เลขที่สิทธิบัตร 65016

สป/200 - ข

สิทธิบัตรการประดิษฐ์

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522 รับดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

4ไลฟ์ เปเต็นท์ส, แอลแอลซี

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ปรากฏในสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	0701004962
วันขอรับสิทธิบัตร	1 ตุลาคม 2550
ผู้ประดิษฐ์	เดวิด ลิสันบี และคณะ
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	สารปรับระบบภูมิคุ้มกัน, สารเตรียม และองค์ประกอบที่รวมถึงสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน, การทดสอบสำหรับการประเมินผลแอคติวิตีของสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน และสารเตรียม และองค์ประกอบที่รวมถึงสิ่งเดียวกัน และวิธีการต่างๆ

ให้ผู้ทรงสิทธิมีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้	ณ	วันที่	20	เดือน	กันยายน	พ.ศ.	2561
หมดอายุ	ณ	วันที่	30	เดือน	กันยายน	พ.ศ.	2570

(ลงชื่อ).....

(นายดิเรก บุญแท้)

รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน

อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา

ผู้ออกสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ 1. ผู้ทรงสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้นสิทธิบัตรจะสิ้นอายุ

2. ผู้ทรงสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวก็ได้

3. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามสิทธิบัตรและการโอนสิทธิต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

036631

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สารปรับระบบภูมิคุ้มกัน, สารเตรียม และองค์ประกอบที่รวมถึงสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน, การทดสอบสำหรับการประเมินผลแอคติวิตีของสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน และสารเตรียม และองค์ประกอบที่รวมถึงสิ่งเดียวกัน และวิธีการต่างๆ

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

ชีววิทยาในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน (immune modulator), สารเตรียม และองค์ประกอบที่รวมถึงสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน, การทดสอบสำหรับการประเมินผลแอคติวิตีของสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน และสารเตรียม และองค์ประกอบที่รวมถึงสิ่งเดียวกัน และวิธีการต่างๆ

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับโมเลกุลที่ปรับ (modulate) (เช่น กระตุ้น, ทำให้ดีขึ้น, ลดแอคติวิตีที่ไม่พึงประสงค์ และอื่นๆ) ภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell mediated immunity) ในตัวอย่างที่ศึกษา (subject) ที่รวมถึงวิธีการต่างๆ สำหรับการก่อกำเนิด (generating) และการได้มาซึ่งโมเลกุล, สารเตรียม และองค์ประกอบต่างๆ ดังกล่าวที่รวมถึงโมเลกุลดังกล่าว, วิธีการสำหรับการประเมินผลด้านประสิทธิภาพของโมเลกุลดังกล่าว, ตลอดจนวิธีการใช้ต่างๆ กล่าวโดยจำเพาะเจาะจงยิ่งขึ้นก็คือ การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งในกรณีนี้เรียกว่า "นาโนแมชชีน (nanomachine)" โมเลกุลที่ปรับภูมิคุ้มกันด้านเซลล์

องค์ประกอบซึ่งรวมถึงสารสกัด และแหล่งของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันที่รวมถึงโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแมชชีน (เช่น โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000 ดา และน้อยกว่า) นั้นถูกเปิดเผย องค์ประกอบเหล่านี้ยังอาจรวมถึงสารปรับระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ เช่น ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ การให้องค์ประกอบที่มีสารสกัดซึ่งรวมถึงโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแมชชีนที่ปรับภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (เช่น ลดแอคติวิตีที่ไม่พึงประสงค์ของเซลล์) ของตัวอย่างที่ศึกษาที่ได้รับองค์ประกอบดังกล่าว เมื่อให้ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ การรวมตัวระหว่างโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแมชชีนและทรานสเฟอร์แฟคเตอร์จะลดแอคติวิตีที่ไม่พึงประสงค์ของเซลล์ในขณะที่การเพิ่มขึ้นหรือเพิ่มระดับ (up-regulating) แอคติวิตีของเซลล์ซึ่งต้านทานต่อเชื้อโรคและสิ่งอื่นๆ ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น เซลล์ที่ระเร็นและเซลล์ที่เบี่ยงเบนไปจากปกติหรือเซลล์ที่กลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้เปิดเผยการหาปริมาณ (assay) และเทคนิคในการหาปริมาณ

ต่างๆ สำหรับการประเมินผลในความสามารถในการปรับระบบภูมิคุ้มกันของสารต่างๆ ที่มีการทดลองนี้ด้วย

ภูมิหลังของสิ่งประดิษฐ์และวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

เป็นที่ทราบกันดีและมีการวิจัยอย่างกว้างขวางว่าความสามารถของเซลล์ต่างๆ ในการจัดเตรียมและส่งผ่านภูมิคุ้มกัน (immunity) เป็นคุณสมบัติของเซลล์ประสาทและกลไกต่างๆ ที่สร้างแอนติบอดี

แต่สิ่งที่ยังไม่ตรงกันดีหรือยังไม่ได้วิจัยอย่างกว้างขวางนักคือบทบาทของทรานสเฟอร์แฟกเตอร์ (transfer factors) ซึ่งรวมถึงสารสกัดจากโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่อยู่ระหว่าง 3,500 Da และ 7,500 Da ซึ่งมีบทบาทในการปรับภูมิคุ้มกันด้านเซลล์และวิถีภูมิคุ้มกันด้วยเซลล์ (T-cell-mediated immunity) ตลอดจนความเข้าใจว่าจุดประสงค์ของสิ่งปรากฏการณ์ที่ตรงกันข้ามนั้นเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของทรานสเฟอร์แฟกเตอร์และบทบาทต่างๆ ของทรานสเฟอร์แฟกเตอร์ในระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตน้ำดีขึ้นและดีขึ้นอย่างต่อเนื่อง

ในขณะที่งานวิจัยที่ผ่านมายังคงแสดงถึงคุณสมบัติและบทบาทที่ต่างๆ ของส่วนประกอบของระบบภูมิคุ้มกันที่มีความซับซ้อนอย่างกว้างขวาง ซึ่งอาจมีจำนวนมากที่ยังเข้าใจไม่ดีพอ หรือแม้แต่มองข้ามไปก็ในโมเลกุลที่อาจมีผลกระทบในรูปแบบซึ่งภูมิคุ้มกันจัดการขึ้นมา, ดำรงอยู่, ส่งผ่าน และดำเนินการตลอดจนผลของภูมิคุ้มกันต่อความทั่งยืนของชีวิต

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 ถึง รูปที่ 4 เป็นรูปประกอบและกราฟที่แสดงผลของการทดลองที่บริษัทฯ ได้ทำขึ้นส่วนประกอบที่เป็นการสกัดแบบ ผนเข้าด้วยกันของสารเวียดนามนี้

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

คำขอนี้ขอเลื่อนสิทธิประโยชน์ย้อนหลังต่อคำขอชั่วคราวของสหรัฐอเมริกาหมายเลข 60/848,348 ที่ยื่นของสิทธิบัตร วันที่ 29 กันยายน 2006 และคำขอสิทธิบัตรของสหรัฐอเมริกาหมายเลข 11/855,944 ที่ยื่นของสิทธิบัตร วันที่ 14 กันยายน 2007 ซึ่งที่ภูมิปัญญาของสิทธิบัตรทั้งสองซึ่งสิทธิบัตรนี้ได้รวมเข้าด้วยกันในเรื่องนี้ ตั้งอยู่ในความครบถ้วนสมบูรณ์โดย การอ้างถึงนี้

เพื่อให้การยื่นนี้ได้มีการแสดงคุณสมบัติในรูปแบบของการแสดงถึงประสิทธิภาพของโมเลกุลที่มีการทดลองในการปรับระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ โมเลกุลที่ทดลองปรับภูมิคุ้มกันด้านเซลล์โดยสรุปวิธีโดยอ้อมนั้นเป็นที่ทราบในศัพท์ปัจจุบันว่าเป็นการปรับระบบภูมิคุ้มกัน (immune

modulators)" สารปรับระบบภูมิคุ้มกันคลาสสะนึ่งรวมถึงนาโนแฟรกชั่นโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (เช่น มากถึง 3,000 Da, มากถึง 3,500 Da, 250 Da ถึง 2,000 Da, 2,000 Da ถึง 4,000 Da) ที่กระตุ้น, ทำให้ดีขึ้น, คลายรือมีผลนั้นก่อปรับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ เนื่องจากสารปรับระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวมีขนาดเล็ก หรือมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ดังนั้นจึงเรียกสารปรับระบบภูมิคุ้มกันในกรณีนี้ว่าเป็นสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน "นาโนแฟรกชั่น" และเป็น "นาโนแฟรกชั่น" โมเลกุล

สารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแฟรกชั่นอาจได้มาจากสัตว์แหล่ง (source animal) ชนิดต่างๆ ที่หลากหลาย ตัวอย่างของสัตว์แหล่ง รวมถึงแต่ไม่ถูกจำกัด ต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (เช่น วัว) และสัตว์ปีก (เช่น ไก่) เนื่องจากการจำกัดในขอบเขตของการประดิษฐ์นี้ สารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแฟรกชั่นอาจได้มาจากน้ำนมมารดาหรือน้ำนมเหลืองหรือน้ำนมที่สร้างโดยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังตัวอย่างที่ไม่มีการจำกัดสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแฟรกชั่นอาจได้มาจากไข่ที่ผลิตโดยสัตว์ปีกหรือสัตว์ชนิดใดๆ ดังนั้นในกรณีนี้จึงเรียกน้ำนมมารดา น้ำนมเหลือง, ไข่ และแหล่งอื่นๆ ของนาโนแฟรกชั่นโมเลกุลโดยรวมว่า "แหล่งนาโนแฟรกชั่น (nanofraction sources)"

อาจเพิ่มการสร้างสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแฟรกชั่นโดยสัตว์แหล่งโดยธรรมชาติ ให้มากขึ้นโดยการให้สัตว์แหล่งได้รับแอนติเจนหนึ่งชนิดหรือมากกว่าในปริมาณที่มากกว่าหรือความเข้มข้นที่มากกว่าปริมาณหรือความเข้มข้นปกติของแอนติเจนดังกล่าวที่สัตว์แหล่งควรได้รับโดยปกติ ตัวอย่างเช่น หากสัตว์แหล่งชนิดที่จำเพาะหรือแม้แต่สัตว์แหล่งที่เฉพาะเจาะจงควรได้รับแอนติเจนที่ให้ในปริมาณหรือความเข้มข้นที่แน่นอนโดยปกติในตลาดแวดล้อมที่เป็นแบบอย่าง การสร้างสารปรับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์แหล่งที่รวมถึงนาโนแฟรกชั่นอาจเพิ่มมากขึ้นโดยการให้สัตว์แหล่งได้รับแอนติเจนดังกล่าวเช่น โดยการฉีดวัคซีนแก่สัตว์แหล่ง, การนำสัตว์แหล่งไปไว้ในสิ่งแวดล้อมที่มีแอนติเจนดังกล่าวปรากฏอยู่ในปริมาณหรือความเข้มข้นมากกว่าปกติและอื่นๆ ในปริมาณที่มากขึ้น (เช่น ความเข้มข้น) ตัวอย่างอื่นๆ หากชนิดของสัตว์แหล่งหรือกลุ่มสัตว์แหล่งที่มีความเฉพาะเจาะจงได้รับการฉีดวัคซีนด้วยเป็นแบบฉีดด้วยแอนติเจนที่ให้ การสร้างสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแฟรกชั่นหนึ่งชนิดหรือมากกว่าของสัตว์แหล่งสามารถเพิ่มมากขึ้นโดยการที่มากว่าได้รับแอนติเจนของสัตว์แหล่ง (เช่น โดยการให้สัตว์แหล่งได้รับแอนติเจนที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งเป็นแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพมากกว่าหรือมีรูปแบบที่ทำให้เกิดการติดเชื้อสูง และอื่นๆ) แม้ว่านาโนแฟรกชั่นโมเลกุลโดยตัวมันเองจะไม่ถูกเชื่อว่าเจาะจงต่อแอนติเจน

กระบวนการที่คล้ายกันทั่วไปที่ถูกใช้ในการทำให้สารปรับระบบภูมิคุ้มกันมาในเฟรกชั่นบริสุทธิ์บางส่วน, โดยมีนัยสำคัญยิ่ง หรืออย่างสมบูรณ์จากโมเลกุลอื่นๆ ที่ปรากฏในการโมเลกุลของสัตว์เหล่านี้ได้มาในเฟรกชั่นมา และที่เป็นทางเลือกคือเพื่อทำให้สารปรับระบบภูมิคุ้มกันมาในเฟรกชั่นเข้มข้นขึ้น กระบวนการดังกล่าวรวมถึงกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยปราศจากการจำกัดในการแยกเชิงกล การแยกเฟส (phase separation) (เช่น การแยกส่วนประกอบที่ละลายในน้ำและส่วนที่ไม่ละลายในน้ำออกจากกัน), การตกตะกอน, การหมุนเหวี่ยง (centrifugation), การกรอง (ซึ่งรวมถึงการกรองแบบไมโครฟิลเตรชั่น (microfiltration) ซึ่งมีค่าตัดขอบของน้ำหนักโมเลกุล (molecule cutoff; MWCO) ในช่วงประมาณ 12,000 Da ลงมาถึงประมาณ 4,000 Da และนาโนฟิลเตรชั่น (nanofiltration) ที่มีค่า MWCO น้อยกว่าประมาณ 4,000 Da), ไดแลซิส (dialysis), โครมาโตกราฟี และอิเล็กโตรโฟรซิส (electrophoretic) กระบวนการดังกล่าวอาจจะนำมาใช้อย่างเดี่ยวหรือในการรวมใดๆ เพื่อผลิตสารเตรียมซึ่งมีสารปรับระบบภูมิคุ้มกันหนึ่งชนิดหรือมากกว่าปรากฏ

ในรูปลักษณ์หนึ่ง การประดิษฐ์นี้รวมถึงสารเตรียมของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันที่ทำให้บริสุทธิ์อย่างน้อยบางส่วน, ทำให้บริสุทธิ์อย่างมีนัยสำคัญ (เช่น ถึงค่าที่ได้รับการยอมรับโดยผู้ชำนาญในศิลปวิทยาการที่เกี่ยวข้อง) และที่ทำให้บริสุทธิ์อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้การประดิษฐ์นี้รวมถึงองค์ประกอบที่รวมถึงสารในเฟรกชั่นโมเลกุลต่างๆ และจากสารในเฟรกชั่นโมเลกุลดังกล่าวแต่ละองค์ประกอบดังกล่าวอาจรวมถึงส่วนประกอบอื่นๆ ที่มีประโยชน์ในการสนับสนุนหรือปรับระบบภูมิคุ้มกันของตัวอย่างที่ศึกษา เช่น น้ำตาล ฟอสโฟลิปิด คอเลสเตอรอล แอนติบอดี และอื่นๆ) และอาจส่วนประกอบที่อาจเป็นประโยชน์ต่อตัวอย่างที่ศึกษาในทางอื่น

