



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105407910 B

(45)授权公告日 2019.12.03

(21)申请号 201480038124.7

(22)申请日 2014.07.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105407910 A

(43)申请公布日 2016.03.16

(30)优先权数据
13175267.7 2013.07.05 EP
61/843,185 2013.07.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.12.31

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/064339 2014.07.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/001092 EN 2015.01.08

(73)专利权人 阿拉食品公司
地址 丹麦维比

(72)发明人 安妮·施陶特·科维斯特加德
彼得·朗堡·魏谢 莎伦·多诺万
玛西亚·H·毛纳科·西格尔
莎拉·S·康斯托克

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 李平 郑霞

(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)

(56)对比文件
W0 2013086459 A1,2013.06.13,
W0 0063241 A2,2000.10.26,
W0 9856404 A1,1998.12.17,
审查员 吕小蒙

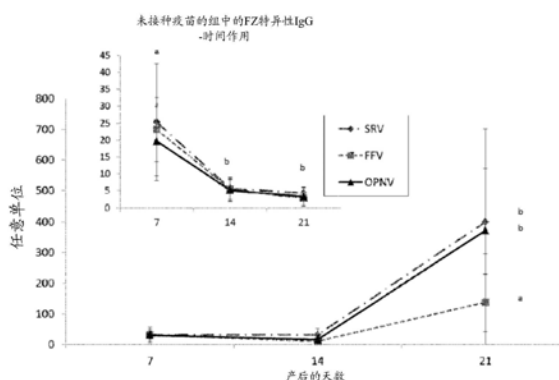
权利要求书3页 说明书19页
序列表2页 附图18页

(54)发明名称

用于增强免疫应答的哺乳动物乳骨桥蛋白

(57)摘要

所披露的发明提供了哺乳动物乳骨桥蛋白和/或其活性截短物或活性肽,用于在哺乳动物例如人受试者中提高对感染性疾病的免疫应答,以及在哺乳动物诸如人中增强用于预防性或治疗性治疗感染性疾病的疫苗接种的功效。本发明进一步提供了一种用于在哺乳动物中预防性或治疗性治疗感染性疾病的疫苗系统,该疫苗系统包含用于向哺乳动物口服给予的一种疫苗和一种哺乳动物乳骨桥蛋白和/或其活性截短物或活性肽,以及通过给予一种疫苗和一种哺乳动物乳骨桥蛋白和/或其活性截短物来在哺乳动物中增强对感染性疾病的免疫抵抗力的方法。



1. 哺乳动物乳骨桥蛋白在制备用于在哺乳动物中增强对感染性疾病的免疫抵抗力的药剂中的用途,其中该骨桥蛋白是用于口服给予的。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中该哺乳动物乳是选自以下各项之中:牛、山羊、绵羊、骆驼、水牛以及其任何组合。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中该骨桥蛋白是牛的并且由以下组成:SEQ ID NO:1的残基17-278的氨基酸序列的一种骨桥蛋白多肽;以及来源于通过在作为RGD基序的C末端的一个位置处进行的体内肽键裂解所得到的OPN多肽的具有40kDa的一种活性截短骨桥蛋白多肽。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中该骨桥蛋白是牛的并且由以下组成SEQ ID NO:1的残基17-278的氨基酸序列的一种骨桥蛋白多肽;以及一种活性截短骨桥蛋白多肽,其中氨基酸序列是SEQ ID NO:1的残基17-163。

5. 根据权利要求1或2所述的用途,其中该骨桥蛋白在该哺乳动物中加强体液免疫。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中该哺乳动物是人。

7. 根据权利要求5所述的用途,其中所述哺乳动物是人。

8. 根据权利要求6所述的用途,其中该人属于一个年龄组,该年龄组选自以下各项之中:0-5岁、6-11岁、12-18岁、19-34岁、35-44岁、45-54岁、55-64岁、65-74岁、75-84岁、以及大于84岁。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中该人属于一个年龄组,该年龄组选自以下各项之中:0-5岁、6-11岁、12-18岁、19-34岁、35-44岁、45-54岁、55-64岁、65-74岁、75-84岁、以及大于84岁。

10. 根据权利要求1-4和7-9中任一项所述的用途,其中在哺乳动物中对感染性疾病的免疫抵抗力是通过疫苗接种来诱导的。

11. 根据权利要求5所述的用途,其中在哺乳动物中对感染性疾病的免疫抵抗力是通过疫苗接种来诱导的。

12. 根据权利要求6所述的用途,其中在哺乳动物中对感染性疾病的免疫抵抗力是通过疫苗接种来诱导的。

13. 根据权利要求1-4、7-9和11-12中任一项所述的用途,其中该感染性疾病是选自以下各项之中:流感、白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎、轮状病毒、人乳头瘤病毒、甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

14. 根据权利要求5所述的用途,其中该感染性疾病是选自以下各项之中:流感、白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎、轮状病毒、人乳头瘤病毒、甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

15. 根据权利要求6所述的用途,其中该感染性疾病是选自以下各项之中:流感、白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎、轮状病毒、人乳头瘤病毒、甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

16. 根据权利要求10所述的用途,其中该感染性疾病是选自以下各项之中:流感、白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎、轮状病毒、人乳头瘤病毒、甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

17.一种用于在哺乳动物中预防性或治疗性治疗感染性疾病的疫苗系统,该疫苗系统包含一种疫苗和一种哺乳动物乳骨桥蛋白,其中该骨桥蛋白是用于口服给予的;其中给予该骨桥蛋白增强由该疫苗诱导的免疫抵抗力。

18.根据权利要求17所述的疫苗系统,其中该哺乳动物乳骨桥蛋白在该哺乳动物中加强体液免疫。

19.根据权利要求17或18所述的疫苗系统,其中该骨桥蛋白是选自以下各项之中:牛、山羊、绵羊、骆驼、水牛以及其任何组合。

20.根据权利要求17所述的疫苗系统,其中该骨桥蛋白是牛的并且由以下组成:SEQ ID NO:1的残基17-278的氨基酸序列的一种骨桥蛋白多肽;以及来源于通过在作为RGD基序的C末端的一个位置处进行的体内肽键裂解所得到的OPN多肽的具有40kDa的一种活性截短骨桥蛋白多肽。

21.根据权利要求17所述的疫苗系统,其中该骨桥蛋白是牛的并且由以下组成:SEQ ID NO:1的残基17-278的氨基酸序列的一种骨桥蛋白多肽;以及一种活性截短骨桥蛋白多肽,其中氨基酸序列是SEQ ID NO:1的残基17-163。

22.根据权利要求17-18和20-21中任一项所述的用途,其中该骨桥蛋白是用于在对该哺乳动物进行疫苗接种之前、同时、或之后、或其组合进行口服给予的。

23.根据权利要求19所述的用途,其中该骨桥蛋白是用于在对该哺乳动物进行疫苗接种之前、同时、或之后、或其组合进行口服给予的。

24.根据权利要求17-18、20-21和23中任一项所述的疫苗系统,其中该哺乳动物是人。

25.根据权利要求19所述的疫苗系统,其中该哺乳动物是人。

26.根据权利要求22所述的疫苗系统,其中该哺乳动物是人。

27.根据权利要求17-18、20-21、23和25-26中任一项所述的疫苗系统,其中该感染性疾病是选自以下各项之中:流感;白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎;轮状病毒、人乳头瘤病毒;甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

28.根据权利要求19所述的疫苗系统,其中该感染性疾病是选自以下各项之中:流感;白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎;轮状病毒、人乳头瘤病毒;甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

29.根据权利要求22所述的疫苗系统,其中该感染性疾病是选自以下各项之中:流感;白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎;轮状病毒、人乳头瘤病毒;甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

30.根据权利要求24所述的疫苗系统,其中该感染性疾病是选自以下各项之中:流感;白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎;轮状病毒、人乳头瘤病毒;甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

31.根据权利要求24所述的疫苗系统,其中该人属于一个年龄组,该年龄组选自以下各项之中:0-5岁、6-11岁、12-18岁、19-34岁、35-44岁、45-54岁、55-64岁、65-74岁、75-84岁、以及大于84岁。

32.根据权利要求25或26所述的疫苗系统,其中该人属于一个年龄组,该年龄组选自以下各项之中:0-5岁、6-11岁、12-18岁、19-34岁、35-44岁、45-54岁、55-64岁、65-74岁、75-84

岁、以及大于84岁。

用于增强免疫应答的哺乳动物乳骨桥蛋白

发明领域

[0001] 本发明涉及在哺乳动物例如人受试者中提高对感染性疾病的免疫应答,以及在哺乳动物诸如人中增强用于预防性或治疗性治疗感染性疾病的疫苗接种的功效。已经发现口服给予哺乳动物乳骨桥蛋白(OPN)或其活性截短部分可增强哺乳动物的免疫应答,并且增强由哺乳动物中的疫苗接种诱导的免疫应答,从而增强疫苗接种的预防性或治疗性功效。

[0002] 发明背景

[0003] 免疫系统针对活生物体中的疾病提供主要的防御机制,因此病原体和外来生物体被免疫系统的组分检测到并且消除。先天免疫应答针对感染起第一道防线的作用,该先天免疫应答包括多样的细胞组分,包括粒细胞(嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞)、肥大细胞、自然杀伤细胞(NKC)和抗原呈递细胞(APC),诸如巨噬细胞和树状细胞(DC)以及可溶性因子,诸如补体蛋白。作为第二道防线的适应性免疫应答较慢地形成,并且包括选择细胞应答与体液应答用于消除病原体。细胞免疫主要是Th1诱导的,从而引起用来破坏受损宿主细胞(例如经病毒或病原体感染的细胞)的细胞毒性T细胞、自然杀伤细胞(NKC)和活化巨噬细胞的分化。体液免疫表现为抗原特异性和抗原记忆增加,因此Th2活化和细胞因子产生引起产生抗体的B细胞和记忆细胞的生成,这些产生抗体的B细胞和记忆细胞有助于识别病原体来源的抗原和病原体消除。

[0004] 新生哺乳动物中的先天免疫是不发达的,这样使得新生儿中的抗病性严重地依赖于被动获取通过母体乳汁(具体地,初乳)得到的母体抗体。与此同时,婴儿免疫系统的发育通过存在于母乳中的免疫刺激组分来诱导。在喂食配方乳而不是母乳的新生哺乳动物中的免疫系统的发育延迟,其原因是将以另外的方式提供于母乳中的主要的免疫诱导和免疫赋予组分的缺乏。

[0005] 在整个生命中维持免疫系统仍然是健康所必需的,并且因此任何年龄的免疫受损个体以及具有稳步下降的免疫的老年个体代表着处于更高疾病相关死亡率的风险中的患者群。

[0006] 提升对感染性疾病的免疫抵抗力的疫苗接种是改善公共卫生的最有效方法。疫苗可供使用的疾病范围正在不断地增加,并且使用这些疫苗来保护成年群体(具体地,不断增加的老年群体)也正在增加。预防性或者治疗性的疫苗接种刺激身体的免疫系统,以便识别类似于给定的致病剂的抗原剂,破坏它,并且“记住”它,这样使得当再次暴露时免疫系统可以更容易地识别并且破坏该致病剂。典型地,这样一种试剂是从病原性微生物的削弱或杀死的形式、它的毒素或它的表面蛋白中的一种制得。

