

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

A61K 39/39

A61K 39/245



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95193942.4

[43]公开日 1997年6月25日

[11] 公开号 CN 1152878A

[22]申请日 95.5.8

[30]优先权

[32]94.5.10 [33]US[31]08/240,373

[86]国际申请 PCT/US95/06053 95.5.8

[87]国际公布 WO95/30437 英 95.11.16

[85]进入国家阶段日期 97.1.2

[71]申请人 美国家用产品公司

地址 美国新泽西州

[72]发明人 H·-J·朱

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 经改良修饰的BRSV或疫苗

[57]摘要

本发明提供了经改良的 BRSV 疫苗组合物, 单次施用后可有利地提供抗感染的免疫力。所说组合物含有经修饰的 BRS 活病毒和佐剂, 单次施用后它们可联合提供抗 BRSV 感染的免疫力, 并产生特异于 BRSV 的免疫应答, 所述免疫应答包括细胞介导的免疫力和局部(分泌型 IgA)免疫力。在优选的实施方案中, BRS 病毒为 375 毒株, 佐剂含有不饱和的 turpin 烃, 优选为角鲨烯或角鲨烷, 以及聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物, 最优选的一种共聚物含有平均分子量约为 3250 至 4000 的聚氧丙烯 (POP) 成分, 其中聚氧乙烯 (POE) 成分占总分子的约 10—20%。佐剂可任意包括表面活性剂, 优选为聚氧乙烯山梨糖单油酸盐。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 用于免疫动物以抗牛呼吸道合胞病毒 (BRSV) 感染的疫苗组合物, 它含有

5 经修饰的 BRS 活病毒, 佐剂和药用载体, 以使此组合物在单次施用后可提供抗 BRSV 感染的免疫力并产生特异于 BRSV 的免疫应答, 所述免疫应答选自细胞介导的免疫力和局部 (分泌型 IgA) 免疫力。

2. 权利要求 1 的组合物, 其中佐剂含有聚氧丙烯 - 聚氧乙烯嵌段共聚物和不饱和的 turpin 烃。

10 3. 权利要求 2 的组合物, 其中不饱和的 turpin 烃是角鲨烯和角鲨烷中的一种, 共聚物具有平均分子量约为 3250 至 4000 的聚氧丙烯成分, 聚氧乙烯成分占总分子的约 10 - 20 %。

4. 权利要求 2 的组合物, 其中所含共聚物的最终浓度约为 0.01 至 1 % (v/v), 所含的烃成分的最终浓度约为 0.02 至 2 % (v/v)。

5. 权利要求 2 的组合物, 其中佐剂另外还含有表面活性剂。

15 6. 权利要求 4 的组合物, 其中佐剂也含有终浓度约为 0.0015 至 0.20 % (v/v) 的表面活性剂。

7. 权利要求 5 或 6 的组合物, 其中表面活性剂是聚氧乙烯山梨聚糖单油酸盐。

20 8. 权利要求 4 的组合物, 其中烃是角鲨烯和角鲨烷中的一种, 共聚物具有平均分子量约为 3250 至 4000 的聚氧丙烯成分, 聚氧乙烯成分占总分子的约 10 - 20 %。

9. 权利要求 1 - 9 中任一项的组合物, 它进一步含有牛鼻气管炎病毒 (BHV - IV), 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和副流感 3 型病毒 (PI - 3V)。

25 10. 用于免疫动物以抗牛呼吸道合胞病毒 (BRSV) 感染的疫苗组合物, 它含有

经修饰的 BRS 活病毒, 药用载体和含有聚氧丙烯 - 聚氧乙烯嵌段共聚物和不饱和 turpin 烃的佐剂, 以使此组合物在单次施用之后可提供抗 BRSV 感染的免疫力。

