

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1138181 B
CN 101553247 B

[12]

STANDARD PATENT SPECIFICATION
標準專利說明書

[21] Application No. 申請編號
10103400.6

[51] Int.Cl.⁸ A61K

[22] Date of filing 提交日期
07.04.2010

[54] IMMUNE MODULATORS, COMPOSITIONS INCLUDING IMMUNE MODULATORS AND USE THEREOF 免疫調節劑、含有免疫調節劑的組合物及其用途

[30] Priority 優先權
29.09.2006 US 60/848,348
14.09.2007 US 11/855,944
[43] Date of publication of application 申請發表日期
20.08.2010
[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期
05.08.2016
CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期
CN 200780039690.X 19.09.2007
CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期
CN 101553247 07.10.2009
Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期
19.08.2015

[73] Proprietor 專利所有人
4LIFE PATENTS, LLC
9890 SOUTH 300 WEST, SANDY
UTAH 84070-3262
UNITED STATES/UNITED STATES OF AMERICA
福萊專利有限責任公司
美國/美利堅合眾國
猶他
[72] Inventor 發明人
LISONBEE, DAVID D·裡森比
MCCAUSLAND, CALVIN W. C·W·麥考斯蘭德
BENNETT, RICHARD H. R·H·本奈特
VAUGHAN, BRENT M. B·M·沃安
LEFLER, SHANE M. S·M·萊夫勒
[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
CLT Patent & Trademark (H.K.) Ltd.
Unit 09, 34/F, Office Tower
Convention Plaza, No. 1 Harbour Road
Wanchai, Hong Kong
誠通專利商標(香港)有限公司
香港灣仔港灣道1號會展廣場
辦公大樓34樓09室

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101553247 B

(45) 授权公告日 2015.08.19

(21) 申请号 200780039690.X

(22) 申请日 2007.09.19

(30) 优先权数据

60/848,348 2006.09.29 US

11/855,944 2007.09.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009.04.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/078947 2007.09.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/042604 EN 2008.04.10

(73) 专利权人 福莱专利有限责任公司

地址 美国犹他

(72) 发明人 D·里森比 C·W·麦考斯兰德

R·H·本奈特 B·M·沃安

S·M·莱夫勒

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 李瑛

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 35/20(2006.01)

(56) 对比文件

US 2005058716 A1, 2005.03.17,

审查员 田园

权利要求书1页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

免疫调节剂、含有免疫调节剂的组合物及其用途

(57) 摘要

公开了含有来自免疫调节剂来源的提取物的组合物,该提取物含有纳米级分免疫调节剂分子(即,具有约3,000Da和更低分子量的分子)。这些组合物还可以包括其他免疫调节剂,如转移因子。含有提取物的组合物的给药调节给药该组合物的受试者的细胞介导免疫(例如,下调不需要的T细胞活性),该提取物包括纳米级分免疫调节剂分子。当与转移因子一起给药时,纳米级分免疫调节剂分子和转移因子的组合下调不需要的T细胞活性,而同时增加或上调对抗病原体和其他不良的实体如癌细胞和其他异常或突变细胞的T细胞活性。还公开了用于评价各种物质的免疫调节能力的测定和测定技术。

1. 用于改善免疫功能的组合物,其含有:
免疫调节成分,其由以下部分组成:
第一部分,其由具有 10,000Da 上限分子量截断的牛初乳的第一级分组成;
第二部分,其由牛初乳的第二级分组成,所述第二部分的上限分子量截断除去大颗粒、抗体和转移因子;和
鸡蛋、鸡蛋黄或鸡蛋的级分。
2. 权利要求 1 的组合物,其中所述第二部分占免疫调节成分重量的至少百分之二。
3. 权利要求 2 的组合物,其中:
所述第一部分占免疫调节成分重量的 68%;和
所述鸡蛋或鸡蛋黄占免疫调节成分重量的 30%。
4. 权利要求 1-3 任一项的组合物,其中所述第二部分的上限分子量截断为 3,000D。
5. 用于改善免疫功能的组合物,其含有:
免疫调节成分,其由以下物质组成:
具有 10,000Da 上限分子量截断的粉末状牛初乳提取物;
上限分子量截断除去大颗粒、抗体和转移因子的粉末状牛初乳提取物;和
粉末状蛋黄。
6. 权利要求 5 的组合物,其中所述上限分子量截断除去大颗粒、抗体和转移因子的粉末状牛初乳提取物占免疫调节成分重量的至少百分之二。
7. 权利要求 6 的组合物,其中:
具有 10,000Da 上限分子量截断的粉末状牛初乳提取物占免疫调节成分重量的 68%;
上限分子量截断除去大颗粒、抗体和转移因子的粉末状牛初乳提取物占免疫调节成分重量的 2%;和
粉末状蛋黄占免疫调节成分重量的 30%。
8. 权利要求 5-7 任一项的组合物,所述上限分子量截断除去大颗粒、抗体和转移因子的粉末状牛初乳提取物具有 3,000D 的上限分子量截断。
9. 用于改善免疫功能的免疫调节剂,其由牛初乳的级分组成,所述牛初乳的级分的上限分子量截断除去大颗粒、抗体和转移因子。
10. 权利要求 9 的免疫调节剂,其中所述上限分子量截断为 3,000D。
11. 权利要求 9 的免疫调节剂,其中所述级分为 250D 至 2500D 的初乳级分。
12. 权利要求 1-8 任一项的组合物或者权利要求 9-11 任一项的免疫调节剂在制备用于调节受试者的免疫系统的药物中的应用。

免疫调节剂、含有免疫调节剂的组合物及其用途

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求 2006 年 9 月 29 日递交的美国临时申请系列号 60/848,348 和 2007 年 9 月 14 日递交的美国临时专利申请系列号 11/855,944 的优先权权益,在此将这两篇文献的公开内容以其整体引入作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及调节(例如,引发、增强、抑制不需要的活性等)受试者中细胞介导免疫的分子,包括用于产生和获得这类分子的方法,包括这类分子的制剂和组合物,用于评价这类分子有效性的方法和使用方法。更具体地,本发明涉及小分子,在此将其称为调节细胞介导免疫的“纳米级分(nanofraction)”分子。

[0004] 背景

[0005] 抗体提供和转移免疫力的能力是公知的,并且得到了广泛的研究,抗体的特征以及抗体所产生的机理也是如此。

[0006] 没有了解地很清楚或没有得到广泛研究的是转移因子的作用,其包括具有 3,500Da 至 7,500Da 分子量的分子家族,在调节细胞或 T-细胞介导免疫中起作用。随着时间的过去,本领域技术人员对转移因子的特征以及它们在生物体的免疫系统中的作用的了解已经得到了改善,并且继续改善。

[0007] 尽管进一步的研究继续阐明多种免疫系统组成部分的特征和功能,但是很大一部分可以没有得到很好的了解,乃至忽略了对可能产生、维持、传送和转移免疫力的方式具有影响以及对免疫力对寿命的作用具有影响的分子。

[0008] 发明公开

[0009] 最近以定量的方式表征了各种分子在调节细胞介导免疫中的有效性。可以直接或间接调节细胞介导免疫的分子是本领域已知的,称为“免疫调节剂”。一类免疫调节剂包括小的或低分子量的纳米级分(例如,至多 3,000Da,至多 3,500Da,250Da 至 2,000Da,2,000Da 至 4,000Da)分子,其引发、增强、抑制或调节细胞介导的免疫应答。由于这样的免疫调节剂相对小的大小或分子量,在此将其称为“纳米级分”免疫调节剂和“纳米级分”分子。