[0007] 因为疫苗接种的功效取决于已接种疫苗的受试者提升有效免疫应答的能力,所以疫苗接种的益处免疫系统没有完全发育的个体中(如在新生或年幼的婴儿中)或者在其免疫系统下降、受损或衰退的个体中(如在一些成年人和老年人中)有所减少。因此,存在对能够在这些患者群中增强免疫应答(具体地,对疫苗接种的免疫应答)的试剂的需要。对这些大量的患者群体进行疫苗接种的公共卫生计划必须是极其安全的,并且因此用来增强对疫苗接种的免疫应答的试剂和用于这些试剂给予的手段两者必须满足这些安全要求。

[0008] 骨桥蛋白 (OPN) 是由多种细胞类型表达的细胞外基质蛋白, 这些细胞类型包括破骨细胞、成骨细胞、巨噬细胞、活化的T细胞、平滑肌细胞以及上皮细胞。该骨桥蛋白存在于若干个组织中, 这些组织包括骨、肾、胎盘、平滑肌以及分泌上皮细胞。OPN能够介导细胞粘附和迁移, 并且与正常的组织重塑过程诸如骨再吸收、血管发生、伤口愈合以及组织损伤相关联。OPN还在某些患病的状态下表达, 例如再狭窄、动脉粥样硬化、肾病以及肿瘤发生。已经观察到编码OPN的基因的修改的转录, 其中改变的剪接转录物在某些疾病状态下引起不同形式的OPN的表达 (比松内特 (Bissonnette) 等人2012)。OPN通过与整联蛋白相互作用而发挥它的许多生物作用, 这些整联蛋白包括一个大家族的介导细胞-细胞和细胞-基质相互作用两者的异源二聚体跨膜受体, 并且该OPN可以在炎症疾病中起作用。

[0009] WO 98/56405 A1涉及一种通过改变 (增加或降低) 骨桥蛋白活性来调制 (增大或减少) 个体的免疫应答的方法; 但缺乏证据支持向受试者给予OPN (例如重组OPN) 的治疗作用。

[0010] WO 00/63241 A2涉及作为免疫应答调节剂的Eta-1/骨桥蛋白; 但没能证明给予OPN可增强对感染性疾病的免疫抵抗力。

[0011] 卡哈吉 (Khajooe) V等人, 2006临床与实验免疫学 (CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY), 143 (2): 260-268涉及, 基于使用人单核细胞来源的巨噬细胞培养物所进行的研究的骨桥蛋白在对抗分枝杆菌感染的防御上的作用。

[0012] 附图简述

[0013] 图1动物测试群体和研究设计。将小猪分成接受大母猪代乳品配方 (FF; n=10) 或用140mg/L骨桥蛋白补充的配方 (OPN; n=12) 或者大母猪养育 (SR; n=7) 的三个膳食组。

[0014] 图2属于接受大母猪代乳品配方 (FF; n=10) 或用140mg/L骨桥蛋白补充的配方 (OPN; n=12) 的膳食组的小猪, 以及示于插图中的大母猪养育的小猪 (SR; n=7) 的产后平均每日体重。

[0015] 图3通过ELISA所测量的来源于7天龄、14天龄和21天龄的小猪的血清中的Fluzone™特异性IgG效价。未接种疫苗的小猪中的流感病毒疫苗特异性IgG水平示于插图中。数据被表达为平均值±SD。不同下标是指在p<0.05处的统计学显著性。未接种疫苗的组中的上标是指统计学显著的时间差异; 接种疫苗的图中的上标指示在第21天时膳食处理组之间的差异。

[0016] 图4通过ELISA所测量的在接种疫苗和未接种疫苗的小猪的血清中的总IgG浓度。该血清来源于7天龄、14天龄和21天龄的小猪血液样品。在第21天时取得的样品中所测量的总IgG水平示于插图中。数据被表达为平均值±SD。上标是指随时间推移的统计学显著的差异。

[0017] 图5通过ELISA所测量的来源于7天龄、14天龄和21天龄的小猪的血清中的总IgM浓度。数据被表达为平均值±SD。上标是指随时间推移的统计学显著的差异。

[0018] 图6对于CD4 (克隆74-12-4) 和CD8 (克隆76-2-11) 所染色的PBMC T淋巴细胞群体的流式细胞术散点图。4个象限绘制了CD8+淋巴细胞 (具有CD3+CD4-CD8+分布 (profile) 的细胞毒性T细胞); CD4+淋巴细胞 (具有CD3+CD4+CD8-分布的T辅助细胞)、CD4+CD8+淋巴细胞 (具有CD3+CD4+CD8+分布的记忆T细胞)。

[0019] 图7膳食对第21天时PBMC中的T辅助细胞CD4+细胞 (图A)、细胞毒性CD8+T细胞 (图B) 的丰度和对CD4+/CD8+比率 (图C) 的作用。细胞群体被表达为总CD3+T细胞的%。数据被表

达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异。*指示在 $p<0.1$ 处的统计趋势。

[0020] 图8膳食对第21天时MLN中的细胞毒性CD8⁺T细胞(图A)的丰度和对CD4⁺/CD8⁺T细胞比率(图B)的作用。细胞群体被表达为总CD3⁺T细胞的%。数据被表达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异。*指示在 $p<0.1$ 处的统计趋势。

[0021] 图9膳食对第21天时脾中的记忆(CD4⁺CD8⁺) T细胞的丰度的作用。细胞群体被表达为总CD3⁺T细胞的%。数据被表达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示对于疫苗接种组内的膳食作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异;*指示对于疫苗接种作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著性。

[0022] 图10由PBMC细胞产生的IL-12分泌。将PBMC细胞离体培养72小时,收集条件培养基并且通过ELISA分析IL-12。数据被表达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示对于处理组之中的膳食作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异;*指示对于疫苗接种作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著性。

[0023] 图11植物凝集素(PHA)刺激对PBMC分泌IL-12(A)和IL-10(B)的作用。在PHA存在下将PBMC细胞离体培养72小时,收集条件培养基并且通过ELISA分析IL-10和IL-12。数据被表达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示对于处理组之中的膳食作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异;*指示对于膳食作用的在 $p<0.1$ 处的统计趋势。

[0024] 图12脂多糖(LPS)刺激对PBMC分泌IL-12(A)、IL-6(B)和IL-10(C)的作用。在LPS存在下将PBMC细胞离体培养72小时,收集条件培养基并且通过ELISA分析IL-6、IL-10和IL-12。数据被表达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示对于处理组之中的膳食作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异;*指示对于疫苗接种作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著性。

[0025] 图13流感病毒疫苗刺激对PBMC分泌IL-12(A)和IL-10(B)的作用。在流感病毒疫苗存在下将PBMC细胞离体培养72小时,收集条件培养基并且通过ELISA分析IL-10和IL-12。数据被表达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示处理组之中的在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异;*指示对于疫苗接种作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著性。

[0026] 图14由脾细胞产生的IL-12(A)和IL-10(B)分泌。将脾细胞离体培养72小时,收集条件培养基并且通过ELISA分析IL-6、IL-10和IL-12。数据被表达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示对于处理组之中的膳食作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异;*指示对于疫苗接种作用的在 $p=0.07$ 处的趋势。

[0027] 图15植物凝集素(PHA)刺激对脾分泌IL-12(A)和IL-10(B)的作用。在PHA存在下将脾细胞离体培养72小时,收集条件培养基并且通过ELISA分析IL-10和IL-12。数据被表达为平均值 \pm SD;不同上标指示处理组之中的在 $p=0.07$ 处的统计趋势;*指示对于疫苗接种作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著。

[0028] 图16脂多糖(LPS)刺激对脾分泌IL-12(A)和IL-10(B)的作用。在LPS存在下将脾细胞离体培养72小时,收集条件培养基并且通过ELISA分析IL-10和IL-12。数据被表达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示对于处理组之中的膳食作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异;*指示对于疫苗接种作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著。

[0029] 图17流感病毒疫苗刺激对脾分泌IL-12(A)和IL-10(B)的作用。在流感病毒疫苗存在下将脾细胞离体培养72小时,收集条件培养基并且通过ELISA分析IL-10和IL-12。数据被

表达为平均值 \pm SD,并且不同上标指示对于处理组之中的膳食作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著的差异;*指示对于疫苗接种作用的在 $p<0.05$ 处的统计学显著。

[0030] 图18当存在以下情况时的年龄从1至6月龄的婴儿中的发热发病率:1)母乳喂养;2)用没有OPN添加的常规配方(RF)(F0)喂养;3)用添加大约65mg OPN/L的牛OPN的RF(F65)喂养以及4)用添加大约130mg OPN/L的牛OPN的RF(F130)喂养。发病率以时间的百分比给出,该时间是属于每个处理组的婴儿在一个日历月的周期过程中被记录为有发烧的时间(记录的时间/日历月值是随临床试验的周期记录的值的平均值)。

[0031] 发明概述

[0032] 当口服给予时,出乎意料地发现哺乳动物乳骨桥蛋白(OPN)和/或其活性截短物可在哺乳动物受试者中增强特异性免疫应答,并且从而提高它们对疫苗接种的特异性免疫应答。本发明是基于证明口服给予OPN能够用来通过疫苗接种增强在哺乳动物受试者中诱导的特异性免疫应答的第一研究。

[0033] 本发明提供了用作用于在哺乳动物中增强对感染性疾病的免疫抵抗力的药剂的哺乳动物乳OPN和/或其活性截短物,例如通过增强由对抗该疾病的疫苗接种诱导的免疫抵抗力,其中该OPN和/或其活性截短物是用于口服给予。根据一个实施例,该活性截短的OPN包含通过蛋白水解裂解可来源于哺乳动物乳OPN的至少一种活性OPN肽。该OPN或其活性截短物可以用于在对该哺乳动物进行疫苗接种之前、同时、或之后、或其组合进行口服给予。

[0034] 该哺乳动物乳OPN和/或其活性截短物能够在该哺乳动物中加强体液免疫。

[0035] 该哺乳动物乳OPN和/或其活性截短物可以来源于以下各项中的任何一种:牛、山羊、绵羊、骆驼、水牛、单峰骆驼、美洲驼以及其任何组合。

[0036] 根据一个实施例,该哺乳动物乳OPN和/或其活性截短物是用于在哺乳动物中增强对感染性疾病的免疫抵抗力,其中该哺乳动物是人。根据一个实施例,该人属于一个年龄组,该年龄组选自以下各项之中:0-5岁、6-11岁、12-18岁、19-34岁、35-44岁、45-54岁、55-64岁、65-74岁、75-84岁、以及大于84岁。

[0037] 根据一个实施例,该感染性疾病是选自以下各项之中:流感;白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎;人乳头瘤病毒;轮状病毒;甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染和带状疱疹。

[0038] 本发明进一步提供了一种疫苗系统,该疫苗系统包含用于在哺乳动物中预防性或治疗性治疗感染性疾病的一种疫苗和一种哺乳动物乳OPN和/或其活性截短物,其中该哺乳动物乳OPN和/或活性截短物是用于例如在对该哺乳动物进行疫苗接种之前、同时、或之后、或其组合进行口服给予。口服给予该哺乳动物乳OPN和/或活性截短物可在哺乳动物中增强由疫苗接种诱导的对感染性疾病的免疫抵抗力。该哺乳动物乳骨桥蛋白和/或活性截短物能够在接种疫苗的哺乳动物中加强体液免疫。

