



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103200960 B

(45)授权公告日 2019.04.23

(21)申请号 201180042339.2

(22)申请日 2011.06.29

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103200960 A

(43)申请公布日 2013.07.10

(30)优先权数据

61/360969 2010.07.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.03.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/042323 2011.06.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/003205 EN 2012.01.05

(83)生物保藏信息

PTA-10545 2009.12.22

PTA-10546 2009.12.22

(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

专利权人 路易斯安那州大学及农业和机械
学院管理委员会

(72)发明人 K.A.奥康奈尔 R.N.拉马尚德拉

S.D.高恩特 R.E.科斯特韦特

T.L.沃斯莫恩

(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.

A61K 39/02(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

C12N 5/078(2006.01)

(56)对比文件

US 4579945 A,1986.04.01,

US 4579945 A,1986.04.01,

CN 1735684 A,2006.02.15,

MAHAN S等.A preliminary study to
evaluate the immune responses induced by
immunization of dogs with inactivated
Ehrlichia canis organisms.《ONDERSTEEPOORT
JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH》.2005,第72
卷(第1期),119-128.

MAHAN S等.A preliminary study to
evaluate the immune responses induced by
immunization of dogs with inactivated
Ehrlichia canis organisms.《ONDERSTEEPOORT
JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH》.2005,第72
卷(第1期),119-128.

审查员 田颖

权利要求书1页 说明书21页 附图3页

(54)发明名称

针对犬埃利希体的疫苗和相关方法

(57)摘要

描述了包含有效免疫量的犬埃利希体菌苗
的疫苗和/或免疫原性组合物。此外,还公开了通
过提供该疫苗和/或免疫原性组合物针对犬埃利
希体免疫受试者的方法。

1. 包含有效免疫量的灭活的犬埃利希体抗原的疫苗组合物;其中当所述疫苗作为初次疫苗施用,所述抗原在受试者中引发保护性免疫应答,但引发最低的体液应答,其中所述疫苗组合物包含非极性溶剂,所述非极性溶剂包含亲脂佐剂,所述亲脂佐剂包含海藻糖6,6'-二霉菌酸酯;并且其中所述犬埃利希体具有ATCC登记号PTA-10546。

2. 权利要求1的疫苗组合物,其中所述抗原是用福尔马林灭活的。

3. 权利要求2的疫苗组合物,其中所述非极性溶剂是氯仿溶剂系统。

4. 权利要求3的疫苗组合物,其中所述氯仿溶剂系统包含体积百分比为65-95%的氯仿。

5. 权利要求4的疫苗组合物,其中所述氯仿溶剂系统进一步包含体积百分比为5.0-30%的甲醇。

6. 权利要求5的疫苗组合物,其中所述氯仿溶剂系统分别包含体积百分比为90%的氯仿:体积百分比为10%的甲醇:体积百分比为1.0%的水。

7. 疫苗组合物,其包含

(a) 福尔马林灭活的来自ATCC登记号PTA-10546的犬埃利希体;和

(b) 包含溶解于体积比为90:10:1的氯仿:甲醇:水中的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯的佐剂。

8. 犬埃利希体,其具有PTA-10546的ATCC登记号。

9. 细胞,其具有PTA-10545的ATCC登记号。

10. 权利要求7的疫苗组合物在制备用于针对犬埃利希体给受试者接种疫苗的药物中的用途。

11. 根据权利要求10的用途,其中所述疫苗组合物的第二个剂量在所述疫苗组合物的第一个剂量后约21天提供。

12. 用于产生福尔马林灭活的犬埃利希体抗原的方法,其包括用福尔马林灭活权利要求8的犬埃利希体抗原,以及浓缩所述灭活的犬埃利希体抗原以产生福尔马林灭活的犬埃利希体抗原。

针对犬埃利希体的疫苗和相关方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据美国法典第35篇第119(e)条要求获得2010年7月2日提交的美国临时申请序列号No.61/360,969的权益,其内容在此处被完整地通过引用并入。

发明领域

[0003] 本发明涉及针对由细菌犬埃利希体 (*Ehrlichia canis*) 引起的犬单核细胞埃利希病 (CME) 的免疫原性组合物和疫苗及相关方法。

[0004] 背景

[0005] 犬单核细胞埃利希病 (CME) 是由细菌犬埃利希体 (犬埃利希体, *E. canis*) 引起的在狗中的严重立克次体病。犬埃利希体经由褐色犬蜱 (血红扇头蜱 (*Rhipicephalus sanguineus*)) 从狗传播到狗。在感染后2 - 3周的培养期后,狗可以通过疾病的急性、亚临床和慢性期进展。在急性期中,临床体征范围为轻度到重度血小板减少症、白血球减少症、贫血、嗜睡和重量减轻。在两个月后,大多数狗将进入持续数月或数年的亚临床期,在这个过程中低血压值可能持续,但临床体征是最低的。小百分比的受感染狗可能发展称为热带犬全血细胞减少症 (TCP) 的严重形式的疾病。持续骨髓抑制、出血、神经学紊乱、外周性水肿、和严重重量减轻是TCP的特征。可能发展低血压休克,导致死亡。尽管迄今为止有针对犬埃利希体的免疫原性组合物的报道[参见例如,Mahan等人,*Onderstepoort J. Vet. Res.* 72 (2) :119-128 (2005);US 2006/0188524A1],但仍未出现针对犬埃利希体的有效疫苗的证实。因此,存在保护免于CME和/或TCP的疫苗的需要。

[0006] 本文任何参考文献的引用不应解释为此类参考文献可用作本申请的“现有技术”的承认。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了促进针对埃利希病的原因的保护性免疫应答的疫苗和/或免疫原性组合物。在某些实施方案中,疫苗组合物和/或免疫原性组合物包含这样的试剂,当作为初次疫苗施用于受试者时,其在受试者中引发最低的(如果存在的话)体液免疫应答。在特定实施方案中,免疫原性组合物包含这样的试剂,当作为初次疫苗施用,其在受试者中引发最低的(如果存在的话)体液免疫应答,但仍引发保护性免疫应答。一个此类实施方案是包含灭活的在狗骨髓细胞系上生长的犬埃利希体的疫苗。在这个类型的特定实施方案中,疫苗可以进一步包含佐剂。在这个类型的某些实施方案中,佐剂是索状因子。在更特定的实施方案中,索状因子佐剂溶解于氯仿溶剂系统中。

[0009] 在一个方面,本发明提供了包含来自犬埃利希体的抗原的疫苗组合物和/或免疫原性组合物,其在初始施用于受试者(例如作为初次疫苗)后,不引发针对抗原的显著抗体的产生。相应地,本发明的某些实施方案包括免疫原性组合物和/或疫苗组合物,其包含有效免疫量的来自犬埃利希体的抗原,其中组合物对于受试者的初始施用/初次疫苗引发最低的体液应答。在特定实施方案中,本发明提供了免疫原性组合物和/或疫苗,其在初始施用/初次接种疫苗后不引发可测量的体液应答,而是在受试者中引发保护性免疫应答。在某

些实施方案中,在初次接种疫苗/初始施用中的本发明的疫苗和/或免疫原性组合物引发细胞免疫应答,同时引发最低和/或无法测量的(例如无法检测的)体液应答。

[0010] 因此,在相关方面,本发明提供了包含有效免疫量的来自犬埃利希体的抗原的疫苗组合物。在这个类型的某些实施方案中,当疫苗作为初次疫苗施用,抗原在受试者中引发保护性免疫应答,但引发最低的体液应答。本发明的疫苗和/或免疫原性组合物可以包含如本文公开的由在细胞上生长和/或传代的犬埃利希体生成的抗原。在某些实施方案中,犬埃利希体在犬细胞系上生长和/或传代。在更特定的实施方案中,细胞系可以是狗骨髓细胞系。在更特定的实施方案中,细胞具有ATCC登记号PTA-10545,和/或是具备具有ATCC登记号PTA-10545的细胞的一种或多种和/或所有鉴定特征的细胞。在特定实施方案中,犬埃利希体抗原是具有ATCC登记号PTA-10546的细胞相关犬埃利希体,和/或具备具有ATCC登记号PTA-10546的细胞相关犬埃利希体的一种或多种和/或所有鉴定特征的细胞相关犬埃利希体。

[0011] 本发明进一步提供了具有ATCC登记号PTA-10546的细胞相关犬埃利希体。本发明还提供了具备具有ATCC登记号PTA-10546的细胞相关犬埃利希体的一种或多种和/或所有鉴定特征的细胞相关犬埃利希体。此外,本发明提供了具有ATCC登记号PTA-10545的细胞。本发明进一步提供了具备具有ATCC登记号PTA-10545的细胞的一种或多种和/或所有鉴定特征的细胞。

[0012] 此外,本发明的疫苗和/或免疫原性组合物的犬埃利希体抗原可以是灭活的。在某些实施方案中,灭活的犬埃利希体抗原是用福尔马林灭活的。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了包含佐剂的疫苗和/或免疫原性组合物。在这个类型的某些实施方案中,佐剂是亲脂佐剂。在某些实施方案中,亲脂佐剂在非极性溶剂内。在特定实施方案中,本发明的免疫原性组合物和/或疫苗包含抗原,其可以与疏水佐剂组合且制成与由疫苗和/或免疫原性组合物包含的极性溶剂系统易混合的。在更特定的实施方案中,佐剂包含索状因子如海藻糖6,6'-二霉菌酸酯。在特定实施方案中,海藻糖6,6'-二霉菌酸酯在非极性溶剂内。在更特定的实施方案中,佐剂包含在氯仿溶剂系统内溶解的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯。在特定实施方案中,氯仿溶剂系统包含约65-95%氯仿体积/体积。在更特定的实施方案中,氯仿溶剂系统包含约80-95%氯仿体积/体积。在特定实施方案中,氯仿溶剂系统包含约5.0-30%甲醇体积/体积。在更特定的实施方案中,氯仿溶剂系统包含约7.5-15%甲醇体积/体积。在特定实施方案中,氯仿溶剂系统包含约0.5-5.0%水体积/体积。在更特定的实施方案中,氯仿溶剂系统包含约0.75-2.5%水体积/体积。在某些实施方案中,氯仿溶剂系统分别包含约90%氯仿:10%甲醇:1.0%水体积/体积。在特定实施方案中,疫苗和/或免疫原性组合物包含福尔马林灭活的在具有ATCC登记号PTA-10545的保藏细胞中生长的细胞相关犬埃利希体和包含溶解于90:10:1氯仿:甲醇:水中的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯的佐剂。包含溶解于氯仿溶剂系统中的索状因子如海藻糖6,6'-二霉菌酸酯的组合物也是本发明的部分,如其作为佐剂的用途一样。

