



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103533958 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201180065699. 4  
(22) 申请日 2011. 11. 21  
(30) 优先权数据  
61/416, 667 2010. 11. 23 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2013. 07. 22  
(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2011/061708 2011. 11. 21  
(87) PCT国际申请的公布数据  
W02012/071346 EN 2012. 05. 31  
(73) 专利权人 潘瑟里克公司  
地址 美国科罗拉多州  
(72) 发明人 蒂莫西·W·斯塔兹尔  
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227  
代理人 彭鲲鹏 郑斌  
(51) Int. Cl.  
A61K 39/395(2006. 01)  
(56) 对比文件  
US 4748018 A, 1988. 05. 31,

US 4341763 A, 1982. 07. 27,  
US 2009142377 A1, 2009. 06. 04,  
US 2009317421 A1, 2009. 12. 24,  
Playford et al. Colostrum and  
milk-derived peptide growth factors for the  
treatment of gastrointestinal disorders. 《Am  
J Clin Nutr》. 2000, 第 72 卷 (第 1 期),  
审查员 吴希哲

权利要求书3页 说明书36页 附图9页

(54) 发明名称

用于在广谱、未分化或混合临床应用中治疗的组合物和方法

(57) 摘要

本公开提供了用于被动免疫的改进组合物和方法。在实施方案中, 提供了包含在载体基质中的特异性多克隆抗体的协同组合的组合物。本公开提供了用于在广谱、未分化或混合临床应用中治疗腹泻和肠道感染的有效的经济性组合物和方法。

1. 一种组合物,其包含:

a) 非新生人有效量的至少一种从动物获得并且特异性地与抗原结合的特异性结合分子或其片段,其中所述特异性结合分子选自免疫球蛋白、抗体、它们的片段或它们的混合物,其中所述抗原来源于肠或胃肠道病原体、病原体相关毒素、病原体相关粘附元件、不期望的菌株,或它们的组合;以及,

b) 载体基质,所述载体基质包含获自、分离自或来源于初乳的基质,其包含至少两种从非人动物获得的选自由以下组成的组的组分:酶、乳铁蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白、细胞因子、白血细胞、补体组分、干扰素,和纤连蛋白,

其中所述至少一种特异性结合分子和所述载体基质的所述至少两种组分从不同动物获得,以及

其中所述有效量是对于治疗或预防未分化腹泻、未分化小儿腹泻、旅行者腹泻、轮状病毒腹泻、毒素介导的腹泻、霍乱、艰难梭菌感染、痢疾、伤寒热、消化性溃疡有效,或对于管理胃肠道菌群有效的量。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述载体基质包含初乳。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的组合物,其中所述载体基质的所述至少两种组分选自由以下组成的组:溶菌酶、磷脂酶、防卫素、调理素、富含脯氨酸的多肽 (PRP)、 $\beta$ -溶素、白介素、趋化因子、TNF- $\alpha$ 、白细胞、吞噬细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞 (NK)、淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK)、弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G、髓过氧化物酶、NADPH 氧化酶,及它们的组合。

4. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述病原体包含人或兽的引起胃肠炎的肠或胃肠道病原体。

5. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述病原体选自由以下组成的组:空肠弯曲杆菌、沙门氏菌属、肠道血清型伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、类志贺邻单胞菌、大肠埃希氏菌、肠致病性大肠埃希氏菌、产肠毒素大肠埃希氏菌、肠聚集性大肠埃希氏菌、肠侵袭性大肠埃希氏菌、出血性大肠埃希氏菌、艰难梭菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、霍乱弧菌 01、弧菌 0139、非-01 弧菌、副溶血性弧菌、嗜水气单胞菌、产气荚膜梭菌、肠肝螺杆菌、幽门螺杆菌、金黄色葡萄球菌、克雷伯氏菌属、加德纳菌属某些种、淋病奈瑟氏菌、沙眼衣原体、支原体属某些种、空肠弯曲杆菌、阴道滴虫、1 型疱疹病毒、2 型疱疹病毒、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌和克柔念珠菌、A 组链球菌属某些种、轮状病毒、冠状病毒、诺罗病毒、杯状病毒、肠道腺病毒、巨细胞病毒、星状病毒、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、淋病奈瑟氏菌、带状疱疹病毒、镰刀菌属某些种,及棘阿米巴属某些种。

6. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述病原体相关毒素包含内毒素或外毒素。

7. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述病原体相关粘附元件包含粘附素、钙粘素、纤毛、伞毛、病毒粘附结构,或它们的组合。

8. 根据权利要求 1 至 7 中的任一项所述的组合物,其中所述组合物包含对于治疗或预防未分化腹泻、旅行者腹泻、轮状病毒腹泻、毒素介导的腹泻、霍乱、伤寒热有效,或对于管理胃肠道菌群有效的量。

9. 根据权利要求 8 所述的组合物,其中所述未分化腹泻是小儿未分化腹泻。

10. 根据权利要求 1 至 9 中的任一项所述的组合物,其中所述组合物包含对于赋予受试者被动免疫力有效的量。

11. 根据权利要求 1 至 10 中的任一项所述的组合物,其中所述特异性结合分子为抗体。

12. 根据权利要求 11 所述的组合物,其中所述抗体选自多克隆抗体或单克隆抗体。

13. 根据权利要求 11 或 12 所述的组合物,其中所述抗体为 IgY。

14. 根据权利要求 11 至 13 中的任一项所述的组合物,其中所述抗体为多克隆抗体。

15. 根据权利要求 1 至 14 中的任一项所述的组合物,其中所述载体基质为初乳。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物,其中所述初乳为非超免疫牛初乳。

17. 根据权利要求 15 或权利要求 16 所述的组合物,其中所述初乳为干燥全脂牛初乳。

18. 根据权利要求 1 至 17 中的任一项所述的组合物,其中所述特异性结合分子为固体形式。

19. 根据权利要求 1 至 18 中的任一项所述的组合物,其中所述载体基质为固体形式。

20. 根据权利要求 1 至 19 中的任一项所述的组合物,其进一步包含药学上可接受的稀释剂、粘合剂、赋形剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、润湿剂,或吸收剂。

21. 一种制备根据权利要求 1 至 20 中的任一项所述的组合物的方法,其包括

(a) 从动物获取至少一种与特异性抗原结合的特异性结合分子或其片段,其中所述特异性结合分子选自免疫球蛋白、抗体、它们的片段或它们的混合物,其中所述特异性抗原包含人或兽的肠或胃肠道病原体、病原体相关毒素、病原体相关粘附元件、不期望的菌株,或它们的组合;

(b) 获取至少一种载体基质,所述载体基质包含获自、分离自或来源于初乳的基质,其包含至少两种从非人动物获得的选自由以下组成的组的组分:酶、乳铁蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白、细胞因子、白血细胞、补体组分、干扰素,和纤连蛋白,其中所述至少一种特异性结合分子和所述载体基质的所述至少两种组分从不同动物获得;

(c) 制备所述载体基质的固体形式及所述特异性结合分子或其片段的固体形式;以及

(d) 将所述载体基质的所述固体形式与所述特异性结合分子或其片段的所述固体形式混合。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述特异性结合分子或其片段含有非新生人有效量的所述特异性结合分子或其片段。

23. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中所述基质包含初乳。

24. 根据权利要求 21 至 23 中的任一项所述的方法,其中所述基质包含由非超免疫牛初乳组成的基质。

25. 根据权利要求 21 至 24 中的任一项所述的方法,其中所述初乳是全脂牛初乳。

26. 根据权利要求 21 至 25 中的任一项所述的方法,其中所述载体基质的所述至少两种组分选自由以下组成的组:溶菌酶、磷脂酶、防卫素、调理素、富含脯氨酸的多肽 (PRP)、 $\beta$ -溶素、白介素、趋化因子、TNF- $\alpha$ 、白细胞、白血细胞、吞噬细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞 (NK)、淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK)、弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G、髓过氧化物酶、NADPH 氧化酶,及它们的组合。

27. 根据权利要求 1 至 20 中的任一项所述的组合物,其用于管理哺乳动物中的微生物

的病原菌株或不期望菌株。

28. 根据权利要求 27 所述的组合物,其中所述哺乳动物为人。

29. 根据权利要求 28 所述的组合物,其中所述人不是新生儿。

30. 根据权利要求 27 至 29 中的任一项所述的组合物,其中所述病原微生物选自由以下组成的组:空肠弯曲杆菌、沙门氏菌属、肠道血清型伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、类志贺邻单胞菌、大肠埃希氏菌、肠致病性大肠埃希氏菌、产肠毒素大肠埃希氏菌、肠聚集性大肠埃希氏菌、肠侵袭性大肠埃希氏菌、出血性大肠埃希氏菌、艰难梭菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、霍乱弧菌 01、弧菌 0139、非-01 弧菌、副溶血性弧菌、嗜水气单胞菌、产气荚膜梭菌、肠肝螺杆菌、幽门螺杆菌、金黄色葡萄球菌、克雷伯氏菌属、加德纳菌属某些种、淋病奈瑟氏菌、沙眼衣原体、支原体属某些种、空肠弯曲杆菌、阴道滴虫、1 型疱疹病毒、2 型疱疹病毒、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌和克柔念珠菌、A 组链球菌属某些种、轮状病毒、冠状病毒、诺罗病毒、杯状病毒、肠道腺病毒、巨细胞病毒、星状病毒、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、淋病奈瑟氏菌、带状疱疹病毒、镰刀菌属某些种,及棘阿米巴属某些种。

31. 根据权利要求 1 至 20 中的任一项所述的组合物,其可用作用于施用给有相应需要的受试者的营养组合物,其中所述受试者患有导致特殊饮食需要的疾病,其中所述疾病选自由以下组成的组:小儿腹泻、克罗恩氏病和溃疡性结肠炎。

## 用于在广谱、未分化或混合临床应用中治疗的组合物和方法

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请以除美国以外的所有指定国家的申请人美国公司 PanTheryx, Inc, 及美国居民 Timothy W. Starzl 的名义在 2011 年 11 月 21 日作为 PCT 国际专利申请提交, 并且要求 2010 年 11 月 23 日提交的美国临时申请第 61/416, 667 号的优先权, 该临时申请以引用的方式完整地并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开提供了用于被动免疫的组合物和方法。在实施方案中, 提供了包含特异性多克隆抗体与载体基质的协同组合的组合物。本公开提供了用于在广谱、未分化或混合临床应用中治疗病原感染的有效且经济的组合物和方法。在一个实施方案中, 提供了用于治疗腹泻和肠道感染的组合物和方法。

[0004] 发明背景

[0005] 抗体、免疫球蛋白和其他生物免疫因子 (这里统称为抗体), 无论是天然存在的还是它们的合成类似物, 都是人和动物的已知治疗剂。抗体通过结合 (经由非共价力) 在抗体上的抗原结合位点与称为抗原决定簇或表位的抗原的一部分之间而起作用。抗体能够具有高度特异性。例如, 在生产的推动下, 单克隆抗体领域已大量开发出特异性和精确性越来越高的结合特性。然而, 这种高特异性可导致过度受限的结合属性, 其中功能上相同的因子或抗原不与免疫试剂或免疫治疗剂相同地反应。另一方面, 通常被认为在获得结合特异性上发生错误或失败的交叉反应性是抗原与针对相似但不同抗原产生的抗体之间的反应。受控制的交叉反应性可建设性地用来扩宽抗体的结合范围。

[0006] 在哺乳动物中初乳已自然演变, 专门为了向胃肠道并通过胃肠道以非常浓缩的低体积形式递送其组分至新生儿。已知初乳含有诸如 IgA、IgG, 和 IgM 的抗体。初乳的其他组分包括乳铁蛋白、溶菌酶、乳过氧化物酶、补体, 和富含脯氨酸的多肽 (PRP)。还在初乳中发现许多细胞因子 (控制免疫系统的运作的小信使肽), 包括白介素、肿瘤坏死因子、趋化因子, 及其他。初乳还含有许多生长因子, 如胰岛素样生长因子 I 和 II, 转化生长因子  $\alpha$ 、 $\beta$  1 和  $\beta$  2, 成纤维细胞生长因子, 表皮生长因子, 粒细胞 - 巨噬细胞刺激生长因子, 血小板源性生长因子, 血管内皮生长因子, 及集落刺激因子 -1。

[0007] 初乳中的抗体和辅因子可通过母乳喂养给接受者提供被动免疫力。抗体和辅因子通常从母体被传递至新生儿, 并提供对抗病原体的第一层保护。生长因子还刺激肠道的发育和修复。

[0008] 一种可通过使用被动免疫力根治的病状为腹泻。腹泻主要由摄入的病原体引起。根据世界卫生组织 (WHO), 全球 88% 的腹泻病例可归因于不安全的水、卫生设施不足或不够卫生。这些病例导致每年约 150 万人死亡, 大多数是儿童死亡。(Pruss-Urstun 等人, Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote world health. World Health Organization, Geneva, 2008.

ISBN9789241596435)。

[0009] 全球特别关注的是发展中国家的感染性腹泻情况,其是尤其儿科人群的巨大的持续的发病率和死亡率的原因。例如,根据 2009 年联合国人类发展报告 (United Nations Human Development report),印度是世界上婴儿死亡率最高的国家之一。例如,全球性非营利性组织救助儿童会 (Save the Children) 报告印度每 15 秒就有一名儿童死亡,并且这些死亡的 90%是由诸如腹泻的可预防疾病引起。WHO 推荐通过使用轮状病毒疫苗和麻疹疫苗、用肥皂洗手、改善饮用水供应和全社区卫生来预防腹泻;然而,这些措施不能有效地治疗该疾病。

[0010] 在世界许多地方,小儿腹泻的标准治疗方案包括抗生素与口服补液疗法的合并施用。出于许多原因,抗生素是处方药。抗生素在病毒感染的治疗上无效。例如,估计轮状病毒导致全球五岁以下儿童中所有因腹泻入院的病例的约 40% (Weekly Epidemiological Record, vol. 83, no. 47, 2008 年 11 月 21 日)。抗生素使用不当可促进细菌耐药菌株。相反,感染可能由耐药的细菌菌株引起。甚至在最好的情况下,合适的抗生素的使用也可能需要数天来减轻腹泻症状的严重程度。

[0011] 抗生素的另一个缺点是,施用可导致存在于胃肠道中的病原细菌和良性细菌都遭到破坏,这可进一步导致内毒素脂多糖的释放。(Holzheimer, The significance of endotoxin release in experimental and clinical sepsis in surgical patients--evidence for antibiotic-induced endotoxin release? Infection. 1998Mar-Apr;26(2):77-84)。这些内毒素具有许多不良的全身作用,包括发热、白细胞计数的变化、弥散性血管内凝血、低血压、休克和死亡、吸收不良;事实上,相当小剂量内毒素的直接注射也会导致大多数哺乳动物死亡。Todar K. Bacterial Endotoxin. Textbook of Bacteriology. 2008. textbookofbacteriology.net。

[0012] 根据 WHO,推荐将口服补液疗法和锌与包括母乳喂养在内的持续喂养一起用于治疗儿童腹泻。锌糖浆或加锌口服补液溶液 (ORS, 40mg/L) 通常以每天约 15mg 至 30mg 的剂量使用。锌廉价,但功效不太高。锌糖浆仅导致急性腹泻的持续时间减少 25%,以及治疗失败或死亡减少 40%。(Bhutta 等人 Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. The American Journal of Clinical Nutrition. 2000; 72(6):1516-22)。一项研究评价加锌 (40mg/L) ORS 在 1,219 名患有急性腹泻的儿童中的功效和安全性。与仅接受标准 ORS 的对照组的临床结果相比,加锌 ORS 组的临床结果得到适度改善。在该项研究中,锌-ORS 组的大便总次数低于对照组的总次数。没有观察到对腹泻持续时间或长时间腹泻风险的显著影响。(Bahl R, Bhandari N, Saksena M, 等人 Efficacy of zinc-fortified oral rehydration solution in 6-to-35-month-old children with acute diarrhea. J Pediatr 2002; 141:677-82)。

[0013] 已知抗生素无法有效地治疗诸如轮状病毒感染的病毒感染。其他干预的效力有限。另外,用于判别腹泻原因的合适的诊断工具并不总是容易获得或负担得起。

[0014] 显然,需要治疗未分化腹泻的迅速、有效且经济的替代方案。仍然需要用于在广谱、未分化或混合临床应用中治疗腹泻和肠道感染的有效且经济的组合物和方法。

## 发明概要

[0015] 本公开提供了被动免疫的组合物和方法,其中将诸如特异性免疫球蛋白的特异性结合分子与载体基质组合以提供用于管理微生物的经口或粘膜施用的组合物;所述组合物和方法包括治疗或预防病原感染或不期望菌株。在实施方案中,将所述组合物施用给非新生儿受试者。

[0016] 在一个实施方案中,本公开提供了用于施用给非新生人以管理微生物的组合物,所述组合物包含至少一种来源于动物的适应性免疫系统的特异性结合分子,或其片段,其中特异性结合分子选自免疫球蛋白、抗体、肽、可变淋巴细胞受体、转移因子,或它们的混合物;以及载体基质,其包含非人哺乳动物的先天免疫系统的两种或更多种组分,其中所述基质可选自或来源于初乳、乳、血清、血浆、唾液、淋巴液、粘膜,或泪液的组分;其中所述基质和特异性结合分子来源于不同的物种。

[0017] 在优选的实施方案中,载体基质包含牛初乳。在另一个实施方案中,所述基质包含选自以下的先天免疫系统组分:溶菌酶、磷脂酶、防卫素、调理素、补体系统组分、 $\beta$ -溶素、富含蛋白质的肽 (PRP)、(PRPs)、乳铁蛋白、转铁蛋白、细胞因子、白介素、趋化因子、干扰素、TNF- $\alpha$ 、纤连蛋白、白细胞、白血细胞、吞噬细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞 (NK)、淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK)、防卫素、弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G、髓过氧化物酶,和 NADPH 氧化酶。

[0018] 在各种实施方案中,所述组合物包括药学上可接受的载体。在其他实施方案中,所述组合物包括食品级载体。在实施方案中,所述组合物可经由经口递送、鼻递送、眼递送或其组合来施用。

[0019] 在其他实施方案中,所述组合物不包括以外源方式添加的聚合物、共聚物、脂质体、水凝胶或纤维蛋白。在其他实施方案中,所述组合物不包括微球体或微胶囊。在又一个进一步实施方案中,所述组合物不包括以外源方式添加的抗原。

[0020] 在进一步的实施方案中,特异性结合分子特异性地与病原体、病原体相关毒素、病原体相关粘附元件、不期望的菌株,或其组合结合。在一方面,病原体包含人或兽的引起胃肠炎的肠道或胃肠道病原体。在各种方面,病原体或不期望菌株选自以下组成的组:空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、肠道血清型伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhi)、痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*)、类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) [包括 (EPEC) 肠致病性大肠埃希氏菌、(ETEC) 产肠毒素大肠埃希氏菌、(EaggEC) 肠聚集性大肠埃希氏菌、(EIEC) 肠侵袭性大肠埃希氏菌,及 (EHEC) 出血性大肠埃希氏菌]、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 01、弧菌 0139、非-01 弧菌、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、肠肝螺杆菌 (*enterohepatic Helicobacter*) (包括幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*))、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、轮状病毒、冠状病毒、诺罗病毒 (*norovirus*)、杯状病毒 (*calicivirus*)、肠道腺病毒 (*enteric adenovirus*)、巨细胞

病毒 (cytomegalovirus)、星状病毒 (astrovirus)、肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*)、流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、带状疱疹病毒 (herpes zoster virus)、镰刀菌属某些种 (*Fusarium spp.*)，及棘阿米巴属某些种 (*Acanthamoeba spp.*)。

[0021] 在具体方面，病原体相关毒素包含内毒素或外毒素。

[0022] 在另一个具体方面，病原体相关粘附元件包含粘附素、钙粘素、纤毛、伞毛 (fimbriae)、病毒粘附结构，或其组合。

[0023] 在各种实施方案中，所述组合物以对于治疗或预防未分化腹泻、旅行者腹泻、轮状病毒腹泻、毒素介导的腹泻、霍乱、艰难梭菌 (*C. difficile*) 感染、痢疾、伤寒热、消化性溃疡有效或对于管理胃肠道菌群有效的量经口施用。在另一个方面，有效量的所述组合物赋予受试者被动免疫力。

[0024] 在另一个实施方案中，本公开提供了通过以下步骤制备本公开组合物的方法：(a) 从动物获取至少一种与特异性抗原结合的特异性结合分子或其片段，其中特异性结合分子选自免疫球蛋白、抗体、肽、可变淋巴细胞受体、转移因子，及它们的混合物；(b) 获取至少一种载体基质，其包含至少两种从非人动物获得的选自由以下组成的组的组分：酶、乳铁蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白、细胞因子、白血细胞、补体组分、干扰素，和纤连蛋白；(c) 制备载体基质的固体形式及特异性结合分子或其片段的固体形式；以及 (d) 将载体基质的固体形式与特异性结合分子或其片段的固体形式混合。

[0025] 在另一个实施方案中，本发明提供了用于制备赋予免疫力的组合物的方法。所述方法包括 (a) 获取至少一种外源来源的特异性靶向免疫因子；(b) 制备所述至少一种外源来源的特异性靶向免疫因子的粉末化形式；(c) 获取至少一种外源来源的载体基质，任选地将外源来源的载体基质与用于支撑外源来源的特异性靶向免疫因子并与其相互作用的试剂混合物混合；(d) 制备所述至少一种外源来源的载体基质的粉末化形式；以及 (e) 将步骤 (b) 的粉末化形式与步骤 (d) 的粉末化形式混合，从而获得赋予被动免疫力的组合物。在一方面，赋予被动免疫力的组合物包括剂量受控制剂。在各种方面，赋予被动免疫力的组合物包括药学上可接受的载体。在各种方面，赋予被动免疫力的组合物不包括聚合物、共聚物、脂质体、水凝胶，或纤维蛋白。在各种方面，赋予被动免疫力的组合物不包括微球体或微胶囊。在各种方面，赋予被动免疫力的组合物不包括免疫原或抗原。