30 11. 权利要求 10 的组合物, 其中烃是角鲨烯和角鲨烷中的一种, 共聚物具有平均分子量约为 3250 至 4000 的聚氧丙烯成分, 聚氧乙烯成分

占总分子的约 10 - 20 %。

12. 权利要求 11 的组合物, 其中所存在的嵌段共聚物的最终浓度约为 0.01 至 1 % (v/v), 所存在的有机成分的最终浓度约为 0.02 至 2 % (v/v)。

5 13. 权利要求 12 的组合物, 其中佐剂另外还含有终浓度约为 0.0015 至 0.20 % (v/v) 的表面活性剂。

14. 权利要求 13 的组合物, 其中表面活性剂是聚氧乙烯山梨聚糖单油酸盐。

10 15. 权利要求 10 - 14 中任一项的组合物, 它进一步含有至少一种选自牛鼻气管炎病毒 (BHV - IV), 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和副流感 3 型病毒 (PI - 3V) 的经修饰的活病毒。

16. 保护动物以抗牛呼吸道合胞病毒 (BRSV) 引起的疾病的方法, 包括给所说动物施用免疫原性组合物的步骤, 所说组合物包括
15 经修饰的 BRS 活病毒, 佐剂, 药用载体, 以使此组合物在单次施用后可提供抗 BRSV 感染的免疫力并产生特异于 BRSV 的免疫应答, 所述免疫应答选自细胞介导的免疫力和局部 (分泌型 IgA) 免疫力。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所说病毒存在的范围为每毫升约 10^3 至 10^6 个感染单位。

20 18. 权利要求 16 的方法, 其中所说施用步骤包括肌肉、皮下、腹膜内、口服和鼻内施用中的一种。

19. 权利要求 16 的方法, 其中佐剂含有终浓度约为 0.01 至 1 % (v/v) 的聚氧丙烯 - 聚氧乙烯嵌段共聚物和终浓度约为 0.02 至 2 % (v/v) 的不饱和 turpin 烃。

25 20. 权利要求 19 的方法, 其中佐剂另外还含有终浓度约为 0.0015 至 0.20 % (v/v) 的非离子型表面活性剂。

21. 权利要求 20 的方法, 其中烃是角鲨烯和角鲨烷中的一种, 表面活性剂是聚氧乙烯山梨聚糖单油酸盐, 共聚物具有平均分子量约为 3250 至 4000 的聚氧丙烯成分, 聚氧乙烯成分占总分子的 10 - 20 %。

30 22. 权利要求 16 - 21 中任一项的方法, 进一步包括同时施用牛鼻气管炎病毒 (BHV - IV), 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和副流感 3 型病毒 (PI - 3V)。

说明书

经改良修饰的 BRSV 或疫苗

发明领域:

- 5 本发明涉及诱导抗牛呼吸道合胞病毒 (BRSV) 之保护性免疫力的改良方法, 具体地说, 涉及使用适于以单一剂量施予接受体动物之经修饰活疫苗的改良方法。

发明背景:

- 10 目前认为牛呼吸道合胞病毒 (BRSV) 是牛呼吸道疾病综合症 (BRDC) 重要的致病原。此病的特征为: 呼吸急促, 咳嗽、厌食、泪涕交流和体温上升。急性暴发此病时, 症状开始 48 小时内出现死亡。

BRSV 可感染包括乳牛在内的各年龄段的牛。据认为 BRSV 是一种最常见的小牛地方性肺炎病毒病原体, BRSV 还与刚断奶小牛的肺气肿病相关。因此需在牛和奶牛群中有效预防此病毒。

- 15 建立抗 BRSV 的保护性免疫力是有困难的。因为在一些其他病毒介导的疾病中, 抗 BRSV 的血清抗体水平并非必需与抗此病的保护作用相关。这种现象可反映出局部产生的抗 BRSV 的 IgA 之作用 (Kimman et al., J.Clin.Microbiol.25: 1097 - 1106, 1987), 和/或能对此病毒进行有效防御之细胞介导的免疫力的需求。由于母体中抗 BRSV 的抗体能
20 耗尽注射到体内的免疫原并有效地中和疫苗, 因此在乳牛中建立保护性免疫力遇到另外的阻碍。最终, 多次接种的不便和昂贵使得单一剂量的疫苗引人注目。因此本领域中需要能引起强有力的多方面免疫应答的单一剂量的 BRSV 疫苗制剂。

