

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99804100.9

[43] 公开日 2001 年 7 月 18 日

[11] 公开号 CN 1304312A

[22] 申请日 1999.1.14 [21] 申请号 99804100.9

[30] 优先权

[32] 1998.1.19 [33] US [31] 09/008,728

[86] 国际申请 PCT/US99/00749 1999.1.14

[87] 国际公布 WO99/36077 英 1999.7.22

[85] 进入国家阶段日期 2000.9.18

[71] 申请人 DCV 公司

地址 美国德拉华州

[72] 发明人 O·阿达尔斯坦森 M·J·达利
S·G·菲茨帕特里克-麦埃利戈特
H·C·格林布拉特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 周慧敏

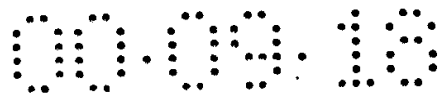
权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 治疗和预防关节炎和/或自身免疫疾病的
组合物与方法

[57] 摘要

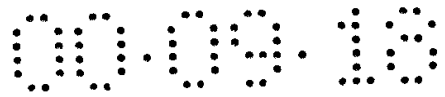
一种预防和治疗关节炎的天然组合物,该组合物包含有效量的蛋 或其部分。所述蛋得自己用至少一种抗原超免疫的产蛋动物。所述蛋 或其组分在预防和治疗自身免疫疾病方面也是有效的。还公开了通过 给予所述蛋或其部分来治疗和预防关节炎和/或自身免疫疾病的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 在受实验动物体内治疗和预防关节炎的组合物, 所述组合物包括得自禽的蛋或其部分, 所述禽已用抗原疫苗或基因疫苗超免疫过。
- 5 2. 权利要求 1 的组合物, 其中已用抗原疫苗超免疫了所述禽, 所述抗原疫苗包括至少一种选自细菌抗原、病毒抗原、原生动物抗原、真菌抗原和细胞抗原以及其混合物的抗原。
3. 权利要求 1 的组合物, 其中已用基因疫苗超免疫了所述禽, 所述基因疫苗包括至少一种抗原编码 DNA 构成物, 选自裸露的 DNA 片
10 段、质粒 DNA、病毒 DNA、细菌 DNA、DNA 表达文库、DNA-RNA 抗原、DNA-蛋白缀合物和 DNA-脂质体缀合物、以及其混合物。
4. 在患关节炎病或对关节炎敏感的受实验动物体中治疗和预防关节炎的方法, 所述方法包括给予所述受实验动物有效量的蛋制品。
5. 权利要求 4 的方法, 其中所述蛋制品得自已经用抗原疫苗或基
15 因疫苗超免疫的禽。
6. 权利要求 5 的方法, 其中所述抗原疫苗包括至少一种选自细菌抗原、病毒抗原、原生动物抗原、真菌抗原和细胞抗原以及其混合物的抗原。
7. 权利要求 5 的方法, 其中所述基因疫苗包括至少一种抗原编码
20 DNA 构成物, 选自裸露 DNA 片段、质粒 DNA、病毒 DNA、细菌 DNA、DNA 表达文库、DNA-RNA 抗原、DNA-蛋白缀合物和 DNA 脂质体缀合物、以及其混合物。
8. 权利要求 4 的方法, 其中所述蛋制品包括蛋或其部分。
9. 权利要求 8 的方法, 其中给予所述动物的蛋制品的每日有效量
25 相当于 0.25 至 100 个蛋。
10. 权利要求 4 的方法, 其中所述抗体经非肠道、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、鼻内、经口或局部给予。
11. 权利要求 4 的方法, 其中将所述蛋制品与药物联合给予所述



受实验动物，所述药物选自非类固醇消炎药和疾病调修抗关节炎药。

12. 权利要求 11 的方法，其中在给予所述蛋制品之前，给予所述受实验动物预定时间的一个方案的所述药。

13. 在实验动物体内治疗和预防自身免疫疾病的组合物，所述组
5 合物包括得自己已经用抗原疫苗或基因疫苗超免疫过的禽的蛋或其部分。

14. 权利要求 13 的组合物，其中已用抗原疫苗超免疫了所述禽，所述抗原疫苗包括至少一种选自细菌抗原、病毒抗原、原生动物抗原、真菌抗原和细胞抗原以及其混合物的抗原。

10 15. 权利要求 13 的组成物，其中已用基因疫苗超免疫了所述禽，所述基因疫苗包括至少一种抗原编码 DNA 构成物，选自裸露的 DNA 片段、质粒 DNA、病毒 DNA、细菌 DNA、DNA 表达文库、DNA-RNA 抗原、DNA-蛋白缀合物和 DNA 脂质体缀合物、以及其混合物。

16. 在患自身免疫疾病或对所述自身免疫疾病敏感的受实验动物
15 体中治疗所述自身免疫疾病的方法，所述方法包括给予所述受实验动物有效量的蛋制品。

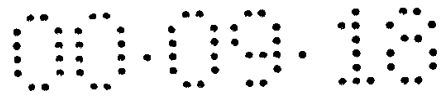
17. 权利要求 16 的方法，其中所述蛋制品得自己已经用抗原疫苗或基因疫苗超免疫过的禽。

18. 要求 17 的方法，其中所述抗原疫苗包括至少一种选自细菌抗
20 原、病毒抗原、原生动物抗原、真菌抗原和细胞抗原以及其混合物的抗原。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述基因疫苗包括至少一种抗原编
25 码 DNA 构成物，选自裸露 DNA 片段、质粒 DNA、病毒 DNA、细菌 DNA、DNA 表达文库、DNA-RNA 抗原、DNA-蛋白缀合物和 DNA 脂质体缀合物、以及其混合物。

20. 权利要求 16 的方法，其中所述蛋制品包括蛋或其组分。

21. 权利要求 20 的方法，其中给予所述动物的蛋制品的每日有效量相当于 0.25 至 100 个蛋。



22. 权利要求 16 的方法, 其中所述抗体经非肠道、皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内、鼻内、口服或局部给予。

23. 权利要求 16 的方法, 其中将所述蛋制品与药物联合给予所述受实验动物, 所述药物选自非类固醇消炎药和疾病调修抗关节炎药。

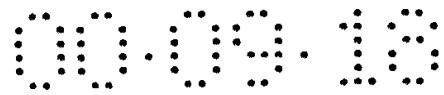
5 24. 权利要求 22 的方法, 其中在给予所述蛋制品之前, 给予所述受实验动物预定时间的一种制度的所述药。

25. 在受实验动物体中减少抗体以防止自身免疫疾病的组合物, 所述组合物包括有效量的、得自禽的蛋或其部分, 所述禽已用抗原疫苗或基因疫苗超免疫过。

10 26. 权利要求 25 的组合物, 其中所述禽已用包括至少一种抗原的抗原疫苗超免疫过, 所述抗原选自细菌抗原、病毒抗原、原生动植物抗原、真菌抗原和细胞抗原以及其混合物。