[0026] 本发明包括以下区别性属性中的至少一种：(a) 它使得基质、特异性因子，和针对指定或目标疾病的激活事件能够被个性化设计；(b) 它使得能够获得可就效果作出调整或调节的多种组分混合物的剂量受控制剂；(c) 它使得能够获得提供超过可在自然系统中获得的正常生理水平的指定组分的剂量受控制剂；(d) 它使用复杂的多组分多通路相互作用创建模拟天然免疫系统反应的系统效果；(e) 它使得能够创建预先调节或强化的被动免疫反应，其可以其强化状态施用，并随后被存在的靶病原体、毒素、疾病状态，或综合征激活；(f) 它使得能够制备具有定义的特异性或广谱效果，从而满足特定目标疾病状态或综合征的需要或使用产品的实践环境的需要的制剂；以及 (g) 它使得能够制备可被靶向用于预防以及用于治疗干预的制剂。

[0027] 在另一方面，通过调节所述组合物中诸如多克隆抗体的特异性结合分子的量，可制备剂量受控制剂。



[0028] 在优选的实施方案中,所述至少一种特异性结合分子包含来源于经免疫的鸡的 IgY。在其他具体方面,IgY 包含对至少产肠毒素大肠埃希氏菌某些种、大肠埃希氏菌 K99 菌毛粘附因子、产气荚膜梭菌毒素 (*Clostridium perfringens* toxoid)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、轮状病毒,和冠状病毒有特异性的 IgY 池。

[0029] 在另一个实施方案中,将所述组合物外用施用至粘膜。

[0030] 在另一个实施方案中,病原体包含引起阴道炎的病原体。在各种方面,病原体选自自由以下组成的组:加德纳菌属某些种 (*Gardnerella* spp.)、淋病奈瑟氏菌、沙眼衣原体、支原体属某些种 (*Mycoplasma* spp.)、空肠弯曲杆菌、阴道滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、1 型疱疹病毒、2 型疱疹病毒、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)、热带念珠菌 (*Candida tropicalis*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*) 和克柔念珠菌 (*Candida krusei*)。

[0031] 在另一个实施方案中,病原体为 A 组链球菌属细菌。

[0032] 在另一个实施方案中,病原体包含引起结膜炎的病原体,其选自自由以下组成的组:金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*)、流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*)、淋病奈瑟氏菌、沙眼衣原体、腺病毒、单纯性疱疹、带状疱疹病毒、肠道病毒、镰刀菌属某些种、念珠菌属某些种 (*Candida* spp.) 和棘阿米巴属某些种。

[0033] 在另一个实施方案中,本公开组合物可用于作用于施用给有相应需要的受试者的营养组合物,所述受试者患有导致特殊饮食需要的疾病,例如小儿腹泻、克罗恩氏病 (*Crohn's disease*) 和溃疡性结肠炎。

[0034] 附图简述

[0035] 图 1 示出实施例 1A 组合物的两个现场试验组与阴性对照在五天内平均每日大便频率的比较。在试验组 1 ( $n = 29$ ) 和试验组 2 ( $n = 31$ ) 中,实施例 1A 组合物与抗生素和口服补液盐 (ORS) 一起每日施用一次,持续三天。在阴性对照组 ( $n = 28$ ) 中,仅施用抗生素和 ORS,而没有施用本公开组合物。

[0036] 图 2 示出图 1 中的这三个组在相同的五天内的平均每日大便硬度,其分为 1-5 级别 (1 = 正常,5 = 液体)。

[0037] 图 3 示出图 1 中的这三个组在相同的五天内的平均医师评估的健康状况,其分为 1-5 级别 (1 = 正常,5 = 病情严重)。

[0038] 图 4 示出三个现场研究 (试验) 测试组在五天内平均每日大便频率。试验组 1 和 2 及阴性对照如针对图 1 所描述的。在试验组 3 ( $n = 140$ ) 中,将实施例 1B 组合物与抗生素和 ORS 一起施用给患者。

[0039] 图 5 示出图 4 中的这四个组在相同的五天内的平均每日大便硬度,其分为 1-5 级别 (1 = 正常,5 = 液体)。

[0040] 图 6 示出图 1 中的这四个组在相同的五天内的平均医师评估的健康状况,其分为 1-5 级别 (1 = 正常,5 = 病情严重)。

[0041] 图 7 示出试验组 1 和 2、阴性对照、试验组 3 在五天内平均每日大便频率,试验组 3 被分成 6 个亚组 (ES204A):与 4g 初乳在一起的 2g 喷雾干燥的卵施用 3 天;(ES204B):与 4g 初乳在一起的 2g 喷雾干燥的卵施用 2 天;(MT204A) 与 4g 初乳在一起的 2g 热干燥的卵施用 3 天;(MT304A) 与 4g 初乳在一起的 3g 热干燥的卵施用 3 天;(MS204A) 与 4g 初乳在一

起的 2g 喷雾干燥的卵施用 3 天；(MS304A) 与 4g 初乳在一起的 3g 喷雾干燥的卵施用 3 天。

[0042] 图 8 示出图 7 中的这些组在相同的五天内的平均每日大便硬度,其分为 1-5 级别 (1 = 正常, 5 = 液体)。

[0043] 图 9 示出图 7 中的这些组在相同的五天内的平均医师评估的健康状况,其分为 1-5 级别 (1 = 正常, 5 = 病情严重)。

## 具体实施方式

[0044] 定义

[0045] 如本文使用的术语“预防 (prevention)”、“预防 (prevent)”、“预防 (preventing)”、“预防 (prophylaxis)”是指在疾病状态或病状的临床表现出现之前开始,以便预防或减轻该疾病状态或病状的此种临床表现的作用过程 (例如施用本公开的化合物或药物组合物)。此种预防和抑制不需绝对有用。

[0046] 如本文使用的术语“治疗 (treatment)”、“治疗 (treat)”和“治疗 (treating)”是指在疾病状态或病状的临床表现出现之后开始,以便消除或减轻该疾病状态或病状的此种临床表现的作用过程 (例如施用化合物或药物组合物)。此种治疗不需绝对有用。

[0047] 如本文使用的术语“需要治疗”是指护理者 (caregiver) 作出的患者需要治疗或将从治疗中获益的判断。这种判断是基于多种因素作出的,所述因素在护理者的专业技能范围内,但是包括对患者因可用本公开的方法、化合物或药物组合物治疗的病状患病或将要患病的了解。

[0048] 如本文使用的术语“需要预防”是指由护理者作出的患者需要预防或将从预防中获益的判断。这种判断是基于多种因素作出的,所述因素在护理者的专业技能范围内,但是包括对患者因可用本公开的方法、化合物或药物组合物预防的病状将要患病或可能患病的了解。

[0049] 如本文使用的术语“个体”、“受试者”或“患者”是指任何动物,包括鸟类或哺乳动物,例如小鼠、挪威大鼠、棉鼠、沙鼠、豚鼠、仓鼠、其他啮齿类动物、家兔、狗、猫、猪、牛、绵羊、山羊、马,或灵长类动物,以及人。该术语可具体指定雄性或雌性或两者,或者排除了雄性或雌性。在一方面,患者为成人。在另一方面,患者为非新生人类婴儿。在另一方面,患者为人类幼儿、儿童或青少年。

[0050] 术语“新生儿”或初生儿是指在出生后的第一个 28 天内的婴儿。术语“非新生儿”是指年龄超过 28 天的动物。

[0051] 如本文使用的术语“有效量”是指单独使用或作为药物组合物一部分使用的药剂的量,所述量能够对疾病状态或病状的任何症状、方面或特征产生任何可检测的阳性效果。此种效果不必绝对有益。

[0052] 如本文使用的术语“包括”在范围上是非限制性的,因此除了所列的那些要素之外,另外的要素也被认为是可能的;这个术语在任何情况下都可理解为“包括但不限于”。

[0053] 术语“免疫”、“主动地免疫 (actively immunize)”、“主动地免疫 (actively immunizing)”和“主动免疫”是指通过使受试者暴露于抗原,例如来源于诸如但不限于病毒或细菌的微生物的抗原来有目的地免疫受试者;此种暴露可以通过使受试者暴露于完整生物体、减毒生物体、所述生物体的一部分、一种或多种存在于生物体上的抗原,或前述的组

合来进行。

[0054] 术语“被动地免疫 (passively immunize)”、“被动地免疫 (passively immunizing)”，和“被动免疫”是指向受试者提供针对抗原，例如，来源于诸如但不限于病毒或细菌的微生物的抗原的抗体，而不必在受试者中引发对所述生物体的免疫反应。被动免疫提供了即时保护，但受试者没有因此形成记忆细胞。

[0055] 如本文使用的术语“被动免疫力”是指通过将抗体转移至受试者而获得的人工获得性免疫力。术语“卵”或“卵产品”均表示禽类来源的完整带壳卵（常规、经免疫或其他）或从其获得的任何产品或部分。

[0056] 术语“免疫卵”或“免疫卵产品”均表示从被维持在免疫状态的产卵动物获得的完整的卵或从其获得的任何产品或部分。

[0057] 术语“抗原”是指可在生物体，尤其动物中诱导免疫反应的实体或其片段。该术语包括免疫原及其负责抗原性或抗原决定簇的区域。

[0058] 术语“多克隆抗体”是指这样的抗体，其为来源于用抗原或其抗原性功能衍生物 (antigenic functional derivative) 免疫的动物血清的非匀质抗体分子群。对于多克隆抗体的生产，可通过注射抗原来免疫各种宿主动物。可使用各种佐剂增强免疫反应，这取决于宿主物种。

[0059] 术语“单克隆抗体”也是本领域公认的，是指在实验室中由单个克隆大量生产的且仅识别一种抗原的抗体。单克隆抗体通常通过将正常短命的产抗体 B 细胞与诸如癌细胞的快速生长的细胞（有时称为“永生”细胞）融合而制备。由此产生的杂交细胞或杂交瘤快速繁殖，建立产生大量抗体的克隆。“单克隆抗体”是针对特定抗原或表位的基本上匀质的抗体群体。它们可用任何通过连续培养细胞系产生抗体分子的技术来制备。单克隆抗体可用本领域技术人员已知的方法获得。参见，例如，Kohler, 等人, Nature 256 :495-497, 1975, 及美国专利第 4, 376, 110 号。

[0060] 术语“晶状”是指已通过结晶，如通过分批结晶纯化的抗体，如单克隆抗体。可使用晶状抗体以便产生小体积的高度浓缩形式。(Yang 等人, 2003, Crystalline antibodies for subcutaneous delivery. PNAS 100 (12) :6934-6939)。

[0061] 术语“非分化腹泻”是指腹泻的致病物未被诊断出。

[0062] 术语“抗体片段”包括任何合成或经遗传工程改造的蛋白质，它们像抗体一样通过与特异性抗原结合从而形成复合物来起作用。例如，抗体片段包括分离的片段，由重链和轻链可变区组成的“Fv”片段；重组单链多肽分子，其中轻链和重链可变区通过肽连接体连接（“scFv 蛋白”）；及由模拟高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位。抗体片段包括抗体的一部分，如 F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、sFv 等。不论结构如何，抗体片段均与被完整抗体所识别的相同的抗原结合。

[0063] 术语“转移因子”是指由氨基酸组成的大约 5000 道尔顿的免疫分子，其导致抗原特异性细胞 - 介导的免疫力，主要迟发型超敏反应并导致产生淋巴因子以及自身结合至抗原。(Kirkpatrick 1993, Structural nature and functions of transfer factors. Ann. N. Y. Acad. Sci. 685 :362-368.)

[0064] 术语“可变淋巴细胞受体”是指在诸如七鳃鳗和盲鳗的无颌脊椎动物中被发现的淋巴细胞来源的分子。这些动物具有大量可变淋巴细胞受体，其仅由少数基因产生并且以

与抗体结合的方式类似的方式、以相同的特异性程度与病原抗原结合。(Alder 等人, 2005, Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. Science, 310(5756):1970-1973)。

[0065] 术语“细胞受体”是指 B- 细胞受体的配体结合半族, 即一种同种型 (例如, IgD、IgM、IgE) 的膜结合的免疫球蛋白分子。除存在完整膜结构域之外, 这些与它们的分泌形式相同。

[0066] 在诸如抗体、抗体片段、可变淋巴细胞受体或转移因子的特异性结合分子 (也称为特异性靶向免疫因子) 的特性的上下文中, 术语“特异性结合”是指优先与存在于不同抗原的均质混合物中的特定抗原结合的能力。在某些实施方案中, 特异性结合相互作用将能够辨别样品中期望和不期望的抗原 (例如, “靶”和“非靶”抗原), 在一些实施方案中辨别能力超过约 10 至 100- 倍或更高 (例如, 超过约 1000- 或 10, 000- 倍)。在一些实施方案中, 与非共用表位相比较, 特异性结合分子可特异性地与微生物的不同物种或菌株之间共用的表位结合。在某些实施方案中, 当抗体与抗原特异性地结合成抗体-抗原复合物时它们之间的亲和力的特征在于  $K_D$  (解离常数) 小于  $10^{-6}M$ 、小于  $10^{-7}M$ 、小于  $10^{-8}M$ 、小于  $10^{-9}M$ 、小于  $10^{-10}M$ 、小于  $10^{-11}M$ , 或小于约  $10^{-12}M$  或更低。

[0067] 术语“先天免疫系统”或非特异性免疫系统是指以非特异性方式保护宿主不被其他生物体感染的细胞、分子组分和机制。先天免疫系统的细胞和分子组分以通用方式识别病原体并对病原体作出反应, 但与适应性免疫系统不同, 它不赋予受试者持久或保护性免疫力。先天免疫系统对感染立刻作出防卫反应。脊椎动物具有第二层保护, 即由先天反应激活的适应性免疫系统。

[0068] 术语“适应性免疫系统”是指识别抗原并对其作出反应, 例如从而消除、制压或阻止病原体生长的高度特化的系统细胞和过程。由于体细胞超突变 (加速的体细胞突变过程) 和 V(D)J 重组 (抗原受体基因片段的不可逆的遗传重组), 该系统具有高度的适应性。适应性免疫力还称为获得性免疫力并且创建免疫记忆。适应性免疫反应是病原体和抗原特异性的反应, 而暴露和最大反应之间存在滞后时间。适应性免疫反应基于克隆识别的原理, 以致于致敏淋巴细胞在初次暴露于抗原后, 要么分化成免疫效应细胞, 要么形成扩充的记忆细胞池, 所述记忆细胞通过发动放大且更迅速的反应来响应于在相同抗原中的二次暴露。

[0069] 术语“动物”是指动物界定义。

[0070] 所有代词意欲被给予最广泛的含义。除非另外说明, 否则女性代词包括男性, 男性代词包括女性, 单数代词包括复数, 并且复数代词包括单数。

[0071] 如本文使用的数值范围意欲包括包含在该范围内的每一个数值和数值子集, 无论是否具体公开。进一步地, 这些数值范围应当被解读为提供对该范围中的任何数值或数值子集的权利要求的支持。例如, 公开的 1 至 10 应被解读为支持 2 至 8、3 至 7、5 至 6、1 至 9、3.6 至 4.6、3.5 至 9.9 等等的范围。

[0072] 本文引用的所有专利、专利公布和同行评审的出版物 (即, “参考文献”) 明确地以引用的方式并入本文, 引用程度如同每篇单独的参考文献均被具体单独地指出以引用的方式并入。如果本公开与并入的参考文献冲突, 则以本公开为准。

[0073] 实施本公开的方式

[0074] 本公开提供了可用于管理不期望菌株或病原微生物的组合物和方法。

[0075] 本发明的一个实施方案基于用于制备包埋或容纳在载体基质中的基于抗体的靶向制剂的方法,其中所述抗体使用受控形式的对多个相关靶抗原簇的交叉反应性,并且其中载体基质含有支撑体和增强抗体效果的辅因子。此类抗体/基质制剂的实用性可包括在致病物类别已知或被怀疑,但确切或具体的致病物未知或未遭怀疑的状况下或在多个(混合)致病物有活性的环境下提供广谱的治疗干预。

[0076] 已开发以这种方式使用抗体的新途径,其利用抗体的特异性和交叉反应的性质,并然后进一步利用载体基质内的组分产生多组分原位免疫反应。在这个实施方案中,抗体被设计用于与代表结构相关的抗原簇的数个密切相关的表位中的所有表位结合。这些抗原在其他方面可显著不同,并且可起源于不同来源、生物体或物种。

[0077] 本发明的一个实施方案涉及载体基质内的特异性结合分子(免疫因子,例如抗体)的方法,其中特异性结合分子对一类相关抗原具有特异性并且特异性地与该类别的不同成员实例交叉反应。相关的靶抗原簇存在结构相似度,而不考虑作为抗原来源的生物体或病原体。结构相似性可导致称为“交叉反应性”的现象(反应性分子与除预期抗原以外的抗原的空间结合)。交叉反应性经常是无意的,并且在大多数情况下被视为错误和非特异性的来源。然而,在这个实施方案中,交叉反应性的范围和程度由限制并引导它的表达以提供期望特性的各种方式控制。

[0078] 用来自抗体从其中被收获的来源的食物的风险因素相当(例如,风这种治疗赋予患者被动免疫力。所述治疗的性质使得相关风险因素与食险因素将与食用卵和一瓶乳的风险因素类似)。这是一种有效的治疗,其毒性小于当前可用替代干预的毒性。

[0079] 本发明基于这一开创性的发现:外源来源(含有从不同于待治疗动物的动物获得的组分)的载体基质与外源来源(外源获得或对应于与从不同于待治疗动物的动物获得的免疫因子)的特异性靶向免疫因子的联合使用可用来向有需要的受试者中传输和引入有效的多参数免疫力。

[0080] 在一方面,本公开提供了组合物,其包含:a)非新生人有效量的至少一种从动物获得并且特异性地与抗原结合的特异性结合分子或其片段,其中特异性结合分子选自免疫球蛋白、抗体、肽、可变淋巴细胞受体、转移因子,及它们的混合物;以及,b)载体基质,其包含至少两种从非人动物获得的选自由以下组成的组的组分:酶、乳铁蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白、细胞因子、白血细胞、补体组分、干扰素,和纤连蛋白,其中所述至少一种特异性结合分子和所述载体基质的至少两种组分从不同动物获得。

[0081] 在另一方面,本公开提供了制备所述组合物的方法,其包括(a)从动物获取至少一种与特异性抗原结合的特异性结合分子或其片段,其中特异性结合分子选自免疫球蛋白、抗体、肽、可变淋巴细胞受体、转移因子,及它们的混合物;(b)获取至少一种载体基质,其包含至少两种从非人动物获得的选自由以下组成的组的组分:酶、乳铁蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白、细胞因子、白血细胞、补体组分、干扰素,和纤连蛋白;(c)制备载体基质的固体形式及特异性结合分子或其片段的固体形式;以及(d)将载体基质的固体形式与特异性结合分子或其片段的固体形式混合。

[0082] 在又一个方面,本公开组合物可用于治疗或预防微生物感染。在实施方案中,微生物感染包括由以下引起的微生物感染:空肠弯曲杆菌、沙门氏菌属、肠道血清型伤寒沙门氏

菌、痢疾志贺氏菌、类志贺邻单胞菌、大肠埃希氏菌、肠致病性大肠埃希氏菌、产肠毒素大肠埃希氏菌、肠聚集性大肠埃希氏菌、肠侵袭性大肠埃希氏菌、出血性大肠埃希氏菌、艰难梭菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、霍乱弧菌 01、弧菌 0139、非-01 弧菌、副溶血性弧菌、嗜水气单胞菌、产气荚膜梭菌、肠肝螺杆菌、幽门螺杆菌、金黄色葡萄球菌、克雷伯氏菌属、轮状病毒、冠状病毒、诺罗病毒、杯状病毒、肠道腺病毒、巨细胞病毒，和星状病毒。在实施方案中，所述组合物可用于治疗或预防诸如以下的病状：未分化腹泻、旅行者腹泻、轮状病毒腹泻、毒素介导的腹泻、霍乱、艰难梭菌感染、痢疾、伤寒热、消化性溃疡、阴道炎，或者用于胃肠道菌群管理。

[0083] 在具体实施方案中，采用本公开组合物和方法治疗或预防腹泻。存在多种引起腹泻的生物体，包括病毒、细菌、寄生虫和原虫。例如，在印度，细菌感染的主要病因包括大肠埃希氏菌某些种、产肠毒素大肠埃希氏菌、肠粘附性大肠埃希氏菌、气单胞菌属某些种、空肠弯曲杆菌、志贺氏菌属某些种、弧菌属某些种、霍乱弧菌 01、副溶血性弧菌、沙门氏菌属某些种、金黄色葡萄球菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌，和小肠结肠炎耶尔森氏菌。次要病因包括艰难梭菌（毒素 A 或 B），病毒性腹泻的主要病因是由轮状病毒所致的感染；但是还已知杯状病毒、星状病毒、诺瓦克病毒，和腺病毒也导致腹泻。病毒性腹泻的次要病因包括肠道腺病毒、单纯疱疹病毒和病毒性肝炎。（John B. Sullivan 和 Gary R. Krieger, *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*, 第 2 版, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 第 1040 页）。

[0084] 还已知患病率存在区域性和季节性差异。例如，在印度，Pranam，一项研究报告轮状病毒造成平均 15-25% 的儿童腹泻病例。产肠毒素大肠埃希氏菌造成总腹泻病例的 10% 至 20%，其中肠致病性大肠埃希氏菌造成约 1% 至 5% 的病例。空肠弯曲杆菌感染造成约 10% 至 15% 的儿童腹泻病例，而志贺氏菌属造成估计 5% 至 15% 的儿童腹泻病例。霍乱弧菌造成约 5% 至 10% 的病例。沙门氏菌属（非伤寒）造成约 1% 至 5% 的病例。原虫感染主要由隐孢子虫（5-15%）引起。约 20% 至 30% 的病例未鉴定出病原学病因。（Fricker, *Children in the Tropics*, Putting an end to diarrheal diseases, 1993-No. 204 :1-66）

[0085] 印度不同地区将细菌性儿童腹泻病例归因于具有不同流行程度的不同的病原体。例如，印度奥里萨邦的一项研究在 866 种培养阳性样品中发现，大肠埃希氏菌某个种（75.5%）、致病性大肠埃希氏菌（13.2%）、气单胞菌属某些种（2%）、志贺氏菌属某些种（4.5%）、霍乱弧菌 01（17.3%）、霍乱弧菌 0139（1%）及沙门氏菌属某些种（0.7%）。  
[find-health-articles.com/rec\\_pub\\_18806340-incidence](http://find-health-articles.com/rec_pub_18806340-incidence)。