- 25 现有技术中 BRSV 疫苗的标准施用方案为二次剂量 (Stott et al., J. Hyg. Camb.93: 251 - 261, 1984; Thomas et al., 农业实践 (Agri-Practice) 5: 1986; and Syvrud et al., Vet.Med.83: 429 - 430, 1988; 兽医药物学和生物学 (Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals), Edition 8 1993/94, PP.484.740-741/956-960,982-983.)。如 Kucera 等人所述 (Agri-Practice, Vet.Med., Vol.78.October 1983, 30 PP.1599-1604, 1983), 单次实验性 BRSV 接种诱导的 BRSV 血清中和 (SN) 抗体效价水平相对较低, 而两次剂量的疫苗诱生了 1: 10 至 1:

320 的 SN 抗体效价。另外，在牧场试验过程中，对于明显暴露于 BRSV 的兽群而言，约 48 % 未接种的动物需要治疗呼吸道疾病，相比之下，以单剂量和双剂量接种的动物中分别有 27 % 和 21 % 的动物需要这种治疗。然而，牧场试验中呼吸道疾病的致病剂并不能确定为 BRSV，而且
5 值得注意的是单剂量疫苗并未显示出具有很强的免疫原性。从后一种评价中可得出结论，即此疫苗的两次剂量对于获得良好的保护作用是必不可少的（牛兽医论坛 1：NO.2 PP.2 - 16，1986；Syvrud. et al., 兽医医学 429 - 430，1988）。

欧洲专利申请 129,923（公开于 1985 年 2 月 1 日，作为专利登记于
10 1988 年 7 月 9 日）描述了一种制备 BRSV 活疫苗的方法，此方法包括将活疫苗溶解于经灭活的含有一种或多种抗原（尤其是灭活的流感病毒）的疫苗中，后者被配制成水包油乳剂。在仍具有母体免疫力的幼畜中得到了血清学反应。此申请还描述了包括 BRSV 和佐剂的经修饰的活制剂，然而却未提供有关任何 BRSV 疫苗抗 BRSV 攻击之保护效力的数据。

15 本发明的一个目的是提供抗 BRSV 的有效疫苗，它可诱生保护性免疫力并能防止由所说病毒引起的疾病。

本发明的另一个目的是提供适用于 BRSV 疫苗的佐剂，其中的佐剂增强病毒的免疫原性以使施用单剂量疫苗后能诱生保护性免疫力。

发明概述

20 本发明包含增强免疫应答的组合物，它含有嵌段共聚物，如聚氧丙烯-聚氧乙烯（POP - POE）嵌段共聚物，优选为 Pluronic[®] L121（例如美国专利 4,772,466），还含有有机成分，如可代谢的油类，如不饱和的 turpin 烃，优选角鲨烷（2,6,10,15,19,23 - 六甲基二十四烷）或角鲨烯。所述组合物也可包括非离子型洗涤剂或表面活性剂，优选聚氧乙烯山梨
25 聚糖单油酸酯，如 Tween[®] 洗涤剂，最优选 Tween[®] - 80，即聚氧乙烯（20）山梨聚糖单油酸盐。

在所说佐剂的贮存混合液中，嵌段共聚物、有机油类和表面活性剂的量
分别为约 10 至 40ml/L，约 20 至 80ml/L 和约 1.5 至 6.5ml/L。在佐剂贮存液的优选实施方案中，有机成分是角鲨烷，其量约为 40ml/L，
30 表面活性剂是聚氧乙烯山梨聚糖单油酸盐（Tween[®] - 80），其量约为 3.2ml/L，POP - POE 嵌段聚合物是 Pluronic[®] L121，其量约为 20ml/L

Pluronic® L121 在 15 - 40C 是液体共聚物，其中聚氧丙烯 (POP) 成分的分子量为 3250 至 4000，聚氧乙烯 (POE) 成分占总分子的约 10 - 20 %，优选占 10 %。