[0010] 可以从各种不同类型的来源动物获得纳米级分免疫调节剂。来源动物的实例包括,但不限于,哺乳动物(例如,奶牛)和鸟类(例如,鸡)。没有限制本发明的范围,可以从哺乳动物产生的初乳乃至奶中获得纳米级分免疫调节剂。作为另一个非限制性实例,可以从鸟类或任何其他类型的动物产的蛋中获得纳米级分免疫调节剂。初乳、蛋和纳米级分分子的其他来源在此总地称为“纳米级分来源”。

[0011] 可以通过将来源动物暴露于比通常来源动物暴露于该抗原的量大或浓度的一种或多种抗原来增强来源动物的纳米级分免疫调节剂的天然生产。例如,如果特定类型的来源动物乃至特定的来源动物在其通常的环境中通常暴露于特定量或浓度的给定抗原,可以通过将来源动物暴露于甚至更高量(例如,浓度)的抗原(例如,通过将来源动物接种

疫苗,通过将来源动物放入存在更大量或浓度抗原的环境中等)来增强来源动物的免疫调节剂的产生,包括纳米级分分子。作为另一个实例,如果特定类型的来源动物乃至特定的来源动物,通常用给定的抗原接种疫苗,可以通过改善来源动物对抗原的暴露(例如,通过将来源动物暴露于改善浓度的抗原,更有效或毒性更高形式的抗原等)来增强一种或多种纳米级分免疫调节剂的来源动物产生,尽管不认为纳米级分分子自身是抗原特异性的。

[0012] 已知方法可以用来从获得纳米级分免疫调节分子的纳米级分来源动物中存在的其他分子中部分、大部分或完全纯化纳米级分免疫调节分子,并任选将纳米级分免疫调节剂浓缩。这样的方法包括但不限于机械分离、相分离(例如,水性和非水性成分相互的分离)、沉淀、离心、过滤(包括微滤,使用约 12,000Da 至约 4,000Da 范围的分子截断(MWCO),和纳滤,使用低于约 4,000Da 的 MWCO)、渗析、色谱和电泳纯化方法。这样的方法可以单独或任意组合进行来产生其中存在一种或多种类型的免疫调节剂的制剂。

[0013] 在一个方面中,本发明包括至少部分纯化的、基本上纯化的(例如,到相关领域技术人员可接受的程度)和完全纯化的免疫调节剂。因此,本发明包括含有纳米级分分子的组合物。除了纳米级分分子,这样的组合物可以包括用于支持或调节受试者免疫系统的其他成分(例如,转移因子、抗体等),以及以其他方式有益于受试者的成分。

[0014] 包括含有单独的纳米级分分子和组合物或与其他免疫调节剂一起的纳米级分分子或组合物的使用或给药方法也在本发明的范围中。使用方法包括将一种或多种类型的免疫调节剂(例如,粗制的、部分纯化的、基本上纯化的或完全纯化形式的、制剂中的、组合物中的等)给药于受试者(例如,人或认为受益于由纳米级分分子提供的免疫调节的任何类型的动物)。以将特定的给药的免疫调节剂类型在受试者体内的水平改善至高于用于受试者的正常量的量(例如,浓度),将免疫调节剂给药于受试者。没有限制本发明该方面的范围,受试者可以接受临床上使受试者的免疫系统引发细胞介导的免疫应答有效的一种或多种免疫调节剂的量,或有效改善受试者的细胞介导的免疫应答的量。

[0015] 此外,评价免疫调节剂有效性的测定和测定方法在本发明的范围内。例如,T-细胞免疫功能测定可以用来评价潜在的免疫调节剂单独或结合其他分子(例如,抗原、促分裂原(其诱导有丝分裂或细胞复制等)调节一种或多种类型细胞的能力(例如,三磷酸腺苷(ATP)的产生),这些细胞参与细胞介导免疫。

[0016] 通过考虑随后的描述和所附的权利要求,本领域技术人员将清楚其他特征和优势。

[0017] 附图简述

[0018] 在附图中,图 1 至 4 是对引入本发明教导的组合物进行的各种测定的结果的图示。

[0019] 实施本发明的方式

[0020] 最近已经发现了各种分子量范围的小分子可用于调节免疫细胞的活性。以下实施例列出了所进行的用于研究这些结论的工作。

[0021] 实施例 1

[0022] 使用已知的方法,包括相分离、沉淀、过滤、微滤或纳滤和渗析,从牛初乳和鸡蛋制备各种分子量的级分。从牛初乳获得的分子量级分为:250Da 至 2,000Da,2,000Da 至 4,000Da,4,000Da 至 8,000Da(其包括转移因子,并包括用于比较的目的)和 8,000Da 至 12,000Da。相似地,从鸡蛋黄制得 2,000Da 至 4,000Da,4,000Da 至 8,000Da(其包括转移因

子,并包括用于比较的目的)和 8,000Da 至 12,000Da 分子量级分。然后将分子量级分干燥至粉末形式(例如,通过喷雾干燥、冷冻干燥等)。

[0023] 然后使用这些制剂进行各种测定来评价每种级分中分子来调节细胞的能力的效果,这些细胞传达细胞免疫(例如,CD4+T 辅助细胞)。具体地,将美国专利 5,773,232 和 6,630,316 以及美国专利申请公开 2005/0260563 中公开的测定类型进行改进并用来评价来自实施例 1 的不同分子量级分在各种条件下的活性。使用上述测定来评价免疫细胞(例如,CD4+T 辅助细胞,CD3+ 细胞(其包括所有 T 细胞)等)的三磷酸腺苷(ATP)产生。以本领域已知的方式(例如,使用所谓的“萤光素反应”,使用 lumenometer)来测量细胞产生的 ATP 量。

[0024] 实施例 2

[0025] 使用健康个体的白细胞进行第一个系列的试验,这些白细胞在其表面上包括或表达所谓的“CD4”糖蛋白,使用由 Cylex Incorporated of Columbia, Maryland 产生的 ImmuKnow™ 试验。由于它们的 CD4 糖蛋白表达,也将这些白细胞称为“CD4+”细胞。CD4 糖蛋白的表达将所谓的“T 辅助”细胞与其他类型的白细胞区分开来,包括其他 T 细胞。

[0026] ImmuKnow™ 试验的试剂盒的成分为:标准 96-孔“测定平板”,包括抽取式八孔片;“样品稀释液”,其包括生长培养基和防腐剂;“刺激剂”,其包括植物凝集素 -L (PHA-L) (来自豆类(例如,红芸豆)的一种物质,已知其非特异性地刺激有丝分裂(其中细胞生长并分裂成两个新细胞的过程),并且因此,刺激白细胞中三磷酸腺苷(ATP)的预备性产生(即,促分裂原)),稀释于生长培养基和防腐剂中;“**Dynabeads®** CD4”,其是覆盖鼠单克隆抗人 CD4 抗体的磁性样品纯化珠,并通过含有牛血清白蛋白(BSA)和防腐剂的缓冲盐溶液来携带;“洗涤缓冲液”,其包括含有 BSA 的缓冲盐溶液;“裂解试剂”,其包括含有去污剂的低渗碱溶液,“校准组”,使用 0、1、10、100 和 1,000ng/ml 的 ATP 浓度;“发光试剂”,包括缓冲溶液中的萤光素和萤光素酶,其与 ATP 反应来形成一定量的光,这表示了已经暴露于发光试剂的 ATP 量;和“测量平板”,具有不透光边界(即,壁和基底)的 96 孔。