[0086] 由于病因多种多样，因此需要治疗未分化腹泻的有效、广谱，经济且安全的方法。大多数儿童腹泻病例似乎由细菌和病毒感染引起，但是需要抗生素和抗病毒药剂的替代物。

[0087] A. 组合物

[0088] 本公开的一方面涉及可用于治疗、预防或管理微生物菌群的组合物。在实施方案中，所述组合物可用于治疗病原感染，尤其胃肠道的病原感染。

[0089] 在实施方案中，本公开提供了包含以下的组合物：

[0090] a) 非新生儿有效量的至少一种从动物获得并且特异性地与抗原结合的特异性结合分子或其片段，其中特异性结合分子选自免疫球蛋白、抗体、肽、可变淋巴细胞受体、转移

因子,及它们的混合物;以及,

[0091] b) 载体基质,其包含至少两种从非人动物获得的选自以下组成的组的组分:酶、乳铁蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白、细胞因子、白血细胞、补体组分、干扰素,和纤连蛋白,其中所述至少一种特异性结合分子和所述载体基质的至少两种组分从不同动物获得。

[0092] 特异性结合分子

[0093] 本公开的组合物和方法提供了从动物获得并且特异性地与抗原结合的特异性结合分子或其片段。特异性结合分子包括抗体、抗体片段、肽、可变淋巴细胞受体、转移因子,及它们的混合物。

[0094] 抗体

[0095] 抗体、免疫球蛋白和其他生物免疫因子(统称为抗体),无论是天然存在的还是它们的合成类似物,都是人和动物的已知治疗剂。

[0096] 抗体通过结合(经由非共价力)在抗体上的抗原结合位点与称为抗原决定簇或表位的抗原的一部分之间而起作用。抗体能够具有高度特异性。例如,在生产的推动下,单克隆抗体领域已大量开发出特异性和精确性越来越高的结合特性。然而,这种高特异性可导致过度受限的结合属性,其中功能上相同的因子或抗原不与免疫试剂或免疫治疗剂相同地反应。另一方面,通常被视为错误或失败的交叉反应性是抗原与针对相似但不同抗原产生的抗体之间的反应。受控的交叉反应性可建设性地用来扩宽抗体的结合范围。

[0097] 本公开的一个实施方案基于用于制备包埋或容纳在载体基质中的基于抗体的靶向制剂的方法,其中所述抗体使用受控形式的对多个相关靶抗原簇的交叉反应性,并且其中载体基质含有支撑体和增强抗体效果的辅因子。此类抗体/基质制剂的实用性可包括在致病物类别已知或被怀疑,但确切或具体的致病物未知或未被怀疑的状况下或在多个(混合)致病物有活性的环境下提供广谱的治疗干预。已开发以这种方式使用抗体的新途径,其利用抗体的特异性和交叉反应的性质,并然后进一步利用载体基质内的组分产生多组分原位免疫反应。在这个实施方案中,抗体被设计用于与代表结构相关的抗原簇的数个密切相关表位中的所有表位结合。这些抗原在其他方面可显著不同,并且可起源于不同来源、生物体或物种。

[0098] 对于本公开的目的,抗体可以是单克隆、来源于任何动物的多克隆、片段、嵌合、人源化或任何其他形式,并且抗体可以为任何同种型:例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM(胎盘哺乳动物)、IgY(鸡),或其他,可以为双特异性或双功能,或多特异性或多功能抗体或其片段。在实施方案中,特异性结合分子可选自以下三大类中的一类:哺乳动物单克隆抗体、哺乳动物多克隆抗体和禽类多克隆抗体;或从它们获得的保留与病原体组分结合的能力的任何片段。

[0099] 本发明的一个实施方案是其在生产广谱治疗剂中的用途。一种生产这类反应性制剂的方法涉及生产从经适当免疫的动物中收获的多克隆抗体,并且其中然后将此类抗体包埋在载体基质中。多克隆抗体(或抗血清)为来源于不同 B 细胞系的抗体。它们通常整体地(en-mass)从经免疫的动物的血清、乳、初乳、卵,或生物流体中收获。它们是针对特异性抗原分泌的免疫球蛋白分子的混合物,或识别一系列不同表位的一组抗原的混合物。单一抗原(结合至不同表位)可以具有多种抗体,或者由于交叉反应性,单一抗体可以结合至多

种抗原。多克隆抗体可从已免疫接种或接种来自靶组分的抗原的动物中获取,所述动物例如牛、绵羊、马、山羊、猪、家兔、鸡、鸭、鹅,或火鸡。所述抗体可从例如由经接种动物产生或来源于经接种动物的组织、血清、乳或卵中收获。这与单克隆抗体相反,单克隆抗体是相同的单特异性抗体;由一种类型的免疫细胞产生,所述免疫细胞全部是单一母细胞的克隆。

[0100] 本发明中使用的抗体可以从血清、血浆、初乳、乳、卵,或其他合适的生物来源的流体,或者从细胞培养基、上清液等中收集。本发明中使用的抗体可经任何合适的方式处理用于制备制剂和使用,所述方式包括但不限于,分离、血浆去除法、干燥工艺、冻干、巴氏杀菌,和保鲜法。本发明中使用的抗体可以用各种方式加以处理、浓缩、分离,或纯化,这取决于它们的最终预期用途。

[0101] 通过将抗体混合物改变成适合于各种实施方案的抗体混合物,本公开提供了适合于治疗或预防其他胃肠道感染的组合物和方法,所述其他胃肠道感染例如霍乱、艰难梭菌、痢疾、伤寒沙门氏菌(伤寒热),和幽门螺杆菌(消化性溃疡)。

[0102] 在一个实施方案中,优选通过例如多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和任选的佐剂来在动物中制备抗体。在一方面,使相关抗原(尤其当使用合成肽时)与待免疫物种中的免疫原性蛋白质缀合可能是有用的。例如,可使用双功能或衍生化试剂,例如磺基琥珀酰亚胺马来酰亚胺基苯甲酰酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 $\text{SOCl}_2$ ,或  $\text{R}_2\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中R和R为不同的烷基)使抗原与钥孔戚血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白,或大豆胰蛋白酶抑制剂缀合。用抗原、免疫原性缀合物或如本文所描述的衍生物免疫动物。在其他实施方案中,抗体可以是合成或半合成抗体,例如如在噬菌体展示文库中获得或作为人源化或嵌合抗体制备的抗体。

[0103] 与传统上用于抗体生产的哺乳动物相比,鸟类(如产卵鸡)作为抗体生产者具有很高的成本效益。禽类抗体具有优于哺乳动物抗体的生物化学优势。当施用给哺乳动物受试者时,哺乳动物与鸟类之间的免疫学差异导致在免疫学测定中具有增大的敏感性和减弱的背景;以及具有高特异性且不存在互补的免疫效果。与哺乳动物抗体相反,禽类抗体不会通过主要或经典途径激活人补体系统,它们也不会与类风湿因子、人抗小鼠IgG抗体、葡萄球菌蛋白A或G,或细菌和人Fc受体反应。然而,禽类抗体可以激活非炎性替代途径。因而,禽类抗体提供了优于哺乳动物抗体的许多优势。

[0104] 在优选的实施方案中,特异性分子为在已接种病原体组分之一或病原体组分混合物的母鸡的卵中制备的多克隆抗体。各种特异性抗原制剂也可以用于接种。在接种后,母鸡产生卵黄中含有大量特异性IgY免疫球蛋白,且白蛋白中含有少量IgM和IgA免疫球蛋白的卵。因此,卵是大量经济地生产的高特异性且稳定的抗体的优良来源。在一个实施方案中,使用鸡生产禽类抗体;但可以替代地使用火鸡、鸭、鹅、鸵鸟等。在一方面,通过如本文所描述的本领域中已知的任何方法给母鸡接种。例如,可以肌肉内或皮下注射抗原。在禽类中,优选的供注射用肌肉是胸肌。可使用的其他施用方法包括皮下注射、静脉内注射、腹膜内注射、皮内、直肠栓剂、气溶胶或经口施用。

[0105] 优选通过免疫并以固定的时间间隔反复加强施用合适剂量而在靶动物中诱导并维持特定免疫状态。在1-12个月的时间内,时间间隔优选为1-8周间隔。剂量在约0.01-5毫克抗原之间选择。在一方面,对于给母鸡的每一次接种,剂量为0.01mg至1.0mg抗原,



优选 100mg、200mg、250mg、300mg、400mg、500mg 或 750mg 抗原。免疫接种的总次数可以选自 12 个月内 1、2、3、4、5、或 6 次。通常,首次接种在第 1 天执行,加强免疫接种在第 10 天内和第 20 天执行。通过用例如 ELISA 监测卵中的特异性抗体浓度,或滴度,从而在需要时给母鸡再接种疫苗。对于母鸡,典型的皮下剂量体积选自约 0.2mL 至 1.0mL、0.3mL 至 0.7mL,或 0.5mL。然而,至关重要,加强施用不能导致免疫耐受性。此过程在本领域中是熟知的。

[0106] 可以使用其他接种维持程序或程序的组合,例如,用于初次免疫的肌肉内注射与用于加强注射的静脉内注射的组合。进一步的程序包括同时施用微胶囊化的和液体的免疫原,或用于初次免疫的肌肉内注射,和通过以微胶囊方式经口施用或肠胃外施用的加强剂量。初次免疫和加强免疫的数种组合是本领域技术人员已知的。

[0107] 也称为药物载体或关于此的功能等价物的佐剂可以包括在免疫溶液 / 疫苗组合物中以增强动物的特异性免疫反应。大量佐剂已被描述并且用于在实验动物中产生抗体,所述实验动物例如小鼠、大鼠、家兔和鸡。在此种情况下,副作用容限相当高,因为主要目的是获得强抗体反应。

[0108] 关于本公开的佐剂可以按照其来源分组,其为矿物质、细菌、植物、合成产物,或宿主产物。在这种分类法下,第一组为矿物质佐剂如铝化合物。与铝盐一起沉淀的抗原或者与预形成的铝化合物混合或吸附到预形成的铝化合物上的抗原已被广泛地用来增强动物和人的免疫反应。在一个实施方案中,免疫组合物中的佐剂起源于细菌。可纯化和合成起源于细菌的佐剂(例如胞壁酰二肽、脂质 A),并且已克隆出宿主介体(白介素 1 和 2)。数种起源于细菌的活性组分的佐剂的已知化学纯化包括:百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、脂多糖、弗氏完全佐剂(Freund's Complete Adjuvant, FCA)和弗氏不完全佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant)(Difco Laboratories, Detroit, Mich.)及 Merck 佐剂 65(Merck and Company, Inc., Rahway, N. J.)。在具体方面,在本公开的免疫组合物中采用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂。另外,根据本发明的合适的佐剂为例如 Titermax Classical 佐剂(SIGMA-ALDRICH)、ISCOMS、Quil A、ALUN,参见美国专利第 58767 号和第 5,554,372 号,脂质 A 衍生物、霍乱毒素衍生物、HSP 衍生物、LPS 衍生物、合成肽基质、GMDP,及其他以及与免疫刺激剂组合(美国专利第 5,876,735 号)。百日咳博德特氏菌在本发明的背景中作为佐剂是感兴趣的,因为它具有通过作用于 T 淋巴细胞群体调节细胞介导的免疫力的能力。弗氏完全佐剂是大多数实验研究中的标准。可向免疫接种组合物中加入矿物油以便保护抗原免受快速分解代谢。

[0109] 许多其他类型的材料可用作根据本公开的免疫原性或免疫组合物中的佐剂。它们包括诸如皂苷的植物产品、诸如壳多糖的动物产品及许多合成化学物。

[0110] 通过肌肉内途径免疫的鸡可在免疫后的第 28 天时在它们的卵中产生高特异性抗体水平,并且在超过 200 天的时间内继续产生特异性抗体,从而使得可在很短的时间例如少于 4-5 周的时间内获得抗体制剂。卵含有浓度高达约 50 毫克 / 卵至约 100 毫克 / 卵的 IgY 抗体。可从单个卵中获取超过 100mg 纯化的 IgY。一个卵黄中的抗原特异性抗体的百分比可高达约 2% 至 10%。(daSilva 等人, IgY:A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary Immunol. Immunopath.*, 135(2010):173-180)。

[0111] 一只具有高产卵菌株的鸡每月可产生约 20 个卵。卵重量约 33 至约 77 克,由于壳而占全卵的约 10.5%。卵黄占全卵重量的约 31%。干燥后,可从 72 个卵制得约 1kg 干燥全卵粉末。因此,在这种算法中,可从一个卵得到约 13.9g 干燥全卵。在另一方面,可从一个免疫卵得到 10g 至约 15g 干燥全卵。在另一方面,本公开的免疫卵每个卵 40mL 至 55mL,每个卵具有约 1-2mg/mL 总 IgY。在另一方面,本公开的免疫卵每个卵含有约 0.01mg/mL 至 0.05mg/mL 特异性 IgY。因此,在一方面,在加工后,例如来自用例如混合抗原制剂免疫的鸡的一个干燥的全免疫卵含有约 80mg 至 110mg 总 IgY 和约 6mg 至 10mg 总混合的抗原特异性 IgY。

[0112] 可通过免疫学领域技术人员已知的许多方法确定是否已在产卵动物中引发免疫反应。这些方法的实例包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、对针对刺激抗原的抗体的存在的测试,及设计用于评价宿主的免疫细胞对抗原作出反应的能力的测试。诱导免疫反应所需的免疫原的最低剂量取决于所用的免疫接种程序,包括所使用的佐剂类型和所使用的一种(多种)免疫原的制剂,以及用作宿主的产卵动物的类型。

[0113] 在一个实施方案中,采用适合于卵商业化生产的母鸡生产多克隆抗体。可采用任何适合于卵生产的鸡品种。可选择,例如, Rhode Island Reds、White Leghorns、Brown Leghorns、Lohmann Brown hens、性连锁杂交组合 (sex-linked hybrid crosses),或其他适合于大卵尺寸、大体积卵生产且便于操作的品种。在一方面,针对标准疾病(例如沙门氏菌属、禽流感或新城疫病毒 (Newcastle virus) 等),在鸡为小鸡的时候对其进行接种。在一方面,可给任何年龄的鸡接种。按照根据用于产生稳定连续生产流的最终产品的量和时间安排预先确定的时间表给母鸡接种,所述接种在该母鸡将要达到产卵期(对于鸡为约 15-19 周),或此前或此后的任何预选时间进行。通常,在约 2 至 4 周的适当时间的隔离和驯化后,每组将进入使用包含抗体期望的特异性抗原的各种抗原或免疫组合物的接种程序。

[0114] 在一个实施方案中,卵收集自经接种的鸡并以全卵形式加以加工。将卵储存在冷藏条件下直至收集足够的卵以准备一批卵。使来自预定组的鸡的成批卵破裂,将内容物与壳分离,混合内容物并优选对其进行巴氏杀菌以消除来自鸡的病原微生物的潜在污染。

[0115] 在一方面,对免疫卵产品进行巴氏杀菌。在卫生的设施中加工卵产品。用自动化设备将带壳卵加工成免疫卵产品,所述自动化设备将带壳卵从卵托上移出,洗涤壳并给壳消毒,并将卵打碎。任选地,将卵白与卵黄分离。任选地过滤液体卵产品,任选地将其与其他成分混合,并然后在进行另外的加工之前将其冷冻。由此产生的卵产品液体然后接受破坏性处理如巴氏杀菌,或者将其加热成干燥形式。在美国,1970Egg Products Inspection Act (EPIA) 要求所有发放用于食用的卵产品必须经过巴氏杀菌处理。

[0116] 在巴氏杀菌后,使用标准商业方法,如使用环境或热空气的喷雾干燥、热干燥、冷冻干燥,或冻干来干燥全部的卵内容物。在一方面,干燥经巴氏杀菌的液体卵的合适方法将对卵中的抗体和分子组分的损害减至最低,从而产生具有高营养价值并且能够赋予被动保护的产品。

[0117] 在一方面,测试干燥卵以确定总滴度或抗体水平。使用标准测试程序,例如 ELISA、FIA(荧光免疫测定)、RIA(放射免疫测定)等。在另一方面,将该批次与来自具有其他平均生产水平的鸡的组的批次混合,导致形成含有标准量抗体的生产批 (lot)。经干燥的含有特异性多克隆抗体的卵在调配成本公开组合物之前可于室温下储存在密封容器中。在实施

方案中,经干燥的卵材料以全卵形式使用,而没有被分离出来。在实施方案中,整个干燥的卵材料含有每个卵至少 5mg 特异性 IgY。

[0118] 在另一个实施方案中,分离出 IgY。分离 IgY 的第一步骤是将水溶性蛋白质与脂蛋白分离。水溶性蛋白质构成卵黄中总蛋白质的 42.4% (Osuga 等人, " Egg Proteins :In Food Proteins, J. R. Whitaker and S. R. Tannenbaum eds., AVI Pub. Co., Westport, Conn. (1977))。

[0119] 许多方法已用于从卵黄中分离和纯化出免疫球蛋白 (Martin 等人, Can J. Biochem. Physiol. 35 :241 (1957) ;Martin 等人, Can. J. Biochem Physiol. 36 :153 (1958) ;Jensenius 等人, J. Immunol. Methods 46 :63 (1981) ;Bade 等人, J. Immunol. Methods 72 :421 (1984) ;Polson 等人, Immunol. Invest. 14 :323 (1985) ;Hassl 等人, J. Immunol. Methods 110 :225 (1988))。Hatta 等人 (Agric. Biol. Chem. 54 :2531 (1990)) 使用食品级天然树胶 (例如,角叉菜胶) 除去作为沉淀的卵黄脂蛋白并回收来自卵黄的水溶性组分中的 IgY。从鸡卵黄中回收抗体的方法是本领域中熟知的。数种方法可用于从卵黄中提取 IgY, 并且可利用商业提取试剂盒 (van Regenmortel, M. H. V. (1993). Eggs as protein and antibody factories. In Proceedings of the European Symposium on the Quality of Poultry Meat, pp. 257-263. Tours, France :INRA)。

[0120] 在另一个实施方案中,空间特异性结合分子可以为对病原体组分有特异性的单克隆抗体。

[0121] 单克隆抗体可使用最初由 Kohler 等人, Nature. 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤方法制备,或者可通过重组 DNA 方法 (U. S. 4, 816, 567) 制备。在杂交瘤方法中,如上面所描述的那样免疫小鼠或其他合适的宿主动物如仓鼠,从而引出产生或能够产生特异性地与用于免疫的蛋白质结合的抗体的淋巴细胞。替代地,可体外免疫淋巴细胞。在免疫后,分离出淋巴细胞,然后使用合适的融合剂如聚乙二醇使所述淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,从而形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, p. 59-103 (Academic Press, 1986))。

[0122] 测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基是否产生了针对所述抗原的单克隆抗体。优选地,通过免疫沉淀法或通过体外结合测定如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 确定杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过 Munson 等人 Anal. Biochem. . 107 :220 (1980) 中所描述的 Scatchard 分析测定。

[0123] 通过常规抗体纯化程序,例如亲和色谱法 (例如使用蛋白质 A 或蛋白质 G- 琼脂糖凝胶) 或离子交换色谱法、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析等,将亚克隆分泌的单克隆抗体适当地从培养基、腹水液,或血清中分离出来。

[0124] 使用常规程序 (例如,通过使用能够特异性地与编码鼠科动物抗体重链和轻链的基因结合的寡核苷酸探针),容易将编码单克隆抗体的 DNA 分离出来并进行测序。杂交瘤细胞用作此种 DNA 的优选来源。一旦所述 DNA 被分离出来,就可将其置入表达载体中,然后将表达载体转染进宿主细胞如大肠埃希氏菌细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞,或不另外产生抗体蛋白的骨髓瘤细胞中,从而获得在重组宿主细胞中的单克隆抗体的合成。有关编码所述抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述包括 Skerra 等人, Curr. Opinion in Immunol. , 5 :256-262 (1993) 及 **Plöckthun**. Immunol. Revs. 130 :151-188 (1992)。

[0125] 在进一步的实施方案中,可从使用 McCafferty 等人, *Nature*. 348 :552-554(1990) 中所描述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离出单克隆抗体或抗体片段。Clackson 等人 *Nature*. 352 :624-628(1991) 和 Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222 :581-597(1991) 分别描述了使用噬菌体文库分离鼠科动物和人抗体。后续出版物描述了通过链改组生产高亲和力 (nM 范围) 人抗体的方法 (Marks 等人, *Bio/Technology*. 10 :779-783(1992)), 以及作为构建非常大的噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组 (Waterhouse 等人, *Nuc. Acids. Res.* 21 :2265-2266(1993))。因而,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方案。

[0126] 可对编码所述抗体的 DNA 进行修饰,以产生嵌合或融合抗体多肽,例如通过如下方式进行修饰:将人重链和轻链恒定结构域 ( $C_H$ 和  $C_L$ ) 序列替换为同源鼠科动物序列(美国专利第 4,816,567 号;以及 Morrison 等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81 :6851(1984)), 或者通过使免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽(异源多肽)的全部或部分编码序列融合。非免疫球蛋白多肽序列可替换抗体的恒定结构域,或者将它们替换抗体的一个抗原结合位点的可变结构域从而形成嵌合二价抗体,其包含对抗原有特异性的一个抗原结合位点和对不同的抗原有特异性的另一个抗原结合位点。

[0127] 用于制备特异性结合蛋白的免疫用抗原

[0128] 选择用于免疫的抗原可为细菌、病毒、原虫、真菌、寄生虫、细胞,或动物的免疫系统对其作出反应的任何其他物质。在一方面,通过使用佐剂来增强抗原的免疫原性。

[0129] 在一方面,给动物接种含有病原体组分、抗原,或免疫原的免疫接种组合物、接种剂或疫苗。在一方面,病原体组分或特异性抗原可获自或来源于诸如 American Type Culture Collection (ATCC) 的商业来源。在另一方面,病原体组分可分离自野生型菌株。在另一方面,病原体组分或不期望菌株存在于混合抗原制剂中。来源于各种不期望菌株或病原体组分的任何抗原或抗原组合都可用于免疫组合物中。