5 另一方面，本发明提供了一种用于免疫动物以抗牛呼吸道合胞病毒 (BRSV) 感染的免疫原性组合物，所述组合物含有经修饰的 BRS 活病毒，还含有上述佐剂和药物可接受的稳定剂，载体或稀释剂。疫苗组合物中存在的佐剂的最终浓度约为 1 - 25 % (v/v)，优选为 5 % (v/v)。此组合物也可包括其他病毒，如感染性的牛鼻气管炎病毒 (IBRV)、牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 和副流感病毒 3 型 (PI - 3V)，可通过
10 肌肉或皮下途径施用此组合物。

另一方面，本发明提供了通过施用单剂量的含有经修饰的活 BRSV 和佐剂的上述疫苗以保护动物使之抵抗由牛呼吸道合胞病毒引起的疾病的方法。

发明详述

15 本文引用的所有专利，专利申请和其他文献的全文都已引入本文作为参考，在不一致的情况下，优先考虑本文公开的内容。

本文所用的“经修饰的活疫苗”是这样一种疫苗，它含有的病毒典型地通过在组织培养细胞中传代培养已被改变，从而减弱了它导致疾病的能力，当将此疫苗施用给动物时，它仍保持有其抗疾病或感染的保护
20 能力。

“佐剂”是指含有一种或多种物质的组合物，所述物质当与疫苗组合物中的 BRSV 联合时可增强 BRSV 的免疫原性和效力。

BRSV 的“感染单位”被定义为 TCID₅₀，或感染或杀死 50 % 组织培养细胞所需的病毒量。

25 本发明提供了适于单剂量施用的抗 BRSV 的疫苗，此疫苗为经修饰的活病毒疫苗。所述疫苗具有保留病毒的免疫原性和/或效力而同时降低病毒之毒力的优点。

可使用本技术领域中的标准方法 (见下文实施例 1) 由新鲜收获的病毒培养物制备疫苗。即可在组织培养细胞如人二倍体成纤维细胞或优
30 选在 MDBK (Madin-Darby 牛肾) 细胞或其他牛细胞中增殖病毒者。使用标准技术 (观察细胞病变效应，免疫荧光或其他以抗体为基础的试验)

监控病毒的生长，当已获得足够高的病毒效价时即可收获病毒。在包含剂疫苗制剂中之前，通过常规方法将病毒贮液进一步浓缩或冻干。也可使用其他方法，如 Thomas 等人所述的方法（Agri-Practice、V.7 No.5, PP. 26-30）。

- 5 本发明的疫苗含有经修饰的活病毒以及一种或多种药物可接受的稳定剂、载体和佐剂。适于使用的载体包括盐水、磷酸盐缓冲的盐水，极限必需培养基（MEM）或含有 HEPES 缓冲液的 MEM。稳定剂包括但不限于蔗糖、明胶、蛋白胨、经消化的蛋白质提取物，如 NE - Amine 或 NE - Amine AS。尤其是，本发明包括可增强经修饰活病毒之免疫原性
10 性的佐剂，将此佐剂提供给单次施用可产生保护性免疫力。

非限制性的适当佐剂的例子包括角鲨烷和角鲨烯（或其他来源于动物的油类）；嵌段共聚物，如 Pluronic[®]（L121）皂苷；洗涤剂，如 Tween[®] - 80；Quil[®]A，矿物油（如 Drakeol[®]或 Marcol[®]）、植物油（如花生油）；衍生自棒状杆菌属的佐剂，如 corynebacterium parvum；衍生自丙酸杆菌属的佐剂，如痤疮丙酸杆菌；牛分枝杆菌（Bacillus Calmette 和
15 Guerinn，或 BGC）；白细胞介素，如白细胞介素 2 和白细胞介素 - 12；单核因子，如白细胞介素 1；肿瘤坏死因子；干扰素，如 γ 干扰素；如皂苷 - 氢氧化铝或 Quil[®]-A 氢氧化铝的联合；脂质体；iscom 佐剂；分枝杆菌细胞壁提取物；合成糖肽，如胞壁酰二肽或其他衍生物；Avridine；
20 脂质 A；硫酸葡聚糖；DEAE - 葡聚糖或含有磷酸铝的 DEAE - 葡聚糖；羟基聚亚甲基，如 Carbopol[®]；EMA；丙烯酸酯类共聚物乳剂，如 Neocryl[®]A640（如美国专利 5,047,238）；痘苗或动物痘病毒蛋白质；亚病毒粒子佐剂，如环状病毒；霍乱毒素；dimethyldioledecylammonium bromide 或它们的混合物。