[0027] 使用一个 96-孔测定平板的八孔片,将其称为“对照片”,以提供对照,包括四个“非受激”(NS)对照孔和四个“受激”对照孔。

[0028] 使用另一个 96-孔测定平板的八孔片,将其称为“测定片”,用于每个待测定的样品。将每个片的四个孔指定为“非受激”孔,而每个片的另外四个孔为“受激”孔。将五十微升(50 μ l)样品稀释液引入对照片四个“非受激”孔中,而将 25 μ l 样品稀释液引入每个测定片的每个“非受激”孔中。将二十五微升(25 μ l)刺激剂引入对照片的四个“受激”孔中,和引入每个测定片的四个“受激”孔中。

[0029] 除了样品稀释液或刺激剂,将实施例 1 中鉴定的分子级分之一 的 25 μ l 样品引入每个测定片的八个孔中。更具体地,将实施例 1 的分子量级分的每一种重建于样品稀释液中,并用一定体积的样品稀释液稀释,以在最终将 25 μ l 样品加入孔中时提供三种不同的浓度,分别将 10 μ g、100 μ g 和 1,000 μ g 量的干粉加入孔中。

[0030] 制备 1:3(血液:“样品稀释液”)的血样稀释液,已经将其温和搅拌以均匀分布其组分,包括白细胞。将七十五微升(75 μ l)的稀释血液加入每个片的每个孔中。然后将孔的内含物混合(例如,通过将平板置于振荡板上约 30 秒钟),然后在 37°C 的温度和 5% CO₂ 环境下孵育约 18 小时。

[0031] 一旦完成孵育,将孔的内含物再次混合(例如,通过将平板置于振荡板上约

三分钟)。此后,将包括 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠的溶液混合,使 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠均匀地悬浮于携带其的液体内(例如,使用涡旋)。如上所述,该实施例中的 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠包括覆盖鼠单克隆抗人 CD4 抗体的磁性珠子。将五十微升 (50 μ l) 携带 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠的溶液加入每个片的每个孔中。

[0032] 将每个片孔中的内含物再次混合(例如,在振荡板上约 15 秒钟),然后在室温将其静置或孵育约 15 分钟的时间。然后重复混合和孵育的过程。**Dynabeads**[®] 样品纯化珠上的鼠抗人 CD4 抗体只结合呈现 CD4 糖蛋白的白细胞。在该孵育过程中,包括 T 辅助细胞的 CD4+ 白细胞通过 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠上的鼠单克隆抗人 CD4 抗体固定,或结合 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠上的鼠单克隆抗人 CD4 抗体。

[0033] 孵育后,将每个孔的内含物再次混合(例如,在振荡板上约 15 秒钟至约 30 秒钟),以重悬浮 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠。根据 ImmuKnow[™] 测定附加的说明书中所列的操作方案,然后将每个孔的内含物引入磁场中(例如,通过将每个八孔片置于从 Cylex 可获得的磁盘中)。当接受磁场时,将 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠倒入它们存在的每个孔的一侧。然后除去孔中剩余的内含物(例如,用移液管吸取等),并将珠子和 T 辅助细胞洗涤一次或多次(例如,三次,每次使用 200 μ l 洗涤缓冲液),使其基本上纯化。

[0034] 然后将两百微升 (200 μ l) 裂解试剂加入每个孔中。从磁场取出每个孔的内含物后,将每个孔的内含物(即, **Dynabeads**[®] 样品纯化珠、连接珠子的细胞和裂解试剂)混合(例如,在振荡板上约五分钟)。裂解试剂破坏了由 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠上的抗体固定的 CD4+ 细胞的膜。其中,ATP 从裂解的细胞中释放出来。

[0035] 一旦完成细胞裂解,将每个孔的内含物接受磁场,将每个孔内的 **Dynabeads**[®] 样品纯化珠倒入孔的一侧。然后从每个孔中转移 50 μ l 样品至测量平板的相应孔中。除了转移样品,预留 96 孔测量平板的几个孔,用于校准组溶液的各种 ATP 浓度的 50 μ l 样品。

[0036] 然后将一百五十微升 (150 μ l) 发光试剂加入测量平板的每个孔中,测量平板包括测定样品或校准组溶液的样品。然后测量每个孔的发光。所测量的每个孔的发光提供了该孔中存在的 ATP 量的指示。每个孔中存在的 ATP 量随后表示了来自测量平板每个孔中内含物的细胞(即, CD4+ 细胞)内代谢活性的量。在用 PHA 非特异性刺激的产生的样品中,预期存在相对高水平的 ATP。免疫调节剂的添加(例如,来自实施例 1 中鉴定的级分之一)将改善或降低或调节由 PHA 非特异性刺激的 CD4+ 细胞中的代谢活性。

[0037] 下表中列出了该测定的结果,所示的数字表示由每个子集的白细胞产生的 ATP 平均量:

[0038] 表 1

[0039]

样品	对照	10 μ g/孔	100 μ g/孔	1000 μ g/孔
250Da 至 2,000Da 初乳级分	非受激 (NS)	14	52	37
	用 PHA 刺激	388	336	253
	PHA 刺激降低的 %		13.4	34.8
2,000Da 至 4,000Da 初乳级分	NS	14	52	42
	用 PHA 刺激	388	388	377
	PHA 刺激降低的 %		0	2.8
4,000Da 至 8,000Da 初乳级分	NS	14	69	46

	用 PHA 刺激	388	378	250	207
	PHA 刺激降低的%		2.6	35.6	46.6
8,000Da 至 12,000Da 初乳级分	NS	14	49	45	39
	用 PHA 刺激	388	337	237	181
	PHA 刺激降低的%		13.1	38.9	53.4
2,000Da 至 4,000Da 蛋级分	NS	14	49	33	44
	用 PHA 刺激	388	228	161	148
	PHA 刺激降低的%		41.2	58.5	61.9
4,000Da 至 8,000Da 蛋级分 (包括 TF)	NS	14	54	47	44
	用 PHA 刺激	388	354	230	158
	PHA 刺激降低的%		8.8	40.7	59.3

[0040] 这些数据表明在非刺激的测定中,其中细胞没有暴露于 PHA, (来自初乳和蛋)的 4,000Da 至 8,000Da 分子量级分,已知两者都含有转移因子,刺激了 CD4+ 白细胞中额外的代谢活性。这些数据证实了转移因子上调细胞介导免疫的能力。

[0041] 相反,4,000Da 至 8,000Da 初乳和蛋级分下调了 PHA 刺激 CD4+ 细胞中代谢活性的非特异性能力。由于 PHA 是人造的非特异性刺激剂,参与细胞介导免疫的转移因子对其活性的下调没有令人感到惊讶。认为并且之前的研究已经表明转移因子有助于平衡甚至集中由 T- 细胞引起的免疫活性 (例如,通过帮助细胞“记住”其最初的目的,通过降低自体免疫力和相关的障碍,这改善了对抗不利实体的活性,如受试者受到微生物 (细菌、病毒等) 的感染)。由 T- 细胞引起的 PHA 刺激活性的下调看来证实了转移因子在细胞介导免疫中的这种作用。

[0042] 在各种不含有转移的其他分子量级分中看到相似的结果,包括 250Da 至 2,000Da 初乳级分 (上调和下调),2,000Da 至 4,000Da 初乳级分 (上调) 和 2,000Da 至 4,000Da 蛋级分 (上调和下调)。8,000Da 至 10,000Da 初乳级分还引起没有用 PHA 刺激的 CD4+ 白细胞活性的上调和 CD4+ 白细胞中代谢活性的 PHA 刺激的下调。

