

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A01N 37/18 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03811104.7

[43] 公开日 2006年3月8日

[11] 公开号 CN 1744818A

[22] 申请日 2003.5.16 [21] 申请号 03811104.7

[30] 优先权

[32] 2002.5.16 [33] US [31] 60/381,570

[32] 2003.5.15 [33] US [31] 10/439,162

[86] 国际申请 PCT/US2003/015532 2003.5.16

[87] 国际公布 WO2004/029198 英 2004.4.8

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.16

[71] 申请人 阿基昂生命科学有限责任公司

地址 美国德拉华州

[72] 发明人 S·耶尔 R·邢

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 2 页

[54] 发明名称

免疫 T - 细胞刺激

[57] 摘要

本发明涉及刺激或增强动物中的免疫 T - 细胞的新方法。特别的,本发明涉及来源于采用一种或多种免疫原超免疫的鸟类的卵,更特别是小于 3000 道尔顿的卵级分。动物对有效量的超免疫卵或其级分的摄入可导致动物中整个 T - 细胞类群的显著增加。

1. 通过对所述动物给药有效量的卵产物来刺激动物中的免疫 T-细胞的方法。
2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述卵产物包括来源于鸟类的卵或卵级分, 其中所述的鸟类采用至少一种免疫原进行超免疫。
3. 如权利要求 2 所述的方法, 其中所述的免疫原选自:
模仿葡萄球菌; 表皮葡萄球菌; 脓链球菌; 大肠埃希氏菌; 肠沙门氏菌; 铜绿假单胞菌; 肺炎克雷伯氏菌; 鼠伤寒沙门氏菌; 流感嗜血菌; 缓症链球菌; 普通变性菌; 痢疾志贺氏菌; 肺炎双球菌; 疮疱棒杆菌; 血链球菌; 唾液链球菌; 变异链球菌; 无乳链球菌。
4. 如权利要求 1 所述的方法, 其中卵产物经口服给药。
5. 如权利要求 1 所述的方法, 其中卵产物包括全卵的级分。
6. 如权利要求 5 所述的方法, 其中所述的级分包括大小约是或小于 3000 道尔顿的级分。
7. 如权利要求 6 所述的方法, 其中卵产物的有效量在约 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 2000 mg/mL 的范围内。
8. 如权利要求 7 所述的方法, 其中卵产物的有效量在约 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内。
9. 如权利要求 8 所述的方法, 其中卵产物的有效量在约 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内。
10. 如权利要求 1 所述的方法, 其中鸟类包括驯养的家禽。
11. 通过对所述动物给药有效量的卵产物来增强动物中的免疫 T-细胞的方法。
12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中所述卵产物包括来源于鸟类的卵或卵级分, 其中所述的鸟类采用至少一种免疫原进行超免疫。
13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中所述的免疫原选自:
模仿葡萄球菌; 表皮葡萄球菌; 脓链球菌; 大肠埃希氏菌; 肠沙门氏菌; 铜绿假单胞菌; 肺炎克雷伯氏菌; 鼠伤寒沙门氏菌; 流感嗜血菌; 缓症链球菌; 普通变性菌; 痢疾志贺氏菌; 肺炎双球菌; 疮疱棒杆菌; 血链球菌; 唾液链球菌; 变异链球菌; 无乳链球菌。
14. 如权利要求 11 所述的方法, 其中卵产物经口服给药。
15. 如权利要求 11 所述的方法, 其中卵产物包括全卵的级分。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中所述的级分包括大小约是或小于 3000 道尔顿的级分。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其中卵产物的有效量在约 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 2000 mg/mL 的范围内。

5 18. 如权利要求 17 所述的方法，其中卵产物的有效量在约 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中卵产物的有效量在约 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内。

20. 如权利要求 11 所述的方法，其中鸟类包括驯养的家禽。

10

免疫 T-细胞刺激

相关申请

- 5 本申请要求 2002 年 5 月 16 日递交的美国临时申请 No. 60/381570 的优先权。

发明领域

- 10 本发明涉及通过天然产生的组合物来刺激或增强受体动物中的免疫 T-细胞活性的方法。更特别的，本发明涉及来自超免疫鸟类的卵或其级分的给药，从而可刺激或增强动物中免疫 T-细胞的活性。

发明背景

- 15 T-细胞的刺激和增强对免疫应答的产生、成熟 T-细胞的存活和胸腺细胞的发育具有重要作用。它是消灭被微生物感染的细胞的特异性获得性免疫系统的一重要组成部分。它同时也构成了宿主自身识别能力的基础。T-细胞对其自身识别能力经过了阳性和阴性选择，其中 MHCp 复合体没有被完全活化，从而阻止了针对宿主组织的免疫应答。

- 20 T-细胞的刺激可增加细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 群体，其中 CTL 具有裂解靶细胞的能力，是 T 淋巴细胞的一种重要的效应物活性。人 T-细胞刺激是一种获得对自体固有肿瘤细胞具有细胞毒性的 T-细胞类群的有效方法。这同样可增加涉及人 B 淋巴细胞活化和免疫球蛋白产生的辅助 T 淋巴细胞的量。

