



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114901293 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 12

(21) 申请号 202080091266.5

(74) 专利代理机构 北京冠和权律师事务所  
11399

(22) 申请日 2020.11.13

专利代理师 朱健

(30) 优先权数据

10-2020-0035466 2020.03.24 KR

10-2020-0109320 2020.08.28 KR

(51) Int. Cl.

A61K 35/16 (2015.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2020/015986 2020.11.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/194038 KO 2021.09.30

(71) 申请人 安炳哲

地址 韩国大邱市

(72) 发明人 安炳哲

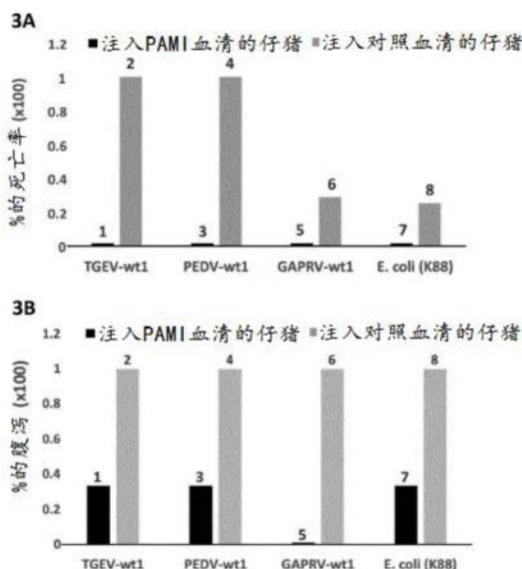
权利要求书1页 说明书17页 附图6页

## (54) 发明名称

用于预防或治疗幼小的哺乳动物得与黏膜相关的传染性疾病的血清组成物的制造方法、通过该方法制造的血清组成物及其用途

## (57) 摘要

本发明涉及一种血清的制造方法,血清包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体,该血清的制造方法包括以下步骤:将黏膜相关传染性病原体通过黏膜通道注入成体猪及牛,诱导从成体猪或牛产生能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体,并涉及一种通过将根据所述方法制造的血清注入新生或年幼的仔猪及牛犊来预防或治疗年幼的仔猪及牛犊感染传染性病原体的方法,通过本发明的方法可以成功地预防及治疗仔猪及年幼的牛犊感染黏膜相关传染性病原体。



1. 一种血清的制造方法,其特征在于,  
血清包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体,  
血清的制造方法包括以下步骤:  
将黏膜相关传染性病原体经口或鼻腔注入成体哺乳动物,诱导从成体哺乳动物产生能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体。
2. 根据权利要求1所述的血清的制造方法,其特征在于,  
哺乳动物是猪、马、反刍类或人。
3. 根据权利要求1所述的血清的制造方法,其特征在于,  
黏膜相关传染性病原体是使年幼的哺乳动物的呼吸器官、消化器官或生殖器官产生疾病的与黏膜相关的病毒或细菌性病原体。
4. 根据权利要求3所述的血清的制造方法,其特征在于,  
使年幼的哺乳动物的呼吸器官、消化器官或生殖器官产生疾病的与黏膜相关的病毒或细菌性病原体是冠状病毒、轮状病毒或产肠毒素性大肠杆菌。
5. 根据权利要求1所述的血清的制造方法,其特征在于,  
具有黏膜免疫性的保护抗体以分泌型免疫球蛋白A为主要的保护抗体,分泌型免疫球蛋白A分泌到黏膜,能够防御黏膜相关传染性病原体的感染。
6. 一种血清,其特征在于,  
包括能够防御通过权利要求1至5中的任意一项的方法制造的黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体。
7. 一种预防或治疗新生或年幼的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体的方法,其特征在于,包括以下步骤:  
将有效量的血清注入新生或年幼的哺乳动物,该血清包括能够防御权利要求6的黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体。
8. 根据权利要求7所述的预防或治疗新生或年幼的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体的方法,其特征在于,  
关于血清的注入,为了预防感染黏膜相关传染性病原体,在分娩新生哺乳动物后1小时内口服,为了预防和治疗感染黏膜相关传染性病原体,通过静脉注射给年幼的哺乳动物。
9. 一种用于预防或治疗新生或年幼的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体的兽医学组成物,其特征在于,  
包括血清作为有效成分,血清包括能够防御权利要求6的黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体。
10. 一种用于预防或治疗由于感染传染性病原体产生的疾病的药学组成物,其特征在于,  
包括血清作为有效成分,血清包括能够防御权利要求6的黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体。

## 用于预防或治疗幼小的哺乳动物得与黏膜相关的传染性疾病的血清组成物的制造方法、通过该方法制造的血清组成物及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种预防及治疗幼小的哺乳动物得与黏膜相关的传染性疾病的方法,更加详细地,涉及一种预防或治疗幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体的方法,将黏膜相关传染性病原体通过黏膜通道注入成体哺乳动物,从而从成体哺乳动物制造包括能够防御黏膜相关传染性病原体的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清,通过将根据所述方法制造的血清注入幼小的哺乳动物来预防或治疗幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体。

### 背景技术

[0002] 猪、马、反刍类等所患消化器官、呼吸器官、生殖器官感染性疾病之类与黏膜相关的传染性疾病,会诱发幼小的哺乳动物的毙死及阻碍其成长,给畜牧业造成巨大的经济损失。

[0003] 能够防御幼小的哺乳动物得传染性疾病的方法之一是从母体获得可以防御传染性病原体的保护抗体。这种从母体传递的被动免疫至幼小的哺乳动物的免疫体系足够发达时为止构成幼小的哺乳动物保护自己免受传染性病原体感染的重要手段。

[0004] 因此,从妊娠的母体诱导对传染性病原体的体液免疫然后在孕中通过胎盘或分娩后通过初乳将保护抗体传递给幼崽,这种母体疫苗接种正用作保护幼崽免受传染性病原体感染的有效方法。

[0005] 例如,针对日本脑炎病毒(Japanese B encephalitis virus,JEV)、猪瘟病毒(classical Swine fever virus,CSFV)等非黏膜相关的传染性病原体(nonmucosa-related infectious pathogen)有报告(van Oirschot JT.2003.Vet Microbiol 96:367-384;Fan YC et al.,2013.Vet Microbiol 163:248-256)提出,通过肌肉或皮下给母体接种疫苗,从母体诱导能够防御传染性病原体的感染的体液免疫,然后幼小的哺乳动物摄取包括保护抗体的母体的初乳,由此可以有效防御感染非黏膜相关的传染性病原体。

[0006] 但是,并非针对所有的传染性病原体都开发疫苗,尤其是为了防御使得消化器官、呼吸器官或生殖器官等的黏膜产生疾病的黏膜相关的传染性病原体(mucosa-related infectious pathogen)感染而通过肌肉或皮下给母体进行的疫苗接种,只在预防幼崽感染黏膜相关传染性疾病方面有有限的效果。例如,产肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic Escherichia coli,ETEC)、猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus,TGEV)、猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus,PEDV)、A群猪轮状病毒(Group A porcine rotavirus,GAPRV)、牛冠状病毒(Bovine coronavirus,BCoV)以及牛A群轮状病毒(Bovine group A rotavirus,BGARV)等黏膜相关传染性病原体,通过肌肉接种疫苗的母体的血清对黏膜相关传染性病原体表现出高的病毒中和(viral neutralization,VN)或细菌凝集(agglutination,AG)效价,但是没有有效地保护摄取接种

了疫苗的母体的初乳的仔猪及牛犊免受黏膜相关传染性病原体的感染。

[0007] 作为用于克服这一点的另一方法,尝试对仔猪注入源自卵黄的免疫球蛋白Y (IgY, immunoglobulin Y) 及源自奶牛初乳的抗体等,以及对牛犊注入针对黏膜相关传染性病原体的高免疫血清,但是事实是这些也没有取得令人满意的结果。

[0008] 因为没有有效的预防及治疗黏膜相关传染性病原体感染的方法,所以在仔猪及牛犊等中持续发生伴随高感染率及致死率的黏膜相关传染病,并且考虑到约10亿、15亿只猪及牛的饲养头数 (Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, 联合国粮食及农业组织) 等时,幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体是导致世界畜牧业遭受重大经济损失的主要原因。因这些原因,实情是迫切需要开发能够预防并治疗包括仔猪及牛犊在内的哺乳动物得黏膜相关(呼吸器官、消化器官及生殖器官) 传染性疾病的更为有效的方法。

[0009] 另外,俄罗斯注册专利RU2438709C1号公开了“一种抵抗由牛传染性鼻气管炎病毒、副流感病毒、轮状病毒、冠状病毒和粘膜型腹泻病毒引起的牛疾病的血清,具有多特异性、高免疫性,以及预防和治疗由牛传染性鼻气管炎病毒、副流感病毒、轮状病毒、冠状病毒和粘膜腹泻病毒引起的疾病的方法”,俄罗斯注册专利RU2396979C2号公开了“一种抗牛群体性病毒疾病的超免疫多价血清”,但是没有记载本发明中的包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清,以及包括具有黏膜免疫性的保护抗体的血清组成物的制造方法。此外,通过实验结果确认了,将根据所述方法制造的血清,即通过非黏膜通道将传染性病原体或病原体的一部分注入成体牛而制造的血清,注入牛犊时,通过这种方法制造的血清的注入在保护牛犊免受黏膜相关传染性病原体感染方面没有效果 (Selim et al., 1995. Vaccine 13:1454-1459)。

## 发明内容

[0010] 本发明在上述要求下提出,其目的在于,提供一种包括能够防御幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清及从成体哺乳动物诱导·产生该血清的方法,并提供一种通过将产生的血清注入新生或幼小的哺乳动物来预防或治疗幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体的方法。

[0011] 作为用于实现所述目的的手段,本发明提供一种通过将幼小的哺乳动物的黏膜相关传染性病原体通过黏膜通道注入成体哺乳动物 (PAMI血清供体) 来从成体动物制造包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清的方法。

[0012] 本发明作为包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清 (the serum harboring protective antibodies with mucosal immunity against infectious pathogens, PAMI血清), 更加具体地,提供一种包括分泌型免疫球蛋白A作为主要的保护抗体的血清,分泌型免疫球蛋白A能够防御黏膜相关传染性病原体的感染,分泌在黏膜上,具有黏膜免疫性。

[0013] 本发明提供一种通过将根据所述方法诱导生成的有效量的血清在有效的时间内通过口服或静脉注入新生或幼小的哺乳动物来预防或治疗新生或幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体的方法。

[0014] 本发明的预防及治疗仔猪及小牛犊感染黏膜相关传染性病原体的方法,考虑到因

感染黏膜相关传染性病原体导致仔猪及牛犊成长受阻及毙死、国内外的猪及牛的饲养头数等时,不仅在韩国国内而且在全世界猪牛畜牧业表现出巨大的经济效果。

[0015] 本发明中,包括能够防御各不相同的多种黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清(PAMI血清)可以通过将各不相同的多种黏膜相关传染性病原体注入一个体(PAMI血清供体)后从该个体持续诱导、维持及产生。