[0043] 这些数据确定了转移因子以外的免疫调节剂至少存在于 250Da 至 2,000Da 初乳级分、2,000Da 至 4,000Da 初乳级分和 2,000Da 至 4,000Da 蛋级分中。通过实施例 3 中所示实验至少部分证实了这些级分各自中存在的“纳米级分分子”的免疫调节能力。

[0044] 实施例 3

[0045] 第二个系列的活性测定包括健康个体呈现 CD3 糖蛋白的白细胞 (即 CD3+ 细胞),已知其包括所有 T- 细胞,包括所谓的“T 记忆”细胞。具体地,使用 Cylex 的 T- 细胞记忆™测定。Cylex 的 T- 细胞记忆™测定的方案与实施例 2 中所示的非常相似,除了下列例外之外: 25 μl 刺激剂,其包括伴刀豆球蛋白 A (ConA),替代 PHA,只引入对照片的“受激”孔中,而将 25 μl 1 : 10 稀释的巨细胞病毒 (CMV) 疫苗加入每个测定片的“受激”孔中 (最终,每个孔的稀释度为 1 : 50); 将鼠抗人 CD3 抗体固定于磁珠的表面 (按照 T- 细胞记忆™试剂盒中所附的说明),以制备 **Dynabeads®** 样品纯化珠;并且在最初孵育之前,将 **Dynabeads®** 样品纯化珠加入血样、样品稀释剂、刺激剂 (如果存在) 和样品级分 (如果存在) 中。

[0046] 在 T- 细胞记忆™测定中,使用抗原,替代促分裂原 (例如 PHA),使得可以评价 T 记忆细胞识别特定抗原的能力。特别地,从测量平板的每个孔中发射出来的光的强度较低,因为 T 记忆细胞只构成一部分已经结合 **Dynabeads®** 的抗体分子的细胞。

[0047] 这些测定的结果列于下表中,所示的数字表示由每个所测定样品 (和量) 的白细胞产生的 ATP 平均量:

[0048] 表 2

[0049]

样品		对照	10 μ g	100 μ g	1000 μ g
250Da 至 2,000Da 初乳级分	非受激 (NS)	12	14	12	17
	用 CMV 刺激	316	468	338	345
	CMV 刺激增加的 %		48.1	7.0	9.2
2,000Da 至 4,000Da 初乳级分	NS	12	15	12	15
	用 CMV 刺激	316	501	503	440
	CMV 刺激增加的 %		58.5	59.1	39.2
4,000Da 至 8,000Da 初乳级分	NS	12	22	16	19
	用 CMV 刺激	316	473	476	475
	CMV 刺激增加的 %		49.7	50.6	50.3
8,000Da 至 12,000Da 初乳级分	NS	12	14	18	26
	用 CMV 刺激	316	453	404	370
	CMV 刺激增加的 %		43.4	27.8	17.1
2,000Da 至 4,000Da 蛋 级分	NS	12	26	61	108
	用 CMV 刺激	316	305	349	350
	CMV 刺激增加的 %		-3.5	10.4	10.8
4,000Da 至 8,000Da 蛋 级分 (包括 TF)	NS	12	34	39	108
	用 CMV 刺激	316	310	280	381
	CMV 刺激增加的 %		-1.9	-11.4	20.6

[0050] 从该实施例 3 中所进行的测定获得的数据证明了在抗原 (即, 特异性刺激剂, 与促分裂原的非特异性如 ConA 或 PHA 相对) 的存在下, 三种含有非转移因子的初乳级分增强了所测定的 T 记忆细胞对 CMV 的活性, 改善至与含转移因子的 4,000Da 至 8,000Da 类似大小样品的初乳级分在暴露于 CMV 时改善所测定细胞活性的能力相当 (250 至 2,000Da 和 8,000Da 至 12,000Da 初乳级分的 10 μ g 样品) 或超过 (2,000Da 至 4,000Da 初乳级分的 10 μ g 和 100 μ g 样品) 的程度。

[0051] 实施例 4

[0052] 进行了另一个系列的试验来测定纳米级分免疫调节分子 (即, 2,000Da 至 4,000Da 初乳级分的免疫调节剂) 或含转移因子的级分 (即, 4,000Da 至 8,000Da 初乳级分) 是否能够调节 (例如, 增强) 受试者的免疫记忆, 该受试者最近已经暴露于高剂量的特定抗原。具体地, 从已经暴露于引起全身性感染的流感病毒并患有流感症状四周的个体中获得血样。

[0053] 以实施例 3 中所述的方式进行测定, 根据实施例 3 中所示的测定提供的说明来使用 Cylex T- 细胞记忆™测定, 除了使用流感抗原, 以 Aventis Pasteur of Paris, France 制造的用于 2006-2007 流感季节的流感疫苗的 1 : 25 稀释液的形式 (最终, 每孔的稀释度为 1 : 125), 替代实施例 3 中的 CMV 疫苗。

[0054] 该测定的结果列于下表中:

[0055] 表 3

[0056]

样品		对照	10 μ g	100 μ g	1000 μ g
2,000Da 至 4,000Da 初乳级分	NS	4	10	3	4
	用流感抗原刺激	827	1003	906	936
	ConA	694			
	流感抗原刺激增加的 %		21.3	9.6	13.2
4,000Da 至 8,000Da 初乳级分 (包括 TF)	NS	4	36	24	11
	用流感抗原刺激	827	989	997	830
	ConA	694			
	流感抗原刺激增加的 %		19.6	20.6	0.4

[0057] 表 3 中所示的结果 (图 1 中还用图表表示了) 表明, 最近已经暴露于特定抗原的受试者的 T 记忆细胞暴露于该抗原时, 特别是在纳米级分分子或转移因子的存在下, CD3+ 记忆 T- 细胞的活性显著改善。实际上, 相对少量的纳米级分分子和转移因子引起 T 记忆细胞活性增加约 20%。事实上, 可以看出 2,000Da 至 4,000Da 级分的免疫调节剂与 4,000Da 至 8,000Da 级分中存在的转移因子和任何其他分子在调节所测定细胞的活性中大致同样有效。

CN 101553247 B

[0058] 来自实施例1-4的结果表明具有250Da至2,000Da, 2,000Da至4,000Da和8,000Da至12,000Da范围中分子量的免疫调节剂在调节各种类型的T细胞的免疫活性中是有效的。因此,通过将这样的免疫调节剂或含有免疫调节剂的制剂或组合物给予受试者,可以调节受试者的细胞介导免疫。

[0059] 基于这些结果,研发了生产各种含有预定MWCO分子的膳食补充剂(例如,来自(牛)初乳,(鸡)蛋等)的方法。例如,并且是非限制性的,可以将至少已经除去了大颗粒(例如,初乳/奶固体、蛋壳和膜等)(例如,通过相分离、过滤方法等)的纳米级分免疫调节剂源的液体制剂压迫通过具有设定大小的孔的滤器,以提供预定的上限MWCO。作为非限制性实例,可以使用提供约3,000Da分子量截断的滤器。或者,可以使用渗析方法,其包括使用渗析膜,其具有提供所需MWCO的孔。使用这样的方法提供了除去了较大分子的“纳米级分”,较大的分子包括转移因子、抗体和各种其他具有超过约3,000Da分子量的分子。例如,产生了初乳、鸡和各种粉状组合物。然后可以通过已知技术(例如,冷冻干燥、喷雾干燥、蒸发,以形成更的液体,掺入凝胶中等),将滤液(即,通过滤器的液体部分)进一步加工。然后将所得到的“纳米级分产物”单独使用或掺入其他组合物中。

