

# 發明專利說明書 公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 96135902

AGIK<sup>35/20</sup> 2006.01,

※ 申請日期： 96.9.27

※IPC 分類：

AGIK<sup>35/54</sup> 2006.01,

AGIP<sup>37/02</sup> 2006.01

## 一、發明名稱：(中文/英文)

免疫調節物、包含免疫調節物之製備物與組成物、評估免疫調節物及包含其之製備物和組成物之活性的試驗及方法

IMMUNE MODULATORS, PREPARATIONS AND COMPOSITIONS INCLUDING IMMUNE MODULATORS, TESTS FOR EVALUATING THE ACTIVITY OF IMMUNE MODULATORS AND PREPARATIONS AND COMPOSITIONS INCLUDING THE SAME AND METHODS

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

富萊福專利公司 / 4LIFE PATENTS, LLC

代表人：(中文/英文)

史蒂芬 D. 圖 / TEW, STEVEN D.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國猶他州 84070-3262 山迪市南 300 西 9850 號  
9850 South 300 West, Sandy, Utah 84070-3262 U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 / USA

## 三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 大衛 里森比 / LISONBEE, DAVID.
2. 凱文 W. 麥考斯蘭 / McCAUSLAND, CALVIN W.
3. 理察 H. 貝內特 / BENNETT, RICHARD H.
4. 布倫特 M. 弗漢 / VAUGHAN, BRENT M.
5. 薛恩 M. 雷弗爾 / LEFLER, SHANE M.

國 籍：(中文/英文)

- 1.~5. 美國 / USA

**四、聲明事項：**

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，  
其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、2006.09.29、60/848,348
2. 美國、2007.09.14、11/855,944

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

### 【實施方式】

最近已發現在多種分子量範圍內之小分子適用於調節免疫細胞之活性。以下實施例闡述為達到該等結論所執行之行為。

#### 實施例 1

使用包含相分離、沈澱、過濾、微過濾或奈米過濾及透析之已知方法，自牛初乳及雞蛋二者中製備多種分子量部分。自牛初乳獲得之分子量部分為：250 Da 至 2,000 Da，2,000 Da 至 4,000 Da，4,000 Da 至 8,000 Da（其包含轉移因子，且為比較之原因而包含），及 8,000 Da 至 12,000 Da。類似地，自雞蛋黃製備 2,000 Da 至 4,000 Da，4,000 Da 至 8,000 Da（其包含轉移因子，且為比較之原因而包含），及 8,000 Da 至 12,000 Da 分子量部分。隨後將該等分子量部分乾燥為粉末形式（例如藉由噴霧乾燥、冷凍乾燥等等）。

隨後使用該等製備物進行各種檢定以評估每一部分中之分子調節傳送細胞免疫性之細胞（例如 CD4+ T 輔助細胞）之活性的作用。特定言之，修改揭示於美國專利第 5,773,232 號及第 6,630,316 號中及美國專利申請公開案第 2005/0260563 號中之該類型之檢定且將其用以評估來自實施例 1 之不同分子量部分在多種條件下之活性。使用上述檢定來評估由免疫細胞（例如 CD4+ T 輔助細胞、CD3+ 細胞（其包含所有 T 細胞）等等）產生之三磷酸腺苷（ATP）。

由該等細胞所產生之 ATP 之量可以此項技術中已知之方式（例如藉由使用以流明計檢測之所謂「螢光素反應」）量測。

## 實施例 2

使用於其表面上包含或表現所謂「CD4」糖蛋白之健康個體之白血球且使用由 Cylex Incorporated (Columbia, Maryland) 生產之 ImmuKnow™ 檢定進行第一系列檢定。該等白血球由於其表現 CD4 糖蛋白亦稱為「CD4+」細胞。CD4 糖蛋白之表現使所謂的「T 輔助」細胞與包含其他 T 細胞之其他類型白血球區分開。

ImmuKnow™ 檢定試驗套組之組件為：包含可拆換 8 孔測試條 (strip) 之標準 96 孔「檢定板」；包含生長培養基及防腐劑之「樣品稀釋劑」；包含植物血球凝集素-L (PHA-L) (來自豆(例如紅菜豆)之物質) 之「刺激劑」，已知其非特異性地刺激有絲分裂(細胞生長且分裂成兩個新細胞之過程)且因此於生長培養基及防腐劑中稀釋之白血球中製備性產生三磷酸腺苷(ATP)，(亦即「致裂物質」)；「Dynabeads®\* CD4」，其為以小鼠單株抗人類 CD4 抗體塗佈之磁性樣品純化珠粒且由具有牛血清白蛋白(BSA)及防腐劑之緩衝鹽水溶液承載；「洗滌緩衝液」，其包含具有 BSA 之緩衝鹽水溶液；「溶解試劑」，其包含具有去污劑之低滲透壓鹼性溶液；「定標液」(Calibrator Panel)，其中 ATP 濃度為 0、1、10、100 及 1,000 ng/ml；於緩衝溶液中包含螢光素及螢光素酶的「發光試劑」，其

與 ATP 反應以產生指示發光試劑所暴露之 ATP 之量之光；及包含具有不透明邊界（亦即壁及基底）之 96 孔之「量測板」。

使用一個可稱為「對照條」之 96 孔檢定板之 8 孔測試條以提供對照，其包含 4 個「未經刺激」（NS）對照孔及 4 個「經刺激」對照孔。

對於待測試之每一樣品使用另一可稱為「試驗條」之 96 孔檢定板之 8 孔測試條。將每一測試條中之 4 個孔指定為「未經刺激」孔，而每一測試條中之其他 4 個孔為「經刺激」孔。將五十微升（50  $\mu$ l）樣品稀釋劑引入對照測試條之 4 個「未經刺激」孔之每一者中，同時將 25  $\mu$ l 樣品稀釋劑引入每一試驗條之「未經刺激」孔之每一者中。將二十五微升（25  $\mu$ l）刺激劑引入對照測試條之 4 個「經刺激」孔之每一者中，且引入每一試驗條之 4 個「經刺激」孔之每一者中。

除樣品稀釋劑或刺激劑外，還將 25  $\mu$ l 實施例 1 中所鑑別之分子量部分中之一者之樣品引入每一試驗條之 8 個孔中之每一者中。更特定言之，使實施例 1 之分子量部分之每一者在樣品稀釋劑中復水且以一定體積之樣品稀釋劑稀釋以提供三種不同濃度，該等濃度在向孔中添加 25  $\mu$ l 樣品後，最終分別等於向該孔中添加 10  $\mu$ g、100  $\mu$ g 及 1,000  $\mu$ g 乾燥粉末。

製備包含白血球之 1:3（血液：「樣品稀釋劑」）稀釋度的血樣，將其輕微攪動以使其組份均勻分布。將七十

五微升 (75  $\mu$ l) 稀釋血液添加至每一測試條之每一孔中。隨後使孔中內容物混合 (例如藉由將板置於震盪器板上約 30 秒)，隨後在 37°C 之溫度下在 5% CO<sub>2</sub> 環境中培育約 18 小時。

一旦完成培育，則使孔中內容物再次混合 (例如藉由將該板置於震盪器板上約 3 分鐘)。此後，使包含 Dynabeads<sup>®</sup> 樣品純化珠粒之溶液混合以使 Dynabeads<sup>®</sup> 樣品純化珠粒均勻懸浮於承載其之液體內 (例如使用渦流)。如上所述，該實施例中之 Dynabeads<sup>®</sup> 樣品純化珠粒包含以小鼠單株抗人類 CD4 抗體塗佈之磁性珠粒。將五十微升 (50  $\mu$ l) 承載 Dynabead<sup>®</sup> 樣品純化珠粒之溶液添加至每一測試條之每一孔中。