[0014] 此外,本发明提供了在特别适合于其生长的细胞和/或细胞系上生长的犬埃利希体细菌。本发明进一步提供了用于生产用于本发明的疫苗和/或免疫原性组合物的抗原的方法。因此,本发明提供了用于生产犬埃利希体抗原的方法。在特定实施方案中,犬埃利希体在巨噬细胞上生长。在某些实施方案中,犬埃利希体细菌在巨噬细胞样细胞系上生长。在

某些实施方案中,犬埃利希体在狗骨髓 (DBM) 细胞上生长,以生产细胞相关犬埃利希体抗原。在特定实施方案中,犬埃利希体细菌在DBM细胞系上生长。在特定实施方案中,DBM细胞系是DBM (WCS) MCS+12,ATCC登记号PTA-10545。在特定实施方案中,犬埃利希体是细胞相关的,WS MS+3,19517-001,ATCC登记号PTA 10546。在可替换的实施方案中,犬埃利希体在DH-82细胞系上生长。

[0015] 本发明的犬埃利希体抗原可以是灭活的犬埃利希体。在特定实施方案中,犬埃利希体抗原是菌苗。在某些实施方案中,灭活的犬埃利希体抗原是细胞相关的。

[0016] 本发明还提供了针对犬埃利希体免疫受试者的方法。此类方法可以包括给受试者施用本发明的疫苗组合物和/或免疫原性组合物。某些实施方案包含给受试者皮内施用本发明的疫苗和/或免疫原性组合物。另一种此类方法包括给受试者皮下施用本发明的疫苗和/或免疫原性组合物。另外一种此类方法包括给受试者经口施用本发明的疫苗和/或免疫原性组合物。在这个类型的特定实施方案中,动物受试者是犬。在另一个实施方案中,动物受试者是猫(例如家猫)。在特定实施方案中,提供疫苗组合物和/或免疫原性组合物的第二个剂量作为加强剂量。在某些实施方案中,加强剂量在疫苗组合物的初始剂量后约21天施用。

[0017] 本发明进一步提供了制备本发明的疫苗组合物和/或免疫原性组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于生产如本文描述的犬埃利希体抗原的方法。所述疫苗组合物和/或免疫原性组合物通过将本发明的抗原与兽医学合适的赋形剂混合进行制备。在这个类型的某些实施方案中,抗原是细胞相关的犬埃利希体菌苗。在特定实施方案中,兽医学合适的赋形剂是溶解于氯仿溶剂系统中的索状因子佐剂。

[0018] 本发明的这些和其他方面通过参考附图、详述和实施例将得到更好地理解。

[0019] 附图简述

[0020] 图1是随着对照动物(三角形)和接种疫苗的动物(正方形)时间过去的平均攻击后白血细胞计数的图解表示。粗线指示依照默克手册(Merck Manual)视为正常的最低水平的白血细胞计数。

[0021] 图2是随着对照动物(三角形)和接种疫苗的动物(正方形)时间过去的平均攻击后红血细胞计数的图解表示。粗线指示依照默克手册视为正常的最低水平的红血细胞计数。

[0022] 图3是随着对照动物(三角形)和接种疫苗的动物(正方形)时间过去的平均攻击后血红蛋白值的图解表示。粗线指示依照默克手册视为正常的最低水平的血红蛋白计数。

[0023] 图4是随着对照动物(三角形)和接种疫苗的动物(正方形)时间过去的平均攻击后血细胞比容值的图解表示。粗线指示依照默克手册视为正常的最低水平的血细胞比容计数。

[0024] 图5是随着对照动物(三角形)和接种疫苗的动物(正方形)时间过去的平均攻击后血小板计数的图解表示。粗线指示依照默克手册视为正常的最低水平的血小板计数。

[0025] 发明详述

[0026] 本发明提供了免疫原性组合物和疫苗,其可以减少在用犬埃利希体的强毒株攻击后血小板减少症、白血球减少症、贫血和重量减轻的发生率。本发明的结果与先前公开的关于受感染狗的报道不一致,其已通过抗生素治疗治愈,但对后续疾病敏感[参见例如,Breitschwerdt等人,*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(2) 362-368(1998)]。

这些先前报道提示在暴露于该生物后不发展保护性免疫。与之形成直接对比,本发明提供了通过给受试者施用本发明的免疫原性组合物和/或疫苗组合,用于改善和/或预防受试者中的犬单核细胞埃利希病(CME)和/或热带犬全血细胞减少症(TCP)的方法。因此,在一个方面,本发明提供了针对犬埃利希体的有效疫苗。

[0027] 如本文公开的,在犬埃利希体攻击模型的发展过程中,狗快速发展针对犬埃利希体的体液抗体应答。与抗犬埃利希体抗体的出现相关的是血小板计数中的快速下降,或血小板减少症,和几种其他临床适应症的开始。然而,在狗中诱导强体液抗体应答的疫苗未能保护其免于疾病的临床体征。事实上,产生针对犬埃利希体的强抗体应答的接种疫苗的狗在攻击后可能具有比未接种疫苗的对应物更差的临床结果。不受任何具体理论束缚,本文公开的结果看起来与犬埃利希体一致,其使用针对其产生的抗体,以通过调理作用的过程获得对细胞内部的进入。

[0028] 本发明进一步提供了生产用于免疫原性组合物和/或疫苗自身的抗原的方法。在特定实施方案中,该方法包含在特定细胞系上生长犬埃利希体以生产抗原。在一些实施方案中,抗原与兽医学合适的赋形剂混合。在更特定的实施方案中,本发明包括包含灭活的在狗骨髓细胞系上生长的犬埃利希体的组合。本发明的免疫原性组合物和/或疫苗可以进一步包括佐剂。

[0029] 尽管关于何种犬埃利希体区别何种细胞感染的选择性机制知之甚少,但适合于感染的细胞通常表达主要组织相容性复合物(MHC) II类抗原受体。Harris等人[Vet. Immunol. Immunopathol., 96:239-243 (2003)]已证实犬埃利希体具有用于下调在它感染的细胞表面上的MHC II类受体表达的机制作为用于避免免疫监督的可能机制。虽然明确源自蜱物种的细胞系不表达哺乳动物MHC II类受体,但Singh等人[Cellular Microbiology, 8(9), 1475-1487 (2006)]已证实犬埃利希体根据它正在感染脊椎动物还是无脊椎动物宿主来改变其表面蛋白表达。相应地,在另一个方面,本发明提供了适应犬埃利希体生长、而同时产生已对于疫苗使用优化的犬埃利希体抗原的细胞和/或细胞系。

[0030] 如本文使用的,“受试者”指可以受犬埃利希体感染的任何物种。在某些实施方案中,受试者是非人动物受试者。在特定实施方案中,受试者是犬或猫。在某些实施方案中,动物受试者是犬。在其他实施方案中,动物受试者是猫。

[0031] 如本文使用的,术语“犬”包括所有驯养狗、灰狼犬(Canis lupus familiaris)或家犬(Canis familiaris),除非另有说明。

[0032] 如本文使用的,“有效免疫量”可以取决于用于生成疫苗的犬埃利希体的一种或多种菌株而改变,并且可以是足以诱发保护性免疫应答的任何量。

[0033] 尽管如本文使用的,“保护性免疫应答”可以是在受试者中导致免于一种或多种感染适应症的保护的免疫应答,但“保护性免疫应答”不要求免于任何感染适应症的完全保护。相反,“保护性免疫应答”可以是足够的免疫应答,从而使得在攻击后,潜在感染的症状至少是减少的,和/或引起症状的一种或多种潜在细胞、生理学和/或生物化学原因或机制是减少和/或消除的。应当理解的是,如在这个背景中使用的“减少的”意指相对于感染状态,包括感染的分子状态,不只是感染的生理学状态。本发明的疫苗预期提供保护性免疫应答。

[0034] 如本文使用的,“引发最低的体液应答”意指当通过下述程序进行检测时,在初次

接种疫苗中给受试者(例如犬)施用包含犬埃利希体的疫苗组合物不导致在初次暴露于疫苗组合物后21天得自受试者的测试血清中针对犬埃利希体的抗体的检测:使测试血清的1:40稀释物暴露于固定的犬埃利希体,充分洗涤以去除所有未结合的材料,加入对于受试者物种合适的荧光标记的抗IgG抗体,充分洗涤以去除所有未结合的材料,并且随后经由对于犬埃利希体特异性的抗体,目视检查由于与固定的犬埃利希体结合的荧光标记的抗IgG抗体的荧光。在特定实施方案中,给受试者施用疫苗的单个后续加强剂量接种疫苗仍不引发针对犬埃利希体的显著体液应答,并且当通过上文对于初次疫苗进行的方法测定时,要求在暴露于加强剂量疫苗组合物后得自动物受试者的测试血清的1:160或更少的稀释度,以检测测试血清中针对犬埃利希体的抗体,如果它们是完全可检测的。

[0035] 如本文使用的,术语“稳定感染的”细胞系指在细胞培养的至少10次传代自始至终保持感染的细胞系。

[0036] 抗原

[0037] 本发明的犬埃利希体抗原可以从任何数量的犬埃利希体来源或菌株中分离。此类犬埃利希体菌株的例子包括但不限于Ebony、Broadfoot、Florida、Israel 611、Kogashima 1、Louisiana、Oklahoma、Venezuela、North Carolina State University (NCSU) 菌株Jake以及NCSU分离物Demon、D J和Fuzzy。在特定实施方案中,抗原可以是犬埃利希体菌苗。在另外实施方案中,抗原可以由已通过可获得任何合适方法灭活的犬埃利希体细菌分离或衍生。此类方法的例子包括但不限于热、甲醛、福尔马林、二乙烯胺、辐射和 β -丙内酯处理。在特定实施方案中,犬埃利希体细菌可以通过福尔马林处理灭活。