[0060] 认为通过在还包括转移因子(并且其还包括基线水平(即,从其获得转移因子的来源(例如,初乳,蛋等)中已经存在的那些水平)的制剂中包括纳米级分分子,即使是非常小的量,所得到的组合物将下调由T-细胞所引起的所需活性(例如,自体免疫力和相关障碍等),同时改善或上调所需的T-细胞活性。研发了表4和5中所示的纳米级分-和-转移因子组合物。

[0061] 表4组合物A

[0062]

成分	相对量(以重量计)
牛初乳级分,上限MWCO 10,000Da(喷雾干燥)	68%
牛初乳级分,上限MWCO 3,000Da(纳米级分)(喷雾干燥)	2%
鸡蛋黄(喷雾干燥)	30%

[0063] 表4的组合物也可以称为“免疫调节成分”。这样的“免疫调节成分”基本上可以由免疫调节剂来源(包括纳米级分免疫调节剂的来源)或免疫调节剂来源的提取物的混合物组成,如表4中所列的那些,或其可以包括其他成分。

[0064] 同样,引入本发明教导的组合物可以基本上由“免疫调节成分”组成,如表4中公开的,或可以包括其他成分,如表5中所示的。

[0065] 表5组合物B

[0066]

成分	量(每份,每份大小=一粒胶囊)
组合物A	150mg
锌(作为单甲硫氨酸)	5mg
Cordyvant™专利的多糖复合物	440mg
IP-6(肌醇六磷酸)	
大豆提取物(植物甾醇)	
冬虫夏草(7%虫草酸)	
β-葡聚糖(来自面包工厂酵母)(酿酒酵母)(<i>Saacharomyces cerevisiae</i>)	
β-葡聚糖(来自燕麦)(<i>Avena sativa</i>)	
姬松茸(<i>Agaricus blazei</i>)提取物	
甘露聚糖(来自芦荟)(叶)	
橄榄叶提取物(油橄榄)(<i>Olea europaea</i>)	
灰树花(<i>Grifola frondosa</i>)(整株植物)	
香菇(<i>Lentinus edodes</i>)(整株植物)(5:1提取物)	

[0067] 根据本发明的组合物可以具体为液体（例如，掺入从 4LifeResearch, LC, Sandy, Utah 可获得的 **RioVida**[®] 饮料中）、粉末（其可以包括其他成分，以提供所需的风味、溶解特性等）、片剂（其另外包括其他成分，如粘合剂（例如，淀粉）等）、凝胶（其中添加了明胶或其他成分），或以任何其他合适的形式。应当理解，为了本发明公开的目的，用于制造本发明组合物的这些实施方案的其他成分对于此公开的目的可能仅仅被认为对组合物是任选的和非必需的，除非所附权利要求另外要求。

[0068] 实施例 5

[0069] 从已经患有带状疱疹（水痘带状疱疹病毒（VZV）感染）症状约四周的个体收集血液。然后以实施例 2 中所述的方式使用 Immuknow[™]测定来测定血液，用以下物质替换实施例 2 的样品级分：(a) 不包括免疫调节剂的对照；(b) 具有约 3,000Da MWCO 的已经喷雾干燥的初乳级分；(c) 加入转移因子 **XF**[®]，目前其可从 4Life Research 获得并包括具有约 10,000Da 上限 MWCO 的牛初乳提取物；(d) 表 4 中的组合物，将其标记为“组合物 A”；和 (e) 表 5 的组合物，将其标记为“组合物 B”。将 (b) 至 (e) 中的每一种重建于 Immuknow[™]测定附带的样品稀释液中，并稀释至一旦将血样和所有其他液体加入每个孔中时所得到的 1mg/ml 最终每孔浓度的浓度。

[0070] 这些测定的结果列于下表中：

[0071] 表 6

[0072]

	对照	纳米级分	TF XF	组合物 A	组合物 B
非受激 (NS)	26	35	77	47	19
用 PHA 刺激	220	234	150	140	27

[0073] 这些结果还显示在图 2 的图中。

[0074] 需要重申的是这些结果是在一定时间点（最初感染后大约四周；即，恢复过程中）下获得的，其中在不存在刺激的情况下，预期 T 辅助（CD4+）细胞活性降低，尽管大量 T 辅助细胞仍然存在于受试者血液中。在不存在非特异性刺激剂 PHA 的情况下，T 辅助细胞活性只受到纳米级分、TF XF 和组合物 A 的轻微刺激，并且没有显示出受到组合物 B 的刺激。然而，由 PHA 引起的 T 辅助细胞的非特异性刺激受到 TF XF 和组合物 A 的显著降低，并且通过组合物 B 甚至降低更大程度，如从列于表 1 中的实施例 2 结果可以预计的。

[0075] 实施例 6

[0076] 在较早的时间点（带状疱疹症状发作后大约一周），将预期 T 记忆细胞，尽管由于引起带状疱疹的 VZV 感染的局部特性没有以大浓度存在于受试者血液中（即，相对低的 VZV 血液滴定度），将已经识别 VZV 感染并易于受到 VZV 抗原存在的刺激。因此，进行 T-细胞记忆[™]测定来测定纳米级分、TF XF、组合物 A 和组合物 B 对来自如实施例 5 中所测定的相同受试者血液的 T 记忆细胞的作用。按照实施例 3 中所示的方案，除了以下例外：替代 CMV 疫苗，使用 VZV 疫苗，其已经 1：10 稀释（最终每孔稀释度为 1：50）；以及用实施例 5 中所用的对照和免疫调节剂替代实施例 3 的样品级分，将每种免疫调节剂稀释至 100 μg/ml 的最终每孔浓度。

[0077] 下表列出了测定结果：

[0078] 表 7

[0079]

	对照	纳米级分	TF XF	组合物 A	组合物 B
非受激的 (NS)	1	2	13	27	51
用 VZV 刺激的	1	5	30	32	69
用 ConA 刺激的	288				

[0080] 图 3 中还用图标显示了该数据。

[0081] 如所预期的, T 记忆细胞刺激了存在于 TF XF 中的转移因子的活性。将少量额外的纳米级分分子加入转移因子中显著改善了 T 记忆细胞的活性, 在使用和没用另外的 VZV 刺激中都是如此。因此, 实施例 5 和 6 的结果证实了将额外的纳米级分分子加入还含有转移因子的制剂中, 即使是非常小的量, 也将下调不需要的由 T- 细胞引起的活性 (例如, 自体免疫力和相关的障碍等), 同时改善或上调所需的 T- 细胞活性。

[0082] 实施例 7

[0083] 在另一个研究中, 将其进行来测定各种组合物刺激自然杀伤 (NK) 细胞对抗人成红细胞白血病细胞系 K-562 (其对 NK 细胞敏感) 活性的能力, 组合物包括如表 4 和表 5 中所示的含有转移因子和额外的纳米级分分子的组合物。因此, 在此也将 NK 细胞称为“效应细胞”, 而在此也将 K-562 细胞称为“肿瘤细胞”和“靶细胞”。具体地, 使用了 MTT 测定技术, 其中通过活细胞的活性线粒体中的还原酶, 将黄色的 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物 (MTT) 还原成紫色的甲 腓。就在细胞毒性分析之前, 将溶解甲 腓的溶液 (例如, 稀盐酸 (HCl) 中的二甲基亚砷、十二烷基磺酸钠 (SDS) 等) 加入每个孔中。然后使用分光光度测定法来测定所测定孔中的活细胞数量, 相对于没有加入组合物的一个或多个对照孔中的活细胞数量, 在分光光度测定法中, 测量了通过每个孔中的溶液吸收的特定波长 (约 500nm 至约 600nm 范围中的波长) 的光量。