วิธีการที่รวมถึงการใช้หรือการให้สารในเฟรกชั่นโมเลกุลหรือองค์ประกอบที่รวมถึงสิ่งเดียวกัน โดยลำพังหรือมีสารปรับระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ นั้นอยู่ภายในขอบเขตของการประดิษฐ์นี้ วิธีการของการใช้รวมถึงการให้สารปรับระบบภูมิคุ้มกันหนึ่งชนิดหรือมากกว่า (เช่น ในรูปที่ผ่านกรรมวิธี, รูปที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน, รูปที่ทำให้บริสุทธิ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง หรือรูปที่ทำให้บริสุทธิ์อย่างสมบูรณ์, ในสารเตรียม, ในองค์ประกอบและอื่นๆ) แก่ตัวอย่างที่ศึกษา (เช่น มนุษย์หรือสัตว์ชนิดใดๆ ที่เชื่อว่าจะได้รับผลดีจากสารปรับระบบภูมิคุ้มกันที่จัดเตรียมโดยนำในเฟรกชั่นโมเลกุล) สารปรับระบบภูมิคุ้มกันถูกให้แก่ตัวอย่างที่ศึกษาในปริมาณที่เพิ่มระดับ (เช่น ความเข้มข้น) ของชนิดสารปรับระบบภูมิคุ้มกันที่ให้อย่างเฉพาะเจาะจงในช่วงเวลาของตัวอย่างที่ศึกษาไปถึงปริมาณที่สูงกว่าปกติสำหรับตัวอย่างที่ศึกษา โดยปราศจากการจำกัดของขอบเขตของรูปลักษณ์นี้ของการประดิษฐ์

นี้ ตัวอย่างที่ศึกษาจะได้รับสารปรับระบบภูมิคุ้มกันหนึ่งในปริมาณหนึ่งหรือมากกว่าที่มีผลในทางคลินิกสำหรับการทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของตัวอย่างที่ศึกษานั้นไปกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์หรือปริมาณที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์โดยตัวอย่างที่ศึกษา

นอกจากนี้ การทดสอบต่างๆ และวิธีการทดสอบที่ประเมินผลความมีประสิทธิภาพของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนั้นอยู่ในขอบเขตของการประดิษฐ์นี้ ดังตัวอย่างอาจใช้การทดสอบปริมาณฟังก์ชั่น (function) ของภูมิคุ้มกันด้านทีเซลล์ (T-cell immune function assay) ในการประเมินผลความสามารถของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันที่มีศักยภาพต่อการปรับแต่งคิวิสิของ (เช่น การผลิตอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) โดย) เซลล์ชนิดหรือมากกว่าที่มีส่วนในภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ อาจโดยลำพังหรือร่วมกับโมเลกุลอื่นๆ (เช่น แอนติเจน, ไมโตเจน (ซึ่งชักนำกระบวนการไมโตซิส หรือการจำลองเซลล์ (cell replication) และอื่นๆ)

ทักษะอื่นๆ และข้อดีต่างๆ จะชัดเจนในทักษะในศิลปวิทยาการโดยการพิจารณาการบรรยายที่ตามมาและการดึงสิทธิเหนือ

เนื่องในปัจจุบันนี้ได้มีการค้นพบว่าโมเลกุลขนาดเล็กในช่วงน้ำหนักโมเลกุลที่หลากหลายที่มีประโยชน์ในการปรับแต่งคิวิสิของเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน (immune cell) ต่างๆ ตัวอย่างต่อไปนี้เป็นการอธิบายการกระทำต่างๆ ที่ได้ดำเนินการเพื่อให้ไปถึงข้อสรุปต่างๆ เหล่านี้

ตัวอย่างที่ 1

การใช้กระบวนการที่เป็นที่ทราบกันดี ที่รวมถึงการแยกเฟส (phase separation), การตกตะกอน, การกรอง, การกรองแบบไมโครหรือการกรองแบบนาโนและไดแอลิซิส ทำให้สามารถเตรียมเฟรกชั่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่หลากหลายจากทั้งน้ำนมน้ำเหลืองของสัตว์ปีกพวกวัว (bovine colostrum) และไข่ไก่ เฟรกชั่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่ได้มาจากน้ำนมน้ำเหลืองของสัตว์ปีกพวกวัว ได้แก่: 250 Da ถึง 2,000 Da, 2,000 Da ถึง 4,000 Da, 4,000 Da ถึง 8,000 Da (ซึ่งรวมถึงทรานสเฟอร์แฟกเตอร์ และถูกรวมถึงสำหรับวัตถุประสงค์ในการเปรียบเทียบ) และ 8,000 Da ถึง 12,000 Da ที่คล้ายคลึงกันคือเฟรกชั่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่ได้มาจากไข่แดงของไข่ไก่ที่มีขนาด 2,000 Da ถึง 4,000 Da, 4,000 Da ถึง 8,000 Da (ซึ่งรวมถึงทรานสเฟอร์แฟกเตอร์และถูกนำมารวมถึงสำหรับวัตถุประสงค์ในการเปรียบเทียบ) และ 8,000 Da ถึง 12,000 Da จากนั้นจึงทำให้เฟรกชั่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ เหล่านี้อยู่ในรูปผง (เช่น โดยการพ่นแห้ง (spray drying), การทำแห้งแบบเย็นจัด (freeze drying) และอื่นๆ)

ต่อมาจึงทำการหาปริมาณ (assay) อย่างๆ โดยการใช้สารเตรียมเหล่านี้เพื่อประเมินผลในผลของโมเลกุลต่างๆ ในแต่ละเฟรกชั่นในการปรับแอคติวิตี้ของเซลล์ที่ขนส่งภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cellular immunity) (เช่น CD4+ ทีเซลล์ผู้ช่วย (T helper cell)) ดังกล่าวโดยจำเพาะเจาะจงที่การหาปริมาณ (assay) ของชนิดที่เปิดเผยในสิทธิบัตรของสหรัฐอเมริกาเลขที่ 5,773,232 และ 6,630,316 และในการประกาศโดยคำขอจดสิทธิบัตรของสหรัฐอเมริกาเลขที่ 20050260563 นั้นถูกปรับเปลี่ยนและใช้ในการประเมินผลของแอคติวิตี้ของเฟรกชั่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ จากตัวอย่างที่ 1 ในสภาวะที่หลากหลาย การหาปริมาณ (assay) ดังที่ได้กล่าวมาก่อนแล้วถูกใช้ในการประเมินผลการสร้างอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) โดยเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน (immune cell) เช่น CD4+ ทีเซลล์ผู้ช่วย (T-helper cell), เซลล์ CD3+ (ซึ่งรวมถึงทีเซลล์ (T-cells) ทั้งหมด) และอื่นๆ ปริมาณของ ATP ที่สร้างโดยเซลล์ดังกล่าวอาจวัดในวิธีการที่เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปในศิลปวิทยาการ (เช่น โดยการใช้ที่เรียกว่า "ปฏิกริยาลูซิเฟอริน (Luciferin reaction)" พร้อมด้วยลูมิโนมิเตอร์ (luminometer))

ตัวอย่างที่ 2

การหาปริมาณ (assay) ชุดแรกถูกทำขึ้นโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวของบุคคลที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ที่รวมถึงหรือแสดงสิ่งที่เรียกว่า "CD4" โปรตีนที่ผิวโดยใช้อิมมูโนวันเคลนเซ่ (ImmuKnow™ assay) ที่ผลิตโดยบริษัทไซแลกซ์อินคอร์ปอเรเตดของโคลัมเบีย (Cylex incorporated) แมรีแลนด์ เซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้ถูกเรียกว่า "CD4+" เนื่องจากการแสดงของยีน CD4 โปรตีน การแสดงของ CD4 โปรตีนทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างสิ่งที่เรียกว่า "ทีเซลล์ผู้ช่วย (T helper cell)" จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ ที่รวมถึงเซลล์ที (T cells) ชนิดอื่นๆ

ส่วนประกอบของชุดทดสอบอิมมูโนวันเคลนเซ่ (ImmuKnow™ assay) คือ: เพลตสำหรับการทดสอบชนิด 96 หลุม (96-well "Assay Plate") ที่รวมถึงสตริปแบบ 8-หลุม (8-well strips) ซึ่งจัดออกได้: "ตัวเจือจางตัวอย่าง (Sample Diluent)" ซึ่งรวมถึงมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต (growth medium) และวัสดุกันเสีย; "สารกระตุ้น (Stimulant)" ซึ่งรวมถึงไฟโตฮีมแอกกลูตินิน แอล (phytohemagglutinin-L (PHA-L)) ตัวที่มีขนาดเล็กต่างๆ (เช่น ถั่วแดงหลวงที่ทราบกันดีว่าใช้ในการกระตุ้นไมโทซิส (กระบวนการซึ่งเซลล์เดี่ยวโตขึ้นเป็น 2 เซลล์ใหม่) อย่างไม่เฉพาะเจาะจง และดังนั้นผลผลิตที่เครียดของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (เช่น "ไมโตเจน (mitogen)") จึงถูกนำมาทำให้เจือจางในมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต (growth medium) และวัสดุกันเสีย; "โดนาบีดส์ CD4 (Dynabeads® CD4)" ซึ่งเป็นเม็ดแม่เหล็กสำหรับการทำให้

ตัวอย่าง (sample) บริสุทธิ์ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีโมโนโคลนอลต่อต้านมนุษย์ CD4 (mouse monoclonal anti-human CD4 antibodies) และที่บรรจุอยู่ในสารละลายน้ำกลั่นที่เป็นบัฟเฟอร์ (buffer saline solution) ที่มีโปรตีนซีรัมบัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) และวัสดุทั่วไป: "บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (Wash buffer)" ซึ่งรวมถึงสารละลายน้ำกลั่นที่เป็นบัฟเฟอร์ที่มี BSA; "รีเอเจนต์ในการสลาย (Lysis reagent)" ซึ่งรวมถึงสารละลายไฮโปโทนิคที่เป็นเบส (hypotonic basic solution) ที่มีสารซักฟอก (detergent) ; "แผงสำหรับการเทียบมาตรฐาน (Calibration Panel)" ที่มีความเข้มข้นของ ATP 0, 1, 10, 100 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร; "ลูมิเนสเซนส์รีเอเจนต์ (Luminescence Reagent)" ที่รวมทั้งลูซิเฟอริน (luciferin) และลูซิเฟอเรส (luciferase) ในสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งทำปฏิกิริยากับ ATP เพื่อสร้างแสงในบริเวณที่ช่วงชี้ปริมาณของ ATP ซึ่งลูมิเนสเซนส์รีเอเจนต์ได้ถูกดัดแปร และ "แผงสำหรับการวัด (Measure Plate)" ที่มี 96-หลุม (96-well) ซึ่งมีขอบที่ทึบแสง (เช่น ที่ผนังและฐาน)

สตริปชนิด8-หลุม (8-well strips) ของแผงสำหรับการทดสอบชนิด 96 หลุม (96-well"Assay Plate") ซึ่งอาจเรียกว่าเป็น "สตริปควบคุม (control strip)" นั้นใช้ในการเตรียมหลุมควบคุมผลการทดสอบ (controls) ซึ่งรวมถึงหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุม "ที่ไม่ถูกกระตุ้น (nonstimulated; NS)" จำนวน 4 หลุม และหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุม "ที่ถูกกระตุ้น (stimulated)" คือ 4 หลุม

สตริปชนิด8-หลุม (8-well strips) ของแผงสำหรับการทดสอบชนิด 96 หลุม (96-well"Assay Plate") ที่ๆ ซึ่งอาจเรียกว่าเป็น "สตริปทดสอบ (test strip)" นั้นใช้สำหรับการทดสอบตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง โดยจะจัดเตรียมไว้ให้หลุม "ที่ไม่ถูกกระตุ้น (nonstimulated)" จำนวน 4 หลุม และหลุม "ที่ถูกกระตุ้น (stimulated)" คือ 4 หลุม จากนั้นจึงใส่สารสำหรับเจือจางตัวอย่าง (Sample Diluent) 50 ไมโครลิตรในหลุม "ที่ไม่ถูกกระตุ้น (nonstimulated)" จำนวน 4 หลุมของสตริปควบคุมและใส่ตัวทำให้ตัวอย่างเจือจาง 25 ไมโครลิตรในหลุม "ที่ไม่ถูกกระตุ้น (nonstimulated)" จำนวน 4 หลุมของสตริปทดสอบ ใส่ตัวกระตุ้น (Stimulant) 25 ไมโครลิตรในหลุม "ที่ถูกกระตุ้น (stimulated)" จำนวน 4 หลุมของสตริปควบคุมและในหลุม "ที่ถูกกระตุ้น (stimulated)" แต่ละหลุมจำนวน 4 หลุมของสตริปทดสอบ

นอกจากจะใส่สารสำหรับเจือจางตัวอย่าง และตัวกระตุ้นแล้ว ยังได้ใส่เซลล์ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกได้จากตัวอย่างที่ 1 จำนวน 25 ไมโครลิตรลงในหลุมแต่ละหลุมของสตริปทดสอบ โดยเฉพาะเจาะจงยิ่งขึ้นเซลล์ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างที่ 1 นั้นถูกนำมาและกระจายในสารสำหรับเจือจางตัวอย่างและทำให้เจือจางด้วยปริมาตรของสารสำหรับเจือจางตัวอย่างเพื่อเป็นการ

เตรียมความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้นในที่สุด จากการเติมตัวอย่าง 25 ไมโครลิตรลงในหลุม โดยมีผลเหลืองที่เติมลงในหลุมปริมาณ 10 ไมโครกรัม, 100 ไมโครกรัม และ 1,000 ไมโครกรัม ตามลำดับ