- 25 原始 T-细胞的抗原特异性免疫应答涉及一系列非常复杂的协同事件。该活化包括 T-细胞的分化、增殖和效应物功能。共同支配该分化过程的各种参数已被确定，例如，抗原呈递途径和剂量、微环境、抗原呈递细胞 (APC) 和抗原的特性。免疫 T 细胞活化的最初关键事件是由 T 细胞上的特异性 T 细胞受体 (TCR) 与同 APC 上的 MHC 分子结合的抗原性肽相互作用引起的。这些事件对于细胞因子如 IL-2 的产生以及
30 细胞因子受体的表达是至关重要的。这又将决定 T 细胞增殖的程度和持续时间。由活化 T-细胞对 IL-2 生产的调节是 T 细胞活化调节的重要特征之一。

鸟纲的各种属, 例如小鸡 (*gallus domesticus*)、火鸡、和鸭, 能在血液和卵中产生抗能导致鸟类疾病的免疫原的, 和抗其他免疫原的抗体。例如, LeBacqVerheyden 等 (*Immunology* 27: 683 (1974)) 和 Leslie, G. A. 等 (*J. Med.* 130: 1337 (1969)) 已对小鸡的免疫球蛋白进行了定量分析。Polson 等 (*Immunological Communications* 9: 495-514 (1980)) 对母鸡进行免疫使其抗许多蛋白质和蛋白质的天然混合物, 并在其卵黄中检测到 IgY 抗体。Fertel 等 (*Biochemical and Biophysical Research Communications* 102: 1028: 1033 (1981)) 免疫母鸡使其能抗前列腺素, 并在其卵黄中检测到抗体。

10 Jensenius 等 (*Journal of Immunological Methods* 46: 63-68 (1981)) 提供了一种分离卵黄 IgG 用于免疫诊断应用的方法。Polson 等 (*Immunological Communications* 9: 475-493 (1980)) 描述了从被各种植物病毒免疫的母鸡卵黄中分离的抗体。

目前已开发出超免疫的卵, 并被证实其可超量产生抗体和一些生物因子。对于这类进展的一些例子如下:

美国专利 No. 4, 357, 272 中公开了从来源于超免疫母鸡的卵黄中分离抗体的技术方案。所述的抗体应答是通过反复注射来源于植物病毒、人 IgG、破伤风抗毒素、蛇抗蛇毒素和 *Serameba* 的免疫原引起的。

美国专利 No. 4, 550, 019 中公开了从采用具有至少 30,000 的分子量或粒子重量的免疫原进行超免疫的母鸡的抗体产生的蛋黄中分离抗体的技术方案。用于超免疫鸡的免疫原选自: 植物病毒、人免疫球蛋白、破伤风毒素、和蛇毒液。

美国专利 No. 4, 748, 018 中公开了被动免疫哺乳动物的方法, 其包括胃肠外给药来源于已经用相应抗原免疫的鸟类的卵的纯化的抗体, 并且所述哺乳动物获得了对上述卵的免疫性。

美国专利 No. 5, 772, 999 公开了通过对受体给药超免疫的卵和/或乳或其级分来预防、抑制或降低受体中的慢性肠胃病症或非甾类消炎药导致的 (NSAID-导致的) 肠胃损伤的方法。

美国专利 No. 6, 420, 337 公开了分离自超免疫卵的新的细胞因子活化因子 (CAF), 其能上调一些促炎细胞因子, 包括 $TNF\alpha$, IL-6 和 IL-1 β , 并能下调 TGF β 。

但是这些参考文献中没有一篇公开或启发了当将所述卵或其级分

给药至动物，具有刺激或增强所述动物中的免疫 T-细胞活性的能力。这些参考文献中也没有公开或启发了这样一种提供了合理的预期的方法，其中采用非特异性疫苗超免疫鸟类可诱导鸟类产下具有这种当给药至受体动物时的能力的卵。

5

发明简述

本发明的目的是提供通过对所述动物给药有效量的卵产物来刺激动物中免疫 T-细胞产生的方法。

本发明的进一步的目的是提供通过对所述动物给药有效量的卵产物来增加动物中免疫 T-细胞产生的方法。

10

附图简述

图 1 为一曲线图，其描述了与超免疫卵的小于 3000 道尔顿的级分一起培养的各种时间阶段的 Jurkat 细胞的刺激指数。

15

图 2 为一曲线图，其描述了与超免疫卵的小于 3000 道尔顿的级分一起培养的各种时间阶段的 Daudi 细胞的刺激指数。

发明详述

本发明采用新的途径来刺激或增强动物中的免疫 T-细胞的活性。本发明包括来源于经一种或多种免疫原超免疫的鸟类的卵或其级分。动物对有效量的超免疫卵或其级分的摄入可导致所述动物中 T-细胞类群的显著刺激。

20

本发明中的卵产物是具有特别吸引力的产品，因为它是完全天然的，并且，其本身可经给药来刺激或增强动物中的 T 细胞活性，而无需担心许多目前采用的免疫刺激产物通常伴随的副作用。很明显，对卵有变应性或具有对卵的耐受性的动物不能摄入一些给药形式中的超免疫蛋产物。

25

发明人相信，上述有益特性（即 T 细胞刺激和增强）是由于经超免疫过程引发或增强的一些免疫因子造成的。这些免疫因子不被认为是抗体，因为如实施例所述，超免疫卵的大小小于 3000 道尔顿的级分比全卵本身在刺激和增强免疫 T-细胞活性方面更有效。很明显，小于 3000 道尔顿大小的级分不含抗体。因此，发明人认为这些因子代替了