[0038] 在特定实施方案中,犬埃利希体抗原可以包含当一种或多种抗原提供给受试者时,未由受试者识别为外来的一种或多种抗原,即受试者未增强(mount)针对一种或多种抗原的体液应答或将增强针对一种或多种抗原的最低的体液应答。在一些实施方案中,一种或多种犬埃利希体抗原将不引发针对一种或多种犬埃利希体抗原的抗体的产生,或可替换地,将引发针对一种或多种犬埃利希体抗原的最低的抗体的产生。此外,此类犬埃利希体抗原将引发针对一种或多种犬埃利希体抗原的保护性免疫应答。本发明包括用于免于埃利希病类型的给犬接种疫苗的免疫原性组合物,其包含在犬中导致免疫应答的试剂,利用在犬中引发很少至无体液免疫应答,但仍在犬中引发保护性免疫应答的试剂作为试剂。在特定实施方案中,该保护性免疫应答至少部分是由于细胞介导的免疫应答。

[0039] 细胞

[0040] 本发明的犬埃利希体细菌可以在合适的细胞和/或细胞系上生长。相应地,来自犬埃利希体的抗原可以由在细胞系上生长或繁殖的犬埃利希体细菌产生。此类细胞和细胞系的例子包括原代细胞(例如巨噬细胞)和/或细胞系和/或连续细胞系例如下文列出的那些:

[0041] 原代细胞系:

[0042] ·犬血液巨噬细胞,参见例如[Nyindo,等人*Am. J. Vet. Res.* 32:1651-1658 (1971)]。

[0043] ·腹膜巨噬细胞,参见例如[Stephenson和Osterman,*Am. J. Vet. Res.* 38:1815-1819 (1977)]。

[0044] 连续细胞系:

[0045] ·人/犬杂交细胞系[参见例如,Stephenson和Osterman,*Am. J. Vet. Res.* 41:

234-240 (1980)]。

[0046] ·犬巨噬细胞细胞系 (DH-82) [参见例如,Dawson,等人,*J. Infect. Dis.* 163: 564-567 (1991)]。

[0047] ·鼠腹膜巨噬细胞;小鼠/狗杂交细胞系 (MDH-SP), [参见例如,Holland和Ristic, Abstr 55,第89页,Program and Abstracts of the IVth International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases,Piestany Spa,Czech and Slovak Federal Republics]。

[0048] ·小鼠巨噬细胞细胞系[参见例如,Keysary,等人,*J Vet Diagn Invest* 13:521-523 (2001)]。

[0049] ·狗骨髓细胞系 (DBM细胞) [参见例如,Gaunt 等人*J. Clin Micro.* 34 (6) :1429-1432 (1996)]。

[0050] ·猫胚胎成纤维细胞细胞系 (FEF) [参见例如,Battles 等人,WO 2009/036177 A1]。

[0051] ·蜱细胞系 (IDE8和ISE6) [参见例如,Munderloh,等人U. S. 5,869,335]。

[0052] 在本发明的一个方面,细胞系是巨噬细胞样细胞系,其表达类似于由犬巨噬细胞表达的那些的表面受体。在相关实施方案中,细胞系是巨噬细胞细胞系。在这个类型的特定实施方案中,采用的细胞系是具有ATCC登记号CRL-10389的DH-82细胞系。

[0053] 本发明包括已在单核细胞或巨噬细胞样哺乳动物细胞系上生长的犬埃利希体。在某些情况下,这些细胞系已永生化,以便提供用于制造疫苗的连续和可靠的生长基质。永生化细胞可以由肿瘤性转化祖细胞如由Wellman等人[*In Vitro Cell Develop Biol* 24: 223-228, (1988)]描述的DH-82细胞系产生。细胞可以通过使用病毒基因得到永生化。猿猴病毒40 (SV40) T抗原已显示为产生永生化细胞的非常可靠的途径,并且与SV40转化的人细胞杂交的犬腹膜巨噬细胞的体细胞杂交物通过Stephenson等人[*Am J Vet Res* 41 (2) : 234-40, (1980)]以连续方式用于生长犬埃利希体。广泛范围的试剂可以用于永生化细胞,包括不同病毒、x射线、有机溶剂、金属化合物和核酸。这些方法已由Rhim [*Annals NY Acad of Sci.* 919:16-25 (2000)]广泛综述。在本发明的特定实施方案中,犬埃利希体在此类细胞系中生长,并且随后灭活以形成犬埃利希体菌苗抗原。

[0054] 在特定实施方案中,细胞系是狗骨髓 (DBM) 细胞系。在特定实施方案中,DBM细胞系是由Gaunt等人[*J. Clin. Microbio.* 34 (6) :1429-1432, (1996)]描述的细胞系。在特定实施方案中,DBM细胞系是保藏菌株ATCC登记号PTA-10545。在特定实施方案中,细胞系是由犬埃利希体稳定感染的DBM细胞系。在这个类型的特定实施方案中,细胞相关的犬埃利希体是保藏的且具有ATCC登记号PTA-10546。在可替换的实施方案中,细胞系是昆虫细胞系。在这个类型的特定实施方案中,昆虫细胞系是蜱细胞系。在一个特定实施方案中,昆虫细胞系是从肩突硬蜱 (*Ixodes scapularis*) 分离的IDE8蜱细胞系,其已由ATCC保藏且具有ATCC登记号CRL-11973。

[0055] 犬埃利希体的繁殖

[0056] 由犬埃利希体感染的细胞培养物可以在烧瓶中生长,并且随后传至更大烧瓶,以获得制备免疫原性组合物和/或疫苗所需的更大体积的材料。可替换地,受感染的细胞培养物可以从烧瓶传至后续滚瓶、旋转瓶、细胞立方体、生物反应器或能够大规模生长细胞培养

物的任何装置内,以便产生掺和免疫原性组合物和/或疫苗所需的合适量的材料。受感染的培养物可以在合适培养基中冷冻且以后用于感染细胞培养物。

[0057] 细胞可以贴壁且附着至生长烧瓶或装置,包括附着至微载体,或可替换地,在悬浮液中漂浮。用于取出贴壁细胞的方法包括但不限于使用机械细胞刮棒从烧瓶中手动刮取,或用胰蛋白酶溶液处理以使其从烧瓶中取出,且随后用蛋白溶液中和未使用的胰蛋白酶。细胞随后可以离心以浓缩且重悬浮于合适的冷冻培养基中。冷冻培养基包括但不限于含有10-90%胎牛血清和1-20%二甲亚砜(DMSO)的培养基。可以使用其他合适的冷冻保护剂,其可能更适合于不同细胞系且在解冻和重新起始培养后导致高水平的活力。

[0058] 为了起始受感染的培养,未受感染的细胞可以从冷冻器中取出且在合适培养基中培养。例如,将含有 1×10^5 DBM细胞的1 mL小瓶快速解冻,且置于含有合适培养基的T-75组织培养瓶(75cm²表面积)内用于生长DBM细胞。在一个特定实施方案中,培养基是Fischer's完全生长培养基。例如,通过将200 mL马血清加入770 mL Fischer's培养基中制备用于DBM细胞的一升Fischer's完全生长培养基。通过加入10 mL 2 mg/mL氢化可的松溶液、10 mL 200 mM谷氨酰胺溶液和10 mL 1M HEPES溶液完成培养基。

[0059] 一旦DBM培养物达到合适的汇合水平(10-90%),培养物就准备受感染。从冷冻器取出受感染培养物的小瓶,快速解冻且分配到生长培养物上。培养物在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 在含或不含CO₂补充的加盖或通风烧瓶中生长。培养物根据本领域技术人员的常见方法根据需要通过将细胞传至新鲜培养基内得到维持。在几周后,可以通过使用抗犬埃利希体抗体或其他合适方法的间接荧光显微镜检查,就感染水平检查培养物。培养物可以达到90%或更高的感染水平。更高的感染水平是更希望的,因为它导致更高的抗原材料产量/培养物体积。通过培养物移至更大烧瓶、滚瓶或其他合适培养容器,可以将受感染培养物传至更大体积的培养物。

[0060] 细胞培养物通过犬埃利希体的感染可以通过几种方法进行测定,包括但不限于用染料例如吉姆萨染料、Camco Difquick染料或吡啶橙染色的细胞的显微镜分析。此外,对于犬埃利希体特异性的抗体可以用荧光标记直接或间接标记,并且用荧光光学显微镜和在对于特定荧光标记合适的波长显现。其他技术可以用于测定培养物的感染水平,包括但不限于定量聚合酶链式反应(qPCR)或PCR。

[0061] 未感染的细胞可以根据需要加入培养物中,以便维持培养物中的特定感染水平。当达到受感染培养物的合适体积时,可以通过多种方法灭活培养物,包括但不限于热或化学方法。在灭活前,可以滴定培养物以测定培养物中的感染性颗粒的量,作为测定将多少灭活后培养物加入掺和物中的方法。用于滴定受感染培养物的方法在下文实施例中提供。在某些实施方案中,将福尔马林加入培养物中至0.05%的终浓度,并且培养物在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 混合三天。可以使用的其他此类灭活剂包括但不限于:乙撑亚胺(EI,BEI)、β丙内酯和苯酚。抗生素也可以用于灭活培养物,如去氧土霉素或犬埃利希体对其敏感的任何其他抗生素。

[0062] 培养物可以通过任何数量的方法进行测试以测定活力。此类方法包括但不限于在细胞培养物上的反向滴定,关于承受非穿透性染料的膜完整性,和注射到狗内且监测感染的典型体征。

[0063] 一旦灭活,培养物就可以通过任何多种方法进行浓缩。例如,非存活犬埃利希体的浓缩可以通过离心、超滤或蒸发完成。在一个特定实施方案中,由犬埃利希体感染的DBM细