27. 权利要求 25 的组合物, 其中所述禽已用基因疫苗超免疫过, 所述基因疫苗包括至少一种抗原编码 DNA 构成物, 选自裸露的 DNA
15 片段、质粒 DNA、病毒 DNA、细菌 DNA、DNA 表达文库、DNA-RNA 抗原、DNA-蛋白缀合物和 DNA 脂质体缀合物、以及其混合物。

28. 权利要求 25 的组合物, 其中所述自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、青少年糖尿病、多发性硬化、格雷夫斯病、Meneri 病、重症肌无力、血斑狼疮、银屑病、全身性硬皮病、风湿热和斯耶格伦综合
20 征。



说明书

治疗和预防关节炎和/或自身免疫疾病的组合物与方法

5

发明领域

本发明涉及关节炎和自身免疫疾病的治疗与预防；更详细地说，本发明涉及一种天然食品和其在预防、抵抗(countering)或减少关节炎和/或自身免疫疾病方面的应用。

10

发明背景

关节炎

关节炎表现为各种各样的形式，一些较普通的形式包括类风湿性关节炎、骨关节炎和全身性风湿病。

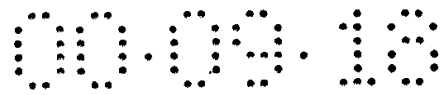
15

类风湿性关节炎是一种自身免疫疾病，其特征为关节疼痛、肿胀且僵硬。类风湿性关节炎是折磨大约 3% 美国人、且尤其是妇女的一种疾病。类风湿性关节炎是一种极其使人丧失工作能力的疾病，且通常侵袭年龄在 30 和 40 岁之间的成年人，而临床上发病最多的在年龄 40-60 岁的人群中间。虽然药物治疗有点效果，但是，多至 7% 的类风湿性关节炎患者在疾病发作后 5 年便快速地在某种程度上丧失工作能力，且在 10 年内，多至 50% 的患者丧失了能力而不能工作(*Medical Sciences Bulletin*, 1994 年 12 月)。

20

25

骨关节炎产生与类风湿性关节炎相似的症状。尤其是，虽然骨关节炎发作是关节软骨变性而类风湿性关节炎发作为滑膜的炎症，但当疾病发展时，每种变化过程向另一过程接近。在骨关节炎方面，由于软骨变性和关节的适合性被改变，因而反应性滑膜常常发展；相反，由于类风湿性关节炎侵蚀软骨，因而继发性骨关节炎改变在骨与软骨中的发展。在骨关节炎和类风湿性关节炎的末期，所涉及的两类关节均出现相同的病征。

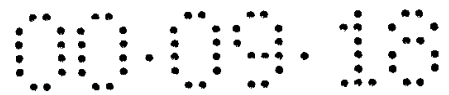


5 关节炎的其它一些形式包括关节强硬性血清阴性脊椎关节病(关节强硬性脊椎炎)和反应性关节炎。这些病症通常称为“与 B-27 相联系的疾病”，它们难以与类风湿性关节炎相区别。在一些病例中，关节强硬性脊椎炎、赖特综合征或银屑病性关节炎与 RA 同时存在于同一个病人的体内。在许多病例中，象那些进行性类风湿性关节炎患者一样，用同样的疾病调修药治疗这些病人。

10 关节炎的发作通常发生于 30 岁后的、对这种病敏感的那些人中；然而，某些形式的关节炎可由于不同的起因而发作，诸如慢病毒感染。由于有极大的症状重叠，因而许多医生把这些形式看作“全身性风湿病”，且以相同的方法进行这些病的治疗。一些属于该类别的疾病包括慢性疲劳综合症、纤维肌痛(纤维织炎)和痛风。事实上，对于某些病人，类风湿性关节炎和纤维肌痛重叠的证据正在积累。(Harris, Edward D.和 W. B. Saunders, *Rheumatoid Arthritis*, 1997)。

15 自身免疫疾病

20 如上所述，类风湿性关节炎是一种自身免疫疾病，因此它的病因学与其它任何一种自身免疫疾病的病因学几乎是同样的。通常，机体正常地识别它自己的副产物和外来的侵入物(列举几个，即细菌、病毒、真菌和原生动植物)之间的差异。当一个免疫细胞(T 或 B 淋巴细胞)在它的发育期间对“自体蛋白”反应时，该细胞被认为是有缺陷的并且常被破坏掉或被失活掉。然而，有时“自体反应”的免疫细胞能逃避破坏，在此之后的某一时间，该细胞可被活化并引起免疫应答。活化被认为发生于普通细菌或病毒感染之后，该细菌或病毒包含一种具有一段氨基酸序列的多肽，该多肽与有缺陷的“自体蛋白”上的一段
25 序列相匹配。几种细菌诸如链球菌属(*Streptococcus*)、支原体属(*Mycoplasma*)和包柔螺旋体属(*borrelia*)，以及某些病毒即逆转录病毒，和该病的发作有关。除 RA 之外，自体免疫常常导致象青少年糖尿病、多发性硬化、格雷夫斯病、Meneri 病、重症肌无力、红斑狼疮



和银屑病这样的疾病(*Medical Sciences Bulletin*, 1994年9月)。

5 几种神经学的疾病诸如小舞蹈病、慢性强迫观念与行为的疾病(OCD)、注意力不集中的过度反应症(ADHD)、Tourette综合征(TS)和精神分裂症的有些病例,可能具有自体免疫成分并可能与抗神经元抗体相联系(*Medical Sciences Bulletin*, Sept. 1994)。

10 目前,类风湿性关节炎,其它的关节炎以及其它自体免疫疾病的治疗为药物治疗。一般地,开始用“一线”药物治疗病人,该药物通常为非类固醇的消炎药(NSAID),它主要是缓解症状;在此之后用“二线”药物或疾病调修药(DMARD)治疗病人,所述药物诸如甲氨蝶呤、金化合物、青霉胺、柳氮磺胺吡啶和抗疟药。然而,以上的所有药物都有严重的副作用,特别是当以提高的剂量给药时。例如,阿司匹林可引起消化不良和胃痛,保泰松可引起胃溃疡以及非那西丁可导致肾病。甲氨蝶呤可引起口腔溃疡和胃肠的(GI)副作用。

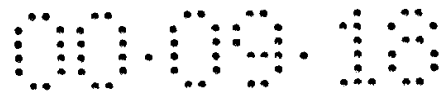
15 因此,尽管当前有很多药物可用于治疗各种各样形式的关节炎和自体免疫疾病,但能减轻以及防止这样的疾病发作、且没有副作用(引起)的并发症的一种简单而有效的疗法仍是需要的。

