

[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 200480036743.9

[51] Int. Cl.

C07K 14/28 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 2 月 13 日

[11] 公开号 CN 101124241A

[22] 申请日 2004.12.8

[21] 申请号 200480036743.9

[30] 优先权

[32] 2003.12.9 [33] EP [31] 03104603.0

[86] 国际申请 PCT/EP2004/053342 2004.12.8

[87] 国际公布 WO2005/056586 英 2005.6.23

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.9

[71] 申请人 英特威国际有限公司

地址 荷兰博克斯海尔

[72] 发明人 P·沃梅吉

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 赵艳华

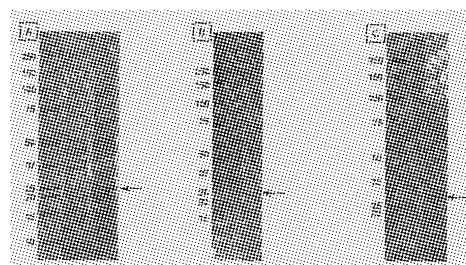
权利要求书 2 页 说明书 16 页 序列表 3 页
附图 1 页

[54] 发明名称

细胞内劳索尼亚菌 26kD 亚单位疫苗

[57] 摘要

本发明具体涉及编码新的细胞内劳索尼亚菌 (Lawsonia intracellularis) 蛋白的核酸。其还涉及包含这些序列的 DNA 片段、重组 DNA 分子和活的重组载体。其也涉及包含这些核酸、DNA 片段、重组 DNA 分子和活的重组载体的宿主细胞。此外, 本发明也涉及由这些核苷酸序列编码的蛋白和其在疫苗生产中的用途。本发明也涉及抗细胞内劳索尼亚菌感染的疫苗和其制备方法。最后本发明涉及用于细胞内劳索尼亚菌抗原和抗细胞内劳索尼亚菌的抗体的检测的诊断测定法。



1) 编码 26kD 细胞内劳索尼亚菌 (*Lawsonia intracellularis*) 蛋白的核酸或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸的部分, 所述核酸或其所述部分和具有示于 SEQ ID NO: 1 的序列的核酸具有至少 90%、优选地 92%、更优选地 94%、甚至更优选地 96% 的同源性。

2) 含有权利要求 1 的核酸的 DNA 片段。

3) 含有权利要求 1 的核酸或权利要求 2 的 DNA 片段的重组 DNA 分子, 所述重组 DNA 分子在有效连接的启动子的控制之下。

4) 活的重组载体, 其包含权利要求 1 的核酸、权利要求 2 的 DNA 片段或权利要求 3 的重组 DNA 分子。

5) 宿主细胞, 其含有权利要求 1 的核酸、权利要求 2 的 DNA 片段、权利要求 3 的重组 DNA 分子或权利要求 4 的活的重组载体。

6) 26kD 的细胞内劳索尼亚菌蛋白或所述蛋白的免疫原性片段, 所述蛋白包含和 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 90%、优选地 92%、更优选地 94%、甚至更优选地 96% 的同源性的氨基酸序列。

7) 用于疫苗的权利要求 6 的细胞内劳索尼亚菌蛋白。

8) 权利要求 6 的细胞内劳索尼亚菌蛋白在制备抗细胞内劳索尼亚菌感染的疫苗中的用途。

9) 抗细胞内劳索尼亚菌感染的疫苗, 其特征在于其包含权利要求 1 的核酸、权利要求 2 的 DNA 片段、权利要求 3 的重组 DNA 分子、权利要求 4 的活的重组载体、权利要求 5 的宿主细胞或权利要求 6 的蛋白和药物可接受的载体。

10) 权利要求 9 的疫苗, 其特征在于其含有佐剂。

11) 权利要求 9 或 10 的疫苗, 其特征在于其含有另外的来源于猪的病原性病毒或微生物的抗原或编码所述抗原的遗传信息。

12) 权利要求 11 的疫苗, 其特征在于所述猪的病原性病毒或微生物选自伪狂犬病病毒 (*Pseudorabies virus*)、猪流感病毒 (*Porcine influenza virus*)、猪细小病毒 (*Porcine parvo virus*)、传染性胃

肠炎病毒 (Transmissible gastro-enteritis virus)、轮状病毒 (Rotavirus)、大肠杆菌 (Escherichia coli)、猪红斑丹毒丝菌 (Erysipelothrix rhusiopathiae)、支气管炎博德特氏菌 (Bordetella bronchiseptica)、猪霍乱沙门氏菌 (Salmonella cholerasuis)、副猪嗜血菌 (Haemophilus parasuis)、多杀巴斯德氏菌 (Pasteurella multocida)、猪链球菌 (Streptococcus suis)、猪肺炎枝原体 (Mycoplasma hyopneumoniae)、猪痢疾螺旋体 (Brachyspira hyodysenteriae) 和胸膜肺炎放线杆菌 (Actinobacillus pleuropneumoniae)。

13) 抗细胞内劳索尼亚菌感染的疫苗, 其特征在于其含有抗权利要求 6 的蛋白的抗体。

14) 制备权利要求 9-13 的疫苗的方法, 所述方法包括将权利要求 1 的核酸、权利要求 2 的 DNA 片段、权利要求 3 的重组 DNA 分子、权利要求 4 的活的重组载体、权利要求 5 的宿主细胞、权利要求 6 的蛋白或抗权利要求 6 的蛋白的抗体和药物可接受的载体混合。

15) 用于抗细胞内劳索尼亚菌的抗体的检测的诊断检验法, 其特征在于所述检验法包含权利要求 6 中定义的蛋白或其片段。

16) 用于细胞内劳索尼亚菌的抗原性材料的检测的诊断检验法, 其特征在于所述检验法包含抗权利要求 6 中定义的蛋白或其片段的抗体。

细胞内劳索尼亚菌 26kD 亚单位疫苗

本发明具体涉及编码新的细胞内劳索尼亚菌 (*Lawsonia intracellularis*) 蛋白的核酸, 包含这些序列的 DNA 片段、重组 DNA 分子和活的重组载体、包含这些核酸、DNA 片段、重组 DNA 分子和活的重组载体的宿主细胞、由这些核苷酸序列编码的蛋白和其在疫苗制备中的用途、抗细胞内劳索尼亚菌感染的疫苗和其制备方法和用于细胞内劳索尼亚菌抗原和抗细胞内劳索尼亚菌的抗体的检测的诊断检验法。

