

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680050074. X

[51] Int. Cl.

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C12Q 1/24 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月29日

[11] 公开号 CN 101495139A

[22] 申请日 2006.11.10

[21] 申请号 200680050074. X

[30] 优先权

[32] 2005.11.10 [33] AU [31] 2005906282

[86] 国际申请 PCT/AU2006/001682 2006.11.10

[87] 国际公布 WO2007/053899 英 2007.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.30

[71] 申请人 迪娃解决方案股份有限公司

地址 澳大利亚西澳大利亚州

[72] 发明人 T·M·埃利斯 S·G·芬威克

C·M·詹姆斯

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图 16 页

[54] 发明名称

鉴别治疗组合物

[57] 摘要

本发明提供了一种标记已经被给予或将会被给予至少一种第一抗原的受试者的方法，其中所述抗原来源于能够感染所述受试者的传染原，且所述抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用，所述方法包括下列步骤：给予所述受试者一种标记或报道物，所述标记或报道物在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了所述第一抗原的受试者。

1. 一种标记已经被给予或将会被给予至少一种第一抗原的受试者的方法，其中所述抗原来源于能够感染所述受试者的传染原并且能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用，所述方法包括下列步骤：给予所述受试者一种标记或报道物，所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受所述第一抗原的受试者。
2. 一种标记已经接受了一种第一抗原的受试者的方法，所述第一抗原来源于能够感染所述受试者的传染原，所述第一抗原能够在所述受试者体内产生或至少有助于产生治疗反应，所述方法包括下列步骤：给予所述受试者一种标记抗原，所述标记抗原在所述受试者体内是可检测的并且能够区分处理过和未处理过的受试者，所述标记抗原的表达对于所述第一抗原来说是外源性的。
3. 一种标记已经被给予了一种第一抗原的受试者的方法，所述第一抗原来源于能够感染所述受试者的病毒，所述方法包括下列步骤：
 - (a) 给予所述受试者一种标记抗原，所述标记抗原并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物；并且
 - (b) 其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的应答。
4. 一种针对一种传染原而对受试者进行免疫的方法，所述方法包括下列步骤：
 - (a) 给予所述受试者一种第一抗原，其中所述第一抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用，和
 - (b) 给予所述受试者一种标记或报道物，所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了步骤(a)中所述第一抗原的受试者。
5. 一种针对一种病毒而对受试者进行免疫的方法，包括下列步骤：
 - (a) 给予所述受试者至少一种第一抗原，所述第一抗原来源于能够感染所述受试者的病毒并且能够递送或产生疗效；
 - (b) 同时给予所述受试者一种标记抗原，所述标记抗原并非来源于天然地能够感染该受试者的生物，其中所述标记抗原可在所述受试者体内引发可检测的免疫应答。
6. 一种针对一种病毒而对受试者进行免疫的方法，所述方法包括下列步

骤：给予所述受试者一种单一剂型，所述单一剂型包括(a)一种来源于能够感染所述受试者的病毒的第一抗原和(b)一种并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物体的标记抗原，其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。

7. 一种可药用制剂，包括：
 - (a) 一种能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用的第一抗原，和
 - (b) 一种标记或报道物，所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了步骤(a)中所述第一抗原的受试者。
8. 一种可药用制剂，包括：

一种来源于能够感染所述受试者的病毒的第一抗原；和一种并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物体的标记抗原，其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。
9. 一种标记疫苗的方法，所述疫苗可对抗能够感染受试者的病毒，所述方法包括下列步骤：将一种第一抗原和一种标记或报道物组合，所述第一抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用，所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了所述第一抗原的受试者。
10. 一种标记疫苗的方法，包括下列步骤：
 - (a) 使所述疫苗与一种标记抗原接触，所述标记抗原并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物；和
 - (b) 其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。
11. 一种鉴别已经使用本申请所述的制剂进行过疫苗接种的受试者的方法，所述方法包括下列步骤：测定来自所述受试者的样本以检测所述标记。
12. 一种用于对受试者进行免疫的试剂盒，包括：(a) 一种来源于能够感染所述受试者的病毒的第一抗原；和(b) 一种并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物体的标记抗原。
13. 一种试剂盒，包括：一种用于检测所产生的抗一种标记抗原的抗体的工具，所述标记抗原并非源于能够感染所述受试者的生物。

鉴别治疗组合物

技术领域

本发明涉及一种鉴别治疗组合物 (differentiating therapeutic composition) 及其用于检测免疫过和未免疫过的受试者的用途。更具体而言, 本发明提供了一种用于免疫受试者的疫苗, 所述疫苗提供了一种用于指示已经发生过免疫的标记。本发明还涉及一种用疫苗免疫受试者以使得可以检测到免疫的方法。

背景技术

使用疫苗接种来防治病毒爆发和感染的程序必须具有有一种能够有效监测种群中持续存在的病毒感染的系统。然而, 疫苗接种使得通过血清学方法对感染传播进行大规模的监测变得复杂, 因为接种疫苗的受试者和接触病毒的受试者均会产生特异性针对该病毒的抗体。病毒的感染性野毒株与病毒疫苗之间的抗原相似性 (特别是如果使用灭活病毒作为疫苗时) 妨碍了对感染的受试者与接种疫苗的受试者的辨别, 因为疫苗接种会导致抗体产生并且持续存在, 所述抗体在感染的受试者与接种疫苗的受试者中是无法区分的。

存在多种病毒性疾病 (例如, 口蹄疫、禽流感 (AI)、新城病、西尼罗河病毒和猫免疫缺陷病毒 (FIV)), 其中由于无法区分感染的受试者与接种疫苗的受试者而妨碍了对病毒爆发和传播的监测。目前, 在许多国家和地区 (例如中国、印度尼西亚、越南和香港) 中, 正在按照政府防治程序利用 H5 禽流感疫苗来逐渐实现对禽流感传播的控制。

全世界对 DIVA (可鉴别感染的和接种疫苗的动物) 疫苗接种策略的关注正在逐渐增加。例如, 关于禽流感毒株 H5N1 HPAI 的 WHO/FAO/OIE 联合会议已经推荐使用 DIVA 来实施所有的疫苗接种, 这样可以监测感染的传播。然而, 如下文所述, 目前的 DIVA 法尚难以扩大规模, 并且通常难以鉴别疫苗接种和其他流行性病毒株的感染。

目前的监测方法包括对接种疫苗的动物进行身体标记、使用哨兵动物、病毒学测试和使用重组体异种疫苗。然而, 这些现有的方法具有许多局限性。

对接种疫苗的动物进行身体标记包括使用物理方法(例如耳标、腿箍或翼标)识别接种疫苗的受试者个体。然而,由于后勤和经济原因这些方法难以大规模应用。由于后勤和经济原因,未接种疫苗的哨兵动物也难以用在许多受影响的地区中,所述地区中有小规模的高危乡村家畜,例如家禽群或单只家畜。此外,还存在的风险是如果哨兵被所述病毒感染,则增加了传播给人类的风险。

通过筛选和检测活病毒进行的个体的病毒学测试或 RT-PCR 监督测试是一种价格非常昂贵且对设备要求很高的方法,这种方法并不适合于许多地区,特别是较贫困地区,在这些地区许多疾病(例如禽流感 and 口蹄疫)都很常见。该方法还难以扩大规模。此外,用于检测病毒的病毒学测试以及 RT-PCR 测试仅能提供关于个体受试者的当前感染情况的信息,而不能对该受试者的感染史和/或疫苗接种史进行分析。

最近,已经开发了许多被称为“可鉴别感染的和接种疫苗的动物”疫苗或 DIVA 疫苗的重组体异种疫苗。在用这类重组体疫苗进行疫苗接种后,接种疫苗的禽类会产生与自然感染的禽类不同的 N 抗体应答。然后使用鉴别抗体测试来测定所述受试者是被野生型病毒感染的还是被所述重组体病毒感染的(例如, H5N2 疫苗可以被用在出现 H5N1 感染的地区中,然后测试禽类的 N1 抗体,所述 N1 抗体可作为接触病毒的指示剂;或者可以使用异种疫苗 H7N3 来进行接种以对抗 H7N1 疾病,这样就可以通过是否存在 N3 抗体来识别接种疫苗的禽类)。

然而,在许多正面临普遍的 H5N1 传染的地区中,其他低病原性禽流感病毒(例如 H9N2、H6N1 等)会在水鸟和家禽中流行。抗 H5N1 的禽类疫苗接种(例如 H5N2 疫苗)不会使该禽类免遭随后的低病原性禽流感病毒(例如 H6N1)的感染。因此,如果针对 N1 进行测试,基于 N 亚型抗体的 DIVA 抗体测试将会给出假阳性结果。此外,一些地区正在他们的疫苗接种程序中同时使用同种 H5N1 疫苗和异种 H5N2 疫苗,所述疫苗接种程序会使得 DIVA 血清学测试的应用变得复杂。此外,有 16 种 H 型和 9 种 N 型可以合并到禽流感病毒亚型中,因此需要许多新的测试和疫苗亚型来将所述方法扩展到每种新的病毒亚型。

本发明满足了本领域中对于可以鉴别接种疫苗的和感染的受试者的新病毒疫苗的需求,所述新病毒疫苗至少能够改善现有技术中存在的一种或多种问题。

一般性说明

本领域技术人员应认识到本申请描述的本发明可以很容易进行变化和修改，而并不局限于本文所具体描述的实施方案。本发明包括所有这些变化和修改。本发明还单独地或全部地包括说明书中所涉及或所说明的所有步骤、特征、制剂和化合物，以及所述步骤和特征的任两项或更多项的任何和全部组合。

本文所引用的每篇文件、参考文献、专利申请或专利的全文均通过引用的方式明确地纳入本文，这是指读者应该将上述引文作为本说明书的一部分来阅读和考虑。本文所引用的文件、参考文献、专利申请或专利之所以未在说明书中重复仅是为了简洁。

本文或者本文所引用的任一文件中所提到的对于任何产品的制造商使用说明、说明书、产品说明和产品单均通过引用的方式纳入本文，并且可能会被用于实施本发明。

本发明并不受限于任何本文所述的具体实施方案的范围。这些实施方案仅意在起示例性作用。显然，功能等同的产品、制剂和方法均属于本文所述的本发明的范围。

本文所述的本发明可能包括一个或多个数值范围(例如大小、浓度等)。数值范围应被理解为包括该范围内的所有数值，包括限定该范围的数值以及邻近该范围的数值，所述邻近该范围的数值会产生与其紧邻的限定了该范围界限的数值相同或基本相同的结果。

本说明书通篇中，除非上下文中另外要求，术语“包括”或其同义词“包含”或“含有”均应被理解是指包括所说明的整体或整体群，但不排除任何其他整体或整体群。还应该注意的，在本文公开的内容中，特别是权利要求和/或各段中，术语例如“包括”、“包含”、“含有”等应具有美国专利法所赋予其的含义，例如，它们可以表示“包括”、“包括的”、“包含”等；术语例如“基本上由……构成”和“基本上由……组成”具有美国专利法所赋予其的含义，例如他们可以包含未明确描述的元素，但是排除现有技术中存在的或者会影响本发明的基本特征或新特征的元素。

本文所选用的术语的其他定义可参见具体实施方式部分并且可通篇使用。除非另有说明，本文所用的所有其他科学和技术术语均具有本发明所属技术领域普通技术人员所通常理解的含义。

发明内容

在一方面，本发明提供了一种标记已经被给予或将会被给予至少一种第一抗原的受试者的方法，其中所述抗原来源于能够感染所述受试者的传染原，且所述抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用，所述方法包括下列步骤：给予所述受试者一种标记或报道物，所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了所述第一抗原的受试者。

在更优选的方面，本发明提供了一种标记已经接受了一种第一抗原的受试者的方法，所述第一抗原来源于能够感染所述受试者的传染原，其中所述抗原能够在所述受试者体内产生或至少有助于产生治疗反应，所述方法包括下列步骤：给予所述受试者一种标记抗原，所述标记抗原在所述受试者体内是可检测的并且能够区分处理过和未处理过的受试者，所述标记抗原的表达对所述第一抗原来说是外源性的。

另一方面，本发明提供了一种标记已经被给予了一种第一抗原的受试者的方法，所述第一抗原来源于能够感染所述受试者的病毒，所述方法包括下列步骤：

(a) 给予所述受试者一种标记抗原，所述标记抗原并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物；并且

(b) 其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的应答。

在产生可检测信号例如阳性抗体应答方面，所选择的第一抗原和标记抗原不应互相干扰。

本发明还提供了一种针对一种传染原而对受试者进行免疫的方法，所述方法包括下列步骤：

(a) 给予所述受试者一种第一抗原，其中所述第一抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用，和