[0016] 本发明的例示中,可以预防及治疗仔猪及牛犊感染各不相同的黏膜相关传染性病原体的本发明的方法,不仅适用于例示中使用的仔猪及牛犊的黏膜相关传染性病原体(TGEV,PEDV,GAPRV,BCoV,BGARV,E.coli),而且适用于引起消化器官、呼吸器官及生殖器官等发生疾病的仔猪及牛犊的所有黏膜相关传染性病毒及细菌性病原体,从而可以用于预防及治疗这些黏膜相关传染性病原体的感染。

[0017] 本发明中,通过增加注入仔猪及牛犊的血清(PAMI血清)的用量或针对传染性病原体的血清效价等,可以调整保护注入了血清的仔猪及小牛犊免受传染性病原体感染的被动免疫时间。

[0018] 本发明中,适用于各不相同的两种哺乳动物(仔猪及牛犊)来预防及治疗黏膜相关传染性病原体的感染的本发明的方法,不仅可以适用于猪、牛,而且可以适用于具有相似免疫体系的马、猪、反刍类、人等所有哺乳动物,可以用于预防及治疗幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体。

[0019] 本发明的注入了血清的仔猪可以早日与母猪隔离并成长,因此可以解决母猪压死仔猪、多产母猪的母乳量不足等问题,使得仔猪的断奶仔猪数(Piglet per Sow per Year, PSY)增加。

[0020] 本发明的方法不仅可以代替现有的疫苗适用于具有相似免疫体系的所有哺乳动物,防御幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体,而且可以用作预防及治疗现有的疫苗无法解决的黏膜相关传染性病原体感染的方法。

## 附图说明

[0021] 图1A至图1C是示出成猪血清的病毒中和(viral neutralization,VN)及细菌凝集(agglutination,AG)效价的图。成猪在26周期间每周经口感染传染性病原体[TGEV(175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1、E.coli(K88、K99、F18)],从成猪分别收集了感染传染性病原体之前(0周)的血清(control serum,对照血清)及感染传染性病原体之后(26周)的血清(PAMI serum,PAMI血清)。此外,从通过肌肉接种了传染性病原体(PEDV-sm98或KPEDV-9)疫苗的一头成猪分别收集了接种疫苗前的血清(control serum,对照血清)及接种疫苗后的血清(vac-control serum,vac-对照血清)。感染传染性病原体前的成猪血清(对照血清)、感染传染性病原体26周后的成猪血清(PAMI血清)、接种疫苗前的成猪血清(对照血清)、接种疫苗后的成猪血清(vac-对照血清)的对于TGEV(175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1的VN效价及对于E.coli(K88、K99、F18)的AG效价,根据材料及方法进行了考察。各图表上的数字标示代表相应列(柱)。

[0022] 图1A是分别示出成猪(阉猪)经口感染TGEV(175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1或E.coli(K88、K99、F18)之前及之后从成猪收集的血清

(分别是对照血清及PAMI血清)的对于TGEV (175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1的VN效价及对于E.coli (K88、K99、F18)的AG效价的图。

[0023] 图1B是分别示出成猪(母猪)经口感染TGEV (175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1、E.coli (K88、K99、F18)之前及之后从成猪收集的血清(分别是对照血清及PAMI血清)的对于TGEV (175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1的VN效价及对于E.coli (K88、K99、F18)的AG效价的图。

[0024] 图1C是分别示出接种疫苗(PEDV-sm98、KPEDV-9)后的成猪血清(vac-对照血清)及接种疫苗前的成猪血清(对照血清)的对于PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1的VN效价的图。

[0025] 图2是示出成牛血清的病毒中和(viral neutralization, VN)及细菌凝集(agglutination, AG)效价的图。成牛在12周期间每周经口感染传染性病原体[BCoV-wt1、BCoV-vac、BGARV-wt1、BGARV-vac及E.coli (K99)],从成牛分别收集了感染传染性病原体之前(0周)的血清(对照血清)及感染传染性病原体之后(12周)的血清(PAMI血清)。感染传染性病原体前的成牛血清(对照血清)、感染传染性病原体12周后的成牛血清(PAMI血清)的对于BCoV-wt1、BCoV-vac、BGARV-wt1、BGARV-vac的VN效价及对于E.coli (K99)的AG效价,根据材料及方法进行了考察。各图表上的数字标示代表相应列(柱)。

[0026] 图3A及图3B是示出注入了对照血清及PAMI血清的仔猪传导感染传染性病原体后观察到的临床症状的图。在各个仔猪组中,对照血清经口注入给注入对照血清的仔猪(control serum-fed piglets)组仔猪,PAMI血清经口注入给注入PAMI血清的仔猪(PAMI serum-fed piglets)组仔猪后,根据记述的材料及方法,A组仔猪感染了TGEV-wt1、B组仔猪感染了PEDV-wt1、C组仔猪感染了GAPRV-wt1、D组仔猪感染了E.coli (K88),并观察了仔猪的临床症状。各图表上的数字标示代表相应列(柱)。

[0027] 图3A是示出注入了对照血清及PAMI血清的各仔猪组中传导感染了TGEV-wt1的A组仔猪、传导感染了PEDV-wt1的B组仔猪、传导感染了GAPRV-wt1的C组仔猪以及传导感染了E.coli (K88)的D组仔猪的致死率的图。

[0028] 图3B是示出注入了对照血清及PAMI血清的各仔猪组中传导感染了TGEV-wt1的A组仔猪、传导感染了PEDV-wt1的B组仔猪、传导感染了GAPRV-wt1的C组仔猪以及传导感染了E.coli (K88)的D组仔猪的腹泻发生率的图。

[0029] 图4A至图4D是示出分娩前后收集的母猪血清的对于传染性病原体的VN及AG效价的图。血清是在分娩前后从四头初产母猪(母猪1、母猪2、母猪3、母猪4)收集的,收集的血清的对于TGEV (175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1的VN效价及对于E.coli (K88、K99、F18)的AG效价,根据记述的材料及方法进行了测量。各图表上的数字标示代表相应列(柱)。

[0030] 图4A是分别示出分娩前后收集的母猪1血清的对于TGEV (175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1的VN效价及对于E.coli (K88、K99、F18)的AG效价的图。

[0031] 图4B是分别示出分娩前后收集的母猪2血清的对于TGEV (175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1的VN效价及对于E.coli (K88、K99、F18)的AG效价的图。

[0032] 图4C是分别示出分娩前后收集的母猪3血清的对于TGEV (175L)、TGEV-wt1、PEDV-

sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1的VN效价及对于E.coli (K88、K99、F18)的AG效价的图。

[0033] 图4D是分别示出分娩前后收集的母猪4血清的对于TGEV (175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1的VN效价及对于E.coli (K88、K99、F18)的AG效价的图。

[0034] 图5是示出注入了对照血清及PAMI血清的牛犊传导感染传染性病原体后观察到的临床症状的图。在各个牛犊组中,对照血清经口注入给注入对照血清的牛犊(control serum fed calves)组牛犊,PAMI血清经口注入给注入PAMI血清的牛犊(PAMI serum fed calves)组牛犊后,根据记述的材料及方法,A组牛犊感染了BCoV-wt1、B组牛犊感染了BGARV-wt1、C组牛犊感染了E.coli (K99),并观察了牛犊的临床症状。各图表上的数字标示代表相应列(柱)。

[0035] 图6是示出分娩后PAMI血清经口注入仔猪的时间和传导感染传染性病原体(PEDV-wt1)的仔猪的临床症状的图。针对相同腹内的仔猪按照分娩后1小时内“0小时组仔猪(n=3)”、分娩后12小时内“12小时组仔猪(n=3)”、分娩后18小时内“18小时组仔猪(n=3)”分别经口注入PAMI血清。从分娩3日后至产后28日止观察注入了PAMI血清的各组仔猪根据记述的材料及方法传导感染PEDV-wt1( $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>/一只仔猪)后的致死率及腹泻发生率。各图表上的数字标示代表相应列(柱)。

[0036] 图7是示出分别感染了BCoV-wt1、BGARV-wt1及E.coli (K99)并出现腹泻症状的牛犊组中注入了对照血清或PAMI血清后牛犊的腹泻症状恢复率的图。根据记述的材料及方法,分别向传导感染了BCoV-wt1的牛犊(n=6)注入对照血清(n=3)及PAMI血清(n=3)、向传导感染了BGARV-wt1的牛犊(n=6)注入对照血清(n=3)及PAMI血清(n=3)、向传导感染了E.coli (K99)的牛犊(n=6)注入对照血清(n=3)及PAMI血清(n=3),并观察了牛犊的临床症状。各图表上的数字标示代表相应列(柱)。

[0037] 图8A及图8B是示出发生了PEDV的农场中注入了PAMI血清的仔猪组(n=280)及注入了vac-对照血清的仔猪组(n=9)的临床症状的图。发生了PEDV的农场中,根据记述的材料及方法,在分娩后1小时内经口分别将PAMI血清注入给注入PAMI血清的仔猪组(n=280),将vac-对照血清注入给注入vac-对照血清的仔猪组(n=9)后,至产后28日止观察了仔猪的临床症状。各图表上的数字标示代表相应列(栏)。NA(not applicable):不适用。

[0038] 图8A是示出发生了PEDV的农场中注入了PAMI血清的仔猪及注入了vac-对照血清的仔猪的致死率的图。

[0039] 图8B是示出发生了PEDV的农场中注入了PAMI血清的仔猪及注入了vac-对照血清的仔猪的腹泻发生率的图。

## 具体实施方式

[0040] 仔猪及牛犊的主要黏膜相关传染性病原体,即TGEV、PEDV、GAPRV、BCoV、BGARV、Enterotoxogenic E.coli等,会诱发仔猪及牛犊各种各样的感染率及伴随致死率的严重腹泻。因此,仔猪及牛犊的成长阻碍及死亡成为给养猪及养牛畜牧业造成巨大经济损失的原因,但还没有开发出能够防御这种黏膜相关传染性病原体的感染的有效的方法。

[0041] 作为解决这一问题的例子,本发明将仔猪的各不相同的黏膜相关传染性病原体

(TGEV、PEDV、GAPRV、ETEC等)通过黏膜通道(经口)注入成猪,从而诱导、生产包括能够防御黏膜相关传染性病原体的保护抗体的具有黏膜免疫性的血清(PAMI血清),经口将生产的PAMI血清在分娩后初期注入新生仔猪时,注入了PAMI血清的仔猪可以防御各不相同的黏膜相关传染性病原体的传导感染。此外,发生了PEDV的农场中,将PAMI血清注入新生仔猪时,注入了PAMI血清的仔猪防御了PEDV感染,发生了PEDV的农场成功终止了PEDV扩散。

[0042] 为了考察像这样可以防御黏膜相关传染性病原体的感染的本发明的方法是否可以同样适用于具有相似免疫体系的其他哺乳动物,对牛犊实施了另一例子。将牛犊的各不相同的黏膜相关传染性病原体BCoV、BGARV、E.coli(K99)通过黏膜通道(经口)注入成牛,从而诱导、生产包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的保护抗体的血清(即,PAMI血清),经口将生产的PAMI血清注入新生牛犊后实施黏膜相关传染性病原体[BCoV-wt1、BGARV-wt1及E.coli(K99)]的传导感染时,注入了PAMI血清的牛犊防御了各不相同的黏膜相关传染性病原体的感染。此外,将PAMI血清通过静脉注入因各不相同的黏膜相关传染性病原体[BCoV-wt1、BGARV-wt1及E.coli(K99)]的传导感染引起腹泻的牛犊时,注入了PAMI血清的牛犊的腹泻得到治疗。