使每一測試條孔中之內容物再次混合 (例如在震盪器板上約 15 秒)，隨後將其置於室溫下或於室溫下培育約 15 分鐘。隨後重複該混合及培育之過程。Dynabeads<sup>®</sup> 樣品純化珠粒上之小鼠抗人類 CD4 抗體僅與展現 CD4 糖蛋白之白血球結合。在該培育期間，包含 T 輔助細胞之 CD4+ 白血球由 Dynabeads<sup>®</sup> 樣品純化珠粒上之小鼠單株抗人類 CD4 抗體固定或結合於其上。

培育之後，將每一孔中之內容物再次混合 (例如於震盪器板上約 15 秒至約 30 秒) 以使該等 Dynabeads<sup>®</sup> 樣品純化珠粒再懸浮。隨後根據闡述於附於 ImmuKnow<sup>™</sup> 檢定之說明中之方案將每一孔中之內容物引入磁場中 (例如藉由將每一 8 孔測試條放置於自 Cylex 購得之磁盤中)。

Dynabeads<sup>®</sup>樣品純化珠粒在經受磁場時被拉至其所存在於其中之每一孔之一側。可隨後移除該孔中之剩餘內容物（例如使用移液管吸出等等），且將珠粒及 T 輔助細胞洗滌一或多次（例如 3 次，每次使用 200  $\mu$ l 洗滌緩衝液）以大體上使其純化。

隨後將二百微升（200  $\mu$ l）溶解試劑添加至每一孔中。自磁場中移除每一孔中之內容物之後，使每一孔中內容物（亦即 Dynabeads<sup>®</sup>樣品純化珠粒、附接於其上之細胞及溶解試劑）混合（例如於板震盪器上約 5 分鐘）。溶解試劑使由 Dynabeads<sup>®</sup>樣品純化珠粒上之抗體固定之 CD4+細胞之膜破裂。其中，ATP 自溶解之細胞中釋放。

一旦完成細胞溶解，則使每一孔中之內容物再次經受磁場，將每一孔內之 Dynabeads<sup>®</sup>樣品純化珠粒拉至該孔之一側。隨後將 50  $\mu$ l 樣品自每一孔轉移至量測板之相應孔中。除了轉移樣品外，還保留 96 孔量測板之若干孔以供 50  $\mu$ l 具有各種 ATP 濃度之定標液溶液的樣品之用。

隨後將一百五十微升（150  $\mu$ l）發光試劑添加至包含試驗樣品或定標液溶液樣品之量測板之每一孔中。隨後量測每一孔之發光。所量測之每一孔之發光提供存在於該孔中 ATP 之量的指示。存在於每一孔中 ATP 之量又指示細胞（亦即 CD4+細胞）內代謝活性之量，其中量測板之每一孔中之內容物係來自該等細胞。來源於以 PHA 非特異性刺激之細胞之樣品中預期存在相對較高含量之 ATP。添加免疫調節物（例如來自於實施例 1 中鑑別之部分之一者）

將增加或降低或調節由 PHA 非特異性刺激之 CD4+細胞中之代謝活性。

該試驗之結果係闡述於下表中，其中所說明之數字表示每一子集之白血球產生之 ATP 的平均(mean) (平均(average)) 量：

表 1

樣 品		對照	每 孔 10 µg	每 孔 100 µg	每 孔 1000 µg
250 Da 至 2,000 Da 初乳部分	未經刺激 (NS)	14	52	50	37
	經 PHA 刺激	388	336	253	127
	PHA 刺激下之 降低%		13.4	34.8	67.3
2,000 Da 至 4,000 Da 初乳部分	NS	14	52	62	42
	經 PHA 刺激	388	388	377	339
	PHA 刺激下之 降低%		0	2.8	12.6
4,000 Da 至 8,000 Da (包含 TB) 初 乳部分	NS	14	69	50	46
	經 PHA 刺激	388	378	250	207
	PHA 刺激下之 降低%		2.6	35.6	46.6
8,000 Da 至 12,000 Da 初乳部分	NS	14	49	45	39
	經 PHA 刺激	388	337	237	181
	PHA 刺激下之 降低%		13.1	38.9	53.4
2,000 Da 至 4,000 Da 卵部分	NS	14	49	33	44
	經 PHA 刺激	388	228	161	148
	PHA 刺激下之 降低%		41.2	58.5	61.9



憶細胞僅構成已結合於 Dynabeads®之抗體分子之細胞的一部分。

該等檢定之結果闡述於下表中，其中所說明之數字表示所測試之每一樣品（及量）之白血球產生之 ATP 的平均（平均）量：

表 2

樣 品		對照	10 µg	100 µg	1000 µg
250 Da 至 2,000 Da 初乳部分	未經刺激 (NS)	12	14	12	17
	經 CMV 刺激	316	468	338	345
	CMV 刺激下 之增加%		48.1	7.0	9.2
2,000 Da 至 4,000 Da 初乳部分	NS	12	15	12	15
	以 CMV 刺激	316	501	503	440
	CMV 刺激下 之增加%		58.5	59.1	39.2
4,000 Da 至 8,000 Da (包含 TF) 初乳部 分	NS	12	22	16	19
	經 CMV 刺激	316	473	476	475
	CMV 刺激下 之增加%		49.7	50.6	50.3
8,000 Da 至 12,000 Da 初乳部分	NS	12	14	18	26
	經 CMV 刺激	316	453	404	370
	CMV 刺激下 之增加%		43.4	27.8	17.1

感冒病毒且患有流行性感感冒症狀歷時 4 週之個體獲得血樣。

該檢定係以描述於實施例 3 中之方式，使用 Cylex 之 T 細胞 Memory™ 檢定，根據檢定提供且闡述於實施例 3 中之說明進行，其中例外為使用由 Aventis Pasteur (Paris, France) 為 2006-2007 流行性感感冒季節製造之流行性感感冒疫苗的 1:25 稀釋液形式的流行性感感冒抗原（最終每孔稀釋度為 1:125）替代實施例 3 之 CMV 疫苗。

該檢定之結果闡述於下表中：

表 3

樣品		對照	10 µg	100 µg	1000 µg
2,000 Da 至 4,000 Da 初乳部分	NS	4	10	3	4
	經流行性感感冒 抗原刺激	827	1003	906	936
	ConA	694			
	流行性感感冒抗 原刺激下之增 加%		21.3	9.6	13.2
4,000 Da 至 8,000 Da (包含 TF) 初乳部 分	NS	4	36	24	11
	經流行性感感冒 抗原刺激	827	989	997	830
	ConA	694			
	流行性感感冒抗 原刺激下之增 加%		19.6	20.6	0.4