การทำให้ตัวอย่างเลือดเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ (ส่วน 1:3 แล้วแต่ "การสำหรับเจือจางตัวอย่าง") ซึ่งทำให้มีการเกิดเม็ดไมโครอย่างหมุนวนเพื่อเป็นการเตรียมให้ส่วนประกอบที่รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดขาวนั้นกระจายตัวอย่างเท่าเสมอ จากนั้นจึงเติมเลือดที่เจือจางแล้ว จำนวน 75 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของแต่ละสตริป แล้วจึงผสมสิ่งที่อยู่ในหลุมให้เข้ากัน (เช่นโดยการวางเพลต (plate) ลงบนเครื่องเขย่าเพลตเป็นระยะเวลาประมาณ 30 วินาที) จากนั้นจึงบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มอัตโนมัติที่มีการควบคุมไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง

เมื่อการบ่มเสร็จสิ้น จึงผสมสิ่งที่อยู่ในหลุม (well) ให้เข้ากันอีกครั้ง (เช่นโดยการวางเพลต (plate) ลงบนเครื่องเขย่าเพลตเป็นระยะเวลาประมาณ 3 นาที) หลังจากนั้นการละลายที่รวมถึงเม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไดนาบีดส์ (Dynabeads® sample purification beads) ถูกผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันเพื่อให้เม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไดนาบีดส์แขวนลอยภายในของเหลวที่เม็ดหิ้งกล่าวอยู่ (เช่น ด้วยเครื่องวอร์เทกซ์ (vortex)) ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น เม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไดนาบีดส์ในตัวอย่างนี้รวมถึงเม็ดแม่เหล็กที่คลุมด้วยแอนติบอดีโมโนโคลนอลต่อแอนติเจนเซลล์ CD4 แอนติบอดี (mouse monoclonal anti-human CD4 antibodies) แล้วจึงใส่สารละลายสำหรับการบรรจุเม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไดนาบีดส์ 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของแต่ละสตริป

จากนั้นจึงผสมสิ่งที่อยู่ในหลุมของแต่ละสตริปให้เข้ากันอีกครั้ง (เช่น ไว้บนเครื่องเขย่าเพลตเป็นระยะเวลาประมาณ 15 วินาที) จากนั้นจึงปล่อยให้อยู่ตัว (set) หรือบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาประมาณ 15 นาที และกระทำกระบวนการของการผสมให้เข้ากันและการบ่มซ้ำ เมื่อโมโนโคลนอลแอนติเจนแบบ CD4 แอนติบอดีที่อยู่บนเม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไดนาบีดส์จะยึดเกาะ (bind) เฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แสดง CD4 ไกลโคโปรตีน ในระหว่างการบ่มนี้ เซลล์เม็ดเลือดขาว CD4+ ซึ่งรวมถึงเซลล์ที่ช่วย (T helper cell) จะถูกทำให้เคลื่อนที่ไม่ได้โดยหรือยึดเกาะกับเม็ดโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน CD4 แอนติบอดีที่อยู่บนเม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไดนาบีดส์

ภายหลังจากการบ่ม สิ่งที่อยู่ในแต่ละหลุมจะถูกผสมให้เข้ากันอีกครั้ง (เช่น เป็นระยะเวลาประมาณ 15 วินาที ถึงประมาณ 30 วินาทีบนเครื่องเขย่าเพลต) เพื่อให้เม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไดนาบีดส์แขวนลอยอีกครั้ง (resuspend) จากนั้นจึงนำสิ่งที่อยู่ในหลุมไปยังสนามแม่เหล็ก

(เช่น โดยการวางสเตริปชนิด 8 หลุมแต่ละเส้นลงในแม่พิมพ์จาก Cytex) ตามวิธีการซึ่งชี้แจงไว้ในคู่มือแนะนำในการใช้อิมมูโนรีแคลเซ็นต์ (ImmuKnow™ assay) เมื่ออยู่ภายใต้สนามแม่เหล็ก เม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไลนาไซต์จะถูกดึงไปที่ด้านหนึ่งของแต่ละหลุมที่ปรากฏเม็ดดังกล่าว ดังนั้นจึงสามารถเทสิ่งที่อยู่ในหลุมที่เหลือออกได้ (เช่น โดยการดูดด้วยปิปเปต์ และอื่นๆ) และเม็ดต่างๆ และเซลล์ที่ช่วย (T-helper cells) ถูกล้าง 1 ครั้งหรือมากกว่า (เช่น ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (Wash Buffer) 200 ไมโครลิตรในการล้างแต่ละครั้ง และการล้าง 3 ครั้ง) เพื่อเป็นการทำให้มีบริสุทธิ์อย่างมีนัยสำคัญที่มีขั้นตอนเดียวกัน

ต่อมาจึงเติมรีเอเจนต์ในการสลาย (Lysis reagent) 200 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม ภายหลังจากการนำสิ่งที่อยู่ในแต่ละหลุมออกจากสนามแม่เหล็ก สิ่งที่อยู่ในแต่ละหลุม (เช่น เม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไลนาไซต์ เซลล์ที่ยึดติดไปยังสิ่งนั้น และรีเอเจนต์ในการสลาย) ถูกผสมให้เข้ากัน (เช่น เป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาทีบนเครื่องเขย่าแผ่นเล็ก) รีเอเจนต์ในการสลายจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ CD4+ ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ลับแล้งมาจากเม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไลนาไซต์แตกออก ท่ามกลางสิ่งอื่นๆ ATP จะถูกปล่อยออกจากเซลล์ที่ถูกสลาย

เมื่อการสลายนั้นเสร็จสมบูรณ์ จึงนำสิ่งที่อยู่ในหลุมแต่ละหลุมไปไว้ในสนามแม่เหล็กอีกครั้ง ซึ่งจะเป็นการดึงเม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ไลนาไซต์ไปที่ด้านหนึ่งของหลุม จากนั้นจึงย้ายตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรในแต่ละหลุมไปยังหลุมที่สอดคล้องกันของเพลตสำหรับการวัด (Measurement Plate) นอกจากการย้ายตัวอย่างแล้ว จะมีการสำรองหลุมหลายๆ หลุมในเพลตสำหรับการวัดชนิด 96-หลุมสำหรับตัวอย่างของ ATP ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตรของสารละลายสำหรับแผงสำหรับการเทียบมาตรฐาน (Calibrator Panel solution)

จากนั้นจึงเติมลูมิเนสเซนต์รีเอเจนต์ (Luminescence Reagent) 150 ไมโครลิตรลงในหลุมแต่ละหลุมของเพลตสำหรับการวัดที่รวมถึงตัวอย่างสำหรับการทดสอบหรือตัวอย่างของสารละลายสำหรับแผงสำหรับการเทียบมาตรฐาน แล้วจึงวัดการเรืองแสงของแต่ละหลุม การเรืองแสงที่วัดได้ในแต่ละหลุมจะเป็นสิ่งบ่งชี้ถึงปริมาณของ ATP ที่ปรากฏในหลุมดังกล่าว โดยทางกลับกันปริมาณ ATP ที่ปรากฏในแต่ละหลุมจะบ่งชี้ปริมาณของเมตาโบลิซึมเมตาบอลิกแอคติวิตี้ (metabolic activity) ภายในเซลล์ดังกล่าว (เช่น เซลล์ CD4+) จากสิ่งที่อยู่ในหลุมแต่ละหลุมของเพลตสำหรับการวัด โดยคำนวณปริมาณ ATP ในระดับสูงในตัวอย่างที่ได้มาจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นอย่างไม่เจาะจงด้วย PHA การเติมสารปรับระดับภูมิคุ้มกัน (เช่น จากแต่ละชั้นหนึ่งที่ระบุในตัวอย่างที่ 1) จะเพิ่มหรือลด หรือปรับเมตาโบลิซึมเมตาบอลิกแอคติวิตี้ในเซลล์ CD4+ ที่ถูกกระตุ้นอย่างไม่เจาะจงด้วย PHA

ผลของการทดสอบดังกล่าวนั้นได้บันทึกไว้โดยละเอียดในตารางต่อไปนี้ โดยมีตัวอย่างประกอบอธิบายที่แสดงถึงแต่ละเปอร์เซ็นปริมาณ ATP ที่สร้างโดยเซลล์มีชีวิตยาวของเซลล์ก่อนแต่ละเซล

ตารางที่ 1

ตัวอย่าง		ควบคุม	10 ไมโครกิลรัมต่อหลุม	100 ไมโครกิลรัมต่อหลุม	1000 ไมโครกิลรัมต่อหลุม
แฟรกชั่นน้ำนมน้ำหนัก : 250 Da ถึง 2,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	14	52	52	37
	ถูกกระตุ้นด้วย PHA	388	336	253	127
	%การลดลงในการกระตุ้นด้วย PHA		13.4	34.8	67.3
แฟรกชั่นน้ำนมน้ำหนักถึง 2,000 Da ถึง 4,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	14	52	62	42
	ถูกกระตุ้นด้วย PHA	388	388	377	339
	%การลดลงในการกระตุ้นด้วย PHA		0	2.8	12.6
แฟรกชั่นน้ำนมน้ำหนักถึง เรวมถึง 4,000 Da ถึง 8,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	14	69	50	46
	ถูกกระตุ้นด้วย PHA	388	378	250	207
	%การลดลงในการกระตุ้นด้วย PHA		2.6	35.6	46.6
แฟรกชั่นน้ำนมน้ำหนักถึง 8,000 Da ถึง 12,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	14	49	45	39

	ถูกกระตุ้นด้วย PHA	388	337	237	181
	%การลดลงในการกระตุ้นด้วย PHA		13.1	38.9	53.4
แฟรกชั่นไซ่ 2,000 Da ถึง 4,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	14	49	33	44
	ถูกกระตุ้นด้วย PHA	388	228	161	148
	%การลดลงในการกระตุ้นด้วย PHA		41.2	58.5	61.9
แฟรกชั่นไซ่ (รวมถึง TFF 4,000 Da ถึง 8,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	14	54	47	44
	ถูกกระตุ้นด้วย PHA	388	354	230	158
	%การลดลงในการกระตุ้นด้วย PHA		8.8	40.7	59.3

ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าในการทดสอบที่กระตุ้นแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งเซลล์ไม่ได้สัมผัสกับ PHA แฟรกชั่นที่มีน้ำหนักโมเลกุล 4,000 Da ถึง 8,000 Da (ซึ่งเป็นน้ำหนักน้ำเลี้ยงและไซ่) ทั้งสองแฟรกชั่นนี้เป็นที่ทราบดีว่าเป็นทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ที่กระตุ้นและการในสิ่งแวดล้อมวิวัฒนาการเพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาว CD4 - ข้อมูลนี้เป็นการยืนยันความสามารถของทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ที่เพิ่ม (up-regulate) ภูมิคุ้มกันด้านเซลล์

ในทางตรงกันข้าม แฟรกชั่นที่มีน้ำหนักโมเลกุล 4,000 Da ถึง 8,000 Da ของน้ำนมน้ำเลี้ยงและไซ่ลด (down-regulate) ความสามารถในการกระตุ้นที่ไม่จำเพาะเจาะจงของ PHA ในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดวิวัฒนาการ CD4 - เนื่องจาก PHA เป็นตัวกระตุ้นที่ทำขึ้น (artificial) และไม่มีการกระตุ้นเฉพาะเจาะจง จึงไม่น่าแปลกใจที่ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ ซึ่งมีส่วนในภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ ทำให้แสดงฤทธิ์ของ PHA ลดลง เท่าที่เชื่อถือได้และงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงว่าทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ช่วยสนับสนุนและเพิ่มความสามารถในการตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยที่เซลล์ (T-cells) (เช่น โดยการช่วยเซลล์ "ช่วย" วัตถุประสงค์ปฐมภูมิของตน โดยการลดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง

(autoimmunity) และการผิดปกติที่เกี่ยวข้อง ในขณะที่ทำให้เซลล์วิวัฒนาการขึ้นเพื่อต้านต่อสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ เช่น การติดเชื้อของร่างกายของตัวอย่างที่ก่อโรคจุลชีพ (แบคทีเรีย, ไวรัส และอื่นๆ) ซึ่งคาดหมายว่าการลดเซลล์วิวัฒนาการกระตุ้นของ PHA ด้วยทีเซลล์ (T-cell) จะเป็นการยืนยันการบาดของทรานสฟอร์แฟลเลอร์นี้ในภูมิคุ้มกันต้านเซลล์

ได้ทำผลการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับในแฟรกชั่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลอื่นๆ ที่ไม่รวมถึงทรานสฟอร์แฟลเลอร์ ที่รวมถึงแฟรกชั่นจากน้ำนมน้ำเหลือง 250 Da ถึง 2,000 Da (การเพิ่มขึ้นและการลดลง), แฟรกชั่นน้ำนมน้ำเหลือง 2,000 Da ถึง 4,000 Da (การเพิ่มขึ้น) และแฟรกชั่นจากไข่ 2,000 Da ถึง 4,000 Da (การเพิ่มขึ้นและการลดลง) นอกจากนี้แฟรกชั่นจากน้ำนมน้ำเหลือง 8,000 Da ถึง 10,000 Da ยังทำให้เซลล์วิวัฒนาเซลล์เม็ดเลือดขาว CD4+ เพิ่มขึ้นซึ่งไม่ได้กระตุ้นด้วย PHA และทำให้การกระตุ้นของ PHA ต่อเซลล์ทีเซลล์เม็ดเลือดขาว CD4+ นั้นลดลง

ข้อมูลผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารปรับระบบภูมิคุ้มกันยกเว้นทรานสฟอร์แฟลเลอร์นั้นปรากฏต่างกันคือแฟรกชั่นน้ำนมน้ำเหลือง 250 Da ถึง 2,000 Da, แฟรกชั่นน้ำนมน้ำเหลือง 2,000 Da ถึง 4,000 Da และแฟรกชั่นไข่ 2,000 Da ถึง 4,000 Da ความสามารถของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันของ "ทรานสโลเคชั่นในเซลล์" ที่ปรากฏในแต่ละแฟรกชั่นเหล่านี้ได้วัดการยืนยันในทางส่วนโดยการทดลองที่ได้อธิบายต่างกระเอียดไว้ในตัวอย่างที่ 3

