天然aroA区和质粒的aroA区之间发生同源重组事件,从而质粒的部分将以某些频率导入宿主支气管败血性博德特氏菌染色体。使用抗生素卡那霉素选择转化子能分离这些特定的转化子。 Δ aroA基因插入的验证通过PCR实现,并且DNA尺寸通过琼脂糖凝胶电泳确定。

[0093] 染色体中不期望的序列例如天然aroA基因、卡那霉素抗性基因、和任何其它载体序列的去除通过进一步重组事件发生。期望的重组子的选择通过在质粒复制的非允许温度不含抗生素的条件下细胞传代来实现。卡那霉素敏感的分离物通过PCR和DNA琼脂糖电泳来筛选 Δ aroA基因和天然aroA基因的缺失。使用aroA缺失区周围支气管败血性博德特氏菌染色体的序列分析来证明在aroA突变支气管败血性博德特氏菌中没有保留外源载体DNA。

[0094] 实施例2

[0095] 支气管败血性博德特氏菌aroA突变菌株与其亲本非减毒菌株的小鼠LD₅₀的比较

[0096] 8只小鼠分组腹膜内接种0.5mL剂量的支气管败血性博德特氏菌aroA突变菌株(参见上文实施例1)或其亲本非减毒菌株的系列稀释液来确定其LD₅₀。小鼠观察7天,每天记录死亡小鼠数目(参见下文表1)。接种 2.8×10^7 cfu/剂量或更高剂量的亲本菌株(LD₅₀ 8.9×10^6)和 1.2×10^9 cfu/剂量或更高剂量的aroA突变菌株(LD₅₀ 3.8×10^8)的组中死亡率是100%。值得注意的是,分别在更低稀释的亲本菌株或aroA突变菌株中均没有死亡。这些结果证明aroA基因中的缺失显著地削弱了支气管败血性博德特氏菌,使其比亲本菌株在小鼠中毒力低约40倍。

[0097] 表1

[0098] 接种后小鼠死亡率

[0099]

组别	菌株	cfu/ 剂量	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	总计
A1	亲本	2.8×10^8	1	7	---	---	---	---	---	8/8
A2	亲本	2.8×10^7	0	1	4	2	1	---	---	8/8
A3	亲本	2.8×10^6	0	0	0	0	0	0	0	0/8
A4	亲本	2.8×10^5	0	0	0	0	0	0	0	0/8
A5	亲本	2.8×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0/8
B1	$\Delta aroA$	1.2×10^{10}	8	---	---	---	---	---	---	8/8
B2	$\Delta aroA$	1.2×10^9	0	8	---	---	---	---	---	8/8
B3	$\Delta aroA$	1.2×10^8	0	0	0	0	0	0	0	0/8
B4	$\Delta aroA$	1.2×10^7	0	0	0	0	0	0	0	0/8
B5	$\Delta aroA$	1.2×10^6	0	0	0	0	0	0	0	0/8

[0100] 实施例3

[0101] 安全和有效的疫苗剂量的确定

[0102] 为了发现安全和有效的剂量范围,包含实施例1的支气管败血性博德特氏菌aroA突变($\Delta aroA$)菌株的实验疫苗分三个不同的(通常应用的)剂量水平皮下施用于狗。相应地,1 mL剂量支气管败血性博德特氏菌 $\Delta aroA$ 菌株活培养物如下施用于治疗组A、B、和C(每组8只狗):在研究第0和21天,细菌在胰蛋白胍磷酸盐液体培养基(TPB)中生长12小时,并随后分别稀释到目标剂量 1.0×10^8 cfu/mL(组A), 1.0×10^7 cfu/mL(组B),和 1.0×10^6 cfu/mL(组C)。对照组D(9只狗)中的犬接受无菌TPB。

[0103] 疫苗接种

[0104] 在研究第0和21天,每只狗使用带无菌22G 1"号针的注射器在脖子底部皮下接种1mL剂量各自的疫苗。第一次接种在右侧,第二次接种在左侧。每次接种前后进行细菌平板计数以确定所给的剂量。