胞是灭活的,且随后以1400 x g离心15分钟,以沉淀全细胞。将上清液弃去且将沉淀重悬浮于不含血清的Fischer's培养基中。庆大霉素或类似防腐剂可以在灭活后加入,以避免污染物质(issues)。将培养物重悬浮于不含血清的Fischer's培养基中至原始体积的十分之一,以便浓缩灭活的培养物且使得其更易于处理。在灭活的浓缩物中可获得的抗原量可以通过任何数量的方法进行测定,包括层析、光谱法或多种类型的特异性免疫测定。大量抗原可以与稀释剂和佐剂掺和,以制备可接受的疫苗。

[0064] 免疫原性组合物和疫苗

[0065] 如上所示,包含本发明的抗原(例如犬埃利希体菌苗)的免疫原性组合物和/或疫苗可以但不一定进一步包括一种或多种药学可接受的佐剂。药学可接受的佐剂的例子是本领域众所周知的,参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(1990,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.)和Goodman和Gilman's,The Pharmacological Basis of Therapeutics(第10版2001)。在特定实施方案中,佐剂可以是刺激细胞介导的免疫应答但不刺激体液免疫应答的佐剂。

[0066] 进一步包含佐剂的本发明的免疫原性组合物和/或疫苗可以包含在水中一般不可溶的一种或多种元素。在特定实施方案中,佐剂是溶解于非极性溶剂中的非极性溶质。非极性溶剂的例子包括但不限于己烷、苯、甲苯、二乙醚、氯仿和乙酸乙酯。在一个此类实施方案中,溶剂是氯仿溶剂系统。氯仿在一些情况下可以是优选的,因为它是不易燃的且更适合于制造兽医学生物制品。本文例举的佐剂是在氯仿溶剂系统中的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯。

[0067] 非极性溶剂在水中一般不可溶,且因此具有相对低介电常数但在水中具有良好可溶性的极性溶剂的使用可以用于溶剂系统中,以增加佐剂混合物在水溶液中的可溶性。极性溶剂的例子包括但不限于甲醇、乙醇、异丙醇、二甲亚砜和二甲基甲酰胺。在特定实施方案中,非极性溶剂是索状因子[例如海藻糖6,6'-二霉菌酸酯]。其他非极性溶剂可以用于刺激细胞介导的免疫,包括但不限于纯化皂苷的疏水馏分、细菌脂肽(Pam₃CSK₄)和单磷酸脂质A。在特定实施方案中,索状因子溶解于氯仿溶剂系统中。在特定实施方案中,氯仿溶剂系统包含约65-95%氯仿体积/体积。

[0068] 相应地,氯仿溶剂系统的某些实施方案包括但不限于包含氯仿和甲醇的溶剂系统。在非限制性例子中,氯仿溶剂系统可以包含约70% - 95%氯仿和/或约5% - 30%甲醇体积/体积。在这个类型的某些实施方案中,氯仿溶剂系统进一步包含0.5 - 5.0 %水体积/体积。在一个非限制性例子中,氯仿溶剂系统可以包含按体积计九十份氯仿、按体积计十份甲醇和按体积计一份水[即分别约90%氯仿:10%甲醇:1.0%水体积/体积]。在特定实施方案中,佐剂可以包含溶解于氯仿溶剂系统中的索状因子和/或其他佐剂。在一个此类实施方案中,佐剂是溶解于氯仿溶剂系统中的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯:90 mL氯仿:10 mL甲醇:1 mL水。

[0069] 在特定实施方案中,疫苗组合物可以包含一种或多种药学或兽医学可接受的载体或稀释剂。可以用于疫苗组合物制剂中的载体或稀释剂的非限制性例子包括水、葡萄糖溶液、右旋糖/盐水、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、HEPES缓冲液、Fischer's培养基、Hank's溶液和Ringer's溶液。此类制剂可以含有药学可接受的辅助物质以增强稳定性、可递送性或可溶性,如缓冲试剂、张力调节剂、湿润剂、去污剂等。添加剂还可以包括另外的活性成分如杀菌剂或稳定剂。例如,溶液可以含有硫柳汞、庆大霉素、乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇酐单月桂酸酯或三乙醇胺油酸酯。组合物可以通过常规已知灭菌技

术进行灭菌。

[0070] 在特定实施方案中,考虑疫苗组合物可以进一步包含其他活性组分如但不限于针对下述的抗病原体组分,或抗原组分和/或其减毒和/或杀死的分离物:狂犬病病毒、莱姆病(伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*))、犬瘟热病毒、犬博德特菌属、犬细小病毒、犬腺病毒、犬冠状病毒、犬巴贝虫(*Babesia canis*)、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)、贾第虫属(*Giardia*);问号钩端螺旋体(*leptospira interrogans*)如血清变型犬型(*canicola*)、出血性黄疸型(*icterohaemorrhagiae*)、波摩那型(*pomona*)、感冒伤寒型(*grippotyphosa*)或布拉迪斯拉发型(*bratislava*)等,或其任何组合。

[0071] 在一些实施方案中,疫苗和/或免疫原性组合物可以以剂量单位形式配制,以促进施用且确保剂量的一致性。此处,当剂量单位涉及疫苗组合物时,它指适合作为用于受试者的单位剂量的物理上不连续单位,每个单位含有计算为与佐剂、载体和/或媒介物结合的产生所需免疫原性效应的预定量的犬埃利希体抗原。在某些实施方案中,免疫原性组合物和/或佐剂是冻干的。

[0072] 在某些实施方案中,根据通过可能暴露于犬埃利希体携带者的时间决定的时间表,疫苗和/或免疫原性组合物可以以有效量肠胃外施用,例如肌内、皮下、腹膜内、皮内等,或免疫原性组合物和/或疫苗可以以有效量经口或鼻内施用。以这种方式,在自然暴露前,处理的受试者可以具有时间以构建免疫。例如,典型的治疗时间表可以包括在潜在暴露前至少42天的皮下注射。在实施方案中,可以给受试者提供疫苗组合物的超过一次施用。作为非限制性例子,在受试者的潜在暴露前约42天的第一次施用和在约21天的第二次。然而,免疫的发作可以在更快速的时间过程中发生。

[0073] 疫苗的施用

[0074] 本发明的疫苗可以作为液体、乳状液、干燥粉末包括作为冻干粉末和/或在薄雾中通过任何肠胃外途径、静脉内、腹膜内、皮内、通过划破、皮下、肌内施用,或通过粘膜途径例如经口、鼻内、作为气溶胶、通过滴眼剂、通过卵内(*in ovo*)施用接种,或作为冷冻干燥粉末植入。

[0075] ATCC保藏

[0076] 下述生物学材料的培养物已在满足用于专利程序目的的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约的要求的条件下由下述国际保藏中心通过下述保藏:

[0077] Board of Supervisors,

[0078] Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College and LSU Agricultural Center, 104 Efferson Hall,

[0079] Baton Rouge, Louisiana, 70803

[0080] 美国典型培养物中心(ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A.。

<u>生物</u>	<u>ATCC 登记号</u>	<u>保藏日期</u>
[0081] 狗骨髓细胞	PTA-10545	2009 年 12 月 22 日
细胞相关的犬埃立克体	PTA-10546	2009 年 12 月 22 日

[0082] 本发明通过参考下述非限制性实施例可以得到更好地理解,所述实施例作为本发明的示例提供。呈现下述实施例以便更全面地举例说明本发明的优选实施方案。然而,它们决不应解释为限制本发明的较宽范围。

实施例

[0083] 实施例 1

[0084] 表1

[0085] 疫苗组合物

[0086]

抗原部分	使用的体积/重量
以6.5 log ₁₀ TCID ₅₀ /mL滴度的福尔马林灭活的犬埃利希体抗原	315 mL
佐剂:溶解于氯仿溶剂系统中的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯100 mg	101 mL
氯仿溶剂系统	
氯仿	90 mL
甲醇	10 mL
水	1 mL
Fischer's培养基	9479 mL
1 M HEPES缓冲液	94.9 mL
硫柳汞10%溶液	9.1 mL
庆大霉素溶液	0.96 mL
总掺和物体积	10 L

[0087] 实施例2

[0088] 研究设计和结果:

[0089] 表2

[0090] 测试动物描述

[0091]

物种	犬
初始年龄	9-11个月
性别	雌性
品种	实验室小猎犬
初始体重范围	在攻击当天9.0-16.6 kg
动物数量	16
鉴定方法	耳纹身
选择标准	在研究前通过兽医的体格检查且测定为健康和适合于使用的。在第一次接种疫苗前关于针对犬埃利希体的抗体血清学阴性的(≤ 1:40),在攻击前的正常血小板计数值(≥200,000/μL)。
淘汰标准	未符合入选标准的任何动物

[0092] 饲养 (Housing) 和动物管理:

[0093] 适应/调节:动物得自预先存在的库且因此不需要处理或调节。在研究开始前使动物适应至少7天。在研究自始至终对所有动物实施正常良好管理实践,并且常规程序跨越所有动物标准化。

[0094] 饲养:狗随机成组饲养在围栏中(4-5只狗/围栏),与处理组无关。

[0095] 饮食:水自由地提供给所有动物。饲料满足这个年龄的动物的最低营养需要且符合标准程序。

[0096] 表3

[0097] 处理组指定

[0098]

处理组	狗的数量	疫苗	剂量和途径	在研究日的接种疫苗	在研究日的攻击
1	8	无	无	无	42
2	8	是	1 mL皮下	0和21	42

[0099] 随机化:通过在区组(block)内生成随机数给狗排序,并且随后由相关的组ID分选。在区组内的最低随机数指定至组1,并且最高随机数指定至组2。因为重量减轻是与犬埃利希体感染相关的临床体征之一,所以狗还在随机化过程中按重量分区组。

[0100] 研究的盲化(blinding):测试实验室样品、进行每日动物观察、临床评估和进行验尸观察的人员不知道处理组指定,直到研究完成时。

[0101] 实验程序:

[0102] 接种疫苗前监控/适应:

[0103] 样品:在第一次接种疫苗前的研究第0天时将血液样品收集到血清分离管中用于抗体滴度分析。

[0104] 体格检查:所有动物都在第-3天时在测试设施通过主治医师接受体格检查且发现是健康且适合于研究的。

[0105] 每日观察:在适应期过程中,所有动物都通过动物护理人员每天进行观察。

[0106] 临床观察:在接种疫苗前第0和21天时记录临床体征和直肠温度。

[0107] 接种疫苗:

[0108] 生物制品的施用:疫苗在第0和21天时使用3 mL注射器和23规格x 1英寸针在1.0 mL剂量中皮下施用于每只动物。所有疫苗在运输至动物设施过程中和在疫苗施用过程中都保持在湿冰上。皮下接种疫苗对于第一个剂量在右肩胛上区域和对于第二个剂量在左肩胛上区域中进行。

[0109] 接种疫苗后程序:

[0110] 注射部位反应:在每次接种疫苗后记录注射部位观察共7天。

[0111] 每日观察:所有动物都在接种疫苗后期间过程中通过动物护理人员每日观察。

[0112] 血清学:在研究第21天时,将血液样品收集到血清分离管中用于抗体滴度分析。

[0113] 攻击前程序:

[0114] 临床观察:在研究第35、39和42天时(在攻击前),获得临床体征和直肠温度,以建立基线值。

[0115] 血液样品:在研究第42天时(在攻击前),将血液样品收集到血清分离管中用于抗

体滴度分析。在研究第35、39和42天时 (在攻击前), 将血液样品收集到EDTA管中用于基线CBCs。在研究第42天时 (在攻击前), 将血液收集到PAX Gene管中用于PCR分析。

[0116] 在研究第42天时 (在攻击前) 记录体重用于基线值。

[0117] 攻击:

[0118] 攻击材料: 从液氮中取出两小瓶犬埃利希体攻击材料 (在狗中低传代的冷冻培养物), 快速解冻且在Fischer's培养基中1:100 (1mL + 99mL) 稀释。将稀释的攻击材料塞住, 倒转混合, 并且随后取出1 mL用于滴定。将小瓶用铝盖密封, 标记且置于冰上防泄漏二次容器中用于运输至动物单元。

[0119] 攻击施用: 在第42天时, 所有狗都用2.0 mL稀释的攻击材料皮下攻击。

[0120] 攻击证实/反向滴定: 收集来自稀释的攻击材料的样品且在攻击当天在24孔组织培养板中用于立即滴定。

[0121] 攻击后监控:

[0122] 体重: 在攻击后每周记录体重。

[0123] 每日观察: 在攻击后每日记录动物观察, 除了进行临床观察和温度当天外, 直到研究第49天时。

[0124] 临床观察: 从研究第49天直到研究结束时, 每日记录临床体征 (抑郁、脱水、鼻出血和鼻/眼分泌物), 并且每周两次记录直肠温度。

[0125] 注射部位反应: 在攻击后进行注射部位观察共7天。

[0126] 血液样品:

[0127] 用于CBCs的血液: 在攻击后每周两次收集血液样品 (EDTA) 用于监控CBC特征。

[0128] 用于PCR测试的血液: 每周将血液收集到PAX Gene管中用于PCR分析。

[0129] 用于血清的血液: 在攻击后每两周使狗放血一次用于血清学。

[0130] 验尸/处置: 所有测试动物都通过在验尸前静脉内注射Beuthanasia实施人道安乐死。

[0131] 样品收集和处理:

[0132] 用于CBCs的EDTA血液: 使用含有三钾-EDTA的抽成真空的管, 通过颈静脉的静脉穿刺收集血液。将血液在冰袋上包装且当天处理用于血液特征分析。

[0133] 用于抗体分析的SST血液: 使用抽成真空的管, 通过颈静脉的静脉穿刺收集血液。将血液以2500 RPM离心10分钟且将血清标记且贮存于-10℃或更冷的温度。

[0134] 用于PCR测试的血液: 使用抽成真空的PAX Gene管, 通过颈静脉的静脉穿刺收集血液并且进行PCR分析。

[0135] 分析方法:

[0136] 血小板计数: 根据本领域充分确定的程序测定血小板计数。

[0137] 犬埃利希体滴定: 测试稀释的攻击材料的保留样品。简言之, 在24孔板中以 1.0×10^5 细胞/mL的浓度制备DBM细胞且在测定在 36 ± 2 摄氏度孵育1天。从1天大的DBM培养物中无菌取出培养基, 并且将十倍系列稀释的攻击材料以1mL/孔加入24孔板的4个重复孔。将板在 36 ± 2 摄氏度孵育7天。在7天后, 将板以1mL/孔再补给新鲜的Fischer's生长培养基, 且送回 36 ± 2 摄氏度共7天。在孵育14天后, 将板以2000 RPM离心10分钟, 抽吸培养基且将培养物用100%甲醇 (0.5 mL/孔) 固定10分钟。一旦板干燥, 就加入0.5 mL/孔的

小鼠抗犬埃利希体单克隆抗体(在0.01M PBS中1:1000稀释),并且在 36 ± 2 摄氏度孵育30分钟。将板在0.01M PBS中洗涤3次,以及在水中最后洗涤。随后加入0.5 mL/孔的FITC标记的山羊抗小鼠IgG(在0.01M PBS中1:100稀释),并且在 $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 孵育30分钟。将板再次洗涤,并且在荧光显微镜下观察。使用Spearman-Karber方法在50%终点时计算滴度。

[0138] 血清学:间接免疫荧光抗体(IFA)测定用于检测狗血清中的抗犬埃利希体抗体。简言之,在血清稀释缓冲液中制备最初1:20稀释的血清。将单个样品稀释至1:40、1:80、1:160和1:320,并且随后加入(10 μL /稀释度)含有固定的犬埃利希体感染的DBM细胞的12孔载玻片,并且在增湿室中在 36 ± 2 摄氏度孵育30分钟。将载玻片在0.01M PBS中洗涤10分钟,并且将10 μL FITC标记的山羊抗狗IgG(在0.01M PBS中1:100稀释)加入载玻片上的每个孔中。随后将载玻片置于增湿室内在 36 ± 2 摄氏度共30分钟,在0.01M PBS中洗涤10分钟,并且通过荧光显微镜检查读数。滴度通过其中可见荧光的最高稀释度测定。

[0139] PCR:根据本领域充分确定的程序对血液样品进行PCR。

[0140] 灭活测试:测试福尔马林灭活的抗原以检查完全灭活。简言之,在接种前一天在150 cm^2 烧瓶中以 1.0×10^5 细胞/mL和60 mL/烧瓶制备DBM细胞。将1.0 mL每种测试样品(包括阳性和阴性对照)接种到烧瓶内且在 36 ± 2 摄氏度孵育8天。进行两次盲目传代(blind passage),其中每次传代接受10 mL先前传代接种物。在第2次盲目传代后8天时,通过特异性免疫荧光染色每个烧瓶材料。培养物中荧光的缺乏指示完全灭活。

[0141] 数据分析:

[0142] 结果变量:用于测定疫苗制剂功效的主要变量基于与对照相比较在接种疫苗中重度血小板减少症的预防。百分比重量减轻、验尸总评分、血液值和临床体征视为保护的支持证据。

[0143] 临床观察的评分:对于攻击后12周期间,记录关于每只狗的临床体征并且每日评分。

[0144] 临床评估指导:在进入分离室后,走过去以评估动物的态度。关于抑郁的评分可以在这个第一次步行过程中在许多动物中测定。接下来进行到临床观察。随后,测量体温随后获得所需血液样品。

[0145] 死亡:100点(无生命体征,包括垂死和实施安乐死的狗)。

[0146] 抑郁:不存在(正常活动和行为)。存在:嗜睡,当你在室内时躺下,和勉强起立。

[0147] 鼻分泌物:正常(不存在);严重(中度到重度):透明流体,通常像水,一直下至口或低于口 - 沿着鼻侧或鼻人中(nasal philtrum)下;粘液脓性的(中度到重度):粘液脓性的,不透明,通常有色的分泌物一直下至口或低于口 - 沿着鼻侧或鼻人中下。

[0148] 眼分泌物:正常(不存在);严重(中度到重度):透明流体,通常像水,下至鼻一半或红眼眶(rimming eye)加上合并或在眼内角或外角处浸透的毛发;粘液脓性的(中度到重度):粘液脓性的,不透明,通常有色的分泌物下至鼻一半或红眼眶加上合并或在眼内角或外角处或浸透毛发。

[0149] 鼻出血:(从鼻孔出血) - 正常(不存在);存在:从鼻孔出血。

[0150] 脱水:正常(不存在);存在:在肩膀之间的皮肤褶皱粘着一起或花费长于3秒缩回。

[0151] 表4

[0152] 用于具体临床体征的评分系统

[0153]

死亡	100
抑郁状态	2
鼻分泌物	
严重分泌物	1
粘液脓性分泌物	2
眼分泌物	
严重分泌物	1
粘液脓性分泌物	2
鼻出血	2
脱水	1

[0154] 百分比重量减轻计算:每只狗在攻击前称重,以测定基线重量。关于每只狗的重量减轻在攻击后每周使用下式进行计算:((基线重量 - 目前重量)/基线重量) x 100 = %重量减轻。

[0155] 结果和讨论:

[0156] 并发疾病:一只对照狗必须在研究过程中进行处理。该犬在其左眼中发展溃疡,并且眼睑肿大关闭。避免抗生素以便不影响研究。该状况在特定日发现。在那时,用等渗盐水冲洗眼。两天后,该狗局部接受阿托品的皮下注射。在该状况发现后5天,该狗由兽医观察为完全恢复。该状况可能由创伤(来自另一只狗的抓伤)引起,并且不是研究测试产品或攻击的结果。

[0157] 接种疫苗前测试:狗在接种疫苗前就针对犬埃利希体的抗体的存在进行筛选。当通过犬埃利希体特异性免疫荧光抗体(IFA)测定测试时,发现所有狗都具有<40的滴度(参见表5;第42天是攻击日)。临床观察和直肠温度也在接种疫苗前获得。发现所有狗都是临床正常的。

[0158] 表5

[0159] 平均血清学概括

[0160]

处理组	第0天	第21天	第42天	第56天	第70天	第84天
对照	<40	<40	<40	<40	≥147	≥320
接种疫苗	<40	<40	≥123	≥104	≥207	≥207

[0161] 接种疫苗后测试:

[0162] 观察到接种疫苗的狗无一在接种疫苗后具有注射部位反应。所有狗每日观察在两次接种疫苗后与疫苗相关的不良反应。所述狗无一显示在接种疫苗后的任何不利临床体征。