ตัวอย่างที่ 3

การทดสอบปริมาณ (assay) ชุดที่สมบูรณ์ของเซลล์วิวัฒนาที่กระตุ้นในเม็ดเลือดขาวของบุคคลที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงที่แสดง CD3 โคแอโกโปรตีน เช่น CD3+ เซลล์ ซึ่งมีในที่ทราบกันดีว่ารวมถึงทีเซลล์ทั้งหมด ซึ่งรวมถึง "เซลล์ความจำที่ (T memory cell)" โดยเฉพาะเจาะจงได้ใช้ทีเซลล์เมโมรี่แอสเซ็ของโคเดกซ์ (Cedex's T-Cell Memory™ assay) วิธีการของทีเซลล์เมโมรี่แอสเซ็ของโคเดกซ์ นั้นคล้ายกับที่อธิบายไว้ในตัวอย่างที่ 2 มากแต่มีข้อยกเว้นดังนี้คือ ใช้ตัวกระตุ้นปริมาณ 25 ไมโครลิตร ซึ่งรวมถึงคอนคานาวาลินเอ (Concanavalin A; Con A) แทน PHA ใช้ในหลุมที่ "ถูกกระตุ้น" ของสเตริปสำหรับควบคุม ในขณะที่ไม่มีการใช้ไซโตเมกะโลไวรัส (cytomegalovirus; CMV) ที่เจือจาง 25 ไมโครลิตรลงไปในหลุมที่ "ถูกกระตุ้น" ในแต่ละสตริปที่ทดสอบ (สำหรับขั้นสุดท้าย การทำให้เจือจางต่อหลุมมีอัตราส่วน 1:500) แอนติบอดีต่อเซลล์ CD3 แอนติบอดีนี้ถูกทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ที่ผิวของเม็ดเลือดแดง (ดูข้อแนะนำวิธีการใช้สารชุดทดสอบทีเซลล์เมโมรี่ (T-Cell Memory™)) เพื่อเตรียมเม็ดสำหรับการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์โดยเซ็ปเตส; และเติมเม็ดสำหรับการทำให้

ตัวอย่างบริสุทธิ์โดยการเติมลงไปในตัวอย่างเลือด. ตัวเลือกของตัวอย่าง,ตัวกระตุ้น (ถ้ามี) และแอนติบอดีตัวอย่าง (ถ้ามี) ก่อนที่จะผสมในขั้นต้น

ในเซลล์เมมโมรีแอสเซย์ (T-Cell Memory™ assay) ได้ใช้แอนติบอดีแทนในโปรตีน เช่น PHA) ดังนั้นจึงอาจประเมินผลของความสามารถของเซลล์ความจำที่ (memory cells) ในการรู้จักแอนติเจนที่เจาะจง และนี่น่าจะนำไปสู่ความเข้มข้นของเซลล์ที่ปล่อยออกต่อระยะเวลาผลลัพธ์สำหรับการวัดพื้นที่ผิวต่อ ดังนี้เซลล์ความจำที่จะสร้างขึ้นเฉพาะส่วนของเซลล์ที่ยึดเกาะกับโมเลกุลของแอนติบอดีของไดนาบีดส์ (Dynabeads®)

ผลของการตรวจหาปริมาณด้วยวิธีการทดลองที่นั้นได้สรุปไว้อย่างละเอียดในตารางดังต่อไปนี้ โดยมีตัวเลขประกอบกับการทดลองต่างๆ ของปริมาณ ATP ที่สร้างโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวของตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง (และปริมาณ) ที่ทดสอบ:

ตารางที่ 2

ตัวอย่าง		ควบคุม	10 ไมโครลิตร ต่อหลุม	200 ไมโครลิตร ต่อหลุม	1000 ไมโครลิตร ต่อหลุม
แฟรกชั่นที่มีน้ำหนักน้ำหนักเกือบ 250 Da ถึง 2,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	12	14	12	17
	ถูกกระตุ้นด้วย CMV	316	468	338	345
	%การเพิ่มขึ้นในการกระตุ้นด้วย CMV		45.1	7.0	9.2
แฟรกชั่นน้ำหนักน้ำหนักเกือบ 2,000 Da ถึง 4,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	12	15	12	15
	ถูกกระตุ้นด้วย CMV	316	501	503	440
	%การเพิ่มขึ้นในการกระตุ้นด้วย CMV		58.5	59.1	39.2

	แท่งกลมน้ำนม น้ำตาลช่วงตั้งแต่ 4,000 Da ถึง 8,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	12	22	16	19
		ถูกกระตุ้นด้วย CMV	316	473	476	475
		%การเพิ่มขึ้นในการกระตุ้นด้วย CMV		49.7	50.6	50.3
	แท่งกลมน้ำนม น้ำตาลช่วง 8,000 Da ถึง 12,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	12	14	18	26
		ถูกกระตุ้นด้วย CMV	316	453	404	370
		%การเพิ่มขึ้นในการกระตุ้นด้วย CMV		43.4	27.8	17.1
	แท่งกลมไข่ 2,000 Da ถึง 4,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	12	26	61	108
		ถูกกระตุ้นด้วย CMV	316	305	349	350
		%การเพิ่มขึ้นในการกระตุ้นด้วย CMV		-3.5	3.4	10.8
	แท่งกลมไข่ ตั้งแต่ 4,000 Da ถึง 8,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	12	34	39	108
		ถูกกระตุ้นด้วย CMV	316	310	280	381
		%การเพิ่มขึ้นในการกระตุ้นด้วย CMV		-1.9	-11.4	20.6

ข้อมูลที่ได้จากการทำเสมือนในตัวอย่างที่ 3 ที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีแอนติเจน (เช่น ตัวกระตุ้นที่เฉพาะเจาะจง, สิ่งที่ต่อต้านกับความไม่เฉพาะเจาะจงของไมโลเจน เช่น ConA หรือ PHA) แฟรกชั่นจากน้ำนมน้ำเหลืองทั้งสาม ที่ไม่มีทรานสเฟอร์แฟกเตอร์ทั้งเพิ่มแอคติวิตีของเซลล์ความจำที่ทดสอบต่อ CMV ซึ่งคือวิธีที่สามารถเปรียบเทียบได้ (10 ไมโครกรัมของตัวอย่างของแฟรกชั่นน้ำนมน้ำเหลือง 250 Da ถึง 2,000 Da และ 8,000 Da ถึง 12,000 Da) หรือมากกว่า (ตัวอย่าง 10 ไมโครกรัมและ 100 ไมโครกรัมของแฟรกชั่นน้ำนมน้ำเหลือง 2,000 Da ถึง 4,000 Da) ความสามารถของตัวอย่างที่มีขนาดสามารถเปรียบเทียบได้ของแฟรกชั่นน้ำนมน้ำเหลือง 4,000 Da ถึง 8,000 Da ที่มีทรานสเฟอร์แฟกเตอร์ในการเพิ่มแอคติวิตีของเซลล์ที่ทดสอบเมื่อสัมผัสกับ CMV

ตัวอย่างที่ 4

เซลล์ของการหาปริมาณอื่นๆ ได้ถูกทำเพื่อหาว่าโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันในแฟรกชั่น (เช่น สารปรับระบบภูมิคุ้มกันของแฟรกชั่นน้ำนมน้ำเหลือง 2,000 Da ถึง 4,000 Da) หรือทรานสเฟอร์แฟกเตอร์ที่มีแฟรกชั่น (เช่น แฟรกชั่นน้ำนมน้ำเหลือง 4,000 Da ถึง 8,000 Da) สามารถปรับ (เช่น นำให้ดียิ่งขึ้น) ความจำเพาะของระบบภูมิคุ้มกันของตัวอย่างที่ทดสอบผู้ซึ่งสัมผัสกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงในขนาด (dose) ต่ำ โดยเฉพาะเจาะจง คือ ตัวอย่างเลือดที่ได้มาจากบุคคลที่คลุกคลีสัมผัสกับไวรัสอินฟลูเอนซา (influenza virus) ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อแบบทั่วไป (systemic infection) และการอุบัติขึ้นของการติดเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การวิเคราะห์ปริมาณต่างๆ นั้นกระทำด้วยวิธีการที่อธิบายไว้ในตัวอย่างที่ 3 โดยการใช้ไวแอกซ์ที่เซลล์เมมโมรี่ (Cylex T-Cell Memory™) ตามข้อแนะนำในการใช้และอธิบายอย่างละเอียดในตัวอย่างที่ 3 ยกเว้นแอนติเจนอินฟลูเอนซา (influenza antigen) ในรูปแบบของการทำให้เชื้อจางด้วยอัตราส่วน 1:25 ของวัคซีนอินฟลูเอนซาที่ผลิตโดยอะวองติส พาสเจอร์ คอร์ปอเรชั่น (Aventis Pasteur or Paris) ประเทศฝรั่งเศส สำหรับช่วงให้หวัดใหญ่ปี 2006-2007 (สำหรับขั้นสุดท้าย การเจือจางด้วยสุมมีอัตราส่วน 1:125) นั้นใช้ในแทนวัคซีน CMV ของตัวอย่างที่ 3

ผลจากการหาปริมาณดังกล่าวได้อธิบายไว้อย่างละเอียดในตารางต่อไปนี้:

ตารางที่ 3

ตัวอย่าง		ควบคุม	10 ไมโครลิตร ต่อหลุม	100 ไมโครลิตร ต่อหลุม	1000 ไมโครลิตร ต่อหลุม
แฟรคชันน้ำหนักโมเลกุลสูง 2,000 Da ถึง 4,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	4	10	3	4
	ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนอินฟลูเอนซา	827	2003	906	936
	ConA	694			
	%การเพิ่มขึ้นในการกระตุ้นด้วยแอนติเจนอินฟลูเอนซา		21.3	9.6	13.2
แฟรคชันน้ำหนักโมเลกุลรวมถึง TF1 4,000 Da ถึง 8,000 Da	ไม่ถูกกระตุ้น	4	36	24	11
	ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนอินฟลูเอนซา	827	989	997	830
	ConA	694			
	%การเพิ่มขึ้นในการกระตุ้นด้วยแอนติเจนอินฟลูเอนซา		19.6	20.6	0.4

ผลการศึกษาที่แสดงในตารางที่ 3 (ซึ่งยังแสดงเป็นรูปกราฟิคในรูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่า เมื่อเซลล์ความจำที่ (T memory cell) ของตัวอย่างที่ศึกษาที่สัมผัสแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงเมื่อไม่นานมานี้ ได้สัมผัสกับแอนติเจนดังกล่าว โดยเฉพาะเมื่อนำไปแฟรคชันโมเลกุลหรือทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ ทำให้เอฟเฟคติวิตี้ของ CD3+ เมมโมรีทีเซลล์ (CD3+ memory T cell) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยแท้จริง

แม้ว่าโมเลกุลที่มีจำนวนอะตอมและทรานสฟอร์แพลเตอร์ที่มีจำนวนน้อยกว่าให้ผลดีกว่า ขณะที่ค่าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นประมาณ 20% โดยแต่ละรูปแสดงว่าสารปรับระบายภูมิคุ้มกันของแฟรกชั่น 2,000 Da ถึง 4,000 Da นั้นมีประสิทธิภาพเท่ากับทรานสฟอร์แพลเตอร์และโมเลกุลโดยที่ประกฏในแฟรกชั่น 4,000 Da ถึง 8,000 Da ในการปรับแอกติวิตี้ของเซลล์ที่ทดสอบ

ผลการศึกษาจากตัวอย่างที่ 1-4 แสดงให้เห็นว่าสารปรับระบายภูมิคุ้มกันที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 250 Da ถึง 2,000 Da, 2,000 Da ถึง 4,000 Da และ 8,000 Da ถึง 12,000 Da นั้นมีประสิทธิภาพในการปรับแอกติวิตี้ของระบายภูมิคุ้มกัน (immune activity) ของเซลล์ทดสอบ ซึ่งนำโดยการให้สารปรับระบายภูมิคุ้มกันด้วยน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ประกอบที่ระดับที่สารปรับระบายภูมิคุ้มกันแต่ตัวอย่างที่ศึกษา ล้วนทำให้มีการปรับภูมิคุ้มกันด้วยเซลล์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ดีกว่า

จากผลการศึกษาเหล่านี้ได้มีการพัฒนากระบวนการในการผลิตอาหารเสริมทางการแพทย์ (เช่น อาหารเสริมทางเลือก (ตัวอย่างเช่น ไข่ (ไข่ขาวและไข่แดง)) ที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลของ MWCO ที่กำหนดไว้ข้างต้น ตัวอย่างเช่น และไม่ใช้วิธีการเพื่อการจำกัด การสกัดที่เป็นของเหลวของการปรับระบายภูมิคุ้มกันมาโมเลกุลขนาดใหญ่ (macroscopic particles) (เช่น น้ำนมน้ำเหลืองนมโซลิด (colostrum/milk solids) เปลือกไข่และเยื่อ และอื่นๆ) (เช่น โดยการแยกเฟส, กระบวนการกรอง และอื่นๆ) อันซึ่งการเป็นการกรองผ่านที่กรองที่มีรูที่ถูกวัดขนาดในการสกัดด้วย MWCO ขีดจำกัดบนที่กำหนดไว้แล้ว ดังที่เป็นตัวอย่างที่ไม่มีการจำกัด การกรองที่ใช้เครื่องมือสำหรับแยกน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000 Da ถึงการกรองนี้อาจใช้กระบวนการไดแอลิซิสซึ่งรวมถึงการใช้เยื่อไดแอลิซิส (Dialysis Membranes) ที่มีรูซึ่งเป็นให้ได้ MWCO ที่ต้องการ การใช้กระบวนการดังกล่าวเป็นการจัดเตรียม "น้ำไดแฟรกชั่น" จากโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ซึ่งรวมถึงทรานสฟอร์แพลเตอร์, เอนดิโทลิน และโมเลกุลอื่นๆ ที่มีขนาดเล็ก ซึ่งไม่รวมโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าประมาณ 3,000 Da (เช่น น้ำนม น้ำเหลือง, ไข่ และผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวที่ผลิตขึ้น) จากนั้นของเหลวผลการกรอง (เช่น ส่วนของของเหลวที่ผ่านเยื่อกรอง) อาจผ่านกระบวนเพิ่มเติมที่เป็นการกำจัดซึ่งการกรองกับดัก (เช่น การทำแห้งเยือกแข็ง, การทำแห้ง, การระเหยเพื่อประกอบเป็นของเหลวที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งเป็นหรือควรรวมเป็นเจล และอื่นๆ) จากนั้นอาจใช้ "ผลิตภัณฑ์น้ำไดแฟรกชั่น" เพื่อการบริโภคหรือใช้ร่วมกับอาหารประเภทอื่นๆ

เป็นที่เชื่อกันว่าการรวมเข้ากับไดแฟรกชั่นโมเลกุลขนาดใหญ่ในปริมาณที่น้อยมากๆ ซึ่งอยู่ในสารเตรียมที่รวมถึงทรานสฟอร์แพลเตอร์ และการรวมถึงระดับพื้นฐาน (Baseline) (เช่น ระดับที่ประกฏในแหล่ง (เช่น น้ำนมน้ำเหลือง, ไข่ และอื่นๆ) ที่ได้จากทรานสฟอร์แพลเตอร์ของที่ประกอบด้วยได้ระ