[0130] 在一方面,针对靶抗原簇的共同或被保存组分或区域选择接种剂、抗原或免疫原,而忽略相关抗原簇的各个成员的可变或区别性组分或区域。该方法涉及制备合适的免疫原,所述免疫原的特点是诱导与所述表位的期望实例交叉反应但不与其他表位反应的抗体的产生,还涉及给生产细胞或生物体接种所述免疫原或使其暴露于所述免疫原以便导致产生抗体,所得抗体被包埋在合适的载体基质中用于施用。可以开发出这类制剂,其使用根据这种方法产生的抗体混合物提供宽范围的对一个以上的靶抗原簇的覆盖。例如,在两个不相关抗原簇与疾病或病状关联并且期望创建单一制剂来根治这种疾病或病状的情况下,可使用这种同时提供两个宽范围的反应性结构域的方法制备两种抗体、免疫球蛋白,或生物免疫因子的混合物。这个实施方案的一个实例是用于生产特异性地与结构上相关的毒素的簇反应的抗毒素抗体。

[0131] 在一个实施方案中,利用这种途径制备具有广泛反应性的针对来自任何革兰氏阴性细菌(大肠埃希氏菌、沙门氏菌属、志贺氏菌属,及其他肠杆菌科、假单胞菌、莫拉克斯氏菌 (*Moraxella*)、螺杆菌 (*Helicobacter*)、寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas*),及其他)的脂多糖 (LPS) (内毒素) 的抗体,或例如具有广泛反应性的针对 AB5 毒素(包括弯曲杆菌肠毒素、霍乱毒素、热不稳定肠毒素 (LT 和 LT-II) (大肠埃希氏菌)、百日咳毒素、志贺毒素(志贺氏菌属)、志贺样毒素(或维罗毒素 (verotoxin)) 的抗体。

[0132] 在优选的方面,这些示例性抗毒素抗体具有与产生毒素的物种无关的效果。在另一方面,所产生的抗体是中和抗体,其能够中和或灭活靶毒素的生物活性。此种广谱中和抗体可用于干预这样的病理病例(例如某些类型的腹泻),其中介导症状的毒素是被靶向的簇(在这些实例中,AB5 或 LPS)之一,而不需要了解哪一种生物体是致病物。进一步地,如果制备含有临床有效量的抗 AB5 抗体和抗 LPS 抗体的混合物,则所述制剂可用于干预其中活性毒素为 AB5 或 LPS 或二者的病例。

[0133] 这种方法可扩展到包括任何数量(在这个实例中)的毒素簇,以及扩展到包括针对其他毒素样反应(例如病毒毒素样现象)的介体的广谱中和抗体,从而(在这个实例中对)腹泻创建可广泛适用的干预,其中可在不了解感染病因的情况下管理症状和病理,或者其中存在多个感染病因。在一方面,本公开提供了包含组合在载体基质中的抗毒素抗体的协同组合的组合物。

[0134] 在一些实施方案中,本发明的方法和组合物用于多种病原体或致病物,所述多种病原体或致病物包括而限于,霍乱毒素(霍乱弧菌)、大肠埃希氏菌(包括产肠毒素大肠埃希氏菌(ETEC))、志贺氏菌属、沙门氏菌属、弯曲杆菌、艰难梭菌、寄生虫(例如,贾第鞭毛虫病(*Giardia*)、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、隐孢子虫病(*Cryptosporidiosis*)、环孢子虫),及腹泻病毒(例如,轮状病毒)。

[0135] 在进入胃肠道后,包括但不限于诸如大肠埃希氏菌的细菌的许多病原体结合(粘附)至上皮、粘膜,或其他组织并且被包埋在胃肠道组织如肠壁中。在结合至胃肠道中的组织后,病原体复制,从而导致毒素浓度增加,所述毒素浓度的增加直接由于毒素的产生所引起,或者间接由于免疫系统作用所致的病原体细胞的裂解增加所引起。抑制病原体结合至胃肠道组织的能力促进在大小足以引起病变和其他症状的集落形成之前病原体的更有效的活动化、消化和排泄。通过阻断将被用于粘附至胃肠道的病原体上的受体和配体的类别(包括但不限于粘附素、钙粘素、纤毛、伞毛和/或病毒粘附结构),可阻止对胃肠道组织的粘附或将对胃肠道组织的粘附减至最低,从而最终导致来自利用这种作用模式的病原体的病理显著减轻。

[0136] 在各种实施方案中,病原体选自人或兽的引起胃肠炎的肠或胃肠道病原体中的一种或组合。在各种方面,病原体选自由以下组成的组:空肠弯曲杆菌、沙门氏菌属、鼠伤寒沙门氏菌、肠道血清型伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、类志贺邻单胞菌、大肠埃希氏菌[包括(EPEC)肠致病性大肠埃希氏菌、(ETEC)产肠毒素大肠埃希氏菌、(EaggEC)肠聚集性大肠埃希氏菌、(EIEC)肠侵袭性大肠埃希氏菌,及(EHEC)出血性大肠埃希氏菌]、小肠结肠炎耶尔森氏菌、霍乱弧菌 01、弧菌 0139、非-01 弧菌、副溶血性弧菌、嗜水气单胞菌、产气荚膜梭菌、艰难梭菌、肠肝螺杆菌(包括幽门螺杆菌)、金黄色葡萄球菌、克雷伯氏菌属、轮状病毒、冠状病毒、诺罗病毒、杯状病毒、肠道腺病毒、巨细胞病毒,和星状病毒。在另一方面,病原体相关的毒素包括内毒素或外毒素。在另一方面,病原体相关的粘附元件包括粘附素、钙粘素、纤毛、伞毛、病毒粘附结构,或其组合。

[0137] 在各种方面,病原体组分、免疫原或抗原可来源于,例如,轮状病毒、冠状病毒;C型产气荚膜梭菌;大肠埃希氏菌(细胞);大肠埃希氏菌的产肠毒素菌株,及来自大肠埃希氏菌的肠毒素;具有 K99、K88、987P,或 F41 菌毛粘附因子抗原的任何细菌;由大肠埃希氏菌和鼠伤寒沙门氏菌(一般为革兰氏阴性细菌)造成的内毒素(或 LPS)。在具体的方面,给

母鸡接种来源于一、二、三、四、五、六、七、或八种,或许多种病原微生物的抗原或毒素。

[0138] 在一方面,当抗原来源与经免疫接种的动物的免疫系统之间的距离增加时,免疫反应更加强有力。

[0139] 在具体实施方案中,给第一群鸡接种第一混合抗原制剂。在一方面,给第二群鸡接种第二混合抗原制剂,其含有与第一混合抗原制剂不同的一组抗原。在另一方面,给第三群鸡接种第三混合抗原制剂。在进一步的方面,给第四群鸡接种第四混合抗原制剂。虽然不意欲限制本发明的范围,但据信用不同抗原免疫不同鸡群以便避免抗原过载 (antigen overload) 是有利的。

[0140] 收集来自每个鸡群的卵,任选地针对特异性和 / 或总 IgY 进行滴定,任选地进行分离和 / 或纯化,并分开加工以制备干燥粉末。在另一方面,将来自第一和第二鸡群;第一、第二和第三鸡群;或第一、第二、第三和第四鸡群的干燥粉末状卵与载体基质掺混或包装在一起以制备本公开组合物。在一方面,第一抗原制剂包含牛轮状病毒 (血清型 G6 和 G10)、牛冠状病毒、具有 K99 菌毛粘附因子的大肠埃希氏菌的产肠毒素菌株,和 C 型产气荚膜梭菌。混合抗原制剂罐中可任选地加入佐剂以增强免疫反应。

[0141] 在另一方面,第二抗原制剂包含由 C 型产气荚膜梭菌及产生热不稳定毒素或具有 K99、K88、987P 或 F41 粘附因子的大肠埃希氏菌的产肠毒素菌株产生的  $\beta$  毒素

[0142] 在一方面,第三抗原制剂包含大肠埃希氏菌和鼠伤寒沙门氏菌。JVAC 降低由大肠埃希氏菌和鼠伤寒沙门氏菌引起的内毒素血症的发病率和严重程度。常常与它们的内毒素相关联的是大肠杆菌乳腺炎及与内毒素血症关联的其他革兰氏阴性疾病。

[0143] 在另一方面,通过本领域中已知的任何方式制备抗原。例如,来自野生型来源,如罹患例如大肠埃希氏菌腹泻的动物的细胞。可将分离的细胞在例如胰酪胨大豆肉汤培养基 (Trypticase Soy Broth, TSB) 中于 37°C 下培养过夜,并通过离心浓缩。可将由此产生的沉淀物用含有 0.4% 甲醛的 PBS 缓冲液重悬并在 37°C 下温育用于灭活。可通过离心除去甲醛。将沉淀物重悬在 PBS 中并用作抗原。在一方面,在接种前用等体积的佐剂使抗原乳化。

[0144] 在另一个实施方案中,抗原选自引起结膜炎的那些病原生物体。已知的致病病原体描述于 Gambotto 等人的 US2008/0031903 中,其以引用的方式并入本文。

[0145] 流行性角膜结膜炎 (EKC) 是世界各地可见的致衰弱的眼部传染病。该疾病主要由腺病毒,尤其血清型 8、19 和 37 引起。血清型 3、4 和 11 也牵涉到一些 EKC 流行病。该疾病影响所有年龄组,具有高度传染性,在学校、学校、游泳池、儿科部和营地迅速传播。目前根据症状来治疗,因为没有有效的治疗方法。需要开发有效的抗病毒外用药剂来治疗该病变及预防流行病。

[0146] 结膜炎也可由许多另外的细菌、病毒、真菌和原虫剂引起,包括但不限于:金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、淋病奈瑟氏菌、沙眼衣原体、腺病毒、单纯性疱疹、带状疱疹病毒、肠道病毒、镰刀菌属物种、念珠菌属物种和棘阿米巴属物种。某些病毒感染如腺病毒感染可用抗病毒药品如西多福韦 (cidofovir) 治疗。通常,药品具有副作用,例如与西多福韦关联的眼部和肾脏副作用。药品还面临其他后勤问题 (logistical issue),包括稳定性、生产成本等。因此,需要治疗眼部感染的廉价、容易获得、被广泛接受的稳定药品。

[0147] 在一方面,本公开提供了治疗结膜炎或红眼病的组合物,其包含组合在如下面所描述的载体基质中的针对这些病原体的多克隆抗体。该抗体如本文所描述的那样生产。

[0148] 在另一个实施方案中,抗原选自引起阴道炎的那些病原生物体。该感染可能是细菌、真菌(酵母),或寄生虫引起的。细菌性阴道炎可由例如加德纳菌属某些种、淋病奈瑟氏菌、沙眼衣原体(*Chlamydiaeae trachomatis*)、支原体属某些种、空肠弯曲杆菌引起。寄生虫性阴道炎可由例如阴道滴虫引起。病毒性阴道炎可由例如 1 型或 2 型疱疹病毒引起。念珠菌性阴道炎是由念珠菌属酵母样真菌引起。现已记载了超过 170 种酵母样真菌。白色念珠菌(*C. albicans*)是 85-90% 的妇女的念珠菌性阴道炎的最常见的致病物。在其他念珠菌物种当中,光滑念珠菌(*C. glabrata*) (5-10%)、热带念珠菌(*C. tropicalis*) (3-5%)、近平滑念珠菌(*C. parapsilosis*) (3-5%) 和克柔念珠菌(*C. krusei*) (1-3%) 也具有临床意义。这些病原体中的任一种均可选作如本文所描述的多克隆抗体生产的抗原来源。

[0149] 念珠菌性外阴阴道炎经常由许多诱病因素引起,所述诱病因素例如长期无节制地使用抗生素、皮质类固醇、细胞抑制剂、口服避孕药、放射治疗、严重的传染性疾病、内分泌紊乱、免疫缺陷状态等。广谱抗生素的处方不仅抑制病原细菌,而且还抑制阴道粘膜上的腐生菌:乳酸杆菌和双歧杆菌。结果,阴道 pH 增大(趋向碱性范围),并且自我清洁过程遭到扰乱。此外,念珠菌能使用一些抗生素作为营养底物。因而,在女性生殖器官内出现对念珠菌的活跃增生有利的条件。在一方面,本公开提供了治疗阴道炎的组合物,其包含组合在如下所描述的载体基质中的针对一种或多种所述病原体的多克隆抗体。

[0150] 在具体方面,包含在载体基质中的特异性多克隆抗体混合物的本公开组合物提供了治疗细菌、病毒、真菌或寄生虫性阴道炎的广谱方法。在另一方面,本公开组合物可用来治疗有相应需要的受试者的未分化阴道炎。

[0151] 其他特异性结合分子

[0152] 本公开的组合物和方法包括其他特异性结合分子,其包括转移因子、可变淋巴细胞受体和细胞受体。转移因子是由氨基酸组成的大约 5000 道尔顿的免疫分子,其导致抗原特异性细胞-介导的免疫力,主要迟发型超敏反应并导致产生淋巴因子以及自身结合至抗原(Kirkpatrick1993,Structural nature and functions of transfer factors. Ann. N. Y. Acad. Sci. 685 :362-368.)。可变淋巴细胞受体是在诸如七鳃鳗和盲鳗的无颌脊椎动物中被发现的淋巴细胞来源的分子。这些动物具有大量可变淋巴细胞受体,其仅由少数基因产生并且以与抗体结合的方式类似的方式、以相同的特异性程度与病原抗原结合。(Alder 等人,2005, Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. Science, 310(5756) :1970-1973)。

[0153] 载体基质

[0154] 本公开提供了治疗或预防受试者的病原感染的组合物。所述组合物包含与载体基质组合的诸如多克隆抗体的特异性结合分子。虽然不意欲限制本发明的范围,但是载体基质的使用有着双重目的。首先,为了保护例如在经口施用后在其预期功能环境中,以及在非新生受试者胃肠道内的抗体;并且进一步为了提供组分,例如先天免疫系统的组分,以与管理感染的抗体协同反应。

[0155] 术语“载体基质”或保护性/反应性基质是指任何底物、化合物、制剂,或补充附加剂(不论是天然或合成的),其含有合适比例和浓度的元件、辅因子或其他组分以便提供繁殖、促进、支持或增强原位免疫型反应、级联,或反应所需的元件。这些元件可不同地促进分裂和成熟反应、组装物和复合物的形成、耗竭和吸附功能,供应必需的元件、生物制剂,或

化合物,并为活性元件或组分提供保护功能。载体基质可含有或不含有内源性抗体(免疫因子),所述内源性抗体(免疫因子)可能对靶抗原有或没有特异性。

[0156] 在一个实施方案中,载体基质选自或来源于,从非人哺乳动物获得的血清、血浆、初乳、乳、唾液、淋巴液、粘液(mucous),或泪液。

[0157] 天然存在的载体基质的实例为初乳。在哺乳动物中初乳已自然演变,专门为了向胃肠道并通过胃肠道以非常浓缩的低体积形式递送其组分至新生儿。哺乳动物在产后立即产生初乳,或“最初的乳”。抗体和辅因子从母体被传递至新生儿,并提供对抗病原体的第一层保护。生长因子还刺激肠道的发育和修复。

[0158] 初乳含有许多免疫互补因子(immuno-complimentary factor)。它们包括干扰素、免疫球蛋白(包括 IgG 和分泌型 IgA)、多形核白细胞、巨噬细胞和淋巴细胞。初乳还含有富含脯氨酸的多肽或 PRP,其是一种 T 细胞激活剂。已知,初乳与乳相比具有高的免疫球蛋白含量。已知哺乳动物的初乳含有诸如 IgA、IgG 和 IgM 的抗体。IgA 通过肠上皮被吸收,穿过血液,并被分泌到其他 I 型粘膜表面上。注意到牛初乳含有 6%至 20%的免疫球蛋白,主要 IgG<sub>1</sub>和 IgG<sub>2</sub>。在一方面,全牛初乳用作载体基质。

[0159] 初乳还有助于调节肠道环境,使其对外来病原体不利。初乳含有乳铁蛋白,乳铁蛋白是一种防止细菌和病毒获得复制所需的铁的铁结合蛋白。初乳还选择性地使某些益生菌种增殖,所述益生菌种又有助于抵御感染。它是两种主要生长因子,转化生长因子(TGF)  $\alpha$  和  $\beta$  的唯一天然来源,以及胰岛素生长因子 1 和 2 的来源。这些因子促进组织修复和发育。初乳也是刺激肠壁细胞生长和扩充的肝细胞生长因子的来源。初乳被天然地设计用作胃肠道环境中的载体基质。合成形式的载体基质也包括在本公开中。由天然和合成组分构成的载体基质也包括在本公开中

[0160] 初乳含有非常丰富的蛋白质、维生素 A 和氯化钠,但所含有的碳水化合物、脂质和钾的量比常乳低。初乳中的最相关的生物活性组分为生长因子和抗微生物因子。初乳中的抗体提供被动免疫力,而生长因子刺激肠道的发育。它们被传递至新生儿并且提供对抗病原体的第一层保护。初生儿获得来自母体的被动免疫力。

[0161] 初生儿具有非常小的消化系统,并且初乳以非常浓缩的低体积形式递送其营养素。新生儿胃肠道特别容易接受来自初乳的免疫力的被动转移。出生时,由于残留在胃里的羊水,胃内的 pH 值在 6-8 的范围内。胃的 pH 然后在 24 至 48 小时内下降至 pH 为 1.5 至 3。因此,初生儿的 GI 条件有利于被动免疫。另外,新生儿和早产儿的胃排空时间延长,在 6-8 个月的年龄时达到成人值。初乳中的抗体和辅因子可在某些情况(例如,母乳喂养)下对接受者提供被动免疫力;这对于新生儿而言尤其适用。非新生婴儿、儿童、青少年和健康成人的胃肠道是对于免疫球蛋白的经口施用较为不利的环境。

[0162] 初乳的其他免疫组分包括先天免疫系统的主要组分,如乳铁蛋白、转铁蛋白、溶菌酶、乳过氧化物酶、补体,和富含脯氨酸的多肽(PRP)。还在初乳中发现许多细胞因子(控制免疫系统运作的小信使肽),其包括白介素、肿瘤坏死因子、趋化因子,以及其他。初乳还含有许多生长因子,如胰岛素样生长因子 I 和 II,转化生长因子  $\alpha$ 、 $\beta$  1 和  $\beta$  2,成纤维细胞生长因子,表皮生长因子,粒细胞-巨噬细胞刺激生长因子,血小板源性生长因子,血管内皮生长因子,及集落刺激因子-1。

[0163] 在一方面,载体基质包含初乳的两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五



种或更多种,或六种或更多种,或七种或更多种非免疫球蛋白组分。在另一方面,载体基质包含已经过加工从而除去大部分免疫球蛋白的初乳。在实施方案中,载体基质包含至少两种从非人动物获得的选自以下组成的组的组分:酶、乳铁蛋白、转铁蛋白、非特异性免疫球蛋白、补体系统的组分、细胞因子、白血细胞、补体组分、干扰素,和纤连蛋白,其中所述至少一种特异性结合分子和所述载体基质的至少两种组分是从不同动物获得的。

[0164] 在另一方面,基质包含选自以下的两种或更多种试剂:溶菌酶、磷脂酶、防卫素、调理素、富含脯氨酸的多肽 (PRP)、 $\beta$ -溶素、乳铁蛋白、转铁蛋白、细胞因子、白介素、趋化因子、干扰素、TNF- $\alpha$ 、纤连蛋白、富含脯氨酸的多肽、胰岛素样生长因子 1 型、胰岛素样生长因子 2 型、血小板衍生生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞血小板生长因子、转化生长因子  $\alpha$ 、转化生长因子  $\beta$ 、神经生长因子、瘦素 (leptin)、白细胞、白血细胞、吞噬细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞,及树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞 (NK)、淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK)、包括防卫素的阳离子蛋白、包括弹性蛋白酶的蛋白水解酶、组织蛋白酶 G、髓过氧化物酶、NADPH 氧化酶组分,或它们的组合。在另一方面,基质包括来自先天免疫系统的试剂的混合物。在优选的方面,载体基质包含非超免疫牛初乳。

[0165] 母牛为它们的初生牛犊产生牛初乳。在许多乳牛群中,不允许牛犊吃乳;而是给它们喂初乳,后来用瓶,然后用桶喂乳。初乳被收集并被加工用于商业用途。包括初乳的各种组合物和制备初乳的工艺已公开于美国专利 US5,846,569、US6,410,058、US6,475,511,和 US6,521,277 中,该美国专利的内容以引用的方式完整地并入本文。干燥牛初乳可商购获得。在一个具体方面,载体基质是市售的干燥牛初乳。

[0166] 牲畜养殖者/饲养员通常将他们的动物的初乳储备入库。在他们自己的房舍产生的初乳被认为优于来自其他来源的初乳,因为它是由已暴露于在房舍内产生的病原体(并因而产生针对所述病原体的抗体)的动物产生的。一般来说,来自暴露于相关病原体的动物的初乳将具有优良的免疫特性。

[0167] 除了在对乳糖或其他组分不耐受或过敏的情况下之外,牛初乳及其组分供人食用是安全的。牧草喂养的母牛的牛初乳含有对许多人病原体有特异性的免疫球蛋白,所述人病原体包括大肠埃希氏菌、微小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*)、弗氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、沙门氏菌属、葡萄球菌属,和轮状病毒,这取决于它们在这些病原体中的天然暴露。在开发抗生素之前,初乳是用于对抗感染的免疫球蛋白的主要来源。

[0168] 超免疫初乳是通过用特异性病原体免疫母牛来提升天然牛初乳的功效的一种尝试。这种途径是有希望的,因为产生针对初始激发所使用的特异性病原体或抗原的抗体。然而,对抗原的变化的变化、生物变异性,和低初乳产率限制了它的临床和商业实用性。

[0169] 在一方面,本公开提供了包含初乳的组合物,所述初乳不是超免疫初乳或者不含可测量或显著量的对病原体组分或靶抗原组分有特异性的抗体。在另一方面,本公开提供了组合物,其中载体基质含有先天免疫系统的各种组分,而不含显著量的特异性或非特异性抗体。

[0170] 在一个实施方案中,可对初乳进行加工以除去大部分免疫球蛋白,所述加工例如通过以分批或柱格式使抗体吸收到亲和树脂(例如,蛋白 G 或蛋白 A 琼脂糖凝胶;或蛋白 A 或蛋白 G 琼脂糖)中,并保留洗脱液用于进一步加工来进行。免疫球蛋白也可以通过在