於表 4 中之「免疫調節組份」組成，或其可包含如闡述於表 5 中之其他成份。

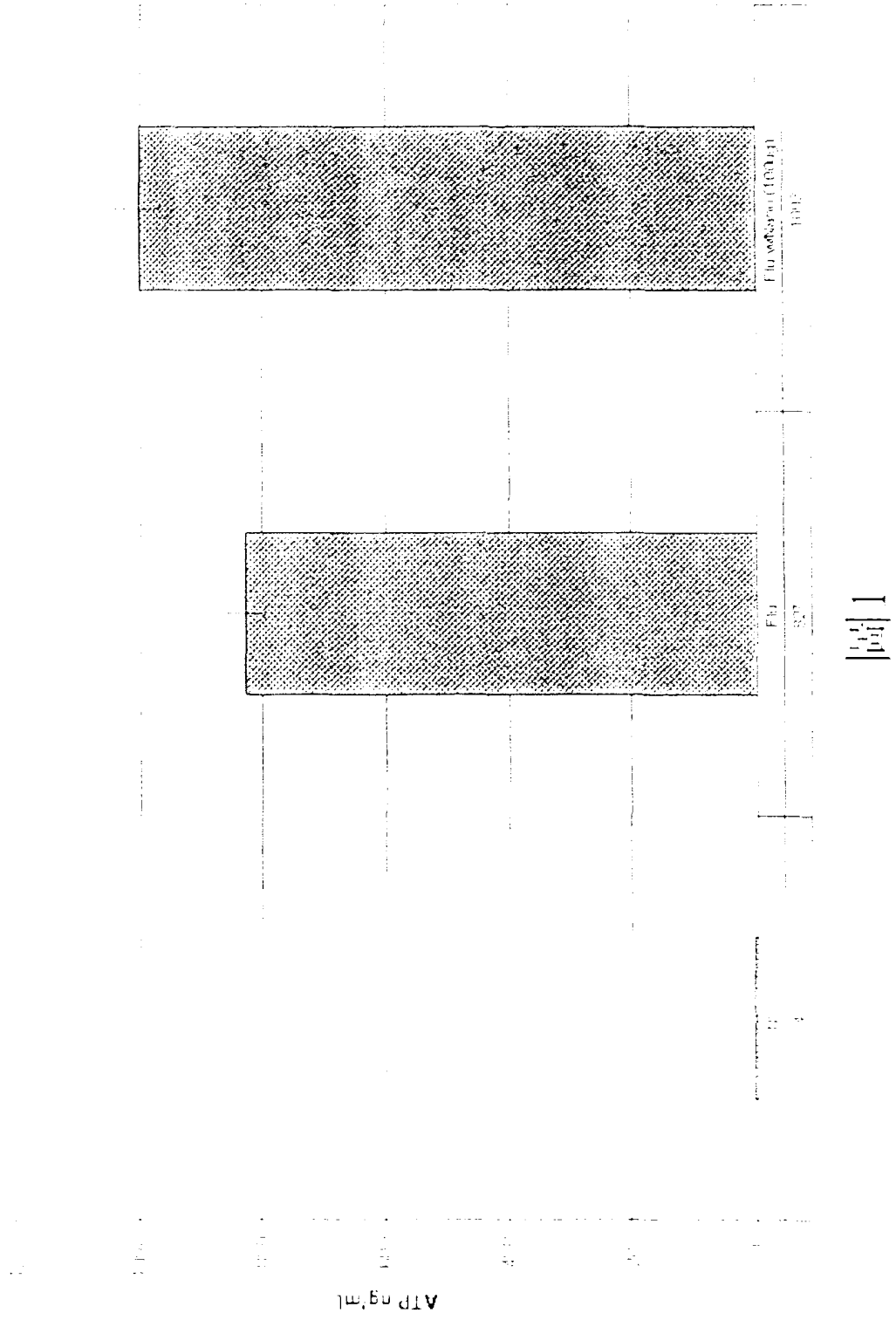
表 5  
組成物 B

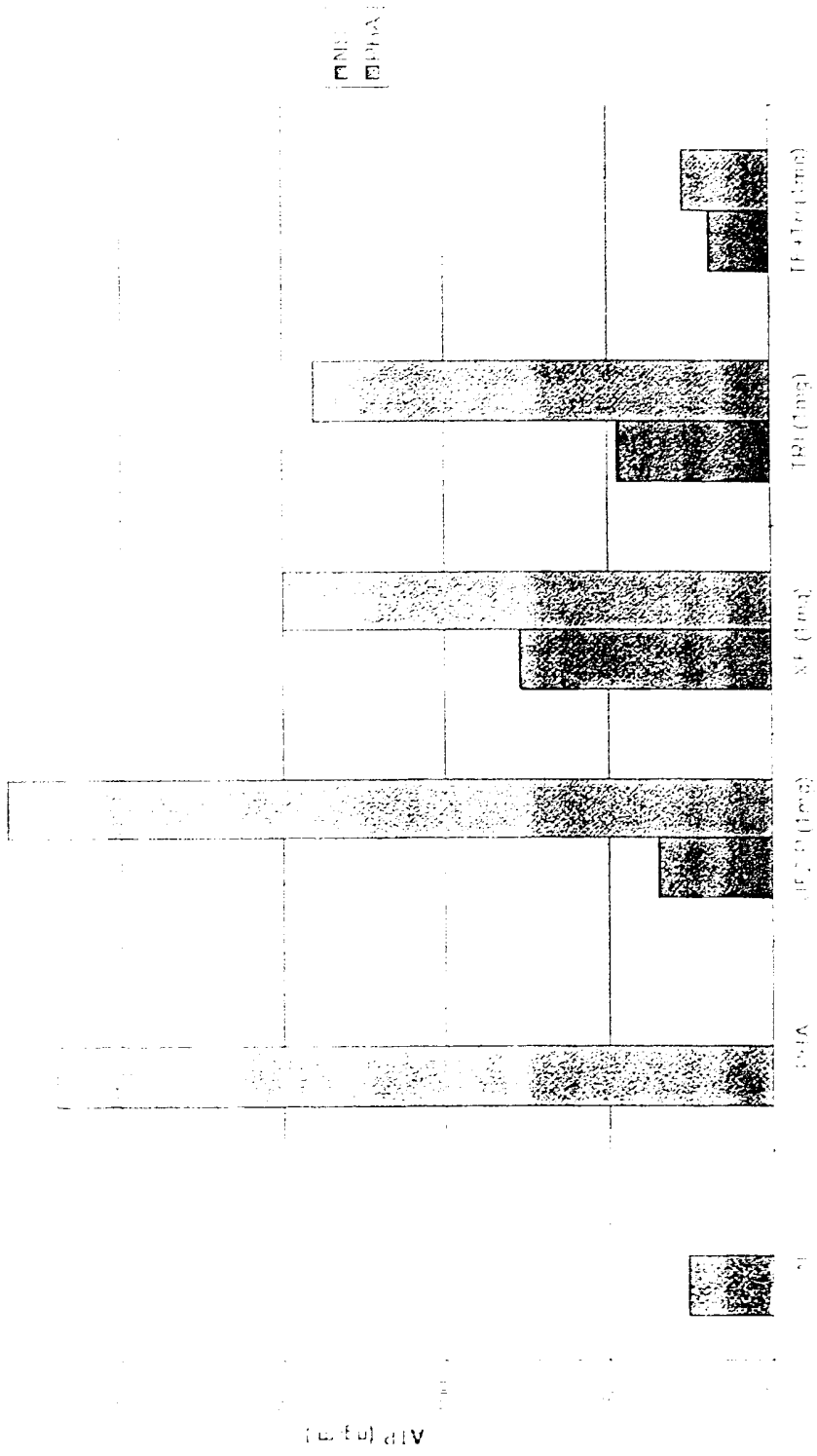
成 份	量 (每份，每份大小=一個膠囊)
組成物 A	150 mg
鋅 (以單甲硫胺酸形式)	5 mg
Cordyvant™ 專屬之多醣複合體	440 mg
IP-6 (六磷酸肌醇)	
大豆萃取物 (植物甾醇)	
多蟲夏草 (7%蟲草酸)	
β-葡聚糖 (來自焙用酵母) (釀酒酵母 ( <i>Saacharomyces cerevisiae</i> ))	
β-葡聚糖 (來自燕麥) (燕麥 ( <i>Avena sativa</i> ))	
姬松茸 ( <i>Agaricus blazeii</i> ) 萃取物	
甘露聚糖 (來自真蘆薈 ( <i>Aloe vera</i> )) (葉子)	
橄欖葉萃取物 (木犀欖 ( <i>Olea europaea</i> ))	
舞菇 (Maitake Mushroom) (灰樹花 ( <i>Grifola frondosa</i> )) (整個植物)	
冬菇 (Shiitake Mushroom) (香菇 ( <i>Lentinus edodes</i> )) (整個植物) (5:1 萃取物)	