[0105] 接种后监测

[0106] 接种后,收集全血以确定抗体滴度。注射部位每天触诊,直至无注射部位反应可以被感觉到。使用卡尺测量注射部位反应高度、宽度和深度的厘米(cm)数。注射部位反应进一步表征为增厚、柔软、坚硬、或触痛。

[0107] 攻击

[0108] 攻击使用下列材料进行。支气管败血性博德特氏菌菌株D2 [Musser等, Journal of Bacteriology, 169(6):2793-2803 (June 1987)]接种到胰蛋白胨磷酸盐液体培养基(TPB)琼脂平板上(每板200 μL),然后平板在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 孵育约16-18小时。每板用10mL TPB从琼脂平板上洗去纯细菌生长物,密度调整到 $\geq 1.0 \times 10^{10}$ cfu/mL。制备新鲜的攻击材料用于每天的攻击。在研究第35和36天,攻击材料的鼻内施用通过使用3mL带涂药器的注射器每鼻孔滴入0.5mL进行。

[0109] 攻击后监测

[0110] 攻击后21天每天观察狗的临床症状,包括,但不限于压抑、昏睡、食欲不振、咳嗽、流鼻涕、和呼吸困难。狗每天接受温和的气管触诊尝试诱发咳嗽。临床症状“粘液排出”、“脓性鼻涕”、“诱发性咳嗽”、“自发性咳嗽”、“自发干呕性咳嗽”和“呼吸困难”进行评分。每只狗每周收集两次鼻拭子,进行3周以测定攻击生物体的释放。

[0111] 数据分析:

[0112] 主要结果变量是疾病临床症状和/或细菌释放。此研究中的实验单位是个体狗。根据临床观察对行为和生理性状分配数字评分。临床评分按每只狗,每天加和并计算中值评分。对于释放数据,计算分离自鼻拭子的支气管败血性博德特氏菌生物体的平均cfu/mL:(i)对于每个治疗组,(ii)对于每个鼻拭子收集,和(iii)释放的天数。

[0113] 结果:

[0114] 接种前,所有狗具有针对支气管败血性博德特氏菌的低抗体滴度(≤ 64),通过鼻拭子分离确定为支气管败血性博德特氏菌感染阴性。免疫接种 1.0×10^6 cfu/mL 支气管败血性博德特氏菌aroA⁻ (治疗组C)和安慰剂(治疗组D)没有诱导支气管败血性博德特氏菌特异性的抗体增加。相反,在研究第28天,接种剂量 1.0×10^8 (治疗组A)在100%(8/8)的狗中诱发256或更高的抗体滴度,接种剂量 1.0×10^7 cfu/mL在25%(2/8)的狗中诱发128或更高的抗体滴度。治疗组A、B、C和D在研究第28天的几何平均数分别为470、76、35、和40(表2)。

[0115] 表2

[0116] 接种前后对支气管败血性博德特氏菌的几何平均血清抗体滴度

[0117]

治疗组	研究第4天	研究第20天	研究第28天
A 1.0×10^8 cfu/mL	17	70	470
B 1.0×10^7 cfu/mL	25	41	76
C 1.0×10^6 cfu/mL	29	35	35
D 安慰剂	25	30	40

[0118] 治疗组A中的狗在注射部位发生肿胀,在接种后9-13天内消退。治疗组A中测量的

最大的注射部位反应为2 x 2 x 1.5 cm,并且8只狗中的2只具有触诊为触痛的注射部位反应。治疗组B中的狗在注射部位发生肿胀,在接种后3-6天内消退,最大的注射部位反应测量为2 x 2 x 1.5 cm。治疗组C中仅一只狗发生轻微肿胀(0.5 x 0.5 x 0.5 cm),仅在一天能够测量到。治疗组D中没有观察到注射部位反应。每个治疗组的平均注射部位反应显示于表3,其计算采用第一次接种后每只狗最大尺寸的注射部位反应。虽然接种后没有疫苗导致任何有害的全身反应,组A和B中肿胀的尺寸和特征在兽医实践中将是不能被普遍接受的。

[0119] 表3

[0120] 平均注射部位反应尺寸

[0121]

治疗组	平均注射部位 反应尺寸 (cm ²)
A 1.0 x 10 ⁸ cfu/mL	2.1
B 1.0 x 10 ⁷ cfu/mL	1.0
C 1.0 x 10 ⁶ cfu/mL	0
D 安慰剂	0