30

某些免疫调节因子类型，有效诱导了免疫应答的细胞臂，导致了免疫T-细胞的刺激。

定义

5 术语“卵”或“全卵”均表示任何的完整的卵，无论是食用卵还是超免疫卵或其他的卵。

术语“卵产物”或“其级分”分别表示来源于卵的任何产物或级分。

10 术语“食用卵”或“食用卵产物”或“其级分”分别表示完整的卵，或其来源的任何产物或级分，这些均来源于保持在非超免疫状态的产卵动物。

术语“超免疫卵”或“超免疫卵产物”或“其级分”分别表示完整的卵，或其来源的任何产物或级分，这些均来源于保持在超免疫状态的产卵动物。

15 术语“免疫原”是指能诱导体液抗体和/或细胞介导的免疫应答并能与其产生的产物，如抗体，发生反应的物质。

术语“免疫调节因子”是指除了抗体以外的能影响免疫系统的物质。

20 术语“组合来源的免疫原”是指通过组合合成的方式在免疫原间产生分子多样性的新方法。

术语“生物工程免疫原”是指通过允许可产生具有免疫原性的表位的编码核苷酸的插入的基因克隆技术和遗传操作的方法所获得的免疫原。

25 术语“基因疫苗”是指通常通过重组技术生产的并可引起免疫应答的核酸疫苗。

术语“给药”是指对个体给予物质的任何的方法，其包括口服的、鼻内的、眼内的、胃肠外的（静脉内的、肌内的、或皮下的）、直肠的或局部的给药。

术语“动物”表示动物界的定义。

30 术语“目标动物”是指具有产卵或产卵产物功能的动物。

术语“受体动物”是指对其给药由目标动物产生的卵或卵产物的动物。

“T-细胞”或“T-淋巴细胞”是指在胸腺中成熟的，并在免疫应答中具有重要作用的一类淋巴细胞。其分为许多的亚类：杀伤 T-细胞负责杀死受病毒感染的细胞；辅助 T-细胞诱导其他的细胞（B-淋巴细胞）产生抗体。

5

超免疫卵产物的制备

应当牢记：超免疫处理既可以在鸟类中进行，从而其卵可含有超免疫处理获得的有效成分；也可以在牛中进行，从而其乳可含有超免疫处理获得的有效成分。虽然已构思了相同的技术方案也适用于牛的超免疫同时可收集其超免疫乳，但如下说明仅限于鸟类的超免疫。

10

所述的超免疫卵产物可通过任何的产卵动物来生产。优选所述动物选自鸟纲，或者换句话说，是一种鸟类。在鸟纲中，优选驯养的家禽，但是本纲中的其他物种，例如火鸡、鸭子和鹅也是超免疫卵产物的合适来源。

15

所述的超免疫卵产物以喷雾干燥的卵粉末提供，其来源于采用了一组人肠道病原体进行疫苗接种的产卵母鸡（参见实施例 1）。可以认为任何的免疫原或免疫原集合可用于本发明的超免疫过程。喷雾干燥经巴氏灭菌的卵液的过程可将卵中的抗体和免疫调节因子的损伤最小化，从而获得一种具有高营养值、并能对可能的肠道感染产生被动保护从而显示出可降低炎症的能力的产物。抗体，作为一类群，对常规酶的降解具有特别的抗性，并且经口服摄入消化后，重要的级分可完整和具有活性的通过肠道途径。许多研究报道，口服摄入消化的抗体能针对特定的肠道病原产生防护保护。

20

此外，当使这种产卵动物通过如下途径，例如抗原周期性的加强免疫，处于特定的免疫状态时，该动物将产下具有刺激受体动物 T-细胞增加的有益特性的卵，当所述卵被受体动物摄入时。

25

在已知发展和保持超免疫状态的必要条件方面的知识的情况下，本领域的熟练技术人员知晓可根据所采用的产卵动物的种属来调整给药的免疫原量，从而使动物保持于超免疫状态。

30

优选的通过任何免疫原或免疫原的组合来产生超免疫状态。优选的通过多次暴露于多重免疫原、多次暴露于单一免疫原、或单次暴露于免疫原库来实现超免疫。

除了通过天然存在的免疫原来进行免疫之外，也可通过组合化学过程合成得到的免疫原来实现免疫。其基本策略是集合多种化学结构基团的组合从而产生具有多样性的分子集合。近来，发展了许多方法用于低聚物 (Fodor, S. 等, Science 251: 767 (1991); Houghton, R. 等, Nature 354: 82 (1991)) 以及小的有机分子库 (Bunin, B. & Ellman, J., J. Am. Chem. Soc. 114: 10997 (1992)) 的固相和液相组合合成。快速的多种肽和低聚物合成可作为组合衍生免疫原的来源。此外，可选的策略将允许有机结构基团以组合的方式添加至主链分子上从而提高免疫原性。

10 超免疫卵生产动物的另一模型可用于替代免疫原性疫苗，包括基因疫苗的应用。特别的，任何 DNA 构建体（通常包括一启动子区域和一免疫原编码序列）均可引发免疫应答。基因疫苗包括免疫原编码载体、裸露的 DNA 片段、质粒 DNA、DNA-RNA 抗原、DNA-蛋白结合体、DNA-脂质体结合体、DNA 表达文库、和导入的用于产生免疫应答的病毒和细菌 DNA。DNA 导入的方法包括粒子轰击、直接注射、病毒载体、脂质体和喷射注射、及其他的方法。当采用这些导入方法时，只需要较少的量并且常常导致更持续的免疫原产生。当采用这种遗传操作时，向鸟类导入 DNA 的优选方法为通过肌内注射的方式将 DNA 注入其胸肌。