本發明之組成物可以液體 (例如加入自 4Life Research, LC (Sandy, Utah) 購得之 RioVida® 飲料中)、粉劑 (其可包含其他成份以提供適宜之風味、溶解特性及其類似特性)、錠劑 (其另外包含其他成份，諸如黏合劑 (例如澱粉) 及其類似物)、凝膠劑 (其中可添加明膠或其他成份)

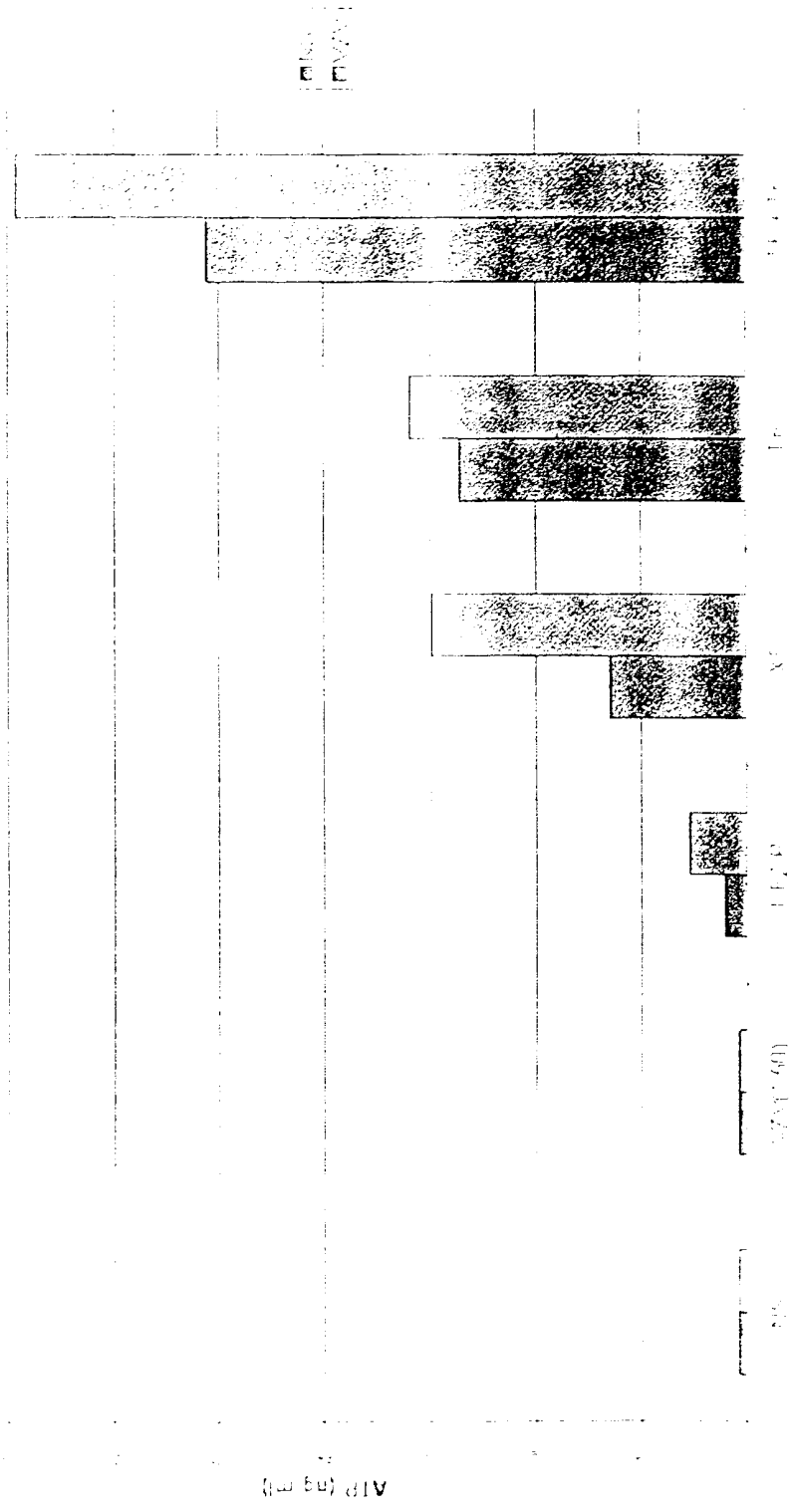
## 六、英文發明摘要：

Compositions that include extracts from sources of immune modulators that include nanofraction immune modulator molecules (*i.e.*, molecules having molecular weights of about 3,000 Da and less) are disclosed. These compositions may also include other immune modulators, such as transfer factor. Administration of compositions with extracts that include nanofraction immune modulator molecules modulates the cell-mediated immunity (*e.g.*, down-regulates undesired T cell activity) of a subject to which such compositions are administered. When administered with transfer factor, the combination of nanofraction immune modulator molecules and transfer factor down-regulates undesired T cell activity while increasing, or up-regulating, T cell activity against pathogens and other undesirable entities, such as cancer cells and other aberrant or mutated cells. Assays and assay techniques for evaluating the immune modulation capabilities of various substances are also disclosed.