Sephadex G-200 或 DEAE Sephadex A-25 离子交换色谱法上的凝胶过滤色谱法除去。(Lloyd and Soulsby, Immunology, The role of IgA immunoglobulin in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. 34, 939-945) 这些过程可采用本领域中已知的各种方法和技术以柱或分批格式运行。

[0171] 在一个具体实施方案中,载体基质包括初乳。在一方面,采用市售初乳作为支撑性/反应性基质。在优选的方面,市售牛初乳是仅从最先挤出的初乳生产的附聚且速溶化、经巴氏杀菌的全脂全初乳粉。在另一方面,在低压和低温下加工初乳,并使用间接蒸汽对其进行喷雾干燥以维持最大生物活性。在另一方面,市售初乳来自不含抗生素的来源。在另一方面,针对多种病原体对初乳进行微生物学分析,发现其是阴性或低于可接受水平。在各种其他方面,针对诸如硝酸盐、黄曲霉素、硝基呋喃、二恶英、三聚氰胺和重金属的其他污染物进行初乳测定,发现其是阴性或低于规定的水平。

[0172] 在一个实施方案中,本发明可由数种经超免疫的来源的初乳组成,所述数种经超免疫的来源各靶向不同的抗原簇或类别,其中将该初乳混合以提供广谱的抗体制剂。

[0173] 在另一个实施方案中,载体基质包含重构或人造粘膜分泌物,如泪液、鼻或支气管粘液、宫颈粘液、精浆、汗水、血浆或唾液。已知体液含有变化量的数种组分。(Schenkels 等人, Biochemical composition of human saliva in relation to other fluids, Crit. Rev. Oral Biol. Med., 1995, 6(2):161-175)。唾液含有粘蛋白、酸性 PRP、 $\alpha$ -淀粉酶、碱性 PRP、碱性 PRG、分泌型 IgA、胱抑素、富酪蛋白(statherin)、IgG、腮腺外糖蛋白(EP-GP)、VEGH(脂钙蛋白(lipocalin))、组胺素(histatin)、溶菌酶、激肽释放酶(kallikrein)、乳铁蛋白、乳过氧化物酶、结合咕啉(haptocorrin)、 $\beta$ -微精液蛋白、IgM、白蛋白,及 Zn- $\alpha$ 2-糖蛋白。在一方面,载体基质包含两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种,或七种或更多种体液组分。

[0174] 泪液(Tear fluid)或泪液(lachrymal fluid)具有许多与唾液的组分相同的组分,并且具有特别高的浓度的分泌型 IgA、VEGH、溶菌酶,和乳铁蛋白。在一方面,含有诸如氯化钠等盐作为主要成分的人造泪液,或如本文领域中已知的含有羟乙基纤维素、硫酸软骨素或透明质酸或黄原胶的滴眼剂(US7, 875, 271, 其以引用的方式并入本文)中添加有两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种如所描述的体液组分,并且用作如本文所描述的纯化的多克隆抗体的载体基质。在一方面,组合物可用来治疗眼部的微生物感染如红眼病。

[0175] 宫颈粘液含有粘液素、 $\alpha$ -淀粉酶、溶菌酶、乳过氧化物酶、白蛋白和  $\beta$ -微精液蛋白。该基质通过将组分中的两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种组合来形成,该基质作为载体基质与通过本公开方法制备的空间特异性结合分子如抗细菌或抗真菌多克隆抗体一起形成组合物。

[0176] 在一方面,本公开提供了组合物,其包含能够固定水或在水中可溶胀的树胶,含有与纤维素组合的羧甲基淀粉作为渗透剂,并且在与水接触时几乎瞬间胶凝且很容易适用于阴道施用。包含本公开抗体/基质组合物的片剂可以例如包含如 US4, 808, 415 中公开的羧甲基淀粉和纤维素,该专利以引用的方式并入本文。在具体的方面,将抗细菌和抗真菌多克隆抗体组合在基质中并进行调配以提供阴道病的广谱治疗。在一方面,所述组合物用来治疗阴道细菌感染,如滴虫感染或真菌性阴道病,如念珠菌感染。

[0177] 唾液是存在于口腔中的由唾液腺产生的粘膜分泌物。唾液提供保护功能,如组织涂层、润滑、湿润,和牙齿再矿化。唾液也可利用免疫活性,抗细菌、抗病毒和抗真菌活性提供宿主防御功能。唾液还利用消化酶、食团形成和味觉提供消化活动。唾液含有各种蛋白质如组胺素,及唾液所特有的酸性富含脯氨酸的蛋白质。唾液还含有存在于其他体液中的蛋白质如溶菌酶、粘液素、富酪蛋白和免疫球蛋白。唾液含有起源于血浆的诸如白蛋白和 Zn- $\alpha$ -2-糖蛋白的蛋白质。已知牛唾液的治疗价值。(Varshney 等人,1997, Therapeutic value of bovine saliva in wound healing:a histomorphological study., Indian J. Biol. May1997, 35(5) :535-7)。在一方面,唾液组分可能可用于例如牙膏或漱口水,或其他用于经口粘膜施用的制剂中。

[0178] 支气管粘液含有粘液素、 $\alpha$ -淀粉酶、碱性富含脯氨酸的多肽 (PRP)、胱抑素、富酪蛋白、EP-GP、溶菌酶、 $\beta$ -微精液蛋白,和白蛋白。在一方面,本公开提供了包含空间特异性结合分子和载体基质的组合物,所述载体基质包含两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种唾液组分或支气管分泌物组分。在一方面,具有载体基质的组合物将与根据本公开制备的空间特异性结合分子如抗-A组链球菌多克隆抗体一起包装成干燥形式。在一方面,干燥制剂在例如盐水溶液中重构,并作为治疗链球菌性咽喉炎的咽喉部喷雾剂施用。

[0179] 可制备在其他使用环境中起作用的,例如用于雾化(吸入)、眼部、外用或其他制剂的其他载体基质。

[0180] 在具体实施方案中,特异性结合分子和载体基质来源于不同物种。在进一步的方面,特异性结合分子和载体基质都来源于非人物种。在另一方面,特异性结合分子来源于非人哺乳动物。在另一方面,载体基质来源于非人哺乳动物。

[0181] 制剂和组合物

[0182] 在一个实施方案中,从经接种动物的血浆、血清,或血液、初乳、卵,或其他组分,或人造生产系统(如细胞培养物)中收获抗体,然后加以纯化或处理,并将其添加到诸如初乳的载体基质中。将允许的组合物作用于例如抗体制剂的经口施用的递送介质。这种途径可提供以这种方式可靠地按比例缩放抗体生产用于调配,以便控制用于商业用途的滴度、一致性和连续可用性的有效方式。在一个实施方案中,从经接种动物的卵中收获抗体,并可对该抗体进行纯化或处理或将其保留在卵材料中,并将其添加到牛初乳中。

[0183] 明显需要针对许多胃肠道病原体的低成本且有效的治疗,经口施用的抗体是这个角色的候选者。除了已表现出功效之外,经口施用的抗体通常不具有免疫原性。它们通常被认为有很好的耐受性,无不良副作用的报道,并且相对而言没有与可比的摄入食品不同的反应。值得注意地,含有经口施用的抗体的数种产品已接受FDA的GRAS(一般认为安全(Generally Recognized as Safe))认证。

[0184] 本发明的一个实施方案是广谱治疗性或预防性抗毒素制剂,其由根据这种方法生产的包埋在载体基质中的广谱中和抗体混合物组成,目的是允许跨越导致毒素介导的腹泻的广泛范围的未知或未诊断病状有效施用。

[0185] 本发明的一个实施方案是包埋在载体基质中的广谱治疗性或预防性抗病原体制剂,其含有根据这种方法生产的广谱抗病原体抗体的混合物。

[0186] 本发明的一个实施方案是包埋在载体基质中的广谱治疗性或预防性抗粘附制剂,其含有根据这种方法生产的广谱抗粘附抗体的混合物。

[0187] 本发明的一个实施方案是包埋在载体基质中的广谱治疗性或预防性制剂,其含有根据这种方法生产的广谱抗毒素、抗病原体 and 抗粘附素抗体的混合物。

[0188] 使用基于天然食物的产品的一个重要限制是制剂局限于天然过程所允许的结果。本发明允许选择性地添加显著地高于正常情况下可在自然界获得的生理水平的水平的特异性抗体和一般免疫因子(制剂)。本发明还允许以确保对靶疾病、病原体或物质产生更高的特异性的方式增加各种因子的权重。

[0189] 在一个实施方案中,包含特异性结合分子的制剂是干燥固体(卵粉末)制剂。将粉末状制剂密封在任选地具有惰性气体层的密封包中。该制剂可在室温下在冷藏或冷冻温度下储存延长的时间。在其他实施方案中,将干燥组合物调配成用于经口施用的胶囊或片剂。在另一个实施方案中,将制剂压制成咀嚼片剂。

[0190] 本发明的另一个实施方案涉及用于调配组合物的药物可接受的稀释剂,其中所述药物可接受的稀释剂选自由以下组成的组:单独的乳糖、甘露醇、山梨醇、微晶纤维素、蔗糖、柠檬酸钠、磷酸二钙,或具有类似性质的任何其他成分,或其合适的组合;选自由以下组成的组的粘合剂:单独的黄芪胶、阿拉伯胶、甲基纤维素、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、淀粉或具有类似性质的任何其他成分,或其合适的组合;选自由以下组成的组的赋形剂:单独的琼脂、碳酸钙、碳酸钠、硅酸盐、藻酸、玉米淀粉、马铃薯木薯淀粉、淀粉羟乙酸钠(primogel)或具有类似性质的任何其他成分,或其合适的组合;选自由以下组成的组的润滑剂:单独的硬脂酸镁、硬脂酸钙或 steorotes、滑石、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠或具有类似性质的任何其他成分;选自由以下组成的组的助流剂:单独的胶体二氧化硅或具有类似性质的任何其他成分,或其合适的组合;选自由以下组成的组的甜味剂:例如单独的蔗糖、糖精或具有类似性质的任何其他成分,或其合适的组合;选自由以下组成的组的调味剂:单独的薄荷、水杨酸甲酯、橙风味剂、香草风味剂,或任何其他药学上可接受的风味剂,或其合适的组合;选自由以下组成的组的润湿剂:单独的鲸蜡醇、单硬脂酸甘油酯或任何其他药学上可接受的润湿剂,或其合适的组合;选自由以下组成的组的吸收剂:单独的高岭土、膨润土或任何其他药学上可接受的吸收剂,或其合适的组合;选自由以下组成的组的延迟剂:单独的蜡、石蜡或任何其他药学上可接受的延迟剂,或其合适的组合。

[0191] 在另一方面,对于非新生人的每日剂量由量化特异性抗体的任何方法标准化。在一方面,通过使用 ELISA 评价制剂中特异性抗抗原抗体的浓度来使所述组合物的剂量标准化。在一方面,对于治疗病原感染有效的经口组合物的一次剂量含有约 0.0001mg 至 20mg、0.001mg 至 15mg、0.01mg 至 10mg、0.05mg 至 5mg、0.1mg 至 1mg 混合的抗原特异性结合分子。

[0192] 术语“固体形式”是指特异性结合分子的干燥形式,或载体基质的干燥形式,或包含干燥的特异性结合分子和载体基质的固体剂型如粉末、压制片剂、锭剂,或胶囊。在一方面,固体剂型用于经口施用。在一方面,粉末是用于配制混悬液的制剂。在一方面,将粉末状干燥免疫卵和粉末状干燥初乳包装在密封包中。紧接在经口施用前,将包的内容物悬浮或溶解在约液体中并将其经口施用。

[0193] 在一方面,所述组合物也可以以用于施用的液体形式提供。

[0194] 在一方面,一次剂量含有 1g、2g、3g、4g、5g、5g、6g 或 7g 干燥免疫卵和 1g、2g、3g、4g、5g、5g、6g 或 7g 干燥牛初乳。在一方面,干燥剂型的一次剂量含有 3g 干燥免疫卵产品和 4g 干燥牛初乳。在一方面,干燥剂型的一次剂量含有 2g 干燥免疫卵产品和 4g 干燥牛初

乳。在一方面,干燥剂型的一次剂量含有 4g 干燥免疫卵产品和 4g 干燥牛初乳。在另一方面,将单剂量包的内容物溶解在约 2 盎司水中并将其经口施用。

[0195] 用于经口使用的制剂也可以被制备成锭剂、咀嚼片剂,或者被制备成硬明胶胶囊,其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合,或者被制备成软明胶胶囊,其中活性成分与水或油介质,例如,花生油、液体石蜡或橄榄油混合。使用以上在片剂和胶囊中提及的成分,以常规方式,使用例如混合器、流化床装置或喷雾干燥设备,可制备粉末和颗粒剂。

[0196] 在各种实施方案中,本公开制剂相对于现有技术提供了多种优点。在一方面,包含抗原特异性 IgY 和牛初乳载体基质的本公开制剂具有在感兴趣抗原被识别后能在约 6 周的短时间内制备完成的优势。这允许鸡免疫接种方案的易再现性和标准化。在一个具体方面,将不同群鸡各自用单一混合抗原制剂免疫接种,并然后进行组合从而获得用于治疗病原感染的广谱组合物。在一个具体方面,将三群鸡用分开的混合抗原制剂免疫接种,然后汇集从而制备用于在不需要了解致病微生物病原体的情况下治疗未分化腹泻的广谱组合物。这种方法的优点是,需要时,可根据特定的发作、区域或季节调整组合物中的抗原特异性抗体的混合物。最终,在实施方案中,为了快速制备和长期储存,不需要将特异性结合分子从全干燥卵中分离出来。

[0197] 在另一方面,本公开组合物对于经口施用治疗非新生儿的病原感染是有效的。非新生儿胃肠道的酸性非常强,并且比新生儿的吸收能力小,如本文所描述的。在本公开的实例中,所述组合物对于治疗 6 个月至 5 岁的非新生儿童的未分化腹泻是有效的。在另一方面,本公开组合物对于治疗或预防成人的旅行者腹泻是有效的。载体基质是用于与抗原特异性结合分子组合的保护性和反应性基质。在另一方面,本公开组合物以临施用前配制成混悬液的粉末状固体形式提供。在一方面,经悬浮或重构的剂型的优点是,它们对于婴儿和儿童来说非常美味,甚至当婴儿和儿童遭受病原感染的症状时。这具有使罹患病原感染的受试者容易施用和摄入全剂量的优点。

[0198] 在另一方面,在病原感染的治疗或预防中,本发明组合物可用于施加广谱被动免疫力。在一方面,对鸡的低水平的免疫可足以制备具有有效量的抗抗原特异性结合分子的组合物,从而在与载体基质一起施用产生有效的广谱制剂。

[0199] 病原感染的治疗或预防

[0200] 本公开组合物包含包埋在载体基质中的特异性结合分子。在合适的载体基质内,所述组合物可以适合于其特定免疫原性或者生物学或免疫学反应特征的任何方法施用,所述方法包括经口、静脉内、颊、鼻、粘膜、皮肤施用或其他方法。具体实施方案涉及本公开组合物的经口施用。

[0201] 在各种实施方案中,所述组合物作为预防性或治疗性组合物施用。在各种方面,所述组合物包括药学上可接受的载体。在各种方面,所述组合物不包括聚合物、共聚物、脂质体、水凝胶,或纤维蛋白。在各种方面,所述组合物不包括微球体或微胶囊。在各种方面,所述组合物不包括免疫原或抗原。本发明组合物可经由经口递送、鼻递送、眼递送(ophthalmic delivery)、眼部递送(ocular delivery)、粘膜递送或其组合施用。

[0202] 本发明的一个实施方案使用经口施用。已证明,在人和动物系统中,抗体、免疫球蛋白和其他生物免疫因子的经口(摄入)施用可对胃肠道系统的疾病、胃肠道系统中的疾

病、与胃肠道系统相关的疾病,或受胃肠道系统影响的疾病的病程、严重程度和持续时间产生可测量影响。

[0203] 将广谱抗体的混合物包埋在诸如初乳的载体基质内用于经口施用。初乳起到向抗体制剂提供协同的保护和功效属性的作用。可在载体内使用抗体的任何组合,包括但不限于抗病原体、抗毒素和抗粘附素抗体的组合。

[0204] 在一方面,本公开组合物用来治疗罹患各种病原感染的患者。所述用于经口施用的组合物和制剂可一天施用一次、两次、三次或四次,持续 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或 12 个连续日,以治疗病原感染。在一方面,所述组合物每天施用两次,持续五天,以治疗病原感染。在另一个具体方面,所述组合每天施用一次,持续三个连续日,以有效治疗非新生儿童的未分化腹泻,或治疗非新生儿童或成人的旅行者腹泻。在另一方面,所述组合物可定期施用以防病原感染。

[0205] 在通过向粘膜外用施用治疗粘膜病原感染的组合物的情况下,所述组合物可每天施用二至六次,持续 3 至 12 天。

[0206] 在优选的实施方案中,本公开提供了对于治疗非新生人的未分化腹泻有效的组合物。所述组合物利用有效的多克隆抗体生产策略(给鸡接种,通过卵收获抗体)产生靶向于数种腹泻病理致病物的高特异性抗体。在具体实施方案中,所述组合物包含在载体基质中的特异性多克隆抗体,所述载体基质为市售牛初乳。

[0207] 在优选的实施方案中,本公开提供了有效治疗未分化小儿腹泻的经济性组合物。所述组合物包含多克隆抗体(主要为 IgY)的混合物,所述多克隆抗体为对大肠埃希氏菌、沙门氏菌属某些种、轮状病毒、革兰氏阴性菌、由病原体产生的毒素,及使病原体能够附着并定殖于胃肠道中的粘附素有特异性的多克隆抗体。

[0208] 在具体方面,所述组合物包含同等重量的来自经不同抗原或不同混合抗原制剂接种的三个鸡群中的每一个鸡群的干燥免疫卵产品,将其与特定重量的市售干燥非超免疫牛初乳组合包装。在一方面,将 0.5g 至 3g、0.7g 至 2.0g、1.0g、1.3g,或 1.5g 来自每个鸡群的干燥免疫卵产品添加到单剂量包中。优选将 1.0g 或 1.3g 每种免疫卵产品添加到单剂量包中。在另一方面,将 1g 至 5g、2g 至 4g、1.5g、2.0g、2.5g、3.0g、3.5g、4.0g、4.5g 或 5g 干燥初乳添加到同一个包中。

[0209] 使用前,将包或药囊中的内容物混合在大约 2 盎司净化水或一些其他经口用液体中。将全部经重构的制剂经口施用给受试者。所述组合物可每天施用一至四次,持续二至十天。在具体实施方案中,所述组合物每天施用一次,持续 3 个连续日。本公开提供了通过每天一次持续二、三或四天地施用本公开组合物来治疗未分化小儿腹泻的方法。

[0210] 在一方面,将本公开组合物作为抗生素治疗的辅助治疗。在这个方面,所述组合物可每天施用一次,持续前三个治疗日。在另一方面,本公开组合物与口服补液溶液(ORS)一起施用。在另一方面,本公开组合物与口服锌制剂联合施用。在另一方面,将本公开组合物作为抗生素治疗的辅助物施用,以防止对抗生素有耐药性的特定病原生物体过度生长。如实施例中详细描述,所述组合物和方法有效地使未分化小儿腹泻的症状迅速消退,导致大便量、大便频率和腹泻持续时间显著减少,以及医生报告的健康状况显著改善。

[0211] 在一个替代实施方案中,本公开组合物用来治疗旅行者腹泻。TD 的发病通常发生在旅行的第一周内,但可能发生在旅行时的任何时间,甚至发生在回家之后。风险的最重要

的决定因素是旅行者的目的地。高风险的目的地是拉丁美洲、非洲、中东和亚洲的发展中国家。处于特别高的风险中的人包括青年成人、经免疫抑制的人、患有炎症性肠道疾病或糖尿病的人，及带有 H-2 阻滞剂或抗酸剂的人。大多数 TD 病例突然开始。该疾病通常导致大便的频率、量和重量增加。大便硬度发生改变也是常见的。通常，旅行者每天经历四至五次拉稀或水样排便。其他常见的伴随症状为恶心、呕吐、腹泻、腹部绞痛、腹胀、发热、尿急，和全身乏力。

[0212] 传染物是 TD 的主要病因。细菌性肠道病原体导致大约 80% 的 TD 病例。在所调查的国家中分离的最常见致病物是产肠毒素大肠埃希氏菌 (ETEC)。ETEC 导致水泻，伴随绞痛和低热，或不发热。除 ETEC 和其他细菌性病原体之外，多种病毒和寄生性肠病原体也是潜在的致病物。

[0213] 在一方面，作为旅行者腹泻的抗生素治疗的替代方案或辅助治疗，向受试者施用本公开组合物，每天一次，持续三个连续日。有限的现场研究证据揭示，在施用第一剂量的 24 或 48 小时内腹泻症状得到改善。替代地，在第 1 天每天两剂量地施用本公开组合物，接着在第 2 和 3 天施用单一剂量。在一方面，以替代的每日或每周方案，或以减少的剂量的方案施用本公开组合物以预防旅行者腹泻。

[0214] 在另一个替代实施方案中，例如，在施用益生菌之前，使用本公开组合物作为管理受试者胃肠道菌群的“益生元”。如本文所使用，术语“益生元”是指允许胃肠道微生物区系的组成和 / 或活性二者发生特定变化，其对受试者的健康状态和健康提供益处。在一方面，所述组合物可用于管理胃肠道菌群以便减少或消除一种或多种不期望的细菌菌株。在一方面，为管理胃肠道菌群而调整抗抗原免疫球蛋白组成以便减少或消除一种或多种不期望的细菌菌株。在另一方面，所述组合物用作传统益生元的辅助物。在进一步的方面，本公开组合物进一步包含可溶性纤维。在进一步的方面，所述组合物单独地用于管理菌群。

[0215] 在另一方面，本公开提供了管理受试者的胃肠道菌群的方法，其包括以下步骤：施用本公开组合物以减少或消除一种或多种不期望的细菌菌株，接着施用益生菌以引入一种或多种期望的细菌菌株。在另一方面，本公开组合物作为抗生素治疗的辅助物施用，以防止对抗生素有耐药性的特定病原生物体过度生长。