[0039] 根据一个实施例,该疫苗系统包含来源于以下各项的OPN和/或其活性截短物:牛、山羊、绵羊、骆驼、水牛、单峰骆驼、美洲驼、或其任何组合。

[0040] 根据该疫苗系统的一个实施例,该哺乳动物是人。

[0041] 根据该疫苗系统的一个实施例,该感染性疾病是选自以下各项之中:流感、白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型肝炎、轮状病毒、人乳头瘤病毒、甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

[0042] 根据该疫苗系统的一个实施例,该疫苗是选自以下各项之中:白喉疫苗、破伤风疫苗、百日咳疫苗、脊髓灰质炎疫苗、或组合的疫苗(例如TaP/IPV疫苗);组合的麻疹、腮腺炎和风疹疫苗(例如MMR疫苗);结核病疫苗(例如BCG疫苗);乙型肝炎疫苗;丙型脑膜炎疫苗;轮状病毒(轮状病毒疫苗);人乳头瘤病毒(HPV)疫苗;甲型流感和乙型流感疫苗(例如流感疫苗);肺炎球菌疫苗;以及带状疱疹疫苗。

[0043] 根据该疫苗系统的一个实施例,该人属于一个年龄组,该年龄组选自以下各项之中:0-5岁、6-11岁、12-18岁、19-34岁、35-44岁、45-54岁、55-64岁、65-74岁、75-84岁、以及大于84岁。

[0044] 本发明进一步提供了一种在哺乳动物中增强对感染性疾病的免疫抵抗力的方法,该方法包括向该哺乳动物给予一种疫苗和哺乳动物乳OPN和/或其一种或多种活性截短物,其中该OPN和/或其活性截短物被口服给予。该哺乳动物乳OPN和/或活性截短物能够在接种疫苗的哺乳动物中加强体液免疫。

[0045] 根据在哺乳动物中增强对感染性疾病的免疫抵抗力的该方法的一个实施例,该哺乳动物是人。

[0046] 根据该方法的一个实施例,该OPN或其活性截短物在对该哺乳动物进行疫苗接种之前、同时、或之后、或其组合进行给予。

[0047] 根据该方法的一个实施例中,该OPN或其活性截短物以在约0.05mg/kg所治疗的受试者体重至约5g/kg所治疗的受试者体重的范围内的每日剂量来给予。

[0048] 根据在人中增强对感染性疾病的免疫抵抗力的该方法的一个实施例,该人属于一个年龄组,该年龄组选自以下各项之中:0-5岁、6-11岁、12-18岁、19-34岁、35-44岁、45-54岁、55-64岁、65-74岁、75-84岁、以及大于84岁。

[0049] 根据该方法的一个实施例,该OPN或其活性截短物具有哺乳动物来源,选自牛、山羊、绵羊、骆驼、水牛、单峰骆驼、美洲驼、以及其任何组合。

[0050] 根据该方法的一个实施例,该感染性疾病是选自以下各项之中:流感、白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎和风疹、结核病、乙型肝炎、丙型脑膜炎、轮状病毒、人乳头瘤病毒;甲型流感、乙型流感、肺炎球菌感染以及带状疱疹。

[0051] 根据该方法的一个实施例,该疫苗是选自以下各项之中:白喉疫苗、破伤风疫苗、百日咳疫苗、脊髓灰质炎疫苗、或组合的疫苗(例如TaP/IPV疫苗);组合的麻疹、腮腺炎和风疹疫苗(例如MMR疫苗);结核病疫苗(例如BCG疫苗);乙型肝炎疫苗;丙型脑膜炎疫苗;轮状病毒(轮状病毒疫苗);人乳头瘤病毒(HPV)疫苗;甲型流感和乙型流感疫苗(例如流感疫苗);肺炎球菌疫苗;以及带状疱疹疫苗。

[0052] 发明详细说明

[0053] 本发明解决了对在哺乳动物受试者,具体地配方喂养的婴幼儿;具有下降的免疫能力的成年人(例如免疫受损受试者);以及老年人中增强免疫应答的需要。发明人已经发现,当向受试者口服给予时哺乳动物乳OPN和/或其活性截短物可在该哺乳动物中增强免疫应答,从而提高对该哺乳动物进行疫苗接种的功效。

[0054] I哺乳动物乳骨桥蛋白(OPN)和/或其活性截短物

[0055] I.i哺乳动物乳OPN的结构

[0056] 根据一个第一实施例,本发明提供了用于增强对感染性疾病的免疫应答,并且具

体地在哺乳动物中增强对感染性疾病的疫苗诱导的免疫抵抗力的哺乳动物乳OPN和/或其活性截短物。

[0057] 哺乳动物乳OPN是通过从乳腺中分泌所产生的可溶性乳蛋白质。虽然哺乳动物乳OPN作为具有大约60kDa分子量(如通过SDS-PAGE所确定)的多肽被分泌,但通常发现它与OPN的截短形式一起共存于乳中。与在其他组织中表达的可变(转录)剪接OPN同工型相反,哺乳动物乳OPN仅以一种剪接同工型存在;而乳OPN的截短形式是这种分泌性多肽同工型的蛋白水解裂解的结果。乳OPN(全长多肽和其截短形式两者)是高度磷酸化和糖基化的多肽。已知OPN的磷酸化和糖基化的翻译后模式是组织特异性的并且可调节它的生理特性。乳OPN多肽同工型的磷酸化和糖基化的高水平和模式是对于它的功能特性重要的特定(比松内特等人2012)。

[0058] 根据本发明的该乳OPN具有哺乳动物来源,并且可以例如来源于牛、山羊、绵羊、骆驼、水牛、单峰骆驼或美洲驼乳。乳OPN多肽包含多个其特征在于 α -整联蛋白结合特性的高度保守序列基序,具体地RGD基序。在哺乳动物乳OPN多肽之中保守的这些基序的位置是关于牛OPN来鉴定的,牛OPN的主要翻译产物氨基酸序列在表1中列出。

[0059]

表 1: 牛 OPN 的氨基酸序列[SEQ ID NO 1]

10	20	30	40	50	60
----	----	----	----	----	----

[0060]

```

MRIAVICFCL LGIASALPVK PTSSGSSEEK QLNNKYPDAV ATWLKPDPSQ KQTFLAPQNS
    70          80          90          100          110          120
VSSEETDDNK QNTLPKSKSNE SPEQTDDLDD DDDNSQDVNS NDSDDAETTD DDPHSDSHH
    130          140          150          160          *          170          180
SDESDEVDFP TDIPTIAVFT PFIPTESAND GRGDSVAYGL KRSRKKFRRS NVQSPDATEE
    190          200          210          220          230          240
DFTSHIESEE MHDAPKTSQ LTDHSKETNS SELSKELTPK AKDKNKHSNL IESQENSKLS
    250          260          270
QEFHSLEDKL DLDHKSEEDK HLKIRISHEL DSASSEVN
  
```

UniProtKB: P31096

信号肽: 氨基酸 1-16

成熟的全长 OPN: 氨基酸 17-278

*= R¹⁶³/S¹⁶⁴ 预测的凝血酶裂解位点和假定的体内截短裂解位点

FPTDIPT 和 RGD**SVAYGLK** 基序(已加下划线的序列): 预测的整联蛋白结合位点

磷酸化位点*: 已加下划线和斜体的 T 或 S 残基

O-糖基化位点*: 粗体的 T 残基

*索伦森(Sørensen)等人 1995

[0061] 当该哺乳动物乳OPN来源于牛乳时,该OPN典型地包含除了成熟的全长OPN多肽以

外的至少一种活性截短的OPN多肽。典型地,该一种或多种活性截短的OPN多肽具有大约40kDa的分子量(如通过SDS-PAGE所确定)。典型地,该一种或多种活性截短的OPN多肽来源于通过在作为RGD基序的C末端的位置处体内肽键裂解所得到的全长OPN多肽。典型地,该至少一种或多种活性截短的牛乳OPN来源于全长成熟的OPN多肽,其中该成熟的OPN具有与SEQ ID NO:1的残基17-278具有确定的序列一致性的氨基酸序列。牛乳OPN是具有信号肽(相应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基1-16)的分泌性多肽,该信号肽被共翻译去除以得到成熟的全长多肽。当该牛乳OPN包含全长OPN多肽时,它典型地具有SEQ ID NO:1的残基17-278的氨基酸序列。一种活性截短的牛乳OPN被预测通过处于或接近凝血酶裂解位点(表1)处的肽裂解而来源于牛OPN多肽(SEQ ID NO:1),从而得到保留RGD基序的具有大约40kDa分子量(如通过SDS-PAGE所确定)的C末端截短的OPN多肽。

[0062] 根据一个实施例,该哺乳动物乳OPN包含与SEQ ID NO:1具有至少66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、88%、90%、92%、94%、96%、98%、100%氨基酸序列一致性的成熟全长OPN多肽;和/或与一种多肽具有至少66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、88%、90%、92%、94%、96%、98%、100%氨基酸序列一致性的一种或多种活性截短的OPN多肽,该多肽具有选自以下各项中的任何一种之中的序列:SEQ ID NO:1的氨基酸残基17-161;氨基酸残基17-162;氨基酸残基17-163;氨基酸残基17-164和氨基酸残基17-165。

[0063] 在本发明的上下文中,术语“序列一致性”涉及两个氨基酸序列之间或两个核酸序列之间(优选地具有相等长度)的一致性程度的定量度量。如果有待比较的两个序列不具有相等长度,必须将它们比对以尽可能最好地配合。该序列一致性可以被计算为 $(N_{ref} - N_{dif}) * 100 / (N_{ref})$,其中 N_{dif} 是当比对时在两个序列中不一致的残基的总数,并且其中 N_{ref} 是参照序列的残基数。因此,DNA序列AGTCAGTC将与序列AATCAATC具有75%的序列一致性($N_{dif} = 2$ 并且 $N_{ref} = 8$)。空位被算作特定的一个(多个)残基的不一致性,即DNA序列AGTGTC将与DNA序列AGTCAGTC具有75%的序列一致性($N_{dif} = 2$ 并且 $N_{ref} = 8$)。可以例如使用适当的BLAST程序,诸如由美国国家生物技术信息中心(NCBI)提供的BLASTp算法来计算序列一致性。

[0064] 该哺乳动物乳OPN可以包含活性截短的OPN多肽(tOPN)或全长OPN多肽(f10PN)、或可以不同比率存在的这两种形式。例如,tOPN/f10PN的比率可以在从0:100至100:0之间的范围内;更优选地,该比率是以下各项中的任何一种:5:95;10:90;15:85;20:80;25:75;30:70;35:65;40:60;45:55;50:50;55:45;60:40;65:35;70:30;75:35;80:20;85:15;90:10;以及95:5。典型地,牛乳中的该比率是75%tOP比25%f10PN,其中该tOPN具有大约40kDa的分子量(如通过SDS-PAGE所确定)。