[0122] 攻击后,对每只狗的临床症状评分并合计21天观察期的总数。接种1.0 x 10⁸ cfu/mL和1.0 x 10⁷ cfu/mL支气管败血性博德特氏菌aroA-菌株减少了支气管败血性博德特氏菌感染相关的临床症状。安慰剂接种的对照组中(治疗组D)9只狗中的7只(78%)和治疗组C(1.0 x 10⁶ cfu/mL)中8只狗中的5只在21天观察期中具有1或更高的咳嗽评分;而接种1.0 x 10⁸ cfu/mL的8只狗中仅1只(13%)并且治疗组B中8只狗中2只(25%)在21天观察期中仅1天具有1或更高的咳嗽评分。接种实施例1中活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株并且随后用有毒力的支气管败血性博德特氏菌攻击的每组狗的中值临床评分在表4中描述。

[0123] 在攻击后21天观察期间6个时间点收集鼻拭子,以测定攻击生物体的释放。攻击后21天,治疗组C和D中所有的狗(100%)释放大量支气管败血性博德特氏菌,相比之下治疗组A中8只狗中4只(50%)和治疗组B中8只狗中5只(63%)仍然释放。分离自组A、B和C中狗鼻的支气管败血性博德特氏菌生物体平均数目少于分离自组D中狗的生物体的平均数目(表4)。

[0124] 表4

[0125] 攻击后临床评分和支气管败血性博德特氏菌释放

[0126]

治疗组	中值临床评分	咳嗽评分 ≥ 1 的狗的数目	支气管败血性博德特氏菌生物体释放的平均数目
A 1.0×10^8 cfu/mL	0	1/8 (13%)	2261
B 1.0×10^7 cfu/mL	0.5	2/8 (25%)	32,592
C 1.0×10^6 cfu/mL	3.5	5/8 (63%)	46,341
D 安慰剂	3.0	7/9 (78%)	73,656

[0127] 总之,支气管败血性博德特氏菌的活的aroA突变菌株可以被用作活疫苗用于全身施用于狗。但是在支气管败血性博德特氏菌的活的aroA突变菌株最有效的滴度下,疫苗还是导致不可接受的注射部位反应。

[0128] 实施例4

[0129] 在安全水平上的效价的改善

[0130] 进行后续的研究以评价所测试的最低剂量(1×10^6 cfu)的效价是否可以被显著的改善,同时保持最小限度的,如果有,注射部位反应。用于新治疗组A、B、C和D(每组5只)的实验疫苗含有实施例1的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株的活培养物,以1mL剂量施用。治疗组E中的狗接受不含任何抗原的无菌DMEM。aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株在5L发酵罐中胰蛋白胨磷酸盐液体培养基(TPB)中生长17小时,当OD_{580nm}为1.0到2.0时收获。发酵培养物掺合稳定剂并冻干。

[0131] 对于治疗组A,冻干饼用无菌水再水化到 1.0×10^8 cfu/mL的目标剂量。对于治疗组B、C和D,冻干饼用无菌水再水化到 1.0×10^6 cfu/mL的目标剂量:

[0132] 对于组B,加2%磷酸铝;

[0133] 对于组C,加2%氢氧化铝;或

[0134] 对于组D,加芳香族化合物混合物。

[0135] 用于治疗组E的冻干饼用无菌水再水化,参见下文表6。

[0136] 所用的2%磷酸铝佐剂为2% Rehydraphos[®],而所用的2%氢氧化铝佐剂为2% Rehydrogel[®] LV。这两种佐剂都可以从Reheis Inc., Berkeley Heights, NJ, USA商购获得。芳香族化合物混合物(芳香族添加剂)在下文表5中描述。在研究第0和21天,狗接种上述疫苗或DMEM安慰剂。

[0137] 表5

[0138] 芳香族化合物混合物

	成分	芳香族添加剂 ($\mu\text{g/mL}$)
[0139]	L-酪氨酸	40
	2,3-二羟基苯甲酸	5
	L-色氨酸	40
	L-苯丙氨酸	40
	对氨基苯甲酸	10