[0043] 在像这样预防或治疗黏膜相关传染性病原体的感染时,本发明的方法可以适用于各不相同的两哺乳动物,此外,通过实验确认了适用于各不相同的多种黏膜相关传染性病原体并能够预防及治疗幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体,由此完成了本发明。这一结果揭示了,本发明的方法不仅可以适用于在预防或治疗黏膜相关传染性病原体的感染时在例子中使用的猪及牛,而且可以适用于包括反刍类动物、马、人等具有相似免疫体系的所有哺乳动物,此外可以适用于例子中使用的仔猪及牛犊的黏膜相关传染性病原体和所述的所有幼小的哺乳动物的黏膜相关传染性病原体。

[0044] 本发明中,术语“血清”指的是血浆中除去纤维蛋白的剩余部分,根据本发明的血清(PAMI血清)中包括具有黏膜免疫性的保护抗体,其能够防御因注入成体哺乳动物的传染性病原体诱导免疫反应的黏膜相关传染性病原体的感染。

[0045] 根据本发明的血清的制造方法中,所述黏膜相关传染性病原体,作为虽对成猪(或牛)具有感染性但诱发无症状或轻微的临床症状,而对仔猪(或小牛犊)诱发严重的临床症状的具有感染性及病原性的野生株或毒性减弱了的病毒或细菌,是诱发仔猪(或小牛犊)的消化器官、呼吸器官、生殖器官等产生疾病的黏膜相关病毒及细菌性病原体。

[0046] 根据本发明的血清的制造方法中,黏膜相关传染性病原体的注入用量作为虽对成猪(或牛)具有感染性及免疫原性但未达到致死率的量,可以是在成猪(或牛)的血清内充分诱导及生成针对传染性病原体的保护抗体的用量,根据黏膜相关传染性病原体的种类及状态,从业人员可以选择使用合适的用量,也可以调节注入次数,以便血清内可以诱导及生成有效程度的保护抗体。

[0047] 此外,根据本发明的血清的制造方法中,黏膜通道(mucosal route)注入,优选地,可以是经口注入或鼻腔注入,只有通过黏膜通道注入传染性病原体才能生成具有黏膜免疫性的保护抗体。以往的疫苗组合物通过肌肉注射等非黏膜通道注入免疫原来诱导抗体生成,包括通过非黏膜通道注入诱导及生成的保护抗体的血清的情况,缺乏黏膜免疫性,因此作为用于预防及治疗黏膜相关传染性病原体的感染的被动免疫原具有效果不高的缺点。

[0048] 根据本发明的血清制造方法中,成猪(或牛)指的是,免疫体系充分发达,注入传染

性病原体或其的蛋白质时,可以诱导及生成包括能够防御传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清的哺乳动物,优选地,可以是包括猪、马、反刍类动物、人等的哺乳动物。

[0049] 根据本发明的血清制造方法中,可以防御各不相同的黏膜相关传染性病原体(TGEV、PEDV、GAPRV、BCoV、BGARV及E.coli)等的PAMI血清诱导产生于一个个体(猪及牛)。因此,意味着通过向一个个体(PAMI血清供体)注入各不相同的多种黏膜相关传染性病原体来预防及治疗多种黏膜相关传染性病原体的感染的PAMI血清可以从一个个体(PAMI血清供体)诱导、维持及产生。

[0050] 此外,根据本发明的一个实施例的血清的制造方法中,保护抗体是在传染性病原体或其的蛋白质包括特异的免疫球蛋白等,优选地,是针对能够防御黏膜相关传染性病原体的黏膜相关传染性病原体具有黏膜免疫性,将分泌至黏膜的抗体(secretory IgA,sIgA)作为主要免疫球蛋白的保护抗体。

[0051] 本发明还提供一种通过所述制造方法制造的包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清。

[0052] 本说明书中,将包括能够防御传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清命名为PAMI血清(PAMI serum,the serum harboring protective antibodies with mucosal immunity against infectious pathogens),所述PAMI血清的特征在于混合有识别传染性病原体或其的蛋白质的多种表位(epitope,抗原决定部位)并具有各不相同的抗原识别部位的保护抗体。

[0053] 此外,本发明的PAMI血清通过冷冻干燥粉末化的情况能够长期保管,在注入幼小的哺乳动物之前通过添加水溶性溶剂,例如水的简单步骤可以容易地置备。

[0054] 根据本发明的包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清可以用于被动免疫,术语“被动免疫”指的是,对没有获得抗原刺激的个体,通过借助抗原刺激的免疫应答注入从其他个体制造的抗体或致敏淋巴细胞(sensitized lymphocyte)而获取的免疫。被动免疫与注射疫苗来诱导抗体生成的主动免疫相比优点在于,就对病原体没有免疫力的个体来说在短时间内可以获得防御效果。

[0055] 此外,本发明提供一种预防或治疗仔猪(或小牛犊)感染黏膜相关传染性病原体的方法,其包括将有效量的血清注入新生或仔猪(或小牛犊)的步骤,该血清包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体。

[0056] 根据本发明的预防或治疗方法中,仔猪(或小牛犊)(PAMI血清受体,PAMI serum recipient)指的是,免疫体系不足够发达,无法生产针对传染性病原体的感染的保护抗体,或需要获取能够防御传染性病原体感染的保护抗体的仔猪(或小牛犊)。

[0057] 在根据本发明的预防或治疗方法中,包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清的优选注入可以是经口或静脉通道注入,但不限于于此。

[0058] 此外,经口注入可以适用于新生仔猪(或牛犊)并用作预防仔猪(或小牛犊)感染黏膜相关传染性病原体的目的,优选地,所述经口注入在新生哺乳动物分娩后1小时内注入。所述经口注入的时间段(time window)是将本发明的血清注入新生哺乳动物使其吸收可以防御黏膜相关传染性病原体感染的保护抗体后可以显现最显著的被动免疫效果的时间区

域段。

[0059] 此外,通过静脉的血清注入可以用作预防及治疗新生及小仔猪(或小牛犊)感染黏膜相关传染性病原体的目的。通过静脉注入的有效时间指的是,就小仔猪(或小牛犊)而言,为了预防或治疗黏膜相关传染性病原体的感染,需要从外部注入包括能够预防黏膜相关传染性病原体感染的保护抗体的血清的时间。

[0060] 根据本发明的血清的注入可以按照免疫学上的有效量来注入。所述“免疫学上的有效量”指的是,能够显现可以预防或治疗传染性病原体感染的效果的程度的充分的量和副作用或者不会引起严重的或过度的免疫反应的程度的量,正确的注入浓度根据对于特定免疫原及病原体的抗体的效价而不同,从业者可以根据对象个体的年龄、体重、健康、性别、注入通道、注入方法等医学领域所熟知的要素容易地决定,可以一次乃至多次注入。

[0061] 此外,就本发明的预防或治疗方法而言,可以向包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清追加混合一种以上的免疫增强剂后注入新生或幼小的哺乳动物。

[0062] 本发明可以包括的免疫增强剂指的是使得注入了本发明的血清的动物的免疫反应增加的物质,多种不同的免疫增强剂被技术领域的从业人员所公知。所述免疫增强剂包括弗氏完全及不完全免疫增强剂、维他命E、植物皂甙、矿物油及无矿物油以及羧乙烯聚合物、油包水型乳剂免疫增强剂等,但不限定于此。

[0063] 本发明中,在不同的两种哺乳类动物即猪及牛中诱导生成针对黏膜相关传染性病原体的PAMI血清,利用所述血清成功地预防及治疗黏膜相关传染性病原体感染的结果表明,可以适用于本发明的方法的动物可以是具有相似免疫体系的猪、马、反刍类、人等。

[0064] 实施例确认了本发明的方法可以适用于不同的哺乳动物及多种不同的黏膜相关传染性病原体来防御黏膜相关传染性病原体。因此可以适用于本发明的方法的病原体不仅可以包括实施例中使用的病原体(TGEV、PEDV、GAPRV、BCoV、BGARV、enterotoxigenic E.coli),还可以包括使得仔猪及牛犊的消化器官、呼吸器官及生殖器官等发生疾病的所有黏膜相关病毒及细菌性传染性病原体等。而且可以适用于本发明的方法的病原体可以包括使得具有相似免疫体系的猪、马、反刍类动物、人等所有哺乳动物的消化器官、呼吸器官及生殖器官等发生疾病的所有黏膜相关病毒及细菌性传染性病原体等。

[0065] 此外,所述传染性病原体可以是诱发消化器官或呼吸器官产生疾病的病毒或细菌,可以是鼻病毒(rhinovirus)、冠状病毒(Coronavirus)、副流感病毒(Parainfluenza virus)、呼吸道合胞体病毒(respiratory syncytial virus)、流感病毒(Influenza virus)、腺病毒(Adenovirus)、诺如病毒(Norovirus)、肠病毒(Enterovirus)、轮状病毒(Rotavirus)、杯状病毒(Calicivirus)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumonia*)、嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)、克雷伯氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumonia*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumonia*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、产肠毒素大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella* spp.)、梭菌(*Clostridium* spp.)、志贺氏菌(*Shigella* spp.)、耶尔森氏鼠疫杆菌(*Yersinia* spp.)、猪轮状病毒(Porcine rotavirus)、猪传染性胃肠炎病毒(transmissible Gastroenteritis virus)、猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus)、猪细小病毒(Porcine parvovirus)、猪呼吸与繁殖障碍综合症病毒

(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus)、猪呼吸道冠状病毒 (Porcine respiratory corona virus)、猪流感病毒 (Swine influenza virus)、猪水泡病病毒 (Swine vesicular disease virus)、猪圆环病毒 (Porcine circovirus)、猪链球菌 (*Streptococcus suis*)、多杀巴斯德菌 (*Pasteurella multocida*)、胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、猪痢疾短螺旋体 (*Brachyspira hyodysenteriae*)、支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*)、猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)、猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、恶性卡他热病毒 (malignant catarrhal fever virus)、牛轮状病毒 (bovine rotavirus)、牛流感病毒 (bovine influenza virus)、牛冠状病毒 (Bovine coronavirus)、牛疱疹病毒 (Bovine herpes virus)、牛副流感病毒 (Bovine parainfluenza virus)、牛呼吸道合胞体病毒 (Bovine respiratory syncytial virus)、牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhea virus)、水疱性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus)、牛传染性鼻气管炎病毒 (infectious Bovine Rhinotracheitis Virus)、牛梭状芽孢杆菌 (Bovine clostridium spp.)、溶血性曼氏杆菌 (*Mannheimia haemolytica*)、非洲马瘟病毒 (African horse sickness virus)、马流感病毒 (equine influenza virus)、马冠状病毒 (Equine coronavirus)、马链球菌 (*Streptococcus equi*)、马红球菌 (*Rhodococcus equi*) 等,但不限于此。

[0066] 本发明还提供一种用于预防或治疗由于感染传染性病原体产生的疾病的药学组成物,其包括血清作为有效成分,血清包括能够防御传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体。