ลดเซลล์ที่ไม่พึงประสงค์โดยเฉพาะ (T-cells) (เช่น ภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง (autoimmunity) และความผิดปกติที่เกี่ยวข้อง และอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง) ในขณะที่ทำให้เซลล์ที่ทรงประสงค์มีชีวิตหรือเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงได้พัฒนาองค์ประกอบของนาโนแฟรกชั่นและน้ำยาทรานสเฟคชั่นแฟกเตอร์ ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4

องค์ประกอบ A

ส่วนผสม (Ingredient)	ปริมาณสัมพัทธ์ (Relative Amount) (โดยน้ำหนัก)
แฟรกชั่นน้ำมันน้ำหนักของเซลล์จำพวกวัว, MWCO ขีดจำกัดบน 10,000 Da (เพ่นเทอ)	68%
แฟรกชั่นน้ำมันน้ำหนักของเซลล์จำพวกวัว, MWCO ขีดจำกัดบน 3,000 Da	2%
นาโนแฟรกชั่นทูทันเทอ	
ไม่ต้องใช้ได้	30%

องค์ประกอบของตารางที่ 4 จะเรียกว่าเป็น "ส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน (Immune Modulating Component)" "ส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน" ดังกล่าวอาจประกอบด้วยนัยสำคัญด้วยแต่ส่วนต่างๆ ของการปรับระบบภูมิคุ้มกัน (ซึ่งอาจเป็นผลต่างของการปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแฟรกชั่นหรือการเสริมของการปรับระบบภูมิคุ้มกันเช่นดังที่แสดงในรายการของตารางที่ 4 หรือตารางที่ 5 ส่วนผสมอื่นๆ

ในทำนองเดียวกัน องค์ประกอบที่แสดงรวมในการประดิษฐ์นี้ อาจประกอบด้วยนัยสำคัญด้วย "ส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน" เช่นที่เปิดเผยในตารางที่ 4 หรือตารางที่ 5 ส่วนผสมอื่นๆ ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5

องค์ประกอบ B

ส่วนผสม (Ingredient)	ปริมาณ (ต่อการใช้,ขนาดการใช้ หนึ่งแคปซูล)
องค์ประกอบ A	150 มิลลิกรัม
สังกะสี (ในรูปโมโนเมตไทโอนีน (monomethionine)	5 มิลลิกรัม
สารประกอบเชิงซ้อนของโพลีซัคคาไรด์ คอร์ไดเซพ คอมพ์เพ็กซ์ (Cordyceps™ Proprietary Polysaccharide complex)	450 มิลลิกรัม
ไอพี-6 (IP 6 ; กรดไมโอ-อิโนซิทอล เฮกซะฟอสเฟต)	
สารสกัดจากเห็ดหลินจือ (ไซโคลเคลอรอล)	
ถั่วเช่า (Cordyceps sinensis) (กรดคอร์ไดซาไซ (cordyceptic acids) 7%)	
บีตาซีโนแกน (Beta-glucan) (จากยีสต์ขนมปัง (*Saccharomyces cerevisiae*)	
บีตาซีโนแกน (Beta-glucan) (จากข้าวโอ๊ต (*Avena sativa*)	
สารสกัดจาก *Agaricus blazei*	
แมนแนน (Mannans) (จากว่านหางจระเข้)(ใบ)	
สารสกัดจากใบมะกอก(Olive Leaf) (*Olea europaea*)	
เห็ดไมทาเกะ (Maitake Mushroom) (*Grifola frondosa*) (ทั้งต้น)	
เห็ดหอม (*Lentinus edodes*)(ทั้งต้น) (สารสกัด 5:1)	

องค์ประกอบของการประดิษฐ์นี้อาจมีรูปลักษณ์เป็นของเหลว (ที่อยู่ในรูปเครื่องดื่มวิโกวิต้า (Rio Vida™) จาก 4 ไลฟ์ รีเสิร์ช (4Life Research) LC เมืองแซนดี้ ยูทาห์ รัฐยูทาห์) , ผง (ซึ่งอาจรวมถึงส่วนผสมเพิ่มเติมเพื่อให้ได้รสชาติ, คุณสมบัติการละลาย และสิ่งที่คล้ายคลึงที่พึงประสงค์), ยาเม็ด (ซึ่งรวมถึงส่วนผสมอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ตัวยึด เช่น แป้ง (starch) และสิ่งที่คล้ายกัน), เจล (ซึ่งอาจเติมของเหลวหรือส่วนผสมอื่นๆ) หรือในรูปแบบที่เหมาะสมอื่นๆ เป็นสิ่งที่ควรเข้าใจว่าสำหรับวัตถุประสงค์ในการเปิดเผยครั้งนี้ส่วนผสมเพิ่มเติมที่ใช้ในการผลิตรูปลักษณ์ดังกล่าวขององค์ประกอบของการประดิษฐ์นี้ อาจสำหรับวัตถุประสงค์ต่างๆ ของการเปิดเผยครั้งนี้ ซึ่งเพียงนำมาพิจารณาให้เป็นตัวเลือก และเป็นสิ่งที่ไม่จำเป็นสำหรับองค์ประกอบบางส่วนมีความต้องการโดยการดึงสำหรับเพิ่มเติม

ตัวอย่างที่ 5

เลือดนั้นรวบรวมจากบุคคลซึ่งได้รับความเสียหายจากการโรคงูสวัด (การติดเชื้อจากเชื้อไวรัสวาริเซลล่า ซอสเตอร์(VZV)) เป็นระยะเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ ขั้นตอนนี้จึงนำเสนอการตรวจวัดปริมาณ(assay) โดยใช้อิมมูโนเอสเซย์ (ImmuKnow™ assay) ในวิธีการดังที่กล่าวไว้ในตัวอย่างที่ 2 โดยมีการแทนที่แฟรคชั่นตัวอย่างของตัวอย่างที่ 2 ด้วยสิ่งต่อไปนี้ : (a) กลุ่มองค์ประกอบที่ไม่รวมถึงการปรับระดับภูมิคุ้มกัน ; (b) แฟรคชั่นจากน้ำนมน้ำเหลืองที่มี MWCO ประมาณ 3,000 Da ที่ผ่านการพิสูจน์แล้ว ; (c) ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ เอ็กซ์เอฟ (Transfer Factor XF™) ซึ่งมาจาก 4 ไลฟ์ รีเสิร์ช (4Life Research) และรวมถึงสารสกัดจากน้ำนมน้ำเหลืองจากสัตว์จำพวกวัว (bovine colostrum extract) ที่เติมด้วย MWCO ขีดจำกัดประมาณ 10,000Da ; (d) องค์ประกอบในตารางที่ 4 ซึ่งทำเครื่องหมายว่าเป็น "องค์ประกอบ A" ; และ (e) องค์ประกอบในตารางที่ 5 ซึ่งทำเครื่องหมายว่าเป็น "องค์ประกอบ B" สารแต่ละสารดังแต่ (b) - (e) นั้นถูกนำมาละลายในสารสำหรับเจือจางตัวอย่างที่ประกอบกับอิมมูโนเอสเซย์และถูกทำให้เจือจางเพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายต่อหลุมเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเติมตัวอย่างเลือดและของเหลวอื่นๆ ทั้งหมดลงในหลุมแต่ละหลุมแล้ว

ผลการศึกษาจากการหาปริมาณ (assay) ดังกล่าวได้นำมาอธิบายไว้อย่างละเอียดในตารางต่อไปนี้

ตารางที่6

	กลุ่มควบคุม	มาโทแฟรกชัน	TFXF	องค์ประกอบ A	องค์ประกอบ B
ไม่ถูกกระตุ้น (NS)	26	35	77	47	19
ถูกกระตุ้นด้วย PHA	220	234	150	140	27

นอกจากนี้ผลการศึกษาเหล่านี้ยังแสดงไว้ในรูปกราฟของรูปที่ 2

กล่าวสรุปครั้งว่าผลการศึกษาเหล่านี้ได้มาเมื่อเวลา (ประมาณ 4 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อเริ่มแรก ; เช่นในระหว่างระยะเวลาฟักฟื้น) ซึ่งเมื่อไม่มีการกระตุ้นจึงคาดหวังว่าแคลดิวิดีเซลล์ผู้ช่วย (CD4+)(T-helper cell) แม้ว่าจะมีเซลล์ผู้ช่วยจำนวนมากยังคงอยู่ในเลือดของตัวอย่างที่ศึกษา แคลดิวิดีเซลล์ผู้ช่วยถูกกระตุ้นเพียงเล็กน้อยโดยปราศจากตัวกระตุ้นที่ไม่เฉพาะเจาะจง PHA , โดยมาโทแฟรกชัน, TFXF และองค์ประกอบ A และดูเหมือนว่าจะไม่ถูกกระตุ้นด้วยองค์ประกอบ B อย่างไรก็ตามถ้ากระตุ้นที่ไม่เฉพาะเจาะจงโดย PHA ต่อเซลล์ผู้ช่วยนั้นตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญโดย TX XF และองค์ประกอบ A และน้อยแต่องค์ประกอบ B จำนวนมากกว่าดังที่อาจคาดหวังได้จากผลการศึกษาของตัวอย่างที่ 2 ที่แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 1

ตัวอย่างที่ 6

ณ เวลาก่อนหน้านี้ (ประมาณ 1 สัปดาห์ภายหลังเกิดงูสวัด) คาดหวังได้ว่าเซลล์ความจำที่ซึ่งแม้ว่าจะไม่ปรากฏในเลือดของตัวอย่างที่ศึกษาในความเข้มข้นที่สูง เนื่องจากลักษณะของการติดเชื้อ VZV ที่เป็นแบบเฉพาะที่อันทำให้เกิดงูสวัด (เช่น โคลเตอร์ของเลือดของ VZV ต่ำ) ที่จำการติดเชื้อ VZV แล้ว และพร้อมที่จะถูกกระตุ้นเมื่อมีแอนติเจน VZV ดังนั้นจึงได้ทำเซลล์เมโมรี่แอสเซย์ (T-Cell Memory[TM] assay) เพื่อหาผลของมาโทแฟรกชัน, TF XF, องค์ประกอบ A และองค์ประกอบ B ที่มีต่อเซลล์ความจำที่ที่มาจากเลือดจากผู้ป่วยคนเดียวกันกับที่ทดสอบในตัวอย่างที่ 5 โดยปฏิบัติตามวิธีการที่อธิบายรายละเอียดไว้ในตัวอย่างที่ 3 ซึ่งมีข้อยกเว้นดังต่อไปนี้ : ใช้วัคซีน VZV ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10 แทนวัคซีน CMV (สำหรับการเจือจางต่อหลุมขั้นสุดท้ายเท่ากับ 1:50) ; และเปรตซ์ตัวอย่างของตัวอย่างที่ 3 นั้นถูกแทนที่ด้วยบัฟเฟอร์ควบคุมและสารปรับระยะทูมิคุ้มกันที่ใช้ในตัวอย่าง

ที่ 5 ซึ่งเชื่อมโยงสารปรับระบบภูมิคุ้มกันให้มีความเข้มข้นขั้นสุดท้ายต่อหลุมเท่ากับ 200 ไมโครกรัม มิลลิลิตร

ตารางต่อไปนี้เป็นการอธิบายรายละเอียดของผลการศึกษาของการทดสอบ (assay)

ตารางที่ 7

	กลุ่มควบคุม	มาโนแฟรคชั่น	TF XF	องค์ประกอบ A	องค์ประกอบ B
ไม่ถูกกระตุ้น (NSI)	1	2	13	27	51
ถูกกระตุ้นด้วย VZV	1	5	30	52	69
ถูกกระตุ้นด้วย ConA	288				

ข้อมูลนี้ยังแสดงเป็นกราฟได้ดังภาพที่ 3

ดังที่ได้คาดหวังไว้ ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ซึ่งประกอบอยู่ใน TF XF นั้นถูกกระตุ้นแอคติวิตีโดยเซลล์ความจำที่ นอกจากนี้จากเด็กซ์ตร้านมาโนแฟรคชั่นในเอคุนที่นี่ต่อทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ที่เพิ่มแอคติวิตีของเซลล์ความจำที่อย่างมีนัยสำคัญทั้งโดยการกระตุ้นเพิ่มเติมด้วย VZV และปราศจากการกระตุ้นเพิ่มเติมด้วย VZV ดังนั้นผลการศึกษาของตัวอย่างที่ 5 และ 6 เป็นการยืนยันว่าหลังจากเด็กซ์ตร้านมาโนแฟรคชั่นในเอคุนต่อการเตรียมต่างๆ ที่รวมถึงทรานสเฟอร์แฟคเตอร์แล้วแต่ในการวิเคราะห์ที่น้อยมากจะลดแอคติวิตีที่ไม่พึงประสงค์โลหิตเซลล์ (เช่น การสร้างภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเองและความผิดปกติที่เกี่ยวข้อง และอื่นๆ) ในขณะที่ทำให้แอคติวิตีของเซลล์ที่พึงประสงค์ดีมากขึ้นหรือเพิ่มมากขึ้น

ตัวอย่างที่ 7

ในการศึกษาอื่นๆ ซึ่งศึกษาเพื่อหาความสามารถขององค์ประกอบต่างๆ ที่หลากหลายซึ่งรวมถึงองค์ประกอบที่รวมถึงทรานสเฟอร์แฟคเตอร์และเด็กซ์ตร้านมาโนแฟรคชั่นในเอคุนที่อธิบายรายละเอียดไว้ในตารางที่ 4 และ 5 ในการกระตุ้นแอคติวิตีของเซลล์ธรรมชาติฆ่าเชื้อ (Natural killer cell ; NK cell) ที่ล้านตามต่อเซลล์ไลน์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังชนิดไวต่อยาเคมีบำบัด K-562 (human erythroblast leukemia cell line K-562) ซึ่งในส่วนเซลล์ (NK cells) ถูกประเมินผล ดังนั้นเรียกเซลล์ในกรณีนี้ว่า "เอฟเฟคเตอร์เซลล์" (effector cell) ในขณะที่เรียกเซลล์ K-562 ในกรณีนี้