[0216] 实施例 1. 治疗腹泻的组合物

[0217] 腹泻是由包括细菌、病毒、原虫和寄生虫感染在内的广泛范围的病因引起的症状。细菌性腹泻由多种生物体引起，所述多种生物体包括各种形式的大肠埃希氏菌、沙门氏菌属、霍乱弧菌和副溶血性弧菌、志贺氏菌属、弯曲杆菌、耶尔森氏菌及其他。病毒性小儿腹泻常常由轮状病毒引起，也可能由数种其他病毒引起。

[0218] 据了解，腹泻存在多种致病生物体。这些致病生物体可组织成公共簇，其产生结构上相关的毒素，针对这些毒素可产生一系列广谱中和抗体，所述抗体在被混合成具有临床有效滴度的制剂时可用作毒素介导的腹泻的广谱的非生物体依赖性的治疗干预。

[0219] 简言之，通过给鸡接种抗原来制备对腹泻的致病生物体有特异性的抗体。收集免疫卵，并对全卵进行巴氏杀菌和喷雾干燥从而获得粉末化形式。将市售牛初乳混合成粉末化形式。将这两种粉末相继添加到单剂量包中，密封，并以干燥形式分配用作口服制剂。在施用前，将粉末状口服制剂与少量水混合，然后口服食用。

[0220] 这种治疗赋予患者被动免疫力，如本文的实施例中所证明的。所述治疗的性质使

得相关风险因素与食用来自抗体从其中被收获的来源的食物的风险因素相当（例如，风险因素将与食用卵和一瓶乳的风险因素类似）。这是一种有效的治疗，其毒性小于当前可用替代药物的毒性。

[0221] **实施例 1A.** 单独地给鸡接种来源于以下 5 种大肠埃希氏菌菌株的纯化的抗原：四种含有大肠埃希氏菌粘附菌毛抗原 F41、97P、F19 和 K99 的 ATCC 菌株，和一种来源于乳的野生型大肠埃希氏菌。仅给每只鸡接种一种抗原。每周给鸡接种一次，持续三周。初次接种使用弗氏佐剂，随后在第二次和第三次接种时使用弗氏不完全佐剂。每次接种注射两针，在左和右胸脯注射。将卵分开安置，收集卵，进行瞬时巴氏杀菌并喷雾干燥。将五种抗体制剂中的每一种以等份混合。将干燥的卵粉末抗大肠埃希氏菌抗体制剂冷冻储存约 2 年。

[0222] 给第二群鸡接种含有轮状病毒、冠状病毒和大肠埃希氏菌抗原的混合抗原制剂。如上那样执行相同的接种、收集和卵加工方案。将干燥的卵粉末抗腹泻抗体制剂冷冻储存 1.5 年。使用 ELISA 表征抗体制剂。

[0223] 将 1 克每种干燥的抗大肠埃希氏菌抗体制剂和干燥的抗腹泻抗体制剂与 3 克或 4 克市售干燥的全脂牛初乳一起包装在单剂量包中。

[0224] **实施例 1B.** 单独地给三群鸡接种以下不同混合抗原制剂中的一种：含有轮状病毒（血清型 G6 和 G10）、冠状病毒、具有 K99 菌毛粘附因子的产肠毒素大肠埃希氏菌，和 C 型产气荚膜梭菌类毒素及佐剂的第一抗原制剂；含有具有 K99、K88、987P 或 F41 粘附因子的大肠埃希氏菌的产肠毒素菌株的第二制剂；以及含有各种大肠埃希氏菌内毒素及佐剂的第三混合抗原制剂。三群鸡的每一群仅接受单一混合抗原制剂。收集卵，清洗，将其打碎，进行巴氏杀菌并喷雾干燥或热干燥从而制得三种干燥的免疫卵产品。任选地通过 ELISA 评价干燥卵产品的特异性 IgY 活性。将同等重量的三种干燥免疫卵产品中的每一种与 3g 或 4g 干燥初乳组合在单一剂量包中。如下所描述，每一单剂量包采用总重量为 2g、3g，或 4g 的干燥免疫卵产品。在一方面，市售干燥初乳没有表现出对疫苗抗原的特异性活性。

[0225] **实施例 1C.** 免疫接种鸡用于 IgY 生产

[0226] 以下免疫方案是由 Gallus Immunotech, Inc. 方案修改而来的，并且可用于制备 IgY 多克隆抗体。在免疫之前任选地收集几个卵用作基线对照。如果采用针对牛或猪的混合抗原制剂，则在施用前将它以 1 : 2、1 : 4、1 : 8，或 1 : 16 稀释。在第 0 天，给鸡注射 0.02 至 0.5mg 抗原和弗氏完全佐剂。可皮下或肌肉内注射到母鸡胸部组织的多个部位中。抗原 / 佐剂混合物的总体积可为约 1mL，其中佐剂占该体积的二分之一至三分之二。通常，在第 14、21 和 28 天，使用弗氏不完全佐剂和约初始量一半的量的抗原重复免疫。通常，可在约第 30 天检测卵中的特异性抗体。对于持续很久的抗体生产，每隔几个月给予母鸡一次加强免疫。在加工和 / 或纯化 IgY 之前，卵可冷藏储存。在一方面，在加工和 / 或纯化之前，卵可冷藏保存长达一个月或长达两个月。在另一方面，使用合适量的抗原，以类似方式在鸭、鹅、鸵鸟、鹌鹑、火鸡卵中制备 IgY。

[0227] **实施例 2.** 摄入抗体治疗艰难梭菌

[0228] 在一个实施方案中，本发明方法和组合物用来治疗艰难梭菌，艰难梭菌是一种天然存在于大多数人身体中的细菌。艰难梭菌的群体水平受到肠道的其他天然菌群的控制。当因另一种医学病状而施用的抗生素使肠道天然菌群耗尽，从而使得艰难梭菌群体能够不受抑制地繁殖时，患者常常罹患艰难梭菌感染。虽然许多艰难梭菌菌株可用专用抗生素治



疗,但越来越多的艰难梭菌菌株对抗生素治疗产生耐药性。这导致患者需要很长的恢复时间且恢复困难,并且甚至在某些情况下可能威胁生命。用所摄入的赋予被动免疫力的抗体中和艰难梭菌群体的过程能够控制艰难梭菌群体水平,从而使得天然的肠道菌群平衡能够恢复。

[0229] 与由轮状病毒和革兰氏阴性菌引起的抗腹泻制剂中的情况一样,所调配的包埋在载体基质中以特异性地与艰难梭菌或其毒素结合的抗体是一种有效的治疗途径。这种制剂可用来治疗持续感染,或防止此种感染发生。因此,所述治疗可单独地施用,或与抗生素同时施用。这种治疗不仅有利于患者从艰难梭菌发作中恢复,而且可以作为预防药施用给处于患艰难梭菌的高风险中的患者。

[0230] 中和艰难梭菌的抗体以在载体基质(用于“激活”肠道内的抗体以及提供有用的二次免疫、保护或营养的蛋白质和酶的混合物)中的形式被摄入。在一个实施方案中,通过给动物注射或接种抗原或抗原组合来生产抗体,所述抗原或抗原组后可包含或不包含在混合抗原制剂中,(潜在地与佐剂组合以引发较强的免疫反应)。

[0231] 在一方面,抗原获自或来源于艰难梭菌抗原或毒素。在另一方面,抗原组合含有一种或多种来源于艰难梭菌的抗原或毒素,及一种或多种另外的病毒抗原。在另一方面,抗原组合含有一种或多种来源于艰难梭菌的抗原或毒素,及一种或多种另外的细菌抗原或毒素。在另一方面,抗原组合含有一种或多种来源于艰难梭菌的抗原,及一种或多种另外的原虫抗原。在另一方面,抗原组合含有一种或多种来源于艰难梭菌的抗原,及一种或多种另外的真菌抗原。

[0232] 所述抗体然后可获自、分离自,或来源于动物产品,如动物的乳、卵或初乳,或者直接从动物,例如血清、血浆中收获。在具体方面,给母鸡接种抗原、抗原组合或疫苗,并且从全卵或卵黄中获取抗体,或者从经接种鸡的全卵或卵黄中取出或纯化出抗体。在另一方面,所述抗体为多克隆抗体。

[0233] 这种组合物旨在帮助治疗艰难梭菌感染,或者是对抗艰难梭菌感染的预防药。例如,该物质包含包埋在载体基质(例如初乳)中的特异性地靶向艰难梭菌的抗体。收获后,将所述抗体粉末化。也可以将载体基质粉末化。然后可将这两种粉末充分混合,或分开添加至单剂量包或小瓶中,并以干燥形式分配。在优选的施用方法中,该物质将经口通过摄入施用。为了食用,临食用前将该粉末状物质与少量液体如水、乳、果汁,或电解质溶液混合,并将按医生的指示服用。也考虑了其他递送方法。

[0234] 艰难梭菌感染的现行治疗集中在抗生素疗法上。然而,在强力抗生素是感染病因的情况下,以及在已形成对抗生素的耐药性的情况下,目前几乎没有替代治疗。本发明实施方案试图通过利用天然免疫机制而不是有毒的抗生素来中和艰难梭菌。它的优点是,在减少艰难梭菌群体水平的同时允许肠道中天然存在的菌群生长。

[0235] 将抗体组合包埋在载体基质中从而增强抗体功效,这种方法在当前没有被任何艰难梭菌疾病治疗所使用。本发明方法赋予患者被动免疫力。所述治疗的性质使得相关风险因素与食用来自抗体从其中被收获的来源的食物的风险因素相当(例如,风险因素将与食用卵和一瓶乳的风险因素类似)。这是一种有效的治疗,其毒性小于当前可用的替代药物的毒性。

[0236] 在一方面,获取、纯化并分离出所选的抗体,并将其制备成粉末化形式。在另一方

面,没有纯化或分离出所选的抗体,而将其作为完整的产品加工。例如,对从经接种鸡获得的全卵内容进行加工,例如进行巴氏杀菌,并将其制备成粉末化形式,而不需另外的纯化步骤。也将激活酶/蛋白质混合物(例如,包括初乳)制备成粉末化形式。将这两种粉末充分混合并以干燥形式分配用作口服制剂。施用前,将粉末状口服制剂与少量水混合,然后食用。

[0237] 这种治疗赋予患者被动免疫力。所述治疗的性质使得相关风险因素与食用来自抗体从其中被收获的来源的食物的风险因素相当(例如,风险因素将与食用卵和一瓶乳的风险因素类似)。这是一种有效的治疗,其毒性小于当前可用的替代药物的毒性。

[0238] 实施例 3. 摄入抗体治疗幽门螺旋杆菌

[0239] 幽门螺旋杆菌是一种革兰氏阴性菌,其可栖息于胃区中。一般认为,幽门螺旋杆菌与十二指肠溃疡和胃溃疡以及可能与胃癌关联。幽门螺旋杆菌可通过钻进具有较为中性的 pH 环境的上皮细胞表面粘液层中而逃脱胃腔内的酸性环境。幽门螺旋杆菌可产生用于结合至上皮细胞的膜相关脂质或碳水化合物的粘附素。幽门螺旋杆菌在胃区内的定殖可导致慢性胃炎,慢性胃炎是一种长期胃炎症。消化性溃疡的主要病因是幽门螺旋杆菌感染。

[0240] 获取所选择的针对幽门螺旋杆菌的抗体,并将其制备成粉末化形式。也将激活酶/蛋白质混合物(例如,包括初乳)制备成粉末化形式。将这两种粉末充分混合,或分开添加至单剂量包或小瓶中,并以干燥形式分配用作口服制剂。施用前,将粉末状口服制剂与少量水混合,然后食用。

[0241] 这种治疗赋予患者被动免疫力。所述治疗的性质使得相关风险因素与食用来自抗体从其中被收获的来源的食物的风险因素相当(例如,风险因素将与食用卵和一瓶乳的风险因素类似)。这是一种有效的治疗,其毒性小于当前可用的替代药物的毒性。

[0242] 实施例 4. 临床研究 - 在未分化腹泻中的功效

[0243] 由于致病生物体的范围广泛、用于指导治疗方案的诊断测试的数量有限,有效广泛地治疗腹泻是一个重大的挑战。对于严重腹泻的病例,现行标准干预包括普遍地施用抗生素和口服补液盐(ORS)。然而,这种途径的功效有限,并且促进耐抗生素细菌菌株的形成。

[0244] 实施例 4A. 现场研究(试验)1 和 2

[0245] 执行临床研究来评价实施例 1A 制剂在治疗未分化腹泻或加速未分化腹泻的消退中的耐受性和功效。第一项开放单中心非比较性研究总共录入 63 位 6 个月至 5 岁的两种性别的小儿腹泻儿科患者。该研究比较了测试组 A,“试验组 1”与对照组 B 的临床结果,其中测试组 A,“试验组 1”接受与抗生素和 ORS 一起施用的实施例 1A 口服制剂,而对照组 B 仅接受抗生素和 ORS。在追踪研究中,第二测试组 AA,“试验组 2”录入 33 位患者以在不同季节性条件下测试实施例 1A 制剂。

[0246] 所有参与的小儿患者都表现出如由主治医生评估的“危急的”或“严重的”腹泻特征(4 或 5 级),其采用 5 分级别(参见表 1)。没有针对小儿腹泻的致病物或病因学作出诊断鉴别。排除了排米泔水样便或排便的患者。另外,排除了已知对乳、鸡或卵产品过敏的患者。

[0247]	表 1. 5-分级别	
	1 级	5 级

	大便频率	1-2次/天	10次或更多次/天
[0248]	大便硬度	1=正常	5=完全液体
	医师评估的健康状况	1=正常	5=严重(通常住院)

[0249] 录入的儿童 (n = 63) 分为两组, 实验组研究 1, “组 A” (录入 34 位儿童; 29 位完成试验), 阴性对照“组 B”, (录入 29 位儿童; 28 位完成试验), 及研究 2 “组 AA” (录入 31 位)。接受抗生素和 ORS 的第二对照组“组 BB”用作与组 AA 并行的阴性对照, 但图中省略了结果。

[0250] 每个测试组均接受了混合在水中的 2g 组合卵粉末和 4g 初乳, 其经口施用, 每天一次, 持续三个连续日。观察每个组并收集数据五天。组 A 除了接受如由主治医师确定的抗生素和口服补液补充剂 (ORS) 的标准方案之外还接受了实施例 1 的组合物。组 B 用抗生素和 ORS 的标准方案治疗。允许研究 1 和研究 2 之间存在六个月时间窗口以测试季节性影响。这两组测试都在同一研究中心进行。在每个组中, 抗生素和 ORS 处方由主治医师根据具体病例确定 (表 2)

组	施用的疗法	完成病例数	治疗期	观察
[0251] A	实施例 1 的组合物+抗生素+ORS	29	实施例 1 的组合物: 第 1-4 天; 抗生素+ORS: 第 1-6 天	5 天
AA	实施例 1 的组合物+抗生素+ORS	31	实施例 1 的组合物: 第 1-3 天; 抗生素+ORS: 第 1-6 天	5 天
B	抗生素+ORS	28	抗生素+ORS: 第 1-5 天	5 天

[0252] 将实施例 1A 的组合物包装在 5 克粉末单一剂量药囊中。所述组合物经口施用, 将一包重悬在大约 2 盎司饮用水中。重悬完成后, 立即要求患者在一种环境下饮用全部混悬液, 在所有情况下都遵循这种方案。

[0253] 这个实施例所涵盖的如针对每位患者测量的参数包括大便频率、大便硬度和医师评估的健康状况。大便频率为监护人或医院报告的每 24 小时的腹泻排便次数。大便硬度为 1-5 级别的硬度, 其中 1 指示正常, 5 指示液体。医师评估的健康状况为 1-5 级别的总体健康状况, 其中 1 指示健康儿童的正常参数, 5 指示病情严重的儿童。

[0254] 要求参与试验的医师在六天的过程中提供他们对如由所描述的三个参数衡量的通常患者进展的诊治经验。对于每个参数, 将所报告的值聚合成单一的预期患者进展基线。既针对基于医生经验的相对于预期结果的改善, 还针对并行的阴性对照评价患者。

[0255] 利用 MS Excel 和 Matlab 进行数据分析。通过卡方检验计算统计显著性, 其中 p-值 < 0.05 视为有显著性。结果在图 1 至 3 中示出。

[0256] 在初始剂量施用的 24 小时内, 观察到接受实施例 1A 的组合物的患者有着明显改善。在初始剂量施用后的 48 小时内, 患者一般稳定在正常或接近正常水平。

[0257] 如图 1 中所示, 在施用初始剂量的实施例 1 的组合物之后, 在组 A (试验组 1) 中,

24 小时内的腹泻排便的平均次数从 9 次减少至 2 次。组 AA ( 试验组 2 ) 表现出从 10 次减少至 3 次的类似减少。相比之下,在组 B ( 阴性对照 ) 中,相同时间段的平均发作次数从 11 次减少至 10 次。在组 A 和 AA ( 试验组 1 和 2 ) 中,平均发作次数从第 3 天起一直恒定在 2 次,而组 B 逐渐减少,最终到第 5 天时出现每 24 小时发作 6 次。在组 A 中,在用实施例 1 的组合物治疗的 24 小时内,大便频率返回至接近正常水平,  $2.32 \pm 2.48$ , 胃肠道症状持续时间与对照群体相比减少超过 86% ( $P < 0.001$ )。在 48 小时内,大便频率改善至  $2.14 \pm 2.19$ 。在组 AA 中,大便频率表现出类似的稳定率,在 24 小时内改善至  $2.56 \pm 0.68$  并且在 48 小时内改善至  $2.00 \pm 0.45$ ,与对照相比有着显著改善 ( $P < 0.001$ )

[0258] 如图 2 中所示,所有患者的初始大便硬度都为液体。在施用第一剂量的组合物后,在施用初始剂量的实施例 1 的组合物后,组 A 和组 AA 大便硬度在 24 小时内改善至接近正常水平。对照组 B 硬度得到改善但在 24 小时内仍然为液体,并且在整个观察期内症状没有完全消退。组 A 在 48 小时及该研究的剩余时间内获得正常大便硬度,而组 B 到第 3 天时改善至大部分液体。组 B 最终到第 6 天时达到接近正常的大便硬度水平,而组 A 大便硬度在整个 3-6 天内保持正常。

[0259] 令人惊讶地,在用实施例 1A 的组合物治疗的 24 小时内,大便硬度率返回至轻度水平,对于组 A 为  $2.05 \pm 1.02$ ,对于组 AA 为  $1.96 \pm 0.61$ ,胃肠道症状的持续时间与对照群体相比较减少超过 86% ( $P < 0.001$ )。在 48 小时内,组 A 大便硬度进一步下降至接近正常水平  $1.41 \pm 0.9$ ,而组 AA 水平为  $1.17 \pm 0.37$ 。

[0260] 如图 3 中所示,录入研究的所有患者都被主治医师评定为病情严重,直到并包括严重脱水、呕吐和低反应。在施用第一剂量的实施例 1 的组合物之后,组 A 和组 AA 中的患者一夜之间显著改善 ( $P < 0.001$ ) 至大约为 2 的平均健康状况评估水平。在 24 小时时,组 B 患者仍然病情严重。组 A 和组 AA 患者在 48 小时时改善至接近正常并且在第三天继续改善,从而获得正常状态,而组 B 患者虽然得到改善,但病情仍然非常严重。在整个 4-6 天,组 A 中的患者保持完全恢复,而组 B 中的患者得到线性方式的改善;然而,他们在研究结束时仍然存在中度的症状。

[0261] 总体的医师报告的健康状况在一天内返回至接近健康水平,其中组 A 从初始值  $4.46 \pm 0.51$  下降至  $1.9 \pm 0.9$ ,该水平被认为在这个群体的正常参数范围内。组 AA 显示出类似的结果,从初始水平  $4.3 \pm 0.46$  下降至  $2.03 \pm 0.49$ 。这共同地表示当与对照群体相比较时疾病持续时间减少 86% ( $p < 0.001$ )。在 48 小时内,医师报告的健康状况对于组 A 进一步改善至  $1.26 \pm 0.83$ ,对于组 AA 进一步改善至  $1.4 \pm 0.49$ 。

[0262] 独立于最初的试验评价,在组 A ( 试验组 1 ) 中进行用于证实针对预期轮状病毒患病率的试验病例的正态分布的检查。收集组 A 的 29 位实验患者中的 26 位及组 AA 的 31 位患者中的 24 位的大便样品,并在独立的参考实验室使用制定的商业凝集测定法 (Slidex Rota-kit, bioMerieux, France) 进行测试。组 A 中取样的 26 位患者中的七位在轮状病毒测试中呈阳性 ( 占所测试群体的 27% )。这种小儿轮状病毒感染患病率与针对季节和允许进入本研究的腹泻病例的严重程度的预期结果一致。在组 AA 中,24 位中的四位测试呈阳性 ( 占所测试群体的 17% )。组 AA 的轮状病毒患病率略低于预期结果。因此,在被施用用于治疗包括由轮状病毒感染引起的未分化腹泻在内的未分化腹泻时,实施例 1A 组合物被视为有效。

[0263] 为了进一步确定轮状病毒阳性组 (RV) 与非轮状病毒阳性组 (非-RV) 对实施例 1 的组合物的反应的相似性, 使用皮氏积矩相关系数 (Pearson' s Product-Moment Correlation Coefficient) (表示为" R), 其强度被表示为在 -1 至 1 的范围内。R 的计算使用非-RV 和 RV 组在每个时间点的平均值, 从 6 天内每个组的平均值计算 R 值。

[0264] 对于医师评估的健康状况数据集, 有关 RV 组与非-RV 组的相关性的 R 值为 0.99029, 表明这两组之间存在非常强的线性相关性和协方差。非-RV 和 RV 患者的行为对彼此有很强的预测作用, 并且在六天的治疗和观察期间对所述治疗表现出非常相似的反应。这些结果证实实施例 1 的组合物在轮状病毒介导的腹泻病例中的功效 (表 3)。

[0265]

天	RV	非-RV
1	4.71	4.38
2	1.71	1.95
3	1.33	1.24
4	1.28	1
5	1.14	1
6	1	1

[0266] 在录入研究的 96 位患者中, 88 位完成满六天的研究期。医师让组 A 中的四位患者及组 AA 中的两位患者退出, 因为判定他们的肠炎伴有其他病状或由其他病状引起, 如表 4 中所示。在施用第二剂量的实施例 1 的组合物之后组 A 的一位患者退出试验, 因为其监护人判断其身体状况足够健康, 能退出。此外, 一位患者由于记录保存错误而从组 B 中退出 (表 4)。