[0067] 本发明的药学组成物除了血清外还可以包括药学上容许的载体、赋形剂或稀释剂。此外,根据一般的方法虽然可以剂型化为悬浮液、乳液、糖浆等口服型剂型及灭菌注射溶液的形态使用,但不限于此。组成物中可以包含的载体、赋形剂及稀释剂可以是乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、刺槐树胶、藻朊酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶质纤维素、水及硬脂酸镁。制剂化的情况,使用通常使用的填充剂、增量剂、结合剂、湿润剂、崩解剂、界面活性剂等稀释剂或赋形剂来制造。作为用于口服的液状制剂,有悬浮剂、内容液剂、乳剂、糖浆剂等,除了常用的单纯稀释剂水之外,可以包括许多赋形剂、例如湿润剂、甜味剂、芳香剂、保存剂等。用于非口服的制剂包括灭菌的水溶液、非水溶剂、悬浮剂、乳剂。

[0068] 根据本发明的药学组成物的合适的注入量根据制剂化方法、注入方式、患者的年龄、体重、性别、病态、饮食、注入通道、抗体半衰期、抗体效价及反应感应性等因素而可以开多种处方。

[0069] 本发明的药学组成物中包括的有效成分的浓度,可以考虑治疗目的、治疗对象的状态、所需时间等来决定,不限于特定范围的浓度。

[0070] 在本发明的药学组成物中,由感染传染性病原体引起的疾病不限于此,但包括冠状病毒肺炎、流感(由流行性感病毒引起的急性呼吸器官疾病)、腺病毒感染症、冠状病毒感染症、副流感病毒感染症、呼吸道合胞病毒感染症、鼻病毒感染症、偏肺病毒感染症、肺炎球菌感染症、支原体感染症、衣原体感染症、轮状病毒感染症、诺如病毒感染症、肠腺病毒感染症、星状病毒感染症、札如病毒感染症、大肠菌感染症或沙门氏菌感染症等。

[0071] 本发明还提供一种用于预防或治疗新生或幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体的兽医学组成物,其包括血清作为有效成分,血清包括能够防御传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体。

[0072] 根据本发明的包括能够防御传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清对传染性病原体具有抑制及治疗感染的效果,因此,可以提高家畜的免疫力,维持及改善家畜的健康状态。

[0073] 本发明的兽医学组成物还可以包括在兽医学组成物的制造上通常使用的合适的赋形剂及稀释剂。

[0074] 根据本发明的血清的兽医学注入形态不仅可以单独或和其他兽医学活性化合物结合,而且可以用作适当的集合。

[0075] 本发明的包括血清的兽医学组成物中可以包含的赋形剂及稀释剂可以是乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、刺槐树胶、藻朊酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶质纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水及硬脂酸镁。

[0076] 根据本发明的包括血清的兽医学组成物可以额外包括填充剂、抗凝集剂、润滑剂、湿润剂、香辛料、乳化剂、防腐剂等,根据本发明的兽医学组成物注入动物后,为了可以提供活性成分的迅速吸收或稳定性等,可以使用本领域从业人员熟知的方法进行剂型化,剂型可以是悬浮液、乳液、溶液、糖浆、灭菌注射溶液等形态。

[0077] 根据本发明的兽医学组成物中,传染性病原体作为诱发消化器官、呼吸器官及生殖器官产生疾病的病毒或细菌,和前述相同。

[0078] 本发明中,通过向各不相同的哺乳动物注入各不相同的黏膜相关传染性病原体来诱导、维持、生产可以预防及治疗这些病原体感染的血清即PAMI血清,并将生产的PAMI血清注入幼小的哺乳动物来预防及治疗黏膜相关传染性病原体的感染,这样的本发明的方法,在适用于具有相似免疫体系的所有哺乳动物及与这些哺乳动物的黏膜相关的传染性病原体并防御黏膜相关传染性病原体时,可以代替疫苗之类的现有方法或成为预防或治疗用现有的方法不能解决的黏膜相关传染性病原体感染的新方法。

[0079] 以下,对本发明的实施例进行详细说明。但,下面的实施例仅仅是本发明的例示,本发明的内容不限于下面的实施例。

[0080] 实施例1.材料及方法

[0081] 1-1.细胞、病毒、细菌

[0082] 利用EMEM(Eagle's minimum essential medium)或DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)在37°C、CO<sub>2</sub>培育箱中对Vero细胞(Vero cells)、猪睾丸细胞(swine testis cell, ST cells)、恒河猴胚胎肾(MA104)细胞(fetal rhesus monkey kidney (MA104) cells)进行了培养,EMEM或DMEM包括5-10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、盘尼西林(100units/ml)、链霉素(100μg/ml)。使用了野生型猪流行性腹泻病毒(wild type Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV-wt1)、野生型猪传染性胃肠炎病毒(wild type transmissible gastroenteritis virus, TGEV-wt1)、野生型猪轮状病毒(wild type group A porcine rotavirus, GAPRV-wt1)、疫苗株病毒[KPEDV-9 (Korea BNP, Korea)、PEDV-sm98 (Green Cross Veterinary Products Co., LTD, Korea)、TGEV (175L) (Green Cross Veterinary Products Co., LTD, Korea)及GAPRV-vac (Green Cross Veterinary

Products Co., LTD, Korea)、产肠毒素大肠杆菌 (ETEC) K88、K99及F18菌株 (Veterinary Science Research Institute, Korea)、野生型牛冠状病毒 (wild type bovine coronavirus, BCoV-wt1)、疫苗株牛冠状病毒 (bovine coronavirus, BCoV-vac)、野生型牛轮状病毒 (wild type bovine group A rotavirus, BGARV-wt1)、疫苗株牛轮状病毒 [bovine group A rotavirus (Korea, BNP), BGARV-vac] 等。在Vero细胞中使用含有胰蛋白酶 (10 $\mu$ g/ml) 的DMEM对PEDV及BCoV、在ST细胞中使用DMEM对TGEV、在MA104细胞中使用含有胰蛋白酶 (0.5-1.5 $\mu$ g/ml) 的EMEM (或DMEM) 对GAPRV及BGARV分别进行增殖。以及, 在LB broth (Affymetrix, Inc. OH, USA) 中培养ETEC。

#### [0083] 1-2. 病毒野生株的分离

[0084] 从感染各病毒的仔猪及牛犊的粪便中按照现有的记述的方法分离出野生株TGEV (Zhenhui S et al., 2015. Israel Journal of Veterinary Medicine 70:22-30)、野生株PEDV及BCoV (Chen Q et al., 2014. J Clin Microbiol 52:234-243)、野生株GAPRV及BGARV (Arnold M et al., 2009. Curr Protoc Microbiol Chapter 15:Unit 15C 13), 分别命名为TGEV-wt1、PEDV-wt1、BCoV-wt1、GAPRV-wt1、BGARV-wt1。

#### [0085] 1-3. 病毒效价测定

[0086] 按照现有的记述的方法实施了病毒的效价测定。为了测定PEDV及BCoV的效价 (Thomas JT et al., 2015. PLoS One 10:e0139266), 用PBS对培养在96-孔培养板的80-90%单层Vero细胞进行了3次清洗。并且在37 $^{\circ}$ C下被胰蛋白酶 (10 $\mu$ g/ml) 激活1小时的PEDV在DMEM中分阶段地连续被稀释, 分别稀释的0.1ml PEDV (或BCoV) 接种于用PBS清洗的Vero细胞。接种病毒的Vero细胞在37 $^{\circ}$ C反应1小时后, 病毒接种液替换为包含胰蛋白酶 (10 $\mu$ g/ml) 的0.2ml DMEM, Vero细胞在37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>培育箱中培养3-5天。为了测定TGEV的效价 (He L et al., 2012. Virol J 9:176), 用PBS对培养在96-孔培养板的80-90%单层ST细胞进行了3次清洗。并且TGEV在DMEM中分阶段地连续被稀释, 分别稀释的0.1ml TGEV接种于用PBS清洗的ST细胞。接种病毒的ST细胞在37 $^{\circ}$ C反应1小时后, 病毒接种液替换为0.2ml DMEM (5% FBS), ST细胞在37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>培育箱中培养3-5天。为了测定GAPRV及BGARV的效价 (Otto PH et al., 2015. J Virol Methods 223:88-95), 用PBS对培养在96-孔培养板的80-90%单层MA104细胞进行了3次清洗。并且在37 $^{\circ}$ C下被胰蛋白酶 (10 $\mu$ g/ml) 激活1小时的GAPRV (或BGARV) 在EMEM (或DMEM) 中分阶段地连续被稀释, 分别稀释的0.1ml GAPRV (或BGARV) 接种于用PBS清洗的MA104细胞。接种病毒的MA104细胞在37 $^{\circ}$ C反应1小时后, 病毒接种液替换为包含胰蛋白酶 (0.5-1.5 $\mu$ g/ml) 的0.2ml EMEM (或DMEM), MA104细胞在37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>培育箱中培养5-7天。明显出现因接种病毒导致的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 时, 接种了病毒的细胞在10%福尔马林中固定30分钟后用0.5% (w/v) 结晶紫 (crystal violet) 进行染色。显示病毒效价的50%组织培养感染用量 (fifty percent tissue culture infective doses, TCID<sub>50</sub>) 计算为, 在各个被稀释的病毒感染的细胞中显示CPE的最高病毒稀释倍数的倒数。

#### [0087] 1-4. 实验动物及传染性病原体的接种

[0088] 农场购入的5只怀孕的初产猪 (母猪1、母猪2、母猪3、母猪4、母猪5) 分别在分离的场所饲养。为了在猪中诱导生成包括能够防御传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清即PAMI血清, 在一个场所饲养了4只成猪, 即两只母猪和两只阉割的公猪。并且,

40Ml的各病毒( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/Ml) [TGEV (175L)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac及GAPRV-wt1]以及培养了18小时的400Ml的各E.coli (K88、K99及F18)和猪饲料混合,26周期间每周注入4只成猪。为了生成接种于疫苗株的猪血清(vac-对照血清),疫苗株(KPEDV-9及PEDV-sm98)按照制造公司的用法通过肌肉通道以两周为间隔经两次接种于一只成猪。并且最后接种后以两周为间隔进行两次的追加接种。

[0089] 为了在牛中诱导生成包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清即PAMI血清,使用了一头15个月大的成体母牛。40Ml的各病毒( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/Ml) [BCoV-vac、BCoV-wt1、BGARV-vac及BGARV-wt1]以及培养了18小时的100Ml的E.coli (K99)在12周期间每周经口注入成体母牛。

[0090] 1-5.血清及效价测定

[0091] 四只初产猪(母猪1、母猪2、母猪3、母猪4)分娩前血清及分娩后血清、注入传染性病原体(PEDV、TGEV、GAPRV及E.coli)前的四只成猪血清(对照血清)及注入传染性病原体26周后的成猪血清(PAMI血清)、以及接种疫苗株(KPEDV-9及PEDV-sm98)前的猪血清及接种疫苗株(KPEDV-9及PEDV-sm98)后的猪血清(vac-对照血清)等,通过乳静脉或颈动脉分别收集。此外,就牛而言,感染BCoV-vac、BCoV-wt1、BGARV-vac、BGARV-wt1及E.coli (K99)前及感染12周后的成体母牛的血清,通过颈静脉收集。针对收集的所有猪血清,分别测定对于PEDV、TGEV及GAPRV的VN效价以及对于E.coli的AG效价。并且,针对收集的牛血清,分别测定对于BCoV-vac、BCoV-wt1、BGARV-vac及BGARV-wt1的VN效价以及对于E.coli的AG效价。