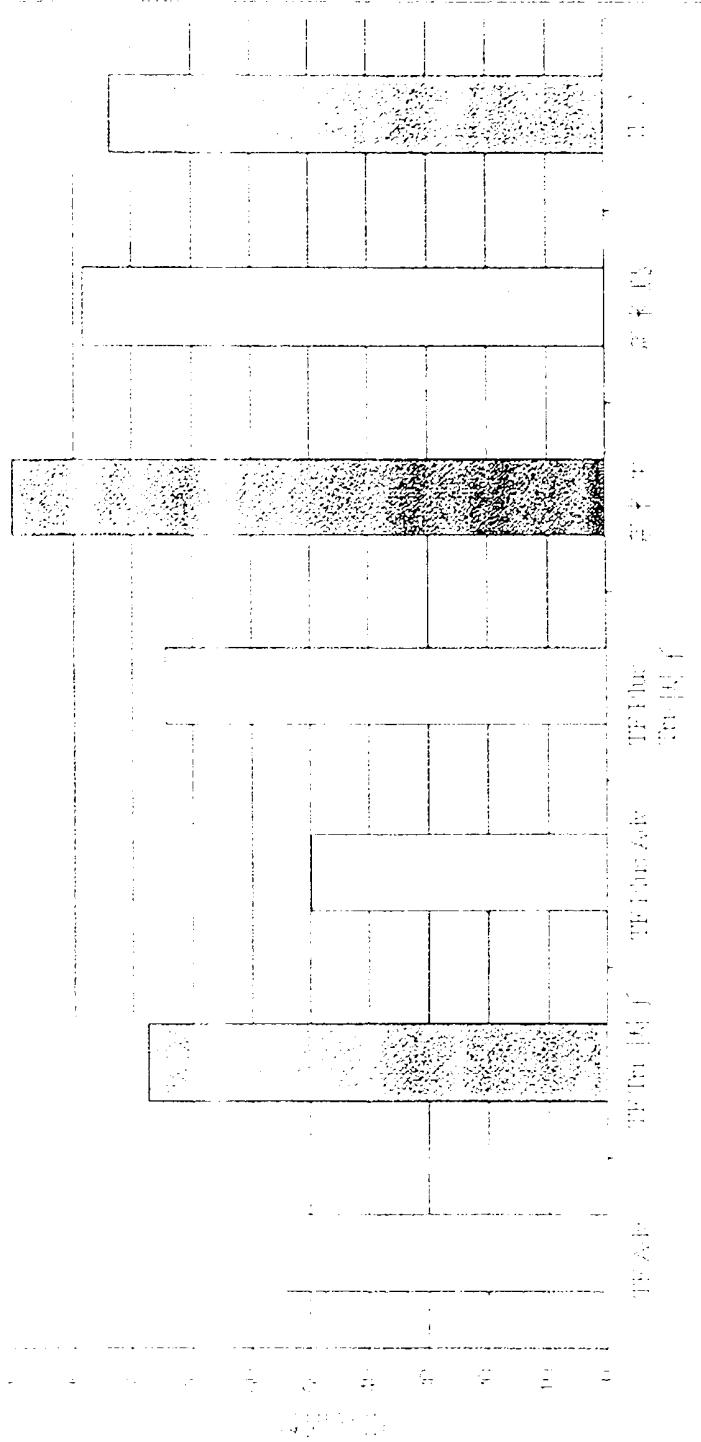


[2/2]



10/3

NUMBER OF



10/1



**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第(無)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

(無)

## 九、發明說明：

年	月	日	修(更)正	替換頁
99	3	12		

### 優先權聲明

本申請案主張於 2006 年 9 月 29 日提出申請之美國臨時申請案序號 60/848,348 及於 2007 年 9 月 14 日提出申請之美國專利申請案序號 11/855,944 的優先權，兩者的揭露內容茲以引用方式全文納入本文中。

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於調節（例如引發、增強、抑制非所欲的活動等等）個體中細胞媒介性免疫之分子，包含產生及獲得該等分子、包含該等分子之製備物及組成物，評估該等分子之有效性之方法及使用方法。更特定言之，本發明係關於在本文中稱為調節細胞調控免疫之「超微粒(nanofraction)」分子。

### 【先前技術】

抗體提供且轉移免疫性之能力為吾人所熟知且受到廣泛研究，抗體之特徵及抗體產生之機制亦同樣如此。

包含具有介於 3,500 Da 與 7,500 Da 之間之分子量的分子家族之轉移因子(Transfer Factor)於調節細胞或 T 細胞媒介性免疫性中所起之作用並不亦為吾人所熟知或並未受到廣泛研究。熟習相關技術者對於轉移因子之特徵及其於生物體免疫系統中之作用之瞭解已隨時間增加且繼續增加。

儘管進一步研究繼續闡明多種免疫系統組份之特性及

功能，但是可能存在大量不太瞭解或甚至忽視之分子，該等分子可能對免疫性產生、維持、輸送及轉移之方式以及對免疫性對壽命之作用具有影響。

### 【發明內容】

各種分子在調節細胞媒介性免疫中之有效性最近已以可計量方式進行表徵。可直接或間接調節細胞媒介性免疫之分子在此項技術中稱為「免疫調節物」。一類免疫調節物包括小型或低分子量超微粒（例如至多 3,000 Da，至多 3,500 Da，250 Da 至 2,000 Da，2,000 Da 至 4,000 Da）分子，其引發、增強、抑制或以其他方式調節細胞媒介之免疫反應。由於該等免疫調節物之相對較小之大小或分子量，其在本文中稱為「超微粒」免疫調節物及「超微粒」分子。

超微粒免疫調節物可自多種不同類型之動物來源獲得。來源動物之實例包括（但不限於），哺乳動物（例如牛）及鳥（例如雞）。在不限制本發明之範疇的情況下，超微粒免疫調節物可自哺乳動物產生之初乳或甚至乳汁獲得。如另一非限制性實施例，超微粒免疫調節物可自由鳥或任何其他類型之動物產生之卵獲得。初乳、卵及其他超微粒分子之來源在本文中總稱為「超微粒來源」。

由來源動物天然產生超微粒免疫調節物可藉由使來源動物暴露於比來源動物通常所暴露之一或多種抗原之量大的量或濃度的此類抗原來增強。舉例而言，若特殊類型之來源動物或甚至特定之來源動物在其典型環境中通常暴露

於某一量或濃度的給定抗原，則該來源動物中包含超微粒分子之免疫調節物之產生可藉由將該來源動物暴露於甚至更大量（例如濃度）該抗原（例如藉由疫苗接種來源動物，藉由將來源動物置於存在更大量或濃度之該抗原的環境中，等等）來增強。如另一實施例，若特殊類型之來源動物或甚至特定之來源動物典型地經給定抗原接種，則該來源動物中一或多種超微粒免疫調節物之產生可藉由增加該來源動物對抗原之暴露（例如藉由將來源動物暴露於增加濃度之抗原、更有效或較高毒性形式之抗原，等等）來增強，儘管超微粒分子本身並不視為具有抗原特異性。

可使用已知方法自存在於超微粒來源動物中之其他分子中部分地、大體上或完全地純化超微粒免疫調節物（其中該等分子自該超微粒來源動物獲得），且視情況使該等超微粒免疫調節物濃縮。該等方法包括（但不限於）機械分離、相分離（例如使水性組份與非水性組份互相分離）、沈澱、離心、過濾（包含微過濾，其中分子量截止（MWCO）在約 12,000 Da 降至約 4,000 Da 範圍內，及奈米過濾，其中 MWCO 低於約 4,000 Da）、透析、層析及電泳純化法。該等方法可個別地或以任何組合實施以產生存在一或多種類型免疫調節物之製備物。

在一態樣中，本發明包括至少部分純化、大體純化（例如至相關技術者所接受之程度）及完全純化之免疫調節物之製備物。另外，本發明包含包括有超微粒分子之組成物。除超微粒分子之外，該等組成物還可包含適用於支持或調

節個體之免疫系統之其他組份（例如轉移因子、抗體等等）以及可以其他方式有益於該個體之組份。

包含單獨或與其他免疫調節物一起使用或投予超微粒分子或包含其之組成物之方法亦處於本發明之範疇內。使用方法包含向個體（例如認為可因由超微粒分子提供之免疫調節受益的人類或任何類型之動物）投予一或多種類型之免疫調節物（例如呈未加工、部分純化、大體純化或完全純化形式，呈製備物、組成物形式等等）。向個體投予免疫調節物以使一個特定的、該所投予類型的免疫調節物在個體體內之含量（例如濃度）增加至高於對於個體而言正常之量的量。在不限制本發明之該態樣之範疇的情況下，個體可接受對於使個體之免疫系統引發細胞媒介性免疫反應而言臨床上有效之量的一或多種免疫調節物，或有效增強個體之細胞媒介性免疫反應之量的一或多種免疫調節物。

此外，評估免疫調節物之有效性之試驗及試驗方法處於本發明之範疇內。舉例而言，可使用 T 細胞免疫功能檢定評估潛在免疫調節物單獨或與其他分子（例如抗原、致裂物質（其誘發有絲分裂或細胞複製等等））結合調節參與細胞媒介性免疫之一或多種類型細胞（例如產生三磷酸腺苷（ATP））之活性的能力。

經由考慮隨後之描述及隨附申請專利範圍，其他特徵及優點對於熟習此項技術者將變得顯而易見。

4,000 Da 至 8,000 Da (包含 TF) 卵部分	NS	14	54	47	44
	經 PHA 刺激	388	354	230	158
	PHA 刺激下之降低%		8.8	40.7	59.3