ว่า "มูมเอร์เซลล์ (tumor cell)" และ "เซลล์เป้าหมาย(target cell)" โดยเฉพาะเจาะจงได้ใช้เทคโนโลยีเอ็นทีทีแอสเสย์ (MTT Assay) ซึ่ง 3-(4,5-ไดเมทิลไทอะซอล 2 อิล)-2,5-ไดฟีนิลเตตระโซเลียมโบรไมด์(MTT) ซึ่งมีสีเหลืองทับถูกรีดิวซ์ให้กลายเป็นฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งมีสีม่วงคล้ายกลิ่นจากเส้นใยน้ำตาลซึ่งอยู่ในไมโตรคอนเดรียที่ยังคงไว้ในเซลล์ที่มีชีวิต เพื่อกำหนดการวัดระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ได้เล็งการละลาย (เช่น โซเดียมลิวซัลฟอกไซด์,โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ในกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง (HCl) และอื่นๆ) ที่ละลายฟอร์มาซานในแต่ละหลุม โดยวิธีการวัดสปโตรโฟโตมิทรีเป็นการวัดปริมาณของแสงที่ความยาวคลื่นที่แน่นอน (เช่น ความยาวคลื่นในช่วงประมาณ 500 นาโนเมตรถึงประมาณ 600 นาโนเมตร) ซึ่งถูกดูดซับโดยสารละลายในแต่ละหลุม ซึ่งจากนั้นใช้ในการหาจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตในหลุมที่ทำการทดปริมาณที่สัมพันธ์กับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตในหลุมของกลุ่มควบคุมหนึ่งหลุมหรือมากกว่าซึ่งไม่มีองค์ประกอบที่ทดสอบเติมลงไป

องค์ประกอบที่ถูกประเมินผลรวมถึงทรานสเฟอร์แฟกเตอร์แอดวานซ์ (Transfer Factor Advanced™) ที่มาจาก 4 ไลฟ์ซิเตีร์ช; ทรานสเฟอร์แฟกเตอร์พลัสแอดวานซ์ (Transfer Factor Plus Advanced™) ซึ่งมาจาก 4 ไลฟ์ซิเตีร์ชเช่นกัน, องค์ประกอบA ซึ่งรวมถึงทั้งทรานสเฟอร์แฟกเตอร์และนาโนแฟรกชั่นโมเลกุลที่อยู่ในระดับที่สูง; องค์ประกอบ B ซึ่งรวมถึงทรานสเฟอร์แฟกเตอร์, นาโนแฟรกชั่นโมเลกุลที่อยู่ในระดับที่สูง และส่วนผสมอื่นๆ ที่เรียกว่าเทิมแอคติวิตีของระบบภูมิคุ้มกัน; นาโนแฟรกชั่นโมเลกุลจากน้ำนมน้ำเหลืองของสัตว์จำพวกวัว; นาโนแฟรกชั่นโมเลกุลจากไข่ไก่; และอินเตอร์ลิวคิน-2 (IL-2) ที่อยู่ภายใต้ชื่อการการค้าว่า โพรลิวคิน (Proleukin) จากบริษัทชิรอน (Chiron) ของประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าช่วยเร่งการเติบโตของเซลล์เพื่อการฆ่าเซลล์มะเร็ง

เลือดทั้งได้มาจากผู้ให้เลือดที่มีสุขภาพดี 5 ราย โดยใช้กระบวนที่เป็นที่ทราบกันดีในการแยกเม็ดเลือดขาวออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ของเลือด เทคนิคที่เป็นที่ทราบกันดีในการหมุนเหวี่ยงแบบเกรเดียนของความหนาแน่น (density gradient centrifugation technique) (เช่น การใช้ดิสโตแพกเกตซิลีกระดับ (Histopaque® density gradient จากบริษัท ซิกมาอัลดริช คอร์ปอเรชั่น (Sigma Aldrich Corporation) เมืองเซนต์หลุย มลรัฐมิสซูรี) นั้นใช้ในการแยกโมโนนิวเคลียร์เซลล์ (mononuclear cell) ที่รวมถึงเซลล์ทีเซลล์ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ จากนั้นจึงนำโมโนนิวเคลียร์เซลล์มาใส่ในมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต (growth medium) RPMI 1640 ที่มีเฟตัลเคาล์ฟซีรัม (fetal calf serum: FCS) ปริมาตรที่เท่ากันของของผสมนี้ ซึ่งรวมถึงมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต 100

ไมโครลิตร ที่มีเซลล์มีชีวิตขนาด 60,000 เซลล์ ถูกใส่ในหลุมที่แตกต่างของเพลตมาตรฐานชนิด 96 หลุม ตัวอย่างของสาร เมลทาร์ดเฟกเตอร์ และ/หรือ ยาโมเฟรคซัน ไมเกรนที่มีองค์ประกอบที่ระบุไว้ข้างต้นที่ละลาย ซึ่งมีความเข้มข้นของสาร 0.100 มิลลิกรัมต่อน้ำที่ขจัดไอออนแล้วและปราศจากเชื้อ (sterile deionized water) 1 มิลลิลิตรนั้นถูกใส่ในหลุม 3 หลุมที่แตกต่างกันที่มีเซลล์มีชีวิตขนาดและมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตสำหรับหลุมรวมทั้งหมด 18 หลุม นอกจากนี้ได้ใส่ IL-2 1,000 IU/ml ลงในหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) 3 หลุมที่มีของผสมของโมโนไนทิวเคลียร์เซลล์และมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต หลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) รวมทั้งของผสมของโมโนไนทิวเคลียร์เซลล์และมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตเท่านั้นโดยไม่มีสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน หลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบที่มีเอฟเฟคเตอร์เซลล์เท่านั้นซึ่งถูกรวมถึงของผสมของโมโนไนทิวเคลียร์เซลล์และมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต ในขณะที่หลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบสามกลุ่มเซลล์ที่มีเซลล์เป้าหมายที่ถูกรวมถึงมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต 100 ไมโครลิตรเท่านั้น

โมโนไนทิวเคลียร์เซลล์ถูกบ่มกับองค์ประกอบของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันโดยลำดับ (ยกเว้นสำหรับหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบจำนวน 3 หลุม) ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีความชื้น 100% เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ภายหลังจากการบ่ม เซลล์ K-562 ประมาณ 30,000 เซลล์ถูกใส่ลงในหลุมแต่ละหลุมยกเว้นหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบที่มีเอฟเฟคเตอร์เซลล์เท่านั้นจำนวน 3 หลุมที่มีโมโนไนทิวเคลียร์เซลล์และมีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต จากนั้นจึงบ่มเพลตชนิด 96 หลุม และของผสมในหลุมของเพลตดังกล่าวอีกครั้งในที่ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีความชื้น 100% เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

สารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้นของ MTT 5 มิลลิกรัม มิลลิลิตรของสารละลายน้ำเกลือของฮังค์ (Hank's saline solution) ได้ถูกเตรียมตามเทคนิคมาตรฐานที่เป็นที่ทราบกันดี จากนั้นจึงใส่สารละลาย MTT 20 ไมโครลิตรลงในหลุมที่มีโมโนไนทิวเคลียร์เซลล์-มีเดียมเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต-ทูมอร์เซลล์ของเพลตชนิด 96 หลุม เพลตและสิ่งที่อยู่ในหลุมของเพลตดังกล่าวถูกบ่มอีกครั้งในที่ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีความชื้น 100% ซึ่งคราวนี้ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง

หลังจากการบ่มครั้งสุดท้ายนี้ ซึ่งนำเพลตชนิด 96 หลุมไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบประมาณ 1,500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นจึงเอาส่วนลอย (supernatant) (ของเหลว) ออกจากหลุมแต่ละหลุม และใส่ไดมีทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ลงในหลุมที่มีโมโนนิวคลีอิกเซลล์และหลุมที่มีมูเมอร์เซลล์แต่ละหลุม จากนั้นจึงใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์วัดความทึบแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของหลุมที่มีเซลล์แต่ละหลุม จากนั้นใช้ค่าความทึบแสงที่วัดได้เพื่อหาดัชนีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic index) (%) (CI%) ของเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นโดยสารที่ทดสอบแต่ละตัวโดยการใช้สูตรดังต่อไปนี้:

$$CI(\%) = [1-(OD_{sp}-OD_{s})/OD_{p}] \times 100$$

โดย OD_{sp} คือ ความทึบแสงของหลุมทดสอบแต่ละหลุมที่สอดคล้องกับองค์ประกอบที่ทดสอบที่รวมถึง IL-2 ของกลุ่มควบคุมเชิงบวก, OD_{s} คือค่าเฉลี่ยของค่าความทึบแสงของหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบที่มีเซลล์เป็นเท่านั้น และ OD_{p} คือ ค่าเฉลี่ยของความทึบแสงของหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบที่มีเซลล์เป็นเท่านั้น ค่า CI (%) นี้แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เป้าหมายที่ถูกฆ่าโดยเม็ดเลือดขาวในแต่ละหลุมที่มีองค์ประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกันด้วย ผลการศึกษานี้แสดงไว้ในตารางต่อไปนี้:

ตารางที่8

องค์ประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน	CI (%)	แคลดีวิตีสัมพัทธ์ (Relative activity)
ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์แอดวานซ์ (Transfer Factor Advanced®)	43.1	55
ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์พลัสแอดวานซ์ (Transfer Factor Plus Advanced®)	38.5	49
องค์ประกอบ A	60.3	77
องค์ประกอบ B	57.9	74
นาโนแฟรกชั่นโมเลกุลจากน้ำนมน้ำเหลือง	77.9	100
นาโนแฟรกชั่นโมเลกุลจากไข่	68.7	88
IL-2	77.0	84

นอกจากนี้ข้อมูลเหล่านี้ในแผนภูมิของรูปที่ 4 ที่แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบที่รวมถึงทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ในไมเลกุลโดยเฉพาะที่มาจากน้ำนมน้ำเหลืองจากสัตว์ป่วยทั้งมีประสิทธิภาพประมาณ หรือมีประสิทธิภาพมากกว่า IL-2 ที่การกระตุ้นแอคติวิตีของเอ็นเดเซลล์ในการล่อล้านทูมเซลล์ K-562 ในขณะที่องค์ประกอบที่รวมถึงทรานสเฟอร์แฟคเตอร์จากน้ำนมน้ำเหลืองและไข่แดงในไมเลกุลจากน้ำนมน้ำเหลือง (เช่น องค์ประกอบ A และองค์ประกอบ B) กระตุ้นเอ็นเดเซลล์ต่างมีประสิทธิภาพมากกว่าองค์ประกอบที่ปราศจากทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ในไมเลกุล

โดยการเติมทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ในไมเลกุลอย่างน้อย 2% โดยน้ำหนักหรือมากกว่า ไปยังองค์ประกอบที่รวมถึงทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ในไมเลกุลสามารถส่งเสริมฤทธิ์โดยส่วนประกอบที่ไม่เฉพาะเจาะจง (เช่น เอ็นเดเซลล์) ของส่วนภูมิคุ้มกันต้านเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของตัวอย่างที่ศึกษา. การส่งเสริมความสามารถของทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ในการกระตุ้นแอคติวิตีโดยส่วนประกอบที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแอนติเจน (antigen-specific component) ของส่วนภูมิคุ้มกันต้านเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของตัวอย่างที่ศึกษา

เมื่อพิจารณาด้วยกัน ผลการศึกษาจากตัวอย่างที่ 5 ถึงตัวอย่างที่ 7 แสดงให้เห็นว่าทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ความบริสุทธิ์และกระตุ้น (prime) เซลล์ที่ผู้ช่วยซึ่งทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของตัวอย่างที่ศึกษาสามารถตอบสนองต่อเชื้อโรค (pathogen) ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพและสิ่งที่ไม่พึงประสงค์อื่นๆ นอกจากนี้ตัวอย่างที่ 5 ถึง ตัวอย่างที่ 7 แสดงให้เห็นว่าทรานสเฟอร์แฟคเตอร์อาจเพิ่มแอคติวิตีของเซลล์ความจำที่

นอกจากนี้ตัวอย่างที่ 5 ถึงตัวอย่างที่ 7 ยังแสดงให้เห็นว่าการเติมเอกซ์ตราในไมเลกุลที่เป็นสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน (extra nanofraction immune modulator molecules) ลงในองค์ประกอบที่รวมถึงทรานสเฟอร์แฟคเตอร์อาจเสริม และเพิ่มการปรับระบบภูมิคุ้มกัน (เช่น ของเซลล์ที่ผู้ช่วย, เซลล์ความจำที่ และเอ็นเดเซลล์) ของทรานสเฟอร์แฟคเตอร์และองค์ประกอบที่มีอยู่ซึ่งรวมถึงทรานสเฟอร์แฟคเตอร์

วิธีการในการปรับภูมิคุ้มกันต้านเซลล์ของตัวอย่างที่ศึกษารวมถึงการให้ (เช่น ทางลำไส้ (enterally), ทางการฉีด (parenterally) และอื่นๆ) องค์ประกอบที่รวมถึงทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ในไมเลกุลต่อตัวอย่างที่ศึกษา โดยอาจให้ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ในไมเลกุลอย่างเดียวหรือเป็นส่วนของส่วนประกอบที่ประกอบอย่างมีนัยสำคัญด้วยทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ในไมเลกุล หรืออาจให้ร่วมกับองค์ประกอบ (เช่น องค์ประกอบที่ได้อธิบายไว้โดยละเอียดในตารางที่ 4 หรือตารางที่ 5) ที่รวมถึงทรานสเฟอร์แฟคเตอร์

การให้เจ็บปวดขึ้นในที่ที่ปกติในความพยายามในการดำรงสมดุลทั้งหมดในภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ของตัวอย่างที่ศึกษา หรือบางทีผลในการลบล้างการติดเชื้อ, ความผิดปกติในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง (autoimmune disorder), การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (tissue transplant) หรือเหตุการณ์อื่นๆ ที่ส่งผล (กระตุ้นหรือลด) ภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ของตัวอย่างที่ศึกษา