(b) 给予所述受试者一种标记或报道物，所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了步骤(a)中所述第一抗原的受试者。

更优选地，所述针对一种病毒而对受试者进行免疫的方法包括下列步骤：

(a) 给予所述受试者至少一种第一抗原，所述第一抗原来源于能够感染

所述受试者的病毒并且能够送递或产生疗效;

(b) 同时给予所述受试者一种标记抗原, 所述标记抗原并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物; 和

(c) 其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。

本发明还提供了一种针对一种病毒而对受试者进行免疫的方法, 所述方法包括下列步骤: 给予所述受试者一种单一剂型, 所述单一剂型包括(a) 来源于能够感染所述受试者的病毒的第一抗原和(b) 并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物的标记抗原, 其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。

本发明还提供了一种可药用制剂:

(a) 一种能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用的第一抗原, 和

(b) 一种能够在所述受试者体内产生可检测信号并且能够鉴别出已经接受了步骤(a)中所述第一抗原的受试者的标记或报道物。

更优选地, 所述可药用制剂包括:

(a) 一种来源于能够感染所述受试者的病毒的第一抗原;

(b) 一种并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物的标记抗原, 其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。

本发明还提供了一种标记一种疫苗的方法, 所述疫苗可对抗能够感染受试者的病毒, 所述方法包括下列步骤: 将一种第一抗原和一种标记或报道物组合, 所述第一抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用, 所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号并且能够鉴别出已经接受了所述第一抗原的受试者。

更优选地, 所述标记一种疫苗的方法包括下列步骤:

(a) 使所述疫苗与一种标记抗原接触, 所述标记抗原并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物; 和

(b) 其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。

本发明还提供了一种鉴别已经使用本文所述的制剂接种过的受试者的方法, 所述方法包括下列步骤: 测定来自所述受试者的样本以检测所述标记。

更优选地, 所述鉴别方法包括下列步骤:

(a) 测定来自受试者的样本以检测抗所述标记抗原的抗体; 和

(b) 其中抗所述标记抗原的抗体的存在表明他们已经至少被所述标记抗

原免疫过。

本发明还提供了一种用于对受试者进行免疫的试剂盒，包括：

- (a) 一种来源于能够感染所述受试者的病毒的第一抗原；
- (b) 一种并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物体的标记抗原。

本发明还提供了一种试剂盒，包括：一种用于检测所产生的抗标记抗原的抗体的工具，所述标记抗原并非源于能够感染所述受试者的生物。

参照下文的描述，对本领域技术人员来说本发明的其他方面和优势将是显而易见的，参照下列说明性附图对本发明进行描述。

附图说明

图 1 示出了 Equivac™ T 接种的鸡为破伤风类毒素 (TT) 抗体阳性。

图 2 示出了 TT+Alum 接种的鸡在疫苗接种后表现出 TT 抗体阳性。

图 3 示出了 TT+Alum 接种的鸭在增大剂量接种后表现出 TT 抗体阳性。

图 4 示出了与取自接种的鸡的阳性对照相比，从屠宰场收集的肉鸡 (35 日龄) 血清中的 TT 抗体水平。

图 5 示出了与取自接种的鸡的阳性对照相比，从屠宰场收集的肉种鸡 (1.5-2 年龄) 血清中的 TT 抗体水平。

图 6 示出了与取自接种的鸡的阳性对照相比，从屠宰场收集的蛋鸡 (1.5-2 年龄) 血清中的 TT 抗体水平。

图 7 示出了与取自接种的鸡的阳性对照相比，澳大利亚西北部哨兵鸡 (超 1 年龄) 血清中的 TT 抗体水平。

图 8 示出了香港/中国大陆鸡 (90 日龄) 体内的 TT 水平。

图 9 示出了科乌努拉 (Kununurra) 鸭的 TT 抗体水平。

图 10 示出了简达科特 (Jandakot) 鸭的 TT 抗体水平。

图 11 示出了共同给予禽流感和 TT 疫苗后鸡 TT 抗体的水平。

图 12 示出了共同接种的鸡体内的 HA 效价。

图 13 示出了共同接种的鸭体内的 TT 和 AI 效价。

图 14 示出了共同接种的鸭体内的 TT 和 AI 效价。

图 15 示出了接种疫苗的鸡体内的 TT 水平。

图 16 示出了共同接种 TT 和 AI 疫苗后，鸡体内的 HI 效价。

具体实施方式

根据本发明,发明人已经证明了通过下列方法至少可以部分地解决现有技术中存在的问题:用可在受试者体内被检测到的标记或报道物标记动物,其中这种标记能够以不依赖于所述第一抗原表达的方式产生其信号。通过以不依赖于所述第一抗原表达的方式产生信号,可以很容易地显示出用于治疗受试者的所述第一抗原的疗效,而基本上不需要改变用在本发明方法中的检测体系。此外,通过将所述第一抗原的表达和所述标记导致的可检测信号的产生分离开,可以对所述标记的作用以及所述第一抗原的作用实行更高水平的控制。

标记受试者的方法

根据本发明,提供了一种标记已经被给予或将会被给予至少一种第一抗原的受试者的方法,其中所述抗原来源于能够感染所述受试者的传染原,且所述抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用,所述方法包括下列步骤:给予所述受试者一种标记或报道物,所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号,并且能够鉴别出已经接受了所述第一抗原的受试者。

在一个更优选的实施方案中,本发明提供了一种标记已经接受了一种第一抗原的受试者的方法,所述第一抗原来源于能够感染所述受试者的传染原,所述抗原能够在所述受试者体内产生或至少有助于产生治疗反应,所述方法包括下列步骤:给予所述受试者一种标记抗原,所述标记抗原在所述受试者体内是可检测的并且能够区分处理过和未处理过的受试者,所述标记抗原的表达对所述第一抗原来说是外源性的。

在另一个实施方案中,本发明提供了一种标记已经被给予了一种第一抗原的受试者的方法,所述第一抗原来源于能够感染所述受试者的病毒,所述方法包括下列步骤:

(a) 给予所述受试者一种标记抗原,所述标记抗原并非来源于能够天然地感染所述受试者的生物; 并且

(b) 其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的应答。

所述第一抗原对其有疗效的病毒可以是任何能够感染受试者并导致疾病的病毒。优选地,所述病毒为能够感染包括但不限于下列的动物物种的病

毒：人类和/或其他高等哺乳动物、鱼和禽类。所述病毒可能是选自下列的传染性病毒：微小核糖核酸病毒科的成员例如口蹄疫病毒群（例如导致口蹄疫的病毒）、正粘病毒科的成员例如禽流感病毒、逆转录病毒科的成员例如FIV、副粘病毒科的成员例如导致新城病的病毒、弹状病毒科的成员例如导致狂犬病的狂犬病病毒、微小病毒科的成员例如与肠胃炎相关的病毒和乳多空病毒科的成员例如导致肿瘤和疣的乳头瘤病毒。在本发明的一个具体实施方案中，所述病毒为禽流感病毒。

在选择所述标记抗原时要进行试验以确保所述抗原至少不会干扰第一抗原引发可检测信号（例如阳性抗体应答）。然而，所述标记抗原可促进所述第一抗原应答。

本文所用的短语“并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物体的抗原”通常是指来源于这样一种生物体的抗原，所述生物体并非被广泛观察到或发现会感染受试者所属群组成员的生物体。根据这一理解，所述抗原的可检测性必须不能被所述受试者体内的天然感染状况所掩蔽。更具体而言，由所述标记抗原产生的信号必须要超过受试者所述群组成员体内的任何噪声，所述噪声是由所述生物体的先天性感染所产生的。因此，所述标记抗原在免疫过的动物体内必须可被检测到。优选地，在所治疗的动物种群中，由于偶然存在所述标记抗原导致的噪声应很低。此外，所述标记抗原不应诱导将会危害所述受试者的有害免疫应答。

在选择所述第一抗原和所述标记抗原时，需要谨慎从事以确保这两种抗原不会彼此干扰其引发阳性抗体应答的能力。

所述受试者是可变的，但是优选地选自哺乳动物、禽类和鱼。更优选地，所述受试者为哺乳动物，例如农场动物，包括绵羊、山羊、猪、奶牛、马、骆马，家庭宠物例如狗和猫，以及灵长类；人类；禽类，例如鸡、鹅和鸭；以及鱼。

例如，当已经使用一种来自传染性病毒的第一抗原接种了受试者并且保护其免遭该病毒的进一步感染时，可以使用本发明的方法。然后，可以通过用所述标记抗原接种来“标记”所述受试者以证明如果在该受试者体内检测到抗所述第一抗原的抗体，则这些抗体来源于疫苗接种而非感染。

虽然普通技术人员能够认识到所述标记抗原可为与所述第一抗原一致的内源性表达的抗原，但是在本发明的一个优选的实施方案中，相对于所述第一抗原来说，所述标记抗原为外源性表达的抗原。

本文所用短语“所述标记抗原的表达对所述第一抗原来说是外源性的”通常是指第一抗原表达的方式不涉及或不依赖于产生标记抗原的方法。优选地，所述标记抗原以不依赖于第一抗原的方式表达。更优选地，使用另一种表达载体来表达所述标记抗原。

本发明还提供了一种标记已经被给予了一种第一抗原的受试者的方法，所述第一抗原来源于能够感染所述受试者的传染原，所述抗原能够在所述受试者体内产生治疗反应，所述方法包括下列步骤：给予所述受试者一种标记抗原，所述标记抗原在所述受试者体内是可检测的并且能够区分处理过和未处理过的受试者，所述标记抗原的表达对所述第一抗原来说是外源性的。

根据本发明的方法，所述第一抗原通常会对所述受试者产生疗效。优选地，所述第一抗原被用于产生保护性或中和性应答，这种应答可能是通过疫苗来获得的，然而通过所述第一抗原可以获得任何类型的疗效。根据所述第一抗原的这一作用，普通技术人员应理解，所述第一抗原可包括多个能够产生多种免疫应答的抗原部分。所述第一抗原也可以是单一的抗原。然而，应该理解的是，受试者通常会被给予许多抗原，例如两种或两种以上抗原的混合物。考虑到这一点，一些疫苗被设计成包含多种抗原以便在受试者体内引起最有效的抗体应答。

在本发明的一个高度优选的实施方案中，所述第一抗原可以来源于选自下列的来源：完全灭活病毒或减活病毒或一种病毒原(viral agent)，所述病毒原已经经过了重组改造缺失了其毒力，但是仍然保持着其天然的免疫特征。优选地，所述第一抗原来源于天然存在的病毒。然而，它还可以来源于天然存在的病毒的遗传修饰形式或重组体形式。

优选地，所述第一抗原能够在受试者体内诱发保护性抗体，并且因此保护所述受试者免遭该病毒的感染。当所述病毒为禽流感病毒时，血凝素以及神经氨酸酶和/或来自西尼罗河病毒的衣壳蛋白可构成所述第一抗原。或者，所述第一抗原选自内部保守性病毒抗原，例如基质或核蛋白。当所述病毒为禽流感病毒时，第一抗原的实例为H5和N2的组合。

标记体系

正如本文所说明的，所述标记体系的要求是所述标记能够区分免疫过的和未免疫过的动物。可用于本发明的方法中的标记应是本领域普通技术人员已知的。它们包括任何能标记或报道所存在的免疫过的动物和未免疫过的动

物的方法。合乎需要的标记是无害的且不具有明显毒性的标记，所述标记可容易地被检测到并且使得能够快速区分出免疫过的受试者群体。例如，所述标记可以是遗传标记或表达的蛋白标记或免疫标记。

从所述标记体系基于遗传标记这方面来说，这类标记的特征可通过下列技术来获得：例如限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、随机引物聚合酶链反应 (AP-PCR)、DNA 扩增指纹 (DAF)、序列特征性扩增区域 (SCAR)、扩增片段长度多态性 (AFLP)、又被称为小随体的简单重复序列 (SSR) 和单核苷酸多态性 (SNP)。例如，参见 Berry, Don, et al., “Assessing Probability of Ancestry Using Simple Sequence Repeat Profiles: Applications to Maize Hybrids and Inbreds”, *Genetics*, 2002, 161: 813-824 和 Berry, Don, et al., “Assessing Probability of Ancestry Using Simple Sequence Repeat Profiles: Applications to Maize Inbred Lines and Soybean Varieties”, *Genetics*, 2003, 165: 331-342, 二者均通过引用的方式纳入本文。

在所述标记体系基于蛋白质标记体系这方面来说，所述标记可以是并非通常在所述受试者群体中表达、但是可进行生物学测试的蛋白质。例如，所述蛋白质可以通过标记的单克隆抗体来检测。或者，所述标记可以是绿色、黄色或蓝色荧光蛋白 (分别为 GFP、YFP 和 BFP) 基因的序列。