如果能得到有效治疗和预防这些疾病的天然食品,则将提供一种易于服药、容易得到且安全的治疗组合物。

20 相关的技术

25 美国专利第 4,357,272 号公开了从得自超免疫的母鸡的蛋黄中分离抗体。通过反复注射抗原而引起超免疫,所述抗原得自植物病毒、人的 IgG、破伤风抗毒素、蛇的抗蛇毒素(Snake antivenoms)和 Serameba。美国专利第 4,550,019 号公开了从蛋黄中分离抗体,该抗体是通过用免疫原超免疫母鸡而引起的,所用免疫原具有至少 30000 的分子量或微粒重量。用于超免疫鸡的抗原选自植物病毒、人的免疫球蛋白、破伤风毒素和蛇毒。

美国专利第 4,748,018 号公开了一种哺乳动物的被动免疫方法,



该方法包括非肠道给予得自禽蛋的纯化了的抗体，所述禽已用相应的抗原免疫过，并且其中该哺乳动物获得了对所述蛋的免疫力。

在美国专利第 5,215,746 号中，公开了在哺乳动物中提供抗动脉粥样硬化效应的蛋，该蛋来自用特定细菌抗原免疫过的鸡。

5 然而，这些参考文献中没有一篇公开或提出可将超免疫的蛋给予动物，以治疗关节炎和/或自身免疫疾病；也没有一篇这些参考文献中的文献公开或提出提供合情合理的预期的方法；所述预期为：对禽的超免疫能产生下具有如此性能蛋的禽。

10

发明概要

本发明基于本发明人的发现；该发现为：在得自超免疫禽的蛋和蛋制品里，且尤其是在蛋制品中有活性；当将其给予受实验动物，特别是受实验哺乳动物时，在受实验动物体内预防或减少关节炎和/或自身免疫疾病。

15

尤其是，本发明涉及治疗和预防关节炎和自身免疫疾病的组合物，该组合物包括得自己已经用抗原疫苗或基因疫苗超免疫过的禽的蛋制品。

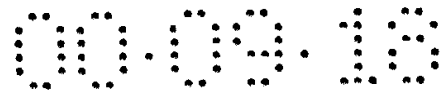
20

本发明也涉及治疗受实验动物体内至少一种下列疾病的方法，所述疾病为：关节炎和自身免疫疾病。该方法包括将有效量的蛋制品给予受实验动物。

本发明另外涉及一种方法，在该方法中，将所述蛋制品与一种药联合给予受实验动物，该药选自非类固醇的消炎药和疾病调修抗关节炎的药。

25

本发明最后涉及一种组合物，该组合物用于受实验动物中减少抗体，以防自身免疫疾病；该组合物包含有效量的得自禽的蛋制品，所述禽已用抗原疫苗或基因疫苗超免疫过。



发明详述

一般地，本发明涉及治疗和预防关节炎和自身免疫疾病的组合物与方法。该组合物最好是包含超免疫蛋或蛋制品的天然食品。当按本发明方法给予该食品时，不仅使由关节炎和自身免疫疾病引起的疼痛和其它症状减轻，而且能推迟、甚至防止这类疾病的发作。注射到禽体内以产生超免疫蛋制品的优选抗原混合物不包含已知引起关节炎或自身免疫疾病的特异性抗原。

因此，当将得自用混合的抗原疫苗免疫过的禽的蛋制品给予受实验者时，该蛋制品的给予对于减少关节炎和自身免疫疾病的症状是有效的，且有效地预防关节炎和自身免疫疾病；这是令人惊奇的。

定义：

下面的定义适用于全文。

术语“关节炎”意味着以结缔组织结构、特别是以关节和相关结构的发炎与变性为标志的各种各样疾病中的任何一种，它可伴随着疼痛、僵硬或上述发炎与变性部分运动的限制。关节炎的一些形式包括：类风湿性关节炎、骨关节炎、关节强硬性血清阴性脊椎关节病、反应性关节炎、慢性疲劳综合症、纤维肌痛(纤维织炎)和痛风。

术语“自身免疫疾病”是实用的标准医学定义，正如在诸如 Dorland 的和 Taber 的标准医学字典中所见到的。下面的疾病被认为是自身免疫疾病：类风湿性关节炎、青少年糖尿病、多发性硬化、格雷夫斯病、Mener 病、重症肌无力、红斑狼疮、银屑病、全身性硬皮病、风湿热和斯耶格伦综合征。

术语“超免疫”意味着暴露于一种或更多种的抗原之下以致免疫应答被提高、且保持在天然的未暴露的水平之上。

术语“蛋”或“蛋制品”分别意味着任何全蛋(食用的、超免疫的或其它的)或得自所述蛋的任何制品或部分。

术语“食用蛋”或“食用蛋制品”分别意味着得自不保持着超免

疫状态的产蛋动物的全蛋或得自上述“食用蛋”的任何制品或部分。

术语“超免疫蛋”或“超免疫蛋制品”分别意谓得自保持着超免疫状态的产蛋动物的全蛋或得自上述“超免疫蛋”的任何制品或部分。

5 术语“超常水平”意味着超过在不保持超免疫状态的产蛋动物的蛋中所发现水平的水平。

术语“结合衍生的抗原”是指通过组合合成(combinatorial synthesis)的方式在抗原中产生分子多样性的一种新方法。

10 术语“生物工程的抗原”是指通过基因克隆技术和基因重排的方法获得的抗原，所述方法允许插入编码核苷酸，该核苷酸能产生具有抗原性的分子。

术语“基因疫苗”是指可以引起免疫应答的核酸疫苗，该疫苗一般由重组技术产生。

15 术语“治疗”意味着疾病症状(包括疼痛)的发作和/或疾病的病源被推迟或完全被阻止；或者，如果症状存在的话，则改善或完全消除该症状。例如，超免疫蛋制品不仅通过压制人和其它哺乳动物体内该病的症状，而且通过作为预防剂在受者体内起抵抗该疾病出现的作用，来治疗关节炎和/或自身免疫疾病。

术语“预防”意味着疾病的进行被减少和/或消除；或者意味着消除疾病的发作。

20 术语“给予”意味着供给实验者物质的任何方式，包括经口、鼻内、非肠道(静脉内、肌内或皮下)、直肠或局部给予。

术语“动物”意味着动物界的定义。

术语“靶动物”是指起产所述蛋或蛋制品的动物作用的动物。

25 术语“受实验动物”是指给予由靶动物产生的所述蛋或蛋制品的动物。

本发明

本发明的制品和方法具体涉及天然食品——超免疫蛋在治疗和预

防自身免疫疾病和关节炎方面的应用。由于是天然的，因而这种食品能用于治疗 and 预防这样的疾病而不担心副作用，当然，只是在不能耐受蛋的那些人中有过敏性反应。

5 在一优选的实施方案中，本发明包括在受实验动物体内有效治疗和预防关节炎和/或自身免疫疾病的超免疫蛋或蛋制品。该超免疫蛋得自一产蛋动物，且更优选为禽，该禽已用至少一种抗原超免疫过。该超免疫蛋制品最好是经口给予受实验动物的蛋制品。该超免疫蛋或蛋制品可进一步分离成多种有效力的成分，它们随后可以以各种各样的形式给予受实验动物。

