

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104363962 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201380016517. 3

A61K 31/702 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 03. 11

A23L 1/30 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/616230 2012. 03. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/030185 2013. 03. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/148134 EN 2013. 10. 03

(71) 申请人 雅培制药有限公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 D. L. 托马斯 R. 巴克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘健 徐厚才

(51) Int. Cl.

A61P 37/04 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书20页 附图3页

(54) 发明名称

用于使用人乳寡糖调节细胞介导的免疫的方法

(57) 摘要

公开了使用包括人乳寡糖的营养组合物增强个体中的细胞介导的免疫的方法。人乳寡糖是唾液酸化的人乳寡糖、岩藻糖基化的人乳寡糖、或两者的组合。人乳寡糖可以增强T细胞介导的应答和T细胞调节性应答。

1. 增强有其需要的个体中细胞介导的免疫的方法,所述方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强细胞介导的免疫的量的唾液酸化的人乳寡糖或岩藻糖基化的人乳寡糖的营养组合物。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述有其需要的个体选自易于过敏的婴儿、儿童、青少年或成人;易患自身免疫性疾病的婴儿、儿童、青少年或成人;非母乳喂养的婴儿;补充有配方或人乳强化剂的母乳喂养的婴儿;免疫衰老的成人和老年人;绝经期妇女;绝经后的妇女;化疗患者;免疫系统受损的个体;具有 AIDS 的个体;及其组合。

3. 权利要求 1 或 2 中任一项的方法,其中所述营养组合物是液体,其包含约 0.001 mg/mL 至约 20 mg/mL 的唾液酸化的人乳寡糖或岩藻糖基化的人乳寡糖,优选约 0.001 mg/mL 至约 10 mg/mL 的唾液酸化的人乳寡糖或岩藻糖基化的人乳寡糖,更优选约 0.001 mg/mL 至约 5 mg/mL 的唾液酸化的人乳寡糖或岩藻糖基化的人乳寡糖。

4. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述营养组合物是粉末,其包含所述粉末的约 0.0005 重量 % 至约 5 重量 % 的唾液酸化的人乳寡糖或岩藻糖基化的人乳寡糖,优选约 0.01 重量 % 至约 1 重量 % 的唾液酸化的人乳寡糖或岩藻糖基化的人乳寡糖。

5. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述唾液酸化的人乳寡糖选自 3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖、乳酰唾液酸四糖及其组合。

6. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述营养组合物基本上无岩藻糖基化的人乳寡糖。

7. 权利要求 1-5 中任一项的方法,其中所述岩藻糖基化的人乳寡糖选自 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳酰-N-岩藻五糖、单岩藻糖基乳酰-N-六糖及其组合。

8. 权利要求 1-5 或 7 中任一项的方法,其中所述营养组合物基本上无唾液酸化的人乳寡糖。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述营养组合物包含足以增强 T 细胞介导的应答的量的唾液酸化的人乳寡糖和足以增强 T 细胞调节性应答的量的岩藻糖基化的人乳寡糖。

10. 权利要求 1-5、7 或 9 中任一项的方法,其中所述营养组合物是液体,其包含约 0.001 mg/mL 至约 20 mg/mL 的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的每一种,优选约 0.001 mg/mL 至约 10 mg/mL 的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的每一种,更优选约 0.001 mg/mL 至约 5 mg/mL 的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的每一种。

11. 权利要求 1-5、7、9 或 10 中任一项的方法,其中所述营养组合物是粉末,其包含所述粉末的约 0.0005 重量 % 至约 5 重量 % 的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的每一种,优选约 0.01 重量 % 至约 1 重量 % 的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的每一种。

12. 权利要求 1-5、7 或 9-11 中任一项的方法,其中所述唾液酸化的人乳寡糖选自 3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖、乳酰唾液酸四糖及其组合,且所述岩藻糖基化的人乳寡糖选自 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳酰-N-岩藻五糖、单岩藻糖基乳酰-N-六糖及其组合。

13. 权利要求 1-6 或 9-12 中任一项的方法,其中所述营养组合物包含足以增强 T 细胞介导的应答的量的唾液酸化的人乳寡糖。

14. 权利要求 1-5 或 7-13 中任一项的方法,其中所述营养组合物包含足以增强 T 细胞调节性应答的量的岩藻糖基化的人乳寡糖。

## 用于使用人乳寡糖调节细胞介导的免疫的方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

本申请在此要求 2012 年 3 月 27 日提交的序列号 61/616,230 的相同标题的临时专利申请的权益,所述申请以其整体通过引用并入本文。

### [0002] 公开领域

本公开涉及人乳寡糖用于调节和增强细胞介导的免疫的用途。更具体地,本公开涉及使用唾液酸化的人乳寡糖、岩藻糖基化的人乳寡糖、或唾液酸化的人乳寡糖和岩藻糖基化的人乳寡糖两者的组合以调节和增强个体中的细胞介导的免疫的方法。

### [0003] 背景

免疫应答是机体中细胞和 / 或非细胞 (体液) 组分两者间对机体的感知损害或威胁作出反应的多面性系列的相互作用。具体而言,细胞介导的免疫主要针对吞噬细胞中存活的微生物和感染非吞噬细胞 (即粘膜上皮细胞) 的微生物,或展示改变的自身抗原的细胞,诸如癌细胞。细胞介导的免疫在去除病毒感染的细胞中是最有效的,而且还参与抵御真菌、原生动物、癌症和细胞内细菌。

[0004] 参与细胞介导的免疫应答的一种免疫细胞类型是胸腺来源的淋巴细胞或 T 细胞。在细胞介导的免疫的背景下, T 细胞通过诱导在其表面上展示外来抗原的表位的机体细胞 (诸如病毒感染的细胞,具有细胞内细菌的细胞,和展示肿瘤抗原的癌细胞) 的凋亡而提供保护。T 细胞还产生影响参与所有类型的免疫应答 (细胞介导的或体液,先天或适应性免疫应答) 的其它细胞的功能的细胞因子。因此,功能性细胞介导的应答是个体中最佳健康的先决条件。

[0005] 尽管如上所述是有益的,但不受控制的、不恰当的或失调的免疫应答牵涉于慢性炎性疾病,诸如过敏、易激性肠综合征、自身免疫性疾病等。因此,最佳的健康需要用适当的调节免疫应答平衡的功能性效应免疫应答。

[0006] 因此,提供供应将增强细胞介导的免疫应答的个别组分的营养组合物将是期望的。如果可以提供细胞介导的免疫应答的增强而不生成过度恶化的免疫应答,诸如不受控制的炎症 (其可以具有许多不利结果,并最终超过有益方面),将是进一步有利的。

### [0007] 概述

本公开涉及使用人乳寡糖增强个体 (包括婴儿、儿童、成人和老年人) 中的细胞介导的免疫的方法。在一些实施方案中,使用的人乳寡糖是唾液酸化的人乳寡糖。在其它实施方案中,人乳寡糖是岩藻糖基化的人乳寡糖。在又其它实施方案中,唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的组合被用来增强个体的细胞介导的免疫。人乳寡糖增强 T 细胞介导的应答并增强的 T 细胞调节性应答。

[0008] 在一些实施方案中,本公开涉及增强有其需要的个体中的细胞介导的免疫的方法。该方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强 T 细胞介导的应答的量的唾液酸化的人乳寡糖的营养组合物。

[0009] 在其它实施方案中,本公开涉及增强有其需要的个体中的细胞介导的免疫的方法。该方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强 T 细胞调节性应答的量的岩藻糖基化

的人乳寡糖的营养组合物。

[0010] 在其它实施方案中,本公开涉及增强有其需要的个体中的细胞介导的免疫的方法。该方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强 T 细胞介导的应答的量的唾液酸化的人乳寡糖和足以增强 T 细胞调节性应答的量的岩藻糖基化的人乳寡糖的营养组合物。

[0011] 在其它实施方案中,本公开涉及增强有其需要的个体中的 T 细胞介导的应答的方法。该方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强 T 细胞介导的应答的量的唾液酸化的人乳寡糖的营养组合物。

[0012] 在其它实施方案中,本公开涉及增强有其需要的个体中的 T 细胞调节性应答的方法。该方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强 T 细胞调节性应答的量的岩藻糖基化的人乳寡糖的营养组合物。

[0013] 已经发现,人乳寡糖影响细胞介导的免疫,并且不是所有人乳寡糖都以相同方式影响细胞介导的免疫。具体地,已经发现,唾液酸化的人乳寡糖以不同于岩藻糖基化的人乳寡糖的方式影响 T 细胞免疫应答;两者都以积极的方式影响。唾液酸化的人乳寡糖增强 T 细胞介导的应答,而岩藻糖基化的人乳寡糖增强 T 细胞调节性应答。因此,唾液酸化的人乳寡糖促进 T- 细胞介导的抗病毒、抗细菌、抗真菌、抗原生动物和抗癌应答,而岩藻糖基化的人乳寡糖诱导防止或抑制慢性炎性疾病调节性应答。

[0014] 此外,已经出乎意料地发现,唾液酸化的人乳寡糖和岩藻糖基化的人乳寡糖的组合表现出增加的 T 细胞介导的功能和增加的调节两者的益处,使得唾液酸化的人乳寡糖和岩藻糖基化的人乳寡糖的功能性不互相排斥。因此,已经发现,唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖可以组合使用,以通过防止或抑制感染性疾病和癌症而增强平衡的免疫应答,而不诱导慢性炎性状况。此外,通过改变当组合使用时唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的比率,现在可能在不诱导总体免疫抑制的情况下抑制慢性炎性状况,或在不诱导炎症的情况下增强受抑制的免疫状况。因为如本文所述的人乳寡糖的使用不是抗原(像疫苗,例如)特异性的,所以它们可以产生平衡的细胞介导的免疫的总体增强。

#### [0015] 附图简述

被并入本说明书中并构成本说明书的一部分的附图连同上面给出的一般说明,说明实施方案,并且,下面给出的实施方案的详述,用于解释本公开的原理。

[0016] 图 1 是描述如实施例 11 中分析的在个别 HMOs 和 HMO 混合物存在的情况下 PBMC 的 PHA 刺激的应答的图。

[0017] 图 2 是描述如实施例 11 中分析的在个别 HMOs 和 HMO 混合物存在的情况下 PBMC 的增殖应答的图。

[0018] 图 3 是描述如实施例 12 中分析的补充和不补充 2' FL 的小鼠的肠系膜淋巴结中 T 调节性细胞的百分比的图。

#### [0019] 详述

本公开涉及用于提供个体中的细胞介导的免疫的总体增强的方法。不像利用一种或多种特定营养组分或合成药物通过增强的 T 细胞介导的应答或增强的 T 细胞调节性应答来增强个体中的细胞介导的免疫的许多其它常规方法,本公开的方法通过同时增强 T 细胞介导的应答和增强 T 细胞调节性应答两者而提供细胞介导的免疫的增强。这使个体具有增强的免疫学益处,而没有不想要的炎症的增加的风险。