猪增生性肠病 (PPE 或 PE) 已成为世界范围内现代猪产业的重大疾病。所述疾病影响了 15%至 50%的正在生长的畜群和在已确定了的问题畜群中影响高达 30%的动物个体。如今在每头受影响的猪的额外的饲料和设施时间花费上, 年经济损失估计已达 5-10 美元。PPE 是具有许多不同临床症状 (死亡、苍白 (pale) 和贫血的动物、水样、黑色或鲜红的腹泻粪便、萎靡、食欲不振和行动迟缓、生长迟滞以及增加的 FCR) 的一组慢性和急性病症。然而, 存在两个一致的特征。第一特征 (只在尸体剖检时观察到的病理学变化) 是小肠和结肠粘膜的增厚。第二是在受感染的肠的肠上皮细胞 (enterocytes) 中出现胞质内小弯曲细菌 (small-curved bacteria)。这些细菌现在已被确定为 PPE 的病原因子 (etiological agent) 并被称为细胞内劳索尼亚菌。

许多年来, 已发现细胞内劳索尼亚菌感染许多种类的动物, 包括猴子、兔子、白鼬 (ferrets)、仓鼠、狐狸、马和差异如鸵鸟和 emoe 般大的其他动物。细胞内劳索尼亚菌是革兰氏阴性的、带鞭毛的细菌, 其只在真核生物的肠上皮细胞中繁殖并且非细胞体系培养还未曾被描述过。为了在细胞中生存和繁殖, 细胞内劳索尼亚菌必须要穿透正在分裂的 (dividing) 隐窝细胞。细菌与细胞膜结合并通过进入液泡快速地进行肠上皮细胞。然后该液泡迅速地破裂 (在 3 小时内), 细菌便

在细胞质中旺盛地生长和自由地繁殖。细菌导致被感染的细胞不能成熟,持续地进行有丝分裂和形成发育不全的隐窝细胞的机制仍不清楚。

目前对细胞内劳索尼亚菌感染、对该疾病的治疗和控制的理解决一直因为细胞内劳索尼亚菌不能在非细胞培养基中进行培养而受到阻碍。尽管报道了在大鼠肠上皮细胞中成功的共培养细胞内劳索尼亚菌,但这仍未导致抗细胞内劳索尼亚菌的经灭活的疫苗的开发,尽管明显地存在对这些疫苗的需求。

本发明的目的是提供抗细胞内劳索尼亚菌感染的疫苗。

现在令人惊奇地发现,细胞内劳索尼亚菌产生能够诱导抗细胞内劳索尼亚菌的保护性免疫的新的蛋白。

所述新的蛋白称作 26kD 蛋白。

该新的蛋白的氨基酸序列示于序列标志符 SEQ ID NO: 2。编码该蛋白的基因已被测序,其核酸序列示于序列标志符 SEQ ID NO: 1。该基因在实施例中也称作“基因 5608”。

在本领域众所周知,许多不同的核酸序列可编码同一种的蛋白。该现象通常称作在编码氨基酸的各三联体的第二和特别是第三位碱基上的摇摆现象。该现象可导致两个核酸序列大约 30%的异源性,但其仍能编码相同的蛋白。因此,具有大约 70%序列同源性的两个核酸序列仍可编码同一种蛋白。

因此,一个实施方案涉及编码细胞内劳索尼亚菌蛋白的核酸和该核酸的编码该蛋白的免疫原性片段的部分,其中这些核酸或其部分和序列示于 SEQ ID NO: 1 的核酸具有至少 90%的同源性水平。

优选地,编码该细胞内劳索尼亚菌蛋白的核酸或所述核酸的部分和具有 SEQ ID NO: 1 所示序列的核酸具有至少 92%、优选地 94%、更优选地 95%和甚至更优选地 96%的同源性。更优选的是 98%或甚至 100%的同源性水平。

可用计算机程序“BLAST 2 SEQUENCES”,通过选择可在 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html 上找到的子程序“BLASTN”来确定核苷酸同源性的水平。

该程序的参考资料是 Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999)。使用的参数是缺省参数：匹配赏分 (Reward for match)：+1、错配罚分：-2、开放空位：5、延伸空位：2、Gap x-dropoff：50。

确定某核酸是否是本发明的核酸的另一方法涉及这样的问题，即该特定核酸是否在严紧条件下确实与具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列的核酸杂交。

如果核酸在严紧条件下与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列杂交，那么其被认为是本发明的核酸。

按照 Meinkoth 和 Wahl (1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Anal. Biochem. 138 : 267-284.) 的公式定义严紧条件

$$T_m = [81.5 \text{ }^{\circ}\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\% \text{ GC}) - 0.61 (\% \text{ 甲酰胺}) - 500/L] - 1^{\circ}\text{C}/1 \% \text{ 错配}$$

在公式中，M 是单价阳离子的摩尔浓度；%GC 是 DNA 中鸟嘌呤和胞嘧啶核苷酸的百分比；L 是在碱基对上的杂交长度。

严紧条件是这样的条件，即在该条件下，如果核酸或其片段和具有 SEQ ID NO: 1 所示序列的核酸具有至多 10% 的错配，其仍能杂交。

因为本发明公开了编码新的细胞内劳索尼亚菌蛋白的核酸，因此现在第一次有可能以足够的量获得这些蛋白。这可以通过例如使用表达系统表达编码所述蛋白的基因来实现。

因此，在更优选的实施方案中，本发明涉及包含本发明的核酸的 DNA 片段。这样的 DNA 片段可以是例如克隆了本发明的核酸的质粒。如下所述，这些 DNA 片段例如用作引物可用以增加 DNA 的量。

表达核酸的必要条件是有效地连接所述核酸的恰当的启动子，这样所述核酸就在启动子的控制之下。启动子的选择扩展至能够在细胞（用作蛋白表达的宿主细胞）中指导基因转录的任何真核、原核或病毒启动子对本领域技术人员来说是显而易见的。

因此，该实施方案的更优选的形式涉及重组 DNA 分子，所述重组

DNA 分子包含置于有效连接的启动子控制之下的本发明的 DNA 片段或核酸。这可通过例如标准的分子生物学技术 (Sambrook, J. 和 Russell, D. W. , Molecular cloning: a laboratory manual, 2001. ISBN 0-87969-577-3) 的方法来实现。有效连接的启动子是能够控制其连接的核酸转录的启动子。