10 本发 明的超免疫蛋或蛋制品对治疗和预防所有形式的关节炎有效；包括但不限于：类风湿性关节炎、骨关节炎、关节强硬性血清阴性脊椎关节病、反应性关节炎、慢性疲劳综合症、纤维肌痛(纤维织炎)和痛风。本发 明的蛋制品在治疗自身免疫疾病方面同样有效，所述疾病其中诸如类风湿性关节炎、青少年糖尿病、多发性硬化、格雷夫斯病、Meneri 病、重症肌无力，细斑狼疮、银屑病、全身性硬皮病、风湿热和斯耶格伦综合征。

15

超免疫蛋制品

20 所述超免疫蛋制品可由任何产蛋动物产生。该动物最好是鸟纲中的一员，或换句话说，是一种禽。在鸟纲内，优选家禽，但鸟纲中的其它成员，诸如火鸡、鸭和鹅，也是合适的超免疫蛋制品源。

当例如依靠定期加强给与抗原而使这样的产蛋动物处于特定的免疫状态时，所述动物将产生当受实验者消费所述蛋时在治疗和预防关节炎和自身免疫疾病方面具有有益性能的蛋。

25 由于有了产生和保持超免疫状态所需要的知识，因而以下技术属于本领域技术人员的技术范围：依据所用产蛋动物的属和品种，来改变所用抗原的用量以保持动物处于超免疫状态，。

可以用超免疫产蛋动物的替代方式代替抗原疫苗；且所述方式包

括使用基因疫苗。尤其是，任何 DNA 构成物(通常由一启动子区和一抗原编码序列组成)都将引起免疫应答。基因疫苗包括：编码抗原的载体、裸露的 DNA 片段、质粒 DNA、DNA-RNA 抗原、DNA-蛋白质缀合物、DNA-脂质体缀合物物、DNA 表达文库、以及传递以产生免疫应答的病毒 DNA 和细菌 DNA。传递 DNA 的方法其中包括粒子轰击、直接注射、病毒载体、脂质体和喷射注射。当使用这些传递方法时，可能必需小得多的量，且通常导致更持久的抗原生产。当使用这样的基因操作时，将 DNA 导入禽的优选方法是通过将 DNA 肌肉注射入胸肌。

10

超免疫过程

下面的步骤说明是一优选方法的实例，用于使产蛋动物处于加强的免疫状态：

1. 选择一种或多种的抗原。
- 15 2. 通过初次免疫在产蛋动物中引起免疫应答。
3. 给予合适剂量的加强抗原疫苗以诱导及保持超免疫状态。

20

步骤 1：任何抗原或抗原的组合均可用作疫苗。所述抗原可以是产蛋动物的免疫系统能对其应答的细菌的、病毒的、原生动物的、真菌的、细胞的或任何其它的物质。该步骤中的关键点是所述抗原必须能在产蛋动物体内诱导出免疫和超免疫状态。虽然就本发明的方法而言，仅仅一单一的抗原就可以作为疫苗而起作用，但一种优选的疫苗是多价的细菌抗原和病毒抗原的混合物，所述抗原选自下面的抗原家族：肠杆菌和类细菌、肺炎球菌、假单胞菌、沙门菌、链球菌、芽孢杆菌、葡萄球菌、奈瑟氏菌、梭状芽胞杆菌、分枝杆菌、放线菌、衣原体和支原体；病毒抗原优选自下面的抗原家族：腺病毒、细小核糖核酸病毒和疱疹病毒，尽管其它的病毒抗原家族能起作用。

25

在另一个可供选择的实施方案中，使用称为系列 100 (S-100)的多

价疫苗。在实施例 1 的表 1 中列举了 S-100 疫苗中所包括的细菌。先前已在美国专利第 5,106,618 号和第 5,215,746 号中描述了这种疫苗，上述两专利已转让 Stolle Research and Development Corporation。供使用的另一优选疫苗是 EB-100E 疫苗，其详情也描述于实施例 1 中。

5

步骤 2：该疫苗可或者是灭活的或者是减活的疫苗；并可以用引起免疫应答的任何方法给予该疫苗。最好是通过肌肉注射给予抗原而完成免疫，优选用于注射的肌肉在禽中为胸肌。优选的剂量为 0.05-5 毫克抗原疫苗。可以使用的其它给予方法包括静脉内注射、腹膜内注射、皮内、直肠栓剂、气雾剂或经口给予。当把 DNA 技术用于超免疫过程时，需要少得多的量，通常为 1-100 微克。

10

可用免疫学领域技术人员已知的许多方法来确定是否该疫苗已在产蛋动物体内引起了免疫应答。这些方法的实例包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、针对刺激抗原的抗体存在的试验以及设计来评价来自宿主的免疫细胞对抗原反应能力的试验。诱导免疫应答必需的最小抗原剂量取决于所用的接种程序，既包括所用佐剂的类型和抗原的配方，又包括用作宿主的产蛋动物的类型。

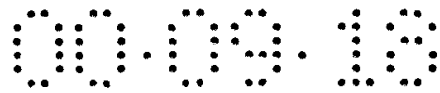
15

步骤 3：最好通过以固定的时间间隔重复地加强给予合适剂量，诱导及保持靶动物的超免疫状态。该时间间隔优选为在 6-12 个月的期间内 2-8 周的时间间隔。然而，加强给予不导致免疫耐受性是必需的。这样的方法在本领域是众所周知的。

20

使用其它保持超免疫的方法或方法的组合是可能的；例如，诸如初次免疫采用肌肉注射，且通过静脉内注射进行加强注射。另外的方法包括同时给予微胶囊包裹的抗原和液体抗原；或者初次免疫用肌肉注射，且通过口服或由微胶囊包裹的方式非肠道给予来进行加强给药。几种初次免疫和超免疫的组合是本领域技术人员已知的。

25



加工和给药

一旦产蛋动物被充分地超免疫，最好就收集来自这些动物的蛋，并加工生产超免疫蛋制品；随后，可将超免疫蛋制品给予受实验者。

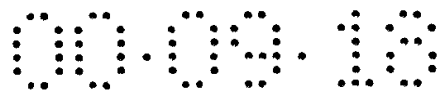
5 通过治疗或预防受实验动物关节炎和/或自身免疫疾病的任何方法，将本发明的蛋和/或蛋制品给予受实验动物者。最好是通过直接饲喂该蛋或该蛋的任何衍生物来进行给药。蛋和蛋黄是天然的食物成分，并且无毒又安全。

10 在另一可供选择的实施方案中，将所述蛋结合到一营养添加物中。用于制备待掺入营养添加物中的蛋的一种优选方法涉及将蛋干燥成蛋粉。虽然各种各样用于干燥蛋的方法是已知的，但优选的方法是喷雾干燥。喷雾干燥蛋的方法是本领域众所周知的。