[0140] 疫苗接种

[0141] 在研究第0和21天,每只狗使用无菌22G 1”号针在脖子底部皮下接种1mL剂量各自的疫苗。第一次接种在右侧,第二次接种在左侧。每次接种前后进行细菌平板计数以确定所给的剂量。

[0142] 接种后监测

[0143] 接种后,收集全血以确定抗体滴度。注射部位每天触诊,直至无注射部位反应可以被感觉到。使用卡尺测量注射部位反应高度、宽度和深度的厘米(cm)数。注射部位反应进一步表征为增厚、柔软、坚硬、或触痛。

[0144] 攻击

[0145] 攻击使用下列材料进行。支气管败血性博德特氏菌菌株D2接种到胰蛋白胨磷酸盐液体培养基(TPB)琼脂平板上(每板200 μL),然后平板在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 孵育约16-18小时。每板用10mL TPB从琼脂平板上洗去纯细菌生长物,密度调整到 $\geq 1.0 \times 10^{10}$ cfu/mL。制备新鲜的攻击材料用于每天的攻击。在研究第42天,新鲜的攻击培养物鼻内施用,其通过使用3mL带涂药器的注射器每鼻孔滴入0.5mL进行。在研究第43天,新鲜的攻击培养物鼻内施用,其通过使用带电子泵的喷雾器每鼻孔滴入0.5mL进行。

[0146] 攻击后监测

[0147] 攻击后21天每天观察狗的临床症状包括,但不限于压抑、昏睡、食欲不振、咳嗽、流鼻涕、和呼吸困难。狗每天接受温和的气管触诊尝试诱发咳嗽。临床症状“粘液排出”、“脓性鼻涕”、“诱发性咳嗽”、“自发性咳嗽”、“自发干呕性咳嗽”和“呼吸困难”进行评分。

[0148] 结果:

[0149] 接种前,所有狗具有针对支气管败血性博德特氏菌的低抗体滴度(≤ 64),通过鼻拭子分离确定为支气管败血性博德特氏菌感染阴性。在研究第28天,对照狗(治疗组E)100%的狗中具有抗体滴度32或更低。相反, 1.0×10^8 cfu/mL剂量接种aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株(治疗组A)在80%(5只中的4只)的狗中诱导256或更高的抗体滴度, 1.0×10^6 cfu/mL +2% Rehydraphos® 接种(治疗组B)在80%(5只中的4只)的狗中诱导128或更高的抗体滴度, 1.0×10^6 cfu/mL + 2% Rehydragel® LV 接种(治疗组C)在40%(5只中的2只)的狗中诱导128或更高的抗体滴度, 1.0×10^6 cfu/mL + 1 X AroMix 接种(治疗组D)在60%(5只中的3只)的狗中诱导128或更高的抗体滴度。治疗组A、B、C、D和E在研究第28天的几何平均滴度分别为338、111、84、97、和14(表6)。

[0150] 表6

[0151] 接种前后对支气管败血性博德特氏菌的几何平均血清抗体滴度

治疗组	cfu	添加物	研究第4天	研究第20天	研究第28天
A	1×10^8	----	37	64	338
B	1×10^8	2% 磷酸铝	32	49	111
C	1×10^8	2% 氢氧化铝	32	37	84
D	1×10^8	芳香族 化合物混合物	32	56	97
E	----	----	28	28	14

[0153] 接种后,狗保持临床正常,包括无发热。治疗组A中的狗在注射部位发生中度肿胀,在接种后16-19天内消退。治疗组A中测量的最大的反应为 $3.0 \times 3.0 \times 0.5$ cm,并且5只狗中的3只具有触诊为触痛的反应。治疗组B中的狗(5只中的4只)在注射部位发生轻微肿胀,在接种后9-11天内消退,最大的反应测量为 $1.0 \times 1.0 \times 0.5$ cm,并且5只狗中的1只具有触诊为触痛的反应。治疗组C中的狗(5只中的5只)在注射部位发生肿胀,在接种后9-10天内消退,最大的反应测量为 $1.0 \times 1.0 \times 0$ cm。治疗组D中的5只狗中仅2只在注射部位发生轻微肿胀,在接种后5-8天内消退,最大的反应测量为 $0.5 \times 0.5 \times 0$ cm。治疗组E中没有观察到注射部位反应。每个治疗组的平均注射部位反应显示于表7,其计算采用第一次接种后每只狗最大尺寸的注射部位反应。这些结果验证了先前的观察,即 1.0×10^8 的疫苗剂量用于年轻的狗中是不安全的,而 1×10^6 cfu/mL的剂量,甚至与佐剂一起施用,提供在兽医实践中将被考虑是可接受的更好的安全性。