这样的启动子可以是劳索尼氏菌属 (Lawsonia) 启动子例如参与编码 26 kD 蛋白的基因的体内表达的启动子, 假如该启动子在用于表达的细胞中是有效的。其也可以是异源启动子。当宿主细胞是细菌时, 可使用的有用的表达控制序列包括 Trp 启动子和操纵子 (Goeddel, 等人, Nucl. Acids Res. , 8, 4057, 1980); lac 启动子和操纵子 (Chang, 等人, Nature, 275, 615, 1978); 外膜蛋白启动子 (Nakamura, K. 和 Inouge, M. , EMBO J. , 1, 771-775, 1982); 噬菌体 λ 启动子和操纵子 (Remaut, E. 等人 , Nucl. Acids Res. , 11, 4677-4688, 1983); α 淀粉酶 (枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)) 启动子和操纵子, 与选择的宿主细胞相容的终止序列和其他增强和控制表达的序列。

当宿主细胞是酵母时, 有用的表达控制序列包括, 例如 α -交配因子 (mating factor)。对于昆虫细胞, 可使用杆状病毒的多角体蛋白和 p10 启动子 (Smith, G. E. 等人, Mol. Cell. Biol. 3, 2156-65, 1983)。当宿主细胞是哺乳动物来源的宿主细胞时, 举例说明性的有用的表达控制序列包括 SV-40 启动子 (Berman, P. W. 等人, Science, 222, 524-527, 1983) 或金属硫蛋白启动子 (Brinster, R. L. , Nature, 296, 39-42, 1982) 或热激启动子 (Voellmy 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4949-53, 1985)。

细菌、酵母、真菌、昆虫和哺乳动物细胞表达系统是非常频繁使用的系统。这些系统在本领域是熟知的并且通常是可获得的, 例如从 Invitrogen (www.invitrogen.com), Novagen (www.merckbiosciences.de) 或 Clontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, USA 商购获得。除了这些表达系统外, 基于寄生虫的表达系统是非常有吸引力的表达系统。这些系统描述于例如

公开号为 2 714 074 的法国专利申请和 US NTIS 公开号 US 08/043109 (Hoffman, S. 和 Rogers, W.: Public. 1993 年 12 月 1 日)。

本发明的该实施方案的其他更优选的形式涉及活重组载体 (LRC)，该重组载体包含编码本发明的 26kD 蛋白或其免疫原性片段的核酸、本发明的 DNA 片段或本发明的重组 DNA 分子。这些载体是例如细菌和病毒。这些 LRC 是这样的微生物或病毒，即在其中已克隆了额外的遗传信息，在该情况下是编码本发明的 26kD 蛋白或其免疫原性片段的核酸。用这些 LRC 感染的动物将产生这样的免疫应答，即该免疫应答不仅抗所述载体的免疫原而且抗遗传密码被另外地克隆入 LRC 的蛋白（例如 26kD 蛋白）的免疫原部分。

作为 LRC 的例子，可使用本领域已知的具有吸引力的减毒的沙门氏菌属 (*Salmonella*) 株系。

Vermeulen, A. N. (Int. Journ. Parasitol. 28: 1121-1130 (1998)) 已具体描述了活的重组载体寄生虫。LCR 也可用作将核酸运送入靶细胞的手段。活的重组载体病毒也称作载体病毒。通常用作载体的病毒是痘苗病毒 (Panicali-等人; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4927 (1982)、疱疹病毒 (E. P. A. 0473210A2) 和逆转录病毒 (Valerio, D. 等人; in Baum, S. J., Dicke, K. A., Lotzova, E. 和 Pluznik, D. H. (编著), Experimental Haematology today-1988. Springer Verlag, New York: pp. 92-99 (1989))。

可使用本领域熟知的体内同源重组技术将重组核酸导入选择的细菌、寄生虫或病毒的基因组，所述细菌、寄生虫或病毒能够诱导本发明的插入的核酸在宿主动物中表达。

最后本发明的该实施方案的其他形式涉及这样的宿主细胞，即其包含在有效连接的启动子控制之下的编码本发明的蛋白的核酸、包含这样的核酸的 DNA 片段或包含这样的核酸的重组 DNA 分子。该形式也涉及含有活的重组载体的宿主细胞，所述载体含有编码本发明的 26kD 蛋白或其片段的核酸分子。

宿主细胞可以是含有基于细菌的质粒如 pBR322 或细菌表达载体

如 pGEX 或含有噬菌体的细菌来源的细胞例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 种类的细胞。宿主细胞也可以是真核来源的细胞, 例如含有酵母特异性载体分子的酵母细胞, 或含有载体或重组杆状病毒的高等真核细胞例如昆虫细胞 (Luckow 等人; *Bio-technology* 6: 47-55(1988)), 和例如含有基于 Ti 质粒载体或植物病毒载体的植物细胞 (Barton, K. A. 等人; *Cell* 32:1033 (1983)), 也含有合适的载体或重组病毒的哺乳动物细胞如 Hela 细胞、中国仓鼠细胞 (CHO) 或 Crandell Feline 肾细胞。

本发明的另一个实施方案涉及本发明的新的蛋白和其免疫原性片段。

下面定义免疫原性片段的概念。

该实施方案的一种形式具体涉及具有和 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 90%的同源性的氨基酸序列的细胞内劳索尼亚菌蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

在优选的形式中, 所述实施方案涉及这样的细胞内劳索尼亚菌蛋白和所述蛋白的免疫原性片段, 即所述蛋白和 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 92%、优选地 94%、更优选地 96%的序列同源性。甚至更优选的是具有 98%或甚至 100%的同源性水平。

可用计算机程序 “BLAST 2 SEQUENCES”, 通过选择可在 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html 上找到的子程序: “BLASTP” 来确定蛋白同源性的水平。

该程序的参考资料是 Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden *FEMS Microbiol. Letters* 174: 247-250 (1999)。使用的矩阵: “blosum62”。使用的参数是缺省参数: 开放空位: 11、延伸空位: 1、Gap x-dropoff: 50。