15 可以以例如蛋白粉、营造体力(power building)饮料、蛋白添加物和任何其它有营养的、与运动员相关的制品的形式，将该干燥的蛋粉加入饮料中。另外，该蛋粉可用于烘烤的调制食品(bake mix)、体力条(power bar)、糖果、家常小甜饼等等。加工蛋的其它实例包括：制做煎蛋卷、煮软的蛋或煮硬的蛋、烤蛋；或者如果希望的话，可生吃该蛋或可将该蛋加工成全蛋液(liquid egg)。

20 最后，所述蛋黄和/或蛋白部分包含引起上面观察到的和提到的有益性能的一种或多种因子通常是本领域已知的；本领域普通技术人员能清楚地认识到进一步的分离能提供更有效力的成分或消除不合需要的组分；并且能考虑到给予的其它方式诸如非肠道、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、鼻内、经口或局部给予蛋制品。这样的进一步分离将提供制造具有所述蛋或其部分的包胶囊的制品和药用组合物的能力。

25 当超免疫蛋制品用于治疗 and 预防疾病时，不管该疾病是一种形式的关节炎还是自身免疫疾病，给予受实验者治疗和预防特定的疾病免疫学上有效量的超免疫蛋制品。治疗的持续时间和强度将取决于特定的健康病征、是否有病征、且如果有，该病征在受实验者体内的进展。以治疗和/或预防该病征和该病症症状的任何量提供该超免疫蛋制



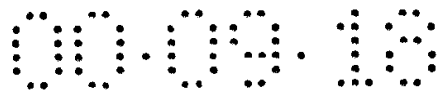
品；例如，在一些情况下，范围从少于一个到几个超免疫全蛋(或包含等量物的超免疫蛋制品，该等量物为少于一个到几个超免疫全蛋)的每日用量，可依所述病征的特定情况将其给予受实验者。用本领域熟知的方法可从几百个蛋中分离并浓缩出更有效力的部分。

5 在一个实施方案中，发现本发明的蛋制品在治疗大鼠的类风湿性关节炎方面是有效的，该大鼠为用胶原诱发关节炎的动物模型(参见实施例 2)。这种动物模型被本领域技术人员公认为与人的类风湿性关节炎效果相应的模型。除了治疗关节炎外，已确定当在诱发关节炎之前给予大鼠该种蛋制品时，该蛋制品推迟且在有些情况下阻止关节炎症状的发作；因而，本发明的蛋制品不仅在治疗所述疾病的症状方面有效，而且有效地推迟和/或阻止疾病的发作或进行。

10 在另一个可供选择的实施方案中，在人中试验了该蛋制品，并在患上上述症状的几个人中显示出治疗不同类型关节炎的正效应，(见实施例 2A-2C)。用所述蛋制品治疗的人除了显示出通常的肿胀和僵硬减少外，还显示出临床上象疼痛这样症状的减少。

15 对自身免疫疾病表示出的一个效应是在这种疾病模型中 II 型胶原抗体令人惊奇地被本发明的蛋制品减少，这也在大鼠中观察到(参见实施例 3)。预期本发明的蛋制品在减少涉及其它自身免疫疾病的抗体方面是有效的，所述自身免疫疾病其中诸如青少年糖尿病、多发性硬化、格雷夫斯病、麦乃丽氏病(Meneri's disease)、重症肌无力、红斑狼疮、银屑病、全身性硬皮病、风湿热和斯耶格伦综合征。

20 正如在发明背景中所描述的，为了减轻关节炎病的症状，目前用非类固醇消炎药(NSAID)和/或缓和疾病抗关节炎药(DMARD)治疗患有关节炎的病人。正如在实施例中所表明的(见实施例 4)，将本发明的蛋制品给予病人并同时进行目前的药物治疗。该蛋制品与药物治疗起协同作用，以减少特定疾病的症状。因此，给予该蛋制品可与另外的关节炎和自身免疫疾病的治疗同时进行，以产生更好的协同作用效应。



另外，正如本领域众所周知的，NSAID 和 DMARD 能引起严重的胃肠损害。已转让给 DCV 公司的美国专利申请序列号 08/688,576 公开了超免疫蛋制品对治疗 NSAID 诱发的胃肠损害有效；因此，对于受实验者正在服用或准备服用 NSAID 治疗关节炎病的状况，设想了一个替代的实施方案。在这种情况下，也可将本发明的蛋制品药给予受实验者，不仅用来治疗关节炎病，而且保护胃肠系统使其免受 NSAID 诱发的损害。在这样的治疗中，较低剂量的超免疫蛋可能是足够的。同样，为了使胃肠系统有更好的准备，在患该病的受实验动物开始它的 NSAID 和 DMARD 制度之前，可将蛋制品给予该患病的受实验动物。

本发明的蛋制品已显示出安全、无毒、适合于长期使用，且除了对蛋过敏性的人外，无副作用；指出这些非常重要。该蛋制品或者可单独口服，或者可与治疗药物联合口服，以长期用于关节炎病和自身免疫疾病。

通过了解下面阐明本发明的实施例可注意到本发明的有利特性。

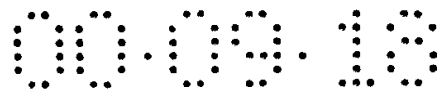
实施例

实施例 1

S-100 疫苗的制备

用 15 ml 培养基重建包含下面表 1 所示范围的细菌的细菌培养物并于 37 °C 培养过夜，所述细菌得自美国典型培养物保藏中心。一旦获得好的生长物，则用大约一半的该细菌悬液接种一升液体培养基，并于 37 °C 培养该接种物。

在培养物中看得见好的生长物后，通过将细菌悬液离心 20 分钟，以除去培养基，从而收获细菌细胞；将得到的细菌沉淀重悬浮于无菌盐水溶液中，并将该细菌样品离心三次，从细胞上洗去培养基。在第三次无菌盐水洗涤后，在少量的双蒸水中重悬浮该细菌沉淀。



通过将该细菌悬液置于玻璃烧瓶里于 80 °C 水浴中过夜，来灭活无培养基的该细菌悬液。用少量灭活的细菌进行肉汤培养物的生存性试验；于 37 °C 将肉汤培养物培养 5 天并每天检查生长，以证明所述的多种细菌已被灭活。

- 5 将灭活的细菌冻至干燥，然后将所述的干细菌与无菌盐水溶液混合以达到每毫升盐水中含有 2.2×10^8 个细菌细胞的浓度(660 nm 的光密度读数为 1.0)。在下面表 1 中列举了包含于 S-100 疫苗中的细菌。