[0020] 在本公开的方法中,通过在营养组合物中使用人乳寡糖的组合来获得这些双重益处。因为已经出乎意料地发现,所述双重益处不是相互排斥的,并且可以在单一营养组合物中提供,所以本公开的方法是特别有益的。在一些实施方案中,所述营养组合物包括第一唾液酸化的人乳寡糖和第二岩藻糖基化的人乳寡糖。根据对个体的期望的结果,两种人乳寡糖的量和比率可以变化以产生期望的结果。

[0021] 下文详细描述营养组合物和方法的这些和其它特点,以及许多任选的变化和增加中的一些。

[0022] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“细胞介导的免疫”和“T 细胞介导的免疫”,是指当幼稚或致敏的 T 细胞直接攻击外来抗原并分泌引发机体的体液免疫应答的细胞因子时产生的免疫应答。

[0023] 术语“蒸煮包装”和“蒸煮灭菌”在本文中可互换使用,且除非另外规定,是指如下常用操作:用营养液填充容器,最通常为金属罐或其它类似包装,然后使该填充液体的包装经受必要的热灭菌步骤,以形成经灭菌的、蒸煮包装的营养液产品。

[0024] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“无菌包装”是指不依靠上述蒸煮包装步骤来制造包装产品,其中营养液和包装在填充之前分别进行灭菌,然后在灭菌或无菌处理条件下组合以形成经灭菌的、无菌包装的营养液产品。

[0025] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“脂肪”和“油”可互换用于指来源于植物或动物或由植物或动物加工的脂质物质。这些术语也包括合成脂质物质,只要此类合成物质适于口服施用于人。

[0026] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“人乳寡糖”或“HMO”通常是指人母乳中发现的许多复杂碳水化合物,其可呈酸性或中性形式,以及是指其前体。示例性非限制性人乳寡糖包括 3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、2'-岩藻糖基乳糖以及乳酰-N-新四糖。示例性人乳寡糖前体包括唾液酸和 / 或岩藻糖。

[0027] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“储存稳定 (shelf stable)”是指营养产品,其经包装然后在 18-24°C 下储存至少 3 个月(包括约 6 个月至约 24 个月,并且也包括约 12 个月至约 18 个月)后保持商业稳定。

[0028] 如本文中所使用,术语“营养制剂”或“营养组合物”可互换使用且除非另外规定,是指合成配方,包括营养液、营养粉、营养固体、营养半固体、营养半液体、营养补充剂和如本领域中已知的任何其它营养食品。营养粉可重构以形成营养液,其均包含脂肪、蛋白质和碳水化合物中的一种或多种且适于人口服食用。

[0029] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“营养液”是指呈即饮型液体形式、浓缩形式的营养产品,和通过在使用之前重构本文所述的营养粉所制备的营养液。

[0030] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“营养粉”是指呈可流动或可舀取形式的营养产品,其可在食用之前用水或另一含水液体重构且包括喷雾干燥和干混 / 干掺的粉末。

[0031] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“营养半固体”是指性质(诸如刚性)介于固体与液体之间的营养产品。一些半固体实例包括布丁、明胶和生面团。

[0032] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“营养半液体”是指性质(诸如流动性质)介于液体与固体之间的营养产品。一些半液体实例包括稠奶昔 (thick shakes) 和液体凝胶。

[0033] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“易患”和“处于风险中”意指对某种状况或

疾病具有极小抗性,包括具有该状况或疾病的遗传倾向、具有其家族史和 / 或具有其症状。

[0034] 除非另外规定,如本文中所使用,术语“调节 (modulating)”或“调节 (modulation)”或“调节 (modulate)”是指对所选特征的定向变动。

[0035] 产品形式

本公开的方法中使用的营养组合物包括唾液酸化的人乳寡糖、岩藻糖基化的人乳寡糖、或唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的组合,并且可以以任何已知的或其它合适的口服产品形式进行配制和施用。任何固体、液体、半固体、半液体或粉末产品形式(包括其组合或变体)适于本文使用,条件是此类形式允许安全和有效地将如本文又定义的成分口服递送至个体。

[0036] 本公开的方法中使用的营养组合物被期望地配制成膳食品形式,其在本文中定义为呈以下产品形式的包含本公开成分的那些实施方案,所述产品形式又含有脂肪、蛋白质和碳水化合物中的至少一种,且优选还含有维生素、矿物质或其组合。

[0037] 营养组合物可以用足够种类和量的营养素配制以提供营养的唯一、主要或补充来源,或提供用于患有特定疾病或状况的个体的或具有如下文所述的目标营养益处的特定营养产品。

[0038] 可以适合于根据本公开使用的特定产品的一些示例性、非限制性的实例包括早产儿配方、足月儿配方、人乳强化剂、儿童配方、成人营养配方、老年人营养配方、医疗配方、老年营养配方、糖尿病营养配方等等。

[0039] 营养液

营养液包括浓缩和即食型营养液。这些营养液最通常配制成悬浮液或乳状液,尽管其它液体形式也在本公开的范围内。

[0040] 适合使用的营养乳状液可以是包含蛋白质、脂肪和碳水化合物的含水乳状液。这些乳状液通常在约 1°C 至约 25°C 下为可流动或可饮用液体且通常呈水包油、油包水或复杂含水乳状液形式,尽管此类乳状液最通常呈具有连续水相和不连续油相的水包油乳状液形式。

[0041] 营养乳状液可为且通常为储存稳定的。营养乳状液通常含有营养乳状液的至多 95 重量 % 的水,包括约 50 重量 % 至 95 重量 %,也包括约 60 重量 % 至约 90 重量 %,且也包括约 70 重量 % 至约 85 重量 % 的水。营养乳状液可具有各种产品密度,但最通常具有密度大于 1.03 g/mL,包括大于 1.04 g/mL,包括大于 1.055 g/mL,包括约 1.06 g/mL 至约 1.12 g/mL,且也包括约 1.085 g/mL 至约 1.10 g/mL。

[0042] 营养乳状液可具有适合最终使用者的营养需求的热量密度,尽管在大多数情况下,乳状液通常包含至少 19 kcal/f1 oz (660 kcal/升),更通常为约 20 kcal/f1 oz (675–680 kcal/升) 至约 25 kcal/f1 oz (820 kcal/升),甚至更通常为约 20 kcal/f1 oz (675–680 kcal/升) 至约 24 kcal/f1 oz (800–810 kcal/升)。通常,22–24 kcal/f1 oz 配方更常用于早产儿或低出生体重婴儿 (low birth weight infants),且 20–21 kcal/f1 oz (675–680 至 700 kcal/升) 配方更常用于足月儿。在一些实施方案中,乳状液的热量密度可为约 50–100 kcal/升至约 660 kcal/升,包括约 150 kcal/升至约 500 kcal/升。在一些特定实施方案中,乳状液的热量密度可为 25、或 50、或 75、或 100 kcal/升。

[0043] 营养乳状液的 pH 值可在约 3.5 至约 8 的范围内,但最有利地在约 4.5 至约 7.5 的

范围内,包括约 5.5 至约 7.3,包括约 6.2 至约 7.2。

[0044] 尽管营养乳状液的食用份量 (serving size) 可根据许多变量而变化,但典型食用份量通常为至少 1 mL,或甚至至少 2 mL,或甚至至少 5 mL,或甚至至少 10 mL,或甚至至少 25 mL,包括在 1 mL 至约 300 mL 的范围内,包括约 4 mL 至约 250 mL,且包括约 10 mL 至约 240 mL。

[0045] 营养固体

营养固体可呈任何固体形式,但通常呈可流动或实质上可流动微粒组合物或至少微粒组合物形式。特别适合的营养固体产品形式包括喷雾干燥、聚结和 / 或干掺的粉末组合物。所述组合物可轻易用勺或类似其它装置舀取和测量,且可轻易由预期使用者用适合的含水液体(通常为水)重构,以形成供立即口服或肠道使用的营养组合物。在此情形下,“立即”使用通常意指在约 48 小时内,最通常在约 24 小时内,优选在重构后立刻。

[0046] 营养粉可在使用之前用水重构至适合最终使用者的营养需求的热量密度,尽管在大多数情况下所述粉末用水重构以形成包含至少 19 kcal/f1 oz (660 kcal/升),更通常为约 20 kcal/f1 oz (675–680 kcal/升) 至约 25 kcal/f1 oz (820 kcal/升),甚至更通常为约 20 kcal/f1 oz (675–680 kcal/升) 至约 24 kcal/f1 oz (800–810 kcal/升) 的组合物。通常,22–24 kcal/f1 oz 配方更常用于早产儿或低出生体重婴儿,且 20–21 kcal/f1 oz (675–680 至 700 kcal/升) 配方更常用于足月儿。在一些实施方案中,重构粉末的热量密度可为约 50–100 kcal/升至约 660 kcal/升,包括约 150 kcal/升至约 500 kcal/升。在一些特定实施方案中,乳状液的热量密度可为 25、或 50、或 75、或 100 kcal/升。

[0047] 增强细胞介导的免疫的方法

本公开的方法使用唾液酸化的人乳寡糖、岩藻糖基化的人乳寡糖、或其组合以调节和 / 或增强个体的细胞介导的免疫应答。如所指出,细胞介导的免疫主要针对吞噬细胞中存活的微生物和感染非吞噬细胞(即粘膜上皮细胞)的微生物,或展示改变的自身抗原的细胞,诸如癌细胞。细胞介导的免疫在去除病毒感染的细胞中是最有效的,但还防御真菌、原生动物、癌症和细胞内细菌。本公开的调节和 / 或增强细胞介导的免疫的方法对于广泛范围的个体是有益的,包括早产儿、婴儿、儿童个体、青少年、成人和老年人(至少 50 岁或更大岁龄的成人)。

[0048] 在本公开的一些实施方案中,通过向个体施用增强个体中的 T 细胞介导的应答的有效量的唾液酸化的人乳寡糖而增强个体中的细胞介导的免疫。在向个体施用之后,唾液酸化的人乳寡糖促进个体中的 T 细胞介导的抗病毒、抗细菌、抗真菌、抗原生动物和抗癌应答,以增强个体中的细胞介导的应答。