20 优选的超免疫操作

如下为一用于使产卵动物处于免疫升高状态优选操作实例的步骤列表：

1. 选择一种或多种免疫原。
2. 通过初次免疫在产卵动物中引起免疫应答。
- 25 3. 给药适当剂量免疫原的加强免疫疫苗用于诱导和保持超免疫状态。

步骤 1: 可采用任何免疫原或免疫原的组合作为疫苗。其中免疫原可以是细菌、病毒、原生动物、真菌、细胞、或能引发产卵动物的免疫系统发生应答的其他的任何物质。本步骤的关键点在于免疫原必须能在产卵动物中诱发免疫和超免疫状态。虽然在本发明的方法中仅有单一的抗原起了疫苗的作用，但优选的疫苗为选自如下抗原族的多价细菌

和病毒抗原的混合物：肠道杆菌和拟杆菌、肺炎球菌 (Pneumococci)、假单胞菌 (Pseudomonas)、沙门氏菌 (Salmonella)、链球菌 (Streptococci)、杆菌 (Bacilli)、葡萄球菌 (Staphylococci)、奈瑟氏菌 (Neisseria)、梭状芽孢杆菌 (Clostridia)、分枝杆菌 (Mycobacteria)、放线菌 (Actinomycetes)、衣原体 (Chlamydiae) 和支原体 (Mycoplasma)。虽然其他的病毒抗原族也有效果，但病毒抗原优选的选自如下抗原族：腺病毒、小 RNA 病毒和疱疹病毒。在一特定优选实施方案中，采用了称为 PL-100 的多价疫苗。包括在 PL-100 疫苗中的细菌列于实施例 1 的表 1 中。

10

步骤 2: 所述的疫苗既可以为灭活疫苗也可以是减毒疫苗，并可通过能引起免疫应答的任何方法来给药。优选的通过经肌肉注射的方式给免疫原来实现免疫。在鸟类中优选的用于注射的肌肉为胸肌。可采用的其他给药方法包括静脉内注射、腹膜内注射、真皮内的、直肠栓剂、喷雾剂或口服给药。当 DNA 技术用于超免疫操作时，将需要更少的量，通常为 1- 100 微克。

可通过免疫领域的熟练技术人员熟知的许多方法来确定是否在产卵动物中引起了免疫应答。其例子包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)，刺激性抗原的抗体存在的检测，用于评价宿主中免疫细胞对抗原的应答能力的实验。诱导免疫应答所需的免疫原的最小剂量取决于所采用的疫苗接种操作，其包括佐剂的类型和所采用的免疫原制剂以及作为宿主的产卵动物的类型。

步骤 3: 通过在固定的时间间隔重复加强给药合适的剂量可优选的在目标动物诱导和保持超免疫状态。时间间隔优选的为在 6-12 个月的期间内 2-8 周的间隔。优选剂量为 0.05-5 毫克的免疫原性疫苗。但是，加强免疫必须不会导致免疫原性耐受。本领域熟知这类操作。

还可以采用其他的超免疫保持操作步骤或操作步骤的组合，例如，肌肉注射进行初次免疫，静脉内注射进行加强免疫。另外的步骤包括同时给药微包囊的和液体免疫原，或肌肉注射进行初次免疫，并且通过口服给药或经微包囊途径胃肠外给药的方式来给药加强剂量。本领域的熟练技术人员已知许多的初次和超免疫的组合方式。

超免疫卵的加工和给药

一旦产卵动物经充分的超免疫后，优选的收集这些动物的卵并进行加工产生超免疫卵产物。随后，可将超免疫卵产物给药至受体动物。

5 将本发明的卵和/或卵产物通过可刺激或增强受体动物中免疫 T-细胞活性的任何方式给药至受体动物。优选的通过直接饲喂卵或其任何有效成分来进行给药。卵和卵黄是天然的食物成分，并且除了对那些过敏者外，其本身无毒并且安全。

一种加工卵的优选的方法涉及将卵干燥成为卵粉。虽然已知各种干燥卵的方法，不过喷雾干燥为优选的方法。喷雾干燥卵的方法是本领域已知的方法。

在一优选实施方案中，超免疫卵与含有许多营养成分如维生素和矿物质的食品产品或食品补充剂一起给药。虽然这么说，但干的卵粉也可掺入饮料中，其中饮料呈如下形式：例如，蛋白粉、粉末成分的饮料、蛋白补充剂和任何其他营养、运动相关的产品。

在另一实施方案中，所述的卵粉可用于烘焙混合物、粉末棒、糖果、饼干等中。卵加工的其他例子包括：制成蛋煎饼、煮软或煮硬的蛋、烤蛋，或如果愿意的话，所述的卵可以生吃或加工成卵液。

最后，本领域公知卵黄和/或卵清部分含有起上述观察到的或提到的有益作用的成分。本领域的普通技术人员很明确的认识通过进一步分离可提供更有效力的级分或除去不理想的成分，并且也允许其他的给药方式，例如经胃肠外的、皮下的、静脉内的、肌内的、腹膜内的、鼻内的、口服的或局部的方式给药卵产物。这种进一步的分离将提供采用所述卵或其级分来制备胶囊产物和药物组合物的能力。