[0163] 在临第二次接种疫苗前,获得血液样品用于接种疫苗后第21天的血清学。在由犬埃利希体感染的DBM细胞包被的12孔载玻片上,使用血清的二倍稀释测量滴度。稀释以1:40开始。接种疫苗组中的狗无一在疫苗的单个剂量后显示超过1:40背景的滴度(参见表5)。

[0164] 在第42天时,在临攻击前,接种疫苗的犬埃利希体抗体滴度的击倒(breakdown)如下(表5):

[0165] 滴度< 40:0只狗

[0166] 滴度= 80:4只狗

[0167] 滴度= 160:3只狗

[0168] 滴度> 320:1只狗

[0169] 所有未接种疫苗的对照狗在攻击前保持血清阴性(<1:40)。

[0170] 攻击:在研究的第42天时,通过在Fischer's培养基中将解冻的攻击材料稀释1:100且对每只狗皮下施用2 mL攻击来攻击所有狗。攻击材料在对狗施用时针定且发现具有 $10^{3.2}$ TCID₅₀ /2 mL剂量的滴度。

[0171] 攻击后临床评估:

[0172] 与攻击相关的重量减轻:在攻击后每周记录体重。结果概括于表6中。

[0173] 表6

[0174] 攻击后的平均体重 (Kg)

[0175]

	基线	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	第7周	第8周
处理组	第42天	第49天	第56天	第63天	第70天	第77天	第84天	第91天	第98天
对照	13.3	13.4	13.4	13.2	12.8	11.9	11.4	11.5	11.5
	平均百分比重量减轻				3.89%	11.15%	14.83%	16.97%	15.91
接种疫苗	10.8	10.8	10.9	10.6	10.2	9.9	9.8	9.9	9.9
	平均百分比重量减轻				4.86%	7.29%	7.88%	7.85%	7.61%

[0176] 在对照狗中可见最高的百分比重量减轻,在攻击后7周具有体重中的16.97%减少的平均值。这也是其中在处理组之间存在最大差异的点,因为接种疫苗的仅经历体重中的7.85%下降。统计学检查重量减轻。重度重量减轻定义为 $\geq$ 狗体重的15%。与接种疫苗的12% (1/8) 相比较,对照狗的87% (7/8) 具有 $\geq$ 其体重15%的重量减轻。这个差异是极端显著的 ($p = 0.0042$)。

[0177] 死亡率:对照组中的八只狗中的两只 (25%) 由于临床体征的严重性而实施安乐死。接种疫苗的无一在试验过程中死亡。安乐死是兽医基于临床体征、重量减轻以及血细胞和电解质值的判断命令。主治兽医对于组指定是不知情的。差异是支持性的,但不是显著的,由于研究中狗的低数量 ($p = 0.2118$)。

[0178] 全血细胞计数估计:血液样品也在研究第35、39和42天时获得,以设定用于白和红血细胞 (WBC和RBC)、血细胞比容 (HCT)、血红蛋白 (Hgb) 和血小板的基线值。根据默克兽医学手册,第八版 [Merck and Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA, (1998)],所有狗在攻击前都在关于这些测量的正常范围中。

[0179] 在攻击后每周两次收集血液样品。CBC结果包括白血细胞 (WBC's)、红血细胞 (RBC's)、血红蛋白 (Hgb)、血细胞比容 (Hct或细胞压积 (packed cell volume)) 和血小板。因为犬埃利希体对血液值具有此类显著效应,所以开发了将发生率评定为“正常、异常或临床上显著 (或重度) 的评分系统。表7概括了在这个研究中使用的值。

[0180] 表7

[0181] 血液样品结果概括

[0182]

	单位	狗值 (正常)	异常值	临床上显著的“重度”值*
WBC	$\times 10^3/\mu\text{L}$	6 - 17	<6.0	持续多天 ≤ 4.5

RBC	$\times 10^6/\mu\text{L}$	5.5 - 8.5	<5.5	持续多天 ≤ 4.0
Hgb	g/dL	12 - 18	<12	持续多天 ≤ 8
Hct	%	37 - 55	<37	持续多天 ≤ 28
血小板	$\times 10^3/\mu\text{L}$	200 - 900	<200	持续多天<150

[0183] *默克兽医学手册。

[0184] 临床上显著(或重度)的值计算为持续多天的正常范围下限的大致75%。这个范围中的狗通常观察为具有可能与相关血细胞缺乏直接关联的临床体征。异常值是在对于正常的最低水平下的任何值。

[0185] 血小板:低血小板计数是与立克次氏体感染相关的主要临床体征。对于这个研究,它是主要变量。犬埃利希体非常善于引起受影响狗中的血小板计数中非常严重的下降。所有8(100%)只对照狗和5/8(63%)只接种疫苗的狗发展血小板减少症(血小板计数<200,000/ μL)。图5显示了在攻击后的平均血小板计数(对照与接种疫苗相比较),并且表8提供了数据的概括。对于两次或更多次读数具有小于150,000血小板/ μL 血液的血小板计数的狗视为在重度类别中,且处于损伤后出血的高度危险中。动物护理工作可以容易地鉴定这些狗,因为在获得样品后与静脉穿刺放血有关的损伤持续相当大量的时间。对于对照狗,8只中的6只(75%)具有在重度类别中的血小板计数。仅2/8(25%)只接种疫苗的狗具有在重度类别中的计数。统计上,该差异是不显著的($p = 0.0768$)。然而,至少一只对照狗中的死亡率被检查数据,因为该狗在研究中早期死亡,因为它展示出重度血小板减少症。如果该狗未死亡,那么该研究将已得出结论:至少7/8只对照展示出重度血小板减少症。因为死亡率是比血小板减少症严重得多的临床体征,所以主要变量再分析为血小板减少症或死亡率。考虑到死亡率,在对照和接种疫苗之间的差异变得显著($p = 0.0213$)。

[0186] 表8

[0187] 血小板结果的概括

[0188]

分类	轻度	异常低的*	临床上显著的
	具有如通过方案定义为血小板减少症的百分比狗(<基线计数的50%)	具有血小板<200*的百分比狗	具有持续超过一天的血小板 ≤ 100 的百分比狗
对照	100% (8/8)	100% (8/8)	75% (6/8)
接种疫苗	63% (5/8)	63% (5/8)	25% (2/8)

[0189] *如通过默克手册定义为血小板减少症。

[0190] 红血细胞:图2显示了关于攻击后期间的平均红血球计数。图2显示了对照狗的平均值对于大多数试验期低于正常,其中接种疫苗的平均值对于大多数试验期停留在正常范围内。表9举例说明了攻击的严重性,因为100%的对照狗满足默克手册的贫血定义,并且63%进展至重度类别。接种疫苗的狗无一进展至贫血的重度类别。该差异是非常显著的($p = 0.0081$)。

[0191] 表9

[0192] RBC结果的概括

[0193]

分类	异常低的*	临床上显著的
	具有RBC计数 $< 5.5 \times 10^6/\mu\text{L}$ 的百分比狗	具有持续超过一天的RBC计数 $\leq 4.0 \times 10^6/\mu\text{L}$ 的百分比狗
对照	100% (8/8)	63% (5/8)
接种疫苗	50% (4/8)	0%

[0194] *如通过默克手册定义为贫血。

[0195] 白血细胞:图1概括了关于攻击后期间的白血球计数结果。图1显示了在对照中观察到的白细胞计数中的严重下降。数据最佳概括于表10中,其中在狗中观察到关于轻度和重度白血球减少症的显著差异。对照组中38%的狗进展至白血球减少症的“重度”类别,其中接种疫苗的无一死亡。该差异不显著 ($p = 0.0822$)。表10和图1举例说明了在关于接种疫苗和对照的平均值之间的差异。对照的平均值降到关于正常的最低水平之下,而接种疫苗的平均值则不是。这个趋势提示,如果在每个研究组中具有更多动物,差异可能是显著的。

[0196] 表10

[0197] WBC结果的概括

[0198]

分类	异常低的*	临床上显著的
	具有WBC计数 $<6 \times 10^3/\mu\text{L}$ 的百分比狗	具有持续超过一天的WBC计数 $\leq 4.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ 的百分比狗
对照	88% (7/8)	38% (3/8)
接种疫苗	50% (4/8)	0%

[0199] *如通过默克手册定义为白血球减少症。

[0200] 血红蛋白值:图3概括了攻击后血红蛋白测量的结果。与其他血液参数一致,图3显示了对于多数攻击后期间,对照的平均值远远降到最小值之下。接种疫苗组平均值从未低于正常。表11显示了100%的对照狗具有低血红蛋白值,而仅50%接种疫苗的下降到这个水平。接种疫苗的无一进展至关于血红蛋白水平的重度类别。然而,仅25%的对照进展至重度类别,并且该差异不显著 ($p = 0.2118$)。

[0201] 表11

[0202] 血红蛋白结果的概括

[0203]

分类	异常低的*	临床上显著的
	具有Hgb值 $<12 \text{ g/dL}$ 的百分比狗	具有持续超过一天的Hgb值 $\leq 8\text{g/dL}$ 的百分比狗
对照	100% (8/8)	25% (2/8)
接种疫苗	50% (4/8)	0%

[0204] *如通过默克手册定义为贫血。

[0205] 血细胞比容百分比:图4概括了攻击后的血细胞比容值的结果。与贫血的其他测量一致,图4显示了对于攻击期的后半部分,对照平均值远远低于正常,而接种疫苗的狗平均值从未低于正常。表12显示了如通过血细胞比容测量的,用测试产品给狗接种疫苗使贫血的发生率降低一半。63%的 (5/8) 对照狗进展至关于血细胞比容的重度类别,而接种疫苗组中的仅1/8狗 (13%) 具有重度值。该差异非常接近于显著性 ($p = 0.0534$)。

[0206] 表12

[0207] 血细胞比容结果的概括

[0208]

分类	异常低的*	临床上显著的
	具有Hct值 $<37\%$ 的百分比狗	具有持续超过一天的Hct值 $\leq 28\%$ 的百分比狗
对照	100% (8/8)	63% (5/8)
接种疫苗	50% (4/8)	0%