在本发明的一个高度优选的实施方案中，所述标记系统是基于免疫标记的。优选地，所述免疫标记为来源于不能感染所述受试者的生物的带标记的抗原。例如，用于口蹄疫疫苗的标记抗原可以包括来源于不能天然地感染家畜的生物的抗原。或者，所述抗原可以是人造的抗原。

优选地，所述标记抗原来源于破伤风病原体，例如破伤风类毒素。在这方面，禽类对破伤风类毒素不敏感 (禽类的中毒剂量为马的中毒剂量的 350,000 倍)。此外，禽类不会被破伤风梭状芽胞杆菌 (*Clostridium tetani*) 感染或被其侵染，但是它们确实会对该抗原产生抗体应答。或者，所述标记抗原可选自另一种不会感染或侵染所述物种的生物，例如来自白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) 的白喉类毒素。

优选地，所述标记抗原为一种已知抗原，所述抗原已经在大规模生产并且已经被注册用于给予人类和/或动物。甚至更优选地，所述标记抗原适用于以较低成本进行大规模生产。

优选地，所述标记抗原不能感染给定的受试者属或物种的任何成员，并

且因此可被用在多种疫苗中或者被用在能够免疫多种受试者的疫苗中。

给予抗原

本发明还提供了一种针对一种传染原而对受试者进行免疫的方法，所述方法包括下列步骤：

(a) 给予所述受试者一种第一抗原，其中所述第一抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用，和

(b) 给予所述受试者一种标记或报道物，所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了步骤(a)中所述第一抗原的受试者。

当递送给动物时，所述第一抗原和所述标记或报道物是共同给予的或同时给予或以任何顺序连续给予。

优选地，所述第一抗原和标记抗原是共同给予的或是同时给予的。因此，本发明还提供了一种针对一种病毒而对受试者进行免疫的方法，所述方法包括下列步骤：

(a) 给予所述受试者一种来源于能够感染该受试者的病毒的第一抗原；

(b) 共同给予或同时给予所述受试者一种标记抗原，所述标记抗原并非来源于天然地能够感染该受试者的生物，其中所述标记抗原可在所述受试者体内引发可检测的免疫应答。

对于本发明来说，同时给予是指基本上在同一时间或者在 24 小时之内给予。

当所述抗原为同时给药时，优选地以单一剂型给予所述抗原。

本发明还提供了一种针对一种传染原而对受试者进行免疫的方法，所述方法包括下列步骤：

(a) 给予所述受试者一种第一抗原，其中所述第一抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用；和

(b) 给予所述受试者一种标记或报道物，所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了步骤(a)中所述第一抗原的受试者。

更优选地，所述针对一种病毒而对受试者进行免疫的方法包括下列步骤：

(a) 给予所述受试者至少一种第一抗原，所述第一抗原来源于能够感染

所述受试者的病毒并且能够递送或产生疗效;

(b) 同时给予所述受试者一种标记抗原, 所述标记抗原并非来源于天然地能够感染该受试者的生物, 其中所述标记抗原可在所述受试者体内引发可检测的免疫应答。

本发明还提供了一种针对一种病毒而对受试者进行免疫的方法, 所述方法包括下列步骤: 给予所述受试者一种单一剂型, 所述单一剂型包括(a)一种来源于能够感染所述受试者的病毒的第一抗原和(b)一种并非来源于能够天然地感染所述受试者的生物体的标记抗原, 其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。

所述单一剂型可包括一种含有所述第一抗原的制剂和一种含有所述标记抗原的制剂的混合物或其他组合物。或者, 所述单一剂型可以包括一种含有所述第一抗原和所述标记抗原的制剂。

根据本发明, 包含所述第一抗原或所述标记抗原的重组构建体可以下列形式给予受试者: 例如减活病毒或与所述传染性病毒相关的非病原性病毒。这类减活病毒或非病原性病毒在所述接种疫苗的受试者体内繁殖并且可在一段时期内通过表达所述第一抗原和标记抗原来提供持续的抗原刺激。表达所述第一抗原和标记抗原的重组构建体的病毒还可以被进一步地处理以提供灭活的全病毒疫苗。

所述第一抗原和/或标记抗原还可以为 DNA 疫苗形式。因此, 所述第一抗原和/或所述标记抗原可以裸露 DNA 的形式递送以进行疫苗接种。优选地, 所述 DNA 疫苗包括含有所述第一抗原或所述标记抗原的重组构建体。所述 DNA 疫苗构建体还可包括质粒 DNA。

或者, 所述第一抗原和标记抗原可以两种或两种以上独立剂型的形式同时给予。在本发明的这一实施方案中, 所述受试者同时接受多个剂型。

第一抗原和标记抗原的选择以及它们的给药方式很重要, 因为当给药时这些抗原不应该干扰彼此的作用。优选地, 所述第一抗原和标记抗原共同作用或协同作用, 即其中至少一种抗原的作用可被存在的另一种抗原所增强。最优选地, 所述标记抗原可增强接种疫苗的受试者对所述第一抗原的应答, 同时还可引发针对其自身的可检测的免疫应答。

优选地, 所述抗原以单剂量递送, 但是在一段时期内可以多剂量递送该抗原。当需要维持针对该传染性病毒的免疫状态时, 可以给予多次剂量。通常, 当需要多次给药时, 疫苗接种方案可以包括初次剂量的疫苗, 然后以

2-4 周的间隔再给予 1-4 次加强接种。在初次疫苗接种后，受试者可以在大约 4 周内接受 1 次加强接种。

制剂/给药途径/剂量

本发明还提供了一种可药用制剂：

(a) 一种能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用的第一抗原，和

(b) 一种标记或报道物，所述标记或报道物能够在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了步骤 (a) 中所述第一抗原的受试者。

更优选地，所述可药用制剂包括：

(a) 一种来源于能够感染所述受试者的病毒的第一抗原；

(b) 一种并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物的标记抗原，其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。

优选地，所述制剂为能够赋予所述受试者保护性免疫力的疫苗。甚至更优选地，所述制剂具有治疗性能，即它可以被给予至已经被所述病毒感染的受试者并且使所述受试者的健康得到改善。

所述第一抗原和/或标记抗原可以是缀合或连接到另一种肽或多糖上。例如，可以使用本领域公知的免疫原性蛋白质。有用的免疫原性蛋白质包括钥孔虫戚血兰素 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白、人血清清蛋白 (HAS)、人 γ 球蛋白、鸡免疫球蛋白 G 和牛 γ 球蛋白。有用的免疫原性多糖包括 A 族链球菌菌壁多糖 (streptococcal polysaccharide)、B 族链球菌的 C 多糖或者肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 或 B 族链球菌的荚膜多糖。

本发明的制剂可以任何合适的途径给予，具体的途径主要取决于用于递送的抗原的配制方式。因此，所述抗原可在适当的载体中以肠胃外的方式给药，通常为皮下地 (SC)、肌内地 (IM)、静脉内地 (IV)、腹膜内地 (IP) 或皮内地 (ID)。然而，其他的给药模型也是可以接受的，例如口服、经鼻递送或经栓剂递送。或者，本申请的制剂可以被直接卵内 (*in ovo*) 递送到含胚卵内以用于对抗禽类疾病的疫苗。

用于肠胃外给药的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬液或乳液。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油，以及可注射的有机酯例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬液，含有盐或缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格式葡萄糖、葡萄糖氯化钠、乳酸

林格氏液或不挥发性油。静脉内载体包括液体营养补充剂、电解质补充剂(例如那些基于林格氏葡萄糖的补充剂)等。还可以存在防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

对于栓剂,传统的粘合剂和载体可以包括例如聚烷撑二醇或三酸甘油酯;这类栓剂可由下述的混合物构成所述混合物含有0.5%-10%的活性成分,优选含有1%-2%的活性成分。

鼻内给药制剂可包括既不会刺激鼻粘膜也不会明显扰乱纤毛功能的载体。本发明可以使用稀释剂,例如水、盐水或其他已知的物质。所述鼻部制剂还可包含防腐剂,例如但不限于三氯叔丁醇和苯扎氯铵。可以存在表面活性剂以增强鼻粘膜对目的蛋白的吸收。

此外,所述疫苗还可以经口服给药。口服剂型包括通常采用的赋形剂,例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采用溶液、悬液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或粉末的形式,并且含有10%-95%的活性成分,优选25%-70%。用于经口服给予患者的胶囊、片剂和丸剂可具有肠溶包衣,所述肠溶包衣包括例如丙烯酸树脂“S”、丙烯酸树脂“L”、乙酸纤维素、邻苯二甲酸乙酸纤维素或羟丙基甲基纤维素。

本文所述的口服固体剂型在 *Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. (1990 Mack Publishing Co. Easton PA 18042) 第89章中有一般性的描述,通过引用的方式将其纳入本文。固体剂型包括片剂、胶囊、丸剂、糖锭(troche)或锭剂(lozenge)、扁囊剂或者丹剂。还可以使用脂质体或类蛋白包封来配制本发明的组合物(例如美国专利No. 4,925,673中所报道的类蛋白微球体)。可以使用脂质体包封并且用各种聚合物来对脂质体进行衍生化(例如美国专利 No. 5,013,556)。Marshall, *in Modern Pharmaceutics*, Chapter 10, Banker and Rhodes ed., (1979)中给出了对可能的固体治疗剂型的描述,所述文献通过引用的方式纳入本文。通常,所述制剂可包括惰性成分,所述惰性成分使得可以保护所述制剂抵抗胃内环境并且将所述生物活性物质释放到肠内。

口服液体制剂可以为例如水性或油性的悬液、溶液、凝胶、乳液、糖浆或酏剂形式,或者为在使用前用水或其它合适的载体重新配制的产品。这类剂型可以包括常规的添加剂,例如助悬剂、乳化剂、非水性载体(可包括食用油)或防腐剂。或者,所述疫苗可以为一种食品载体材料组分的形式,例如布丁或酸乳酪。具体而言,活疫苗可能需要包装成这样一种形式,所述形

式使得可以将该疫苗作为一个完整的病毒体递送到人的消化道中,所述病毒体至少可以被消化道的第一部分(即口腔)或其他位点(例如肠)所吸收。所述制剂可以包括明胶、纤维素或各种其他的赋形剂成分,或者所述制剂可以为凝胶或食品载体(例如布丁)或类似的包括组分形式的所述病毒的制剂。作为另一个实施方案,所述产品制剂、递送载体或所述包装材料的其他组分中可以包括调味料、乳化剂或其他添加剂。本发明的疫苗可以被包装成溶液、单次剂量、糊剂或凝胶、或装在塑料容器中的食品或营养物质、枕式包装(pillow-pack)、可撕包装(tear-pack)、吸管包装或者其他适用于液体、凝胶或食品载体剂型的包装。

剂量或有效量应足以预防、改善或减少传染性病毒对受试者的感染和/或足以产生针对所述标记抗原的抗体应答。本领域技术人员可以很容易地确定所述有效量。活性成分通常可占所述组合物的约 0.01%-约 95%(w/w),或者如果适合的话甚至可以更高或更低。优选地,所述第一抗原和所述标记抗原的活性量低于所述组合物的约 10%(w/w)、更优选低于所述组合物的约 1%(w/w)、最优选低于所述组合物的约 0.05%(w/w)。

所选的每种剂量中的抗原量为可在典型的疫苗接种受试者体内诱发针对所述第一抗原的保护性免疫应答和针对所述标记抗原的免疫应答、同时又不会诱发明显的有害副作用的量。该量可根据所使用的具体免疫原而变化。通常,预计每种剂量可包括 0.1-1000 μg 蛋白,优选 0.2-200 μg 蛋白。具体疫苗的最适量可利用常规研究来确定,所述常规研究包括观察受试者体内的抗体效价和其他应答。

所要给予的量取决于多种因素,例如考虑要进行疫苗接种的受试者的年龄、体重和身体状况。该量还取决于受试者免疫系统合成抗体的能力,所需要的保护程度和所需要的对标记抗原的应答程度。本领域普通技术人员通过进行常规实验建立剂量应答曲线的方法能够很容易地确定有效剂量。

制剂添加剂

通常,将疫苗制剂(例如本发明方法中所用的那些)制成可注射的液体溶液或悬液。然而,还可以制备成适合于在注射前溶于或悬浮于液体中配制成溶液或悬浮液的固体形式。所述制剂还可以是乳化的,或是包封于脂质体中的蛋白。