該等資料展示，在細胞不暴露於 PHA 之未經刺激之試驗中，已知兩者皆含有轉移因子之 4,000 Da 至 8,000 Da 分子量部分中之每一者（來自初乳及卵），激發 CD4+白血球中的額外代謝活性。該等資料證實轉移因子上調細胞媒介性免疫之能力。

相反地，4,000 Da 至 8,000 Da 初乳及卵部分下調 PHA 激發 CD4+細胞中代謝活性之非特異性能力。因為 PHA 為人工非特異性刺激劑，參與細胞媒介性免疫之轉移因子對其活性之下調並不令人吃驚。咸信且先前研究已展示，轉移因子有助於平衡且甚至集中 T 細胞之免疫活性（例如藉由幫助細胞「記得」其主要目的，藉由降低自身免疫及相關病症，同時改善針對諸如微生物（細菌、病毒等等）感染個體軀體之不想要的實體之活性，等等。）。T 細胞對 PHA 刺激活性之下調似乎證實轉移因子在細胞媒介性免疫中之此作用。

類似結果見於數個不包含轉移因子之其他分子量部分，包含 250 Da 至 2,000 Da 初乳部分（上調與下調）、2,000 Da 至 4,000 Da 初乳部分（上調）及 2,000 Da 至 4,000 Da 卵部分（上調與下調）。8,000 Da 至 10,000 Da 初乳部分亦引起未經 PHA 刺激之 CD4+白血球中活性之上調及 CD4+

白血球中 PHA 刺激之代謝活性之下調。

該等資料確定除了轉移因子以外之免疫調節物存在於至少 250 Da 至 2,000 Da 初乳部分、2,000 Da 至 4,000 Da 初乳部分及 2,000 Da 至 4,000 Da 卵部分中。存在於該等部分之每一者中之「超微粒分子」的免疫調節能力已至少部分由闡述於實施例 3 中之實驗證實。

### 實施例 3

進行第二系列於展現 CD3 醣蛋白之健康個體白血球（亦即 CD3+細胞）中誘發之活性之檢定，其中已知包含所有包含所謂「T 記憶」細胞之 T 細胞。特定言之，使用 Cylex 之 T 細胞 Memory™ 檢定。Cylex 之 T 細胞 Memory™ 檢定之方案與闡述於實施例 2 中之方案極類似，其中包含以下例外：僅將包含 Concanavalin A (ConA) 替代 PHA 之 25 µl 刺激劑引入對照測試條之「刺激」孔中，同時將 25 µl 細胞巨大病毒 (CMV) 疫苗之 1:10 稀釋液添加至每一試驗條之「刺激」孔中（每孔稀釋度為 1:50）；將小鼠抗人類 CD3 抗體固定於磁性珠粒表面（按照附於 T-Cell Memory™ 試驗套組之說明）以製備 Dynabeads® 樣品純化珠粒；及在初始培育之前將 Dynabeads® 樣品純化珠粒添加至血樣、樣品稀釋劑、刺激劑（若存在）及樣品部分（若存在）中。

在 T-Cell Memory™ 檢定中，使用抗原替代致裂物質（例如 PHA）以便可評估 T 記憶細胞識別特定抗原之能力。自量測板之每一孔中發出之光的密度顯著較小，因為 T 記

樣 品		對照	10 µg	100 µg	1000 µg
2,000 Da 至 4,000 Da 卵部分	NS	12	26	61	108
	經 CMV 刺激	316	305	349	350
	CMV 刺激下之 增加%		-3.5	10.4	10.8
4,000 Da 至 8,000 Da (包含 TF) 卵部分	NS	12	34	39	108
	經 CMV 刺激	316	310	280	381
	CMV 刺激下之 增加%		-1.9	-11.4	20.6

自實施例 3 中所進行之試驗獲得之資料證明，在抗原（特異性刺激劑，與諸如 ConA 或 PHA 之非特異性致裂物質相對）存在下，3 個含非轉移因子之初乳部分使所測試之 T 記憶細胞對 CMV 之活性提高至相當於（10 µg 250 Da 至 2,000 Da 及 8,000 Da 至 12,000 Da 初乳部分之樣品）或超過（10 µg 及 100 µg 2,000 Da 至 4,000 Da 初乳部分之樣品）含轉移因子之 4,000 Da 至 8,000 Da 初乳部分之相當規模樣品增強所測試細胞在暴露於 CMV 時之活性的能力的程度。

#### 實施例 4

進行另一組檢定以判定超微粒免疫調節物分子（亦即 2,000 Da 至 4,000 Da 初乳部分之免疫調節物）或含轉移因子部分（亦即 4,000 Da 至 8,000 Da 初乳部分）是否可調節（例如增強）最近已暴露於高劑量之特定抗原之個體的免疫記憶。特定言之，自己暴露於引起全身感染之流行性



表 3 中所示之結果（其亦以圖表形式展示於圖 1 中）表明，當使最近已暴露於特定抗原之個體之 T 記憶細胞暴露於該抗原，尤其在超微粒分子或轉移因子存在下時，CD3+記憶 T 細胞之活性顯著增強。實際上，相對較少量之超微粒分子及轉移因子使得 T 記憶細胞活性增加約 20%。實際上，似乎 2,000 Da 至 4,000 Da 部分之免疫調節物在調節所測試細胞之活性中大致上與轉移因子及存在於 4,000 Da 至 8,000 Da 部分中之任何其他分子一樣有效。

實施例 1-4 之結果表明具有在 250 Da 至 2,000 Da、2,000 Da 至 4,000 Da 及 8,000 Da 至 12,000 Da 範圍內之分子量之免疫調節物有效調節多種類型 T 細胞之免疫活性。因此，藉由向個體投予該等免疫調節物或包含該等免疫調節物之製備物或組成物，可調節個體之細胞媒介性免疫。

基於該等結果，開發出（例如自（牛）初乳、（雞）卵等等）生產包含預定 MWCO 之分子之各種膳食增補劑之方法。舉例而言，且不限於，可將至少大粒子（例如初乳/乳固形物、蛋殼及膜等等）（例如藉由相分離、過濾法等等）已經移除之超微粒免疫調節物之來源的液體製備物加壓通過具有大小經確定以提供預定上限 MWCO 之孔的過濾器。作為非限制性實施例，可使用提供約 3,000 Da 分子量截止之過濾器。或者，可使用包含使用具有提供所需 MWCO 之孔之透析膜的透析法。使用該等方法提供包含轉移因子、抗體及分子量大於約 3,000 Da 之多種其他分子之較大分子經去除的「超微粒」。（例如生產初乳、雞及各種粉

狀組成物)。濾液(亦即已通過過濾器之液體部分)可隨後藉由已知技術(例如冷凍乾燥、噴霧乾燥、蒸發以形成更濃之液體、併入凝膠中等等)進一步加工。所得「超微粒產品」可隨後單獨或併入其他組成物中使用。

咸信藉由將超微粒分子即使以極少量包含於亦包含轉移因子之製備物(且其亦可包含獲得轉移因子之基線含量(亦即已存在於來源(例如初乳、卵等等)中之含量))中,所得組成物將下調不想要的 T 細胞活性(例如自身免疫及相關病症等等),同時改善或上調所需 T 細胞活性。開發出闡述於表 4 及表 5 中之超微粒及轉移因子組成物。

表 4

組成物 A

成 份	相對量(依重量)
牛初乳部分, 上限 MWCO 10,000 Da (噴霧乾燥)	68%
牛初乳部分, 上限 MWCO 3,000 Da (超微粒)(噴霧乾燥)	2%
雞蛋黃(噴霧乾燥)	30%

表 4 之組成物亦可稱為「免疫調節組份」。該「免疫調節組份」可基本上由諸如該等列於表 4 中之免疫調節物之來源(包含超微粒免疫調節物之來源)或免疫調節物來源之萃取物之組合組成,或其可包含其他成份。