[0065] 根据一个另外的实施例,该哺乳动物乳OPN是一种截短的OPN,其中该截短的OPN包含通过蛋白水解裂解可来源于哺乳动物乳OPN(例如具有SEQ ID No.1的牛乳OPN)的至少一种活性OPN肽。在穿过哺乳动物受试者的消化道过程中,哺乳动物OPN被暴露于蛋白水解酶中,具体地内切蛋白酶胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶以及糜蛋白酶。根据本发明的活性OPN肽是在暴露于典型地存在于哺乳动物消化道中的蛋白酶之后保留活性的肽。活性OPN肽可以典型地包括包含整联蛋白结合基序的部分或全部,典型地具有从5至16个氨基酸残基的长度的肽。

[0066] I.ii哺乳动物乳OPN可增强通过疫苗接种在哺乳动物中诱导的特异性免疫应答

[0067] 根据本发明的该哺乳动物乳OPN包含能够增强哺乳动物的免疫应答的全长OPN多肽(f10PN)和/或至少一种活性截短的OPN多肽或肽(tOPN),并且从而增加通过暴露于(并且任选地感染有)感染性疾病或通过疫苗接种在哺乳动物中诱导的特异性免疫应答。在暴露于(被感染)感染性疾病的哺乳动物中或在接种疫苗的哺乳动物中的特异性免疫应答包括产生一群抗体分子,这些抗体分子选择性地与存在于该感染性疾病的试剂(感染性疾病的实例和它们的试剂在II i中详细描述)或疫苗中的抗原反应。关于本发明的截短的OPN多肽或肽的术语“活性”被定义为增强哺乳动物对感染性疾病或疫苗接种的特异性免疫应答的能力。

[0068] 通过疫苗接种所诱导的特异性抗体的效价通常被用作疫苗接种时综合免疫应答的体内指示物;以及作为可以赋予对给定疫苗的特异性的临床保护的指示物(阿尔伯斯(Albers)等人2013)。

[0069] 给予牛乳OPN对通过疫苗接种在哺乳动物中诱导的特异性免疫应答的作用在实例1中举例说明。在这个实例中,以具有牛乳OPN补充的配方膳食喂养小猪,通过在21天的周期内产生流感病毒疫苗特异性的IgG而对流感病毒疫苗有响应,在小猪血清样品中的这些IgG的效价明显高于来自对照配方喂养的小猪的血清,同时匹配在接受含有天然猪OPN的猪乳的小猪中看到的IgG水平。

[0070] 在接种疫苗的哺乳动物中的特异性免疫应答可以通过直接或间接地检测并且定量存在于来源于该哺乳动物的体液样品中的抗体来确定,这些抗体可以与一种或多种疫苗抗原形成复合体。在疫苗是粒状的,例如全细胞灭活疫苗的情况下,可以使用定量凝集(细胞结块)测试来确定对体液样品的连续稀释,该体液样品含有足够特异性抗体以便诱导全细胞疫苗的细胞结块。当疫苗是可溶的,例如蛋白质亚单位或肽疫苗的情况下,酶联免疫吸附测定(ELISA)是用于特异性抗体检测的适合的方法。对用于抗体检测的该ELISA方法的使用在实例1.3中说明,其中使用对猪具有特异性的ELISA测定来检测流感病毒疫苗特异性的IgG抗体。

[0071] I.iii哺乳动物乳OPN可增强哺乳动物的体液免疫应答

[0072] 出人意料地,口服给予例如以膳食的OPN补充剂形式的OPN可诱导对体液免疫的强烈刺激,如此以致在接种疫苗的哺乳动物中提供增强的抗原特异性IgG水平和通常更高的IgG水平。这在实例1中举例说明,其中将接受OPN补充的配方膳食的小猪与以配方膳食或大母猪养育的小猪进行比较。认为这种应答的原因在于在接受OPN-配方膳食的小猪中看到的免疫系统的多种修改。第一,当与对照配方喂养或大母猪养育的小猪相比时,接受OPN补充的膳食的小猪具有升高的IL-10水平,这促成对Th2应答的诱导并且刺激B细胞分化成引起更高IgG水平的分泌抗体的细胞。OPN诱导的IL-10产生还在抑制下游Th1应答诸如巨噬细胞活化和促炎性应答上起关键作用。

[0073] 第二,在OPN-配方喂养的小猪的血清中发现的升高的IL-12水平将刺激Th1细胞的分化,这进而将引起分化的B细胞的活化,从而诱导它们分泌抗体(IgG)。当与来源于配方喂养或大母猪养育的小猪的细胞的淋巴细胞分布相比时,在接受OPN补充的膳食的小猪中的这种体液应答诱导被反映在明显升高的分泌T辅助细胞的CD4水平和相对较低的分泌细胞毒性T细胞的CD8水平上。通过Th1和Th2系统产生的T辅助细胞群体促成所观察的体液应答,并且重要地促成疫苗接种之后升高的抗原特异性IgG水平。在以配方膳食饲养的婴儿小猪

的情况下,向该膳食中添加OPN使疫苗接种应答提高到在猪喂养的小猪中看到的水平。这些研究提供了以下证明:向膳食中添加OPN具有增强和提升对疫苗接种的免疫应答的能力,并且从而提高对所给予的疫苗中的抗原的免疫性。这个结论通过以下事实来支持:由疫苗接种诱导的抗体效价至少与通过该疫苗接种所赋予的对抗疾病的保护有相互关系(普洛特金(Plotkin) SA.,2008)。

[0074] I iv哺乳动物乳OPN可在哺乳动物中增强对感染性疾病的免疫抵抗力

[0075] 向哺乳动物,具体地人婴儿口服给予根据本发明的哺乳动物乳OPN可增强它们对感染性疾病的免疫抵抗力。这在实例2中所述的临床试验中被清楚地证明,其中感染事件的频率通过在婴儿中测量并且检测作为由该婴儿染上的感染性疾病的诊断症状的体温升高(发热)来监测,该体温升高(发热)由感染剂(例如病毒、细菌、真菌或真核生物病原剂诸如原生动感染)所引起。

[0076] I v制备适合用于给予的哺乳动物乳OPN

[0077] 可以纯化存在于泌乳哺乳动物的乳中的哺乳动物乳OPN以便提供一种富集的OPN来源,该富集的OPN来源可以是至少约50%至约60%、至少约60%至约70%、或至少约70%至约80%纯的。在一些实施例中,它是至少约80%至约90%纯的,而在其他实施例中,乳OPN来源是至少约90%至约95%纯的、或更纯。在某些实施例中,纯化的乳OPN来源是至少约95%纯的,诸如95%、96%、97%、98%、99%或99.5%纯的、或更纯。

[0078] 在具体实施例中,该OPN来源是一种纯化的牛乳OPN制剂,诸如例如Lacprodan **OPN-10®** (丹麦维比市阿拉食品原料公司(Arla Foods Ingredients,Viby,Denmark)) (还参见美国专利号7,259,243)。Lacprodan **OPN-10®** 包含大约22% (w/w) 的全长牛乳OPN和大约65% (w/w) 的牛乳OPN同工型(截短的OPN)。

[0079] I vi哺乳动物乳OPN的配制和剂量

[0080] 根据本发明的该哺乳动物乳OPN,例如牛乳OPN可以在约0.05mg/kg所治疗的受试者体重至约5g/kg所治疗的受试者体重的范围内的每日剂量来给予。对于婴儿,该每日OPN剂量典型地在约5-50mg/kg体重的范围内,对于具有3至10kg重量范围的体重的婴儿,优选地在25-50mg/kg体重的范围内。典型地,对于成年人,建议每天给予0.5-5g OPN,例如以100-250ml的每日剂量体积。剂型可以含有在0.1mg-10g/剂型范围内的哺乳动物乳OPN。例如,口服剂型可以含有在1mg-1g/剂型范围内的OPN的量。可替代地,口服剂型可以含有在10mg-800mg/剂型范围内的OPN的量。口服剂型可以例如含有在25mg-500mg/剂型范围内的OPN的量。

[0081] 可以营养补充剂的形式给予哺乳动物乳OPN,其中该补充剂包含以在0.01%-90% (w/w) 范围内的量的乳OPN。例如,该营养补充剂可以包含以在0.1%-80% (w/w) 范围内的量的乳OPN。可替代地,该营养补充剂可以包含以在1%-70% (w/w) 范围内的量的乳OPN。

[0082] 在本发明的一些实施例中,该营养补充剂包含以在5%-60% (w/w) 范围内的量的乳OPN。例如,该营养补充剂可以包含以在10%-50% (w/w) 范围内的量的乳OPN。可替代地,该营养补充剂可以包含以在0.1%-20% (w/w) 范围内的量的乳OPN。

[0083] 在本发明的其他实施例中,该营养补充剂包含以在0.001%-5% (w/w) 范围内的量的乳OPN。例如,该营养补充剂可以包含以在0.005%-2% (w/w) 范围内的量的乳OPN。可替代地,该营养补充剂可以包含以在0.01%-1% (w/w) 范围内的量的乳OPN。该营养补充剂可以

例如包含以在0.05%–0.5% (w/w) 范围内的量的乳OPN。典型地,即饮营养饮料包含以在0.005%至0.05% (w/w) 范围内的量的乳OPN。

[0084] 包含乳OPN的营养补充剂可以被预先包装呈液体或粉状形式(例如罐装或瓶装的液体饮品)。在一些实施例中,将该粉状形式添加到一种食物或饮料中以提供另外的营养素。在某些实施例中,可与例如水果、蔬菜、酸奶、乳、和/或冰淇淋配制这些营养饮料。在一些实施例中,将这些营养补充剂共混为思慕雪(smoothie)稠度。在具体实施例中,可用例如蛋白质、维生素、矿物质、抗氧化剂、益生菌和/或益生元强化这些营养饮料。在某些实施例中,这些营养饮料不含乳糖和/或不含谷蛋白。在一些实施例中,这些营养补充剂是有机的。儿童营养饮料的实例包括 **PEDIASURE®**、**PEDIASMART®**、以及仅针对儿童的 **RESOURCE®**。成人营养饮料的实例包括 **ENSURE®**、**BOOST®**、**NESTLE® CARNATION® INSTANT BREAKFAST®**、**GLUCERNA®**、**GLYTROL®**、**NUTREN®**、以及 **PEPTAMEN®**。营养补充剂还包括乳,豆乳和牛乳(例如全脂、半脱脂或低脂、脱脂或无脂(例如英国奶制品公司(Cravendale))、不含有乳糖(例如 **LACTOFREE®**))两者。

[0085] I vii哺乳动物乳OPN的给予

[0086] 如I v中所述的配制用于向哺乳动物口服给予的哺乳动物乳OPN(包括包含哺乳动物乳OPN的营养补充剂或饮料)可以在疫苗接种之前、同时或之后、或其组合向哺乳动物给予。优选地,在疫苗接种之前开始口服给予乳OPN,并且继续该给予至少直到给予该疫苗接种。在疫苗接种之前开始给予乳OPN的情况下,优选的是在疫苗接种之前至少1–21天开始给予,典型地在疫苗接种之前至少1–7天,并且继续该给予至少直到给予该疫苗接种。有利地,在疫苗接种之后,可以将给予乳OPN的周期进一步延长至少另外的1–4周。如果对该哺乳动物进行的疫苗接种包括加强疫苗接种,给予乳OPN(或其制品)的周期优选地被延长到至少递送加强疫苗。