- 25 下文实施例 2 中描述了优选的佐剂混合物的配制。

优选经肌内或皮下途径施用本发明的疫苗，或次优选经鼻内，腹膜内或口服途径施用所述疫苗。

对单剂量施用而言，疫苗应含有相当于约 $10^{3.0}$ 至 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml，
30 优选为 10^4 至 10^5 TCID₅₀/ml 的 BRSV 量。经肌内，皮下或腹膜内途径给每只动物施用药 1 至 5ml，优选为 2ml 疫苗。经口服或鼻内途径施用 1 至 10ml，优选为 2 至 5ml 疫苗。

下列实施例意在进一步阐明本发明而不是限制本发明的范围。

实施例 1: BRSV 的培养和收获

5 A) 病毒贮存液的描述: BRSV 可得自任何容易利用的来源。在一个实施方案中, 使用了 BRSV 毒株 375。此 BRSV 强毒株源于衣阿华州立大学, Ames Iowa。本发明中可考虑并包括任何适当的 BRSV 毒株。类似地, BHV - 1, BVDV 和 PI - 3V 都是容易利用的病毒。当这些病毒以强毒株的形式被获得时, 应用已知的方法将它们减毒以提供适用于疫苗的经修饰的活病毒。也可用常规方法杀死所述病毒以提供适用于疫苗的灭活病毒。减毒或灭活病毒以供疫苗使用的方法是众所周知的。经
10 修饰的活的和/或杀死的 BRSV, BHV - 1, BVDV 和 PI - 3V 病毒疫苗是已知的并可从商业途径获得。例见 Thomas, et al., 文献同上, 和 Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals, 文献同上 和 Appendix 2, A - 31 - 45。

15 B) 细胞培养: 不含 BVD 的 MDBK (NBL - 1) 细胞系购自美国典型培养物保藏中心。将此细胞系维持在 Opti MEM (Gibco, Grand Island, NY) 中, 其中添加了达 10 % (v/v) 的牛血清, 达 0.5 % 的水解乳清蛋白 (JRH, Lenexa, KS), 达 30mcg/ml 的多粘菌素 B (Pfizer, NY, NY) 和新霉素 (Upjohn, Kalamazoo, MI) 和达 2.5mcg/ml 的两性霉素 B (Sigma Chemical Co., St.Louis MO)。当需要维持
20 细胞生长时还可加入丙酮酸钠, 碳酸氢钠, 葡萄糖, L - 谷氨酸酰胺和氯化钙。

为了增殖病毒, 可在 Opti MEM、Eagle's MEM、Medium 199 或等效培养基中添加达 2 % 的牛血清, 达 0.5 % 的牛血清白蛋白, 达 0.5 % 的水解乳清蛋白, 达 30mcg/ml 的多粘菌素 B 和新霉素, 达 2.5mcg/ml
25 的两性霉素 B。当需要维持细胞生长时还可加入丙酮酸钠, 碳酸氢钠, 葡萄糖, L - 谷氨酸酰胺和氯化钠。

C) 接种培养物: 以每个细胞 1: 5 至 1: 5000 感染单体的感染复数, 用 BRSV, BVDV, PI - 3V 或 BHV - IV 接种 MDBK 细胞的单个区汇合培养物。弃去细胞的生长培养基, 用病毒增殖培养基 (见上文)
30 取代之, 然后在培养容器中直接加入种病毒, 在 36 °C 下维持受病毒感染的培养物。