[0092] 按照现有的公布的方法测定了对于TGEV、PEDV、GAPRV、BCoV及BGARV的血清的VN效价(Arnold M et al,2009.Curr Protoc Microbiol Chapter 15:Unit 15C 13;Woods RD et al.,1988.Am J Vet Res 49:300-304;Song DS et al.,2007.Res Vet Sci 82:134-140)。简单来说,对各血清在56℃进行30分钟热处理,在圆底微量滴定96孔板上使用DMEM(或EMEM)连续稀释2倍。50μl的病毒(200TCID<sub>50</sub>/50μl)和50μl的稀释血清混合,在37℃反应30分钟。100μl的PEDV/血清(或BCoV/血清)混合物在培养于96孔培养板的单层Vero细胞、100μl的TGEV/血清混合物在培养于96孔培养板的单层ST细胞、100μl的GAPRV/血清(或BGARV/血清)混合物在培养于96孔培养板的单层MA104细胞中分别加入后在37℃反应2小时。吸附病毒后,TGEV/血清混合物置换为包含5%FBS的0.2Ml DMEM,PEDV/血清(或BCoV/血清)混合物置换为包含10μg/Ml胰蛋白酶的0.2Ml DMEM,GAPRV/血清(或BGARV/血清)混合物置换为包含0.5-1.5μg/Ml胰蛋白酶的0.2Ml EMEM(或DMEM)。并且,感染了病毒的96孔培养板的细胞在37℃、CO<sub>2</sub>培育箱中培养3-7天。感染了病毒的细胞中显示出明显的CPE现象时,接种病毒的96孔培养板的细胞在室温下用10%福尔马林固定30分钟后用0.5%(w/v)结晶紫(crystal violet)进行了染色。对于病毒的血清的VN效价表现为在接种了病毒/血清混合物的单层细胞中没有呈现CPE的血清的最高稀释倍数的倒数。

[0093] 为了考察对于E.coli的血清的AG效价进行了AG分析测定(To SC et al.,1984.Infect Immun 43:1-5)。E.coli在培养基(LB broth)中在37℃下培养了18小时后,用1%福尔马林处理了12小时。经福尔马林处理的E.coli用PBS清洗3次后,用OD<sub>600</sub>0.7的值稀释于PBS从而作用于测定血清的AG效价的E.coli抗原。在96U型板上连续稀释2倍的100μl血清和100μlE.coli抗原混合后在37℃反应3小时。对于E.coli的血清的AG效价和E.coli抗原反应并表现为显示明显的凝集的血清的最高稀释倍数的倒数。

[0094] 1-6. 黏膜相关传染性病原体传导感染及血清治疗

[0095] 为了考察注入了PAMI血清的仔猪能否防御传染性病原体的感染,在从4只(母猪1、母猪2、母猪3及母猪4)初产猪生出来的仔猪中实施了传染性病原体的传导感染。为了进行TGEV-wt1感染实验而使用了母猪1生出的A组仔猪[注入对照血清的仔猪(n=7)及注入PAMI血清的仔猪(n=3)],为了进行PEDV-wt1感染实验而使用了母猪2生出的B组仔猪[注入对照血清的仔猪(n=8)及注入PAMI血清的仔猪(n=3)],为了进行GAPRV-wt1感染实验而使用了母猪3生出的C组仔猪[注入对照血清的仔猪(n=7)及注入PAMI血清的仔猪(n=3)],为了进行E.coli(K88)感染实验而使用了母猪4生出的D组仔猪[注入对照血清的仔猪(n=8)及注入PAMI血清的仔猪(n=3)]。10Ml的PAMI血清在分娩后1小时内经口注入给注入PAMI血清的仔猪,10Ml的对照血清在分娩后1小时内经口注入给注入对照血清的仔猪。分娩2日后各组的仔猪(A组仔猪、B组仔猪、C组仔猪及D组仔猪)分别与母猪分离,至在隔离场所结束实验时为止,供给代乳品(milk replacer,Purina)进行饲养,分娩3日后,A组仔猪经口感染TGEV-wt1( $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>/一只仔猪),B组仔猪经口感染PEDV-wt1( $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>/一只仔猪),C组仔猪经口感染GAPRV-wt1( $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>/一只仔猪),D组仔猪经口感染E.coli(K88)( $1 \times 10^8$ CFU/一只仔猪)后,观察了4周感染传染性病原体的仔猪的临床症状。

[0096] 为了了解给新生仔猪注入PAMI血清的时间和仔猪对感染传染性病原体的防御能力的关系,给相同腹里的仔猪实施了传染性病原体的感染实验。母猪5生出的E组仔猪分别分为3组[0小时组(n=3)、12小时组(n=3)及18小时组(n=3)]。并且,10Ml PAMI血清分别在分娩后1小时内(0小时组)、分娩后12小时内(12小时组)、分娩后18小时内(18小时组)经口注入仔猪,注入了PAMI血清的所有仔猪在分娩3日后经口感染PEDV-wt1( $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>/一只仔猪)后观察了4周感染PEDV-wt1的仔猪的临床症状。

[0097] 此外,为了考察注入了PAMI血清的牛犊是否可以防御传染性病原体的感染,给牛犊进行了传染性病原体感染实验。牛犊分别分为用于进行BCoV-wt1感染实验的A组牛犊[注入对照血清的牛犊(n=3)及注入PAMI血清的牛犊(n=3)]、用于进行BGARV-wt1感染实验的B组牛犊[注入对照血清的牛犊(n=3)及注入PAMI血清的牛犊(n=3)]、用于进行E.coli(K88)感染实验的C组牛犊[注入对照血清的牛犊(n=3)以及注入PAMI血清的牛犊(n=3)]等。200Ml的PAMI血清在分娩后1小时内经口注入给注入PAMI血清的牛犊,200Ml的对照血清在分娩后1小时内经口注入给注入对照血清的牛犊。分娩3日后A、B、C组牛犊分别经口感染BCoV-wt1( $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>/一只牛犊)、BGARV-wt1( $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>/一只牛犊)以及E.coli(K88)( $1 \times 10^8$ CFU/一只牛犊),观察了5天感染传染性病原体的牛犊的临床症状。

[0098] 为了了解因感染BoCoV-wt1、BGARV-wt1或E.coli(K99)而产生腹泻的牛犊是否可以因注入PAMI血清而得到治疗,给因传染性病原体出现腹泻症状的牛犊注入了PAMI血清。各牛犊组分别分为因传导感染BCoV-wt1( $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>/一只牛犊)而产生腹泻的D组牛犊[给药对照血清的牛犊组(n=3)以及给药PAMI血清的牛犊组(n=3)]、因传导感染BGARV-wt1( $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>/一只牛犊)而产生腹泻的E组牛犊[给药对照血清的牛犊组(n=3)以及给药PAMI血清的牛犊组(n=3)]、因传导感染E.coli(K88)( $1 \times 10^8$ CFU/一只牛犊)而产生腹泻的F组牛犊[给药对照血清的牛犊组(n=3)以及给药PAMI血清的牛犊组(n=3)]等。并且通过静脉给出现腹泻症状的牛犊分别按照200Ml的PAMI血清注入给药PAMI血清的牛犊组、200Ml的对照血清注入给药对照血清的牛犊组的方式进行注入,注入后观察了5天牛犊的临

床症状。

[0099] 1-7. 在发生PEDV的农场使用PAMI血清

[0100] 为了了解PAMI血清在野外是否也能防御黏膜相关传染性病原体的感染,在发生PEDV的农场(总共20只规模),PAMI血清经口注入新生仔猪后,观察了4周注入了PAMI血清的仔猪的临床症状。从感染传染性病原体的4只成猪收集的10Ml PAMI血清在分娩后1小时内经口注入给注入PAMI血清的仔猪(n=280),从接种PEDV疫苗的成猪收集的10Ml vac-对照血清在分娩后1小时内经口注入给注入vac-对照血清的仔猪(n=9)。并且,观察了4周注入了PAMI血清及vac-对照血清的仔猪的临床症状。

[0101] 实施例2. 经口感染了黏膜相关传染性病原体的成体猪及牛的血清的VN及AG效价分析

[0102] 决定抗体对感染传染性病原体的防御能力的重要要素之一是抗体对传染性病原体的中和能力。因此,为了了解从经口感染传染性病原体(TGEV、PEDV、GAPRV、E.coli)的成猪收集的血清以及从经口感染传染性病原体(BCoV、BGARV、E.coli)的成体牛的血清是否对感染传染性病原体有防御能力,调查了针对各个传染性病原体的血清的VN及AG效价。

[0103] 就成体猪的血清而言,从感染传染性病原体[TGEV(L75)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1、E.coli(K88、K99、F18)]之前的成猪收集的血清(对照血清)对传染性病原体[TGEV(L75)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1]分别显示出阴性的VN效价(图1A及图1B,1、3、5、7、9、11及13列),此外,针对E.coli(K88、K99及F18)分别显示出阴性的AG效价(图1A及图1B,15、17及19列)。但是从感染传染性病原体[TGEV(L75)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1、E.coli(K88、K99、F18)]26周后的成猪收集的血清(PAMI血清)对TGEV(L75)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1分别显示出1024以上的VN效价(图1A及图1B,2、4、6、8、10、12及14列),此外,针对E.coli(K88)、E.coli(K99)及E.coli(F18)分别显示出64以上的AG效价(图1A及图1B,16、18及20列)。此外,从接种PEDV-sm98及KPEDV-9疫苗的成猪收集的血清(vac-对照血清)对PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1分别显示出1024以上较高的VN效价(图1C,2、4及6列)。但是接种疫苗前的成猪血清(对照血清)对PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1分别显示出阴性VN效价(图1C,1、3及5列)。

[0104] 就成体牛的血清而言,从感染传染性病原体[BCoV-wt1、BCoV-vac、BGARV-wt1、BGARV-vac及E.coli(K99)]之前的成体牛收集的对照血清对病原体BCoV-wt1、BCoV-vac、BGARV-wt1、BGARV-vac分别显示出阴性的VN效价(图2,1、3、5及7列),此外,针对E.coli(K99)分别显示出阴性的AG效价(图2,9列)。但是从感染传染性病原体[BCoV-wt1、BCoV-vac、BGARV-wt1、BGARV-vac及E.coli(K99)]12周后的成体牛收集的血清对BCoV-wt1、BCoV-vac、BGARV-wt1及BGARV-vac分别显示出256以上的VN效价(图2,2、4、6及8列),此外,针对E.coli(K99)分别显示出64以上的AG效价(图2,10列)。

[0105] 一般而言,针对传染性病原体的血清的效价是对感染传染性病原体的防御能力进行测定的方法之一。因此,从成猪及成体牛收集的PAMI血清对黏膜相关传染性病毒显示出较高的VN效价以及对E.coli显示出较高的AG效价,这样的实验结果揭示了,从成猪及成体牛收集的血清即PAMI血清注入仔猪及牛犊时,注入了PAMI血清的幼小仔猪及牛犊获得PAMI血清的保护抗体从而可以防御黏膜相关传染性病原体的感染。