表 1

S-100 细菌目录

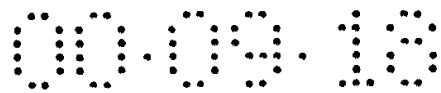
10

大肠杆菌	大肠杆菌(气杆菌属)
肺炎克雷伯杆菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	<i>Salmonella dysenteriae</i>
肠炎沙门氏菌(<i>Salmonella enteritidis</i>)	<i>Salmonella epidermis</i>
<i>Salmonella simulans</i>	化脓链球菌(<i>Streptococcus pyogenes</i>) 1 型
化脓链球菌 3 型	化脓链球菌 5 型
化脓链球菌 8 型	化脓链球菌 12 型
化脓链球菌 14 型	化脓链球菌 18 型
化脓链球菌 22 型	普通假单胞菌(<i>Pseudomonas vulgaris</i>)
无乳链球菌(<i>Streptococcus agalactiae</i>)	缓症链球菌(<i>Streptococcus mitis</i>)
突变链球菌(<i>Streptococcus mutans</i>)	唾液链球菌(<i>Streptococcus salivarius</i>)
血链球菌(<i>Streptococcus sanguis</i>)	肺炎链球菌(<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
痤疮丙酸杆菌(<i>Propionibacterium acnes</i>)	流感嗜血杆菌(<i>Haemophilus influenza</i>)

EB-100E 疫苗

15

已知 EB-100E 疫苗商业名为 Scourmune®-CRT，它由 Schering-Plough Animal Health, of Kenilworth, New Jersey, USA 制造。该疫苗由 C 型产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、大肠杆菌、猪轮状病毒和传染性胃肠炎组成。



超免疫蛋制品的免疫方法

5 如上所述地制备病原体的灭活制剂。对于最初的接种，用弗氏完全佐剂和细菌混合，并将 5.6 mg 细菌物质注射到鸡的胸肌中。对于其余的疫苗，用弗氏不完全佐剂和细菌制剂相混合，并在六个月以二周的间隔注射到鸡体内。

10 收集由超免疫的鸡所下的蛋，然后喷雾干燥成蛋粉形式。在喷雾干燥过程期间，入口温度不超过华氏 320 度，按照产出粉末的最终含水量在 3.0%至 4.0%的范围来保持排气温度，且保持泵压力大约 2500 至 4000 P.S.I.。使用从华氏 100 度至 160 度的较低温度范围，且在干燥过程中监测样品的含水量，以获得具有所需稠度度的最终制品。

实施例 2

在大鼠的胶原诱发的关节炎模型中超免疫蛋制品的抗关节炎特性

15 胶原诱发的关节炎是类风湿性关节炎和自身免疫疾病的一种实验动物模型，自从 1977 年以来它已被科学调查者仔细研究过(Trentham 等 1977)。类风湿性关节炎是一典型的自身免疫疾病，在该病方面已报道了患者体内对胶原免疫应答的提高(Stuart 等 1983)。自从开始发现胶原诱发关节炎的动物模型以来，该动物模型已表示出许多与人的类风湿性关节炎类似的特征。例如，1982 年 Stuart 等已证实，在关节炎大鼠的关节所观察到的几种组织学变化与在患类风湿关节炎病人体内所观察到的对应的变化相类似。小鼠和大鼠的关节炎通常通过用异原 II 型胶原免疫而诱发，该胶原起始一个把关节组织作为目标的、联合的体液和细胞免疫应答。现行的各种疗法是不足的，或者有限制其长期使用的副作用。

25 本实施例着眼于在用胶原 II 诱发关节炎之前和期间，使大鼠口服本发明的蛋制品的效果。当与对照组相比时，按照剂量依赖方式检查对关节炎发生的抑制。

将重量在 100-125 克的 30 只雌性 Sprague-Dawley 鼠 VAF+

(Charles Rivers, Wilmington, MA)随机分成3组(10只动物/组),该实验重复三次,以致于最终每种处理制度的组各包括30只大鼠,供这项研究的大鼠总数为90只。关于经口的管饲法,稀释喷雾干燥的超免疫蛋制品(如实施例1中所述)。每隔一天配制10%和0.2%的用于于口管饲法的蛋制品溶液,于4℃贮藏第二天的溶液直到使用。在II型胶原于大鼠体内诱发关节炎发作前7天和诱发后14天,将蛋制品(3.5 ml各个溶液)经过口管饲法喂入大鼠体中。

诱发和评价大鼠关节炎的方法是按照1977年Trentham等的方法。简言之,通过在较低背部皮内接种以1 mg/ml溶解于0.1 M乙酸且用IFA(23)以1:1的比例乳化的、用400胃蛋白酶处理过的天然II型鸡胶原(CII)(Genzyme, Boston, MA),免疫Sprague-Dawley大鼠。使用的三组为:水管饲法(对照)组;50倍超免疫蛋制品(高剂量)组(3.5 ml 10%的超免疫蛋制品溶液);以及1倍超免疫蛋制品(低剂量)组(3.5 ml 0.2%的超免疫蛋制品溶液);每组各用10只大鼠。在皮内胶原II免疫之后第10天和此后每天直至第21天,以大鼠每肢体的爪关节周的红斑(0-4+)和爪肿胀(0-4+)而临床上地评价(盲法)所述大鼠。

所述组的关节炎指数(AI)是基于关节炎的发生程度和关节炎的严重、得自平均AI的爪评分之和。在第21天,处死所有的大鼠且将所有的大鼠放血。评价血清针对II型胶原的抗体效价,用酶联免疫测定(ELISA)测定针对II型胶原的特异抗体的效价(Trentham等,1983)。然后用过量metafane处死所述动物。

结果

给予蛋制品导致以依赖剂量方式的抗关节炎性能,所述高剂量的蛋制品导致最有效地降低关节炎症状的发生率和严重程度(表1)。表1中的评分表明:用高剂量的蛋制品减少肿胀关节的数目和降低该病的严重程度。此外,在注射胶原II后,低剂量蛋制品和高剂量蛋制品都导致关节炎病发作的推迟(表2)。

表 1

在胶原诱发关节炎的动物模型中的蛋制品

组别

	对照	低剂量	高剂量
实验 1	80%*	78%	57%^
实验 2	80%	100%	63%
实验 3	90%	80%	66%

*关节炎的发生率

^这种控制的水平在历史上和类固醇、

NSAIDS、甲氨蝶呤/米诺环素的一样。

5

表 2

关节炎最大发生率的平均天数

	对照	低剂量	高剂量
实验 1	14	19	20*
实验 2	14	18	17
实验 3	12	15	15

*在用胶原 II 免疫后，推迟最大量的关节炎的发作。

10

在第 21 天，与对照组相比，反映关节炎严重性和程度的关节炎指数在接受高剂量超免疫蛋制品的动物中显著减小(2.46 ± 0.55 对 4.167 ± 0.5 ; $p \geq 0.003$, Student t-测验)。低剂量蛋制品的效果与对照的没有显著不同。另外，与对照相比，在高剂量组中，关节炎的发生被显著抑制(54%对 83%; $p \leq 0.03$)。(表 1)用高剂量超免疫蛋制品看到的关节炎发生百分率的这种降低和报道的类固醇、NSAIDS (非类固醇消炎药)、甲氨蝶呤以及米诺环素的这种降低一样好。