[0087] II疫苗

[0088] II.i用于预防性和治疗性治疗哺乳动物的疫苗

[0089] 疫苗可以起预防性和治疗性作用,因而可以使用预防性或治疗性治疗来在哺乳动物中增加对感染性疾病的免疫抵抗力并且从而降低感染的风险或治疗现存的感染。

[0090] 根据一个实施例,使用该疫苗来增加对感染性疾病的免疫抵抗力,其中该疫苗包含能够在哺乳动物受试者中诱导免疫原性应答的免疫原。该免疫原可以包括引起感染性疾病的活的(优选地减毒的)或被杀死的感染剂(例如微生物诸如细菌或病毒、寄生物、或其他病原体)。可替代地,该免疫原可以包括免疫原性多肽,例如来源于感染剂的多肽,该多肽可以是抗原并且该多肽因此在动物中激活免疫应答。在其他实施例中,该免疫原可以是核酸,诸如编码抗原并且可以例如作为DNA疫苗的一部分给予的重组载体(包括DNA载体或质粒、逆转录病毒载体和慢病毒载体)。

[0091] 在一个实施例中,该免疫原来源于选自以下各项之中的病原体:病毒、细菌、真菌、或哺乳动物(例如人)的原生动物病原体。根据本发明的有待通过疫苗治疗的感染性疾病包括白喉、破伤风、百日咳和脊髓灰质炎(典型地通过组合的疫苗例如TaP/IPV疫苗治疗);MMR:麻疹、腮腺炎和风疹(例如MMR疫苗);结核病(例如BCG疫苗);乙型肝炎(例如乙型肝炎疫苗);丙型肝炎(例如丙型肝炎疫苗);作为用于宫颈癌/肛门癌和生殖器疣的致病剂

人乳头瘤病毒 (HPV) (例如HPV疫苗);甲型流感和乙型流感 (例如流感疫苗);肺炎球菌感染 (肺炎球菌疫苗);轮状病毒 (轮状病毒疫苗) 以及带状疱疹 (带状疱疹疫苗)。对抗带状疱疹的疫苗接种大部分限于老年人,而对抗所有其他列出的疾病的疫苗接种与所有年龄组相关,虽然疫苗接种主要在儿童早期的过程中给予。

[0092] II ii用于预防性和治疗性治疗的疫苗的配制

[0093] 疫苗通常包含治疗有效量的免疫原 (例如,感染剂的抗原、肿瘤抗原、固定的肿瘤细胞),和优选地佐剂和/或药理学上可接受的载体。术语“佐剂”是指增强对抗原的免疫应答的化合物或混合物。佐剂可以例如用作缓慢释放抗原的组织贮库,并且还用作增强免疫应答的淋巴样系统 (参见霍德 (Hood) 等人,免疫学 (Immunology), 第二版,1984,本加民/卡姆明出版社:加利福尼亚门洛帕克 (Benjamin/Cummings:Menlo Park,CA), 第384页)。示例性佐剂包括,但不限于弗氏佐剂 (Freund's adjuvant) (完全和不完全)、皂苷、矿物凝胶诸如氢氧化铝、磷酸铝、表面活性物质 (例如,溶血卵磷脂)、复合多元醇 (例如卡波姆 (Carbopol))、聚阴离子、多肽 (例如牛血清白蛋白、卵白蛋白)、油或烃乳液 (例如二缩甘露醇单油酸酯 (Aracel A))、钥孔虫血蓝蛋白、二硝基苯酚、以及潜在有用的人佐剂诸如BCG (卡介苗) 和短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。

[0094] II iii免疫方案和剂量

[0095] 以与剂量配制品相容的方式,并且以如将是预防性的或治疗上有效的以及免疫原性的频率和量给予疫苗。疫苗将典型地作为感染前疫苗而给予,但也可以作为感染后疫苗给出。根据一个实施例,标准免疫方案包括初次接种,在该初次接种之后可以有一个或多个加强疫苗接种,该一个或多个加强疫苗接种是在1、2、3、4、5、6、7、8或更多周以后给予的。有待给予的量取决于有待治疗的受试者的年龄和重量,包括例如个体的免疫系统产生免疫应答的能力和所希望的保护程度。适合的剂量范围是每次疫苗接种为大约数百微克的单级或多级亚单位疫苗的多肽,其中优选的范围是从约0.1 μ g至1000 μ g,诸如在从约1 μ g至300 μ g的范围内,并且尤其地在从约4 μ g至100 μ g的范围内。

[0096] II iv疫苗的给予

[0097] 任何用于给予疫苗的常规方法是可适用的,包括以含有活性成分的固体形式 (诸如丸剂、栓剂或胶囊剂) 或以生理学上可接受的分散体诸如喷雾剂、散剂或液体来口服、鼻或粘膜给予,或通过例如皮下、皮内或肌肉注射或经皮施用来肠胃外给予。

[0098] 适合用于作为栓剂给予的疫苗配制品包括传统粘合剂和载体 (例如预凝胶化的玉米淀粉、聚亚烷基二醇类或甘油三酸酯类);此类栓剂可以从含有在0.5%至10%、优选地1%-2%范围内的活性成分的混合物中形成。口服配制品包括像例如以下各项这样的通常采用的赋形剂:药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采取溶液、混悬液、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放配制品或散剂的形式,并且有利地含有10%-95%的活性成分,优选地25%-70%。

[0099] III响应于口服给予哺乳动物乳OPN的群体组

[0100] 本发明涉及口服给予哺乳动物乳OPN以便通过暴露于 (并且任选地感染有) 感染性疾病或通过疫苗接种而增强在哺乳动物中诱导的特定免疫应答。该哺乳动物可以是选自以下各项之中:猪、反刍动物、马、猫、犬、以及灵长类动物。优选地该哺乳动物是人受试者。对于口服给予哺乳动物乳OPN特别有益的群体组是新生或年幼的婴儿,具体地在对儿童疾

病进行疫苗接种的周期过程中(参见Iii);以及免疫系统下降、受损或衰退的个体,如在一些成年人和老年人的情况下。该人受试者属于这些群体组,这些群体组可以选自属于以下年龄组的个体:0-5岁、6-11岁、12-18岁、19-34岁、35-44岁、45-54岁、55-64岁、65-74岁、75-84岁、以及大于84岁。

[0101] 实例1

[0102] 1. 方案

[0103] 1.1 动物测试群体和研究设计

[0104] 先前未接种疫苗的怀孕的大母猪(妊娠大约第84天; $n=3$)获自中西部猪研究所(Midwest Research Swine)(吉普森(Gibson),MN)。从这些大母猪中取得血液样品,以便通过ELISA测定来测试FZ特异性IgG(FZ是人流感疫苗Fluzone™)。选择具有最低FZ特异性IgG效价的大母猪用于研究。当得到时,用利特佳(LitterGuard)LT-C(C型产气荚膜梭菌和大肠杆菌菌苗类毒素;辉瑞动物保健(Pfizer Animal Health),宾夕法尼亚州埃克斯顿(Exton, PA))、RespiSure10ne(猪肺炎支原体菌苗(Mycoplasma hyopneumoniae Bacterin);辉瑞公司(Pfizer))、以及Rhinogen BPE(支气管败血性百日咳(Bordetella bronchiseptica)、猪红斑丹毒丝菌、多杀巴斯德菌菌苗类毒素;英特威公司(Intervet Inc.),米尔斯伯勒(Millsboro),DE)对所选择的大母猪进行疫苗接种,接着在产仔之前2周进行加强疫苗接种。这些大母猪没有接受对抗猪流感病毒(SIV)的疫苗接种。将这些大母猪容纳在产仔木箱中,并且安排富含抗生素(BMD)的妊娠膳食。允许大母猪自然产仔并且小猪在产后4小时接受初乳,在这个周期内这些小猪接受存在于大母猪初乳中的抗体,并且获得对这些大母猪进行疫苗接种的普通感染的被动免疫。

[0105] 1.2 动物膳食组和疫苗接种计划

[0106] 接着将小猪随机分成接受大母猪代乳品配方(FF; $n=10$)或用140mg/L牛乳OPN补充的配方(由阿拉食品原料公司I/S供应的Lacprodan OPN-10, Sønderrhøj 10-12, 8260维比J, 丹麦)(OPN; $n=12$)(大母猪代乳品配方是获自牛奶产品专业营养公司(Milk Specialties),邓迪(Dundee),IL的LiquiWean)的三个膳食组,而第三组小猪($n=7$)由大母猪养育(SR)并且用作参照组(图1)。将FF和OPN小猪单独地容纳在环境控制的房间(25℃)中的定制笼中。每日制备大母猪代乳品配方(基于牛乳蛋白)并且以360毫升/千克/天的速率提供22次。

[0107] 在第7天,用0.25mL人流感疫苗的肌肉注射液(Fluzone™,赛诺菲巴斯德生物制品有限公司(Sanofi Pasteur),宾夕法尼亚州斯威夫特沃特(Swiftwater,PA))对每个膳食组(SR、FF、OPN)中的一半小猪进行疫苗接种(SRV、FFV、OPNV)。接种疫苗的小猪在第14天接受加强疫苗接种(在与第一次疫苗接种相等的剂量下)。

[0108] 1.3 分析来源于血液样品的血清中的血清抗体浓度

[0109] 在第7天(疫苗接种之前的基线)和第14天,通过颈静脉穿刺收集血液样品;并且在第21天,通过心脏内穿刺(在即将安乐死之前)再次收集血液样品。

[0110] 使用在我们实验室中开发的ELISA来评价来源于所有取得的血液样品的血清中的流感病毒疫苗特异性IgG。简单地说,用涂布缓冲液[0.5M Carb/Bicarb缓冲液,pH 9.6]中的以1:80稀释的透析Fluzone™疫苗涂布平底板(能肯公司(Nunc),罗切斯特(Rochester),NY),并且在4℃下孵育过夜。在孵育之后,在室温(RT)下用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的10%

胎牛血清 (FBS) 封闭孔, 持续1小时。在添加稀释在PBS/10%FBS中的50 μ L血清之前, 用PBS/0.05%吐温-20洗涤这些孔三次, 并且在37 $^{\circ}$ C下孵育1h。用PBS/吐温再次洗涤板, 接着在37 $^{\circ}$ C下添加PBS/10%FBS中的以1:400稀释的缀合到过氧化物酶上的山羊抗猪IgG (Bethyl实验室, 蒙哥马利 (Montgomery), TX), 持续1h。在室温下将TMB (BD生物科技公司 (BD Biosciences), 圣何塞 (San Jose), CA) 孵育20分钟, 接着添加50 μ L的2N硫酸。对于每个孔, 使用SpectraMax M2e (美国分子仪器公司 (Molecular Devices), 森尼韦尔 (Sunnyvale), CA) 测量450nm处的吸光度。在每个板上包括以从1:2,000-1:80,000范围内稀释的包含已知量的流感病毒疫苗特异性IgG的阳性储备血清的样品, 并且用来对于流感病毒疫苗特异性IgG浓度提供标准曲线。以任意单位表达从该标准曲线的线性部分计算出的流感病毒疫苗特异性IgG。