通过用显微镜检查细胞病变效应或通过荧光抗体染色来测定病毒的生长。对 BRSV 而言，受感染的细胞形成了合胞体和拉长的纺锤形细胞，它们是渐进产生的直至实质上已涉及整个细胞层。对 BHV - IV 而言，受感染的细胞表现为胞质，随后变成圆球形和/或气球形。对 BVDV 而言，受感染的细胞形成了细胞内空泡，聚拢，并剩下不含细胞的约束 (Circumscribed) 区。受 PI - 3V 感染的细胞中的细胞病变的变化与受 BHV - IV 感染的细胞中的类似。

5 D) 收获病毒: 将培养液收集致无菌容器中，当 50 % 的细胞层表现出特征性的细胞病变，并持续到直至 100 % 的细胞受影响时，可开始多次收获。可通过离心或过滤澄清病毒液，也可以不澄清。在 - 50 °C 或更低的温度下贮存病毒液，或冻干之并在 2 至 8°C 下贮存。

为了制备最终的疫苗，可将病毒贮存液或单独或联合地与佐剂相混合。

15 当使用液体病毒贮存液时，将 19 份病毒贮存液与 1 份佐剂，优选为实施例 2 的佐剂相混合。当使用冻干的病毒贮存液时，可在盐水中制备稀释至 5 % (V/V) 的佐剂溶液 (将 1 份佐剂与 19 份盐水相混合)。用经稀释的佐剂重构 (重新水合) 冻干的病毒贮存液以形成最终的疫苗组合物。在最终的制剂中加入乙基汞硫代水杨酸钠 (thimerisol) 至终浓度为 1 : 10,000。

20 实施例 2: 优选的佐剂贮液的配方

按下列配方制备用于本发明的优选佐剂

聚氧丙烯 - 聚氧乙烯嵌段共聚物

(如 Pluronic[®] L121, BASF, Parsippany, NJ) 20ml

角鲨烷 (如 Kodak, Rochester, NY) 40ml

25 聚氧乙烯山梨聚糖单油酸盐

(如 Tween[®] - 80, Sigma Chemical, St.Louis.MO) 3.2ml

缓冲盐水溶液

(如 D - V PAS 溶液, 无 Ca, Mg) 936.8ml

30 将上述成分混合并匀浆直至形成稳定的物质或乳剂。在匀浆之前，可将上述成分或混合物高压灭菌。通过过滤能进一步将乳剂灭菌。加入福尔马林至终浓度为 0.2 %。加入乙基汞硫代水杨酸钠至最终稀释度为

1: 10,000。

实施例 3: 经修饰的 BRSV 活疫苗的增强作用

针对此项研究, 制备了两种 BRSV 疫苗, 一种含有实施例 2 所述的佐剂混合物, 一种不含。不含佐剂的疫苗每 2ml 中含有 2.52 个 BRSV log 感染单位, 而含佐剂的疫苗每 2ml 中含有 2.96 个 BRSV log 感染单位, 并含有 5% (v/v) 佐剂。

二十头牛中的每一头都接受了 2ml 剂量的不含佐剂的疫苗, 十头为肌肉施用, 十头为皮下施用。另外 5 头牛接受了 2ml 剂量的含佐剂的疫苗。在第 21 天, 重复所有的接种过程。第二次接种后的第 6 天采得血清样品, 并检测抗 - BRSV 血清中和抗体的存在。实施例 4 中描述了血清中和抗体的检测方法。

此项研究的结果表明, 接种了含佐剂 BRSV 疫苗的 5 头牛中 4 头显示出抗 - BRSV 抗体的存在 (血清转换), 而接种了无佐剂之 BRSV 疫苗的 20 头动物中没有一头显示出抗体的存在。这表明实施例 2 中所述的佐剂具有增强经修饰的 BRSV 活疫苗之免疫原性的特性。