要理解的是, 对于此处包括的特定蛋白, 单独的细胞内劳索尼亚菌株系之间可存在天然的变异。这些变异可通过总的序列上的氨基酸差异或所述序列中氨基酸的缺失、替换、插入、倒位或添加来表明。例如, Neurath 等人在 “*The Proteins*” Academic Press New York (1979)

中描述了基本上不改变生物学和免疫学活性的氨基酸替换。除其他以外，关联氨基酸之间的氨基酸置换或在演化中频繁发生的置换特别是 Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Val (参见 Dayhof, M. D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D. C., 1978, 第 5 卷, suppl. 3)。其他氨基酸替换包括 Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Leu/Ile、Leu/Val 和 Ala/Glu。基于该信息, Lipman 和 Pearson 开发了用于快速和灵敏地氨基酸比较 (Science, 227, 1435-1441, 1985) 和确定同源蛋白之间的功能相似性的方法。本发明的示例性实施方案的这些氨基酸替换以及具有缺失和/或插入的变异在本发明的范围之内, 只要所得的蛋白保持其免疫反应性。这解释了本发明的细胞内劳索尼亚菌蛋白, 当从不同野外分离株 (field isolate) 中分离时, 可具有大约 90% 的同源性水平, 但却代表具有相同免疫学特性的相同蛋白的原因。在本发明的特定蛋白的氨基酸序列上的这些变异被认为“基本不影响免疫原性”, 即所述变异仍可提供能够诱导抗细胞内劳索尼亚菌引起的感染或至少抗所述感染的临床表现的免疫应答的蛋白。

然而, 当蛋白用于例如接种目的或用于产生抗体时, 不必使用完整的蛋白。也可能使用该蛋白的片段 (所谓的免疫原性片段), 所述片段同样能够诱导抗该蛋白的免疫应答或偶联至能够诱导抗该蛋白的免疫应答的载体例如 KLH。“免疫原性片段”被理解为在宿主中仍然保持其诱导免疫应答的能力的全长蛋白的片段, 即所述片段包含 B 或 T 细胞表位。现在, 可利用各种技术容易地鉴定编码抗原片段 (决定簇) 的 DNA 片段。由 Geysen 等人 (专利申请 WO 84/03564、专利申请 WO 86/06487、美国专利 4,833, 092、Proc. Natl Acad. Sci. 81 : 3998-4002 (1984), J. Imm. Meth. 102, 259-274 (1987) 描述的方法 (所谓的 PEPSCAN 方法) 是容易进行的、快速的和已良好建立的用于检测表位、蛋白的免疫学上重要区域的方法。所述方法得到广泛使用并且同样对本领域技术人员来说是熟知的。该 (经验性的) 方

法特别适合用于 B 细胞表位的检测。此外, 给定编码任何蛋白的基因的序列, 计算机算法能够在其序列和/或结构上与现在已知的抗表位一致的基础上将特定的蛋白片段指定为免疫学上重要的原表位。这些区域的确定基于根据 Hopp 和 Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 38248-3828 (1981)) 的亲水性标准和根据 Chou 和 Fasman (Advances in Enzymology 47: 45-148 (1987) 和美国专利 4,554, 101) 的二级结构状况的结合。同样借助于 Berzofsky 的两亲性标准 (Science 235, 1059-1062 (1987) 和美国专利申请 NTIS US 07/005, 885) 通过计算机可根据序列预测 T 细胞表位。可在: Shan Lu 关于普通原理: Tibtech 9: 238-242 (1991)、Good 等人关于疟疾的抗原表位; Science 235: 1059-1062 (1987)、Lu 的综述; Vaccine 10: 3-7 (1992)、Berzowsky 关于 HIV-表位; The FASEB Journal 5: 2412-2418 (1991) 中查到精简的概述。

因此, 本发明的另外的实施方案的一种形式涉及能够保护猪抗细胞内劳索尼亚菌感染的疫苗, 该疫苗包含如上所述的本发明的蛋白或其免疫原性片段和药物可接受的载体。

本发明的其他实施方案涉及用于疫苗的本发明的蛋白。

其他实施方案涉及本发明的蛋白在生产抗细胞内劳索尼亚菌感染的疫苗上的用途。

一种制备本发明的疫苗的方法是通过生物化学纯化法从细菌(从感染的肠壁获取的粘膜刮取物 (scrapings) 中获得的) 纯化出本发明的蛋白或其免疫原性片段。然而这是非常耗时的制备疫苗的方法。

因此在疫苗中使用编码本发明的蛋白或其免疫原性片段的基因的表达产物要方便得多。本发明提供了编码 26kD 蛋白的基因的核酸。

根据本发明, 通过将本发明的蛋白或其免疫原性片段与药物可接受载体混合可容易地制备基于这些基因的表达产物的这些疫苗, 如下所述。

或者, 本发明的疫苗可包括如上描述的活的重组载体, 所述载体能够表达本发明的蛋白或其免疫原性片段。这些疫苗, 例如基于感染

肠上皮或例如呼吸上皮的沙门氏菌属载体或病毒载体的疫苗具有优于亚单位疫苗的可利方面，其更好地模拟细胞内劳索尼亚菌的感染的天然方式。此外，其自我繁殖是有利的，因为免疫只需要少量的重组载体。

上述疫苗都有助于主动接种，即，宿主的免疫系统通过本发明的蛋白或其免疫原性片段引发，产生抗这些蛋白的抗体。

另外，这些抗体可在例如兔子中产生或可从如下所述的抗体产生性细胞系中获得。然后可将这些抗体给宿主动物施用。该接种方法（被动接种）是当动物已被感染而且没有时间允许天然的免疫应答被触发时选择的接种。它也是接种免疫功能受损（immune-compromised）的动物的优选的方法。施用的抗细胞内劳索尼亚菌的抗体可在这些情况下直接结合细菌。这具有其立即减少了或阻止了细胞内劳索尼亚菌的生长的可利方面。

因此，本发明的该实施方案的一种其他的形式涉及包含抗本发明的 26kD 细胞内劳索尼亚菌的抗体的疫苗。

疫苗也可以基于如上所述的宿主细胞，其包含本发明的蛋白或其免疫原性片段。

另外有效的接种方式是直接用编码相关抗原的 DNA 进行接种。用编码蛋白的 DNA 直接接种已在许多不同的蛋白上获得成功。（如在例如 Donnelly 等人，The Immunologist 2: 20-26 (1993) 中所综述的）。该接种方法对抗细胞内劳索尼亚菌感染的猪的接种是非常有吸引力的。