[0209] *如通过默克手册定义为贫血。

[0210] 临床体征:每只狗每日观察指示严重感染的临床体征。结果概括于表13中。临床体征评分基于通过就抑郁、鼻分泌物、眼分泌物、鼻出血、脱水和死亡的体征观察狗的不知情人员作出的观察。评分相对于临床体征的严重性指定至每次观察。关于对照组的总评分是254,与接种疫苗的28相比较。关于对照的平均评分与接种疫苗相比较分别是32和4。尽管看起来非常指示保护,但在组之间的差异不显著 ($p = 0.4364$)。

[0211] 表13

[0212] 临床评分的概括

[0213]

组	总评分	平均值	中值
对照	254	32	5
接种疫苗	28	4	1

[0214] 直肠温度:每周两次获得且记录直肠温度。如果直肠温度 >39.5 摄氏度,那么狗视为发热的。这与默克兽医学手册一致,其列出了正常温度范围为 38.9 ± 0.5 摄氏度。犬埃利希体已知在受影响的狗中引起温度峰值(spikes)。来自这个研究的观察与这点一致,并且概括于表14中。与50%(4/8)的接种疫苗的相比较,87.5%(7/8)的对照具有发热峰值。发热峰值就差异在统计上进行比较。25%(2/8)的对照具有两天或更多天的发热,而仅12.5%(1/8)的疫苗这样。该差异不显著 ($p=0.6709$)。

[0215] 表14

[0216] 直肠温度的概括

[0217]

组	w/发热的狗百分比	w/发热多天的狗百分比
对照	87.5% (7/8)	25% (2/8)
接种疫苗	50% (4/8)	12.5% (1/8)

[0218] *发热定义为直肠温度 $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$ 。

[0219] 攻击注射部位反应性:狗在攻击部位就反应性进行观察。在接种疫苗组或对照组中的16只狗无一显示出在攻击施用部位处的任何反应性体征。

[0220] 在血液中的犬埃利希体的PCR检测结果:在临攻击前获得血液样品用于PCR分析,以测定犬埃利希体感染。PCR结果显示于表15中。如预期的,所有狗在攻击前都保持对于犬埃利希体感染阴性。关于攻击后对于犬埃利希体感染的血液的每周PCR分析结果在表15中。所有对照狗都在超过一个时间点血液中对于犬埃利希体是阳性的。PCR在接种疫苗的三只中从未检测到犬埃利希体。这些结果完全匹配血小板的结果,因为这些相同的狗在攻击后未能发展血小板减少症。对于阳性结果在对照和接种疫苗之间的差异不显著 ($p = 0.0822$)。

[0221] 表15

[0222] 基于PCR在攻击后由犬埃利希体感染的动物的百分比

[0223]

			第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	第7周	第8周
处理组		第42天	第49天	第56天	第63天	第70天	第77天	第84天	第91天	第98天
对照	%阳性	0%	0%	0%	50%	88%	100%	100%	75%	75%

接种疫苗	%阳性	0%	0%	0%	50%	63%	63%	63%	50%	63%
------	-----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0224] 攻击后的血清学: 攻击后每两周进行血清学。关于接种疫苗的狗的血清学结果回答了这个问题中的狗是否实际上暴露于犬埃利希体的问题, 所述狗通过PCR是阴性的且在攻击后未能发展临床体征包括血小板减少症。在第42天(攻击日)后的一些点, 所有这三只狗都具有滴度中的快速上升, 指示暴露于攻击材料。关于血清学的平均值的概括显示于表5中。抗体滴度与保护的关联性根据这个研究不明确。血清学看起来的确是暴露于强毒犬埃利希体的良好指示物。

[0225] 验尸评分: 在安乐死时对所有狗进行验尸, 并且进行验尸的人员是不知情的。对于大多数狗, 这在攻击后第八周时。对于由于重度临床体征必须早期实施安乐死的狗, 在死亡时进行验尸。在安乐死后立即将狗验尸且评分。脾肿大 (Splenomegally) 是可能与犬埃利希体感染明确相关的一个观察。接种疫苗状态看起来对脾肿大的观察具有作用 (表16)。与关于对照的38% (3/8) 相比较, 接种疫苗的狗无一具有脾肿大。该差异不显著 (0.0822)。在必须在8周试验结束前实施安乐死的狗中, 主治医师注意到存在腹部流体累积的一致发现。因为低血清白蛋白水平导致在循环和组织之间的渗透不平衡, 所以可能产生在腹腔中的流体累积。对于试验期的剩余部分, 按顺序对送进用于测试的每两周一次的血液样品进行化学部分分析 (chemical panels)。关于白蛋白水平的这些测试的结果概括于表17中。一半对照 (4/8) 在验尸时观察到在腹腔中具有流体的显著累积。在的确具有流体累积的对照中, 其中50%具有超过200 mL的回收流体的重度评分。接种疫苗的无一具有任何流体累积 (表16)。该差异不显著 ($p = 0.2118$)。存在与血清白蛋白水平和血小板计数的有趣关联。发展血小板减少症的所有狗都具有低于正常的白蛋白值。接种疫苗的状态看起来明确影响血清白蛋白水平, 其中6/8对照 (75%) 降到对于血清中的白蛋白浓度的最小值75%之下, 而仅3/8 (25%) 接种疫苗的下降至这个水平 (表17)。

[0226] 表16

[0227] 验尸发现的概括

[0228]

外部表现	腹部流体	脾	肺	胃	降结肠	# 验尸总评分
<u>受影响的对照狗的百分比</u>						
38%	50%	38%	13%	38%	0%	26
<u>受影响的免疫接种狗的百分比</u>						
25%	0%	0%	13%	50%	38%	18

[0229] #在每组中对于8只动物的验尸总评分。

[0230] 表17

[0231] 血清白蛋白结果的概括

[0232]

分类	异常	临床上显著的
	具有血清白蛋白<2.5*的百分比狗	具有持续超过一天的血清白蛋白<1.9的百分比狗
对照	100% (8/8)	50% (4/8)
接种疫苗	75% (6/8)	38% (3/8)

[0233] *如通过默克手册定义为下限

[0234] **“临床上显著的”定义为持续超过一天的最小值的75%。

[0235] 所有结果的概括表:为了尝试且捕捉所有这些复杂结果的严重性,产生概括表(表18)。在这个表中,对于这个试验中测量的每个参数仅检查临床上显著的(严重)评分。与关于接种疫苗的3.5相比较,关于对照的平均严重性评分是14.6。这个显著差异突出显示了在所有接种疫苗与对照相比较中测试产品的功效。

[0236] 结论:

[0237] 攻击是有效的,并且比计划的更有力,因为100%的对照发展血小板减少症、针对犬埃利希体的高滴度、严重临床体征、重量减轻并且两只狗必须实施安乐死。

[0238] 当考虑到由于死亡率的检查时,主要变量重度血小板减少症的发生率显示在接种疫苗中低于对照中,并且差异是显著的($p = 0.0213$)。

[0239] 接种疫苗看起来对死亡率具有作用,因为25%的对照和接种疫苗无一在攻击后由于人道原因必须实施安乐死。

[0240] 重度重量减轻由对照组中的狗经历,其中一些狗在攻击后八周过程中丧失其体重的几乎25%。重度重量减轻的发生率在接种疫苗中低于对照中,并且该差异极端显著($p = 0.0042$)。

[0241] 关于达到重度水平的其他血液参数在接种疫苗和对照之间的差异不是非常显著,尽管一些非常接近。这些包括WBCs ($p = 0.08221$)、血细胞比容 ($p = 0.0534$) 和血红蛋白 ($p = 0.2118$)。

[0242] 在血液中犬埃利希体的PCR检测精确匹配对于血小板减少症的发生率获得的结果。

[0243] 接种疫苗组中的三只狗从未显示出感染的任何临床体征或具有通过PCR在血液中可检测水平的犬埃利希体。然而,血清学指示这三只狗看起来在攻击后具有针对犬埃利希体的抗体再生应答,指示它们暴露于强毒攻击材料。

[0244] 由于血液中的严重度白蛋白缺乏导致的在腹腔中的流体累积仅在对照狗中可见,而在接种疫苗中不可见。

[0245] 与接种疫苗相比较,临床体征包括抑郁、鼻分泌物、眼分泌物、鼻出血、脱水和死亡在对照狗中是最严重的,然而,该差异在组之间不是显著不同的($p = 0.4364$)。

[0246] 攻击后的直肠温度峰值在对照狗中更常见。

[0247] 接种疫苗和攻击注射都没有对狗产生任何可观察到的反应。

[0248] 在验尸后,脾肿大的观察仅在对照中可见。

[0249] 这些结果支持本发明的疫苗的功效。

[0250] 表18

[0251] 严重度类别中所有结果的概括

[0252]

处理组	重量减轻	WBC	RBC	PCV	血红蛋白	血小板	死亡率	发热	腹腔流体	脾肿大	白蛋白	PCR+/-	*总评分
对照	21	9	15	15	6	18	是	4	6	3	12	8	117
接种疫苗	3	0	0	3	0	6	否	2	0	0	9	5	28

[0253] 重量减轻 - $>15\%$ 体重 = 3

[0254] WBC - 两天或更多天 $\leq 4.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ = 3

[0255] RBC - 两天或更多天 $\leq 4.0 \times 10^6/\mu\text{L}$ = 3

[0256] 血细胞比容/PCV - 两天或更多天 $\leq 28\%$ = 3

[0257] 血红蛋白- 两天或更多天 $\leq 8\text{g/dL}$ = 3

[0258] 血小板 - 两天或更多天 $\leq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$ = 3

[0259] 发热 - 温度 ≥ 39.5 两天或更多天= 2

[0260] 腹腔流体- $>200\text{ ml}$ = 3

[0261] 脾肿大 - 是 =1

[0262] 白蛋白- 两天或更多天 $\leq 1.9\text{g/dL}$ = 3

[0263] PCR =在研究过程中任何时候阳性 = 1

[0264] #在每组中对于8只动物的总评分。

[0265] 应当理解的是,本发明并不限于本文公开的具体配置、方法步骤和材料,因为此类配置、方法步骤和材料可以略微改变。还应当理解的是,本文采用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且不预期是限制性的,因为本发明的范围将仅受随附的权利要求及其等同物的限制。