[0154] 表7

[0155] 平均注射部位反应尺寸

[0156]

治疗组	cfu	添加物	平均注射部位 反应尺寸 (cm ²)
A	1×10^6	---	4.5
B	1×10^6	2% 磷酸铝	0.2
C	1×10^6	2% 氢氧化铝	0.4
D	1×10^6	芳香族化合物混合物	0.1
E	---	---	0

[0157] 攻击后,对每只狗的临床症状评分并合计21天观察期的总数。攻击剂量判断为足以确定疫苗的效价,因为至少50%的对照狗显示疾病的临床症状和/或细菌释放。如果在攻击后观察期间在 ≥ 3 个非连续的天观察到自发咳嗽或自发干呕咳嗽,则狗定义为已发生持续咳嗽(受影响的狗)。如表8所示,向包含滴度为 1×10^6 cfu的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株的疫苗中加入佐剂或芳香族化合物混合物(芳香族添加剂)导致保护接种的狗抵抗有毒力的支气管败血性博德特氏菌的攻击。相比治疗组A、B和D中的没有狗和治疗组C中仅一只狗,5只安慰剂接种的对照狗中的4只攻击后发生持续咳嗽。治疗组A、B、C、D和E的中值临床评分分别为2、1、3、1、和13(表8)。

[0158] 在攻击后21天观察期间6个时间点收集鼻拭子,以测定攻击生物体的释放。在攻击后21天(研究第63天),治疗组E中所有的狗(100%)均释放大量支气管败血性博德特氏菌。在研究第63天分离自鼻拭子的支气管败血性博德特氏菌攻击生物体的平均cfu/mL对于治疗组A、B、C、D和E分别为726、5,048、17,400、594、和135,840。在所有的研究日分离自鼻拭子的支气管败血性博德特氏菌攻击生物体的总体平均cfu/mL对于治疗组A、B、C、D和E分别为6,899、3,662、6,671、8,060、和24,067(表8)。

[0159] 表8

[0160] 攻击后临床评分和支气管败血性博德特氏菌释放

[0161]

治疗组	cfu	添加物	中值临床评分	受影响的狗的数目*	释放的支气管败血性博德特氏菌生物体平均数目
A	1×10^8	----	2	0/5 (0%)	6899
B	1×10^6	2% 磷酸铝	1	0/5 (0%)	3662
C	1×10^6	2% 氢氧化铝	3	1/5 (20%)	6671
D	1×10^6	芳香族化合物混合物	1	0/5 (0%)	8060
E	----	----	13	4/5 (80%)	24067

[0162] 总之,对4个不同的活的减毒aroA突变支气管败血性博德特氏菌疫苗制剂评价了安全性和效价。具有滴度为 1×10^6 的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株加氢氧化铝佐剂、磷酸铝佐剂、或芳香族添加剂帮助保护狗免于疾病的临床症状,而不导致注射部位显著的肿胀。因此,本研究最低限度的证明,向包含活的减毒aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株的疫苗中加入佐剂和/或芳香族添加剂显著地降低使疫苗有效所必需的剂量,从而有助于将由于疫苗施用导致的任何注射部位反应减到最低。

[0163] 实施例5

[0164] 针对支气管败血性博德特氏菌、犬流感病毒和犬副流感病毒的疫苗

[0165] 已经配制针对犬流感病毒(CIV)、犬副流感病毒(CPI)和支气管败血性博德特氏菌(*B. bronchiseptica*)的多价疫苗。犬疫苗包含修饰的活的犬副流感病毒,灭活的犬流感病毒和实施例1中所述活的减毒的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株。该疫苗设计用于皮下施用。该产品推荐作为支气管败血性博德特氏菌、犬副流感病毒导致疾病的预防中的帮助,和犬流感病毒导致疾病的控制中的帮助。疫苗的每个剂量含有至少 $10^{5.7}$ TCID₅₀ [50%组织培养感染性剂量]的 CPI, 1×10^6 cfu的支气管败血性博德特氏菌,和 1000 HAU [血凝素单位]的CIV。