[0111] 使用商业上可获得的ELISA试剂盒 (Bethyl实验室, 蒙哥马利, TX) 来测量来源于所取得的血液样品的血清中的总IgG和IgM浓度。

[0112] 1.4血清抗体浓度的统计学分析

[0113] 使用重复的测量分析来测试免疫球蛋白 (FZ特异性IgG、总IgG和总IgM) 的循环水平, 其中多项式对比持续SAS (9.2版本, SAS软件研究所 (SAS Institute Inc.), 卡瑞 (Cary), NC) 内的时间。在完整数据集中进行分析, 并且分别地在接种疫苗的组和未接种疫苗的组中进行分析。使用具有较少作为随机变量的起点的混合效应线性模型 (Proc Mixed) 分析来测试在第21天时取得的血液样品上所进行的测量。所分析的主要作用是膳食、疫苗接种以及膳食和疫苗接种的相互作用。当相互作用不显著时, 从模型中去除该相互作用。数据被报告为平均值 \pm SD。具有 $p < 0.05$ 的比较被认为是显著的, 并且具有 $p < 0.1$ 的那些比较认为是趋势。

[0114] 1.5从动物测试群体中进行组织样品收集。

[0115] 在产后21天安乐死之前, 用舒泰 (Telazol) (7mg/kg体重, 肌肉 (IM), 富道动物保健公司 (Fort Dodge Animal Health), 富道, IA) 镇静小猪, 并且通过心脏内穿刺将外周血收集在肝素束紧的真空管中。然后通过注射戊巴比妥钠 (72mg/kg体重, Fatal Plus, Vortech制药有限公司 (Vortech Pharmaceuticals), 迪尔伯恩 (Dearborn), MI) 使小猪安乐死。从幽门括约肌和回肠瓣中切除小肠, 并且测量总肠长度, 并且在离近端10%和85%处切断肠以得到对应地相应于十二指肠、空肠和回肠的3个区段。还切除了脾和回肠肠系膜淋巴结 (MLN) 样品用于分离单核细胞。

[0116] 1.6外周血单核细胞 (PBMC) 的分离

[0117] 最初用RPMI-1640 (2:1; 美国生命技术公司 (Life Technologies), 格兰德岛 (Grand Island), NY) 稀释外周血, 然后铺层于Ficoll-Paque Plus (通用医疗公司 (GE Healthcare), 皮斯卡塔韦 (Piscataway), NJ) 上, 并且在20 $^{\circ}$ C下在400 \times g下旋转40min。从梯度界面中收集PBMC, 并且用洗涤缓冲液 (汉克斯缓冲盐溶液, 无Ca $^{++}$, 无Mg $^{++}$, 美国生命技术公司) 洗涤三次, 该洗涤缓冲液用2%牛血清白蛋白 (BSA; 西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich), 圣路易斯 (St. Louis), MO)、0.01M EDTA (西格玛奥德里奇公司)、50 μ g/mL庆大霉素 (美国生命技术公司)、以及1000U/mL青霉素 (10000U/ml储液, 西格玛奥德里奇公司) 和100 μ g/ml链霉素 (10mg/mL储液, 西格玛奥德里奇公司) 补充。用裂解缓冲液 (0.15M的NH $_4$ Cl、10mM KHCO $_3$ 、以及0.1mM Na $_2$ EDTA) 裂解球粒中剩余的红细胞。将PBMC悬浮于用10%FBS、2mM

谷氨酰胺、50 μ g/mL庆大霉素、1mM丙酮酸钠(美国生命技术公司)、20mM HEPES(美国生命技术公司)、以及20mM 1000U/mL青霉素/100 μ g/mL链霉素补充的RPMI-1640中。使用Countess®自动细胞计数器(美国生命技术公司)评价活细胞数。然后通过流式细胞术或离体细胞刺激来将细胞用于表型细胞鉴定。

[0118] 1.6从脾和MLN中分离总免疫细胞

[0119] 将脾和MLN样品放入收集缓冲液(汉克斯平衡盐溶液(HBSS), 50 μ g/mL庆大霉素、0.01M 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、1000U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)中,并且用PBS(美国生命技术公司)+抗体(50 μ g/mL庆大霉素、1000U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)洗涤三次。然后在HBSS中对组织进行均质化,并且使用Gentle MACS(德国美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech), 奥本(Auburn), CA)短切。使组织匀浆滤过100 μ m(美国BD Falcon公司(BD Falcon), 圣何塞, CA)接着40 μ m的细胞滤过滤器(美国BD Falcon公司)。在裂解红细胞之后用洗涤缓冲液洗涤分离的细胞三次,并且悬浮于完全培养基(RPMI-1640, 10%FBS、2mM谷氨酰胺、50 μ g/mL庆大霉素、1mM丙酮酸钠、20mM HEPES、以及20mM 1000U/mL青霉素/100 μ g/mL链霉素)中。如上所述评价活细胞数。

[0120] 1.7从MLN和脾中分离的PBMC和总免疫细胞的表型鉴定

[0121] 通过流式细胞术(BD™ LSRII, 生物科技公司), 使用一系列荧光黄素(FITC)或藻红蛋白(PE)标记的mAb来监测来自外周血、MLN和脾的单核亚群的表型。通过小鼠抗猪CD4(FITC, 克隆74-12-4)和小鼠抗猪CD8(PE, 克隆76-2-11)抗体(BD生物科技公司)来鉴定T淋巴细胞。将10 μ L每种抗体添加到来自每个样品的 1×10^6 个细胞中。染色程序发生在冰上,并且当可能时将样品从光中移开。简单地说, 用5%小鼠血清(南方生物技术公司(Southern Biotec))和200 μ g/mL纯化的小鼠IgG(美国英杰生命技术有限公司(Invitrogen))封闭每个孔, 各持续5min。在离心之后, 将CD3添加到这些孔中并孵育20min(50 μ L:CD3:PE-Cy5), 并且再次离心。添加CD4:FITC和CD8:PE(各10 μ L), 并且孵育另外的15min直到离心。用PBS/1%BSA/0.1%叠氮化钠洗涤细胞, 并且然后用2%低聚甲醛固定。使用LSRII流式细胞仪(BD™, 生物科技公司)评价细胞。使用FlowJo 7.9软件(FlowJo, 阿什兰(Ashland), OR)来确定T细胞亚群的百分比。CD3+事件被认为是T细胞。CD3+CD4+CD8-事件被认为是T辅助细胞, CD3+CD4-CD8+和CD3+CD4+CD8+被认为对应地是细胞毒性T细胞和记忆T细胞。CD3-CD4-CD8+事件被标记为自然杀伤细胞。

[0122] 1.7离体刺激外周血单核细胞和脾细胞:

[0123] 作为免疫系统功能能力的指示物而进行离体刺激测定。在37℃下, 在5%CO₂下将总共 2×10^6 个/毫升的来自血液的单核细胞和来自脾的细胞放在最终体积为200 μ L培养基(包含20%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、100 μ g/mL青霉素以及100 μ g/mL链霉素的RPMI培养基)的96孔板中, 持续72h。在存在或不存在OPN(10 μ L的10 μ g/mL)的情况下, 将50 μ L的10 μ g/mL植物凝集素(PHA)溶液、50 μ L的0.8 μ g/mL脂多糖(LPS)溶液或18 μ L的180 μ g/mL Fluzone™溶液添加到孔中。在72小时孵育周期之后, 对板进行离心并且收集上清液用于细胞因子分泌的测量。

[0124] 1.8测量由离体刺激的细胞产生的细胞因子分泌:

[0125] 使用对于IL-10、IL-6和IL-12/IL-23p40的商业上可获得的试剂盒(安迪生物科技公司(R&D Systems), 明尼阿波利斯(Minneapolis), MN)来测量细胞因子分泌。简单地说, 在

4℃下使用制造商所建议的浓度,用捕获抗体对96孔板进行涂布过夜。用PBS中的0.05%吐温洗涤板,并且然后在室温下使用PBS中的1%BSA封闭持续1小时。在用PBS中的0.05%吐温洗涤3次之后,将100μL的未稀释的上清液添加到这些孔中,并且在室温下孵育2小时。在添加以1:180稀释在PBS中的1%BSA中的检测抗体之前,再次洗涤孔,并且将板孵育2小时。将链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶缀合物溶液添加到孔中并且孵育20min,接着添加TMB底物反应(OptEIA,BD生物科技公司)。在20min孵育之后,用50μL的2N H₂SO₄停止反应。在450nm波长处,用读板机测量吸光度。

[0126] 2.结果2.1向配方喂养的小猪补充OPN对它们的体重增加没有作用

[0127] 所有组中的小猪展现出正常的体重增加。用OPN或疫苗接种补充配方不影响小猪体重增加(图2)。从出生到第15天,SR组中的体重(图2中的插图)是与配方喂养组可比的,而到第16天它们的体重大于FF或OPN。

[0128] 2.2配方喂养的小猪中的Fluzone™特异性IgG通过膳食OPN补充剂而增强到大母猪养育的小猪中的水平。

[0129] 通过ELISA测量来源于7天龄、14天龄和21天龄小猪的血清中的流感病毒疫苗特异性IgG效价。阳性对照样品被用作用于计算FZ特异性IgG相对量的标准曲线,并且值被报告为任意单位(图3)。总体重复测量统计学显示了疫苗接种($p=0.0005$)和时间作用($p=0.0001$),但没有膳食处理作用。时间作用的进一步多项式趋势分析显示了显著的线性和二次项($p<0.05$)对比。未接种疫苗的组的事后统计学分析表明,循环的FZ特异性IgG通常较低并且不受膳食影响。然而,FZ特异性IgG浓度从第7天至第14天和第21天显著地($p<0.05$)降低。疫苗接种对第一次剂量的FZ之后的FZ特异性IgG的血清水平不具有影响。到第21天,在第14天给出加强剂量之后,来自所有3个处理组的动物响应于FZ疫苗。OPNV小猪中的FZ特异性IgG浓度类似于SRV小猪,并且这两者都显著高于($p<0.05$)FFV小猪(在这3个组中所测量的水平是对应地 371 ± 329 、 400 ± 171 和 137 ± 157)。

[0130] 2.3接种疫苗的小猪和未接种疫苗的小猪的血清中的总IgG和IgM效价随时间推移而下降。

[0131] 通过ELISA测量的血清中的总IgG水平(图4)不受膳食或疫苗接种影响。然而,所测量的总IgG水平随时间推移的平稳下降是统计学显著的($p<0.01$),其中在重复的测量分析之后出现显著的线性变化($p<0.002$)。在第21天时的混合效应线性模型分析表明,当与未接种疫苗(对应地 7.5 ± 2.5 和 5.9 ± 2.7 mg/mL)相比时,在接种疫苗的小猪中的总IgG水平趋向更高模式($p=0.09$)。此外,疫苗接种使OPN组中的总IgG水平增加大约2倍(96%),但在FF和SR小猪中观察到的变化(对应地0%和10%)相当小。总IgG水平的这种增加反映了在接受膳食OPN补充剂的小猪中更好地产生适应性免疫应答的能力。

[0132] 总IgM浓度不受膳食或疫苗接种影响,但最初在产后的周期过程中下降($p<0.001$;其中线性和二次项对比在 $p<0.0001$ 处)。图5指示了在合并来自每个膳食处理内的未接种疫苗的组和接种疫苗的组的数据之后的总IgM水平。

[0133] 2.4膳食和疫苗接种影响淋巴细胞的表型分布

[0134] 通过流式细胞术,使用一系列荧光黄素(FITC)或藻红蛋白(PE)标记的mAb来鉴定在第21天取得的脾、PBMC和MLN样品中的单核亚群的表型。如实例1.7中所述,细胞被鉴定为细胞毒性T细胞、T辅助细胞、双阳性记忆T细胞或自然杀伤细胞(NKC)(图6)。PBMC中的淋巴