การให้ส่งส่วนประกอบที่รวมถึงโมเลกุลสารปรับระบบภูมิคุ้มกันทางโมเลกุลในเฟรคชั่นตามการสอนของการประดิษฐ์นี้ก็นั้นเชื่อว่าเพื่อปรับเทคนิคที่มีของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ที่ตั้งอยู่บนที่ที่จำเป็นต้องการทางคลินิกวิทยา ตัวอย่างเช่น เทคนิคที่ไม่พึงประสงค์ของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (เช่น การสร้างภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง และอื่นๆ) อาจลดลง ลังตัวอย่างที่ๆ ความสามารถของเซลล์ในการกำจัดเชื้อโรคที่ไม่พึงประสงค์ออกจนสิ้นที่ไม่พึงประสงค์ที่ๆ เช่น เซลล์มะเร็งและสิ่งที่เป็นแปลกปลอมจากประเทศที่ๆ หรือเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยรังสี จากร่างกายของตัวอย่างที่ศึกษา (เช่น โดยการกระตุ้นที่เซลล์ผู้ช่วย (CD4+) เซลล์ซึ่งในทางกลับกันกระตุ้นเนเชอร์ออลคิลเลอร์เซลล์ (NK) โดยการเพิ่มภูมิคุ้มกันด้านแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจง (antigen-specific immunity) โดยการให้ความสามารถแก่เซลล์ความจำที่ๆ และอื่นๆ) อาจถูกมุ่งเน้นความสนใจและถูกเพิ่ม โดยเฉพาะเมื่อใช้ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ร่วมกับโมเลกุลสารปรับระบบภูมิคุ้มกันทางโมเลกุลในเฟรคชั่นในปริมาณที่มากพอ

แม้ว่าการอธิบายที่ได้กล่าวมาแล้วมีการเน้นเฉพาะเจาะจงบางประการ แต่สิ่งเหล่านี้จะไม่ถูกตีความว่าเป็นการจำกัดขอบเขตของการประดิษฐ์นี้ แต่เพียงเป็นการแสดงรูปลักษณ์ที่ดีของการไม่ปิดกั้นบางส่วน อย่างคล้ายกันรูปลักษณ์อื่นๆ ของการประดิษฐ์อาจถูกประดิษฐ์ขึ้นใหม่ซึ่งไม่ได้เบี่ยงเบนจากเจตนารมณ์และขอบเขตของการประดิษฐ์นี้ ลักษณะของรูปลักษณ์ที่แตกต่างกันอาจถูกให้เกิดผลสมกัน ดังนั้นขอบเขตของการประดิษฐ์จึงถูกบ่งชี้และถูกจำกัดโดยเพียงคำขอถือสิทธิที่เพิ่มเติมและความสมเหตุสมผลอันพึงมีของขอบเขตการประดิษฐ์มากกว่าโดยการอธิบายที่ได้กล่าวมาแล้ว การเพิ่ม การแทนที่และการปรับทั้งหมดต่อการประดิษฐ์ดังที่เปิดเผยในการณ์นี้อยู่ในความพยายามและขอบเขตของการขอถือสิทธิที่นำมาใช้ด้วยเช่นกัน

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้ในการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถือสิทธิ

1. องค์ประกอบสำหรับการเร่งการเจริญเติบโตของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งประกอบด้วย

ส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งประกอบด้วย

ส่วนแรกที่ประกอบด้วยเศษส่วนแรก (first fraction) ของน้ำเหลืองของลูกวัวพ่อพันธุ์ (bovine colostrums) ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลของน้ำหนักโมเลกุลสูงสุด (upper molecular weight cutoff) 10,000 Da

ส่วนที่สองที่ประกอบด้วยเศษส่วนที่สอง (second fraction) ของน้ำเหลืองของลูกวัวพ่อพันธุ์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลของน้ำหนักโมเลกุลซึ่งไม่รวมอนุภาคที่มีขนาดใหญ่, แอนติบอดี, ทรานสเฟอร์รินและ

ไข่ไก่, ไข่แดงของไข่ไก่ หรือเศษส่วนไข่ไก่

2. องค์ประกอบตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 ซึ่งส่วนที่สองมีสัดส่วนเป็นอย่างน้อยที่สุดสองเท่าเมื่อเทียบกับน้ำหนักของส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน

3. องค์ประกอบตามข้อถือสิทธิข้อที่ 2 ซึ่ง

ส่วนแรกมีสัดส่วนเป็น 68% ของน้ำหนักของส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน และ

ไข่ไก่ หรือไข่แดงของไข่ไก่ หรือเศษส่วนไข่ไก่มีสัดส่วนเป็น 30% ของน้ำหนักของส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน

4. องค์ประกอบตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 ถึง 3 ข้อใดข้อหนึ่ง ซึ่งค่าตัดออฟของค่าน้ำหนักโมเลกุลของส่วนที่สองคือ 3,000 Da

5. องค์ประกอบสำหรับการเร่งการเจริญเติบโตของระบบภูมิคุ้มกัน ที่ประกอบด้วย

ส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกันที่ประกอบด้วย

สารสกัดที่เป็นผลของน้ำเหลืองของลูกวัวพ่อพันธุ์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลของน้ำหนักโมเลกุล 10,000 Da

สารสกัดที่เป็นผลของน้ำเหลืองของลูกวัวพ่อพันธุ์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลซึ่งไม่รวมอนุภาคที่มีขนาดใหญ่, แอนติบอดี, ทรานสเฟอร์รินและ

ไข่แดงของไข่ไก่และ

6. องค์ประกอบตามข้อถือสิทธิข้อที่ 5 ซึ่งสารสกัดที่เป็นผลของน้ำเหลืองของลูกวัวพ่อพันธุ์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลซึ่งไม่รวมอนุภาคที่มีขนาดใหญ่, แอนติบอดี,

ทรานสฟอร์มฟอนเนอร์ ประกอบด้วยอย่างน้อยที่สุดสองเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักของส่วนประกอบที่ประกอบกันมีปุ่มกัน

7. องค์ประกอบตามข้อเรียกร้องข้อที่ 6 ซึ่ง:

สารสกัดที่เป็นผงของน้ำมันน้ำเหลืองของสัตว์จำพวกวัวที่มีค่าตัดออกฟิลจำกัดบนของน้ำหนักโมเลกุล 50,000 Da ประกอบด้วยอย่างน้อย 68% ของน้ำหนักของส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน

สารสกัดที่เป็นผงของน้ำมันน้ำเหลืองของสัตว์จำพวกวัวที่มีค่าตัดออกฟิลจำกัดบนของน้ำหนักโมเลกุลซึ่งไม่รวมอนุภาคที่มีขนาดใหญ่, แอนติบอดี, ทรานสฟอร์แฟคเตอร์ ประกอบด้วยอย่างน้อย 2% ของน้ำหนักของส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน และ

ไข่แดงของไข่ที่ทำผงประกอบด้วยอย่างน้อย 30% ของน้ำหนักของส่วนประกอบที่ปรับระบบภูมิคุ้มกัน

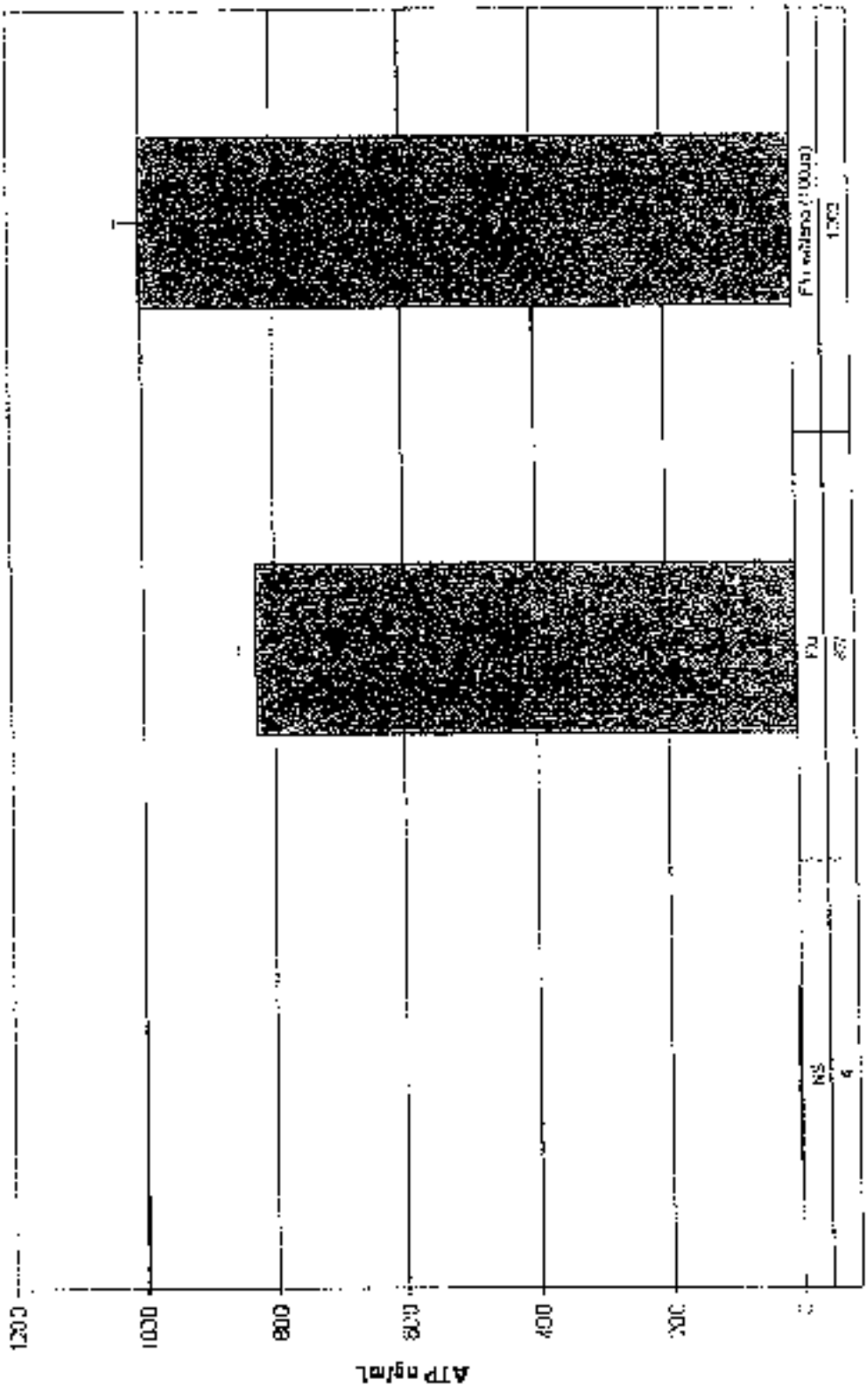
8. องค์ประกอบตามข้อเรียกร้องข้อที่ 5 ถึง 7 ข้อใดข้อหนึ่ง ซึ่งสารสกัดที่เป็นผงของน้ำมันน้ำเหลืองของสัตว์จำพวกวัวที่มีค่าตัดออกฟิลจำกัดบนของน้ำหนักโมเลกุลซึ่งไม่รวมอนุภาคที่มีขนาดใหญ่, แอนติบอดี, ทรานสฟอร์แฟคเตอร์มีค่าตัดออกฟิลจำกัดบนของน้ำหนักโมเลกุล 3,000 Da

9. สารปรับระบบภูมิคุ้มกันสำหรับการปรับปรุงฟังก์ชันของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งประกอบด้วยแฟรกชั่นของน้ำมันน้ำเหลืองของสัตว์จำพวกวัวที่มีค่าตัดออกฟิลจำกัดบนของน้ำหนักโมเลกุลซึ่งไม่รวมอนุภาคที่มีขนาดใหญ่, แอนติบอดี, ทรานสฟอร์แฟคเตอร์

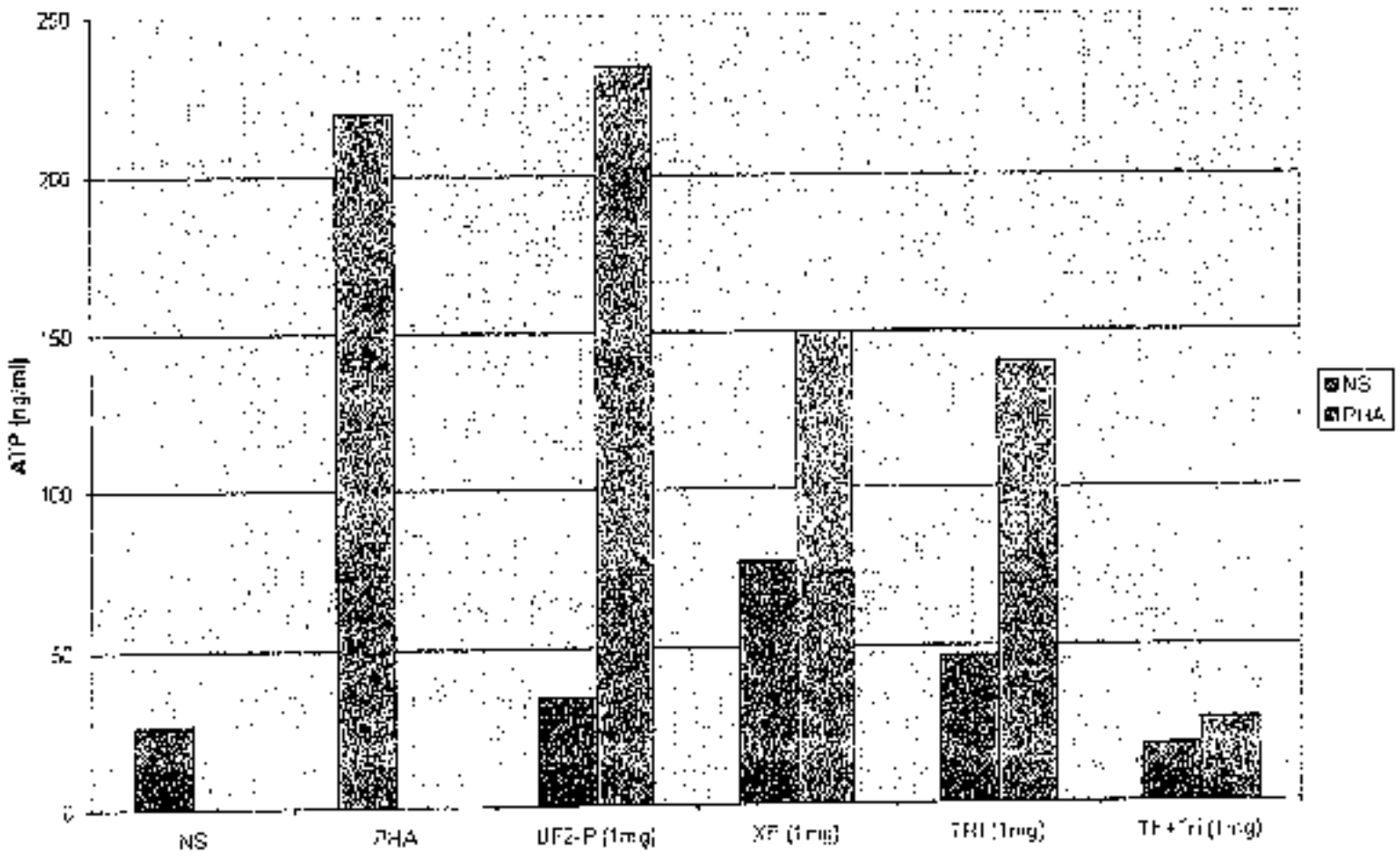
10. สารปรับระบบภูมิคุ้มกันตามข้อเรียกร้องข้อที่ 9 ซึ่งค่าตัดออกฟิลจำกัดบนของน้ำหนักโมเลกุลคือ 3,000 Da