[0049] 可以将唾液酸化的人乳寡糖施用于总体健康的个体,或可以施用于需要增强的 T 细胞介导的应答的个体子集。特别需要增强的 T 细胞介导的应答的一些个体可以包括易于过敏的婴儿、儿童、青少年或成人(易患过敏或处于过敏的升高风险中的婴儿、儿童、青少年或成人),易患自身免疫性疾病的婴儿、儿童、青少年或成人(易患自身免疫性疾病或处于自身免疫性疾病的升高风险中的婴儿、儿童、青少年或成人),非母乳喂养的婴儿,补充有配方或人乳强化剂的母乳喂养的婴儿,免疫衰老的成人和老年人,绝经期妇女,绝经后的妇女,化疗后的患者,免疫系统受损的个体,具有 AIDS 的个体等。早产儿、婴儿、儿童、青少年、成人和老年人可能由于家族史、年龄、环境和 / 或生活方式而易患状况或疾病或处于状况

或疾病的升高风险中。基于上述情况,因为本公开的一些利用唾液酸化的人乳寡糖的方法实施方案涉及经鉴定的个体的特定子集或亚类(即,在解决本文中指出的一种或多种特定疾病或特定状况中“需要”帮助的个体的子集或亚类),所以不是所有个体都将落在对于某些疾病或状况的本文所述的个体的子集或亚类中。

[0050] 在本公开的其它实施方案中,通过向个体施用增强个体中的T细胞调节性应答的有效量的岩藻糖基化的人乳寡糖而增强个体中的细胞介导的免疫。在向个体施用之后,岩藻糖基化的人乳寡糖诱导防止或抑制慢性疾病或炎症的调节性应答,以增强个体中的T细胞调节性应答。

[0051] 可以将岩藻糖基化的人乳寡糖施用于总体健康的个体,或可以施用于需要增强的T细胞调节性应答的个体子集。特别需要增强的T细胞调节性应答的一些个体可以包括易于过敏的婴儿、儿童、青少年或成人(易患过敏或处于过敏的升高风险中的婴儿、儿童、青少年或成人),易患自身免疫性疾病的婴儿、儿童、青少年或成人(易患自身免疫性疾病或处于自身免疫性疾病的升高风险中的婴儿、儿童、青少年或成人),非母乳喂养的婴儿,补充有配方或人乳强化剂的母乳喂养的婴儿,老年人,免疫衰老的成人和老年人,绝经期妇女,绝经后的妇女,具有慢性炎性肠病的个体等。早产儿、婴儿、儿童、青少年、成人和老年人可能由于家族史、年龄、环境和/或生活方式而易患状况或疾病或处于状况或疾病的升高风险中。基于上述情况,因为本公开的一些使用岩藻糖基化的人乳寡糖的方法实施方案涉及经鉴定的个体的特定子集或亚类(即,在解决本文中指出的一种或多种特定疾病或特定状况中“需要”帮助的个体的子集或亚类),所以不是所有个体都将落在对于某些疾病或状况的本文所述的个体的子集或亚类中。

[0052] 在本公开的另一个期望的实施方案中,通过向个体施用有效量的增强个体中的T细胞介导的应答的唾液酸化的人乳寡糖和诱导个体中的调节性应答的岩藻糖基化的人乳寡糖的组合而增强个体中的细胞介导的免疫。在向个体施用之后,唾液酸化的人乳寡糖促进个体中的T细胞介导的抗病毒、抗细菌、抗真菌、抗原生动物和抗癌应答,以增强个体中的细胞介导的应答,且岩藻糖基化的人乳寡糖诱导防止或抑制慢性疾病或炎症的调节性应答。出乎意料地,唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的组合表明增加的T细胞介导的应答/功能和增加的调节两者的益处。因此,已经令人惊讶地发现,唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的功能性不是相互排斥的,且它们可以组合使用,以通过防止或抑制感染性疾病和癌症且不诱导可以降低来自施用人乳寡糖的总体益处的慢性炎症应答或状况而增强个体中平衡的免疫应答。此外,通过改变施用于个体的营养组合物中唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的量的比率,现在可能在不诱导总体免疫抑制的情况下抑制慢性炎性状况,或在不诱导不需要的炎症的情况下增强受抑制的免疫状况。

[0053] 可以将唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的组合施用于总体健康的个体,或可以施用于需要增强的T细胞介导的应答和T细胞调节性应答的个体子集。特别需要增强的T细胞介导的应答和增强的T细胞调节性应答的一些个体可以包括易于过敏的婴儿、儿童、青少年或成人(易患过敏或处于过敏的升高风险中的婴儿、儿童、青少年或成人),易患自身免疫性疾病的婴儿、儿童、青少年或成人(易患自身免疫性疾病或处于自身免疫性疾病的升高风险中的婴儿、儿童、青少年或成人),非母乳喂养的婴儿,补充有配方或人乳强化剂的母乳喂养的婴儿,老年人,免疫衰老的成人和老年人,绝经期妇女,绝经后的妇女,化疗后

的患者,免疫系统受损的个体,具有 AIDS 的个体,具有慢性炎性肠病的个体等。早产儿、婴儿、儿童、青少年、成人和老年人可能由于家族史、年龄、环境和 / 或生活方式而易患状况或疾病或处于状况或疾病的升高风险中。基于上述情况,因为本公开的一些使用唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖的方法实施方案涉及经鉴定的个体的特定子集或亚类(即,在解决本文中指出的一种或多种特定疾病或特定状况中“需要”帮助的个体的子集或亚类),所以不是所有个体都将落在对于某些疾病或状况的本文所述的个体的子集或亚类中。

[0054] 在本公开的一个实例中,早产儿或足月儿配方可以包括唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖两者的组合,以支持平衡的效应免疫应答。在本公开的另一个实例中,早产儿或足月儿配方可以包括相比于唾液酸化的人乳寡糖更高水平的岩藻糖基化的人乳寡糖,以防止或降低过敏性疾病、自身免疫性疾病或慢性炎性疾病。在本公开的另一个实例中,成人营养物可以包括相比于唾液酸化的人乳寡糖更高水平的岩藻糖基化的人乳寡糖,以抑制过敏性疾病、自身免疫性疾病或慢性炎性疾病。在本公开的另一个实例中,成人营养物可以含有相比于岩藻糖基化的人乳寡糖更高水平的唾液酸化的人乳寡糖,并且与癌症治疗或针对 HIV 和 AIDS 的治疗组合。

#### [0055] 唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖

本公开用于调节细胞介导的免疫的方法利用包括唾液酸化的人乳寡糖、岩藻糖基化的人乳寡糖或唾液酸化的人乳寡糖和岩藻糖基化的人乳寡糖的组合的营养组合物。在一些实施方案中,营养组合物包括唾液酸化的人乳寡糖,且基本上无岩藻糖基化的人乳寡糖。在其它实施方案中,营养组合物包括岩藻糖基化的人乳寡糖,且基本上无唾液酸化的人乳寡糖。

[0056] 营养组合物可以任选地包括如本文中指出的一种或多种额外的人乳寡糖。营养组合物中使用的一种或多种人乳寡糖可从哺乳动物分泌的乳中分离或富集,所述哺乳动物包括但不限于:人、牛、绵羊、猪或山羊物种。人乳寡糖也可经由微生物发酵、酶促方法、化学合成或其组合来产生。

[0057] 适合用于营养组合物中使用的唾液酸化的人乳寡糖在寡糖骨架中包括至少一个唾液酸残基。唾液酸化的人乳寡糖还可以包括两个或更多个唾液酸残基。用于本公开中使用的唾液酸化的人乳寡糖的特定非限制性实例包括唾液酸寡糖、唾液酸(即,游离唾液酸、脂质结合唾液酸、蛋白质结合唾液酸)、乳酰唾液酸四糖(lactosialotetraose)、3'-唾液酸-3-岩藻糖基乳糖、二唾液酸单岩藻糖基乳酰-N-新六糖、单岩藻糖基单唾液酸乳酰-N-八糖(唾液酸 Lea)、唾液酸乳酰-N-岩藻六糖 II、二唾液酸乳酰-N-岩藻五糖 II、单岩藻糖基二唾液酸乳酰-N-四糖)、唾液酸岩藻糖基寡糖、2'-唾液酸乳糖、2-唾液酸乳糖胺、3'-唾液酸乳糖、3'-唾液酸乳糖胺、6'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖胺、唾液酸乳酰-N-新四糖 c、单唾液酸乳酰-N-六糖、二唾液酸乳酰-N-六糖 I、单唾液酸乳酰-N-新六糖 I、单唾液酸乳酰-N-新六糖 II、二唾液酸乳酰-N-新六糖、二唾液酸乳酰-N-四糖、二唾液酸乳酰-N-六糖 II、唾液酸乳酰-N-四糖 a、二唾液酸乳酰-N-六糖 I、唾液酸乳酰-N-四糖 b、唾液酸-乳酰-N-四糖 a、唾液酸-乳酰-N-四糖 b、唾液酸-乳酰-N-四糖 c、唾液酸-岩藻糖基-乳酰-N-四糖 I、唾液酸-岩藻糖基-乳酰-N-四糖 II、二唾液酸-乳酰-N-四糖及其组合。特别期望的唾液酸化的人乳寡糖包括 3' 唾液酸乳糖、6' 唾液酸乳糖及其组合。

[0058] 用于本公开中使用的岩藻糖基化的人乳寡糖的特定非限制性实例包括岩藻糖基

寡糖,乳酰-N-岩藻五糖 I、乳酰-N-岩藻五糖 II、2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳酰-N-岩藻五糖 III、乳酰-N-二岩藻六糖 I、乳酰二岩藻四糖、单岩藻糖基乳酰-N-六糖 II、异构岩藻糖基化乳酰-N-六糖 (1)、异构岩藻糖基化乳酰-N-六糖 (3)、异构岩藻糖基化乳酰-N-六糖 (2)、二岩藻糖基-对-乳酰-N-新六糖、二岩藻糖基-对-乳酰-N-六糖、二岩藻糖基乳酰-N-六糖单岩藻糖基乳酰-新八糖、单岩藻糖基乳酰-N-八糖、二岩藻糖基乳酰-N-八糖 I、二岩藻糖基乳酰-N-八糖 II、二岩藻糖基乳酰-N-新八糖 II、二岩藻糖基乳酰-N-新八糖 I、乳酰-N-岩藻五糖 V、乳酰-N-十糖 (decaose)、三岩藻糖基乳酰-N-新八糖、三岩藻糖基乳酰-N-八糖、三岩藻糖基-异-乳酰-N-八糖、乳酰-N-二岩藻-六糖 II 及其组合。特别期望的岩藻糖基化的人乳寡糖包括 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖及其组合。