25 对受体动物给药一定量的超免疫卵产物从而能免疫有效的刺激或增强免疫 T-细胞是十分重要的。如上文所述，大小小于 3000 道尔顿的超免疫卵级分（参见实施例 2 的制备）被证实最有效。考虑到这一点，本发明人发现根据受体动物的大小和体重，每受体动物给药从 0.1 μ g/mL 至 1000 mg/mL 的任何剂量的小于 3K 的超免疫卵级分可有效的刺激或增强 T-细胞。不过，更优选的每动物给药约 0.2 μ g/mL 至约 30 200 μ g/mL、进一步优选 0.5 μ g/mL 至 20 μ g/mL 的小于 3K 的超免疫卵级分。治疗持续的时间和强度将根据受体动物的身体状况、是否表现出

疾病或病症、和如果表现出则该疾病或病症的发展状况等来决定。考虑到这些，超免疫卵产物将以能有效刺激或增强 T-细胞活性从而增强免疫系统战胜疾病或病症的量来进行给药。应当明确，虽然优选小于 3K 的超免疫卵级分，但较大的级分 and 全卵也同样有效。可根据受体动物的特定状况来确定给药的日常量，其中日常量为从小于 1 个到几个完整的超免疫卵（或含有与小于一个到几个完整的超免疫卵等价的超免疫卵产物）的范围内。根据本领域熟知的方法可分离和浓缩更有效的级分。

通过参考如下的用于说明本发明的实施例可进一步体现出本发明的有益特性。

实施例

实施例 1

PL-100 疫苗的制备

如表 1 所示的称为 PL-100 的含有细菌的多价疫苗（来源于美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection））采用 15ml 的培养基重配并在 37℃ 下培养过夜。一旦获得良好生长，取大约一半的细菌悬浮液用于接种至 1 升的肉汤培养基中并随后在 37℃ 下培养。剩下的悬浮液转移至灭菌的乙二醇试管并在 -20℃ 下保存最长达 6 个月。

当培养物中可见良好生长时，通过离心收获细菌。将细菌沉淀物重悬于无菌生理盐溶液中并将细菌样品离心 3 次以洗掉细胞部分。在第三次洗涤后，获得的沉淀物重悬于少量的双蒸水中。

通过将玻璃烧瓶中的悬浮液置于 80℃ 的水中温育过夜来加热灭活不含培养基的细菌悬浮液。采用少量的加热灭活的细菌来检测肉汤培养基的活力。采用加热灭活的细菌来接种肉汤，在 37℃ 下培养 5 天，并每天检测其生长，因为所述的细菌必须被灭活作为疫苗。

加热灭活的细菌经冷冻至完全干燥。随后，将干燥的细菌与无菌盐水溶液混合至 2.2×10^8 个细菌细胞/ml 盐水（在 660 nm 下 1.0 的光学密度）。

表 1
PL-100 疫苗中的抗原

名称	培养基	名称	培养基
模仿葡萄球菌 (<i>Staphylococcus simulans</i>)	BHI	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	BHI
表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	BHI	肺炎克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	BHI
脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>), A1 型	APT	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	BHI
脓链球菌, A3 型	APT	流感嗜血菌 (<i>Haemophilus influenzae</i>)	BHI
脓链球菌, A5 型	APT	缓症链球菌 (<i>Streptococcus mitis</i>)	APT
脓链球菌, A8 型	APT	普通变性菌 (<i>Proteus vulgaris</i>)	BHI
脓链球菌, A12 型	APT	痢疾志贺氏菌 (<i>Shigella dysenteriae</i>)	BHI
脓链球菌, A14 型	APT	肺炎双球菌 (<i>Diplococcus pneumoniae</i>)	APT
脓链球菌, A18 型	APT	痤疮棒杆菌 (<i>Propionibacter acnes</i>)	肉汤 培养基
脓链球菌, A22 型	APT	血链球菌 (<i>Streptococcus sanguis</i>)	APT
大肠埃希氏菌 (<i>Escherichia coli</i>) (ATCC # 26)	BHI	唾液链球菌 (<i>Streptococcus salivarius</i>)	APT
大肠埃希氏菌 (ATCC # 884)	BHI	变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>)	BHI
肠沙门氏菌 (<i>Salmonella enteritidis</i>)	BHI	无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	APT

超免疫卵产物的免疫过程

如上文所述制备灭活的病原体。作为第一次接种，所述细菌与完全 Freund's 佐剂混合，并将 5.6 mg 的细菌物质注射入鸡胸部肌肉中。对于剩下的疫苗，将细菌制备产物与不完全 Freund's 佐剂混合并在 6 个月中以两周的间隔注射入鸡体内。

收集超免疫母鸡产下的卵，并将其喷雾干燥成粉末状形式。在喷雾干燥过程中，入口处温度不超过 320 华氏度，排出的温度与以 3.0 至 4.0 百分比的终湿度产生的粉末保持一致，泵送压力保持在 2500 至 4000 P. S. I 左右。采用了 100-160 F 范围内的低温，并且在干燥过程中监测样品的湿度含量从而使终产物获得任何理想的稠度。

实施例 2

制备卵的部分纯化级分的优选方法

如下实施例记载了一种获得具有较低分子量、且呈非聚集形式的部分纯化的蛋级分的方法（适合于大规模纯化）。超免疫的和对照的食用卵的全卵经破碎后将卵清和卵黄分离并分别喷雾干燥。按如实施例 1 所述的方法获得超免疫卵。单独加工卵清粉从而获得其含水级分用于超滤。