[0166] 支气管败血性博德特氏菌的生产培养物在发酵罐中冷却,并且将下文表9中所述芳香族化合物混合物(芳香族添加剂)加入培养物。修饰的活的CPI随后与活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株,与稳定剂、5%谷胱甘肽溶液、表9的芳香族化合物混合物(芳香族添加剂)和DMEM培养基一起掺合。此掺合物然后冻干并保存。冻干饼在含灭活CIV和2%氢氧化铝佐剂或5%氢氧化铝佐剂的稀释剂中再水化。

[0167] 表9

[0168] 芳香族化合物混合物

[0169]

成分	体积 (每升收获物)
L-酪氨酸(16mg/mL)	2.5 mL
2,3-二羟基苯甲酸(5mg/mL)	1 mL
L-酪氨酸(4mg/mL), L-苯丙氨酸(4mg/mL), 和对 氨基苯甲酸(1mg/mL)	10 mL

[0170] 治疗组B和C中的狗接种用无菌水再水化到 5.0×10^5 cfu/mL活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株的目标剂量的包含活的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株和CPI的冻干疫苗:

[0171] 对于B组,加CIV,加2%氢氧化铝佐剂;或

[0172] 对于C组,加CIV,加5%氢氧化铝佐剂。

[0173] 治疗组D中的狗仅接种CIV加2%氢氧化铝佐剂。所有三个治疗组中使用的氢氧化铝为Rehydragel® LV。

[0174] 接种

[0175] 在研究第0和21天,每只狗使用无菌22G 1”号针在脖子底部通过皮下途径接种1mL剂量各自的疫苗。第一次接种在右侧,第二次接种在左侧。每次接种前后进行细菌平板计数以确定所给的剂量。

[0176] 接种后监测

[0177] 接种后,收集全血以确定抗体滴度。注射部位每天触诊,直至无注射部位反应可以被感觉到。使用卡尺测量注射部位反应高度、宽度和深度的厘米(cm)数,并且进一步表征为增厚、柔软、坚硬或触痛。

[0178] 攻击

[0179] 攻击使用下列材料进行。支气管败血性博德特氏菌菌株D2接种到胰蛋白胨磷酸盐液体培养基(TPB)琼脂平板上(每板200 μ L),然后平板在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 孵育约16-18小时。每板用10mL TPB从琼脂平板上洗去纯细菌生长物,密度调整到 $\geq 1 \times 10^{10}$ cfu/mL。制备新鲜的攻击材料用于每天的攻击。在研究第35天,攻击材料通过鼻内途径施用,其通过使用3mL带涂药器的注射器每鼻孔滴入0.5mL。在研究第36天,攻击材料通过鼻内途径施用,通过使用带电泵的喷雾器每鼻孔滴入~0.5mL。

[0180] 攻击后监测

[0181] 攻击后21天每天观察狗的临床症状,包括,但不限于压抑、昏睡、咳嗽和流鼻涕。每周收集两次鼻拭子,收集间隔3-4天,攻击后进行3周以测定攻击生物体的释放。

[0182] 结果:

[0183] 接种前,所有狗具有针对支气管败血性博德特氏菌的低抗体滴度(≤ 64),通过鼻拭子分离确定为支气管败血性博德特氏菌感染阴性。在研究第28天,安慰剂接种的对照狗(治疗组D)5只中的4只(80%)具有64或更低的抗体滴度。相反,接受包含 5.0×10^5 cfu/mL的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株、CPI、CIV和2%的Rehydragel LV (治疗组B)或5% Rehydragel LV (治疗组C)的测试疫苗的所有狗具有64或更高的抗体滴度。治疗组B、C和D在研究第28天的几何平均滴度分别为111、111、和64(表10)。

[0184] 表10

[0185] 接种前后对支气管败血性博德特氏菌的几何平均血清抗体滴度

[0186]