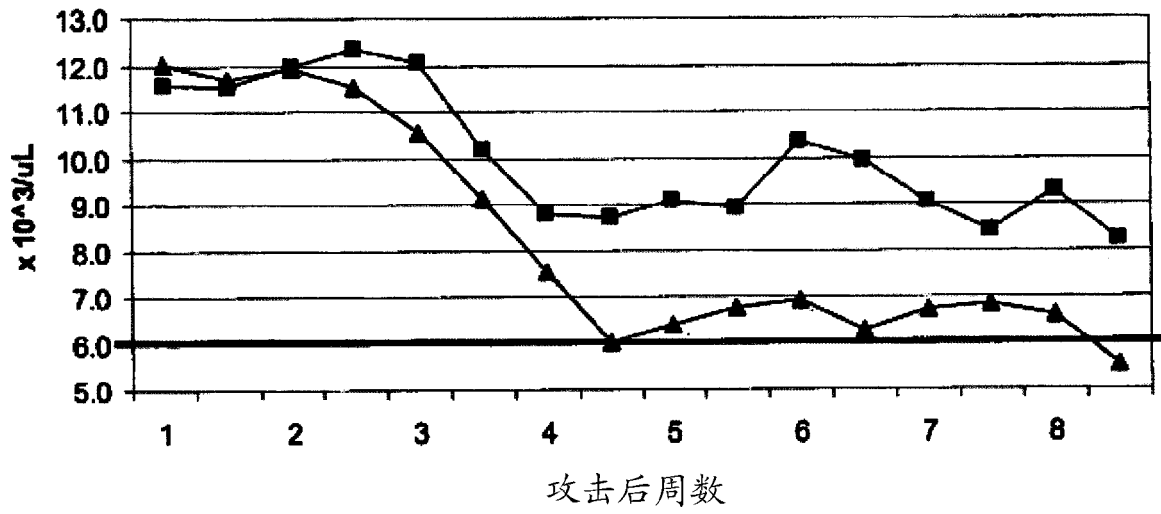


图 1

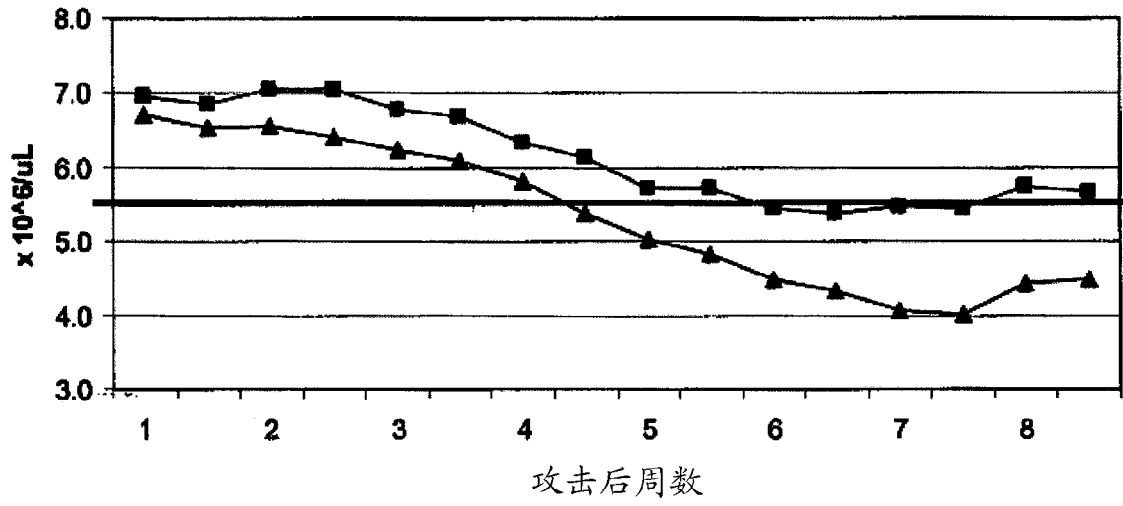


图 2

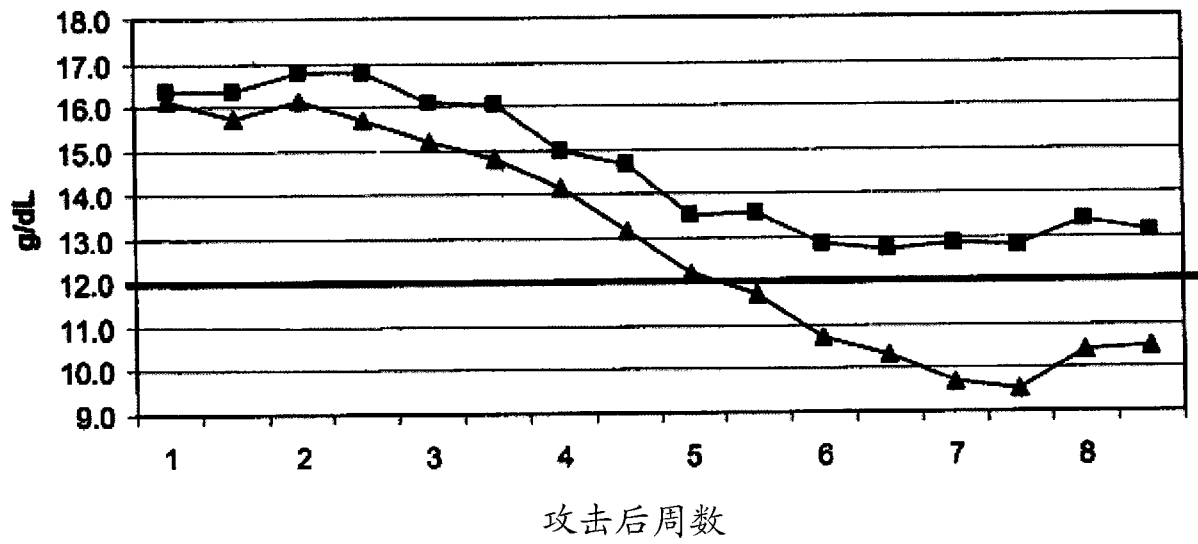


图 3

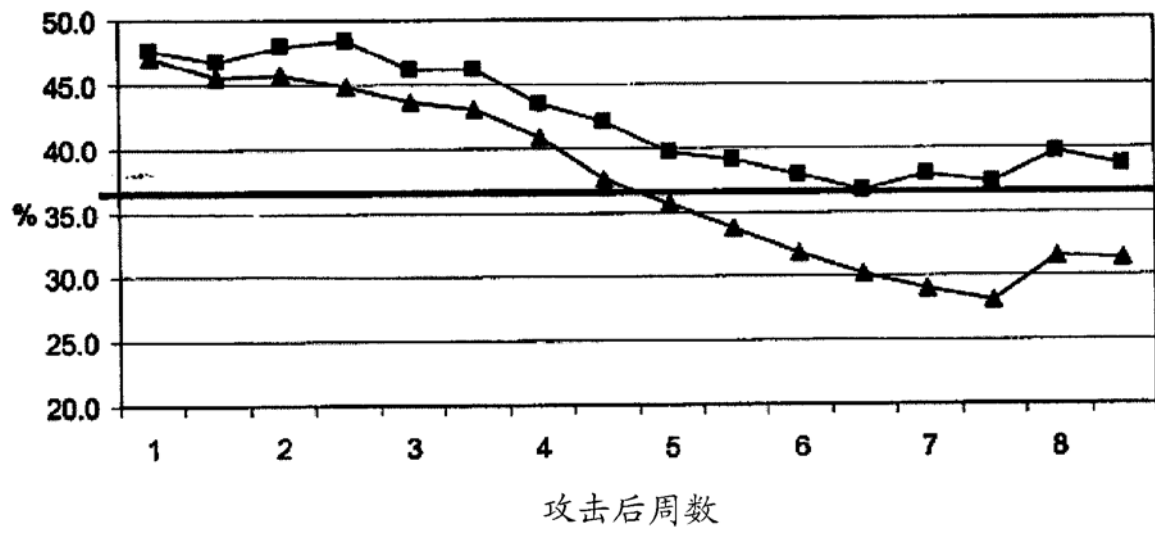


图 4

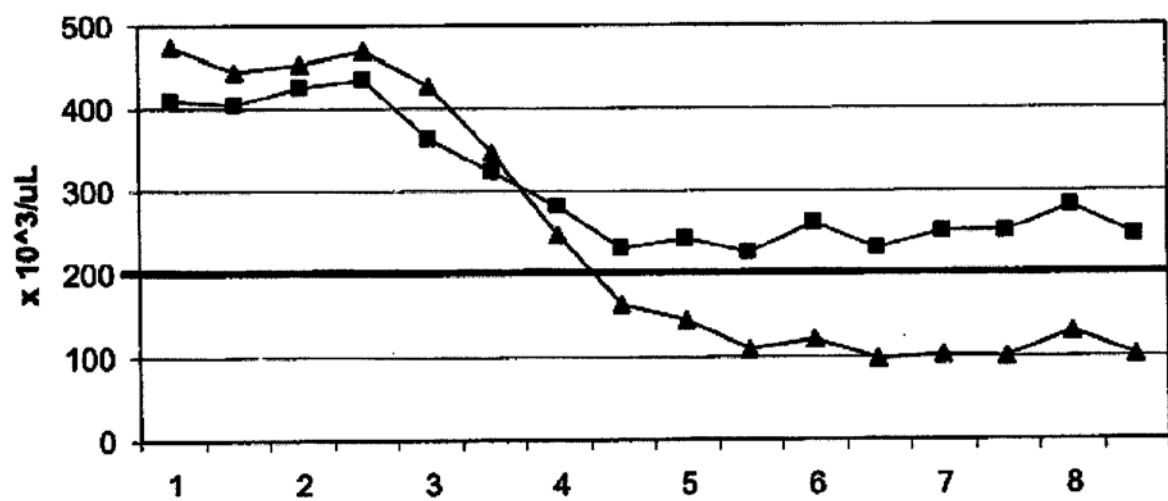


图 5