实施例 4: 单剂量施用经改良的 BRSV 疫苗

为了确定单剂量免疫接种与佐剂配制在一起的经修饰的活的牛呼吸道合胞病毒 (BRSV) 是否能诱导牛体内保护性免疫力, 可进行下列接种和攻击研究。此外还可设计研究确定同时施用经修饰的活的牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 牛疱疹病毒 1 型 (BHV - 1 或 IBRV) 和牛副流感病毒 PI3 是否会干扰对 BRSV 保护性免疫力的诱导。

A) 实验疫苗: 在主细胞贮存传代 20 次的 Madin Darby 牛肾 (MDBK) 细胞上培养在主毒种之上已传代 5 次的经修饰活的牛呼吸道合胞病毒 (BRSV)。简单地说, 在 850cm² 摇瓶中的极限必需培养基 (MEM) 中以 3×10^7 细胞/摇瓶的密度植入 MDBK 细胞, 所述 MEM 中含有 5% 牛血清, 0.5% LAH、和 30ug/ml 庆大霉素。用病毒感染前, 在 37 °C 下将细胞培养 2 天。从摇瓶中倾析培养基, 在每只摇瓶 100ml 病毒增殖培养基 (含有 2% 牛血清, 0.5% LAH 和 30ug/ml 庆大霉素的 MEM) 中以 1: 600 的感染复数加入病毒。感染 7 天后, 呈现出 100% 的细胞病变, 收集上清液。用 25% (v/v) SGGK3 稳定剂稳定病毒并冻干。在接种的当天, 用稀释于盐水稀释剂中的 5% (v/v) 佐剂重新配

制冻干的病毒(见实施例2)。将重新配制的 BRSV 病毒与 PI3、BVDV 和 BHV - 1 病毒联合。通过接种当天的重复滴定检测疫苗中每个成分的效价。

5 B) 所用的实验动物: 此项研究使用了总共 30 头牛。在接种当天试验动物的血清中和 (SN) 抗体效价 < 2, 在攻击当天对照动物的 SN 抗体效价 < 2, 这表明这些牛对 BRSV 敏感。在户外圈养动物, 牛圈三面遮蔽出口朝向南面。攻击前将对照动物与需接种的动物分开圈养以避免前者接触疫苗病毒。每天提供一次完全的配食, 任意提供干草和水。

10 C) 接种: 给每个接种牛施用一次 2ml 体积的联合疫苗。接种 20 头动物 (10 头经皮下途径, 10 头经肌内途径), 留 10 头动物不接种并用作攻击对照。

D) 实验性攻击: 接种后 14 天用强毒力的 BRSV 病毒攻击动物。连续 3 天经气雾攻击给每头牛施用最低为 $10^{5.7}$ TCID₅₀ 的强毒力 BRSV 病毒。

15 E) 临床观察: 攻击后 2 至 14 天每天观察牛的临床疾病体征和是否发烧 (直肠温度)。观察牛的 BRSV 感染体征, 包括但不限于鼻和眼的液体排出, 结膜炎、咳嗽、呼吸困难、厌食和机能降低。在整个观察期每天记录直肠温度。

F) 测定:

20 1. 血清中和抗体测定 (SN)

在使用 100 至 500 TCID₅₀ BRSV 的变化的血清恒定 (Constant) 病毒中和试验中, 将系列稀释的热灭活血清与等体积的病毒悬浮液混合。在 37 °C 下将血清病毒混合物保温 1 小时, 然后接种到 96 孔微量滴定板上的 VERO 细胞上。经细胞病变效应检测不到病毒的存在, 这表明 SN 抗体效价的存在。为测定 SN 抗体效价, 可根据 Reed 和 Muench 的方法
25 计算 50 % 中和作用的终点。