同樣,結合本發明教示之組成物可基本上由諸如揭示

形式或以任何其他合適形式實施。應瞭解，為本發明之目的，用以製造本發明之組成物之該等具體實施例之額外成份，可為本發明之目的，認為對於該組成物僅為可選擇地及非必需成份，除非另外由隨附申請專利範圍要求。

#### 實施例 5

自己患有帶狀泡疹（水痘帶狀皰狀病毒（VZV）感染）症狀歷時約 4 週之個體收集血液。隨後使用 ImmuKnow™ 檢定以描述於實施例 2 中之方式檢定該血液，其中實施例 2 之樣品部分經以下各物替代：（a）不包含免疫調節物之對照；（b）已經噴霧乾燥之具有約 3,000 Da 之 MWCO 之初乳部分；（c）添加轉移因子 XF®，其目前自 4Life Research 購得且包含具有約 10,000 Da 之上限 MWCO 的牛初乳萃取物，；（d）表 4 中之組成物，其經標記為「組成物 A」；及（e）表 5 之組成物，其經標記為「組成物 B」。將（b）至（e）中之每一者於附於 ImmuKnow™ 檢定之樣品稀釋劑中復水，且在血樣及所有其他液體添加至每一孔中時，稀釋使每孔最終濃度為 1 mg/ml 之濃度。

該等檢定之結果闡述於下表中：

表 6

	對照	超微粒	TF XF	組成物 A	組成物 B
未經刺激 (NS)	26	35	77	47	19
經 PHA 刺激	220	234	150	140	27

該等結果亦呈現於圖 2 之圖表中。

重申該等結果係於一時間點（初始感染後約 4 週；亦即在恢復期期間）獲得，其中在不存在刺激之情況下，預期 T 輔助（CD4+）細胞活性降低，儘管大量 T 輔助細胞保留於個體之血液中。T 輔助細胞活性在不存在非特異性刺激劑 PHA 之情況下僅輕微地由超微粒、TF XF 及組成物 A 激發，且似乎不受組成物 B 激發。然而，PHA 對 T 輔助細胞之非特異性刺激受 TF XF 及組成物 A 顯著降低，且受組成物 B 降低至更大程度，可如如闡述於表 1 中之實施例 2 之結果所預期。

#### 實施例 6

在較早時間點（開始帶狀泡疹症狀後約一週），儘管 T 記憶細胞由於引起帶狀泡疹之 VZV 感染之局部性質（亦即 VZV 之相對較低血液力價）不以高濃度存在於個體之血液中，但預期其已識別 VZV 感染且易於受 VZV 抗原之存在刺激。因此，執行 T 細胞 Memory<sup>TM</sup> 檢定以確定超微粒、TF XF、組成物 A 及組成物 B 對於來自與實施例 5 中所測試之相同患者之血液之 T 記憶細胞的作用。按照闡述於實施例 3 中之方案，其中具有以下例外：使用已稀釋為 1:10 之 VZV 疫苗替代 CMV 疫苗（最終每孔稀釋度為 1:50）；且實施例 3 之樣品部分由實施例 5 中所用之對照及免疫調節物替代，其中每一種免疫調節物已稀釋至 100 µg/ml 之最終每孔濃度。

下表闡述該檢定之結果：

表 7

	對照	超微粒	TF XF	組成物 A	組成物 B
未經刺激(NS)	1	2	13	27	51
經 VZV 刺激	1	5	30	32	69
經 ConA 刺激	288				

該等資料亦以圖表形式描述於圖 3 中。

正如所預期，存在於 TF XF 中之轉移因子刺激 T 記憶細胞之活性。將少量額外超微粒分子添加至轉移因子中在有或無其他 VZV 刺激的情況下均顯著地增加 T 記憶細胞之活性。因此，實施例 5 及實施例 6 之結果證實，將額外超微粒分子即使以極少量添加至亦包含轉移因子之製備物中，將下調不想要的 T 細胞活性（例如自身免疫及相關病症等等），同時改善或上調所需 T 細胞活性。

#### 實施例 7

在另一研究中，對旨在確定各種組成物，包含闡述於表 4 及表 5 中之包含轉移因子及額外超微粒分子之組成物，刺激針對對於 NK 細胞敏感之人類紅血球母細胞白血病細胞株 K-562 之自然殺手（NK）細胞活性之能力的研究進行評估。因此，NK 細胞亦在本文中稱為「效應細胞」，而 K-562 細胞亦在本文中稱為「腫瘤細胞」且稱為「靶細胞」。特定言之，使用 MTT 檢定技術，其中黃色的溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎗（MTT）經活細胞之活性粒線體中之還原酶還原為紫色的甲臍(formazan)。恰在分析細胞毒性之前，添加將溶解甲臍之溶液（例如二甲亞砷、

於稀鹽酸 (HCl) 中之十二烷基硫酸鈉 (SDS) 等等) 至每一孔中。將用於量測每一孔中溶液所吸收之特定波長 (例如在約 500 nm 至約 600 nm 範圍內之波長) 之光之量的分光光度測定法隨後用於測定所檢定孔中相對於未添加試驗組成物之一或多個對照孔中活細胞數目之活細胞數目。

所評估之組成物包含：自 4Life Research 購得之轉移因子 Advanced<sup>TM</sup>；亦自 4Life Research 購得之轉移因子 Plus Advanced<sup>TM</sup>；包含轉移因子與增加量之超微粒分子二者之組成物 A；組成物 B，其包含轉移因子、增加量之超微粒分子及認為增強免疫系統活性之其他成份；來自牛初乳之超微粒分子；來自雞蛋之超微粒分子；及可以商標名 Proleukin 自荷蘭的 Chiron 購得之介白素-2 (IL-2)，已知其招募對抗癌細胞之 NK 細胞。

自 5 個健康供體獲得血液。使用已知方法將白血球與血液之其他組份分離。使用已知之密度梯度離心技術 (例如使用自 Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Missouri) 購得之 Histopaque<sup>®</sup> 密度梯度) 自其他類型白血球分離包含 NK 細胞之單核細胞。將單核細胞引入具有 10% 胎牛血清 (FCS) 之 RPMI 1640 生長培養基中。將相等體積之包含每 100  $\mu$ l 培養基中約 60,000 個白血球之濃度的該混合物引入標準 96 孔板之不同孔中。將以上所鑑別之含轉移因子及/或超微粒分子之組成物的各自具有 1 ml 無菌去離子水中 0.100 mg 粉劑之濃度的復水樣品各自添加至 3 個含有白血球及生長培養基之不同孔，總共十八個孔中。此外，將 1,000

IU/ml IL-2 引入 3 個含有單核細胞-生長培養基混合物之陽性對照孔中。3 個陰性對照孔僅包含單核細胞-生長培養基混合物而無免疫調節物。3 個僅效應細胞陰性對照孔亦僅包含單核細胞-生長培養基混合物，而 3 個僅靶細胞陰性對照孔僅包含 100  $\mu$ l 生長培養基。

使單核細胞在 5%CO<sub>2</sub> 存在下在 37°C 之溫度及 100% 之濕度下與其各別免疫調節組成物（除了 3 個陰性對照孔外）一起培育 48 小時。

培育之後，將約 30,000 個 K-562 細胞引入每一孔中，除了含有單核細胞及生長培養基之 3 個僅效應細胞陰性對照孔外。將 96 孔板及於其孔中之混合物在 5% CO<sub>2</sub> 存在下在 37°C 之溫度及 100% 之濕度下再次培育 48 小時。