[0106] 实施例3.经口注入了PAMI血清的仔猪及牛犊对传导感染病原体的防御能力分析

[0107] 为了考察从对传染性病原体 (PEDV、TGEV、GAPRV、E.coli) 显示出较高的VN效价及较高的AG效价的成猪诱导生成的PAMI血清是否可以防御仔猪感染PEDV-wt1、TGEV-wt1、GAPRV-wt及E.coli (K88), 以及从对传染性病原体 [BCoV-wt1、BGARV-wt1、E.coli (K88)] 具有中和及凝集效能的成体牛诱导生成的PAMI血清是否可以防御牛犊感染BCoV-wt1、BGARV-wt及E.coli (K99), 对仔猪及牛犊分别实施了传染性病原体的传导感染实验。

[0108] 就A、B、C、D组仔猪而言, PAMI血清在分娩后1小时内经口注入给注入PAMI血清的仔猪, 对照血清在分娩后1小时内经口注入给注入对照血清的仔猪。并且, 产后2天的仔猪与母猪分离饲养, 产后3天时, A组仔猪经口感染TGEV-wt1、B组仔猪经口感染PEDV-wt1、C组仔猪经口感染GAPRV-wt1、D组仔猪经口感染E.coli (K88) 后, 至产后28天时为止观察了仔猪的临床症状。

[0109] 结果是, 传导感染了TGEV-wt1的A组仔猪中, 注入了PAMI血清的仔猪出现0%的死亡率(图3A, 1列) 及33%的腹泻发生率(图3B, 1列), 注入了对照血清的仔猪出现100%的死亡率(图3A, 2列) 及100%的腹泻发生率(图3B, 2列)。传导感染了PEDV-wt1的B组仔猪中, 注入了PAMI血清的仔猪出现0%的死亡率(图3A, 3列) 及33%的腹泻发生率(图3B, 3列), 注入了对照血清的仔猪出现100%的死亡率(图3A, 4列) 及100%的腹泻发生率(图3B, 4列)。传导感染了GAPRV-wt1的C组仔猪中, 注入了PAMI血清的仔猪出现0%的死亡率(图2A, 5列) 及0%的腹泻发生率(图3B, 5列), 注入了对照血清的仔猪出现29%的死亡率(图3A, 6列) 及100%的腹泻发生率(图3B, 6列)。传导感染了E.coli (K88) 的D组仔猪中, 注入了PAMI血清的仔猪出现0%的死亡率(图3A, 7列) 及33%的腹泻发生率(图3B, 7列), 注入了对照血清的仔猪出现25%的死亡率(图3A, 8列) 及100%的腹泻发生率(图3B, 8列)。

[0110] 注入了PAMI血清的仔猪防御了传染性病原体 [PEDV-wt1、TGEV-wt1、GAPRV-wt1、E.coli (K88)] 的传导感染揭示了分娩前的母猪感染传染性病原体 [PEDV-wt1、TGEV-wt1、GAPRV-wt1、E.coli (K88)] 从而也可以使母猪形成保护抗体的可能性。为了排除这种可能性, 调查了分娩前·后的母猪的血清对传染性病原体的VN及AG效价。分娩前·后的母猪的血清针对传染性病原体 [TGEV (L75)、TGEV-wt1、PEDV-sm98、KPEDV-9、PEDV-wt1、GAPRV-vac、GAPRV-wt1] 显示出阴性VN效价(图4A、B、C及D, 1-14列), 针对传染性病原体E.coli (K88)、E.coli (K99) 及E.coli (F18) 显示出阴性AG效价(图4A、B、C及D, 15-20列)。

[0111] 调查了仔猪具有对黏膜相关传染性病原体的防御能力的本发明的方法是否可以适用于其他哺乳动物, 例如牛。就牛犊组A、B、C而言, 对传染性病原体 [BCoV-wt1、BGARV-wt1、E.coli (K99)] 有中和及凝集效能的PAMI血清在分娩后经口注入给注入PAMI血清的牛犊, 对照血清在分娩后经口注入给注入对照血清的牛犊, 产后3天时A组牛犊经口感染了BCoV-wt1、B组牛犊经口感染了BGARV-wt1、C组牛犊经口感染了E.coli (K99), 观察了临床症状。传导感染了BCoV-wt1的A组牛犊中, 注入了对照血清的牛犊在注入病原体后在1、3、5天时分别出现0%、33%及100%的腹泻发生率(图5, 1、7、13列), 注入了PAMI血清的牛犊在注入病原体后在1、3、5天时均出现0%的腹泻发生率(图5, 2、8、14列)。传导感染了BGARV-wt1的B组牛犊中, 注入了对照血清的牛犊在注入病原体后在1、3、5天时分别出现0%、33%及100%的腹泻发生率(图5, 3、9、15列), 注入了PAMI血清的牛犊在注入病原体后在1、3、5天时均出现0%的腹泻发生率(图5, 4、10、16列)。传导感染了E.coli (K99) 的C组牛犊中, 注入了

对照血清的牛犊在注入病原体后在1、3、5天时分别出现0%、67%及100%的腹泻发生率(图5,5、11、17列),注入了PAMI血清的牛犊在注入病原体后在1、3、5天时均出现0%的腹泻发生率(图5,6、12、18列)。

[0112] 这样的传染性病原体传导感染结果明确表明,包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的PAMI血清可以从成猪及成体牛(PAMI血清供体)诱导产生,如此诱导产生的PAMI血清在早期经口注入新生仔猪或新生牛犊时,PAMI血清的具有黏膜免疫性的保护抗体以被动免疫传递给仔猪或牛犊,从而可以防御仔猪及牛犊感染黏膜相关传染性病原体。

[0113] 实施例4.影响仔猪对传染性病原体的防御能力的PAMI血清的注入时间分析

[0114] 分娩后通过母体的初乳获得被动免疫的马、猪、反刍类等动物摄取初乳的时间是对幼崽的被动免疫的程度造成影响的要素。因此,为了了解将PAMI血清经口注入新生哺乳动物的时间和幼小的哺乳动物防御传染性病原体感染的效果的关联性,对仔猪进行了以下实验。

[0115] E组仔猪中,PAMI血清分别经口在分娩后1小时内(“0”)、12小时内(“12”)、18小时内(“18”)注入仔猪。并且,分娩后3天时注入了PAMI血清的所有仔猪传导感染了PEDV-wt1,至28天时为止观察了临床症状。其结果是,分娩后1小时内注入了PAMI血清的仔猪没有出现死亡或腹泻等任何临床症状(图6,1及2列)。但是,分娩后12小时内注入了PAMI血清的仔猪分别出现66%的死亡率及100%的腹泻发生率(图6,3及4列),分娩后18小时内注入了PAMI血清的仔猪分别出现100%死亡率及100%腹泻发生率(图6,5及6列)。

[0116] 所述结果表明,仔猪对传染性病原体感染的有效防御可以通过在早期将PAMI血清经口注入新生仔猪来实现。此外揭示了,早期将PAMI血清经口注入幼小动物来防御幼小动物感染传染性病原体的方法不仅可以适用于仔猪,而且可以适用于通过初乳传递母体的抗体的马、反刍类等幼小动物。

[0117] 实施例5.针对因感染BCoV-wt1、BGARV-wt1及E.coli(K99)而使牛犊产生腹泻症状的PAMI血清的治疗效果

[0118] 为了了解幼小仔猪及牛犊防御黏膜相关传染性病原体感染除了PAMI血清的经口注入是否还能通过静脉注入来防御,在牛犊中进行了实验。将PAMI血清通过静脉注入因BCoV、BGARV及E.coli(K99)产生腹泻的牛犊时,观察了注入PAMI血清的牛犊的临床症状。

[0119] 在因传导感染BCoV-wt1而产生腹泻的D组牛犊中,注入了对照血清的给药对照血清的牛犊组牛犊的腹泻症状在注入血清后的第1、3、5天均出现0%的恢复率(图7,1、7、13列)。但是注入了PAMI血清的给药PAMI血清的牛犊组牛犊的腹泻症状在注入血清后的第1、3、5天分别出现0%、67%及100%的恢复率(图7,2、8、14列)。在因传导感染BGARV-wt1而产生腹泻的E组牛犊中,注入了对照血清的给药对照血清的牛犊组牛犊的腹泻症状在注入血清后的第1、3、5天均出现0%的恢复率(图7,3、9、15列)。但是注入了PAMI血清的给药PAMI血清的牛犊组牛犊的腹泻症状在注入血清后的第1、3、5天分别出现0%、67%及100%的恢复率(图7,4、10、16列)。在因传导感染E.coli(K99)而产生腹泻的E组牛犊中,注入了对照血清的给药对照血清的牛犊组牛犊的腹泻症状在注入血清后的第1、3、5天均出现0%的恢复率(图7,5、11、17列)。但是注入了PAMI血清的给药PAMI血清的牛犊组牛犊的腹泻症状在注入血清后的第1、3、5天分别出现0%、33%及100%的恢复率(图7,6、12、18列)。

[0120] 如此通过静脉将PAMI血清的保护抗体传递给幼小动物的方法不同于受到新生动物的肠道关闭和注入时间影响的经口注入,必要时可以适用于幼小动物,因此,不仅可以预防传染性病原体的感染,而且可以用作治疗目的。

[0121] 实施例6.发生PEDV的农场PAMI血清的PEDV感染防御能力分析

[0122] 为了考察本发明的PAMI血清在野外是否也能有效地防御传染性病原体的感染,在发生PEDV的农场(200头的母猪场),将PAMI血清经口注入新生仔猪后,评价了血清的效果。血清,即PAMI血清经口注入给注入PAMI血清的仔猪组仔猪(n=280),vac-对照血清经口注入给注入vac-对照血清的仔猪组仔猪(n=9)。并且观察注入了PAMI血清及vac-对照血清的仔猪的临床症状至产后28天时为止。注入了PAMI血清的所有仔猪至产后28天并未出现死亡(图8A,1、3、5、7及9列)以及腹泻症状(图8B,1、3、5、7及9列)。但是注入了从通过肌肉接种疫苗的成猪收集的vac-对照血清的仔猪在产后7天时出现44%的死亡率(图8A,4列),在14天时出现89%的死亡率(图8A,6列),在21天时出现100%的死亡率(图8A,8列)。此外,注入了vac-对照血清的仔猪在产后3天时出现了33%的腹泻症状(图8B,2列),在7天时出现了100%的腹泻症状(图8B,4列),在14天时出现了100%的腹泻症状(图8B,6列)。

[0123] 这样的结果表明,本发明的方法不仅在传染性病原体的传导感染实验中,而且在发生传染病的农场也能有效防御幼小的哺乳动物感染黏膜相关传染性病原体,包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的保护抗体的PAMI血清和PAMI血清供体的性别无关均可以诱导及产生。此外表明,包括能够防御黏膜相关传染性病原体感染的具有黏膜免疫性的保护抗体的血清即PAMI血清,不是通过非黏膜通道(皮下、皮内、肌肉内等)注入黏膜相关传染性病原体,而是必须通过黏膜通道(经口、鼻腔)注入PAMI血清供体,包括具有黏膜免疫性的保护抗体的血清才能从PAMI血清供体诱导产生。