2. 在最终稀释的疫苗中滴定病毒

在接种当天通过重复滴定测定疫苗中 BRSV 病毒的效价, 简单地说, 可将联合疫苗与适当的中和抗血清联合。在 37 °C 下将疫苗和抗血清
30 混合物保温 45 至 60 分钟, 制备疫苗的系列稀释液和抗血清并接种到 VERO 细胞上, 细胞病变效应的存在可表示病毒的存在, 特异性免疫荧

光术 (FA) 可确证病毒的存在, 用 Reed 和 Muench 的方法计算每次重复样品的病毒效价, 疫苗中 BRSV 成分的平均效价为 $10^{3.4}$ TCID₅₀/剂量。

3. 攻击病毒的滴定

系列稀释需施用的 BRSV 攻击病毒并接种到 96 孔微量滴定板中的 MDBK 细胞上。如病毒分离中描述的, 细胞病变效应的存在可表示病毒的存在, 特异性免疫荧光术可确证病毒的存在。

为了阐明结果, 按下述确定临床评分:

	临床体征	分数/观察
	流鼻涕	
10	严重浆液	2
	轻微粘液脓性的	2
	中度粘液脓性的	3
	严重粘液脓性的	4
	流眼泪	
15	严重浆液	1
	轻微粘液脓性的	2
	中度粘液脓性的	3
	严重粘液脓性的	4
	结膜炎	2
20	咳嗽	2
	呼吸困难	2
	厌食	1
	鼻粘膜充血和发红	1
	发烧 (必须超过基线至少 1 F)	
25	103.5 至 103.9 F	1
	104.0 至 104.9 F	2
	105.0 至 105.9 F	3
	> 106.0 F	4

对在户外圈养的牛而言, 中度浆液性的鼻或眼中的液体排出被认为是正常现象。仅当体温高于基线体温至少 1 度时, 才被认为表现为发烧。基线体温被确定为攻击当天之前每头动物每天的平均体温。

将每头动物的总临床分数相加，通过 Mann Whitney Ranked Sum 分析比较接种动物和对照动物的临床分数。

5 攻击后 5 至 10 天，观察对照牛的疾病临床体征（表 1）。在很多天中观察到所有对照动物（100%）都具有呼吸道疾病的体征。呼吸道疾病的特殊体征包括严重浆液性鼻涕的排出（液体实际上由鼻孔滴下），粘液脓性鼻涕的排出，流眼泪和咳嗽。对照牛的平均临床分数为 3.7。

10 通过比较，在经接种的动物中呼吸道体征不那么普遍。仅 40% 的经接种动物具有呼吸道疾病的任何体征，仅 2 只动物（10%）在许多天中有临床体征。经接种组的平均临床分数为 1.0，通过 Mann Whitney Ranked Sum 分析将接种动物与对照动物相比较，前者的临床疾病在统计学上有明显的降低（ $P < 0.05$ ）。

这些数据表明单剂量施用根据本发明的经佐剂修饰的 BRSV 活病毒疫苗可提供抗强毒力 BRSV 攻击的保护作用。甚至当其他疫苗与 BRSV 疫苗同时施用，此疫苗和方法也有效。

15 因此，本发明提供了一种用于免疫动物以抗牛呼吸道合胞病毒（BRSV）感染的疫苗组合物。所述疫苗含有经修饰的 NRS 活病毒，佐剂、和药学上可接受的载体，以使这种联合在单次施用之后可提供抗 BRSV 感染的免疫力并产生特异于 BRSV 的免疫应答，所述免疫应答选自细胞介导的免疫力和局部（分泌型 IgA）免疫力。

20 细胞介导的免疫力包括刺激 T - 辅助细胞，T - 杀伤细胞和 T - 延迟型超敏反应细胞以及刺激巨噬细胞，单核细胞和其他淋巴因子和干扰素的产生。通过常规的体外和体内试验可测定细胞介导的免疫力的存在。通过常规的可显示出 1 - 2 或更高的血清中和抗体效价的 ELISA 或 IFA 试验可测定局部免疫力，如分泌型的 IgA。根据本发明，结果产生
25 的细胞介导的或局部的免疫力对于有特异性 BRSV 或与 BRSV 相关。