[0059] 用于本公开的方法中使用的营养组合物中可以包括的人乳寡糖的其它合适的实例包括乳酰-N-六糖、对-乳酰-N-六糖、乳酰-N-新六糖、对-乳酰-N-新六糖、乳酰-N-新八糖、对-乳酰-N-八糖 (octanose)、异-乳酰-N-八糖、乳酰-N-八糖及其组合。

[0060] 唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖 (和任何其它任选的人乳寡糖) 以营养组合物中总的人乳寡糖的至少 0.001 mg/mL, 包括至少 0.01 mg/mL, 包括 0.001 mg/mL 至约 20 mg/mL, 包括约 0.01 mg/mL 至约 20 mg/mL, 包括 0.001 mg/mL 至约 10 mg/mL, 包括约 0.01 mg/mL 至约 10 mg/mL, 包括 0.001 mg/mL 至约 5 mg/mL, 包括约 0.01 mg/mL 至约 5 mg/mL, 包括 0.001 mg/mL 至约 1 mg/mL, 包括 0.001 mg/mL 至约 0.23 mg/mL, 包括约 0.01 mg/mL 至约 0.23 mg/mL 的营养组合物中人乳寡糖的总量 (每 mL 组合物中人乳寡糖的 mg) 存在于营养组合物中。通常,营养组合物中存在的特定唾液酸化的人乳寡糖和 / 或岩藻糖基化的人乳寡糖的量将取决于特定人乳寡糖或营养组合物中存在的人乳寡糖和其它组分的量,包括任何任选的人乳寡糖的量。

[0061] 在一个实施方案中,当营养组合物为营养粉时,营养粉中人乳寡糖的总浓度为约 0.0005% 至约 5%,包括约 0.01% 至约 1% (以营养粉的重量计)。

[0062] 在其他实施方案中,当营养产品为即食型营养液时,即食型营养液中人乳寡糖的总浓度为约 0.0001% 至约 0.50%,包括约 0.001% 至约 0.15%,包括约 0.01% 至约 0.10%,且进一步包括约 0.01% 至约 0.03% (以即食型营养液的重量计)。

[0063] 在其他实施方案中,当营养产品为浓缩营养液时,浓缩营养液中人乳寡糖的总浓度为约 0.0002% 至约 0.60%,包括约 0.002% 至约 0.30%,包括约 0.02% 至约 0.20%,且进一步包括约 0.02% 至约 0.06% (以浓缩营养液的重量计)。

#### [0064] 长链多不饱和脂肪酸 (LCPUFAs)

除了上述人乳寡糖以外,营养组合物可任选地包括 LCPUFAs。LCPUFAs 包括在营养组合物中以提供营养支持,以及减少氧化应激并增强肠道上皮及相关免疫细胞群体的生长和功能发育。

[0065] 用于营养组合物中的示例性 LCPUFAs 包括例如  $\omega$ -3 LCPUFAs 和  $\omega$ -6 LCPUFAs。特定 LCPUFAs 包括二十二碳六烯酸 (DHA)、二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳五烯酸 (DPA)、花生四烯酸 (ARA)、亚油酸、亚麻酸 ( $\alpha$  亚麻酸) 和  $\gamma$ -亚麻酸,其源自油来源 (诸如植物油、海洋浮游生物、真菌油和鱼油)。在一个特定实施方案中,LCPUFAs 来源于鱼油,诸如鲱鱼 (menhaden)、鲑鱼、鱈鱼、鳕鱼、大比目鱼、鲔鱼或青鱼 (herring) 油。与 HMOs 一起用于营养

组合物中的特别优选的 LCPUFAs 包括 DHA、ARA、EPA、DPA 及其组合。

[0066] 为了减少营养组合物中高剂量 LCPUFAs 的潜在副作用, LCPUFAs 的含量优选不超过营养组合物中总脂肪含量的约 3 重量 %, 包括低于总脂肪含量的 2 重量 %, 且包括低于总脂肪含量的 1 重量 %。

[0067] LCPUFA 可作为游离脂肪酸、以甘油三酯形式、以甘油二酯形式、以甘油单酯形式、以磷脂形式、以酯化形式或作为上述中一种或多种的混合物, 优选以甘油三酯形式提供。

[0068] 如本文所述的营养组合物通常将包含总浓度为约 0.01 mM 至约 10 mM 且包括约 0.01 mM 至约 1 mM 的 LCPUFA。或者, 营养组合物包含总浓度为约 0.001 g/L 至约 1 g/L 的 LCPUFA。

#### [0069] 抗氧化剂

另外, 营养组合物可任选地包含与人乳寡糖组合的一种或多种抗氧化剂以提供营养支持, 以及减少氧化应激。

[0070] 可包括适于口服施用的任何抗氧化剂以用于本公开的营养组合物中, 包括例如维生素 A、维生素 E、维生素 C、视黄醇、生育酚和类胡萝卜素 (包括例如叶黄素、β - 胡萝卜素、玉米黄素和番茄红素及其组合)。

[0071] 营养组合物可包含叶黄素、番茄红素、玉米黄素和 β - 胡萝卜素中的至少一种以提供约 0.001 μg/mL 至约 10 μg/mL 的类胡萝卜素总量。更具体而言, 营养组合物包含叶黄素的量为约 0.001 μg/mL 至约 10 μg/mL, 包括约 0.001 μg/mL 至约 5 μg/mL, 包括约 0.001 μg/mL 至约 0.0190 μg/mL, 包括约 0.001 μg/mL 至约 0.0140 μg/L, 且也包括约 0.044 μg/mL 至约 5 μg/mL 的叶黄素。通常也优选的是, 营养组合物包含约 0.001 μg/mL 至约 10 μg/mL, 包括约 0.001 μg/mL 至约 5 μg/mL, 约 0.001 μg/mL 至约 0.0130 μg/mL, 包括约 0.001 μg/mL 至约 0.0075 μg/mL, 且也包括约 0.0185 μg/mL 至约 5 μg/mL 番茄红素。通常也优选的是, 营养组合物包含约 1 μg/mL 至约 10 μg/mL, 包括约 1 μg/mL 至约 5 μg/mL, 包括约 0.001 μg/mL 至约 0.025 μg/mL, 包括约 0.001 μg/mL 至约 0.011 μg/mL, 且也包括约 0.034 μg/mL 至约 5 μg/mL β - 胡萝卜素。应理解, 这些量的 β - 胡萝卜素、叶黄素、玉米黄素和番茄红素的任何组合可包括在本公开的营养组合物中。其它类胡萝卜素可任选包括在本文所述的营养组合物中。本文所述的营养组合物中所包括的类胡萝卜素的任何一种或全部可来自天然来源, 或经人工合成。

#### [0072] 核苷酸

除了人乳寡糖以外, 本公开的营养组合物可额外任选地包括核苷酸和 / 或选自核苷、嘌呤碱基、嘧啶碱基、核糖和脱氧核糖的核苷酸前体。所述核苷酸可呈单磷酸盐、二磷酸盐或三磷酸盐形式。核苷酸可为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。核苷酸可为单体、二聚的或多聚的 (包括 RNA 和 DNA)。核苷酸可以作为游离酸或以盐 (优选为单钠盐) 形式存在于营养组合物中。

[0073] 适合用于营养组合物中的核苷酸和 / 或核苷包括以下一种或多种 :5' - 单磷酸胞苷、5' - 单磷酸尿苷、5' - 单磷酸腺苷、5' - 1 - 单磷酸鸟苷和 / 或 5' - 单磷酸肌苷, 更优选 5' - 单磷酸胞苷、5' - 单磷酸尿苷、5' - 单磷酸腺苷、5' - 单磷酸鸟苷和 5' - 单磷酸肌苷。

[0074] 核苷酸以至少 5 mg/L, 包括至少 10 mg/L, 包括约 10 mg/L 至约 200 mg/L, 包括约 42 mg/L 至约 102 mg/L, 且包括至少约 72 mg/L 营养产品的核苷酸总量存在于营养产品中。

**[0075] 大量营养素**

包括人乳寡糖的营养组合物可配制为包括蛋白质、脂肪和碳水化合物中的至少一种。在许多实施方案中，营养组合物将包括人乳寡糖与蛋白质、碳水化合物和脂肪。

**[0076]** 尽管脂肪、蛋白质和碳水化合物的总浓度或量可根据产品类型（即，人乳强化剂、早产儿配方、婴儿配方、儿童配方、成人配方、医疗配方等）、产品形式（即，营养固体、粉末、即食型液体或浓缩液体）和预期使用者的目标膳食需求而变化，但此类浓度或量最通常落在以下实施范围之一内，包括如本文所述的任何其它基本脂肪、蛋白质和 / 或碳水化合物成分。

**[0077]** 对于婴儿和成人配方，碳水化合物浓度最通常在约 5 重量 % 至约 40 重量 % 的范围内，包括约 7 重量 % 至约 30 重量 %，包括约 10 重量 % 至约 25 重量 %；脂肪浓度最通常在约 1 重量 % 至约 30 重量 % 的范围内，包括约 2 重量 % 至约 15 重量 %，且也包括约 3 重量 % 至约 10 重量 %；和蛋白质浓度最通常在约 0.5 重量 % 至约 30 重量 % 的范围内，包括约 1 重量 % 至约 15 重量 %，且也包括约 2 重量 % 至约 10 重量 %。

**[0078]** 本文所述的任何液体营养组合物中碳水化合物、脂肪和 / 或蛋白质的量也可除了如下表中所示作为占液体营养组合物总卡路里的百分数外的方式或以替代方式来表征。用于本公开液体营养组合物的这些大量营养素最通常在下表中所述的任何热量范围（实施方案 A-F）内配制（在每个数值前置术语“约”）。

营养素%总卡路里	实施方案 A	实施方案 B	实施方案 C
碳水化合物	0-98	2-96	10-75
蛋白质	0-98	2-96	5-70
脂肪	0-98	2-96	20-85
营养素%总卡路里	实施方案 D	实施方案 E	实施方案 F
碳水化合物	30-50	25-50	25-50
蛋白质	15-35	10-30	5-30
脂肪	35-55	1-20	2-20