[0124] 另外,根据本发明的方法的实施例,可以预防及治疗不同种类的幼小的哺乳动物感染各不相同的多种黏膜相关传染性病原体,这表明预防及治疗传染性病原体感染的本发明的方法不仅可以适用于实施例中使用的猪及牛,而且可以适用于具有相似免疫体系的所有哺乳动物,并且可以适用于实施例中使用的黏膜相关传染性病原体以及引起幼小的哺乳动物的消化器官、呼吸器官、生殖器官等产生疾病的所有黏膜相关传染性病原体。

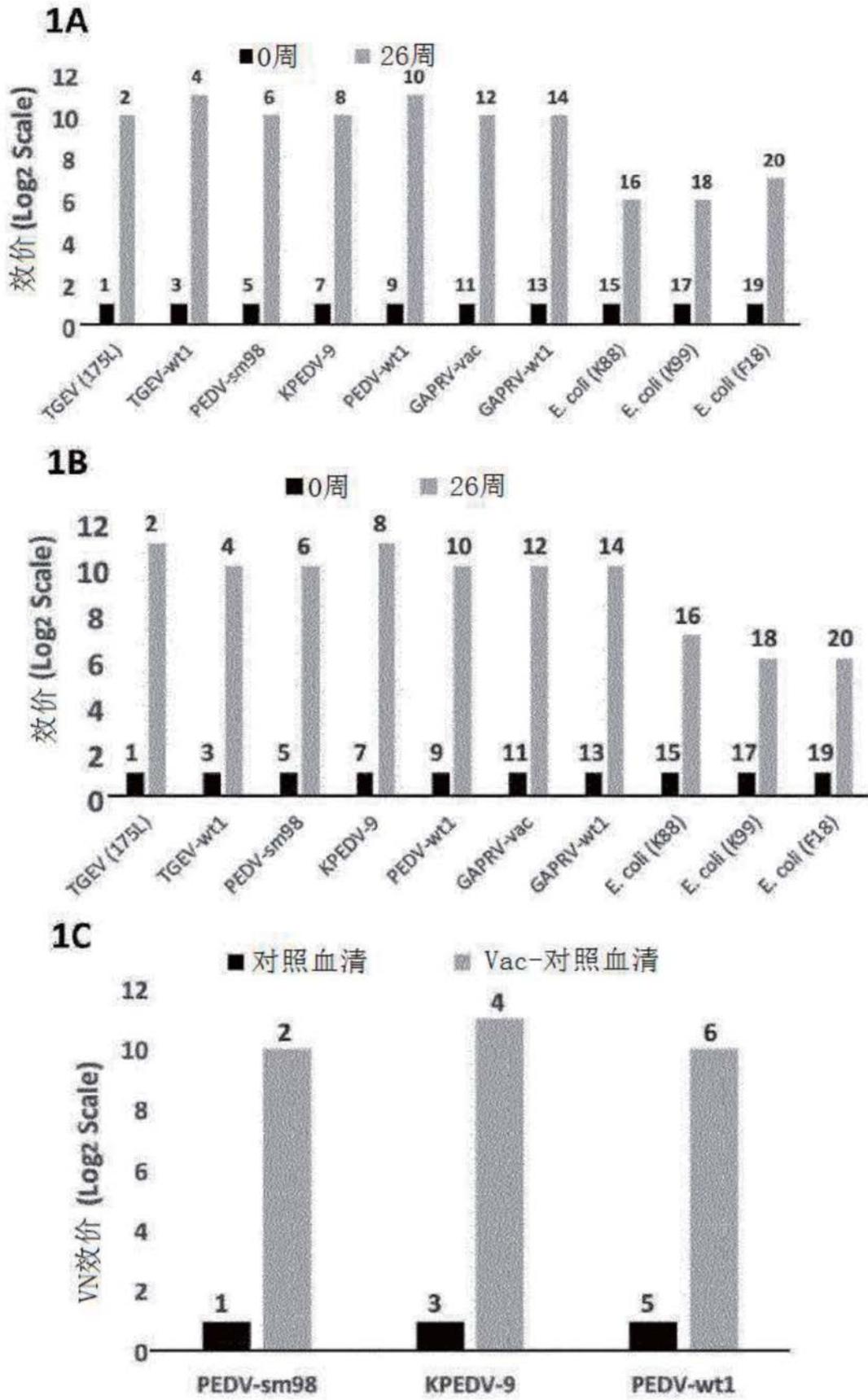


图1

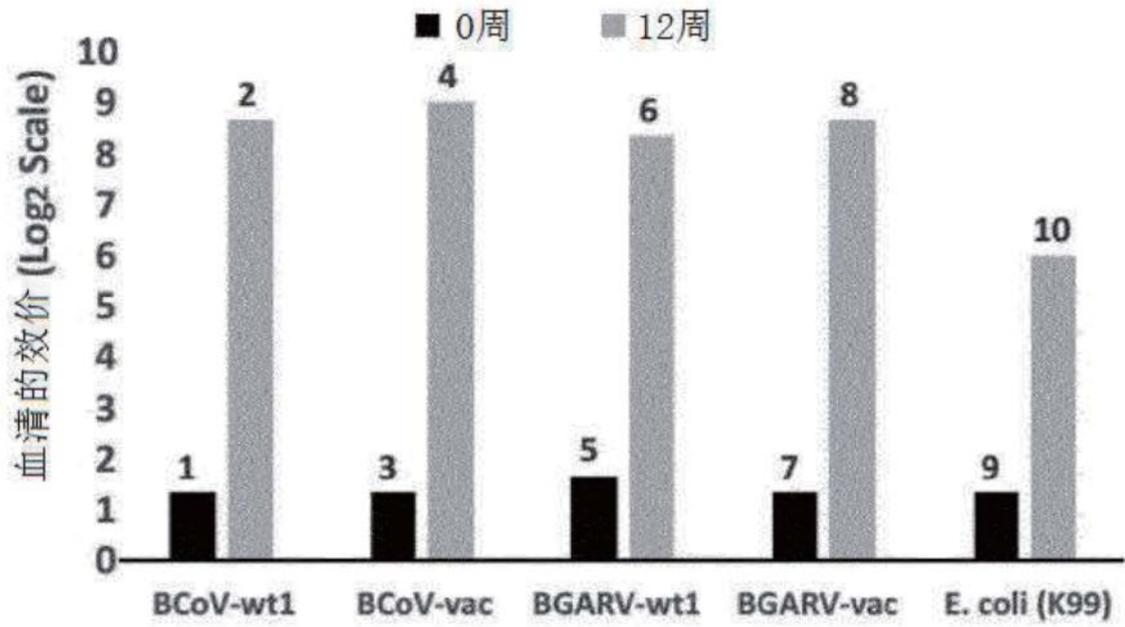