因此，本发明的该实施方案的其他形式涉及包含编码本发明的蛋白或其免疫原性片段的核酸的疫苗和涉及包含含有这些核酸的 DNA 片段的疫苗。

该实施方案的其他形式涉及包含本发明的重组 DNA 分子的疫苗。

通过皮内施用例如使用无针头注射器（needle-less injector）可容易地施用 DNA 疫苗。该施用方法将 DNA 直接递送至被接种的动物的细胞中。1 和 100 μ g 之间的微克范围内的 DNA 量提供了非常好的

结果。

在其他实施方案中，本发明的疫苗额外地包含了一种或多种来源于其他猪病源性生物体和病毒的抗原或编码这些抗原的遗传信息。

这些生物体和病毒优选地选自伪狂犬病病毒 (*Pseudorabies virus*)、猪流感病毒 (*Porcine influenza virus*)、猪细小病毒 (*Porcine parvo virus*)、传染性胃肠炎病毒 (*Transmissible gastro-enteritis virus*)、轮状病毒 (*Rotavirus*)、大肠杆菌、猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、支气管炎博德特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*)、副猪嗜血菌 (*Haemophilus parasuis*)、多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*)、猪链球菌 (*Streptococcus suis*)、猪肺炎枝原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)、猪痢疾螺旋体 (*Brachyspira hyodysenteriae*) 和胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)。

本发明的所有疫苗包含药物可接受的载体。药物可接受的载体可以是例如无菌水或无菌生理盐溶液。更复杂形式的载体可以是例如缓冲剂。

用于制备疫苗的方法包括将本发明的蛋白或其免疫原性片段与药物可接受的载体混合。

本发明的疫苗优选地也可包含佐剂。佐剂通常包含以非特异性方式增强宿主的免疫应答的物质。许多不同的佐剂在本领域是已知的。佐剂的例子是弗氏完全和不完全佐剂、维生素 E、非离子阻断聚合体、胞壁酰二肽、Quill A^(R)、矿质油例如 Bayol^(R) 或 Markol^(R)、植物油和 Carbopol^(R) (同聚物)，或 Diluvac^(R) Forte。疫苗也可以包含所谓的“载体”。载体是多肽附着但非共价地结合其的化合物。经常使用的载体化合物是例如氢氧化铝、磷酸铝或氧化铝、二氧化硅、高岭土和皂土。这样的载体的特殊形式是所谓的 ISCOM (EP 109.942、EP180.564、EP 242.380)，在所述形式中抗原部分地包埋在载体中。此外，疫苗可包含一种或多种合适的表面活性化合物或乳化剂，例如 Span

或 Tween。通常，疫苗与稳定剂混合例如以保护易于降解的多肽免受降解，从而延长疫苗的货架期 (shelf-life)，或提高冷冻干燥效率。有用的稳定剂特别是 SPGA (Bovarnik 等人; J. Bacteriology 59: 509 (1950))、糖类例如山梨糖醇、甘露醇、海藻糖、淀粉、蔗糖、葡聚糖或葡萄糖、蛋白例如白蛋白或酪蛋白或其降解产物，和缓冲剂例如碱金属磷酸盐。

此外，疫苗可悬浮在生理可接受的稀释剂中。不用说，其他佐剂化、添加载体化合物或稀释剂、乳化或稳定化多肽的方法也在本发明的范围之内。

非常合适地可以 1 至 100 微克范围内的量施用本发明的疫苗，尽管原则上可以使用更少量的剂量。超过 100 微克的剂量，尽管在免疫上非常合适，但出于商业原因较少有吸引力。

基于活的减毒的重组载体 (例如 LRC 病毒和上述细菌) 的疫苗可以低得多的剂量进行施用，因为在感染过程中其自身可增殖。因此，对于细菌和病毒非常合适的量分别在 10^3 至 10^9 CFU/PFU 范围之间。

可使用许多施用方式。经口施用是非常有吸引力的施用方式，因为感染是消化道的感染。在本领域已知的和经常使用的优选的经口施用方式是将疫苗装入胶囊中，所述胶囊只有在其通过胃的高度酸性的环境后解体。此外，还可将疫苗与本领域已知的化合物混合以临时增加胃的 pH 值。全身性施用例如通过疫苗的肌肉施用也是合适的。如果使用该途径，本领域已知的用于全身性施用的标准方法是合适的。

从抗疾病的保护性方面来看，快速而正确地诊断细胞内劳索尼亚菌是非常重要的。因此本发明的另一目的是提供适合用于细胞内劳索尼亚菌感染检测的诊断工具。

用于检测血清中细胞内劳索尼亚菌抗体的诊断检验法可以是例如简单的标准夹心 ELISA 检验法，在所述方法中用本发明的 26kD 蛋白或其抗原性片段包被 ELISA 板的孔壁。用于检测这些抗体的方法是通过例如用来自待测哺乳动物的血清温育 26kD 蛋白或其抗原性片段，接着用例如经标记的抗相关哺乳动物的抗体的抗体温育来进行的。然后

颜色反应可显示抗细胞内劳索尼亚菌的抗体的存在或不存在。诊断检验系统的另一例子是例如将包含本发明的 26kD 蛋白或其抗原性片段的 Western 印迹和待测哺乳动物的血清一起温育,接着进行印迹分析。

因此,本发明的另一实施方案涉及用于抗细胞内劳索尼亚菌的抗体的检测的诊断检验法。这些检验法包含本发明的蛋白或其片段。

基于细胞内劳索尼亚菌抗原的特定 26kD 蛋白的抗原性材料的检测从而适合用于细胞内劳索尼亚菌感染的检测的诊断检验法也可以是标准的 ELISA 检验法。在这样的检验法的一个实施例中,用抗 26kD 蛋白的抗体包被 ELISA 板的孔壁。在用待测材料温育后,向孔中加入经标记的抗细胞内劳索尼亚菌的抗体。然后颜色反应显示来自细胞内劳索尼亚菌的抗原性材料的存在。