**[0079]** 在一个具体实施方案中，液体婴儿配方（即食型和浓缩液体二者）包括如下那些实施方案，其中蛋白质组分可占配方热量含量的约 7.5% 至约 25%；碳水化合物组分可占婴儿配方总热量含量的约 35% 至约 50%；且脂肪组分可占婴儿配方总热量含量的约 30% 至约 60%。这些范围仅作为实例提供，且不欲限制。其它适合的范围如下表中所示（在每个数值前置术语“约”）。

营养素%总卡路里	实施方案 G	实施方案 H	实施方案 I
碳水化合物：	20-85	30-60	35-55
脂肪：	5-70	20-60	25-50
蛋白质：	2-75	5-50	7-40

**[0080]** 当营养产品为粉状早产儿或足月儿配方时，以早产儿或足月儿配方的重量计，蛋白质组分存在的量为约 5% 至约 35%，包括约 8% 至约 12%，且包括约 10% 至约 12%；以早产儿或足月儿配方的重量计，脂肪组分存在的量为约 10% 至约 35%，包括约 25% 至约 30%，且包括约 26% 至约 28%；和以早产儿或足月儿配方的重量计，碳水化合物组分存在的量为约 30% 至约 85%，包括约 45% 至约 60%，包括约 50% 至约 55%。

**[0081]** 对于粉状人乳强化剂，以人乳强化剂的重量计，蛋白质组分存在的量为约 1% 至约

55%，包括约 10% 至约 50%，且包括约 10% 至约 30%；以人乳强化剂的重量计，脂肪组分存在的量为约 1% 至约 30%，包括约 1% 至约 25%，且包括约 1% 至约 20%；和以人乳强化剂的重量计，碳水化合物组分存在的量为约 15% 至约 75%，包括约 15% 至约 60%，包括约 20% 至约 50%。

[0082] 本公开的粉状营养组合物中脂肪、碳水化合物和蛋白质的总量或浓度可根据所选组合物和预期使用者的膳食或医疗需求而显著变化。下文阐述大量营养素浓度的其它适合实例。在此情形下，总量或浓度是指粉状产品中的所有脂肪、碳水化合物和蛋白质来源。对于粉状营养组合物，此类总量或浓度最通常且优选以下表中所述的任何具体范围来配制（在每个数值前置术语“约”）。

营养素%总卡路里	实施方案 J	实施方案 K	实施方案 L
碳水化合物	1-85	30-60	35-55
脂肪	5-70	20-60	25-50
蛋白质	2-75	5-50	7-40

### [0083] 脂肪

本公开的方法中使用的营养组合物可包括一种或多种脂肪来源。适合用于本文中的其它脂肪来源包括适合用于口服营养产品中且与此类产品的要素和特点相容的任何脂肪或脂肪来源。例如，在一个特定实施方案中，其它脂肪来源于短链脂肪酸。

[0084] 适合用于本文所述的营养产品中的脂肪或其来源的其它非限制性实例包括椰子油、分馏椰子油、大豆油、玉米油、橄榄油、红花油、高油酸红花油、油酸 (EMERSOL 6313 OLEIC ACID, Cognis Oleochemicals, Malaysia)、MCT 油（中链甘油三酯）、向日葵油、高油酸向日葵油、棕榈和棕榈仁油、棕榈油精 (palm olein)、芥花籽油 (canola oil)、海洋油 (marine oils)、鱼油、真菌油、海藻油、棉籽油及其组合。

### [0085] 蛋白质

本公开的方法中使用的营养组合物可任选进一步包含蛋白质。适合用于口服营养组合物且与此类产品的要素和特点相容的任何蛋白质来源适合用于营养组合物中。

[0086] 适合用于营养产品中的蛋白质或其来源的非限制性实例包括水解、部分水解或非水解蛋白质或蛋白质来源，其可来源于任何已知或另外适合的来源，例如乳（例如，酪蛋白、乳清）、动物（例如，肉、鱼）、谷类（例如，稻、玉米）、植物（例如，大豆、豌豆）或其组合。此类蛋白质的非限制性实例包括乳蛋白分离物、如本文所述的乳蛋白浓缩物、酪蛋白分离物、高度水解酪蛋白、乳清蛋白、酪蛋白钠或酪蛋白钙、全牛乳、部分或完全脱脂乳、大豆蛋白分离物、大豆蛋白浓缩物、完整豌豆蛋白浓缩物、完整豌豆蛋白分离物、水解豌豆蛋白浓缩物、水解豌豆蛋白分离物等。在一个具体实施方案中，营养组合物包括来源于人和 / 或牛来源的乳蛋白的蛋白质来源。

### [0087] 碳水化合物

如本公开的方法中使用的营养产品可进一步任选包含适合用于口服营养产品中且与此类产品的要素和特点相容的任何碳水化合物。

[0088] 适合用于本文所述的营养产品中的碳水化合物或其来源的非限制性实例可包括麦芽糊精、水解或改性淀粉或玉米淀粉、葡萄糖聚合物、玉米糖浆、玉米糖浆固体、来源于稻的碳水化合物、来源于豌豆的碳水化合物、来源于马铃薯的碳水化合物、木薯淀粉、蔗糖、葡萄糖、果糖、乳糖、高果糖玉米糖浆、蜂蜜、糖醇（例如，麦芽糖醇、赤藓糖醇、山梨糖醇）、人

造甜味剂（例如，三氯蔗糖、乙酰磺胺酸钾、甜菊糖（stevia））及其组合。特别期望的碳水化合物为低葡萄糖当量（DE）麦芽糊精。

[0089] 其它任选成分

如本公开的方法中使用的营养组合物可进一步包含其它任选的组分，其可改变产品的物理、化学、美观或加工特征或当用于目标群体时充当药物或其它营养组分。许多此类任选成为已知的或另外适合用于医疗食物或其它营养产品或药物剂型中且也可用于本文的组合物中，条件是此类任选的成分对于口服施用为安全的且与所选产品形式中的基本和其它成分相容。

[0090] 此类任选的成分的非限制性实例包括防腐剂、乳化剂、缓冲剂、果寡糖、半乳寡糖、聚右旋糖（polydextrose）和其它益生元（prebiotics）、益生菌（probiotics）、药物活性剂、抗炎剂、如本文所述的其它营养素、着色剂、调味剂、增稠剂和稳定剂、乳化剂、润滑剂等。

[0091] 营养组合物可进一步包含甜味剂，优选包括至少一种糖醇，诸如麦芽糖醇、赤藓糖醇、山梨糖醇、木糖醇、甘露糖醇、异麦芽酮糖醇（isomalt）和乳糖醇，且也优选包括至少一种人造或高效力甜味剂，诸如乙酰磺胺酸钾、阿斯巴甜、三氯蔗糖、糖精、甜菊糖和塔格糖。这些甜味剂，尤其是糖醇与人造甜味剂的组合，尤其用于配制具有所需味道概况的本公开液体饮料实施方案。这些甜味剂组合尤其有效掩蔽有时与液体饮料中添加植物蛋白相关的不受欢迎的味道。以营养产品的重量计，营养产品中任选的糖醇浓度的范围可为至少0.01%，包括约0.1%至约10%，且也包括约1%至约6%。以营养产品的重量计，任选的人造甜味剂浓度的范围可为至少0.01%，包括约0.05%至约5%，也包括约0.1%至约1.0%。

[0092] 流动剂或防结块剂可包括在如本文所述的营养组合物中以延缓粉末随时间凝块或结块并使得粉末实施方案容易从其容器流出。已知或另外适合用于营养粉或产品形式中的任何已知流动剂或防结块剂适用于本文，其非限制性实例包括磷酸三钙、硅酸盐及其组合。营养组合物中流动剂或防结块剂的浓度根据产品形式、其它所选成分、期望的流动性质等而变化，但以营养组合物的重量计，最通常的范围可为约0.1%至约4%，包括约0.5%至约2%。

[0093] 稳定剂也可包括在营养组合物中。已知或另外适合用于营养组合物中的任何稳定剂也适用于本文，其一些非限制性实例包括胶，诸如黄原胶（xanthan gum）。以营养组合物的重量计，稳定剂可占约0.1%至约5.0%，包括约0.5%至约3%，包括约0.7%至约1.5%。

[0094] 营养组合物可进一步包含各种其它维生素或相关营养素中的任一种，其非限制性实例包括维生素A、维生素D、维生素E、维生素K、硫胺素、核黄素、吡哆醇、维生素B<sub>12</sub>、类胡萝卜素（例如，β-胡萝卜素、玉米黄素、叶黄素、番茄红素）、烟酸、叶酸、泛酸、生物素、维生素C、胆碱、肌醇、其盐和衍生物及其组合。

[0095] 营养组合物可进一步包含各种其它另外矿物质中的任一种，其非限制性实例包括钙、磷、镁、铁、锌、锰、铜、钠、钾、钼、铬、氯化物及其组合。

[0096] 制造方法

本公开的营养组合物可通过用于制备所选产品固体或液体形式的任何已知或另外有效的制造技术来制备。已知用于任何给定产品形式（诸如营养液或营养粉）的许多此类技术且其可容易由本领域普通技术人员应用于本文所述的营养组合物。

[0097] 因此,本公开的营养组合物可通过各种已知或另外有效配制或制造方法中的任一种来制备。在一种适合的制造方法中,例如制备至少三种单独的浆料,包括脂肪包蛋白质(protein-in-fat, PIF)浆料、碳水化合物-矿物质(CHO-MIN)浆料和水包蛋白质(protein-in-water, PIW)浆料。PIF浆料通过加热和混合油(例如,芥花籽油、玉米油等),然后在持续加热和搅拌下添加乳化剂(例如,卵磷脂)、脂溶性维生素和一部分总蛋白质(例如,乳蛋白浓缩物等)来形成。CHO-MIN浆料通过在加热搅拌下将以下添加至水中来形成:矿物质(例如,柠檬酸钾、磷酸氢二钾、柠檬酸钠等)、痕量和超痕量矿物质(TM/UTM预混物)、增稠剂或悬浮剂(例如微晶粉末纤维素、结冷胶、角叉菜胶)。所得的CHO-MIN浆料在持续加热和搅拌下保持10分钟,然后添加其它矿物质(例如,氯化钾、碳酸镁、碘化钾等)和/或碳水化合物(例如,HM0s、果寡糖、蔗糖、玉米糖浆等)。然后PIW浆料通过在加热和搅拌下与其余蛋白质(若存在)混合来形成。