[0267]

患者#	组	原因	退出决定者
A 12	实验(A)	麻疹	研究医生
A 19	实验(A)	脑膜炎	1
A26	实验(A)	患者被视为健康	监护人
A28	实验(A)	麻疹	研究医生
A33	实验(A)	脑膜炎	研究医生
B08	对照(B)	记录保存错误	研究医生

[0268] 这些结果揭示, 实施例 1 的组合物可为未分化小儿腹泻提供安全有效的治疗。降低腹泻的持续时间和严重程度将阻止显著量的与小儿腹泻相关的发病率和死亡率, 并且还可帮助防止小儿患者罹患腹泻相关的并存疾病。

[0269] 在用实施例 1 的组合物治疗 1 天后,儿科医师报告 100% 的完成试验的患者的总体健康状况得到显著改善。令人惊讶地,在用实施例 1 的组合物治疗 2 天后,疾病的持续时间和严重程度的显著降低使得腹泻发作持续时间减少 86%。独立的轮状病毒测试证实实施例 1A 的组合物在这些病例中的功效。

[0270] 在与单独的传统疗法相比较时,实施例 1A 的组合物在治疗未分化腹泻方面表现得高度有效,大大降低疾病的持续时间和严重程度。实施例 1A 的组合物具有很好的耐受性,无不良副作用。这项研究的结果显示了在苛刻的现场环境中在治疗小儿腹泻方面的重要且稳健的改进。这些结果提供了另外调查本发明组合物保护患者不受未分化腹泻的最严重症状损害的机制和生物化学的机会。

[0271] 实施例 4B. 现场研究 (试验) 3

[0272] 第三项研究试验利用试验 3 中录入的 140 位治疗患者和 30 位阴性对照患者进行。在所测试的分组 (arm) 中,所述组合物的每日剂量含有总共 2g 等份的来自三个鸡群中的每一个鸡群的干燥全卵 (所述三个鸡群中的每一个鸡群均分开地用一种市售腹泻或乳腺炎疫苗接种),和 4 克干燥牛初乳 (ES204A ;MS204A);或者 3 克同等重量份的来自三个鸡群的每一个鸡群的干燥全卵 (所述三个鸡群中的每一个鸡群均分开地用一种市售腹泻或乳腺炎疫苗接种),和 4 克干燥牛初乳 (MS304A)。另外,通过喷雾干燥 (S) 或热干燥 (T) 对卵进行加工。将鸡群安置在美国 (M) 或 (E) 内的不同地区。

[0273] 试验 3 如上所述的那样进行;患者每天用所述组合物治疗一次,持续三个连续日。试验 3 与试验 1 和 2 的平均结果的比较在图 4-9 中示出。具有 15 位患者的试验 3 的小分组每天用 2g 干燥卵和 4g 初乳治疗一次,持续两天,其在第 1 和 2 天在每个所测量参数上都显示出显著改善。这个组在第 4 天的医师报告的健康状况及第 3 和 4 天的大便硬度的症状评分上,表现出轻微的平均复发效果 (ES204B)。然而,这些值与阴性对照组相比仍然有着显著地改进。

[0274] 这些结果表明,包含特异性结合分子 (其为干燥全卵中的抗原特异性 IgY 抗体) 和载体基质 (其为非免疫性的干燥牛初乳) 的用于配制成混悬液的固体制剂是经济有效的。本公开基质,干燥牛初乳容易商购获得,并且与乳相比可提供较高水平的各种基质组分。这与 Larrison 等人的 US2010/0233162 的现有技术教导形成对比。Larsson 提供了通过局部施用在人母乳中的分离的鸡卵黄免疫球蛋白 (IgY) 来治疗和预防真菌感染的方法。至少,人母乳的使用使得 Larsson 组合物的经济性较差并且难以迅速生产和储存。进一步地,在治疗 3 天后,本公开组合物被证明能显著减少非新生儿和儿童的未分化腹泻的持续时间;非新生儿和儿童的胃肠道状况比新生儿胃肠道状况恶劣。这与 Larsson 等人的 US2006/0134101 形成对比,US2006/0134101 提供了使用禽类抗体治疗和预防初生婴儿的肠道感染的方法。这也与 Sarker 等人,2001 形成对比,Sarker 等人,2001 报道了经超免疫的鸡卵黄免疫球蛋白在患有轮状病毒腹泻的非新生儿童中的临床试验,其显示出很小的腹泻持续时间差异或没有显示出腹泻持续时间差异。(Sarker 等人,2001, Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. J. Pediatr. Gastroenterol Nutr. 32 :19-25)。

[0275] 另外,本发明组合物将含有抗原特异性 IgY 的干燥全卵与保护性和反应性载体基

质如牛初乳一起用于 (1) 保护经口施用期间的抗体, 以及 (2) 进一步激活如所描述的被动免疫力。这与 Lee 等人的 US2003/0185856 形成对比, US2003/0185856 提供了生产含有抗病原细菌特异性 IgY 的卵及含有所述 IgY 的酸乳和冰淇淋形式的组合物的方法; 然而, 没有描述保护性和反应性载体基质。酸乳和冰淇淋一般不具有足够高浓度的存在于来源于初乳的基质中的基质组分。

[0276] 与免疫调节反应不同, 所述组合物的施用效果一般可在初次施用的 6-12 小时内观察到。本公开组合物是有效的, 而不依赖于受试者的免疫反应。

[0277] 实施例 5. 临床研究 - 意想不到的对伤寒热的功效

[0278] 通过未经计划且意想不到地表现出的由未知的预先接种引起的临床功效提供要求保护的组合物的功效的证据。

[0279] 在印度的一项现场研究中, 临床上已被诊断为患有“伤寒热”的少量儿童提出治疗。伤寒热是一种最经常由一类称为伤寒沙门氏菌的细菌引起的感染。除了腹泻之外, 这种疾病的典型症状由其全身感染期引起。该细菌通常首先游入肠中, 然后游入血液中, 在这里它们可迁移至淋巴结、胆囊、肝、脾, 和其他身体部位。这些患者显示出晚期疾病的典型症状, 包括高热、全身不适感觉, 和腹痛, 及显著地, 典型皮疹 - “玫瑰斑”, 其是腹部和胸部上的小红色斑点。

[0280] 没有对这些患者执行超过大体体格检查的诊断测试, 这在这种实践环境中是典型的。虽然这些患者不适合现场研究的入选标准, 但应主治医师的请求, 出于同情给他们提供了实施例 1B 组合物。

[0281] 利用三种市售疫苗的针对鸡的标准接种方案没有具体包括沙门氏菌属的抗原, 所以预期仅具有有限的临床反应。预测由于内毒素中和作用将会出现轻微的改善, 伴随着主要腹泻症状的一些缓解, 但是对疾病本身的病程没有影响。

[0282] 令人惊讶地, 接受实施例 1B 组合物的所有伤寒热患者都在 24 至 48 小时内表现出腹泻症状的明显改善。这种改善似乎超出对单独的内毒素中和作用可预期的。然而, 更令人惊讶的是所有病例的伤寒热的全身症状也都在接下来的 24 小时内消失, 48 至 72 小时到达正常或接近正常状态。在伤寒热中, 通过治疗, 症状通常在 2 至 4 周内有所改善。

[0283] 在现场试验观察期 (5 天) 内, 没有患者出现任何疾病反弹或疾病复发。已经确证, 如果治疗不能彻底治愈感染, 则症状可能迅速地再出现。

[0284] 用实施例 1B 组合物每天一次持续三个连续日的治疗 (结合标准护理) 足以导致该疾病的症状 (GI 症状和全身症状) 都在非常短的一段时间内明显减轻。反应时间表 (timeframe) 不能用单独的自然效应或“标准护理”效应来解释。

[0285] 为了试图发现这种意想不到的功效来源, 对该生产批的生产过程的整个历史过程进行仔细地审查。发现, 作为普通但自由决定的对市售产卵鸡的接种方案的一部分, 我们所用的鸡接种了沙门氏菌属疫苗。

[0286] 虽然该鸟类在作为小鸡时接受了免疫接种, 但发现该制剂对伤寒沙门氏菌高度有效。沙门氏菌属不是实施例 1 制剂中用于鸡的接种方案中的抗原之一。注意到, 在现场试验期间, 这些伤寒热患者对本公开组合物的意想不到的反应令主治医师非常惊讶。

[0287] 实施例 6. 对卵粉末特异性 IgY 和总 IgY 的定量 ELISA.

[0288] 可通过如下所描述的经修改的 Liou 等人, 2011, J. Anim. Vet. Adv., 10(18) :

2349-2356 的方法,使用酶联免疫测定 (ELISA) 测定总 IgY 和特异性抗抗原 IgY 的抗体活性。

[0289] 将微量滴定板用 100uL 混合抗原制剂 (10ug/孔) 包被,或者针对对照孔用 100uL 家兔抗鸡 IgY 抗体 (10ug/mL, Sigma-Aldrich) 包被。将板在 4°C 下温育过夜。在用 PBS-Tween20 缓冲液洗涤之后,用 2% BSA 封闭板并将板在 4°C 下温育过夜。然后用 PBS-Tween20 缓冲液洗涤孔并用 PBS 洗涤一次。此后,将稀释的干燥卵粉末原液 (10mg/mL) 用 1% BSA 连续稀释,并将其以 100uL/孔加入到样品孔中。在供标准曲线用的孔中装入 100uL 系列稀释物例如在例如 0.015-1ug/mL 浓度范围内的标准 IgY 的连续稀释液,并将其在 4°C 下温育过夜。在用 PBS-Tween20 缓冲液洗涤后,将 100uL 碱性磷酸酶缀合的山羊抗鸡 IgY 添加到孔中,并在 37°C 下温育 2 小时。在用 PBS-Tween20 缓冲液洗涤后,将 100uL 对硝基苯磷酸二钠作为底物添加到每个孔中,并使其在 37°C 下反应 10min。使用板读取器在 405nm 处测量吸光度。标准曲线的吸光度提供了特异性抗抗原抗体 IgY 浓度的相对度量。

[0290] 为了测量总 IgY,用家兔抗鸡 IgY 抗体 (10ug/mL) 包被微量滴定板的每个孔。在如上文那样温育和洗涤后,添加 100uL 稀释的干燥卵粉末,并如上文那样进行测定。