11. สารปรับระบบภูมิคุ้มกันตามข้อเรียกร้องข้อที่ 9 ซึ่งมีประชากรคือ 250 Da ถึง 2,000 Da ของแฟรกชั่นจากน้ำมันน้ำเหลือง

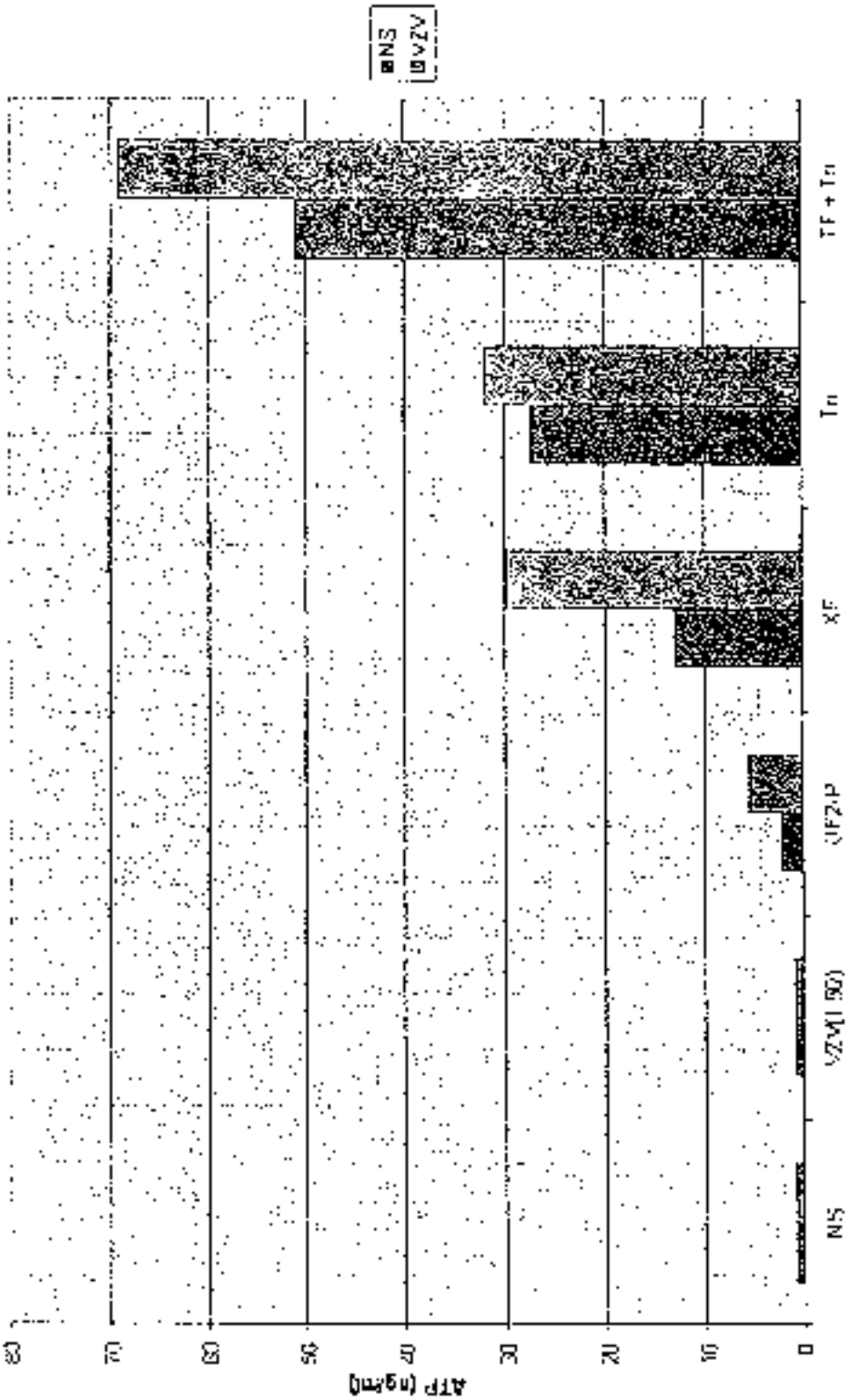
12. การใช้องค์ประกอบตามข้อเรียกร้องข้อที่ 1 ถึง 8 ข้อใดข้อหนึ่ง หรือสารปรับระบบภูมิคุ้มกันตามข้อเรียกร้องข้อที่ 9 ถึง 11 ข้อใดข้อหนึ่ง ในการผลิตยาสำหรับปรับระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วย


1200
1000
800
600
400
200
0
ATP ng/mL
NS
NS
NS
Fluvoxamine (100mg)
1300

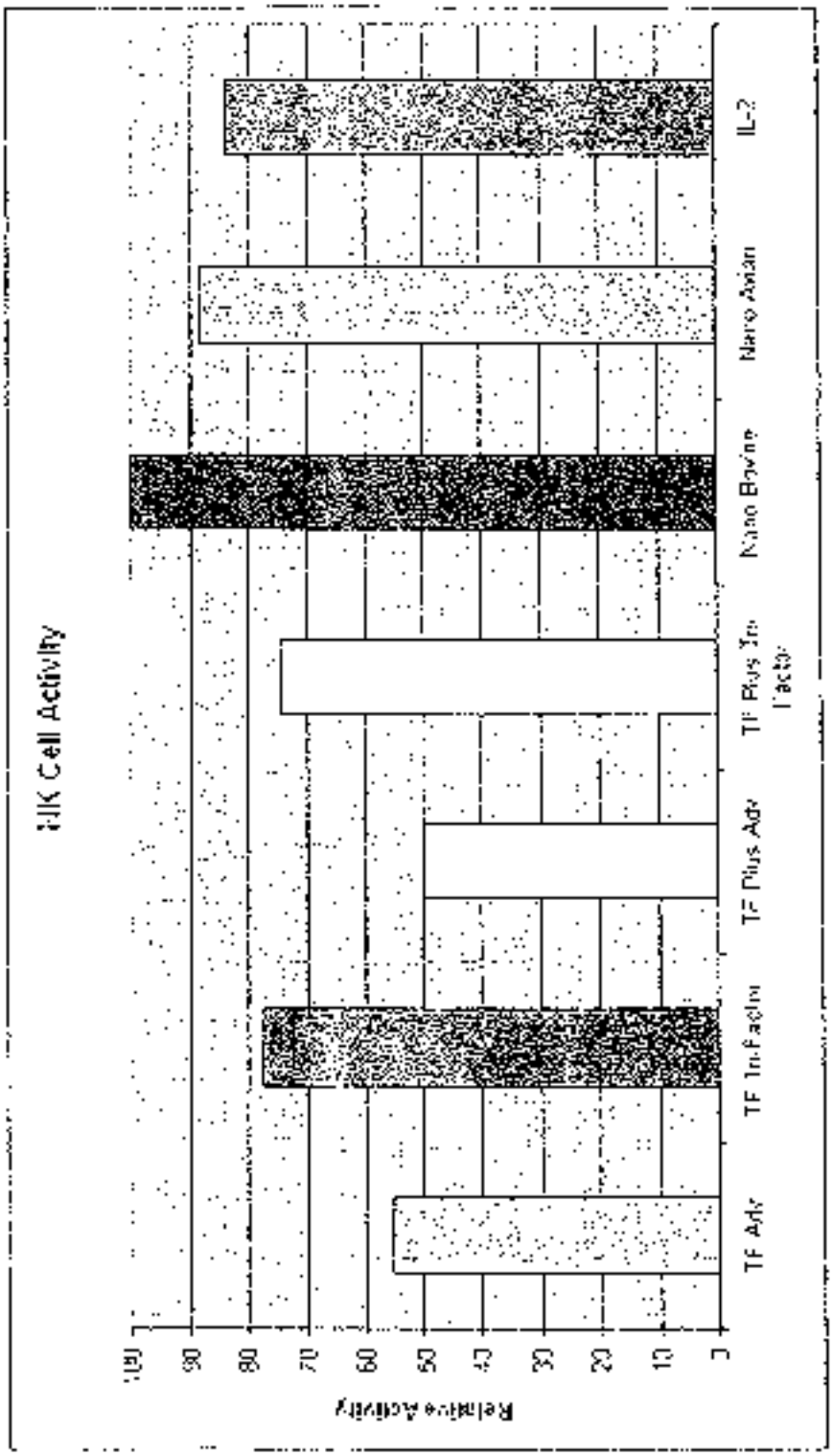
รูปที่ 1


250
200
150
100
50
0
ATP (ng/ml)
NS
PHA
UF2-P (1mg)
XF (1mg)
TRI (1mg)
TF+Tri (1mg)
NS
PHA

รูปที่ 2


NS
VZV
ATP (ng/ml)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
NS
VZV(1 PFU)
UF2-P
XF
Tn
TF + Tn

รูปที่ 3


NK Cell Activity
Relative Activity
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
TF Adv
TF InFactin
TF Plus Adv
TF Plus In Factin
Nano Bovine
Nano Avian
IL-2

รูปที่ 4

บทสรุปการประดิษฐ์

องค์ประกอบที่ซึ่งรวมถึงสารสกัดจากแก่งของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันที่รวมถึงโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนเฟรคชั่น (เช่น โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 Da และต่ำกว่า) ทั้งนี้ยังสามารถรวมถึงสารปรับระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ เช่น พรานเสฟอร์เฟกเตอร์ การให้องค์ประกอบที่มีสารสกัดซึ่งรวมถึงโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนเฟรคชั่นที่ปรับภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ เช่น ลดแอคติวิตี้ที่ไม่พึงประสงค์ของที่เซลล์ของตัวอย่างที่ได้รับองค์ประกอบดังกล่าว เมื่อให้พรานเสฟอร์เฟกเตอร์ การรวมกันระหว่างโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนเฟรคชั่นและพรานเสฟอร์เฟกเตอร์จะลดแอคติวิตี้ที่ไม่พึงประสงค์ของที่เซลล์ในขณะที่การเพิ่มขึ้นหรืออัปเรกูเลติ้ง (up regulating) แอคติวิตี้ของที่เซลล์ ซึ่งล้วนเกี่ยวข้องกับโรคและสิ่งเจ็บป่วยที่ไม่พึงประสงค์ เช่น เซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสหรือเซลล์ที่กลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้มีโดยผลการทดลอง (assay) และเทคนิคในการทดลองอื่นๆ เพื่อวัดการประเมินผลในความสามารถในการปรับระบบภูมิคุ้มกันของสารต่างๆ ที่ทดลองด้วย

กรมทรัพย์สินทางปัญญา
กระทรวงพาณิชย์

(11) เลขที่ประกาศโฆษณา 140343
(43) วันประกาศโฆษณา 29 มกราคม 2558

(12) ประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์

(21) เลขที่คำขอ 0701003962
(22) วันที่ยื่นคำขอ 1 ตุลาคม 2550

(51) สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ Int.Cl.10
A61K 35/20; A61K 39/00

(31) เลขที่คำขอที่ยื่นครั้งแรก
60/848,348
(32) วันที่ยื่นคำขอครั้งแรก
29 กันยายน 2549
(33) ประเทศที่ยื่นคำขอครั้งแรก
สหรัฐอเมริกา

(71) ผู้ขอรับสิทธิบัตร
ฟไมท์ เฟลิ์ทส์ แอนด์ ซี
(72) ผู้ประดิษฐ์
นายเดวิด ลิสันบี และคณะ
(74) ตัวแทน
นายพิทาพรรณ์ มงคลศิริ และ หรือ
นางสาวปรับโยชน์ ศรีกิจจาภรณ์ และ หรือ นายบุญมา เลาหวณิช
บริษัท สำนักกฎหมายดีเดน สนต์ยรสิและบุญมา จำกัด 219
ถ.ศรีอยุธยา ขแขงนครเขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

(54) ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สารปรับระบบภูมิคุ้มกัน, สารเสริม
และองค์ประกอบที่ประกอบด้วยสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน,
การผลิตและสำหรับการประเมินกลไกการทำงานของสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน
และสารเสริมและองค์ประกอบที่ประกอบด้วยสารปรับระบบภูมิคุ้มกัน และวิธีการต่างๆ

(57) บทสรุปการประดิษฐ์

องค์ประกอบซึ่งรวมถึงสารสกัดจากแหล่งของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันที่รวมถึงโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแฟรคชั่น (เช่น โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000 Da และน้อยกว่า) นั้นถูกเปิดเผย องค์ประกอบเหล่านี้ยังอาจรวมถึงสารปรับระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ เช่น ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ การให้องค์ประกอบที่มีสารสกัดซึ่งรวมถึงโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแฟรคชั่นที่ปรับภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (เช่น ลดแอคติวิตีที่ไม่พึงประสงค์ของทีเซลล์) ของตัวอย่างที่ศึกษาที่ได้รับองค์ประกอบดังกล่าว เมื่อให้ทรานสเฟอร์แฟคเตอร์ การรวมกันระหว่างโมเลกุลของสารปรับระบบภูมิคุ้มกันนาโนแฟรคชั่นและทรานสเฟอร์แฟคเตอร์จะลดแอคติวิตีที่ไม่พึงประสงค์ของทีเซลล์ในขณะที่การเพิ่มขึ้นหรืออัพเรกูเลติ้ง (up-regulating) แอคติวิตีของทีเซลล์ ซึ่งต้านทานต่อเชื้อโรคและสิ่งอื่นๆ ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น เซลล์มะเร็งและเซลล์ที่เบี่ยงเบนไปจากปกติหรือเซลล์ที่กลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้เปิดเผยการหาปริมาณ (assay) และเทคนิคในการหาปริมาณต่างๆ สำหรับการประเมินผลในความสามารถในการปรับระบบภูมิคุ้มกันของสารต่างๆ ที่หลากหลายอีกด้วย

(ข้อถือสิทธิ 25 ข้อ, รูปเขียน 4 รูป)