治疗组	支气管败血性 博德特氏菌 cfu	疫苗添加物	研究第-1天	研究第28天
B	5.0×10^5	CPI, CIV, 和 2% 氢氧化铝	28	111
C	5.0×10^5	CPI, CIV, 和 5% 氢氧化铝	42	111
D	---	CIV 和 2% 氢氧化铝	42	64

[0187] 接种后,狗保持临床正常,包括无发热。治疗组B中的5只狗中3只在注射部位发生轻微肿胀,在接种后1-5天内消退,最大的注射部位反应测量为 $1.0 \times 1.0 \times 0.5$ cm。治疗组C中所有的狗在注射部位发生轻微肿胀,在接种后7-11天内消退,最大的注射部位反应测量为 $1.0 \times 1.0 \times 0.5$ cm。治疗组D中5只狗在两种接种后均没有发生注射部位反应。每个治疗组的平均注射部位反应显示于表11,其计算采用第一次接种后每只狗最大尺寸的注射部位反应。

[0188] 表11

[0189] 平均注射部位反应尺寸

[0190]

治疗组	支气管败血性 博德特氏菌 cfu	疫苗添加物	平均注射部位 反应尺寸 (cm ²)
B	5.0×10^5	CPI, CIV, 和 2% 氢氧化铝	0.2
C	5.0×10^5	CPI, CIV, 和 5% 氢氧化铝	0.3
D	---	CIV 和 2% 氢氧化铝	0

[0191] 攻击后,对每只狗的临床症状评分并合计21天观察期的总数。安慰剂接种的对照狗5只中的4只攻击后发生疾病临床症状包括自发咳嗽,表明攻击有效。相反,与对照狗比较,两种测试疫苗减少了支气管败血性博德特氏菌感染相关的临床症状,具体是咳嗽。治疗组B、C和D的中值咳嗽评分分别是1、0和2(表12),发生临床疾病的狗的百分比分别是20%、20%和40%。

[0192] 在21天攻击后观察期间6个时间点收集鼻拭子,以测定攻击生物体的释放。在攻击后21天(研究第55天),治疗组D中所有狗(100%)释放大量支气管败血性博德特氏菌生物体,而两个接种组的每个都显著释放较少。在研究第55天分离自鼻拭子的支气管败血性博德特氏菌D2攻击生物体的平均cfu/mL对于治疗组B、C和D分别为15,494、26,802、和150,620。总体上,治疗组B中的狗比治疗组C和D中的狗释放较少的支气管败血性博德特氏菌生物体。在所有研究日分离自鼻拭子的支气管败血性博德特氏菌D2攻击生物体的总体平均cfu/mL对于治疗组B、C和D分别为38,642、206,713、和178,609(表12)。

[0193] 表12

[0194] 攻击后临床评分和支气管败血性博德特氏菌释放

[0195]

治疗组	疫苗	中值临床评分	具有临床疾病的狗的%	释放的支气管败血性博德特氏菌生物体平均数
B	5.0×10^5 cfu/mL B.b., CPI, CIV, 和 2% 氢氧化铝	1	20%	38,642
C	5.0×10^5 cfu/mL B.b., CPI, CIV, 和 5% 氢氧化铝	0	20%	206,713
D	CIV 和 2% 氢氧化铝	2	40%	178,609

[0196] 总之,对2种不同的活的减毒aroA突变支气管败血性博德特氏菌+CPI+CIV疫苗制剂评价了安全性和效价。具有滴度为 5×10^5 的aroA突变支气管败血性博德特氏菌菌株加芳香族添加剂和2%或5%的氢氧化铝佐剂的疫苗,帮助保护狗免于疾病的临床症状,而不导致注射部位显著的肿胀。因此,本研究最低限度的证明,向包含活的减毒aro突变支气管败血性博德特氏菌菌株的疫苗中加入佐剂和/或芳香族添加剂显著地降低使疫苗有效所必需的剂量,从而有助于将由于疫苗施用导致的任何注射部位反应减到最低。

[0197] 本发明不限于本文所述具体实施方案的范围内。事实上,除了本文所述的那些,本发明的各种修饰对于那些本领域技术人员根据前述说明将变得显而易见。这些修饰意图落入所附权利要求的范围内。