细胞的表型分布和统计学分析(其中当不显著时可去除膳食*疫苗接种相互作用)呈现于表1中。在适应性免疫应答中具有活性作用的T辅助(CD4⁺)细胞是对膳食有响应的,但对疫苗接种没有响应。在OPN中的T辅助细胞显著高于FF和SR动物(对应地49.4%与42.2%和41.3%,图7A)。

[0135] 在对抗胞质病原体的宿主防御中重要的细胞毒性T细胞(CD8⁺)也不受疫苗接种影响,而膳食作用显示差异趋势。最小均方分析的差异显示,SR组中的T细胞毒性细胞的%显著高于OPN($p=0.018$)和在趋势水平($p=0.06$)高于FF(图7B)。为了更好地理解膳食对单核细胞群体的作用,计算了T辅助细胞与T细胞毒性细胞比率(图7C)。OPN(2.73 ± 0.89)和FF(2.24 ± 0.90)小猪的PBMC中的T辅助细胞与T细胞毒性细胞比率显著高于SR动物(1.71 ± 0.48)的该比率。T辅助细胞与T细胞毒性细胞比率的这种增加表明,在接种疫苗的动物中免疫系统被引发制造疫苗特异性的抗体,具体地接受OPN补充的膳食的那些小猪。

[0136] 记忆T细胞的群体(对于CD4⁺和CD8⁺双阳性)显著地受疫苗接种影响,而膳食仅显示一种趋势($p=0.052$)。疫苗接种导致CD3⁺细胞与CD4⁺CD8⁺记忆细胞的%降低21%。

[0137] 在疫苗接种之后PBMC中的自然杀伤细胞(CD4⁺CD3⁺CD8⁻)群体变化,其中从未接种疫苗的动物中的14.8%显著($p<0.05$)增加到接种疫苗的动物中的23.7%,但不存在膳食的作用。

[0138] 表1. 作为%CD3⁺细胞(T细胞)或CD3⁻细胞(自然杀伤细胞)的PBMC中的淋巴细胞的分布。

[0139]

	细胞毒性 T 细胞 (CD3+CD4-CD8+)	记忆 T 细胞 (CD3+CD4+CD8+)	辅助 T 细胞 (CD3+CD4+CD8-)	自然杀伤细胞 (CD3-CD4-CD8+)
SR	23.4 ± 1.17	21.3 ± 2.58	41.0 ± 7.62	20.0 ± 19.4
FF	19.8 ± 5.77	15.1 ± 4.67	39.0 ± 4.77	10.3 ± 4.04
OPN	16.9 ± 3.59	14.5 ± 4.10	49.5 ± 8.47	15.2 ± 6.31
SRV	26.0 ± 8.89	12.6 ± 3.34	38.9 ± 3.29	32.4 ± 14.6
FFV	20.7 ± 6.46	12.2 ± 4.47	43.0 ± 7.14	24.2 ± 15.1
OPNV	21.1 ± 4.56	13.2 ± 3.92	48.0 ± 5.0	19.0 ± 7.66
统计	膳食: $p=0.054$ 疫苗接种: 不显著	膳食: $p=0.052$ 。 疫苗接种: $p<0.01$ 膳食*疫苗接种: $p<0.04$	膳食: $p<0.01$ 疫苗接种: 不显著	膳食: 不显著 疫苗接种: $p<0.03$

[0140] 数据被表达为平均值±SD

[0141] 如实例1.7所述,从MLN中分离免疫细胞,并且细胞群体被鉴定为CD3⁺的%和CD3⁻的%(表2)。疫苗接种对所研究的任何MLN免疫细胞不具有显著的影响。OPN组中的T细胞毒性细胞数(13.7%)最为类似SR组的T细胞毒性细胞数(12.0%),并且它们都与FF动物(16.6%,图8A)显著不同。膳食没有使作为T辅助细胞的CD3⁺细胞%变化,但膳食显著地($p<0.05$)改变了T细胞毒性细胞群体。类似地,OPN和SR T辅助细胞/T细胞毒性细胞比值是可比的并且对于FF显著更大(图8B)。PBMC中看到的CD4⁺/CD8⁺细胞的比率增加反映了,在接受膳食OPN的小猪中对疫苗接种的适应性体液应答增强。SR小猪中的自然杀伤细胞群体高于这两个配方组,但在趋势水平($p<0.06$)处达到统计学显著性。

[0142] 表2. 作为%CD3⁺(T细胞)或CD3⁻(自然杀伤)细胞的MLN淋巴细胞的分布。

[0143]

	细胞毒性 T 细胞 (CD3+CD4-CD8+)	记忆 T 细胞 (CD3+CD4+CD8+)	辅助 T 细胞 (CD3+CD4+CD8-)	自然杀伤细胞 (CD3-CD4-CD8+)
SR	13.6 ± 3.09	14.6 ± 2.71	55.3 ± 5.47	3.1 ± 1.59
FF	16.3 ± 1.51	15.5 ± 3.19	53.9 ± 2.46	2.0 ± 0.69
OPN	14.4 ± 2.33	13.3 ± 4.36	60.3 ± 5.12	2.1 ± 0.82
SRV	10.5 ± 3.89	15.6 ± 9.39	61.7 ± 13.9	3.1 ± 0.86
FFV	16.8 ± 2.92	15.3 ± 5.15	57.2 ± 3.75	1.9 ± 0.51
OPNV	12.9 ± 3.15	17.3 ± 4.68	57.9 ± 3.82	1.9 ± 1.62
统计 学	膳食: p<0.005 疫苗接种: 不显著	膳食: 不显著 疫苗接种: 不显著	膳食: 不显著 疫苗接种: 不显著	膳食: p=0.056 疫苗接种: 不显著

[0144] 数据被表达为平均值±SD

[0145] 从脾中分离的单核细胞的分布示于表3中。脾中的T辅助细胞和T细胞毒性细胞受疫苗接种影响,但不受膳食处理影响。作为记忆细胞的CD3+的%受膳食和疫苗接种影响。疫苗接种增加了记忆细胞的群体,这些记忆细胞在建立适应性(体液)应答方面是重要的。值得注意地,这两个配方喂养的组(OPN组和FF组)都具有比SR显著更高的记忆细胞水平(图9)。当与所有其他处理组相比时,自然杀伤细胞在未接种疫苗的SR动物中显著更高。疫苗接种不影响脾中的自然杀伤水平。在接种疫苗的小猪的脾中,T辅助细胞(CD4+)/T细胞毒性细胞(CD8+)比率被认为是增加的,具体地以SR或OPN喂养的那些小猪,从而反映了适应性体液应答的诱导。

[0146] 表3.作为%CD3⁺(T细胞)或CD3⁻(自然杀伤)细胞的脾中的淋巴细胞的分布。

[0147]

	细胞毒性 T 细胞 (CD3+CD4-CD8+)	记忆 T 细胞 (CD3+CD4+CD8+)	辅助 T 细胞 (CD3+CD4+CD8-)	自然杀伤细胞 (CD3-CD4-CD8+)
SR	13.6 ± 3.09	4.7 ± 0.99	55.3 ± 6.98	10.7 ± 4.16 ^a
FF	13.0 ± 5.79	8.6 ± 4.02	46.0 ± 15.7	4.4 ± 1.10 ^b
OPN	13.9 ± 3.61	8.6 ± 3.52	44.9 ± 6.91	4.1 ± 2.70 ^b
SRV	10.5 ± 3.89	5.94 ± 0.58	61.7 ± 13.9	5.9 ± 0.89 ^b
FFV	12.5 ± 4.52	13.0 ± 2.97	48.2 ± 7.30	4.7 ± 1.47 ^b
OPNV	10.8 ± 2.43	10.6 ± 2.19	49.1 ± 5.87	5.8 ± 2.80 ^b
统计 学	膳食: 不显著 疫苗接种: p<0.05	膳食: p<0.01 疫苗接种: p<0.01	膳食: 不显著 疫苗接种: p<0.04	膳食: p<0.005 疫苗接种: 不显著 膳食*疫苗接种: p<0.02

[0149] ¹数据被表达为平均值±SD

[0150] 2.5由分离的免疫细胞产生的离体刺激和细胞因子分泌:

[0151] 为了评价PBMC和脾细胞的细胞免疫应答,与PHA、LPS或流感病毒疫苗一起孵育分离的细胞持续72小时。植物凝集素(PHA)(一种植物外源凝集素)和脂多糖(LPS)(一种细菌细胞壁组分)是对应地活化T细胞和B细胞的促分裂原。免疫细胞的活化引起细胞因子的分泌。白细胞介素6(IL-6)(又称为干扰素-β2)是对从急性炎症转变成获得性免疫或者慢性炎

症疾病所必要的多效性 α -螺旋细胞因子。白细胞介素10 (IL-10) 是一种抗炎性Th2细胞因子,而白细胞介素-12 (IL-12) 是又称为自然杀伤细胞刺激因子 (NKSF) 或细胞毒性淋巴细胞成熟因子的一种促炎性Th1细胞因子。在培养基中,在存在或不存在10 μ g/mL OPN的情况下进行离体细胞培养。添加OPN对所测定的细胞因子的分泌不具有显著影响,因此合并来自OPN处理的细胞和未处理的细胞的数据。对于PBMC和脾的所有处理的具有细胞因子浓度 (pg/mL) 的数据对应地概述于表4和表5中。然后基于统计学差异合并统计学显著的数据,并且示于图10-17中。

[0152] 外周血单核细胞:在未刺激的PBMC中,IL-6和IL-10的浓度在检测水平以下(表4)。在未刺激的细胞的上清液中检测到IL-12并且膳食和疫苗接种这两者的作用都是统计学显著的 ($p < 0.05$) (图10)。在OPNV组的PBMC中,IL-12相对于所有其他处理组是最高的。在PBMC中PHA刺激细胞因子不受疫苗接种影响。然而,膳食对IL-12分泌的影响是统计学显著的,其中在OPNV中观察到最高分泌(图11A)。IL-10分泌趋向于在膳食组之中不同,其中获自OPN组的细胞趋向于高于来自SR和FF小猪的细胞(图11B)。

[0153] 在来源于OPN喂养的小猪的LPS刺激的PBMC中,IL-6和IL-12的浓度相对于SR组和FF组显著更高 ($p < 0.05$), 无论是否疫苗接种(对应地图12A和图12B)。在LPS刺激IL-10分泌中观察到类似的模式,其中暴露于OPN引起IL-10的浓度更高。另外,疫苗接种在OPN组和SR组中引起更高的IL-10水平(图12C)。

[0154] 流感病毒疫苗对IL-12的作用是疫苗接种依赖性的,其中在膳食与疫苗接种之间具有统计学显著的相互作用(图13A)。疫苗接种在SRV和FFV中导致IL-12分泌减少,而OPN组保持不变。与SR和FF相比,在流感病毒疫苗刺激的细胞中的IL-10分泌高于在OPN喂养的组中,而接种疫苗的小猪具有更低的IL-10浓度(图13B)。