因此,本发明的另一实施方案涉及用于细胞内劳索尼亚菌的抗原性材料的检测的诊断检验法。这些检验法包含抗本发明的蛋白或其片段的抗体。

可使用如上表征的表达的本发明的多肽或其免疫原性片段来生产抗体,所述抗体可以是多克隆的、单特异性的或单克隆的(或其衍生物)。如果多克隆抗体是想要的,用于生产和加工多克隆血清的技术在本领域是熟知的(例如 Mayer 和 Walter (编著) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Academic Press, London, 1987)。

可通过用本领域也已知的技术 (Kohler 和 Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975) 免疫近交小鼠来制备本发明的抗本发明的多肽(或其变体或片段)的单克隆抗体。

用于大规模生产本发明的抗体的方法在本领域也是已知的。这些方法依赖于编码本发明的蛋白的遗传信息(其片段)在用于噬菌体展示的丝状噬菌体中的克隆。特别在 <http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/aepphage.html> 上的“filamentous phage display”下的“Antibody Engineering Page”中和 Cortese, R. 等人, (1994) in *Trends Biotechn.* 12: 262-267.、Clackson, T. &

Wells, J. A. (1994) in Trends Biotechn. 12: 173-183、Marks, J. D. 等人, (1992) in J. Biol. Chem. 267:16007-16010、Winter, G. 等人, (1994) in Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 和 Little, M. 等人, (1994) Biotechn. Adv. 12: 539-555 的综述论文中描述了这些技术。随后使用噬菌体筛选表达骆驼 (camelid) 重链抗体的骆驼表达文库。(Muyldermans, S. 和 Lauwereys, M., Journ. Molec. Recogn. 12: 131-140 (1999) 和 Ghahroudi, M. A. 等人, FEBS Letters 414: 512-526 (1997))。可复制来自表达想要的抗体的文库的细胞, 然后将其用于抗体的大规模表达。

实施例

实施例 1:

来自经感染的猪回肠的细胞内劳索尼亚菌的分离

从患 PE 死亡的猪中收集经组织病理学和抗酸萋尼染色法 (acid-fast Ziehl-Neelsen staining) 确定的经细胞内劳索尼亚菌感染的回肠, 并在 -80°C 下贮存。解冻后, 从采自经感染的肠壁的粘膜刮取物中分离细胞内劳索尼亚菌。如 Lawson 等人 (Vet. Microbiol. 10: 303-323(1985)) 所描述的, 在通用均浆器中, 在 PBS 中对回肠刮取物反复进行匀浆以释放细胞内的细菌。将低速离心除去细胞碎片后获得的上清液通过 5.0、3.0、1.2 和 $0.8\mu\text{m}$ 过滤器 (Millipore) 进行过滤。然后将滤液在 8000 g 下离心 30 分钟, 产生细胞内劳索尼亚菌的小沉淀。使用 Percoll 梯度离心法进一步纯化这些细菌。通过 PCR 检测经纯化的细菌的身份 (Jones 等人, J. Clin. Microbiol. 31: 2611-2615(1993)), 同时通过相差显微镜评估细菌的纯度 ($>95\%$) 以显示任何污染性细菌或肠碎片的存在。

细菌株系和质粒

如上所述从经感染的回肠材料中分离细胞内劳索尼亚菌细胞。从 Novagen (Madison, Wisconsin, USA) 购买含有载体 pLysSrare 和质粒 pET22b 的大肠杆菌株系 BL21star (DE3)。大肠杆菌株系 TOP10F' 购

自 Invitrogen (Groningen, the Netherlands)。将所有细菌株系的原种（含有 30%甘油）在 -70°C 下贮存。根据标准的方法制备 Luria Bertani 液体培养基 (LB) 和 LB 平板。

DNA 分离

为了获得高度纯化的细胞内劳索尼亚菌染色体 DNA，使用 Biorad 染色体 DNA 分离试剂盒 (Biorad, Veenendaal, the Netherlands) 从细菌细胞中制备 DNA。使用 Qiagen 产物分离质粒 DNA。

PCR 扩增

使用含有 52U/ml Expand High Fidelity Enzyme Mix、具有 2.5 mM MgCl_2 、16 mM dNTPs (Promega, Wisconsin, USA) 的 Expand HF 缓冲液、20 皮摩尔的引物和 15 ng 作为模板的细胞内劳索尼亚菌的染色体 DNA 的 PCR 混合物进行 PCR 扩增。对于标准的应用（即菌落 PCR），PCR 混合物含有 20 U/ml Supertaq 和含有 8 mM dNTPs (Promega, Wisconsin, USA) 的 Supertaq 缓冲液 (HT Biotechnology Ltd, Cambridge, UK)、10 皮摩尔的引物和 15 ng 模板。

连接和转化

在 16°C 下、在 1x 连接缓冲中用 1 个单位的连接酶 (Gibco BRL Life Technologies Inc., USA) 进行连接过夜。通过热激法用 $1\mu\text{l}$ 的连接反应物转化大肠杆菌感受态细胞。使用标准的方法制备处于感受态的 BL21star (DE3) 大肠杆菌感受态细胞和 TOP10F' 大肠杆菌感受态细胞。

10xHIS 融合蛋白的表达

确定表达载体的 DNA 序列，然后将表达载体转化入含有 pLysSrare 的 BL21star (DE3)。将所得的株系在 37°C 、200rpm 下于 5ml 含有 $100\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 中培养过夜。在 50ml 含有 $100\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 中将过夜培养物按 1: 100 稀释。将该培养物在相同的条件下培养直至 OD_{600} 达到 0.5。用 IPTG 诱导培养物至 1mM 的终浓度并继续再培养 3 小时。取出 $100\mu\text{l}$ 样品进行分析。培养含有 pLysSrare 的大肠杆菌株系 BL21star (DE3) 并在相同的条件下进行诱导，获取样

品作为阴性对照。通过 SDS PAGE 电泳分析样品。

聚丙烯酰胺凝胶电泳和 western 印迹

使用 4-12% 来自 NuPAGE 电泳系统 (Invitrogen, www.invitrogen.com) 的 Bis-Tris 凝胶进行 SDS-PAGE。使用半干燥印迹方法进行 Western 印迹。使用鸡抗 Lawsonia 多克隆血清或使用猪血清对 Western 印迹进行显色, 所述鸡抗 Lawsonia 多克隆血清是针对乳浊液 (水: 油 = 45: 55) 中的完整细胞制剂产生的, 所述猪血清获自纯化细胞内劳索尼亚菌经口攻击并产生临床症状和细胞内劳索尼亚菌感染典型的死后 (post-mortem) 损伤的动物。在 4℃ 下, 使用等体积的来自含有载体 pLysSrare 的 BL21star (DE3) 的粗制细胞提取物预吸附血清 4 小时。