[0098] 然后将得到的浆料在加热搅拌下掺合在一起并将pH调至6.6-7.0,随后对组合物进行高温短时(HTST)处理,在此期间将组合物热处理、乳化和均质化,然后使其冷却。添加水溶性维生素和抗坏血酸,必要时将pH调至所需范围,添加调味剂,并添加水以达到所需的总固体水平。然后无菌包装组合物以形成无菌包装的营养乳状液。然后可进一步稀释、热处理和包装该乳状液以形成即食型或浓缩液体,或可将其热处理并随后作为可重构的粉末(例如喷雾干燥、干混、聚结粉末)加工和包装。

[0099] 营养固体诸如喷雾干燥的营养粉或干混的营养粉可通过适于制备和配制营养粉的任何已知或另外有效技术的集合来制备。

[0100] 例如,当营养粉为喷雾干燥的营养粉时,喷雾干燥步骤可同样包括已知或另外适合用于制造营养粉的任何喷雾干燥技术。已知许多不同喷雾干燥方法和技术用于营养领域,其全部均适合用于制造本文的喷雾干燥的营养粉。

[0101] 一种制备喷雾干燥的营养粉的方法包括形成和均质化包含预先消化的脂肪和任选蛋白质、碳水化合物和其它脂肪来源的含水浆料或液体,然后喷雾干燥该浆料或液体以产生喷雾干燥的营养粉。该方法可进一步包括喷雾干燥、干混或另外向喷雾干燥的营养粉中添加其它营养成分(包括本文所述的任一种或多种成分)的步骤。

[0102] 其它适合用于制备营养产品的方法例如描述于美国专利号6,365,218(Borschel等)、美国专利号6,589,576(Borschel等)、美国专利号6,306,908(Carlson等)、美国专利申请号20030118703A1(Nguyen等)中,其说明书在其据此一致的程度上通过引用并入本文。

[0103] 本申请涵盖增强有其需要的个体中细胞介导的免疫的方法,所述方法包括向有其需要的个体施用足以增强T细胞介导的应答的量的唾液酸化的人乳寡糖的营养组合物。

[0104] 本申请涵盖先前描述的方法,其中有其需要的个体选自易于过敏的婴儿、儿童、青少年或成人,易患自身免疫性疾病的婴儿、儿童、青少年或成人,非母乳喂养的婴儿,补充有配方或人乳强化剂的母乳喂养的婴儿,免疫衰老的成人和老年人,绝经期妇女,绝经后的妇女,化疗患者,免疫系统受损的个体,具有AIDS的个体及其组合。

[0105] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是液体,且包含0.001mg/mL至约20mg/mL的唾液酸化的人乳寡糖。本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是

液体,且包含 0.001 mg/mL 至约 10 mg/mL 的唾液酸化的人乳寡糖。本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是液体,且包含 0.001 mg/mL 至约 5 mg/mL 的唾液酸化的人乳寡糖。

[0106] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是粉末,且包含以粉末的重量计约 0.0005% 至约 5% 的唾液酸化的人乳寡糖。本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是粉末,且包含以粉末的重量计约 0.01% 至约 1% 的唾液酸化的人乳寡糖。

[0107] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述唾液酸化的人乳寡糖选自 3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖、乳酰唾液酸四糖 (lactosialotetraose) 及其组合。

[0108] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物基本上无岩藻糖基化的人乳寡糖。

[0109] 本申请涵盖增强有其需要的个体中细胞介导的免疫的方法,所述方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强 T 细胞调节性应答的量的岩藻糖基化的人乳寡糖的营养组合物。

[0110] 本申请涵盖先前描述的方法,其中有其需要的个体选自易于过敏的婴儿、儿童、青少年或成人,易患自身免疫性疾病的婴儿、儿童、青少年或成人,非母乳喂养的婴儿,补充有配方或人乳强化剂的母乳喂养的婴儿,免疫衰老的成人和老年人,绝经期妇女,绝经后的妇女,患有慢性炎性疾病个体及其组合。

[0111] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是液体,且包含 0.001 mg/mL 至约 20 mg/mL 的岩藻糖基化的人乳寡糖。本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是液体,且包含 0.001 mg/mL 至约 10 mg/mL 的岩藻糖基化的人乳寡糖。本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是液体,且包含 0.001 mg/mL 至约 5 mg/mL 的岩藻糖基化的人乳寡糖。

[0112] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是粉末,且包含以粉末的重量计约 0.0005% 至约 5% 的岩藻糖基化的人乳寡糖。

[0113] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是粉末,且包含以粉末的重量计约 0.01% 至约 1% 的岩藻糖基化的人乳寡糖。

[0114] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述岩藻糖基化的人乳寡糖选自 2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳酰-N-岩藻五糖 (lacto-N-fucopentaose)、单岩藻糖基乳酰-N-六糖及其组合。

[0115] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物基本上无唾液酸化的人乳寡糖。

[0116] 本申请涵盖增强有其需要的个体中细胞介导的免疫的方法,所述方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强 T 细胞介导的应答的量的唾液酸化的人乳寡糖和足以增强 T 细胞调节性应答的量的岩藻糖基化的人乳寡糖的营养组合物。

[0117] 本申请涵盖前面所述的方法,其中有其需要的个体选自易于过敏的婴儿、儿童、青少年或成人,易患自身免疫性疾病的婴儿、儿童、青少年或成人,非母乳喂养的婴儿,补充有配方或人乳强化剂的母乳喂养的婴儿,免疫衰老的成人和老年人,绝经期妇女,绝经后的妇女,化疗患者,患有慢性炎性疾病的个体,免疫系统受损的个体,具有 AIDS 的个体及其组合。

[0118] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是液体,且包含0.001 mg/mL至约20 mg/mL的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖。本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是液体,且包含0.001 mg/mL至约10 mg/mL的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖。本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是液体,且包含0.001 mg/mL至约5 mg/mL的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖。

[0119] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是粉末,且包含以粉末的重量计约0.0005%至约5%的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖。本申请涵盖先前描述的方法,其中所述营养组合物是粉末,且包含以粉末的重量计约0.01%至约1%的唾液酸化和岩藻糖基化的人乳寡糖。

[0120] 本申请涵盖先前描述的方法,其中所述唾液酸化的人乳寡糖选自3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖、乳酰唾液酸四糖及其组合,且所述岩藻糖基化的人乳寡糖选自2'-岩藻糖基乳糖、3'-岩藻糖基乳糖、乳酰-N-岩藻五糖、单岩藻糖基乳酰-N-六糖及其组合。

[0121] 本申请涵盖增强有其需要的个体中T细胞介导的应答的方法,所述方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强T细胞介导的应答的量的唾液酸化的人乳寡糖的营养组合物。

[0122] 本申请涵盖增强有其需要的个体中T细胞调节性应答的方法,所述方法包括向有其需要的个体施用包含足以增强T细胞调节性应答的量的岩藻糖基化的人乳寡糖的营养组合物。

[0123] 除非另外规定,如本文中所使用,所有百分数、份数和比例均以总组合物的重量计。除非另外规定,所有此类重量在其涉及所列成分时基于活性水平且因此不包括可包括于市售物质中的溶剂或副产物。

[0124] 如本文中所使用,数值范围意图包括该范围内的每个数目和数目的子集,无论是否明确地公开。此外,这些数值范围应视为对针对该范围内的任何数目或数目的子集的权利要求提供支持。例如,1至10的公开应视为支持2至8、3至7、5至6、1至9、3.6至4.6、3.5至9.9等的范围。

[0125] 除非另外规定或提及的上下文相反地清楚暗示,所有对本公开单数特征或限制的提及均应包括相应复数特征或限制,反之亦然。

[0126] 除非另外规定或提及组合的上下文相反地清楚暗示,如本文中所使用,方法或过程步骤的所有组合均可以任何顺序进行。

[0127] 本公开的营养组合物的各个实施方案也可以基本上无本文所述的任何任选或者选择的成分或特征,条件是其余营养组合物仍含有如本文所述的所有需要的成分或特征。在这种上下文中,除非另外规定,术语“基本上无”意指选择的营养组合物含有小于功能量的任选成分,典型地小于1重量%,包括小于0.5重量%,包括小于0.1重量%,且还包括0重量%的此类任选或选择成分。

[0128] 营养组合物和方法可包含下列,由下列组成,或基本上由下列组成:如本文所述的组合物和方法的基本要素以及本文所述或另外用于营养产品应用中的任何其它或任选的要素。

[0129] 尽管本公开已经通过描述几个实施方案进行说明,且尽管已相当详细地描述了说明性的实施方案,但是本申请人并不意在限定或以任何方式将所附权利要求的范围限制到

此类细节。额外的优点和修改对于本领域技术人员可以容易知道。

## 实施例

[0130] 以下实施例说明本公开的营养组合物的特定实施方案和 / 或特征。提供所述实施例仅出于说明的目的而并不应理解为限制本公开,因为在不脱离本公开的精神和范围的情况下其许多变化是可以的。除非另外规定,所有示例性的量均为基于组合物的总重量的重量百分数。

[0131] 示例性的组合物为根据本文所述的制造方法制备的储存稳定的营养组合物,从而使得除非另外规定,各示例性的组合物包括无菌处理的实施方案和蒸煮包装的实施方案。

### [0132] 实施例 1-5

实施例 1-5 说明本公开的即食型营养乳状液,其成分列于下表中。除非另外规定,所有成分量均以每 1000 千克批次产品的千克数列出。

### [0133] 实施例 1-5

成分	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5
水	适量(Q.S.)	适量	适量	适量	适量
脱脂炼乳	86.64	86.64	86.64	86.64	86.64
乳糖	54.80	54.80	54.80	54.80	54.80
高油酸红花油	14.10	14.10	14.10	14.10	14.10
大豆油	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6
椰子油	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1
3'唾液酸乳糖(3'SL)	0.0948	0.090	0.085	9.479	9.005
半乳寡糖(GOS)	8.63	8.63	8.63	8.63	8.63
乳清蛋白浓缩物	6.40	6.40	6.40	6.40	6.40
柠檬酸钾	478.9 g				
碳酸钙	448.28 g				
大豆卵磷脂	355.74 g				
稳定剂	355.74 g				
ARA油	368.01 g				
核苷酸/氯化物预混物	293.26 g				
氯化钾	226.45 g				
抗坏血酸	445.94 g				
维生素矿物质预混物	142.88 g				
DHA油	137.8 g				
角叉菜胶	180.0 g				
氯化镁	55.0 g				
硫酸亚铁	58.0 g				
氯化胆碱	53.9 g				
维生素A, D <sub>3</sub> , E, K <sub>1</sub> 预混物	47.4 g				
柠檬酸	29.77 g				
混合的类胡萝卜素预混物	26.40 g				
氯化钠	AN	AN	AN	AN	AN
L-肉碱	3.31 g				
磷酸三钙	15.65 g				
磷酸二氢钾	13.67 g				
核黄素	2.42 g				
氢氧化钾	AN	AN	AN	AN	AN