图2

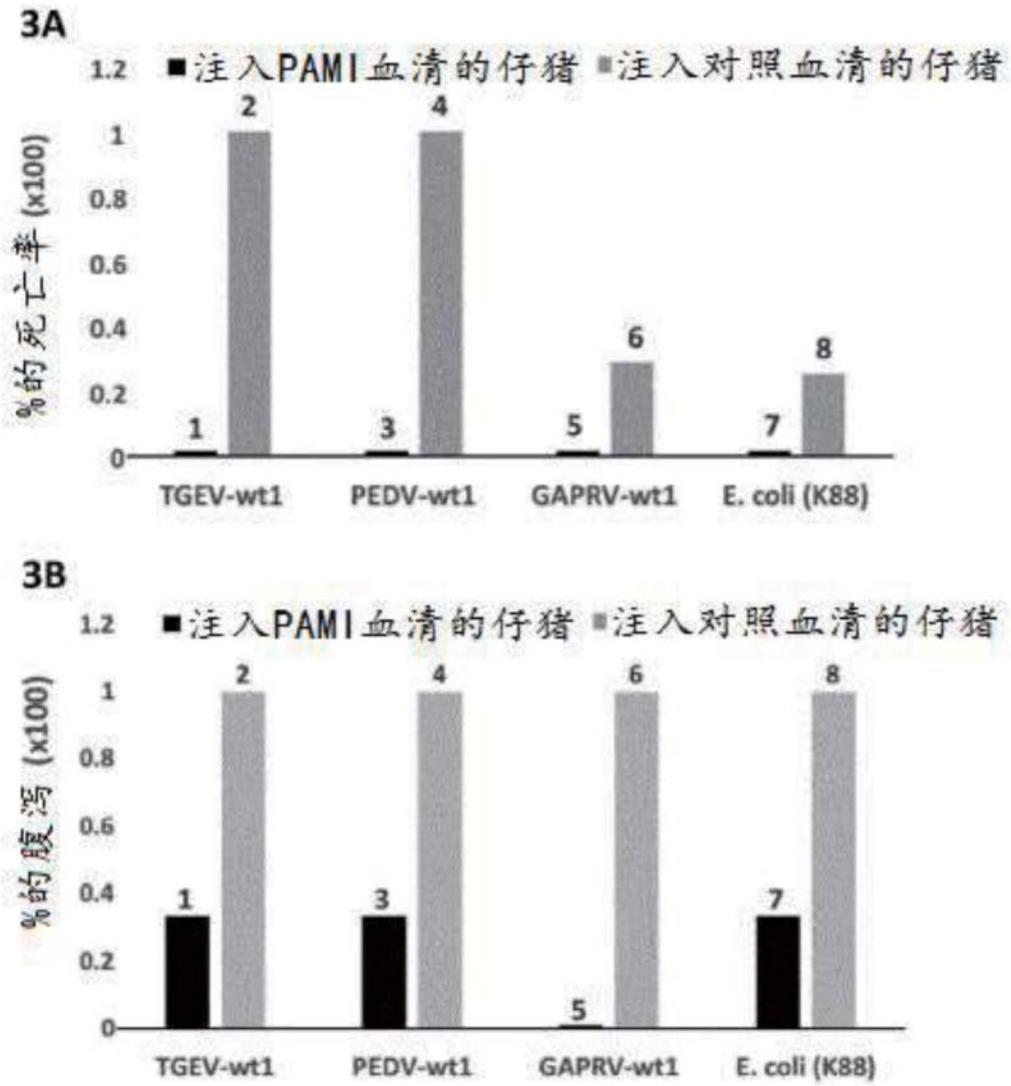


图3

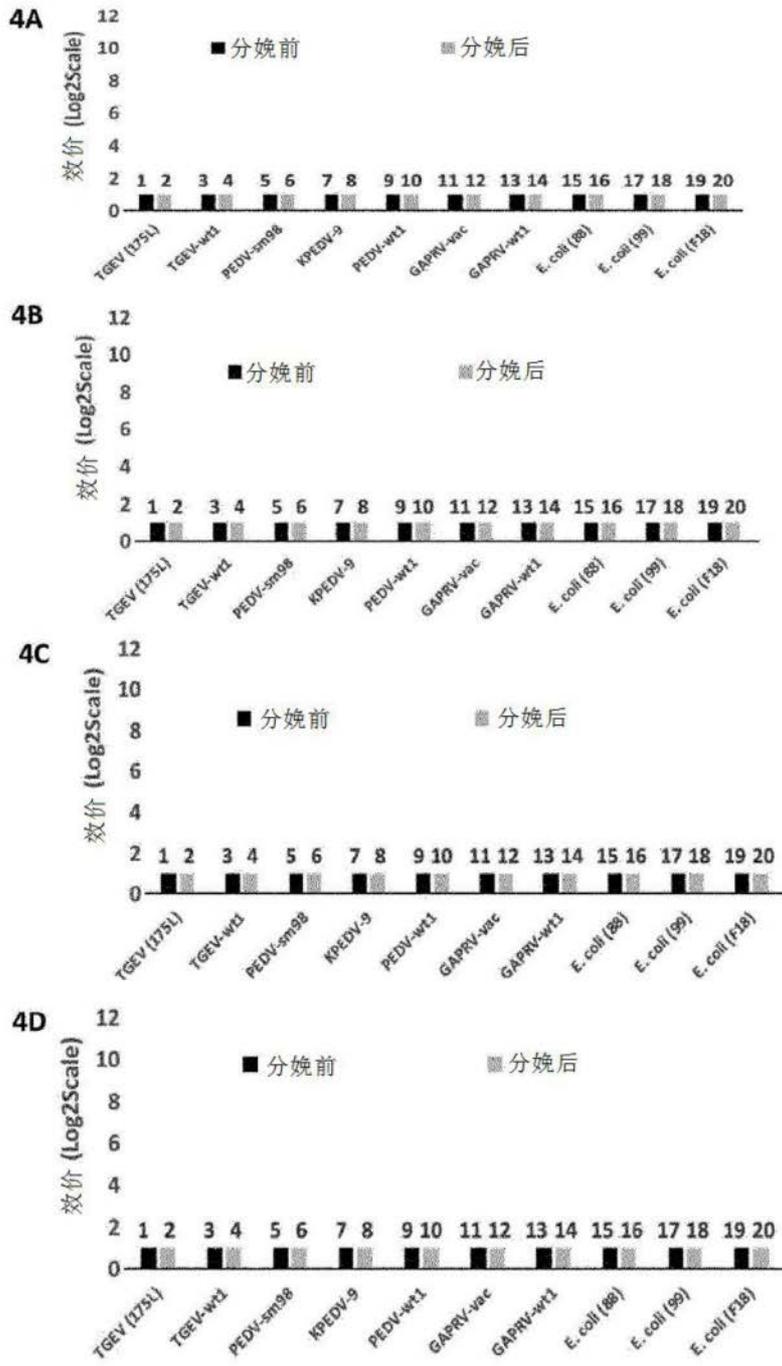


图4

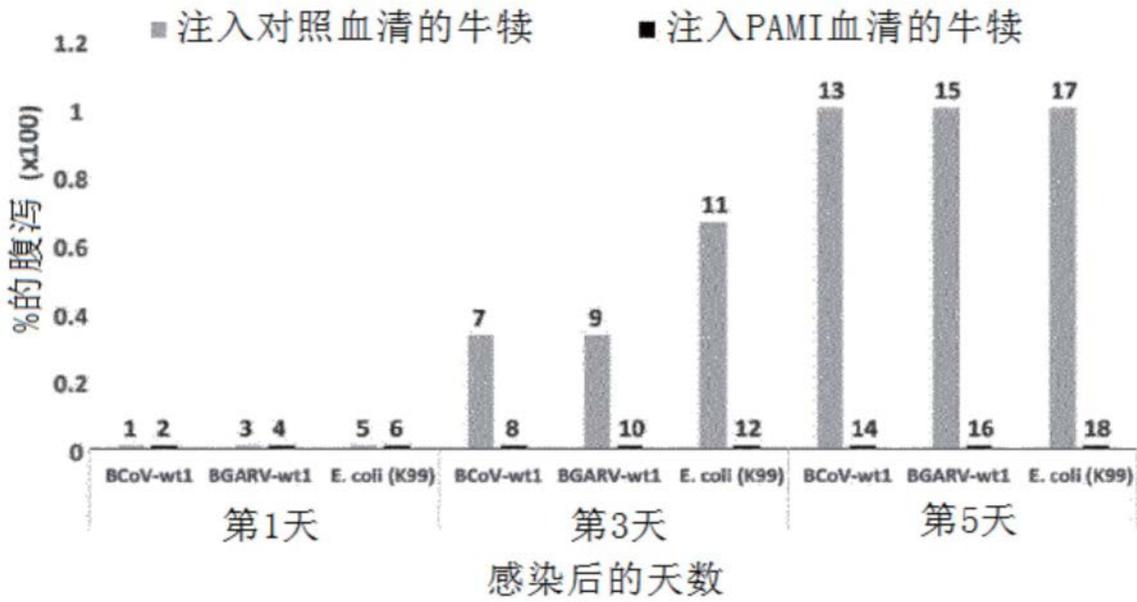


图5

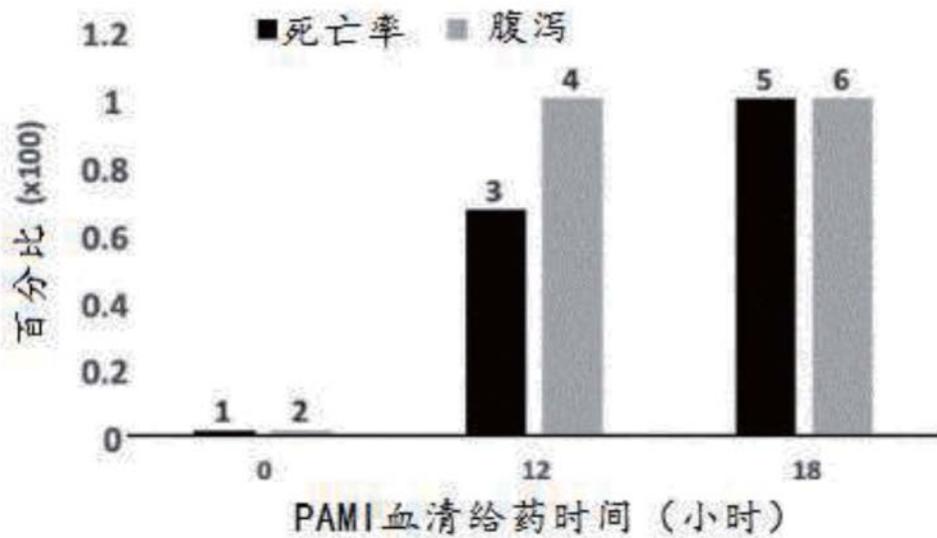


图6

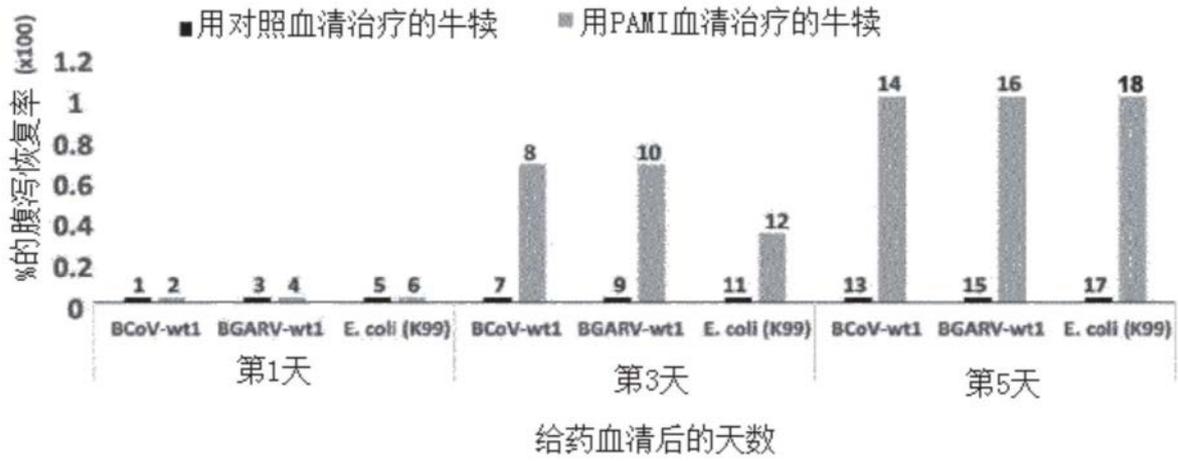


图7

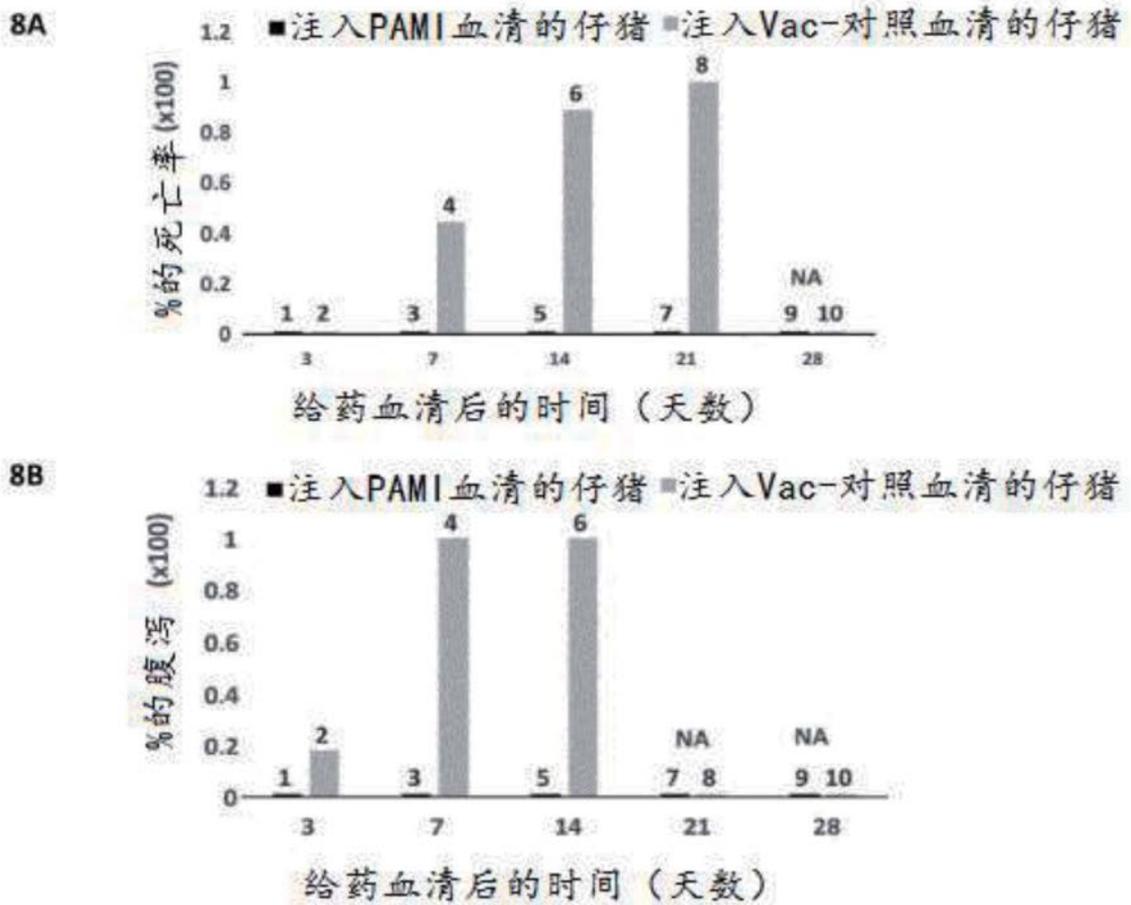


图8