在 Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design-the

subunit and adjuvant approach, Powell 和 Newman 编著, Plenum Press, 1995 和 New Trends and Developments in Vaccines, Voller 等人编著, University Park Press, Baltimore, Md., U.S.A. 1978 中对疫苗制剂进行了一般性描述。包封于脂质体中的技术在例如 Fullerton 的美国专利 No. 4, 235, 877 中有所描述。

通常将活性免疫原成分和可与所述活性成分相容的可药用赋形剂混合。合适的赋形剂为, 例如水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等, 以及它们的组合。

此外, 如果需要的话, 所述疫苗可含有少量的助剂, 例如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲剂和/或可增强疫苗效力的佐剂。

合适的佐剂包括但不限于: 氢氧化铝、N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酸胺 (thr-MDP)、N-乙酰-去甲-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸胺 (CGP 11637, 又被称为 nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸胺基-L-丙氨酸-2 (1' -2' -二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺 (CGP 19835A, 又被称为 MTP-PE) 和 RIBI (含有三种提取自细菌的成分: 单磷酸类脂 A、海藻糖二霉菌酸酯和细胞壁骨架 (MPL+TDM+CWS), 溶于 2% 的鲨烯/吐温 80 乳液); 表面活性剂, 例如十六烷基胺、十八烷基胺、溶血卵磷脂、溴化二甲基双十八烷基铵、N,N-双十八烷基-N'-N-二(2-羟乙基-丙烷二胺)、甲氧基十六烷基-甘油和 pluronic 多元醇; 聚阴离子 (polyanion), 例如吡喃复聚物 (pyran)、硫酸葡聚糖、聚 IC、聚丙烯酸、聚羧乙烯; 肽, 例如胞壁酰二肽、MPL、二甲基甘氨酸 (dimethylglycine)、促吞噬肽、油乳胶、硫酸铝钾 (alum), 和它们的混合物。其他可能的佐剂包括大肠杆菌 (*E. coli*) 热不稳定毒素的 B 肽亚基或霍乱毒素的 B 肽亚基。McGhee, J. R., et al., "On vaccine development," *Sem. Hematol.*, 30: 3-15 (1993)。

佐剂和其他试剂的其他实例包括氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝钾 (alum)、硫酸铍、二氧化硅、高岭土、碳、油包水乳剂、水包油乳剂、胞壁酰二肽、细菌内毒素、脂质 X、短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*) (痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium Acnes*))、百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*)、多核糖核苷酸、海藻酸钠、羊毛脂、溶血卵磷脂、维生素 A、皂苷、脂质体、左旋咪唑、DEAE-葡聚糖、嵌段共聚物或其他合成的佐剂。这类佐剂可购自各种来源, 例如 Merck 佐剂 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) 或弗氏不完全佐剂和完全佐剂 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan)。

通常, 可使用例如 Amphigen (水包油乳剂)、Alhydrogel (氢氧化铝) 或

Amphigen 和 Alhydrogel 的混合物。仅批准氢氧化铝用于人类。

免疫原和佐剂的比例可以在一个较大的范围内变化,只要这两者都以有效量存在。例如,氢氧化铝的存在量为疫苗混合物(基于 Al_2O_3)的 0.5%。方便地,将所述疫苗配制成含有终浓度为 0.2-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、优选为 5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的免疫原的制剂。

配制完成后,可将所述疫苗掺入无菌容器中,然后封闭容器并且贮藏于低温下(例如 4°C),或者将其冻干。冷冻干燥法使得可以稳定形式长期贮藏。

优选地,本发明的疫苗组合物中还可含有载体。所述载体可以是水包油乳剂或铝盐,例如磷酸铝或氢氧化铝。

在一个特别优选的方面,本发明疫苗组合物中的抗原可与佐剂 3-去-O-酰化单磷酸类脂 A (3D-MPL) 和铝盐 alum 组合。通常用于对人类给药时,佐剂 QS21 和 3D-MPL 在疫苗中的含量为 1 μg -200 μg , 例如 10 μg -100 μg , 优选每种剂量 10 μg -50 μg 。

如果将疫苗以无毒的水包油乳剂形式给予,则所述水包油乳剂优选地含有一种无毒的油,例如鲨烯、鲨烯和/或 α 生育酚,乳化剂例如吐温 80, 以及水性载体。所述水性载体例如可以为磷酸盐缓冲盐溶液。此外,所述水包油乳剂可含有司盘 85 和/或卵磷脂和/或三辛酸甘油酯。通常,所述水包油乳剂可包含 2-10%的鲨烯、2-10%的 α 生育酚和 0.3-3%的吐温 80。优选地,鲨烯: α 生育酚的比例等于或小于 1, 因为这可以提供一种更加稳定的乳剂。司盘 85 的含量也可以为 1%。在一些情况下,本发明的疫苗还有利地含有稳定剂。WO95/17210 中描述了一种特别有效的佐剂制剂,包括溶于水包油乳剂中的 QS21、3D-MPL 和生育酚。

本发明的治疗方案和药物制剂可与其他免疫应答增强剂或生物应答调节剂共同给予,所述免疫应答增强剂或生物应答调节剂包括但不限于细胞因子 IFN- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、TNF 或其他细胞因子侵染的免疫细胞。根据本发明的这一方面,本发明的制剂通过与一种或多种治疗活性量的上述细胞因子相联合的疗法被给予。本文所用的术语“细胞因子”是指能够影响其他细胞介导免疫应答功能的任何分泌多肽。因此,应该考虑到本发明的制剂可以与细胞因子共同给予以便增强免疫应答。优选的细胞因子包括但不限于白细胞介素-1- α (IL-1- α)、白细胞介素-1- β (IL-1- β)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-3 (IL-3)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-5 (IL-5)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-7 (IL-7)、白细胞介素

-8 (IL-8)、白细胞介素-9 (IL-9)、白细胞介素-10 (IL-10)、白细胞介素-11 (IL-11)、白细胞介素-12 (IL-12)、干扰素- α (IFN- α)、干扰素- β (IFN- β)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF变体)、肿瘤坏死因子 β (TNF- β)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和转化生长因子 β (TGF- β)。

所述第一抗原和/标记抗原可以中性形式或盐形式制成疫苗。可药用盐包括酸加成盐(与蛋白质抗原的游离氨基基团形成的)和与无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、扁桃酸、酒石酸和马来酸)形成的酸加成盐。还可以用无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铝、氢氧化钙或氢氧化铁)或有机碱(例如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组胺和普鲁卡因)与游离羧基基团形成盐。

标记疫苗的方法

如上文所述,通过将一种已有的疫苗与一种本发明的标记抗原混合或组合来形成本发明的制剂。因此,本发明还提供了一种标记一种疫苗的方法,所述疫苗可对抗能够感染受试者的病毒,所述方法包括下列步骤:将所述疫苗与一种并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物的标记抗原接触,其中所述标记抗原能够在所述受试者体内引起可检测的免疫应答。

优选地,简单地将所述标记抗原加入到疫苗中以形成带标记的疫苗。

载体、宿主细胞等

本发明还提供了一种含有一种多核苷酸的载体,所述多核苷酸编码所述标记抗原或所述第一抗原。所述载体可被用于在相容的宿主细胞中复制所述核酸。因此,在另一个实施方案中,本发明提供了一种通过下列步骤制备编码所述标记抗原或第一抗原的多核苷酸的方法:将本发明的多核苷酸引入复制载体中,将所述载体引入相容的宿主细胞中,并且在可使所述载体复制的条件下使所述宿主细胞生长。从宿主细胞中回收所述载体。合适的宿主细胞包括哺乳动物细胞系和其他真核细胞系,例如昆虫 Sf9 细胞。

优选地,所述载体还包括控制序列,所述控制序列与所述编码序列有效连接并且能够使宿主细胞表达所述编码序列,即所述载体为表达载体。术语“有效连接”是指所述组件之间的关系能使得它们以其预期方式起作用。与编码序列“有效连接”的调控序列是以这样一种方式连接的,所述方式为在

与所述控制序列相容的条件下实现所述编码序列的表达。

可对所述控制序列进行修饰，例如通过加入其他转录调控元件进行修饰以使得由控制序列指导的转录水平对转录调控因子更加敏感。

如下文所述，可将本发明的载体转化或转染到合适的宿主细胞中以表达本发明的蛋白。这一方法可包括：在可使含有编码所述蛋白的编码序列的载体表达的条件下，培养用上文所述的表达载体转化的宿主细胞，并且任选地回收表达的蛋白。

所述载体可为例如质粒或病毒载体，所述质粒或病毒载体含有复制起点、任选地含有用于表达所述多核苷酸的启动子，并且任选地含有启动子的调控子。所述载体可含有一种或多种选择性的标记基因，例如，对于细菌质粒而言，含有氨苄青霉素抗性基因，或者对于哺乳动物载体而言，含有新霉素或卡那霉素抗性基因。例如可以使用载体来转染或转化宿主细胞。

与编码本发明的蛋白质的序列有效连接的控制序列包括启动子/增强子和其他表达调节信号。可选择与宿主细胞相容的上述控制序列，所述宿主细胞中使用了为其设计的表达载体。术语“启动子”是本领域中公知的并且含有核酸区域，所述核酸区域的大小和复杂性的范围介于最小的启动子与含有上游元件和增强子的启动子之间。

所述启动子通常选自在哺乳动物细胞内起作用的启动子，但是也可以使用原核启动子和在其他真核细胞中起作用的启动子。所述启动子通常来源于病毒或真核基因的启动子序列。例如，它可以是来源于将要在其中发生表达的细胞的基因组的启动子。

优选地，所述启动子是可诱导的，这样可以在细胞的全寿命期内调控异源基因的表达水平。“可诱导”是指使用所述启动子获得的表达水平是可以调节的。

此外，任何上述启动子均可通过加入其他调控序列（例如增强子序列）来修饰。也可使用嵌合启动子，所述嵌合启动子包含来自不同的两种或两种以上的上文所述启动子的序列元件。

本发明的载体可被引入宿主细胞中，以便复制所述载体/多核苷酸和/或表达由本发明的多核苷酸编码的本发明的抗原。尽管可以使用原核细胞作为宿主细胞来生产本发明的抗原，但是优选地使用真核细胞，例如酵母、昆虫或哺乳动物细胞，特别是哺乳动物细胞。

优选地，所述重组构建体为能够感染宿主细胞的病毒粒子形式。或者，

所述重组构建体为不可复制的质粒构建体或裸露 DNA 疫苗形式。

鉴别经标记的受试者的方法

经本发明方法处理的受试者或被给予一种本文所述的制剂的受试者可以在所述处理或给予后被鉴别出来。因此，本发明还提供了一种鉴别已经使用一种含有第一抗原和标记抗原的制剂接种过的受试者的方法，所述第一抗原来源于能够感染所述受试者的病毒，所述标记抗原并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物体的标记抗原，所述方法包括下列步骤：测定样本以检测所述标记抗原。用于检测所述标记抗原的方法将取决于所述标记的性质。如果例如所述抗原仅被用于产生抗体，则所述方法将包括下列步骤：测定来自所述受试者的样本以检测抗所述标记抗原的抗体，其中抗所述标记抗原的抗体的存在表明受试者已经至少被所述标记抗原免疫过。

所述方法还包括测定所述样本以检测所述第一抗原。

抗所述第一抗原的抗体的存在表明所述受试者已经通过感染或者通过疫苗接种与来源于所述传染性病毒的抗原接触过了，而受试者体内的抗所述标记抗原的抗体则表明它们已经至少被所述标记抗原免疫过，因为该抗原并非来源于能够感染所述受试者的生物。

优选地，使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来检测抗所述第一抗原和/或标记抗原的抗体，其中使抗体与固相结合并且使用酶-抗原缀合物来检测样本中的抗体和/或对其定量。或者，可以使用蛋白质印迹，其中使溶解的且分离的一种或多种抗原与硝酸纤维素膜结合。然后，利用酶或经标记的缀合的抗免疫球蛋白 (Ig) (例如辣根过氧化物酶-Ig 缀合物) 通过在存在可沉淀或可检测底物的情况下孵育滤膜来检测所述抗体。蛋白质印迹测定的优势在于不需要所需的一种或多种抗原的纯度超过 50%。在 Ausubel, et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons (1988) 的第 10 和 11 章中可找到关于 ELISA 和蛋白质印迹技术的描述。或者，可以利用免疫荧光抗体测试 (例如技术人员所公知的那些测试) 来检测所述抗体。

试剂盒

可以很方便地以试剂盒的形式应用本发明的对受试者进行免疫的方法及其组成部分。因此，本发明还提供了一种用于对受试者进行免疫的试剂盒，包括：

- (a) 一种来源于能够感染所述受试者的病毒的第一抗原;
- (b) 一种并非来源于天然地能够感染所述受试者的生物的标记抗原。

还可利用合适的试剂盒来进行本发明的鉴别经标记的受试者的方法。因此,本发明还提供了一种试剂盒,包括:一种用于检测所产生的抗标记抗原的抗体的工具,所述标记抗原并非源于能够感染所述受试者的生物。