15

本实施例 2 也显示：与不接受蛋的动物相比，在诱发关节炎前给予的高剂量蛋制品在更多的动物中防止关节炎的发展。这些结果显示于下面图 1 中。

图 1

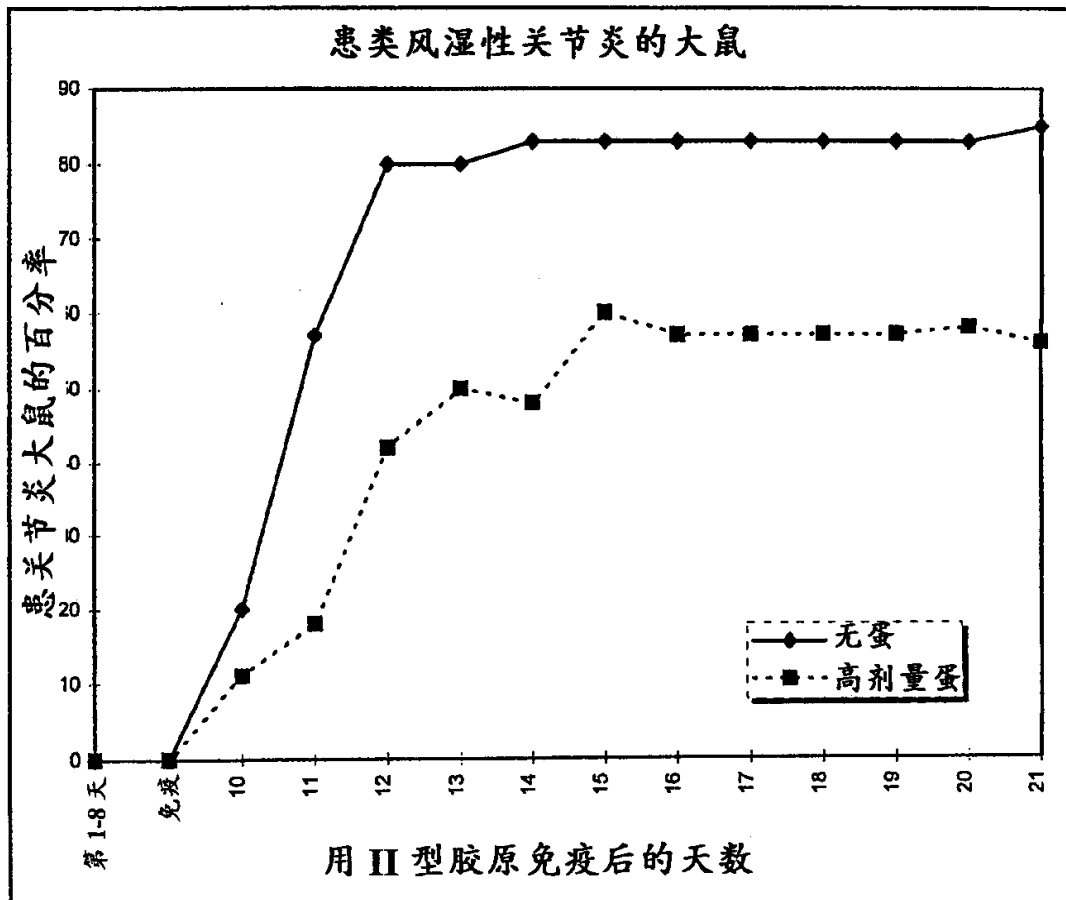
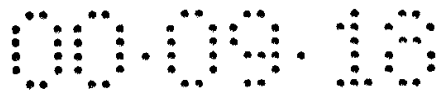


图 1 显示用高剂量的蛋制品预防关节炎。当与未接受蛋的对照动物相比时，用管饲法经口喂蛋制品的动物发生关节炎症状的百分率较低。用管饲法经口喂动物 21 天，7 天在免疫(诱发关节炎)之前，且 14 天在免疫之后。

结论

所述数据清楚地显示在 II 型胶原诱发的大鼠关节炎模型中，所述蛋制品以依赖剂量的方式在大鼠体中的明确的抗关节炎效应。在接受高剂量超免疫蛋制品的动物中观察到有统计学意义的关节炎发生的减少、关节炎发作的延迟以及关节炎严重程度的减弱。本数据显示出高剂量所述蛋制品在关节炎发生方面的预防效应。最重要的在于高剂量和低剂量的超免疫蛋制品都是无毒的。



实施例 3

胶原 II 抗体的减少

5 在第 21 天, 将来自实施例 2 的大鼠放血, 并收集血清样品。用标准的 ELISA 测定来测定对胶原 II 的自身免疫抗体的效价。这些结果显示当与对照相比时, 喂了高剂量蛋制品或者低剂量蛋制品的动物显著降低针对胶原 II 的抗体效价(表 3)。

表 3	对照	低剂量	高剂量
对胶原 II 的抗体效价(-log ₂)	9.3±0.03	8.5±0.28	8.3±0.36
统计学显著性	---	p≤0.004	p≤0.005

10 当与蛋制品对照动物(无蛋制品)相比时, 在用管饲法喂了蛋制品的动物血清中对胶原 II 的自身免疫抗体效价的减少是非常显著的。因为所有组的动物都接受相同水平的胶原 II 来诱导对胶原 II 的抗体, 所以接受蛋制品的组在第 21 天能有较低的胶原 II 抗体的效价是出乎意外的。对胶原 II 的抗体效价的这种减少表明: 超免疫蛋制品在细胞免疫应答和体液免疫应答方面都有积极的影响。

15

实施例 4

蛋制品在关节炎病人身上的效果

20 得到一种营养饮料添加物, 它包括一种高蛋白、包含推荐的每日允许量维生素的 30% 的高碳水化合物粉以及大约 4.5 克超免疫蛋粉(约等于 0.4 个蛋)。该饮料添加物由 Wilmington, DE 的 DCV 公司提供。

三个病人在二个月的期间里服用营养饮料添加物; 根据对每个病人的临床状况的估计和详细的临床检查而评价的关于对该制品临床反应耐受性的临床评价, 于研究之前, 在一个月、二个月以及三个月(停止该制品后一个月)进行。进行临床化学、血液学和尿分析的分布图, 25 这些病人中每个人的治疗结果描述于下。