进行全部的纯化步骤从而使细菌或热原的感染最小化。采用无菌水来配制溶液并且所有的玻璃器皿均经去热原化。此外，将溶液进行无菌过滤。

来源于卵黄的制品

溶剂提取

将如实施例 1 所述制备的干燥卵黄用丙烷或丁烷进行液体溶剂提取从而从含水的卵黄级分中分离脂质成分。简单的说，将 500 克干燥卵黄粉置于柱中，并向其中加入 4 升液体丙烷溶剂。取出溶剂上清和提取的脂质。总共六次脂质提取从而进行了六次另外的溶剂提取步骤。

超滤

采用 4 升的无菌蒸馏水稀释 400 克的干燥去脂卵黄，并采用 Virtis

(handishear)使其匀化。对于卵黄混合物既可以在 24 RPM 的速度下进行离心，又可以允许其保持冷冻直至不溶解的卵黄颗粒沉淀。采用装有 3000 道尔顿拦截螺旋缠绕膜的 Amicon RA1000 超滤系统来超滤获得的含水级分。保持泵送速度，入口压力为 20 psi，出口压力为 15 psi。采用 0.45 μ m 的一次性无菌 Nalgene 滤器无菌过滤 < 3,000 道尔顿分子量的渗透物并冷冻干燥或冷冻用于储存、生物测定或进一步的纯化。

卵黄中小于 3000 道尔顿的分子类型包括具有低分子量的且呈非聚集形式的部分纯化的卵级分。从 400 克的起始物质开始，< 3K 道尔顿的部分纯化的级分的产量约为 12 克或占总量的 3%。

来源于卵清的制品

采用 4 升的去离子水稀释从如实施例 1 所述的超免疫卵和对照的食用卵中分离得到的 400 克卵清。使混合物混合匀化并经 40 μ m 的滤器过滤并经 3KDa MW CO 超滤系统进行超滤。从 400g 的卵清粉中，可回收 8.6g 或 2.15 % 的小于 3K 道尔顿的部分纯化的卵级分。

实施例 3

免疫细胞系中的免疫刺激活性

20

所有的细胞系均来自 ATCC，并在其推荐的培养基中进行培养。这些细胞均在 96 孔板中培养并使其达到对数生长期。适当稀释 3k 级分，并加入各自的孔中培养 24-96 小时。通过采用 Alamar 蓝染色细胞，并在 520nm 的激发波长通过自动微量培养板读取器来读取其荧光强度从而来确定细胞活力。刺激指数 (SI) 表示经处理的细胞比未刺激对照组的细胞的相对数目。

图 1 为一曲线图，其表示与超免疫卵的小于 3K 的级分共同培养的各个阶段 (从 24 至 96 小时) 的 Jurkat 细胞 (T-细胞白血病细胞系) 的刺激指数 (SI)。在 5.5-50 μ M 的浓度范围内 SI 值显著增加，这表示了 Jurkat 细胞的超免疫刺激。在细胞活化的 48、72 和 96 小时阶段中这是一致的。

30

图 2 为一曲线图，其表示与超免疫卵的 3K 的级分共同培养的各个

阶段（从 24 至 48 小时）的 Daudi 细胞（B 成淋巴细胞系）的刺激指数（SI）。结果表明，在 3k 级分的 1.24-300 μ M 的浓度下培养 24 小时后观察到超免疫刺激发生。

因此，超免疫卵的 3k 级分对 Jurkat 和 Daudi 细胞系的影响结果表明了强的免疫刺激活性。这提示我们在 PHA 介导的 T 细胞刺激实验中进行 3 H-胸苷掺入，如如下实施例 4 所述。

实施例 4

采用 PHA 处理的外周淋巴细胞的体外增殖实验

10 采用来源于健康自愿捐赠者的外周淋巴细胞培养物来进行本实验。采用不同浓度的 PHA 处理淋巴细胞，并将其生长动力学与添加生理盐水溶液的细胞的动力学相比较。

结果表明，与对照相比（外周淋巴细胞加生理盐水溶液）以在低浓度，包括 0.1%、0.5%、1.0%和 2.5%，处理的外周淋巴细胞中可观察到促有丝分裂作用。相应于这些浓度的刺激指数分别为 1.6、3.02、2.83 和 1.8，这表明在实验条件下，细胞总数分别增加了 160%、302%、283%和 180%。

T-细胞的母细胞转化

20 按 1: 100 至 1: 1000 的比例制备 PHA 稀释液，并将稀释液加入淋巴细胞培养物的培养板系统中。加入植物凝血素、Pockweed 抗原和 A 伴刀豆球蛋白来鉴定培养孔。在培养阶段后，通过放射性胸苷掺入实验来确定 T-淋巴细胞的增殖。

PHA 强烈的增加了游离促细胞分裂淋巴细胞的增殖。

25 本研究比较了完整的超免疫卵和超免疫卵的部分纯化的级分（如实施例 2 所述的小于 3K 的级分）与单独对照培养基中的促有丝分裂作用。在包括 0.24、0.98、3.9、15.6、62.5 和 250 μ g/ml 的各种浓度下检测完整的超免疫卵。在 0.1、0.2、0.7、2.0、6.1、18.4、55.3 和 166.0 μ g/ml 的浓度下检测超免疫卵的纯化的小于 3K 的级分。