优选地,所述试剂盒还包括一种用于检测所产生的抗第一抗原的抗体的工具,所述第一抗原源于能够感染所述受试者的病毒。

实施例

下列实施例用于更加全面地描述使用上述发明的方式,以及用于阐明实施本发明各方面的最佳方式。应该理解的是,这些方法不以任何方式限制本发明的真正范围,而仅起说明作用。

实施例 1: 用破伤风类毒素免疫鸡

材料和方法

动物和舍饲条件: 鸡: 获取 6-7 周龄的雌性 Hy-Line 褐种小蛋鸡 (layer pullet) (Altona Hatchery Pty. Ltd., Forrestfield, WA) 并且将其随机分组, 每栏 5 只鸡。鸡栏远离地面并且由钢丝制成。所有的鸡均在彼此相邻的大小相同的鸡栏中饲养。

遵照严格的动物伦理指南 (AEC 编号: 6-05-55 和 4-06-37), 所有动物均在位于西澳大利亚 Medina 的农业研究中心 (the Department of Agriculture Research Station) 舍饲。

疫苗接种: 在第 0 周和第 4 周, 使用配有 21G 针头的注射器通过皮下注射 (s. c.) 对禽类进行疫苗接种。如图 1 所示, 用 1 mL 或 0.5 mL 纯化的、配以 alum 佐剂的破伤风类毒素 (TT) 疫苗 Equivac T (CSL Ltd., Australia) 接种禽类。如图 2 所示, 用粗制的、未纯化的 TT (Pfizer, WA) 混合物接种禽类, 所述混合物含有 alum 佐剂 (1 mg 氢氧化铝可与 50-200 μ g 抗原结合)。使用一系列 TT 剂量来确定最佳剂量。

收集血液: 在首次疫苗接种后的第 0、2、4、6 周利用静脉穿刺从翅静脉收集血液样本。

将禽类的血液样本从注射器注入到玻璃采血管或用血清促凝剂处理过的塑料真空采血管 (Greiner Bio-One, NC, USA) 中, 并且在 18-22 $^{\circ}$ C 下静置

分层过夜。在室温下将试管以 1000 g 离心 10 分钟并且通过吸取上清来收集血清。然后在用于测定之前将血清贮藏于 4℃ 下，长期贮藏可贮藏于 -20℃ 下 (1 个月) 和 -80℃ 下 (超过 6 个月)。

测定 TT 抗体效价: 使用所收集的血清通过间接 ELISA (实施例 5) 来测定鸡体内的 TT 抗体效价。在 4℃ 的潮湿腔室中用甲醛灭活的、纯化的 TT 抗原 [0.0125 μg/100 μL] (List Biological Laboratories, Inc., CA, USA) 或者用溶于 0.05 M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 的未纯化的 TT 抗原 [14.58 μg/100 μL] [Pfizer, Western Australia] 来过夜包被免疫吸附 ELISA 板 (Greiner BioOne, Germany)。

统计学分析: 假设各种方法之间方差不齐, 使用 Students t-检验对所有数据进行统计学分析。认为 P 值 < 0.01 时是显著的。

结果

小母鸡 (每组 10 只) 直接获取自商业化的孵化所并且用 1.0 mL 或 0.5 mL 的 Equivac™ TT 疫苗进行皮下接种。测定血清中的抗 TT 抗体 (参见图 1)。在免疫前, 鸡体内并不存在预成的破伤风类毒素抗体。第一次疫苗接种后两周, 两组接种疫苗的鸡与对照相比均成功地产生了超过 100% 的抗 TT 抗体。首次接种疫苗 4 周后, TT 抗体的效价水平下降, 但是如果在第一次疫苗接种一个月后进行一次增强免疫, 则第 6 周时该水平会恢复。

进行包括 50 只鸡的后续实验以便评估作为疫苗给予的 TT 的最佳剂量 (参见图 2)。在该实验中, TT 获取自一家为商业化疫苗提供原料的药物公司。在实验室中将该 TT 制剂与氢氧化铝 (alum) 混合。该疫苗类似于上述研究中所使用的商业化疫苗。使用一系列的 TT 剂量来评估可引发最高 TT 抗体水平的最佳剂量。

图 2 示出了 2 次疫苗接种后, 抗 TT 抗体水平最高达 70%。采用所有测试剂量所获得的 TT 抗体水平之间无显著性差异 ($p > 0.01$)。在引发并维持 TT 抗体水平方面, 0.3 mg 的 TT 剂量与 3 mg 的 TT 剂量的作用相当。

实施例 2: 用破伤风类毒素免疫鸭

材料和方法

动物和舍饲条件: 鸭: 6-8 周龄的雏番鸭 (muscovy duckling) 获取自西澳大利亚当地的家庭养殖者 (backyard breeder)。将鸭饲养于鸭栏中, 同时在水泥地上铺满稻草。

遵照严格的动物伦理指南(AEC 编号: 6-05-55 和 4-06-37), 所有动物均在位于西澳大利亚 Medina 的农业研究中心舍饲。

疫苗接种: 在第 0 周和第 4 周, 使用配有 21G 针头的注射器通过皮下注射(s. c.)对禽类进行疫苗接种。如图 3 所示, 用粗制的未纯化的 TT (Pfizer, WA) 混合物接种禽类, 所述混合物含有 alum 佐剂(1 mg 氢氧化铝可与 50-200 μ g 抗原结合)。使用一系列 TT 剂量来确定最佳剂量。

收集血液: 在首次疫苗接种后的第 0、2、4、6 周利用静脉穿刺从翅静脉收集血液样本。

将禽类的血液样本从注射器注入到玻璃采血管或用血清促凝剂处理过的塑料真空采血管(Greiner Bio-One, NC, USA)中, 并且在 18-22 $^{\circ}$ C 下静置分层过夜。在室温下将试管以 1000 g 离心 10 分钟并且通过吸取上清来收集血清。然后在用于测定之前将血清贮藏于 4 $^{\circ}$ C 下, 之后长期贮藏于-20 $^{\circ}$ C 下(1 个月后)和-80 $^{\circ}$ C 下(超过 6 个月)。

测定 TT 抗体效价: 使用所收集的血清通过间接 ELISA (实施例 5) 来测定鸭体内的 TT 抗体效价。在 4 $^{\circ}$ C 的潮湿腔室中用甲醛灭活的、纯化的 TT 抗原 [0.0125 μ g/100 μ L] (List Biological Laboratories, Inc., CA, USA) 或者用溶于 0.05 M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 的未纯化的 TT 抗原 [14.58 μ g/100 μ L] [Pfizer, Western Australia] 来过夜包被免疫吸附 ELISA 板 (Greiner BioOne, Germany)。

统计学分析: 假设各种方法之间方差不齐, 使用 Students t-检验对所有数据进行统计学分析。认为 P 值 < 0.01 时是显著的。

结果

进行包括 40 只鸭的实验来研究疫苗接种后鸭产生抗 TT 抗体的能力。按照与图 2 所示的鸡实验中所用方法相同的方法, 用各种剂量的 TT 加 alum 的疫苗接种鸭。收集到的血清样本表明 (参见图 3) 在增强接种后鸭成功地产生了抗 TT 抗体。对于受试者不是鸡的测定, 使用竞争性 ELISA, 此时认为对抗 TT 抗体水平的抑制超过 50% 时是显著的。

实施例 3: 禽类体内存在抗破伤风类毒素的天然抗体

材料和方法

动物和舍饲条件: 鸡: 6-7 周龄的雌性 Hy-Line 褐种小蛋鸡获取自 Altona Hatchery Pty. Ltd., Forrestfield, WA。

鸭: 6-8 周龄的雏番鸭获取自西澳大利亚当地的家庭养殖者。

各种禽类从位于西澳大利亚的两家商业化屠宰场收集肉种鸡、肉鸡和蛋鸡的血液。从来自西澳大利亚西北部地区不同地点的哨兵家鸡身上和在科乌努拉捕获的野生尖翅树鸭(plumed whistling duck)身上采血以测定在它们的血清中是否存在预成的破伤风抗体。

收集血液: 利用静脉穿刺从翅静脉收集血液样本。屠宰场屠宰的家禽的血液是从颈静脉处收集的。西澳大利亚大学的 Cheryl Johansen 博士的研究小组收集了从西澳大利亚西北部地区禽类的翅静脉获取的血液样本。

将禽类的血液样本从注射器注入到玻璃采血管或用血清促凝剂处理过的塑料真空采血管(Greiner Bio-One, NC, USA)中, 并且在 18-22°C 下静置分层过夜。在室温下将试管以 1000 g 离心 10 分钟并且通过吸取上清来收集血清。然后在用于测定之前将血清贮藏于 4°C 下, 长期贮藏可贮藏于-20°C 下(1 个月)和-80°C 下(超过 6 个月)。

测定 TT 抗体效价: 使用所收集的血清通过间接 ELISA 来测定 TT 抗体效价。在 4°C 的潮湿腔室中用甲醛灭活的、纯化的 TT 抗原 [0.0125 µg/100 µL] (List Biological Laboratories, Inc., CA, USA) 或者用溶于 0.05 M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 的未纯化的 TT 抗原 [14.58 µg/100 µL] [Pfizer, Western Australia] 来过夜包被免疫吸附 ELISA 板 (Greiner BioOne, Germany)。

统计学分析: 假设各种方法之间方差不齐, 使用 Students t-检验对所有数据进行统计学分析。认为 P 值 < 0.01 时是显著的。

结果

对来自不同地理位置和来源的家禽测定在未进行破伤风疫苗接种的情况下是否存在 TT 抗体 (参见图 4-10)。表 1 中示出了对所筛选的各种家禽的概括说明。

表 1: 所筛选的家禽和破伤风抗体阳性的数量

家禽	被测数目	TT 抗体阳性数量
肉鸡	294	0
肉种鸡	360	0
蛋鸡	262	0
澳大利亚西北部的庭院哨兵	339	0
香港/中国大陆鸡	230	0

实验用孵化所禽类	280	0
野生尖翅树鸭 (科乌努拉)	236	0
番鸭 (Muscovy duck) (Jandakot 农场)	33	0
总计	2034	0

图 4-6 示出了与来自接种疫苗的鸡的阳性对照相比, 从屠宰场收集的鸡血清中存在的 TT 抗体水平 (参见材料和方法)。发现肉禽的本底水平最高可达阳性对照破伤风抗体的 20%, 而年老的肉种鸡和蛋鸡的本底水平低于 40%。还证实了澳大利亚西北部哨兵 (图 7) 的本底抗体水平最高可达阳性对照水平的 40%。总之, 所述本底水平低于图 1 和图 2 中所观察到的阳性 TT 抗体水平, 并且认为 40% 的本底水平为 TT 抗体应答阴性。

还测试了另一地区的鸡的本底 TT 抗体水平来作为对照与我们使用西澳大利亚地区的禽类得到的结果进行比较。在香港检疫实验室中使用与材料和方法部分所述的方法和试剂相同的方法和试剂进行测定。鸡血清样本 (230 个样本) 获取自香港和中国大陆农场。在这些样本中, 有 75 只鸡是从中国大陆农场进口的并且已经用 H5N2 接种过; 有 45 只鸡是从香港农场获得的并且已经用 H5N2 接种过, 余下的鸡为来自香港农场的未接种过的哨兵鸡。所有禽类均为约 90 日龄并且显示出破伤风抗体水平为阴性。

还研究了鸭体内的天然 TT 抗体的存在情况。对科乌努拉地区的野生鸭 (图 9) 和本地饲养的番鸭 (图 10) 进行了测试并且发现它们的 TT 抗体为阴性。

实施例 4: 组合的破伤风类毒素标记和流感疫苗

材料和方法

动物和舍饲条件: 鸡: 获得了 6-7 周龄的雌性 Hy-Line 褐种小蛋鸡 (Altona Hatchery Pty. Ltd., Forrestfield, WA) 并且将其随机分组, 每栏 5 只鸡。鸡栏远离地面并且由钢丝制成。所有的鸡均在彼此相邻的大小相同的鸡栏中饲养。