[0291] 虽然已参考上面实施例描述本发明,但应理解,修改和更改包括在本发明的精神和范围内。因此,本发明仅由所附权利要求书限制。



平均每日大便频率

● 试验组1    ◆ 试验组2    ▲ 阴性对照

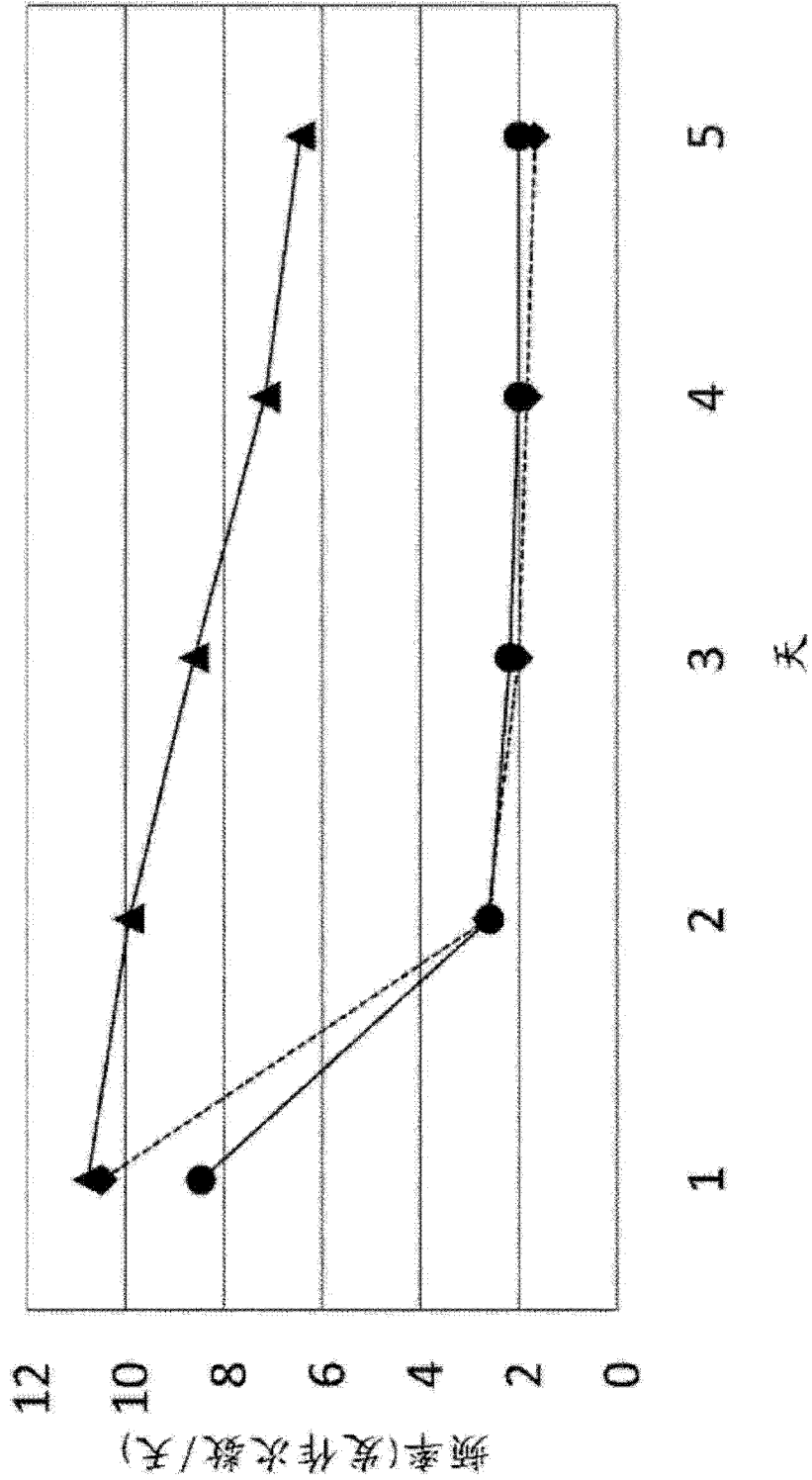


图1

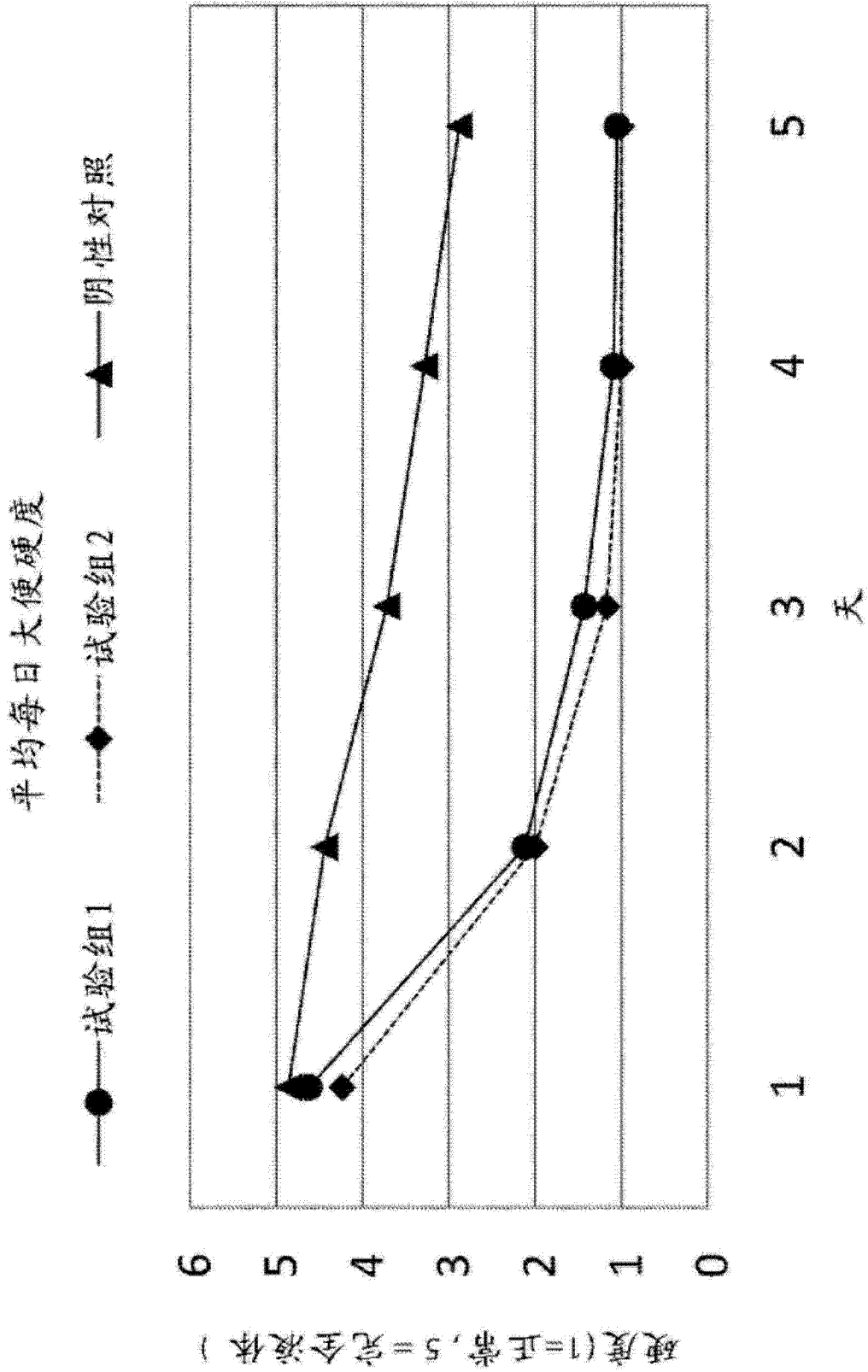


图 2

平均医生评估的健康状况

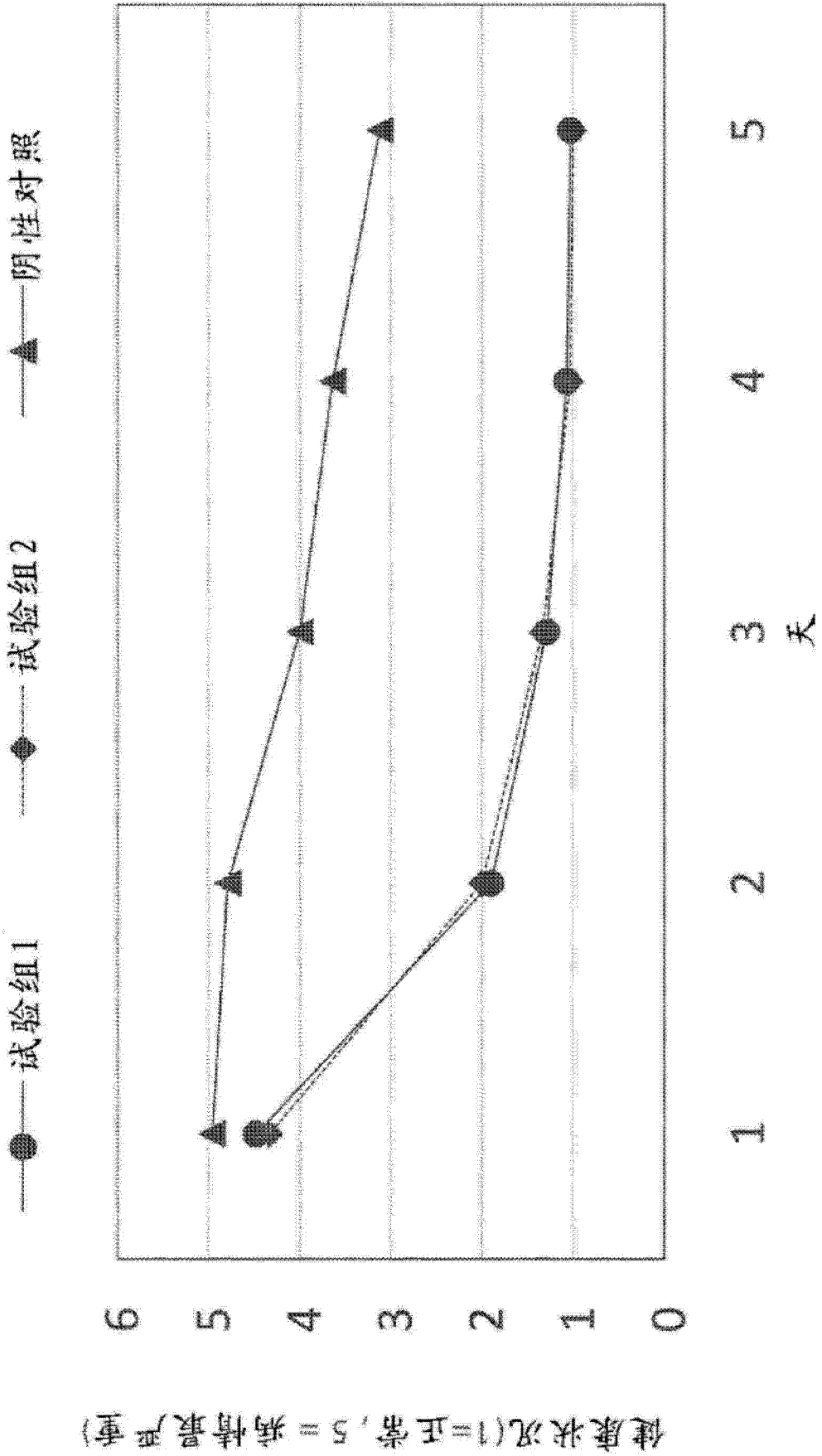


图 3

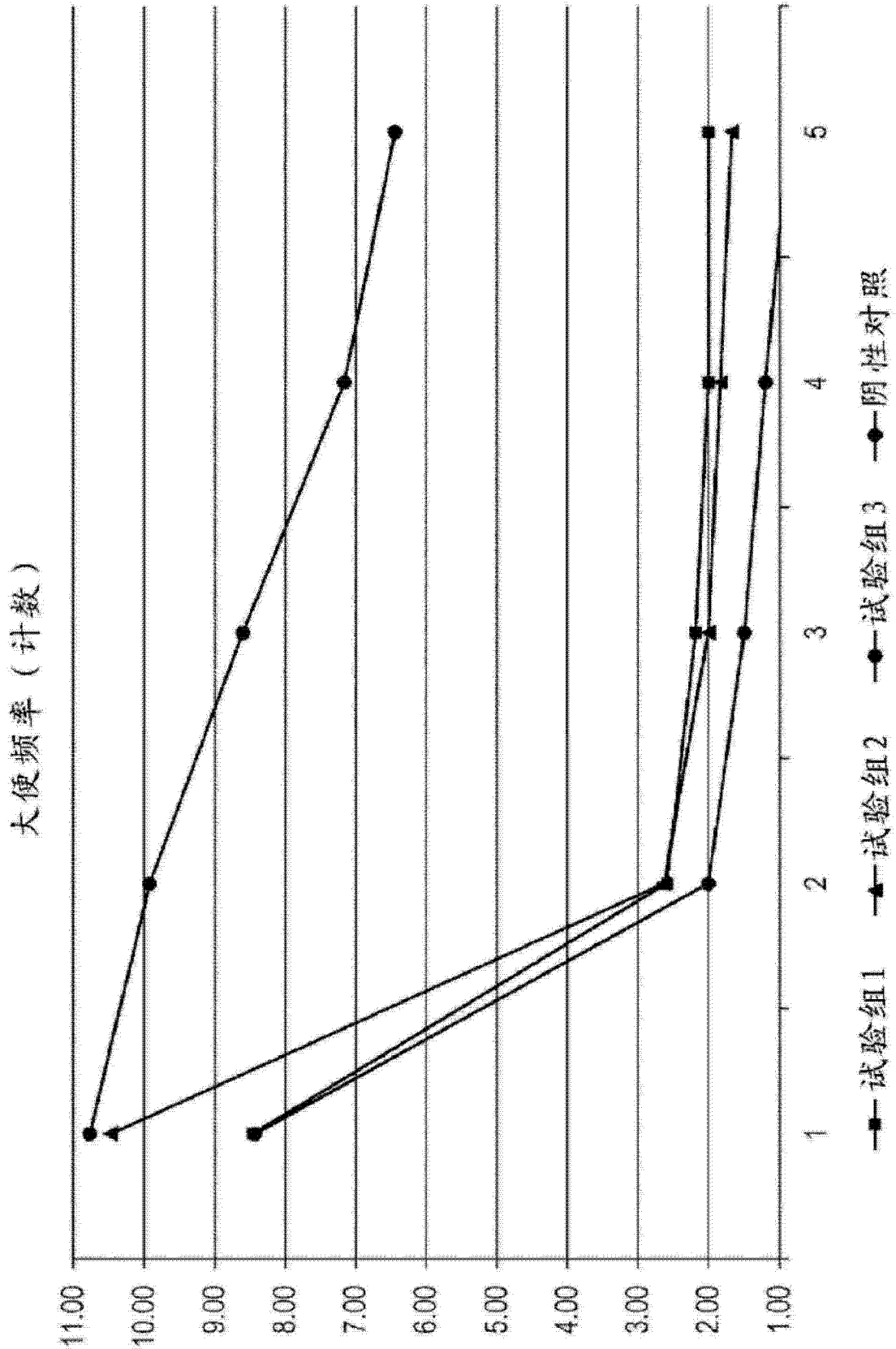


图 4

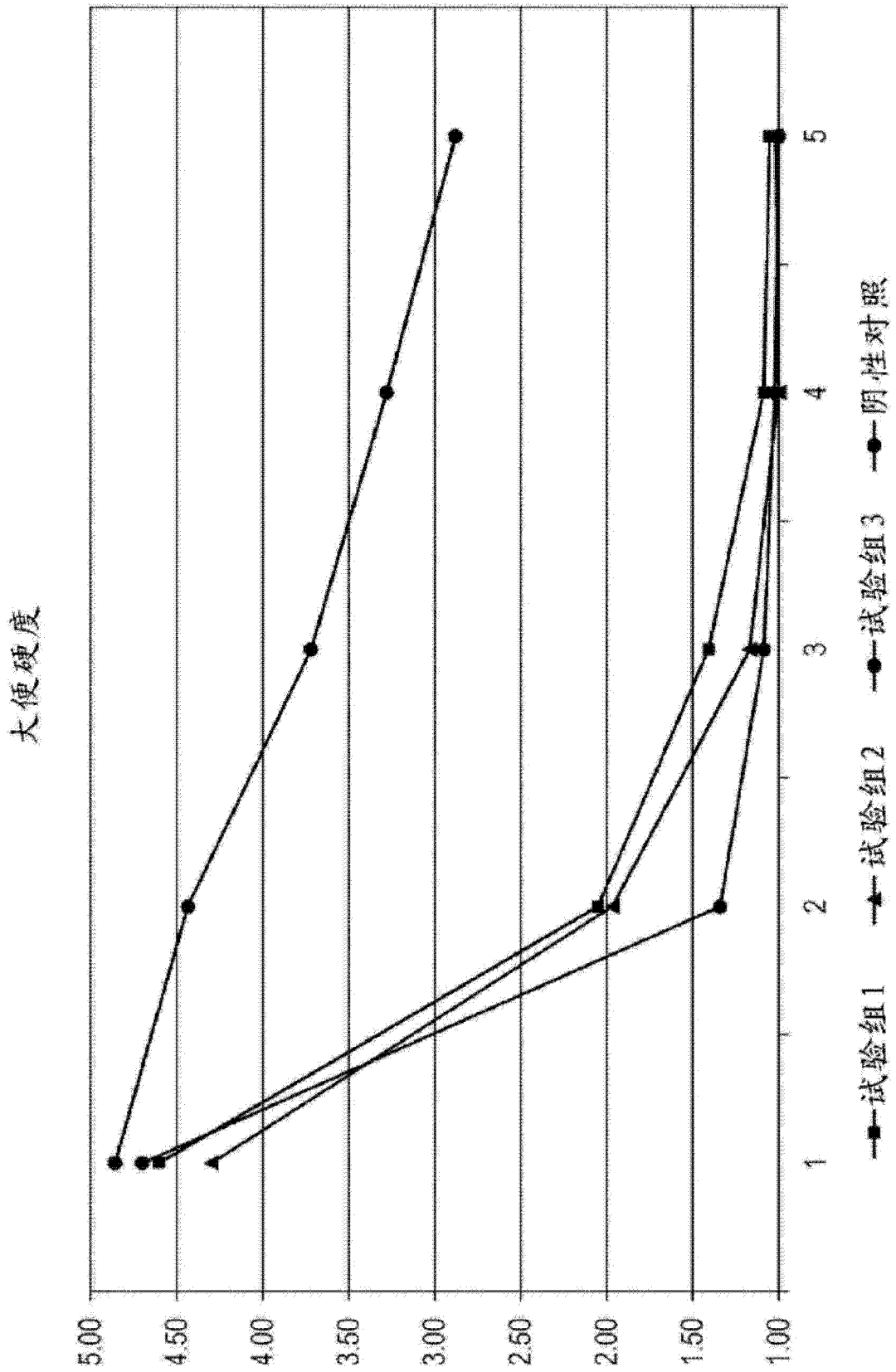


图 5

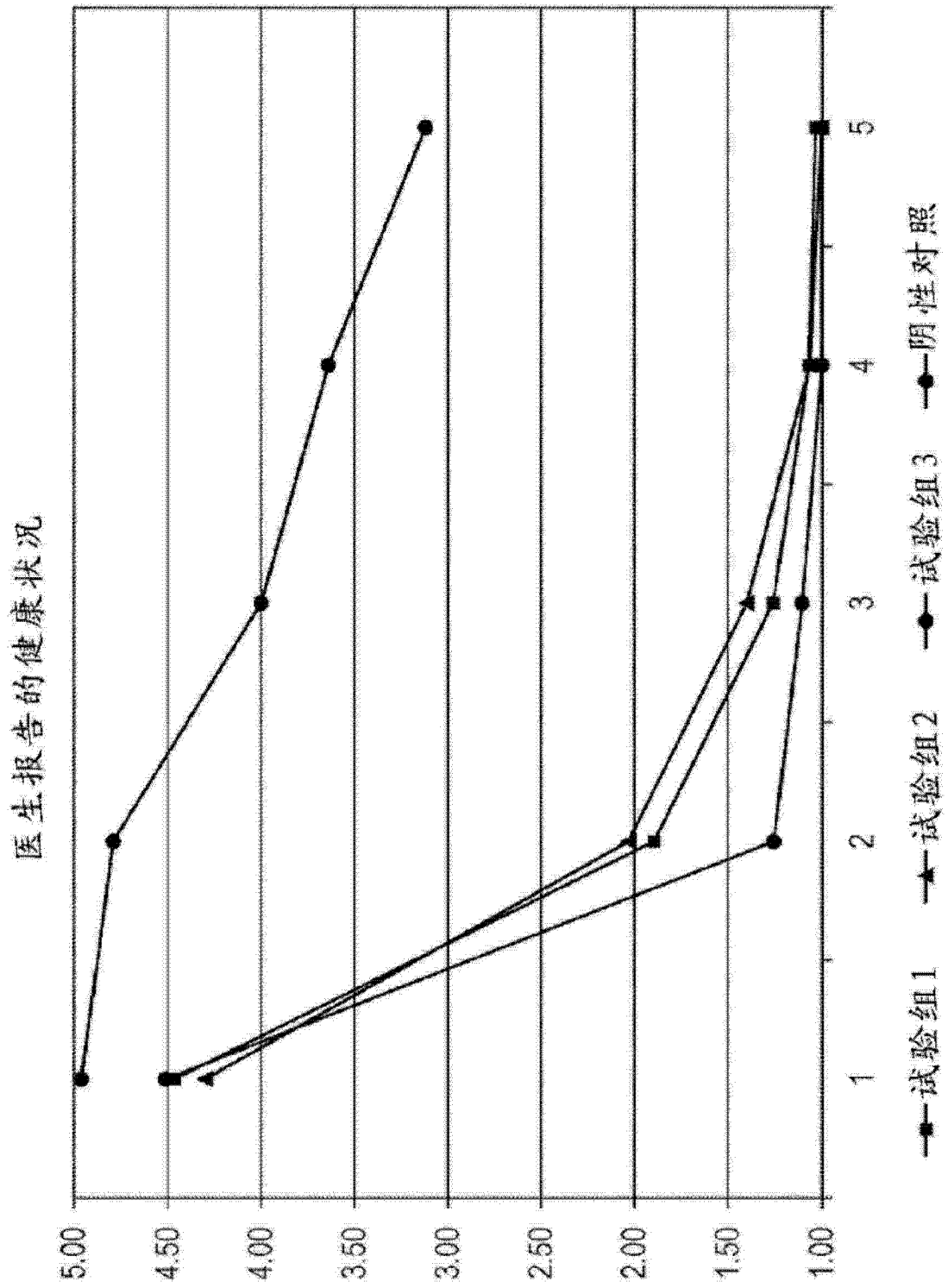


图 6

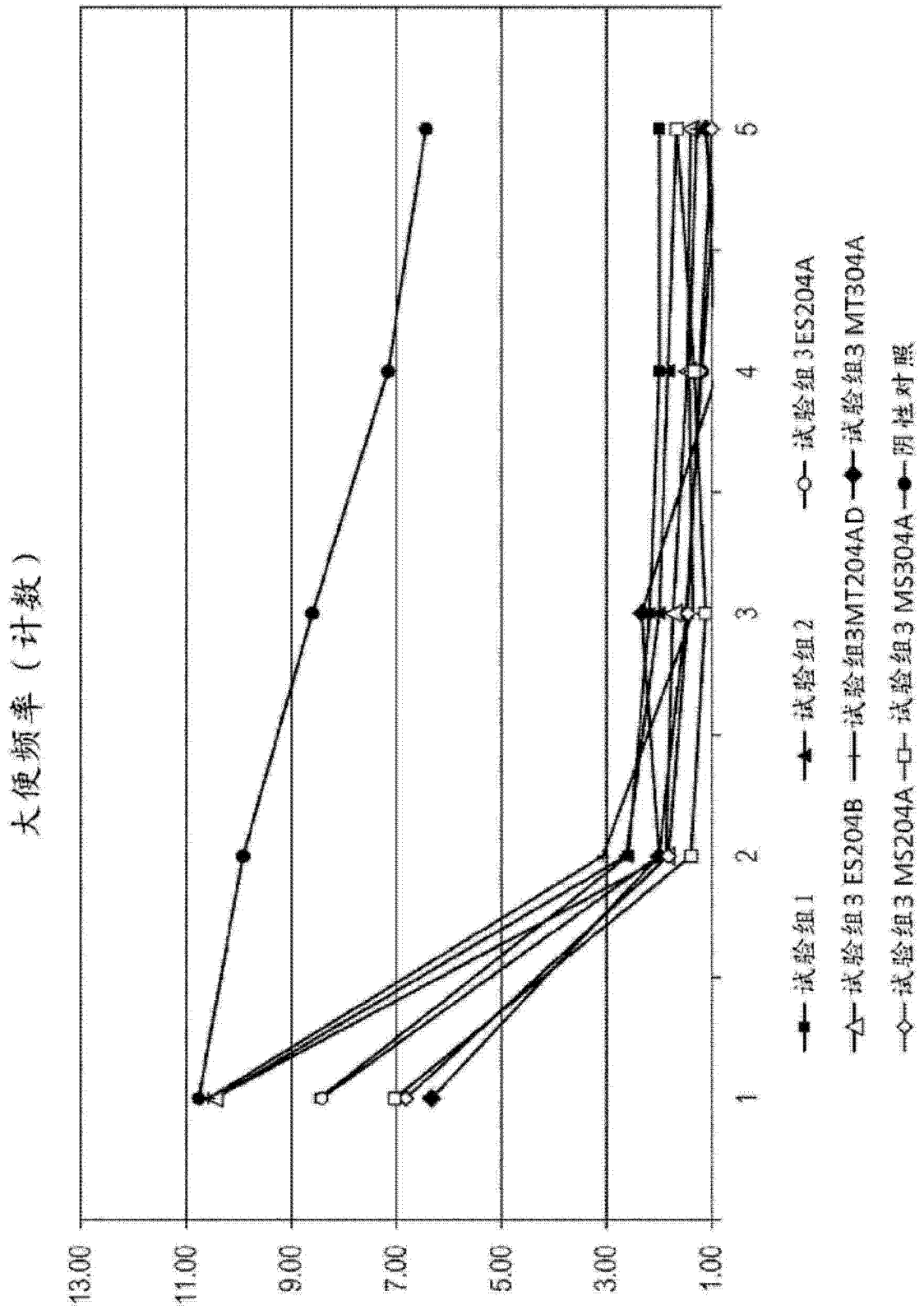


图 7

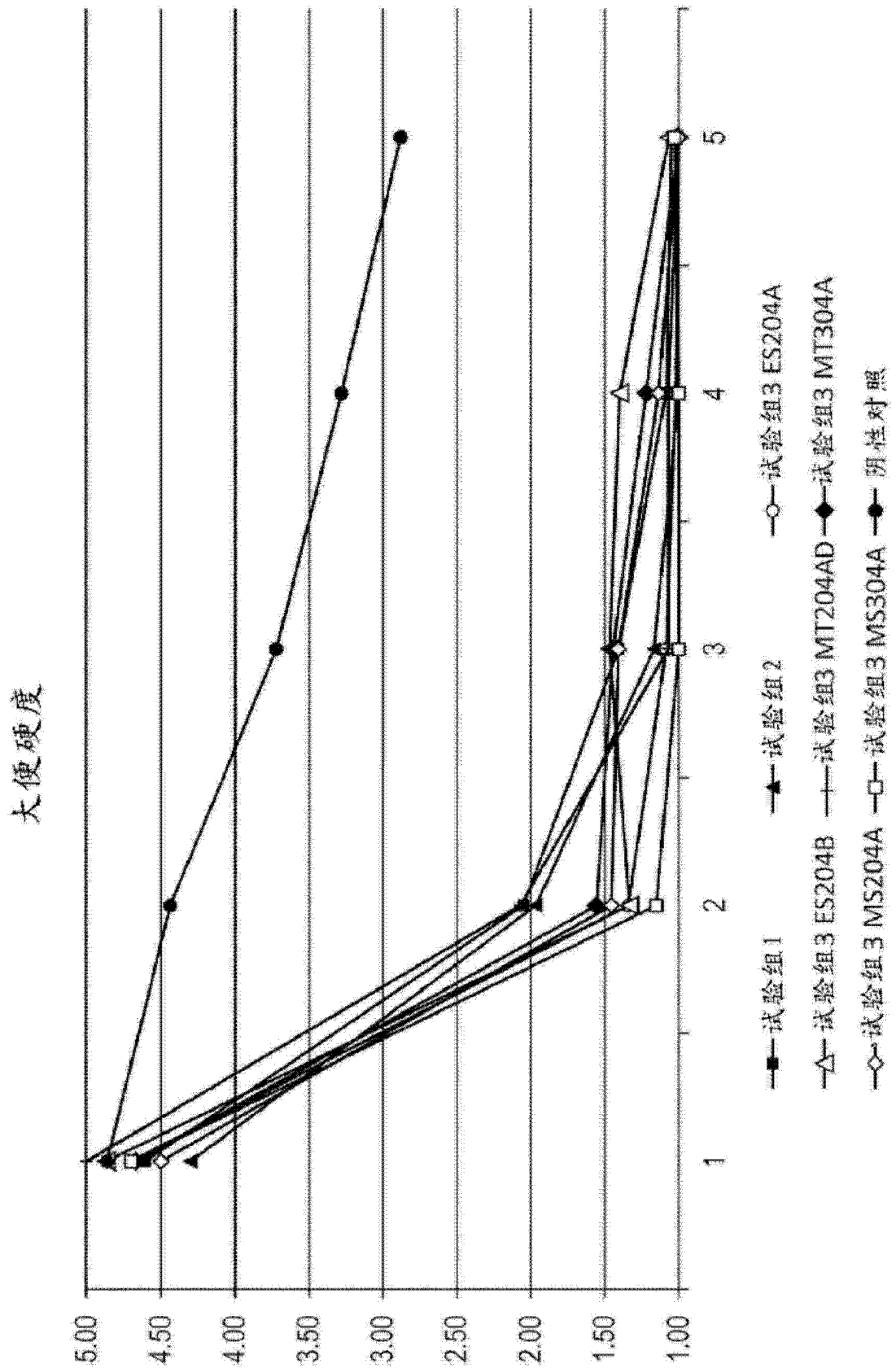


图 8



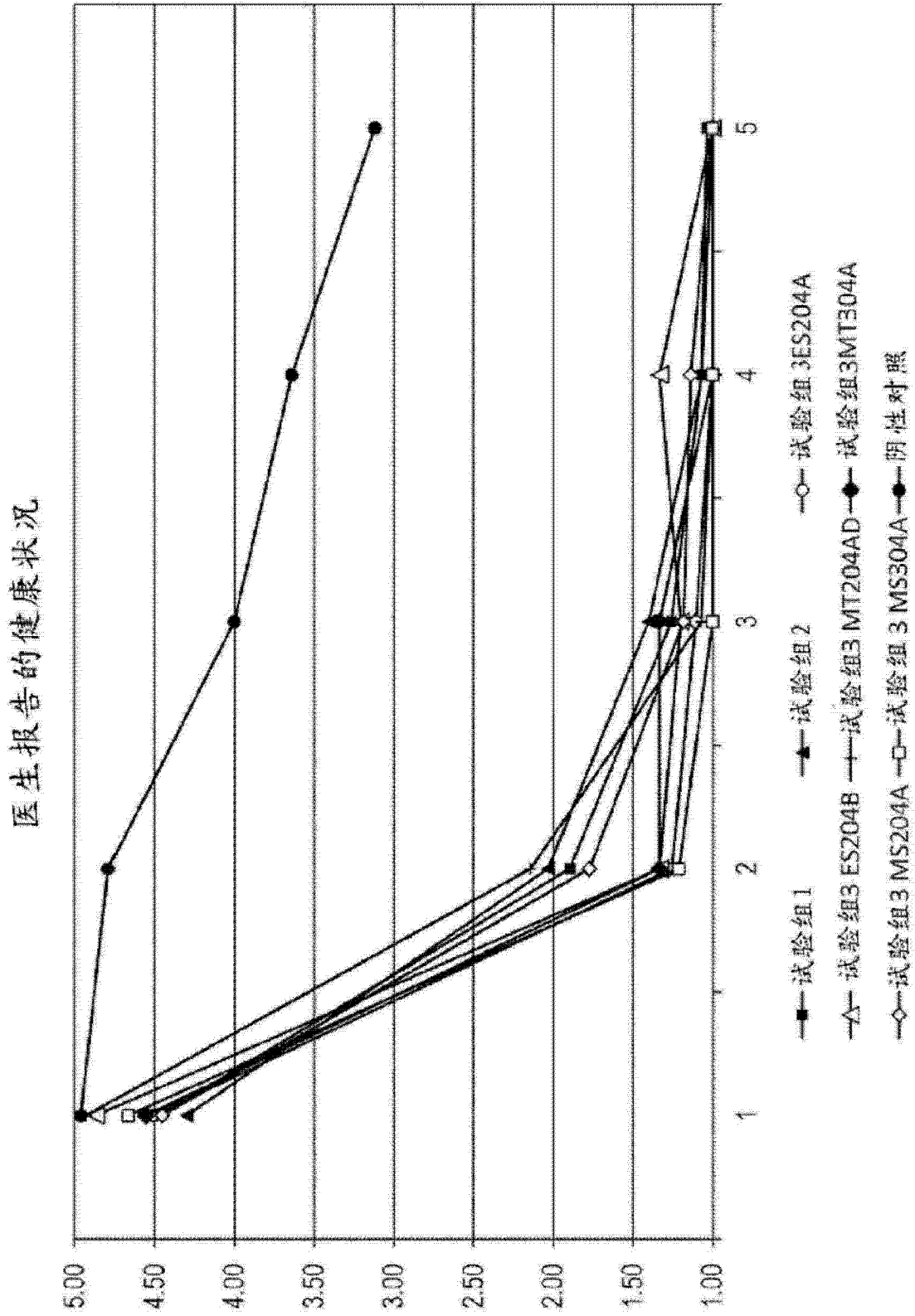


图 9