30 与上述浓度相对应的超免疫全卵的刺激指数分别为 0.9、0.8、0.9、0.9、0.8，这在实验条件下分别相应于 90%、80%、90%、90%、80%和 80%的细胞总数增加。与上述浓度相对应的 3K 纯化级分的刺激

指数分别为 1.1、1.2、1.5、1.7、1.4、1.3、1.0 和 1.2 (参见表 2)，这在实验条件下分别相应于 110%、120%、150%、170%、140%、130%、100% 和 120% 的细胞总数增加。

5 这些结果表明在 0.24-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度范围内，完整的超免疫卵不能显著刺激体外 T-细胞。另一方面，超免疫卵的小于 3K 的纯化级分在 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下显示出显著刺激 T-细胞。表 1 表明了每孔中刺激的细胞的实际数目。

超免疫卵的纯化级分的这种活性可能是由能特异性诱导涉及刺激免疫系统的细胞臂的细胞因子的细胞因子活化因子引起的。

10

编号	PHA [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	对照	< 3K 的级分 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]							
			166.00	55.33	18.44	6.15	2.05	0.68	0.23	0.08
	5	0	166.00	55.33	18.44	6.15	2.05	0.68	0.23	0.08
1	101241	541	890	624	819	958	1050	806	754	644
2	111452	714	765	578	637	759	890	689	794	517
3	98898	552	648	649	711	759	1010	944	639	688
4	121212	633	705	600	967	697	806	698	573	636
5	97149	465	506	523	723	604	1009	809	494	667
6	118218	406	437	436	475	813	1009	919	802	393
AVE	108028	552	659	568	722	765	962	811	676	591
Neg	10365	111	167	78	166	118	94	107	127	114

表2										
刺激指数										
编号	PHA [$\mu\text{g/ml}$]	对照	PL-100 [$\mu\text{g/ml}$]							
			5	0	166.00	55.33	18.44	6.15	2.05	0.68
1	183.5	1.0	1.6	1.1	1.5	1.7	1.9	1.5	1.4	1.2
2	202.0	1.3	1.4	1.0	1.2	1.4	1.6	1.2	1.4	0.9
3	179.2	1.0	1.2	1.2	1.3	1.4	1.8	1.7	1.2	1.2
4	219.7	1.1	1.3	1.1	1.8	1.3	1.5	1.3	1.0	1.2
5	176.0	0.8	0.9	0.9	1.3	1.1	1.8	1.5	0.9	1.2
6	214.2	0.7	0.8	0.8	0.9	1.5	1.8	1.7	1.5	0.7
AVE	195.8	1.0	1.2	1.0	1.3	1.4	1.7	1.5	1.2	1.1
Neg	18.8	0.2	0.3	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

重复相同的实验。如下，表3和4为实验结果。观察到T-细胞刺激的类似增加。

5

表3										
3H-胸苷掺入/孔 [cpm]										
编号	PHA [$\mu\text{g/ml}$]	对照	< 3K的级分 [$\mu\text{g/ml}$]							
			5	0	166.00	55.33	18.44	6.15	2.05	0.68
1	102484	335	461	548	361	526	537	690	597	619
2	114522	326	391	461	401	408	391	551	584	629
3	110201	454	501	393	635	494	533	433	524	500
4	121811	397	494	521	344	405	477	538	514	807
5	97453	391	372	493	537	459	393	484	474	560
6	112934	354	353	358	377	396	397	508	519	519
AVE	109901	376	429	462	443	448	455	534	535	606
NEG	8746	48	65	74	117	54	70	87	46	111

表4										
刺激指数										
编号	PHA [$\mu\text{g/ml}$]	对照	< 3K的级分 [$\mu\text{g/ml}$]							
			5	0	166.00	55.33	18.44	6.15	2.05	0.68
1	272.4	0.9	1.2	1.5	1.0	1.4	1.4	1.8	1.6	1.6
2	304.4	0.9	1.0	1.2	1.1	1.1	1.0	1.5	1.6	1.7
3	293.0	1.2	1.3	1.0	1.7	1.3	1.4	1.2	1.4	1.3
4	323.8	1.1	1.3	1.4	0.9	1.1	1.3	1.4	1.4	2.1
5	259.1	1.0	1.0	1.3	1.4	1.2	1.0	1.3	1.3	1.5
6	300.2	0.9	0.9	1.0	1.0	1.1	1.1	1.4	1.4	1.4
AVE	292.2	1.0	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.4	1.4	1.6
NEG	23.3	0.1	0.2	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3