鸭: 6-8 周龄的雏番鸭获取自西澳大利亚当地的家庭养殖者。将鸭饲养于鸭栏中, 同时在水泥地上铺满稻草。

遵照严格的动物伦理指南 (AEC 编号: 6-05-55 和 4-06-37), 所有动物均在位于西澳大利亚 Medina 的农业研究中心舍饲。

H2N6 禽 流 感 (AI) 病 毒 的 制 备 : 按 照 OIE

(http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00037.htm, 2006年3月22日访问)提供的标准方法培养 H6N2 AI 病毒原种。简言之, 在无菌条件下将 H6N2 传染性 AF 接种到 SPF 鸡胚胎卵的尿囊中(100 μ L/卵)。在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4 天后, 将感染的卵冷却至 4 $^{\circ}$ C。将每个卵的外壳移除, 在无菌条件下收集 AF 并置于 4 $^{\circ}$ C 下。在合并所收集的 AF 之前, 随机测试卵的 HA 活性(参见下文)。通过在 37 $^{\circ}$ C 下与 0.1% (v/v) 的甲醛(使用分析研究级的甲醛)一起搅拌 65 分钟来灭活 AF。在 4 $^{\circ}$ C 下将所述悬液静置过夜并且按上述标准方法用鸡胚胎接种来测试 HA 的失活。

疫苗接种: 在第 0 周和第 4 周, 使用配有 21G 针头的注射器通过皮下注射(s. c.)对禽类进行疫苗接种。

图 11-14 示出了对 TT 剂量的筛选, 并且将 TT 与油性佐剂 Montanide ISA 70 VG (Seppic, France) 混合。用油制备的灭活全病毒 H6N2 疫苗的给药形式为独立的 1 mL 皮下注射剂。按照制造商的推荐方案(Seppic, France)用玻璃注射器和 21G 针头混合疫苗制品。

图 15-16 中示出的数据代表了用于优化所用的 TT 剂量并且将 TT 与 H6N2 疫苗制品合并成单一注射剂的实验。通过搅拌混合所述疫苗制剂直至获得均匀的油包水乳剂。

收集血液: 在首次疫苗接种后的第 0、2、4、6 周利用静脉穿刺从翅静脉收集血液样本。

将禽类的血液样本从注射器注入到玻璃采血管或用血清促凝剂处理过的塑料真空采血管(Greiner Bio-One, NC, USA)中, 并且在 18-22 $^{\circ}$ C 下静置分层过夜。在室温下将试管以 1000 g 离心 10 分钟并且通过吸取上清来收集血清。然后在用于测定之前将血清贮藏于 4 $^{\circ}$ C 下, 之后长期贮藏于-20 $^{\circ}$ C 下(1 个月后)和-80 $^{\circ}$ C 下(超过 6 个月)。

测定 TT 抗体效价: 使用所收集的血清通过间接 ELISA(实施例 5)来测定鸡体内的 TT 抗体效价。在 4 $^{\circ}$ C 的潮湿腔室中用甲醛灭活的、纯化的 TT 抗原 [0.0125 μ g/100 μ L] (List Biological Laboratories, Inc., CA, USA) 或者用溶于 0.05 M 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)的未纯化的 TT 抗原 [14.58 μ g/100 μ L] [Pfizer, Western Australia] 来过夜包被免疫吸附 ELISA 板。

统计学分析: 使用 Students t-检验对所有数据进行统计学分析, 假设各种方法之间方差不齐。认为 P 值 < 0.01 时是显著的。

血细胞凝集(HA)测试: 按照标准方案(陆生动物诊断测试和疫苗手册

(Manual Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals), http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00037.htm, 2006年6月7日访问) 滴定失活的 H6N2 禽流感病毒。简言之, 用 0.1 M PBS 将所述病毒悬液连续地稀释至 25 μ L。向孔内再加入 25 μ L PBS 以使终体积为 50 μ L。然后将 25 μ L 0.5% (v/v) 的鸡红细胞 (RBC) 加入到每个孔中并且将板在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 60 分钟。孵育期结束时, RBC 对照应该已经在所述孔底部沉降为一个明显的斑 (button)。

通过将板倾斜 45 $^{\circ}$ 并且观察是否存在泪形的 RBC 流来确定 HA 效价。给出完整 HA (无流动) 的最高稀释度为端点效价, 表示 1 个 HA 单位 (HAU)。

测定血细胞凝集抑制 (HI) 效价: 使用 HI 测定来确定鸡和鸭体内的 HA 抗体水平。用受体破坏酶 (RDE) 处理鸭的流感病毒抗血清以灭活非特异性抑制剂。鸡抗血清不经 RDE 处理即可使用 (WHO 动物流感诊断和监测 (WHO manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance), WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5, p. 31)。按照制造商的用法说明, 将低压冻干的 RDE (Denka Seiken Co. Ltd., Japan) 重溶于无菌生理盐水中 (0.85% NaCl)。然后, 将 3 倍体积的 RDE 加入到 1 倍体积的血清中并且在 37 $^{\circ}$ C 的水浴中孵育过夜。然后通过 56 $^{\circ}$ C 下加热 30 分钟来使所述酶失活。在使所述处理过的血清冷却后, 加入生理盐水使最终的稀释度为 1:10。

通过在板上用 PBS 连续地将血清稀释至 25 μ L 来进行 HI 测定。然后将流感病毒抗原 (25 μ L, 4 HAU) 加入每个孔中并且在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 60 分钟, 之后加入 25 μ L 0.5% 的鸡 RBC 并且轻轻混合。在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 60 分钟之后, 通过确定可完全抑制 4 HAU 的病毒抗原的最高血清稀释度来评估 HI 效价。设置与血清样本平行的血清对照 (无病毒抗原) 以扣除非特异性 HI 活性。除鸭的 HI 效价外, 所有数据均表示为平均抗体效价+SEM (平均值的标准误), 所述鸭的 HI 效价单独表示。

结果

接下来, 研究了使用破伤风类毒素作为生物标记以区分接种过和未接种过的禽类的组合。进行了两组实验。第一组涉及以彼此独立的注射剂的形式共同给予所述破伤风疫苗和失活的 H6N2 禽流感疫苗, 而第二组实验研究了将两种疫苗合并为单一注射剂的可行性。两种疫苗均涉及使用 Montanide 油作为佐剂, Montanide 油通常被用在商业化的家禽接种中。

在共同给药实验中, 使用 30 只鸡和 30 只鸭来研究皮下给药的疫苗的效

力。根据图 2 所示的结果选择破伤风类毒素的剂量 (0.1 mg、0.3 mg、1.0 mg)。所用的禽流感病毒的 H6 HA 效价为 27。破伤风类毒素的抗体水平和 HI 效价在图 11-14 中示出。

图 11 示出了由疫苗接种引发的 TT 抗体水平。在第二次接种后获得了阳性 TT 抗体水平，抗体效价最高可达 100%。所述强抗体效价可以一直持续到首次接种后的第 20 周。不同剂量之间无显著性差异，但是与 1 mg TT 剂量相比，0.1 mg TT 剂量总是给出稍高的 TT 效价。

图 12 示出了共同接种的鸡体内的 HI 效价。在接种疫苗后成功地引发了 HA 效价，同时在第二次接种疫苗后所有剂量组的效价均达到了 29。值得注意的是，2 次接种后 A1 对照 (26) 的效价低于共同接种组，表明存在下列两种可能性：在递送这两种疫苗时存在额外的佐剂或者某些协同活性导致了共同接种组的较高 HI 效价。通过共同给予 TT 和 A1 疫苗来诱导抗 TT 或 A1 的特异性抗体时未观察到存在干扰作用。

图 13-14 示出了鸭体内的 TT 和 A1 效价。在抗体应答方面，鸭的免疫敏感性通常不如鸡。在所有 TT 剂量组中，阳性抗 TT 抗体效价 (50% 以上的抑制) 仅在第二次接种后才可得到。0.1 mg TT 剂量再次给出了最强的抗 TT 抗体应答，紧随其后的是 1 mg TT 剂量。

鸭体内所引发的 HA 效价低于鸡体内所引发的 HA 效价。并非所有鸭都会对所述疫苗产生免疫应答，但是 0.3 mg TT 剂量 (含 A1) 确实引发了最高的 HA 抗体应答。

接下来研究了将 TT 和 A1 疫苗合并为单一的给药疫苗的策略。明确了在引发阳性抗体应答方面这两种疫苗不会彼此干扰后，用油将这两种疫苗混合并且配制成一种用于皮下给予鸡 (每组 10 只) 的制剂。

基于图 11 中所示的结果选择了 0.3 mg 的最佳 TT 剂量。将该剂量减半 (0.15 mg) 和加倍 (0.6 mg) 以比较所引发的 TT 抗体应答间的差异。还包括了仅接受 A1 疫苗和仅接受 0.3 mg TT 的对照组作为本底参照。接种过的鸡体内的 TT 水平在图 15 中示出。

检测所有 TT 接种组中的 TT 抗体效价。第二次接种疫苗后抗体水平显著增加，而 0.3 mg TT 和 0.6 mg TT 组表现出相当的抗体水平，该抗体水平类似于仅接受 TT 的对照。值得注意的是，在 ELISA 中未使用 TT 疫苗免疫的对照组 A1 接种鸡正如预料地不具有可检测的抗 TT 抗体。与仅接受 TT 的对照相比，共同接种的禽类体内的 TT 抗体水平间不存在显著性差异 ($P > 0.01$)。

图 16 示出了疫苗接种后的 HA 效价类似于图 12 中获得的 HA 效价。值得注意的是，仅接受 0.3 mg TT 疫苗而未接受 A1 疫苗的对照组正如预料地不具有可检测的特异性针对 H6N2 流感病毒的 HI 效价。所有共同接种的组与仅接受 A1 的对照组中 HI 效价间不存在显著性差异 ($P > 0.01$)。

实施例 5: ELISA 诊断

在这一 TT 标记体系中，利用间接 ELISA 法可以很容易地对鸡体内的抗 TT 抗体应答定量，所述间接 ELISA 法包括一种酶缀合抗体，所述抗体识别并结合鸡免疫球蛋白以检测鸡血中的抗 TT 抗体（例如，缀合了辣根过氧化物酶的兔抗鸡 IgG）。然而，这一方法不能用于检测除鸡外的其他禽类物种（例如鸭）的抗体，因为所述缀合抗体是物种特异性的并且与异源抗体的交叉反应能力有限。因此，间接 ELISA 仅限于检测鸡体内的抗体。由于其他的禽类物种可被 HPAI 菌株感染，所以需要另一种方法用来在我们的标记接种策略中检测并监测 TT 抗体（例如，用于监测家禽；鸭、火鸡、鹅、鹤鹑或休闲野生生物；鸬、红鸬）。

间接 ELISA 的一种替代方法是使用一种竞争性 ELISA，所述竞争性 ELISA 对抗体步骤进行了修改。在所述竞争性 ELISA 中，在加入市售的制备好的山羊血清（含有特异性抗 TT 抗体）前，使所述禽类血清与包被所述板的 TT 抗原结合。这两种类型抗体会竞争结合通用 TT 抗原。如果所述禽类血清中的特异性 TT 抗体（阳性血清）结合 TT 抗原，则所述山羊 TT 抗体的结合会被阻断并且发生竞争。反之，如果所述禽类血清不含 TT 特异性抗体（阴性血清），则发生所述山羊 TT 特异性抗体的结合，而不发生竞争。对于这类通用测定，来源于禽类物种的血清源不受限。

将通过间接 ELISA 测得的鸡血清中 TT 特异性抗体以测试血清中的 TT 抗体平均 OD（两个重复）占阳性对照平均 OD（在第 6 周时从 TT 接种的鸡身上采血）的百分数表示，分别通过减去每个样本的阴性对照平均 OD（相当于第 0 周时接种前采血）来进行修正。

$$\text{阳性 \%} = \frac{(\text{测试平均 OD} - \text{阴性对照平均 OD})}{(\text{阳性对照平均 OD} - \text{阴性对照平均 OD})} \times 100$$

将通过竞争性 ELISA 测得的禽类血清（不限于鸡类）中 TT 特异性抗体以测试血清中的 TT 抗体平均 OD（两个重复）占阴性对照平均 OD（在第 0 周时预采血）的抑制百分数表示。

抑制% = $100 - (100 \times \text{测试平均 OD} / \text{阴性对照平均 OD})$

认为抑制超过 50% 的血清样本为 TT 抗体阳性。

材料和方法

间接 TT ELISA:

在 4°C 的潮湿腔室中用甲醛灭活的、纯化的 TT 抗原 [0.0125 μg/100 μL] (List Biological Laboratories, Inc., CA, USA) 或者用溶于 0.05 M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 的未纯化的 TT 抗原 [14.58 μg/100 μL] [Pfizer, Western Australia] 来过夜包被免疫吸附 ELISA 板 (Greiner BioOne, Germany)。使用 12 孔 Immuno 清洗设备 (Nunc International, Australia)，将板用 PBS pH7.6/0.05% 吐温 20 (PBST) 清洗 6 次。用 PBST/4% 脱脂乳将鸡血清稀释为 1/200 并且在每个孔中加入 100 μL，设两个重复。然后将板在 37°C 下孵育 1 小时，之后用 PBST 清洗 6 次。使用用 PBST/4% 脱脂乳 1/4000 稀释的缀合了辣根过氧化物酶 (HRP) 的兔抗鸡 IgG (Chemicon International Inc., Australia) 并且将其以 100 μL 的体积加入到每孔中，然后在 37°C 下孵育 1 小时。然后用 PBST 清洗板，之后加入 100 μL 的底物溶液 (TMB One solution, Promega Corp., USA)。5 分钟后通过加入 50 μL 2M 硫酸来终止反应。15 分钟后，使用全自动定量绘图酶标仪 (Bio-Rad Model 680, CA, USA) 在 450 nm 处读板，并且使用 630 nm 作为参照波长。

竞争性 TT ELISA:

如间接 ELISA 中所述的类似，将板用 TT 包被过夜，并且用 PBST 清洗 6 次。加入第一抗体 (鸡或鸭血清，1/10 稀释，100 μL/孔)，设两个重复，并且在 37°C 下孵育 1 小时。用 PBST 将板清洗 6 次，然后加入山羊抗 TT IgG 抗体 (1/3200 稀释) (Accurate Chemical & Scientific Corp., NY, USA)，在 37°C 下孵育 1 小时。在用 PBST 将孔清洗 6 次后，将缀合了 HRP 的兔抗鸡 IgG 加入到每孔中并且在 37°C 下再孵育 1 小时。然后再次用 PBST 清洗板，之后加入 TMB One Solution。5 分钟后通过加入 2M 硫酸来终止反应，并且在 450 nm 处读板，使用 630 nm 作为参照波长。