AN = 根据需要。

### [0134] 实施例 6-10

实施例 6-10 说明本公开的即食型营养乳状液,其成分列于下表中。除非另外规定,所

有成分量均以每 1000 千克批次产品的千克数列出。

[0135] 实施例 6-10

成分	实施例6	实施例7	实施例8	实施例9	实施例10
水	适量	适量	适量	适量	适量
脱脂炼乳	86.64	86.64	86.64	86.64	86.64
乳糖	54.80	54.80	54.80	54.80	54.80
高油酸红花油	14.10	14.10	14.10	14.10	14.10
大豆油	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6
椰子油	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1
HMO混合物	0.0948	0.0901	0.0853	9.479	9.0047
6'唾液酸乳糖(6'SL)	0.0316	0.0300	0.0284	0	0
2'岩藻糖基乳糖(2'FL)	0.0316	0.0300	0.0284	3.159	3.002
乳酰-N-新四糖(LNnT)	0.0316	0.0300	0.0284	0	0
半乳寡糖(GOS)	8.63	8.63	8.63	8.63	8.63
乳清蛋白浓缩物	6.40	6.40	6.40	6.40	6.40
柠檬酸钾	478.9 g				
碳酸钙	448.28 g				
大豆卵磷脂	355.74 g				
稳定剂	355.74 g				
ARA油	368.01 g				
核苷酸/氯化物预混物	293.26 g				
氯化钾	226.45 g				
抗坏血酸	445.94 g				
维生素矿物质预混物	142.88 g				
DHA油	137.8 g				
角叉菜胶	180.0 g				
氯化镁	55.0 g				
硫酸亚铁	58.0 g				
氯化胆碱	53.9 g				
维生素A, D3, E, K1 预混物	47.40 g				
柠檬酸	29.77 g				
混合的类胡萝卜素预混物	26.40 g				
氯化钠	AN	AN	AN	AN	AN
L-肉碱	3.31 g				
磷酸三钙	15.65 g				
磷酸二氢钾	13.67 g				
核黄素	2.42 g				
氢氧化钾	AN	AN	AN	AN	AN

AN = 根据需要。

[0136] 实施例 11

在本实施例中, 分析人乳寡糖 (HMOs) 对 T 细胞介导的免疫应答的影响。

[0137] 本实施例中使用的 HMOs 或 HMO 混合物包括 2' - 岩藻糖基乳糖 (2' FL)、3- 岩藻糖基乳糖 (3' FL)、3' - 唾液酸乳糖 (3' SL)、6' - 唾液酸乳糖 (6' SL)、乳酰-N-新四糖 (LNnT)、含有 2' FL:3FL 的比率为 85:15 的 2' FL 和 3FL 的 FL 混合物 (FL 混合物)、含有唾液酸 :3' SL:6' SL 的比率为 50:10:40 的唾液酸、3' SL 以及 6' SL 的 SL 混合物 (SL 混合物)、和从人乳中分离的 HMOs 的混合物 (HMO 混合物)。HMO 混合物的组成显示于下表中。通过 HPLC- 芯片 TOF MS 测定组成。

分类	HMO	总共的%
非岩藻糖基化的， 非唾液酸化的	LNT/LNnT	16.1
岩藻糖基化的	LNFP	8.9
	MFLNH	6.7
	2'FL	5.8
唾液酸化的	LST	11.1
	6'SL	2.1
	3'SL	1.1
岩藻糖基化的 且唾液酸化的	FS-LNnH	4.4
	FS-LNH	3.1
	F-LST	2.3

[0138] T-细胞介导的应答通过对T细胞促分裂原植物血凝素(PHA)的增殖应答进行评估(模拟感染)。从五只十日龄仔猪将血液收集到肝素化的 Vacutainer™管中,所述仔猪从出生起已喂食人工母猪配方 (artificial sow formula);这种人工母猪配方无任何人乳寡糖。使用标准的密度梯度 (Ficoll-Paque PLUS) 技术分离外周血单核细胞 (PBMC)。用低渗氯化铵溶液裂解残留的红细胞。将细胞洗涤,并以  $1 \times 10^6/\text{mL}$  的浓度重悬浮在 RPMI (Roswell Park Memorial Institute 培养基) 培养基中,所述 RPMI 培养基含有:10% 胎牛血清、2mM 谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠、20 mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、50 μg/mL 庆大霉素、1000 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素,然后在单独的浓度为 125 μg/mL 的各个 HMOs 或 HMO 混合物或其与 25 μg/mL PHA 的组合存在或不存在的情况下进行培养。将细胞培养 72 小时,并且使用标准氟化的胸苷掺入法测定细胞增殖。结果显示于图 1 和 2 中。

[0139] 如图 1 中显示,在 PHA 存在的情况下通过 SL 混合物和 HMO 混合物两者向细胞培养物添加唾液酸乳糖 (SL) 增强了外周血单核细胞增殖。这是预料不到的发现,因为 HMOs 的免疫修饰以前与先天免疫系统的抗炎作用或调节相关 (Jantscher-Krenn E 等, “Human Milk Oligosaccharides and Their Potential Benefits for the Breast-Fed Neonate”, *Minerva Pediatr* 64: 83-99, 2012)。此外, Kuntz 等 (2008) 报道, SL 暴露于胃肠道上皮细胞减少增殖并增加分化 (Kuntz S, 等, “Oligosaccharides from Human Milk Influence growth-related Characteristics of Intestinally Transformed and Non-Transformed Intestinal Cells”, *Br J of Nutr*, 99: 462-471, 2008)。与 Kuntz 报道一致, Eiwegger 等 (2004) 报道, 在八种酸性寡糖 (3' SL、6' SL、唾液酸-岩藻糖-唾液酸-乳酰-N-新六糖、乳酰唾液酸-四糖 (LST)a、LSTb、LSTc 和二唾液酸-乳酰 N-四糖 (DSLNT)) 的组合存在的情况下,一些细胞因子的脐带血 T 细胞诱导的调节与从幼稚到 1 型 (IFN-γ) 的分化相关,并且增加共表达 CD25 (活化标记物) 的 CD4+ T 细胞的百分比 (Eiwegger T, 等, “Human Milk-Derived Oligosaccharides and Plant-Derived Oligosaccharides Stimulate Cytokine Production of Cord Blood T-Cells in Vitro”, *Pediatr Res* 56: 536-540, 2004)。

[0140] 与无 HMO 的培养物相比,岩藻糖基乳糖 (FL) 没有显著增强增殖, LNnT 也没有,然而,含有 SL、FL 和 LNnT 的 HMO 混合物增强增殖。总之,这些发现表明,3' SL 和 / 或 6' SL 可能是 HMO 混合物中驱动显著增强的外周血单核细胞增殖的关键组分。尽管 SL 混合物含有游离唾液酸,但 HMO 混合物中没有游离的唾液酸,表明在没有游离唾液酸存在的情况下发

生增强的增殖。

[0141] 如图 2 中显示,向细胞培养物添加 FL 降低了未刺激的外周血单核细胞增殖。在含有 2' FL、3' FL、FL 混合物和 HMO 混合物的细胞培养物中注意到这种观察结果,但在含有任何形式的 SL 或 LNNT 的培养物中没有看到这一点,表明 HMO 混合物中驱动所述观察结果的组分可能是 FL。

[0142] 这些数据表明 SL 和 FL 对 T 细胞介导的免疫的差异影响。当 SL 增加 PHA 刺激的细胞中的 PBMC 增殖时,FL 降低未刺激的细胞中的 PBMC 增殖。此外,这些化合物以不相互排斥的方式影响增殖,即 HMO 混合物含有 SL 和 FL 化合物两者,但任一种形式的 HMO 都不抑制另一种形式的属性。HMO 混合物类似于 SL 混合物增加 PHA 刺激的细胞培养物中的增殖,而 HMO 混合物类似于 FL 化合物降低未刺激的细胞培养物中的增殖。

[0143] 细胞介导的免疫的调节是有益的,因为体外 PHA- 刺激通常被认为针对感染性微生物抗原或改变的“自我”的体内细胞介导的免疫的替代物。SL 形式对 PHA 增殖应答的增加表明细胞介导的免疫的增强,和由此,针对细胞内微生物病原体、真菌、原生动物和肿瘤细胞的增强的抗性。

[0144] 进一步,在细胞应答的诱导和威胁的减弱之后,机体必须使自身摆脱目前休眠的 (quiescent) 或未刺激的效应细胞的扩增数目的积累。因为 FL 的形式降低了未活化细胞的增殖,所以 FL 可增强免疫应答的消退 (resolution),从而减弱不受控制的炎症应答的发展。在组合中,如 HMO 混合物所示,SL 和 FL 增加针对细胞内微生物病原体 (病毒和细菌) 真菌、原生动物和肿瘤细胞的抗性,同时增强免疫应答的消退,从而防止不受控制的或慢性炎症应答。

#### [0145] 实施例 12

在本实施例中,分析和评估 2' FL 对 T 细胞调节的影响。

[0146] 对小鼠每天口服补充 200  $\mu$ L PBS 中的 7.5 mg 2' FL (n=5) 或 200  $\mu$ L PBS (n=5),持续 5 天。在第六天,使用标准方法处死小鼠,取出并分离来自肠系膜淋巴结的淋巴细胞。将肠系膜淋巴结淋巴细胞 (MLNL) 用针对 CD4 和 CD25 表面标记物特异性的荧光染料标记的单克隆抗体进行染色。然后将细胞用多聚甲醛溶液固定,以保持表面标记物染色完整性。将染色的 MLNL 用基于皂昔的溶液透化,以允许单克隆抗体的细胞内摄取,然后用针对转录因子 FoxP3 特异性的荧光染料标记的单克隆抗体进行染色。使用的所有细胞制备方法都基于单克隆抗体制造商的推荐方案。将 MLNL 悬浮液通过流式细胞术进行分析。FoxP3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD25<sup>+</sup> 细胞是分类的调节性 T 细胞。

[0147] 共表达 FoxP3、CD4 和 CD25 的调节性 T 细胞是胸腺来源的。这些细胞在防止针对自身和非自身抗原的异常应答中发挥关键作用,导致,例如防止自身免疫性疾病和过敏性疾病。因此,2' FL 通过生成调节性 T 细胞而防止异常免疫应答 (图 3) 以及通过如实施例 11 中显示的抑制未活化细胞的增殖而消退或维持适当的免疫应答 (图 2) 而调节细胞介导的免疫。