虽然本文中结合了特定实施方案来描述和举例说明本发明，但本发明不受所示的具体细节的限定。反而，可在权利要求的等价物的主旨和范围内进行各类修改而不背离本发明的范围。

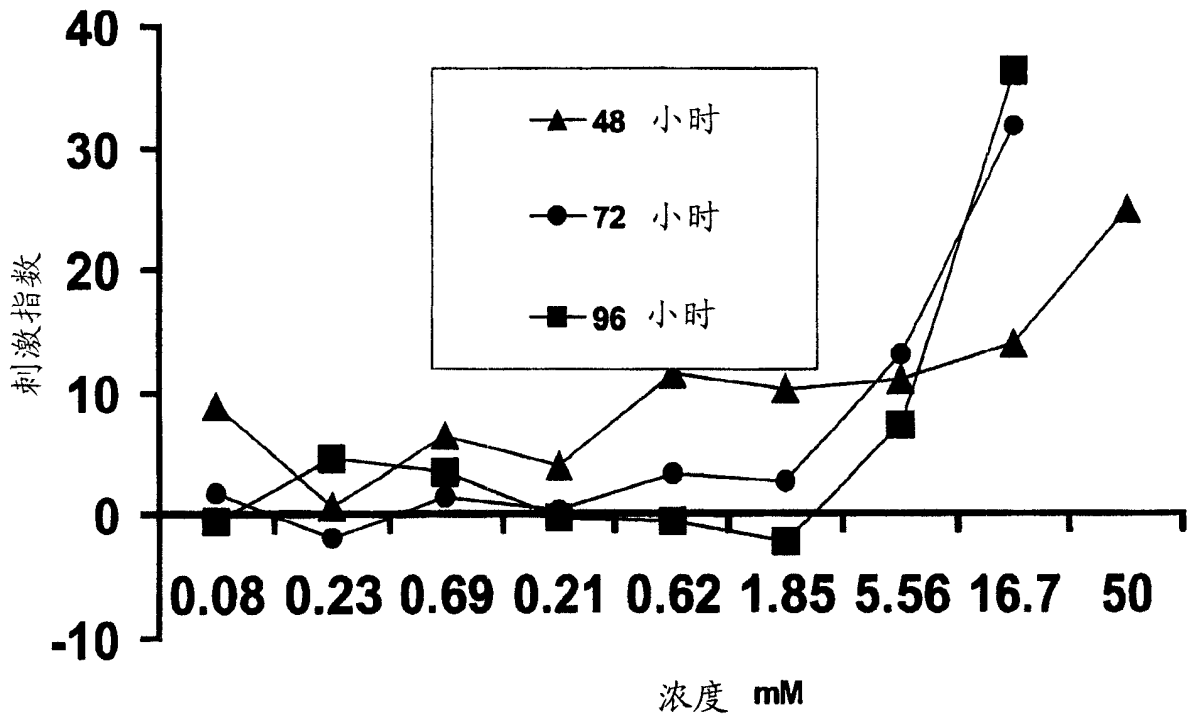


图 1

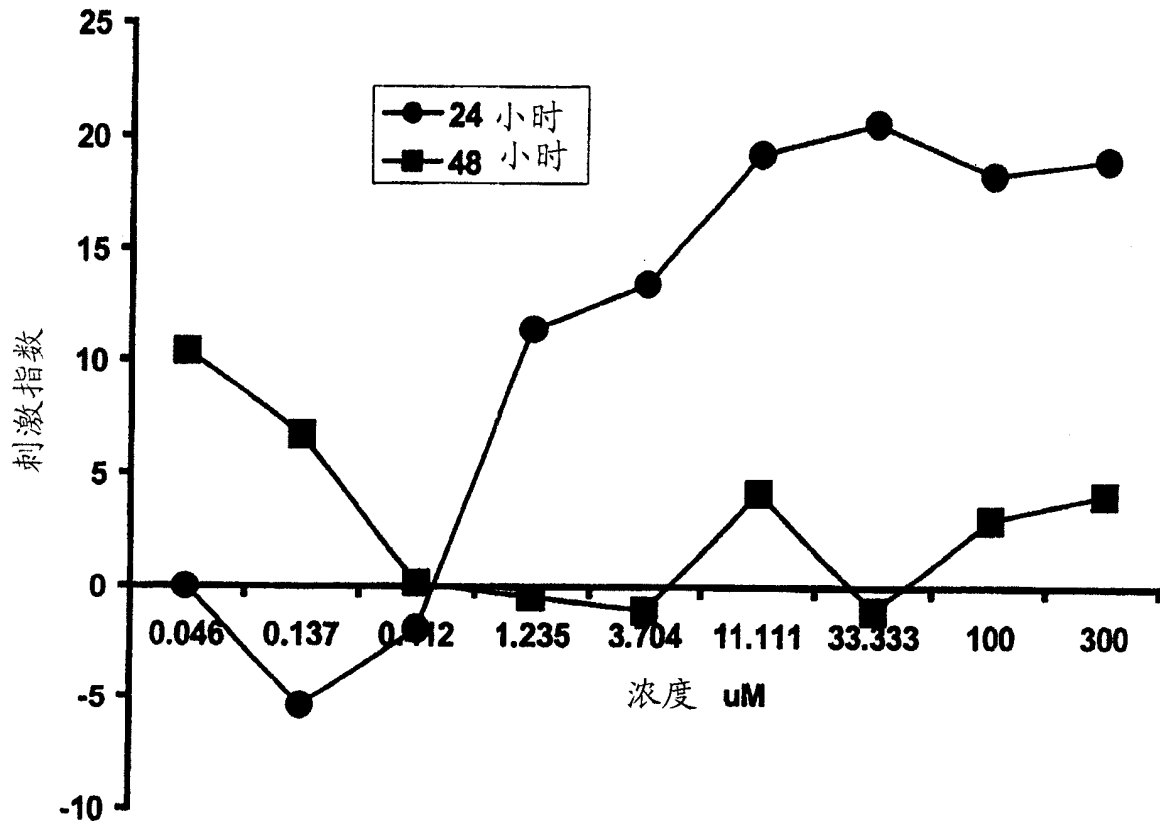


图 2