[0084] 所评价的组合物包括转移因子 Advanced™, 可从 4Life Research 获得; 转移因子加 Advanced™, 也可从 4Life Research 获得; 组合物 A, 其含有转移因子和改善量的纳米级分分子; 组合物 B, 其含有转移因子、升高量的纳米级分分子和认为能增强免疫系统活性的其他成分; 来自牛初乳的纳米级分分子; 来自鸡蛋的纳米级分分子; 和白细胞间介素 -2 (IL-2), 可依据商品名 Proleukin 从 Chiron of the Netherlands 获得, 已知其能募集 NK 细胞来对抗癌细胞。

[0085] 从五名健康捐献者获得血液。使用已知方法将白细胞从血液的其他成分中分离出来。使用已知的密度梯度离心技术 (例如, 使用从 Sigma-Aldrich Corporation of St. Louis, Missouri 可获得的 **Histopaque**® 密度梯度), 从其他类型的白细胞中分离出单核细胞, 包括 NK 细胞。将单核细胞引入含有 10% 胎牛血清 (FCS) 的 RPMI 1640 生长培养基中。将相等体积的该混合物, 包括 100 μ l 培养基中约 60,000 白细胞的浓度, 引入标准 96- 孔平板的不同孔中。将如上所鉴定的含有转移因子和 / 或纳米级分分子的组合物的重建样品, 每个具有 1ml 无菌去离子水中 0.100mg 粉末的浓度, 加入含有白细胞和生长培养基的三个不同孔中, 总共为十八个孔。此外, 将 1,000IU/ml IL-2 引入含有单核细胞生长培养基的三个正对照孔中。三个负对照孔只含有单核细胞生长培养基混合物, 不含免疫调节剂。三个仅含效应细胞的负对照孔也只含有单核细胞生长培养基混合物, 而三个仅含靶细胞的负对照孔中只含有 100 μ l 生长培养基。

[0086] 在 5% CO₂ 存在下, 在 37°C 的温度和 100% 的湿度下, 用各自的免疫调节组合物 (除了三个负对照孔) 将单核细胞孵育 48 小时。

[0087] 孵育后, 将约 30,000 K-562 个细胞引入每个含有单核细胞和生长培养基的孔中, 除了只有效应细胞的三个负对照孔。在 5% CO₂ 存在下, 在 37°C 的温度和 100% 的湿度下, 将 96-孔平板和孔中的混合物再次孵育 48 小时。

[0088] 根据已知的标准技术, 制备 MTT 溶液, 其具有 5mg MTT/ml Henk's 盐溶液。将二十微升 (20 μl) MTT 溶液引入 96 孔平板的每个含有单核细胞-生长培养基-肿瘤细胞的孔中。然后在 5% CO₂ 存在下, 在 37°C 的温度和 100% 的湿度下, 将平板及其内含物再次孵育, 这次时间为约四小时。

[0089] 这次最终孵育后, 将 96-孔平板在约 1,500rpm 下离心约五分钟。此后, 从每个孔中除去上清液 (液体), 并将 150 μl 二甲基亚砷 (DMSO) 引入每个含有单核细胞和肿瘤细胞的孔中。然后使用分光光度计在 540nm 的波长来测量每个含细胞孔的光密度。然后将所测得的光密度用于测定通过每种测定物质所激活的 NK 细胞的细胞毒性指数 (%) (CI (%)), 使用以下等式:

$$[0090] \quad CI(\%) = [1 - (OD_{e+t} - OD_e) / OD_t] \times 100,$$

[0091] 其中 OD_{e+t} 是对应于测定组合物的每个测定孔的光密度, 包括正对照的 IL-2, OD_e 是三个只含效应细胞的负对照孔的平均光密度, 而 OD_t 是三个只含靶细胞的负对照细胞的平均光密度。CI (%) 表示已经由每个还含有测定调节组合物的孔中的 NK 细胞杀灭的靶细胞的百分比。结果呈现于下表中:

[0092] 表 8

[0093]

免疫调节组合物	CI (%)	相对活性
转移因子 Advanced®	43.1	55
转移因子加 Advanced™	38.5	49
组合物 A	60.3	77
组合物 B	57.9	74
纳米级分分子, 初乳	77.9	100
纳米级分分子, 蛋	68.7	88
IL-2	77.0	84

[0094] 这些数据, 在图 4 的图表中也显示了, 表明含有纳米级分分子的组合物, 特别是来自牛初乳的那些, 在引发 NK 细胞对抗 K-562 肿瘤细胞的活性中, 与 IL-2 大致同样有效, 或比 IL-2 更有效, 而含有来自初乳和蛋的转移因子以及来自初乳的纳米级分分子的组合物 (即, 组合物 A 和组合物 B) 激活 NK 细胞比没有纳米级分分子的组合物更有效。

[0095] 通过将少如 2% 重量的更多纳米级分分子加入含有转移因子的组合物中, 纳米级分分子可以通过受试者免疫系统的细胞介导部分的非特异性成分 (例如, NK 细胞) 来激发作用, 补充转移因子通过受试者免疫系统的细胞介导部分的抗原特异性成分来引发活性的

能力。

[0096] 在一起考虑时,实施例 5 至 7 的结果证明转移因子调节并引发 (prime)T 辅助细胞,这使得受试者的免疫系统能够更快速而有效地应答病原体和其他不利的实体。此外,实施例 5 至 7 说明了转移因子 可以增强 T 记忆细胞的活性。

[0097] 实施例 5 至 7 还显示了将额外的纳米级分免疫调节分子加入含有转移因子的组合物中可以增强和改善转移因子和含有转移因子的现有组合物的免疫调节 (例如, T 辅助细胞、T 记忆细胞和 NK 细胞的免疫调节)。

[0098] 调节受试者细胞介导免疫的方法包括将含有纳米级分分子的组合物给予 (例如, 肠内、非肠道等) 受试者。纳米级分分子可以单独给药,或作为基本上由纳米级分分子组成的组合物的一部分给药,或可以与含有转移因子的组合物 (例如,表 4 或表 5 中所列的组合物) 一起给药。可以以规律的基础给药,以努力维持受试者细胞介导免疫的整体平衡,或通过应答感染、自体免疫障碍、组织移植或影响 (激活或抑制) 受试者细胞介导免疫的其他情况来实现。

[0099] 认为根据本发明的教导含有纳米级分免疫调节分子的组合物的给药调节了基于生理需要的细胞介导的免疫活性。例如,可以降低不利的细胞介导的免疫活性 (例如,自体免疫力等)。作为另一个实例,还可以集中和增强 T 细胞除去受试者体内的不利病原体以及其他不利实体如癌细胞和其他异常或突变细胞的能力 (例如,通过激活 T 辅助 (CD4+) 细胞,其随后激活自然杀伤 (NK) 细胞,通过使 T 记忆细胞获能改善抗原特异性免疫力),特别是将转移因子与另外量的纳米级分免疫调节剂分子一起给药时。