根據已知標準技術製備濃度為每毫升 Henk's 生理食鹽水溶液具有 5 毫克 MTT 的 MTT 溶液。將二十微升（20  $\mu$ l）MTT 溶液引入 96 孔板之每一含單核細胞-生長培養基-腫瘤細胞之孔中。將該板及其孔中之內容物在 5% CO<sub>2</sub> 存在下在 37°C 之溫度及 100% 之濕度下再次培育，此次歷時約 4 小時。

在此最終培育之後，將 96 孔板在約 1,500 rpm 下離心約 5 分鐘。此後，將上清液（液體）自每一孔中移除，且將 150  $\mu$ l 二甲亞砜（DMSO）引入每一含單核細胞及腫瘤細胞之孔中。隨後使用分光光度計量測每一含細胞孔在 540 nm 波長下之光學密度。隨後使用下式，使用所量測之光學密度來確定當由每一測試物質活化時 NK 細胞之細胞毒性指數（%）（CI(%)）：

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

其中  $OD_{e+t}$  為對應於包含陽性對照之 IL-2 之所測試組成物的每一測試孔的光學密度， $OD_e$  為 3 個僅效應細胞陰性對照孔之平均光學密度，且  $OD_i$  為 3 個僅靶細胞陰性對照孔之平均光學密度。 $CI (\%)$  表示每一亦含有所測試免疫調節組成物之孔中由 NK 細胞殺死之靶細胞的百分比。結果呈現於下表中：

表 8

免疫調節組成物	CI (%)	相對活性
轉移因子 Advanced <sup>®</sup>	43.1	55
轉移因子 Plus Advanced <sup>™</sup>	38.5	49
組成物 A	60.3	77
組成物 B	57.9	74
超微粒分子，初乳	77.9	100
超微粒分子，卵	68.7	88
IL-2	77.0	84

亦描述於圖 4 之圖中之該等資料展示，包含尤其來自牛初乳之超微粒分子之組成物在引發對抗 K-562 腫瘤細胞之 NK 細胞活性方面大致上與 IL-2 一樣有效或比其更有效，而包含來自初乳及卵之轉移因子及來自初乳之超微粒分子之組成物（亦即組成物 A 及組成物 B）比缺乏超微粒分子之組成物更有效地活化 NK 細胞。

藉由將少至 2 重量%之超微粒分子再添加至包含轉移



因子之組成物中，超微粒分子可增強個體免疫系統之細胞媒介部分之非特異性組份（例如 NK 細胞）的作用，補充轉移因子引發個體免疫系統之細胞媒介部分之抗原特異性組份之活性的能力。

若一起考慮，則實施例 5 至實施例 7 之結果證明轉移因子調節且引發 T 輔助細胞，其使個體之免疫系統能夠更迅速且有效地對病原體及其他不想要的實體作出反應。此外，實施例 5 至實施例 7 說明轉移因子可增強 T 記憶細胞之活性。

實施例 5 至實施例 7 亦展示，將額外超微粒免疫調節物分子添加至包含轉移因子之組成物中可增強且提高轉移因子及現有包含轉移因子之組成物的免疫調節（例如 T 輔助細胞、T 記憶細胞及 NK 細胞之免疫調節）。

調節個體之細胞媒介性免疫之方法包含向該個體（例如口服、非口服等等）投予包含超微粒分子之組成物。該等超微粒分子可單獨或作為基本上由超微粒分子組成之組成物之部分投予，或其可與包含轉移因子之組成物（例如諸如闡述於表 4 或表 5 中之組成物）一起投予。投藥可為維持個體細胞媒介性免疫之總體平衡定期地進行，或其可回應感染、自體免疫病症、組織移植或影響（活化或抑制）個體細胞媒介性免疫之另一情況而加以實施。

威信基於生理學需要投予根據本發明之教示包含超微粒免疫調節物分子之組成物可調節細胞媒介性免疫活性。舉例而言，可降低不想要的細胞媒介性免疫活性（例如自

體免疫等等)。作為另一實施例，T細胞自個體之軀體移除不想要的病原體以及諸如癌細胞及其他異常或突變細胞之其他不想要的實體(例如藉由活化T輔助(CD4+)細胞，其轉而又活化自然殺手(NK)細胞，藉由使T記憶細胞能夠增強抗原特異性免疫等等)之能力尤其在將轉移因子與額外量之超微粒免疫調節物分子一起投予時亦可集中且增強。

儘管以上描述含有許多細節，但其不應視為限制本發明之範疇，而是僅作為提供某些本發明之較佳具體實施例之說明。類似地，可設計不背離本發明之精神或範疇之本發明之其他具體實施例。來自不同具體實施例之特徵可組合使用。因此，本發明之範疇僅由隨附申請專利範圍及其法定等效物而非由以上描述表明且限制。如本文中所揭示，由此涵蓋對本發明所作之處於申請專利範圍之意義及範疇內之所有添加、刪除及修改。

#### 【圖式簡單說明】

在圖式中，圖1至圖4為結合本發明之教示關於對組成物所執行之各種試驗之結果的圖解說明。

#### 【主要元件符號說明】

(無)

年 月 日修(東)正替換頁  
99. 3. 12

99年3月修正

## 五、中文發明摘要：

本發明揭示一種包含免疫調節物之來源之萃取物的組成物，該等免疫調節物包含超微粒免疫調節物分子（亦即具有約 3,000 Da 及低於 3,000 Da 分子量之分子）。該等組成物亦可包含諸如轉移因子之其他免疫調節物。投予具有包含超微粒免疫調節物分子之萃取物之組成物，調節該等組成物所投予之個體之細胞媒介性免疫（例如下調 (down-regulate) 不想要的 T 細胞活性）。當與轉移因子一起投予時，超微粒免疫調節物分子與轉移因子之組合，在增加或上調 T 細胞對抗諸如癌細胞及其他異常或突變細胞之病原體及其他不想要的實體之活性的同時，亦下調不想要的 T 細胞活性。亦揭示用於評估各種物質之免疫調節能力之檢定及檢定技術。

## 十、申請專利範圍

公告本
-----

103年4月30日 修正 補充
-----------------------

103年4月30日修正替換頁

1. 一種用於改善一個體之免疫功能的組成物，其包含具有 250 Da 至 2,000 Da 的分子量的牛初乳或雞蛋或雞蛋黃之萃取物。

2. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其包括：  
包含以下各物之免疫調節組份：

第一部分，其包含該具有 250 Da 至 2,000 Da 的分子量的牛初乳或雞蛋或雞蛋黃之萃取物；及

第二部分，其包含具有 10,000 Da 的上限分子量截止的牛初乳或雞蛋或雞蛋黃之萃取物。

3. 如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該第一部分為牛初乳之萃取物。

4. 如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該第二部分為牛初乳之萃取物。

5. 如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中該免疫調節組份進一步包括：包含雞蛋或雞蛋黃或雞蛋之萃取物的第三部分。

6. 如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中該第一部分構成該免疫調節組份之重量之至少約 2%。

7. 如申請專利範圍第 6 項之組成物，其中：

該第二部分構成該免疫調節組份之重量之約 68%；且

該第三部分構成該免疫調節組份之重量之約 30%。

8. 如申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項之組成物，其經調配以調節 T 記憶細胞、T 輔助細胞、及自然殺手細胞之至

少一者對抗病原體、癌細胞、及異常或突變細胞之活性。

9.如申請專利範圍第8項之組成物，其經調配以降低不想要的細胞媒介性免疫活性。

10.一種如申請專利範圍第1至9項中任一項之組成物之用途，其係用於製造供改善一個體之免疫功能的組成物之用的醫藥品。

## 十一、圖式：

如次頁。