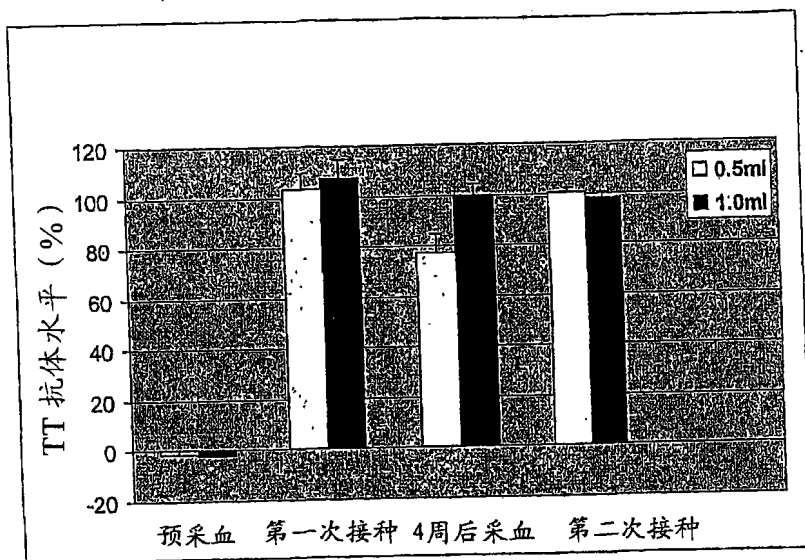


图 1

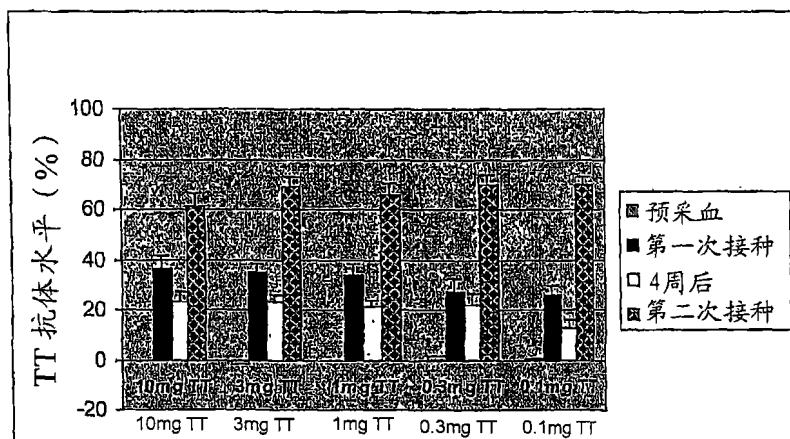


图 2

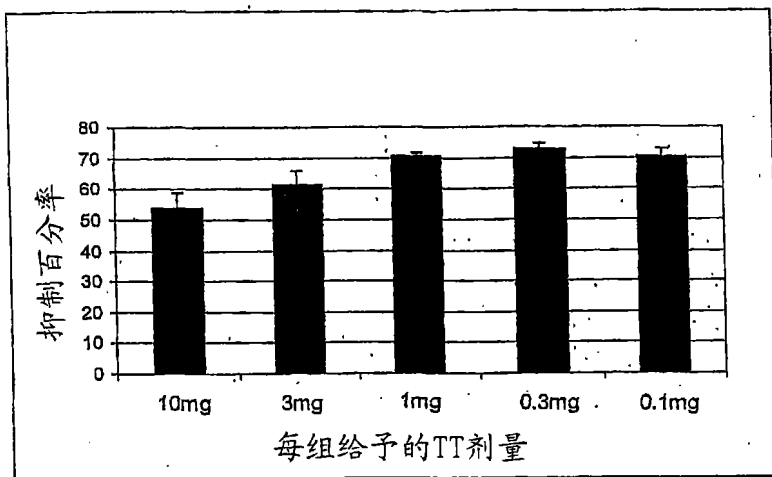


图 3

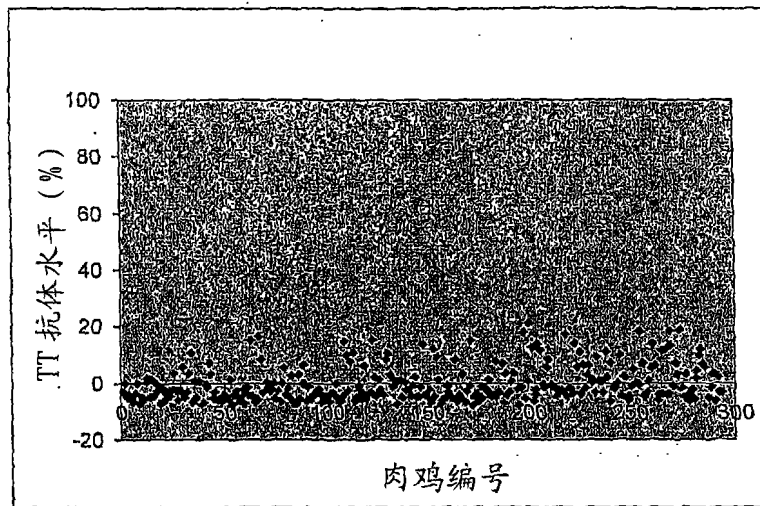


图 4

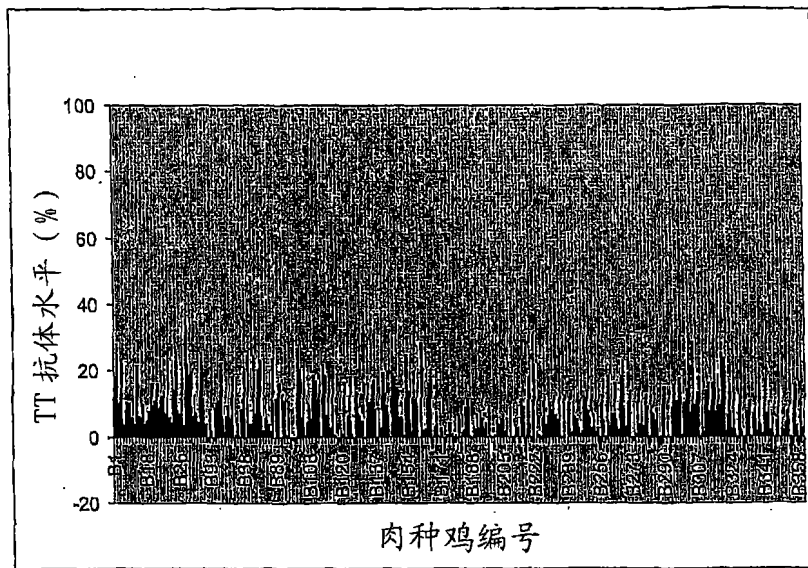


图 5

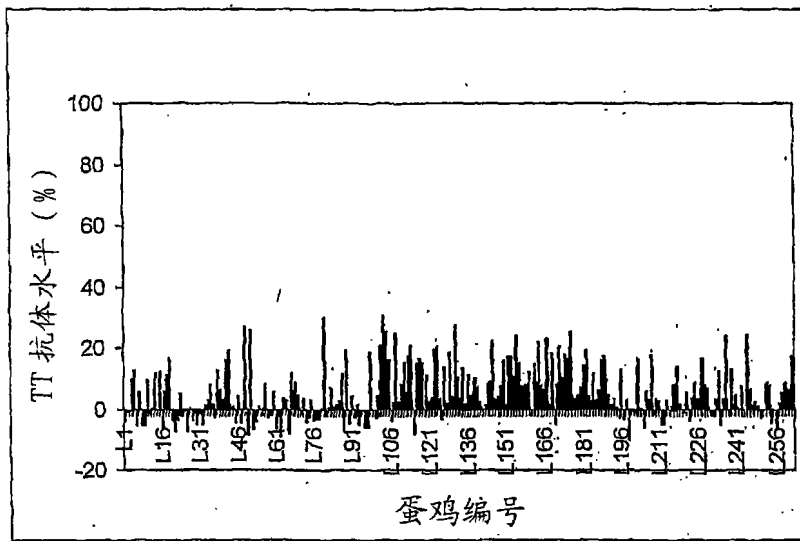


图 6

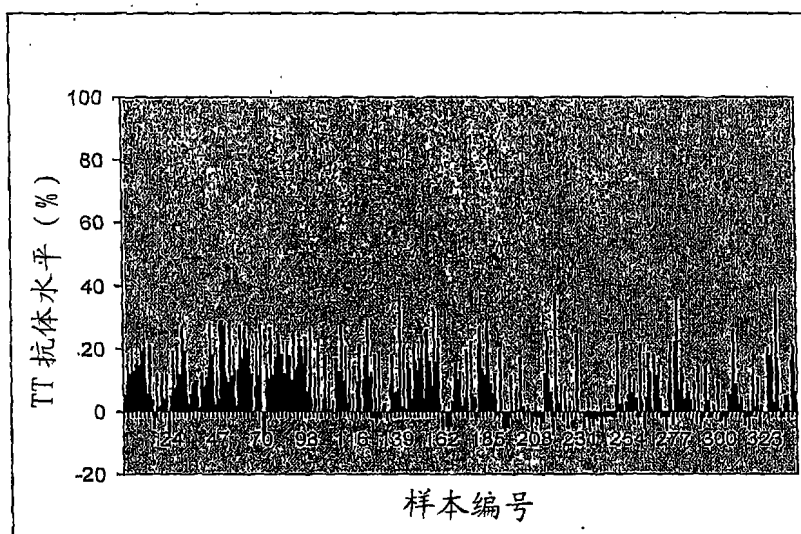


图 7

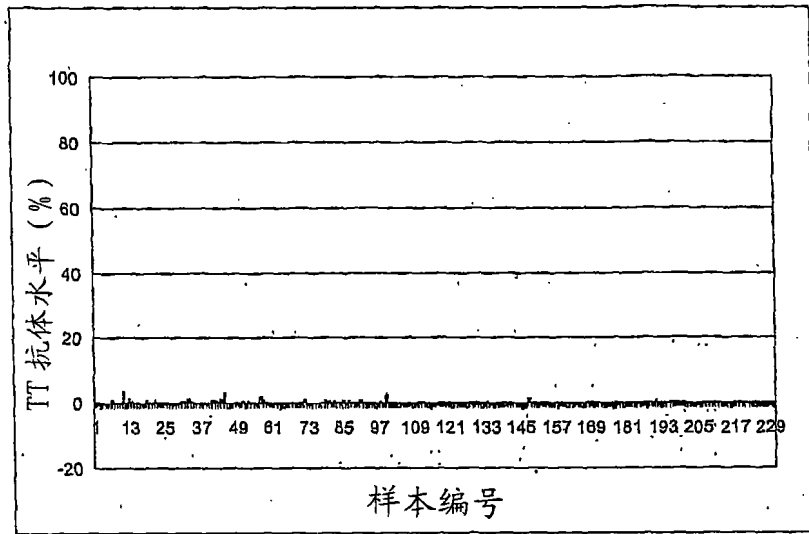


图 8

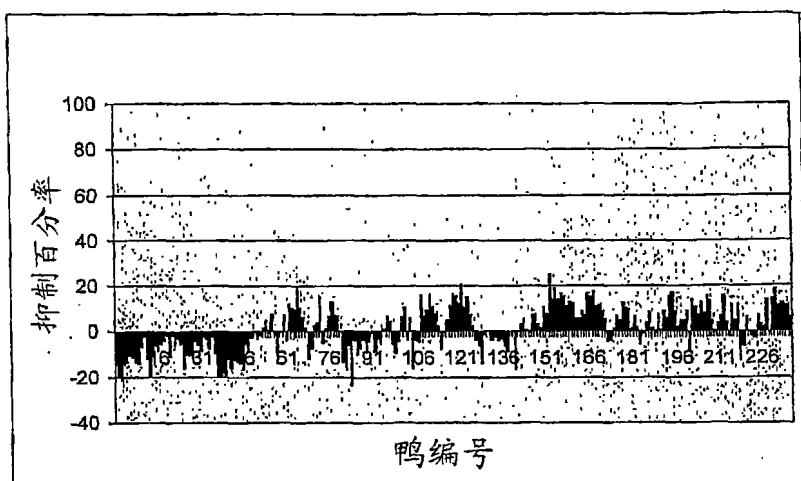


图 9

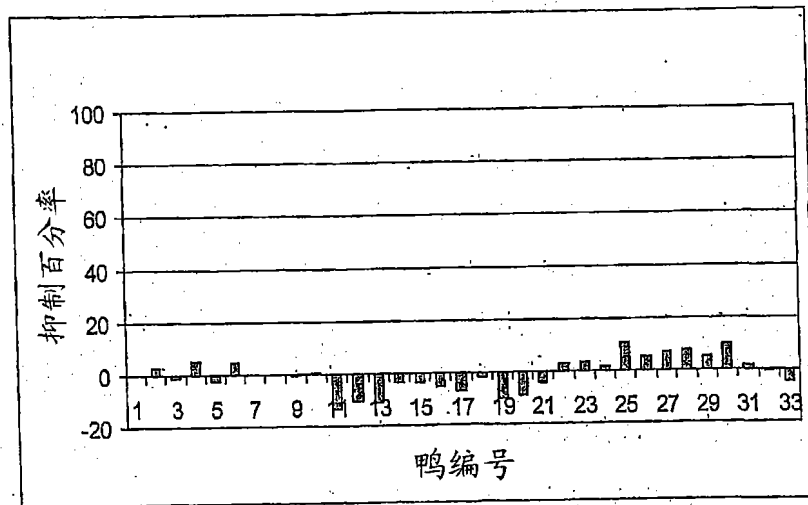


图 10

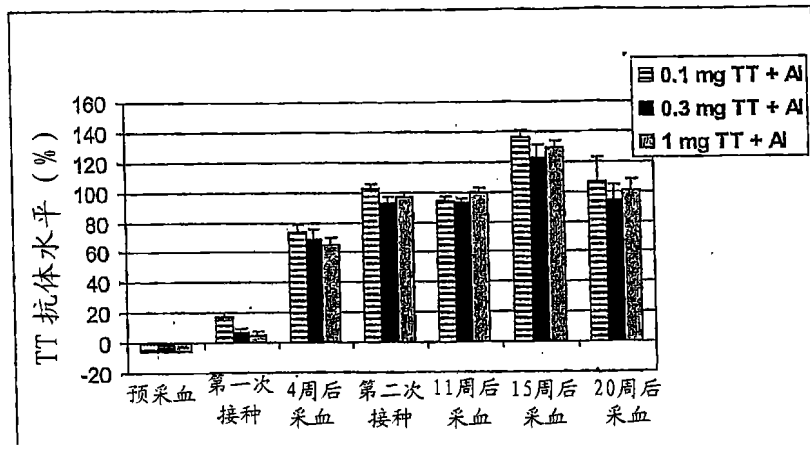


图 11

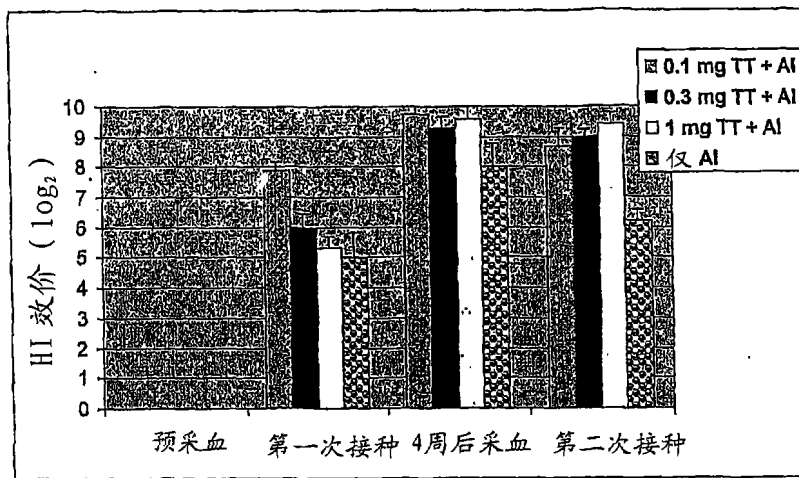


图 12

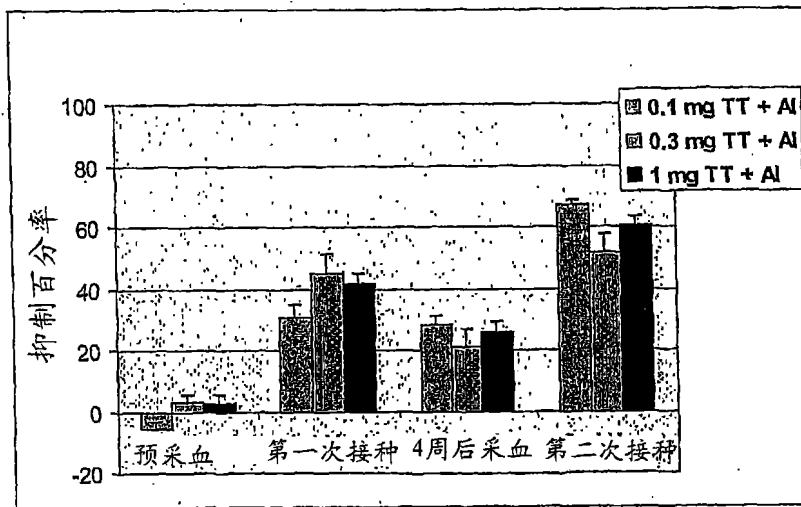


图 13

共同接种TT和AI疫苗的鸭体内的HI效价。

	预采血	第一次接种	4周后采血	第二次接种
0.1 mg TT + H6N2	0 (n=10)	20, 20, 40, 0 (n=7)	10, 0 (n=9)	80 (n=4), 40 (n=4), 20, 0
0.3 mg TT + H6N2	0 (n=10)	10, 0 (n=6)	0 (n=7)	320, 160, 80, 80, 40, 20, 0
1 mg TT + H6N2	0 (n=10)	0 (n=9)	0 (n=9)	80, 80, 40, 40, 20, 20, 20, 10, 10

图 14

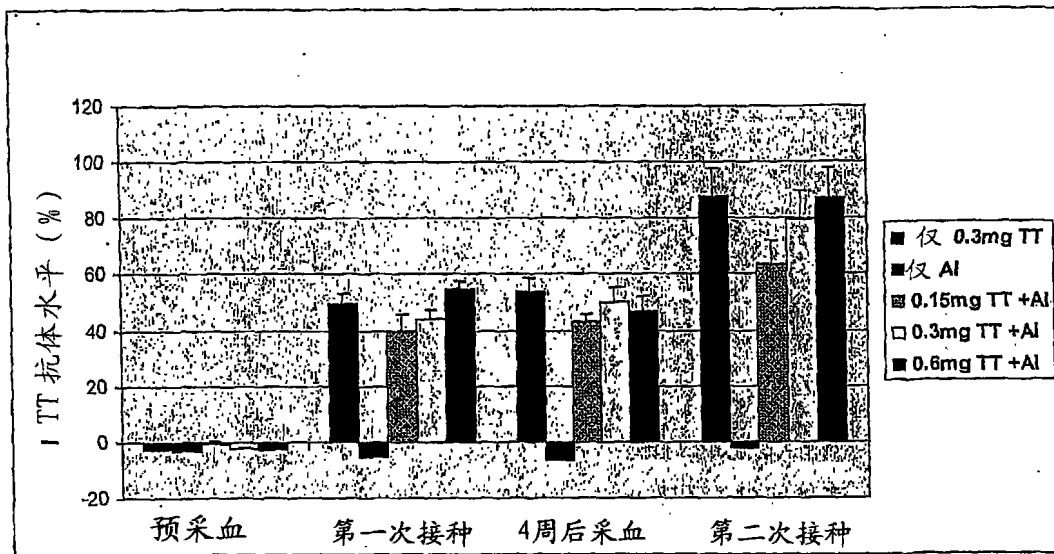


图 15

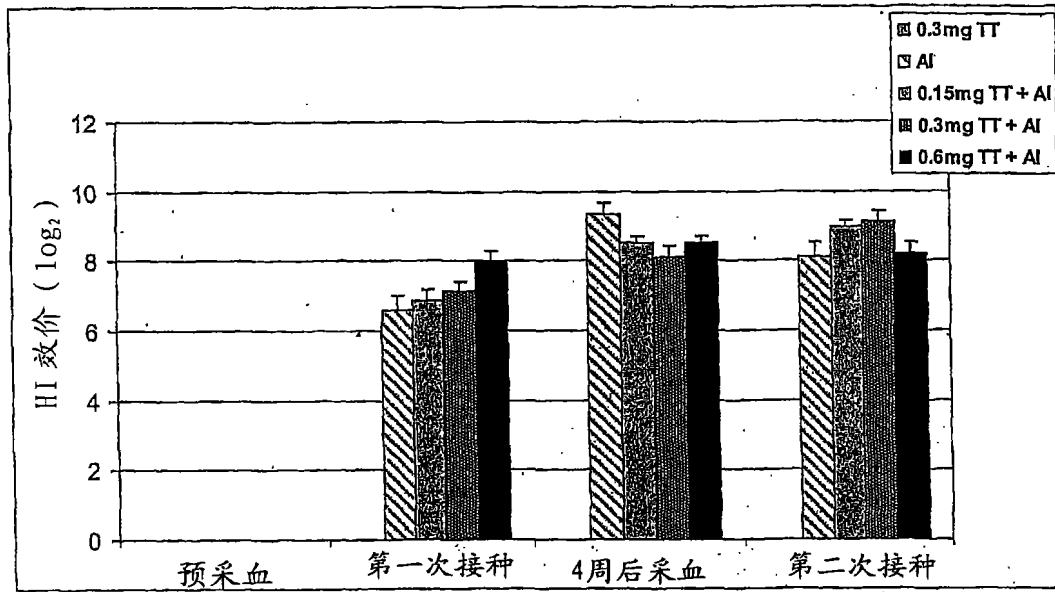


图 16

专利名称(译)	鉴别治疗组合物		
公开(公告)号	CN101495139A	公开(公告)日	2009-07-29
申请号	CN200680050074.X	申请日	2006-11-10
[标]发明人	TM埃利斯 SG芬威克 CM詹姆斯		
发明人	T·M·埃利斯 S·G·芬威克 C·M·詹姆斯		
IPC分类号	A61K39/295 A61K39/21 G01N33/532 C12Q1/24		
CPC分类号	A61K39/145 A61K39/08 G01N2469/20 A61K39/12 C12N2760/16134 A61K2039/5252 A61K2039/552 A61K2039/55505 A61K2039/55566 A61K2039/70		
代理人(译)	姜建成		
优先权	2005906282 2005-11-10 AU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种标记已经被给予或将会被给予至少一种第一抗原的受试者的方法，其中所述抗原来源于能够感染所述受试者的传染原，且所述抗原能够在所述受试者体内产生或有助于产生治疗作用，所述方法包括下列步骤：给予所述受试者一种标记或报道物，所述标记或报道物在所述受试者体内产生可检测信号，并且能够鉴别出已经接受了所述第一抗原的受试者。

$$\text{阳性\%} = \frac{(\text{测试平均OD} - \text{阴性对照平均OD})}{(\text{阳性对照平均OD} - \text{阴性对照平均OD})} \times 100$$