实施例 4A

1 号病人

1 号病人是一位 29 岁的女性，高 5 呎 3 吋(5'3")，体重 170 磅，先前具有类风湿性关节炎(青少年)史。在第一次检查的时候，该病人描述有手指、腕、脚趾、脚和膝的关节疼痛、肿胀和触痛。她抱怨机能上的限制，所述诸如不能弯膝或跑，且她难于跪着。她的血液学化验结果有正常红细胞沉降率(ESR)和 C-反应蛋白(CRP)读数。病人的胆固醇数值为 199 mg/dl。当时正用 300 mg/周的米诺环素、Loestrin Fe 1.5/30 对她进行治疗，并用多种维生素。诊断为类风湿性关节炎加上葡萄膜炎。在每天的基础上消费该营养饮料添加物一个月后，该病人的手红肿减少，且她脚的疼痛和肿胀消失。病人报告，她感觉“较少疼痛”且“感到 75%有所好转”。她汇报她已增加了活力。她的 ESR 和 CRP 读数保持正常，但她的胆固醇下降到 186 mg/dl。病人继续她的连同基于蛋的饮料的药疗法。

在第二个月期间，该病人感到她的手的病情更重，且她介绍：手指与腕有肿胀；并且报告在夜间手麻。她的腿感觉“更好”。医生的综合评价是病人的病情略微加重。当手提购物袋或在开箱时，她还经历痛苦。她的 ESR 和 CRP 读数保持正常且她的胆固醇保持在 189 mg/dl。她继续药疗法，且正如该方案安排的，停止该制品的使用。

在不用该制品一个月后，肿胀和触痛回到了手和脚。她的功能上的限制保持她第一次描述的那样，病人还感到 75%“有所好转”。她的 ESR 和 CPR 读数保持正常，尽管她的胆固醇降到了 180 mg/dl。

从该病人自己的对症状的评价来确定关节炎症状的评分。具体地说，要求该病人表明关节的肿胀，疼痛和/或触痛的数量。基于这个病人的估价，产生数字，显示该症状的程度。所述数字的范围从 36 的高点(肿胀、疼痛和触痛的最大量)到 0 的低点(无肿胀、疼痛或触痛)。

对 1 号病人的关节炎病症而产生的评分如下：

在介绍时=	14
靠基于蛋的饮料一个月=	2
靠基于蛋的饮料二个月=	6
中止饮饮料后一个月=	8

实施例 4B

2 号病人

2 号病人是一位 88 岁的女性，5 呎 3 吋高(5'3")，体重 104 磅，
 5 先前具有类风湿性关节炎史和慢性鼻窦炎史。她描述在下肢和肩膀有
 疼痛。体检显示她的手指和踝肿胀、疼痛和触痛。在功能上，她仅能
 用一种局限的方式行走且在弯曲她的手臂方面有困难。她的血液学化
 验结果表明升高的 ESR (36 mm/hr)、CRP (1.64 mg/dl)且总胆固醇数
 10 值为 220 mg/dl。当时她正用下列药物治疗，所述药物为：5 mg/周的
 甲氨蝶呤、Orudis KT 2/天、1500 mg 钙、Fosomas 10 mg、强的松 5
 mg q2d (每隔一天)，且她服用多种维生素。

该病人除了服基于蛋的饮料外，还继续服用这些药物。

15 在开始基于蛋的饮料一个月后，她仍抱怨手肿胀、膝痛且不能睡
 觉。该病人报告：她感到“50%有所好转”，“感觉一般更好”且“行
 走更好”；虽然她的疼痛的侵袭次数减少，但她仍疼痛。血液学结果
 是 ESR (30 mm/hr)与 CRP (1.64 mg/dl)，且观察到胆固醇增加到 232
 mg/dl。

20 在消费该制品二个月后，病人报告“她感到 98%有所好转”，然
 而她的功能限制保持原样。血液学结果表明她的 ESR 下降(21 mm/hr)
 且 CRP 回到正常的读数，(<0.5 mg/dl)，她的总胆固醇保持在 234
 mg/dl。病人继续她的药疗法，但正如安排的，停止服用基于蛋的饮料。

在停止该制品一个月后，病人抱怨在她的手指和腿出现严重的关
 节疼痛，并显示了腕肿胀，她感到她“病情加重 50%”。她的 ESR 水
 平(27 mm/hr)和胆固醇(257 mg/dl)开始爬升，但她的 CRP (<0.5 mg/dl)

水平保持正常。

从该病人自己对症状的评价来确定关节炎症状的评分。具体地说，要求该病人表明关节的肿胀、疼痛和/或触痛的数量。基于这个病人的估价，产生数字，显示症状的程度。所述数字的范围从36的高点(肿胀、疼痛和触痛的最大量)到0的低点(无肿胀、疼痛或触痛)。

对2号病人的关节炎病症而产生的评分如下：

在介绍时=	10
靠基于蛋的饮料一个月=	7
靠基于蛋的饮料二个月=	2
中止饮饮料后一个月=	10

实施例 4C

3号病人

3号病人是一位79岁的男性，5呎10吋高(5'10")，体重152磅，有骨关节炎史和动脉粥样硬化性心血管病史。症状是背的下部、肩膀、膝和脚疼痛。药物包括：Nitroderm patch、地高辛0.125、80 mg阿司匹林以及20 mg吡罗昔康。功能限制为：手臂移动困难且筋疲力尽。血液学结果是：正常的ESR和CRP且胆固醇读数为217 mg/dl。

在喝该蛋制品和上面提到的药物一个月后，该病人感到“轻微地有所好转(10-20%)”。他还汇报左边和右边肩膀疼痛，并报告他步行不稳且经历着其右膝的弯曲。功能上的限制仍如先前报告的。他的ESR和CRP读数是正常的，且他的胆固醇水平为180 mg/dl。

在消费该制品二个月后，病人继续感到“轻微地有所好转”。症状包括右膝疼痛和行走困难。没得到胆固醇读数，但ESR和CRP保持在正常水平。

在不用该制品一个月后，病人总的说来感到轻微地好转，但比先前的一个月微微病重了一些。症状包括左腿弯曲、肩痛及背的下部疼痛。关节评价表明肩疼且背的下部痛。功能限制为手臂移动困难且感

到“筋疲力尽”。ESR 和 CRP 读数是正常的且胆固醇保持在 180 mg/dl。

5 从该病人自己对症状的评价来确定关节炎症状的评分。尤其是，要求该病人表明关节肿胀、疼痛和/或触痛的数量。基于这个病人的估价，产生数字，显示该症状的程度。所述数字范围从 36 的高点(肿胀、疼痛和触痛的最大量)到 0 的低点(无肿胀、疼痛或触痛)。

对 3 号病人的关节炎病症而产生的评分如下：

在介绍时=	11.5
靠基于蛋的饮料一个月=	2
靠基于蛋的饮料二个月=	3
中止饮饮料后一个月=	8.5

其它病例史显示了相似的改善，并证实在消除关节炎关节的疼痛和炎症方面本发明有效而无副作用。

10 具体地参考了某些优选的实施方案，由此描述了本发明；但在如上描述和在所附权利要求书中所定义的本发明的精神和范围内可实现变化和修改将是不讲自明的。