[0100] 尽管之前的描述包含许多细节,但不应当将这些视为对本发明范围的限制,而仅仅是提供了对本发明的一些优选实施方案的说明。同样,可以设计没有脱离本发明的精神和范围的本发明的其他实施方案。来自不同实施方案的特征可以结合使用。因此,本发明的范围只受所附权利要求及其法定等同物,而不是受之前的描述所示和限制。因此将包括对在此公开的本发明所作的所有添加、删除和改进,它们都落入权利要求的含义和范围内。

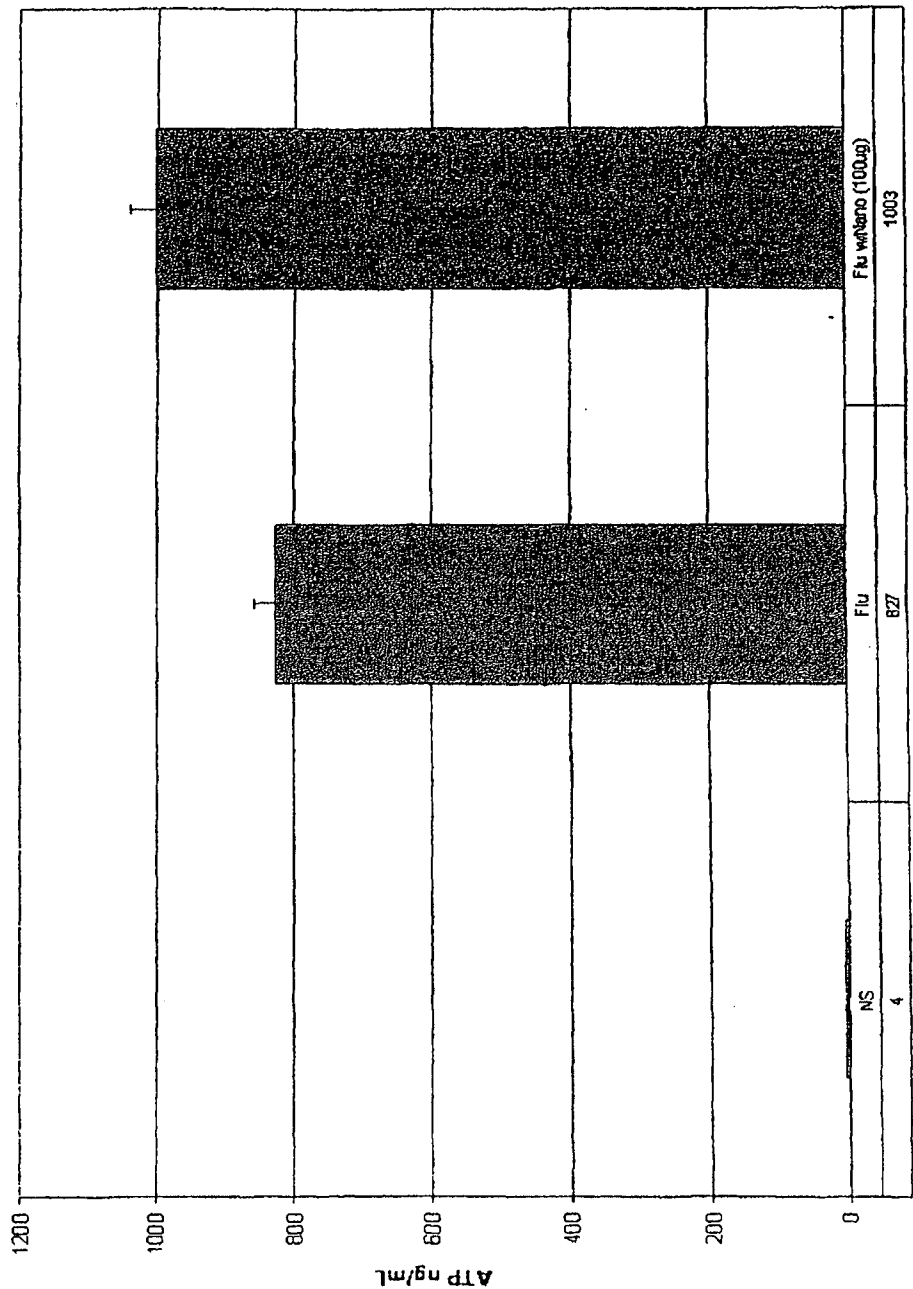


图1

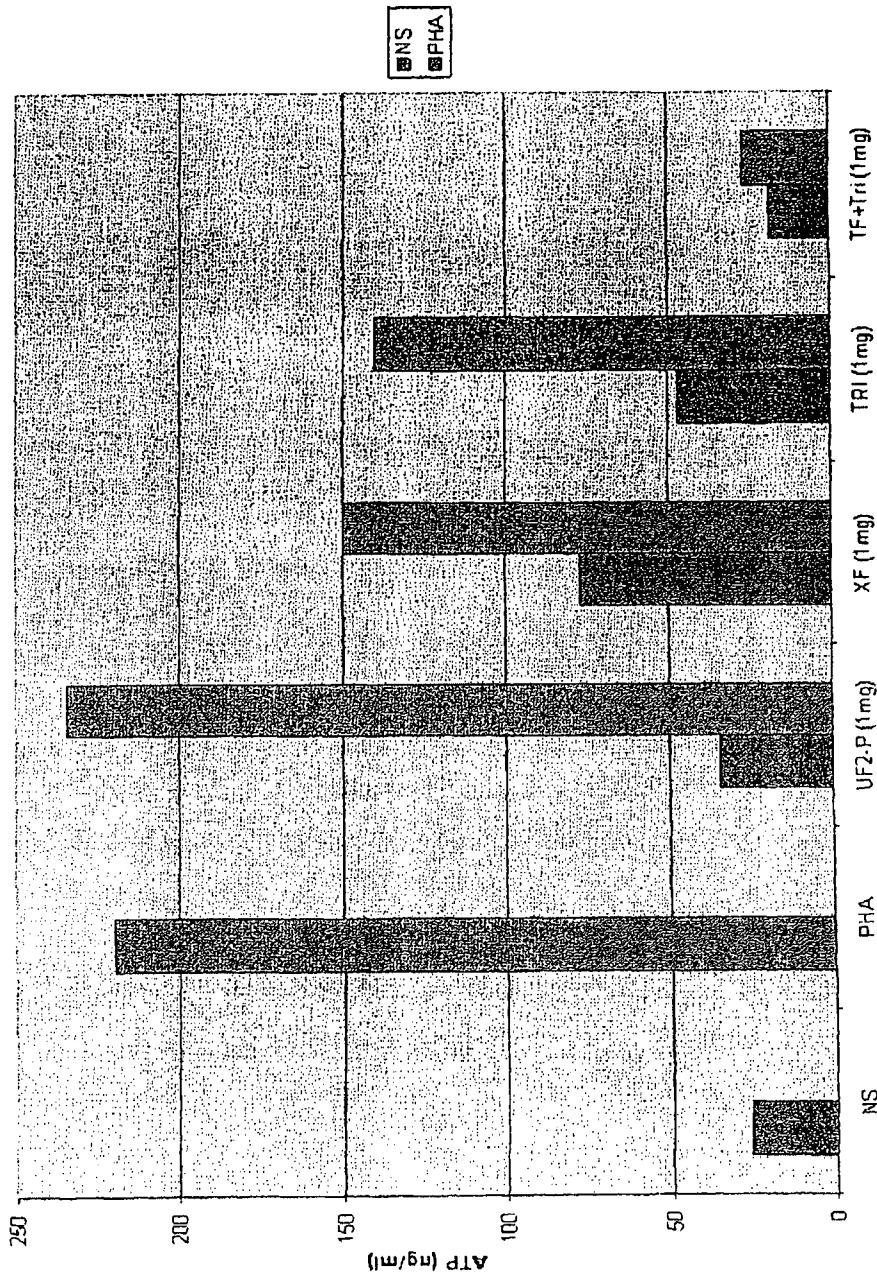


图2

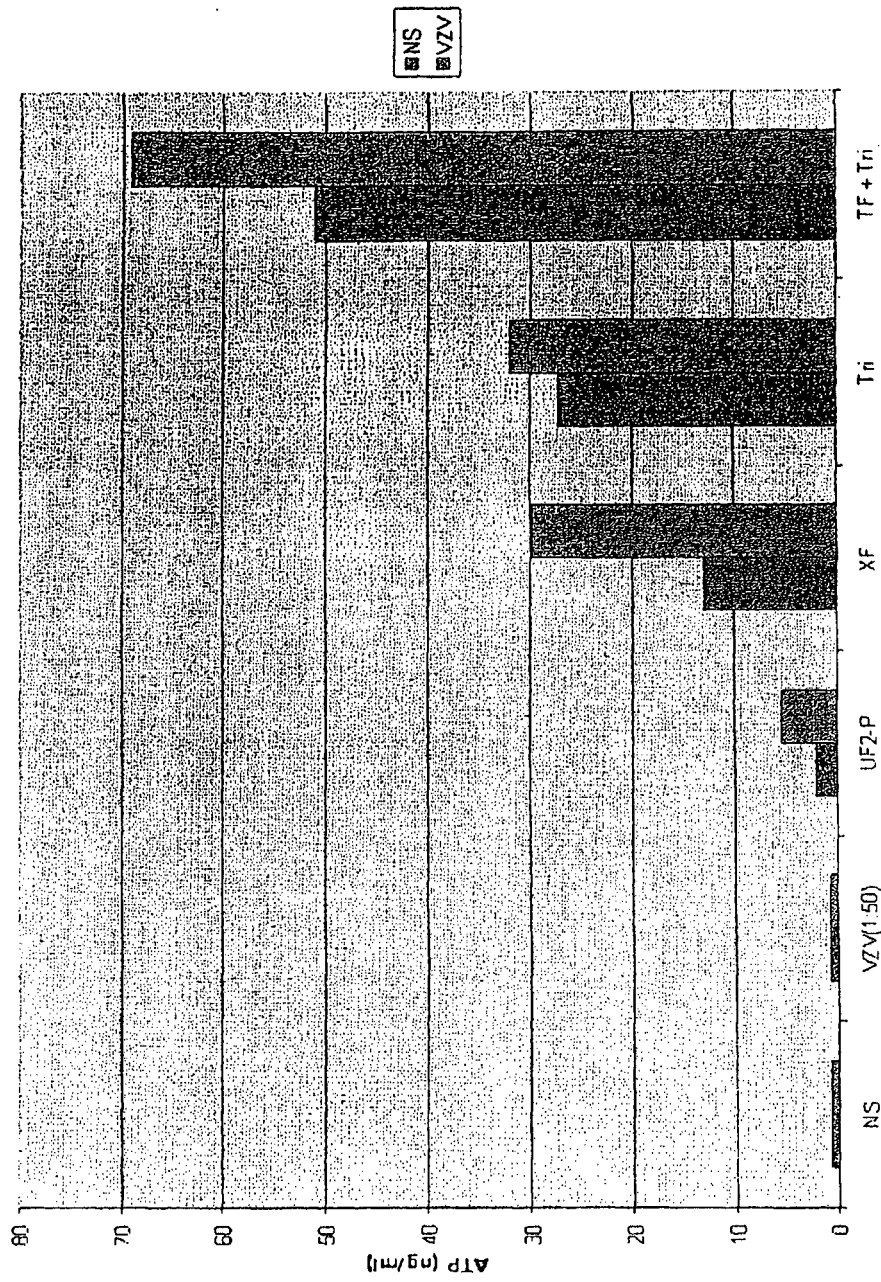


图3

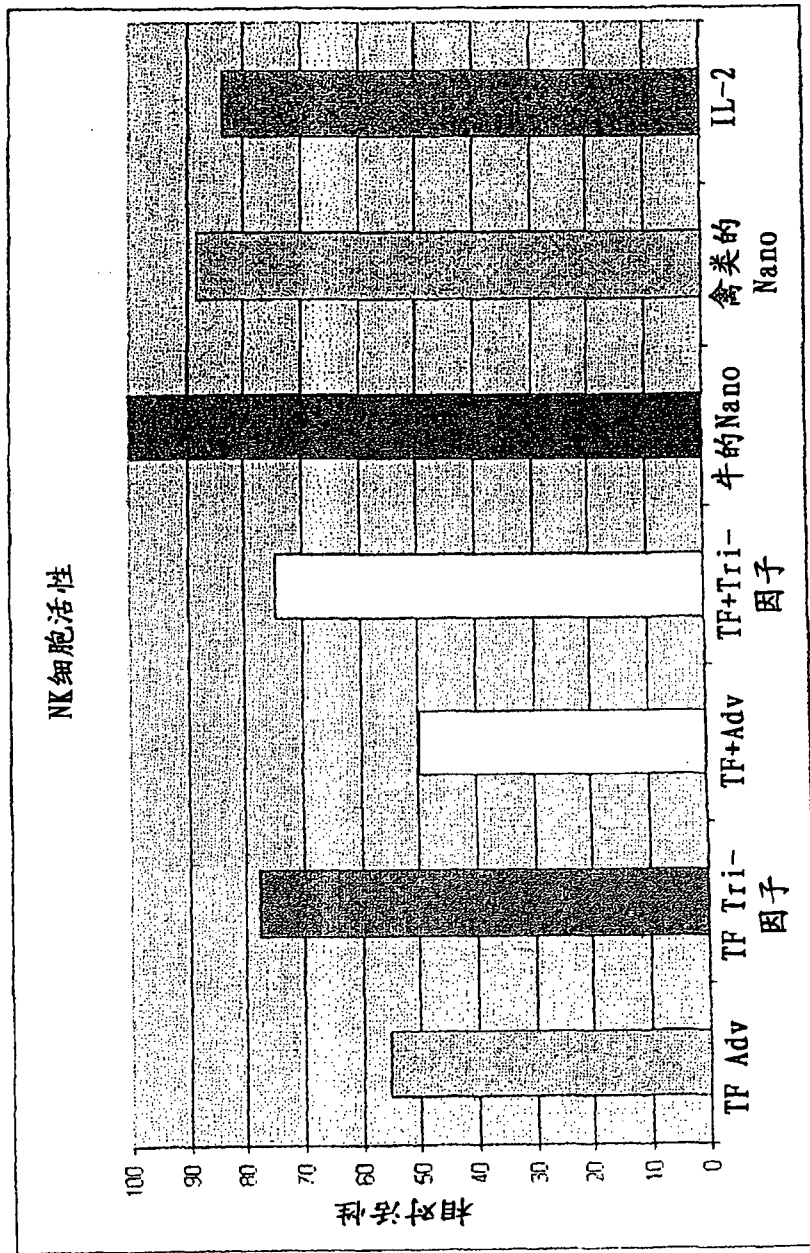


图4