[0148] 总之,实施例 11 和 12 的数据支持 SL 和 FL 的组合对适当调节的 T 细胞介导的免疫应答的发展 / 增强。寡糖的这种组合的优点是针对细胞内微生物病原体、真菌、原生动物和肿瘤细胞的增加的抗性,感染性和 / 或炎性过程 (慢性炎症) 增加的消退和自身免疫性疾病和过敏性疾病的预防。单独的 SL 可以用于增强需要 T 细胞免疫增强的那些中缺乏的

T 细胞介导的免疫应答, 所述需要 T 细胞免疫增强的那些包括但不限于, 老人, 或者从各种形式的免疫抑制疗法诸如化疗恢复的那些, 或者患有免疫抑制状况诸如 HIV 的那些。单独的 FL 可用于预防或治疗过度旺盛的 (over-exuberant) 免疫应答, 包括但不限于, 过敏性疾病、自身免疫性疾病和慢性炎性疾病。

## PHA刺激的针对HMO的PBMC增殖应答

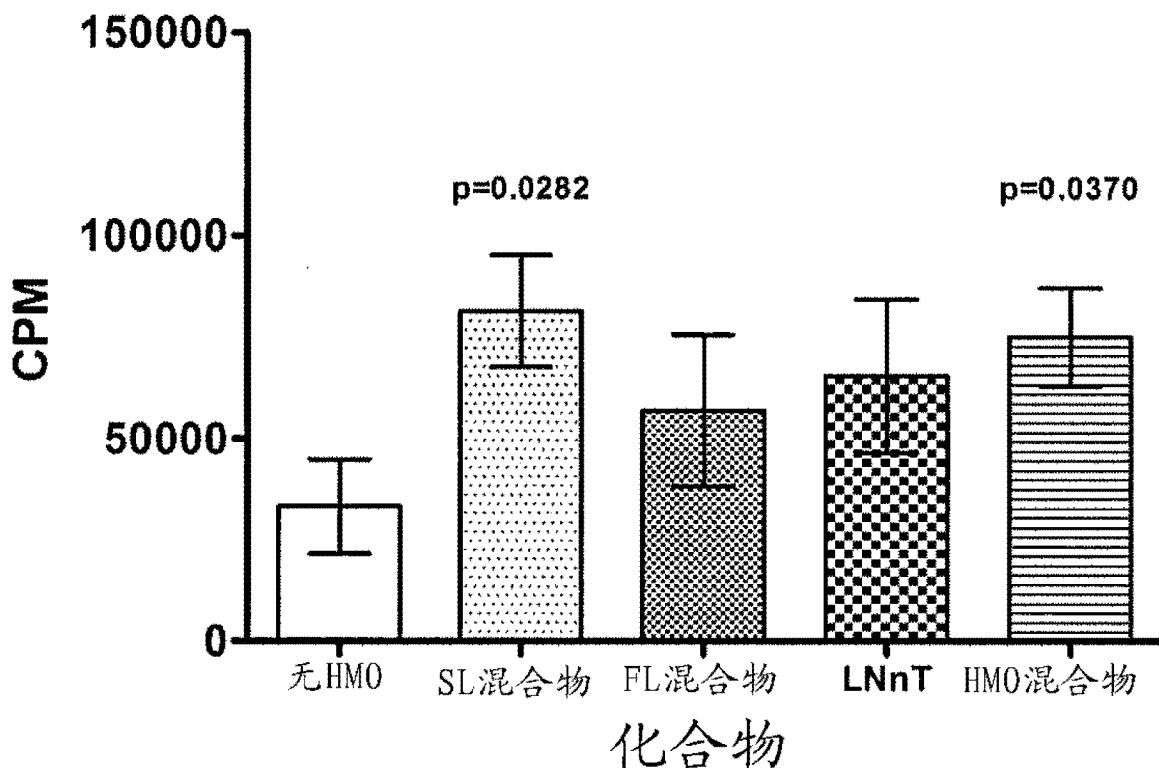
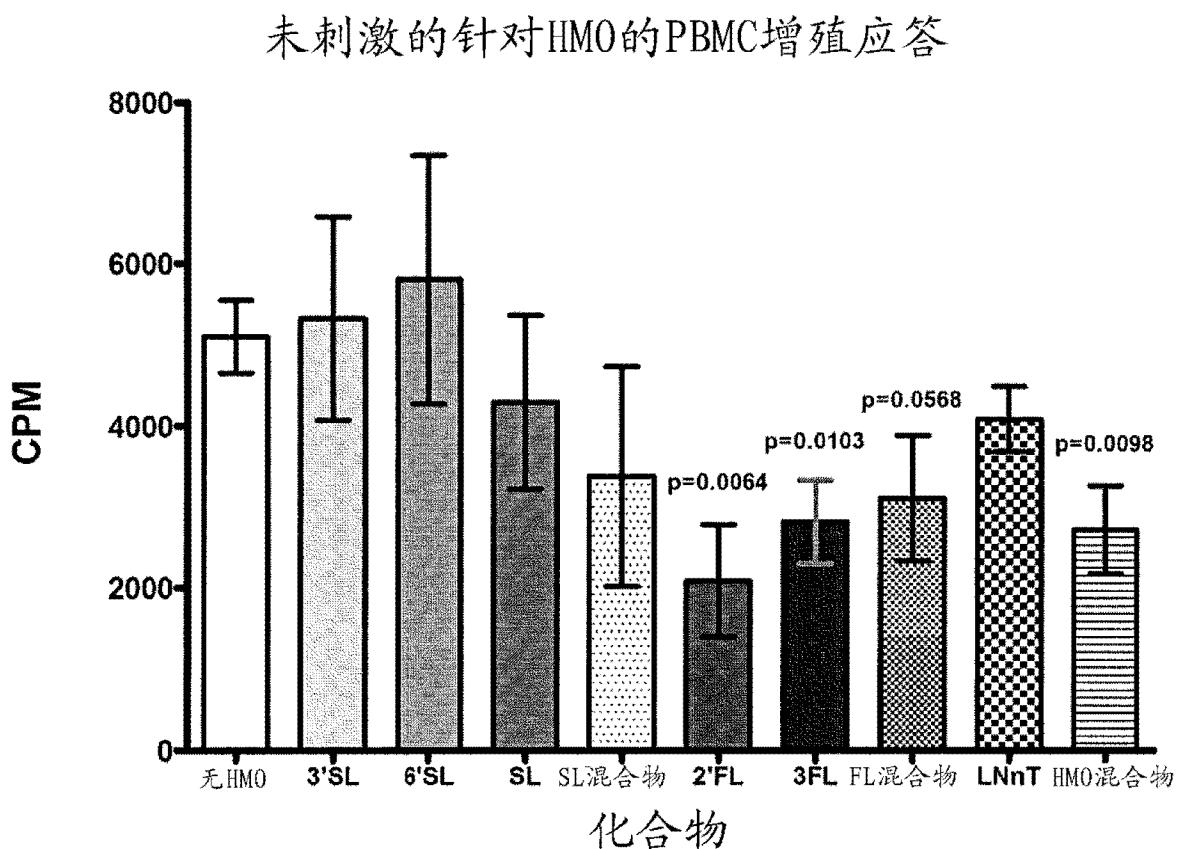


图 1



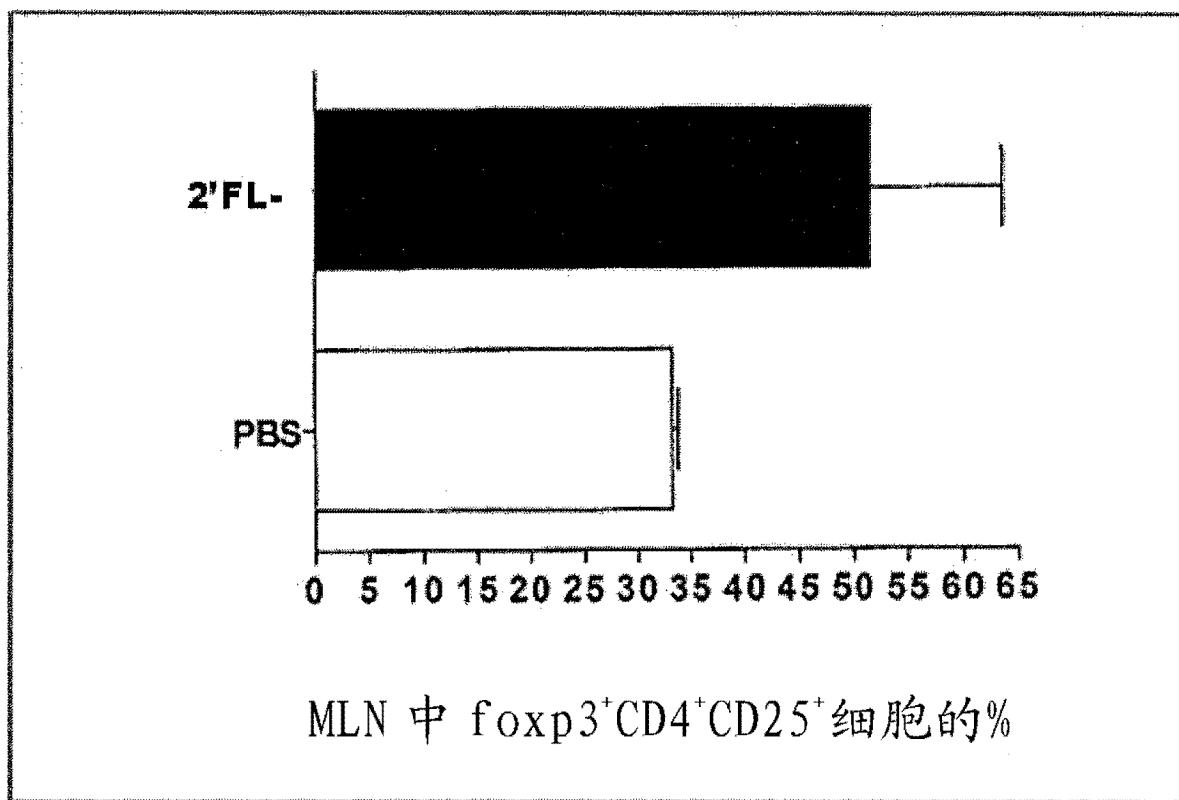


图 3