结果

细胞内劳索尼亚菌基因 5608 在基于 T7 的表达载体中的克隆

使用引物 2179 (CATGCCATGGATTTGATGGAACAGGATTAAAG) 和 2180 (CCGCTCGAGCCATAACCCCTTTTCGATAC) 扩增基因 5608。在该过程中将 5'NcoI 和 3' XhoI 位点引入 PCR 产物中。使用限制性酶 NcoI 和 XhoI 消化所获得的 PCR 产物。随后将消化的 PCR 产物连接至已用相同的两个限制性酶切割的 pET22b。将连接混合物转化大肠杆菌 TOP10F 并在 37℃ 温育过夜。使用集落 PCR 就正确的质粒检测假定的转化子。通过核苷酸序列分析检测集落 PCR 阳性转化子的质粒插入物。选择含有基于克隆策略预期的序列的克隆中的一个克隆并称之为 pET5608。

细胞内劳索尼亚菌基因 5608 在大肠杆菌中通过 T7 启动子的表达

将质粒 pET5608 转化入 BL21Star (DE3) pLysSrare。如上所述检测所得的菌株的重组蛋白产物。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析经诱导的培养物的样品和对照样品 (图 1A)。和未经诱导的样品 (图 1A, 泳道 2) 相比, 在经 3 小时的诱导后采集的样品 (图 1A, 泳道 3) 中观察到大约 26kDa 的清晰蛋白带。也使用猪和鸡血清通过 Western 印迹分析相同的样品。使用来自已用纯化的细胞内劳索尼亚菌细胞经口攻击的猪的血清 (图 1B, 泳道 3) 和鸡抗细胞内劳索尼亚菌的血清 (图

1C, 泳道 3) 观察到与蛋白 5608 的反应。

结论: 26kD 疫苗组分可成功地进行大量表达并且确实被经口攻击的猪抗细胞内劳索尼亚菌血清和鸡抗细胞内劳索尼亚菌血明显地识别。

附图说明

图 1. 通过 SDS-PAGE (A) 和使用多克隆猪血清 (B) 和多克隆鸡血清 (C) 的 Western 印迹对细胞内劳索尼亚菌基因 5608 在大肠杆菌 BL21 STAR/pLysSRARE 中的过量表达的分析。泳道 1, 分子量标记; 泳道 2, pET5608 T=0; 泳道 3, pET5608 T=3。箭头表示表达产物的位置。

<110> AKZO Nobel N.V.

<120> 细胞内劳索尼亚菌 26kD 亚单位疫苗

<130> 2003.023

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 856

<212> DNA

<213> 细胞内劳索尼亚菌 (Lawsonia intracellularis)

<220>

<221> CDS

<222> (80)..(823)

<400> 1

```

atggctataa gcgattgaat aacagaaaat aacacctatg cctgaaattt tcgacgcgtc      60
gaaattttta gaggaaacc atg aaa aaa cta ctc ctt ttg tta tct att ctg      112
                Met Lys Lys Leu Leu Leu Leu Ser Ile Leu
                  1              5              10

ttt cta acc cca agt att acc ttg gcg gaa ggt aat act ttc aat gat      160
Phe Leu Thr Pro Ser Ile Thr Leu Ala Glu Gly Asn Thr Phe Asn Asp
              15              20              25

agt ttc aac aag gct aag cgc ata ctg caa gat gag gtg tat tac gac      208
Ser Phe Asn Lys Ala Lys Arg Ile Leu Gln Asp Glu Val Tyr Tyr Asp
              30              35              40

cac caa gtt aca cta tac tgc gga tat gaa tat gat gac caa aaa agg      256
His Gln Val Thr Leu Tyr Cys Gly Tyr Glu Tyr Asp Asp Gln Lys Arg
              45              50              55

ata tgt ctc cct gat gga ttt ata gca gag aaa cat caa aaa aga tca      304
Ile Cys Leu Pro Asp Gly Phe Ile Ala Glu Lys His Gln Lys Arg Ser
              60              65              70              75

tat aaa att gag tgg gaa cat agt gtg cct gct gag aat ttt ggc aga      352
Tyr Lys Ile Glu Trp Glu His Ser Val Pro Ala Glu Asn Phe Gly Arg
              80              85              90

gct ttt act gaa tgg cgc gaa ggt cat cct ctt tgt gta gat aat aaa      400
Ala Phe Thr Glu Trp Arg Glu Gly His Pro Leu Cys Val Asp Asn Lys
              95              100              105

ggt aaa agt ttc aaa gga cga aaa tgt gca gaa aaa gta aat aaa aca      448
Gly Lys Ser Phe Lys Gly Arg Lys Cys Ala Glu Lys Val Asn Lys Thr
              110              115              120

tat aga tat atg cag tct gat atg tac aat ttg ttt cca gca gtc ggg      496
Tyr Arg Tyr Met Gln Ser Asp Met Tyr Asn Leu Phe Pro Ala Val Gly
              125              130              135

tct gtc aat gct gcg aga agc aat aag caa tac tca gag tta ctt gga      544
Ser Val Asn Ala Ala Arg Ser Asn Lys Gln Tyr Ser Glu Leu Leu Gly
              140              145              150              155

gtt caa tct gct ttt gga acg tgt gag gca aaa ata gat ggg aat aga      592
Val Gln Ser Ala Phe Gly Thr Cys Glu Ala Lys Ile Asp Gly Asn Arg
              160              165              170

```

```

ttc gaa cca ccg gat aga gct aaa ggt caa gta gcc cgt gct gct ctt      640
Phe Glu Pro Pro Asp Arg Ala Lys Gly Gln Val Ala Arg Ala Ala Leu
      175                      180                      185

tat atg gat aaa gag tac aag gaa tac aat cta agt cgt cag caa aga      688
Tyr Met Asp Lys Glu Tyr Lys Glu Tyr Asn Leu Ser Arg Gln Gln Arg
      190                      195                      200

aga ctt ttt gag gct tgg agt aat atg tat cca gtc gat gaa tgg gag      736
Arg Leu Phe Glu Ala Trp Ser Asn Met Tyr Pro Val Asp Glu Trp Glu
      205                      210                      215

tgt aca cga gcc aaa cga atc gaa tct ata cag gga aat gaa aat att      784
Cys Thr Arg Ala Lys Arg Ile Glu Ser Ile Gln Gly Asn Glu Asn Ile
      220                      225                      230                      235

ttt gta aaa aat atg tgt atc gaa aag ggg tta tgg taa acaaacgagg      833
Phe Val Lys Asn Met Cys Ile Glu Lys Gly Leu Trp
      240                      245

acaatataaa tactacctaa gta      856

<210> 2
<211> 247
<212> PRT
<213> 细胞内劳索尼亚菌

<400> 2

Met Lys Lys Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ile Leu Phe Leu Thr Pro Ser
1                      5                      10                      15

Ile Thr Leu Ala Glu Gly Asn Thr Phe Asn Asp Ser Phe Asn Lys Ala
      20                      25                      30

Lys Arg Ile Leu Gln Asp Glu Val Tyr Tyr Asp His Gln Val Thr Leu
      35                      40                      45

Tyr Cys Gly Tyr Glu Tyr Asp Asp Gln Lys Arg Ile Cys Leu Pro Asp
      50                      55                      60

Gly Phe Ile Ala Glu Lys His Gln Lys Arg Ser Tyr Lys Ile Glu Trp
65                      70                      75                      80

Glu His Ser Val Pro Ala Glu Asn Phe Gly Arg Ala Phe Thr Glu Trp
      85                      90                      95

Arg Glu Gly His Pro Leu Cys Val Asp Asn Lys Gly Lys Ser Phe Lys
      100                      105                      110

Gly Arg Lys Cys Ala Glu Lys Val Asn Lys Thr Tyr Arg Tyr Met Gln
      115                      120                      125

Ser Asp Met Tyr Asn Leu Phe Pro Ala Val Gly Ser Val Asn Ala Ala
      130                      135                      140

Arg Ser Asn Lys Gln Tyr Ser Glu Leu Leu Gly Val Gln Ser Ala Phe

```

145	150	155	160
Gly Thr Cys Glu Ala Lys Ile Asp Gly Asn Arg Phe Glu Pro Pro Asp			
	165	170	175
Arg Ala Lys Gly Gln Val Ala Arg Ala Ala Leu Tyr Met Asp Lys Glu			
	180	185	190
Tyr Lys Glu Tyr Asn Leu Ser Arg Gln Gln Arg Arg Leu Phe Glu Ala			
	195	200	205
Trp Ser Asn Met Tyr Pro Val Asp Glu Trp Glu Cys Thr Arg Ala Lys			
	210	215	220
Arg Ile Glu Ser Ile Gln Gly Asn Glu Asn Ile Phe Val Lys Asn Met			
	225	230	235
Cys Ile Glu Lys Gly Leu Trp			
	245		

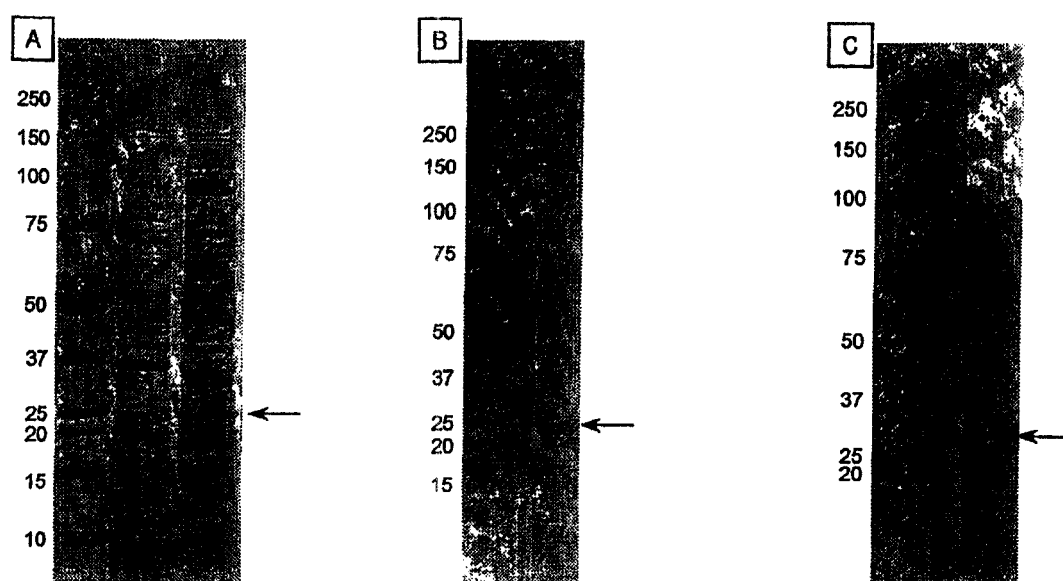


图1

专利名称(译)	细胞内劳索尼亚菌26kD亚单位疫苗		
公开(公告)号	CN101124241A	公开(公告)日	2008-02-13
申请号	CN200480036743.9	申请日	2004-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	英特维特国际股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	英特威国际有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	英特威国际有限公司		
[标]发明人	P沃梅吉		
发明人	P·沃梅吉		
IPC分类号	C07K14/28 C12N15/31 G01N33/53 A61K39/106 A61K39/00 C07K14/195		
CPC分类号	A61K39/00 C07K14/195 A61P31/04		
代理人(译)	赵艳华		
优先权	2003104603 2003-12-09 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明具体涉及编码新的细胞内劳索尼亚菌(*Lawsonia intracellularis*)蛋白的核酸。其还涉及包含这些序列的DNA片段、重组DNA分子和活的重组载体。其也涉及包含这些核酸、DNA片段、重组DNA分子和活的重组载体的宿主细胞。此外，本发明也涉及由这些核苷酸序列编码的蛋白和其在疫苗生产中的用途。本发明也涉及抗细胞内劳索尼亚菌感染的疫苗和其制备方法。最后本发明涉及用于细胞内劳索尼亚菌抗原和抗细胞内劳索尼亚菌的抗体的检测的诊断测定法。