[0155] 脾免疫细胞:用PHA、LPS和流感病毒疫苗刺激从脾中分离的细胞,并且在72小时孵育之后所收集的上清液中测量细胞因子产生(表5)。脾细胞不产生对用于本研究的刺激物有响应的任何IL-6。另一方面,在未刺激的细胞的上清液中发现IL-12(图14A)。来自SR组和FF组的细胞分泌更高量的IL-12,而膳食OPN和疫苗接种趋向于 ($p = 0.07$) 降低IL-12浓度。未刺激的细胞的上清液中的IL-10浓度在SRV组中最高(图14B)。对PHA刺激有响应的由脾细胞产生的IL-12和IL-10分泌是类似的。当与在未接种疫苗的组中发现的水平相比时,疫苗接种降低IL-12(图15A)和IL-10(图15B)的浓度。此外,OPN组具有比SR组和FF组显著更低的这两种细胞因子的水平。类似地,对LPS有响应的IL-12分泌在来源于未接种疫苗的小猪的细胞上清液中显著高于接种疫苗的小猪 ($p < 0.05$) (图16A)。获自OPN组的细胞相对于SR组和FF组分分泌最低量的IL-12。在LPS刺激的细胞中的IL-10分泌不受疫苗接种影响,但在SR组中高于FF组和OPN组(图16B)。当流感病毒疫苗刺激时,IL-12和IL-10分泌在接种疫苗的组中最低 ($p < 0.05$), 并且从OPN动物中分离的细胞比SR和FF分泌更少的IL-12(图17)。

[0156] 总之,当小猪接受用OPN补充的配方膳食时,它们的胃细胞暴露于恒定的OPN浓度中。这与大母猪养育的小猪相反,在这些大母猪养育的小猪中,它们接受的OPN水平将随着用大母猪乳替代大母猪初乳的供应而下降,并且将低于在OPN补充的配方膳食中提供的140mg/L。当不存在和存在免疫刺激剂这两种情况下离体孵育时,当与来源于配方喂养的小猪或大母猪养育的小猪的细胞相比时,接受OPN补充的配方的小猪特征在于分泌更多IL-12和IL-10的免疫细胞(PBMC)。这提供了以下证据:膳食OPN具有引发PBMC细胞分泌IL-12和

IL-10的作用。当用PHA (T细胞活化) 和LPS (B细胞活化) 刺激时,来自OPN-配方喂养的小猪的PBMC分泌IL-12 (促炎性) 和IL-10 (抗炎性) 的能力表明免疫机制推向免疫平衡。

[0157] 实例2

[0158] 使用向婴儿给予的 **Lacprodan®** OPN-10进行的临床试验

[0159] 2.1试验设计

[0160] 在中国上海进行双盲随机临床试验以便评估将牛OPN添加到配方中的作用。母亲选择母乳喂养或者配方喂养她们的从1至6月龄的婴儿。分组如下 (n=60/组) :

[0161] 1) 母乳喂养的婴儿

[0162] 2) 用没有OPN添加的常规配方 (RF) (F0) 喂养的婴儿

[0163] 3) 用添加大约65mg OPN/L的牛OPN的RF (F65)

[0164] 4) 用添加大约130mg OPN/L的牛OPN的RF (F130)

[0165] *在 (未补充的) 常规配方中发现的OPN的基础水平是大约15mg OPN/L。

[0166] 按月登记人体测量学,并且在1月龄、4月龄和6月龄时通过静脉穿刺取得静脉血液样品。分析血液学、免疫参数、血浆氨基酸类和血液尿素氮 (BUN) 。

[0167] 2.2试验结果

[0168] 与母乳喂养的婴儿相比,在接受常规配方 (F0) 的婴儿中,对感染 (诸如病毒、细菌、真菌或变形虫感染) 有响应的婴儿中的发热发病率显著增加 (图18)。以65mg OPN/L或130mg OPN/L的量将OPN添加到常规配方中可使在用常规配方喂养时所见到的高发热发病率降到极为接近在母乳喂养的婴儿中见到的低发病率水平。当与母乳喂养的婴儿相比时,接受常规配方 (F0) 的婴儿组是仅有的显示发热发病率统计学显著增加的组。

[0169] 参考文献:

[0170] 阿尔伯斯等人2013通过普通群体中的营养学监测免疫调制:对人健康的鉴定和持续作用 (Monitoring immune modulation by nutrition in the general population: identifying and substantiating effects on human health). 英国营养学杂志 (British J Nutrition) 110 (2):1-22。

[0171] 比松内特等人2012;牛乳骨桥蛋白同工型的蛋白质组学分析和免疫检测 (Proteomic analysis and immunodetection of the bovine milk osteopontin isoforms). 乳品科学杂志 (Journal of Dairy Science), 95 (2):567-579,

[0172] 普洛特金SA,008;疫苗诱导的免疫的相互关系 (Correlates of Vaccine-Induced Immunity). 疫苗杂志 (Vaccines) 47:401-409

[0173] 索伦森等人1995牛骨桥蛋白的翻译后修饰:鉴定28个磷酸化位点和3个O-糖基化位点 (Posttranslational modifications of bovine osteopontin: Identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites);蛋白质科学杂志 (Protein Science) 4:2040-2049

序列表

<110> 阿拉食品原料公司 (Arla Foods amba)

<120> 用于增强免疫应答的哺乳动物乳骨桥蛋白

<130> P1071EP00

<160> 1

<170> PatentIn 3.5 版本

<210> 1

<211> 278

<212> PRT

<213> 牛

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (152)..(161)

<223> 包含整联蛋白结合结构域的基序

<400> 1

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Ala Ser Ala
1 5 10 15

Leu Pro Val Lys Pro Thr Ser Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
20 25 30

Asn Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Lys Pro Asp Pro
35 40 45

[0001] Ser Gln Lys Gln Thr Phe Leu Ala Pro Gln Asn Ser Val Ser Ser Glu
50 55 60

Glu Thr Asp Asp Asn Lys Gln Asn Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu
65 70 75 80

Ser Pro Glu Gln Thr Asp Asp Leu Asp Asp Asp Asp Asn Ser Gln
85 90 95

Asp Val Asn Ser Asn Asp Ser Asp Asp Ala Glu Thr Thr Asp Asp Pro
100 105 110

Asp His Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu Ser Asp Glu Val Asp
115 120 125

Phe Pro Thr Asp Ile Pro Thr Ile Ala Val Phe Thr Pro Phe Ile Pro
130 135 140

Thr Glu Ser Ala Asn Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Ala Tyr Gly Leu
145 150 155 160

Lys Ser Arg Ser Lys Lys Phe Arg Arg Ser Asn Val Gln Ser Pro Asp
165 170 175

Ala Thr Glu Glu Asp Phe Thr Ser His Ile Glu Ser Glu Glu Met His
180 185 190

Asp Ala Pro Lys Lys Thr Ser Gln Leu Thr Asp His Ser Lys Glu Thr
195 200 205

	Asn	Ser	Ser	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Leu	Thr	Pro	Lys	Ala	Lys	Asp	Lys
	210						215					220				
	Asn	Lys	His	Ser	Asn	Leu	Ile	Glu	Ser	Gln	Glu	Asn	Ser	Lys	Leu	Ser
	225					230					235					240
[0002]	Gln	Glu	Phe	His	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Leu	Asp	Leu	Asp	His	Lys	Ser
					245					250					255	
	Glu	Glu	Asp	Lys	His	Leu	Lys	Ile	Arg	Ile	Ser	His	Glu	Leu	Asp	Ser
				260					265					270		
	Ala	Ser	Ser	Glu	Val	Asn										
				275												

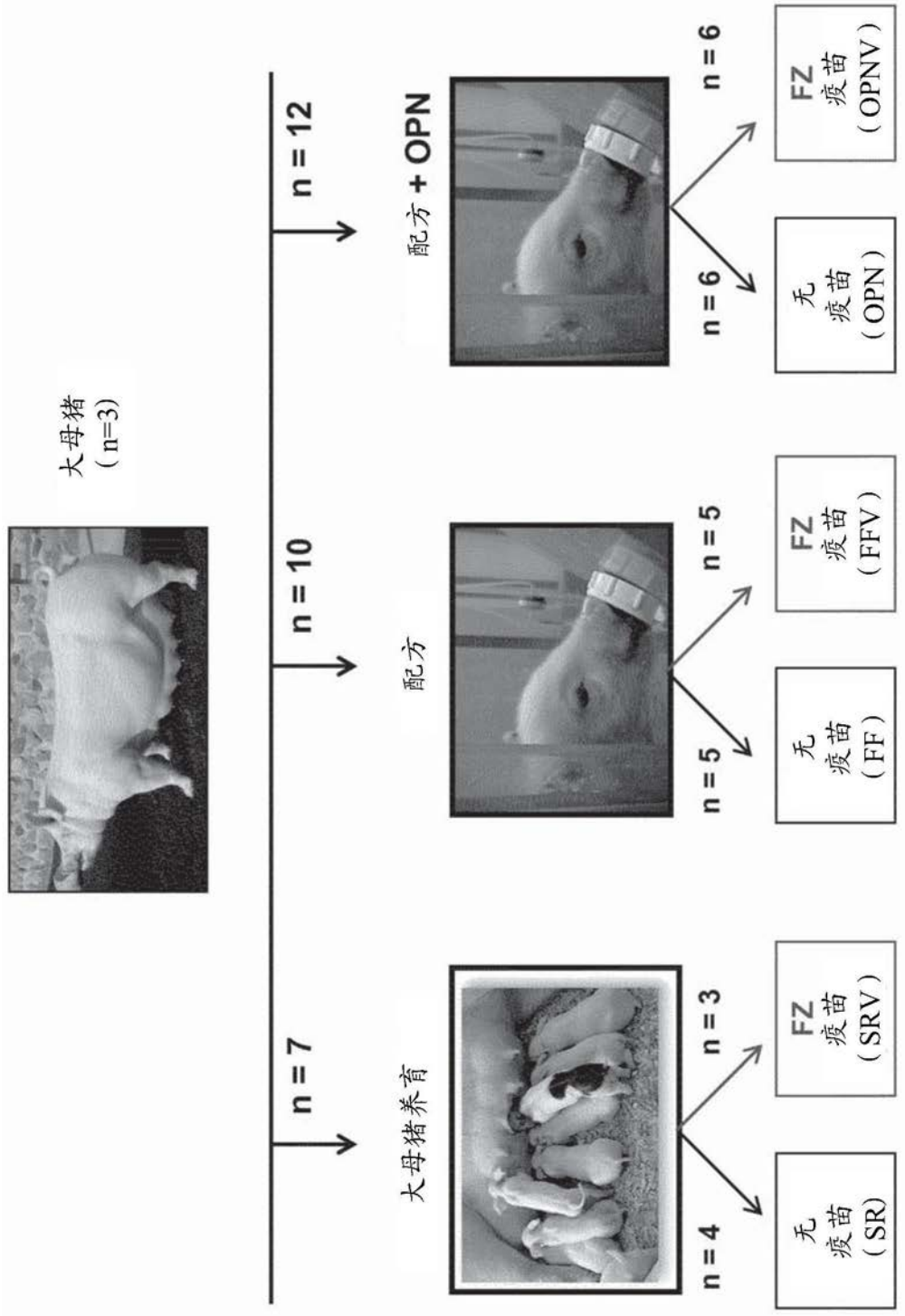


图1

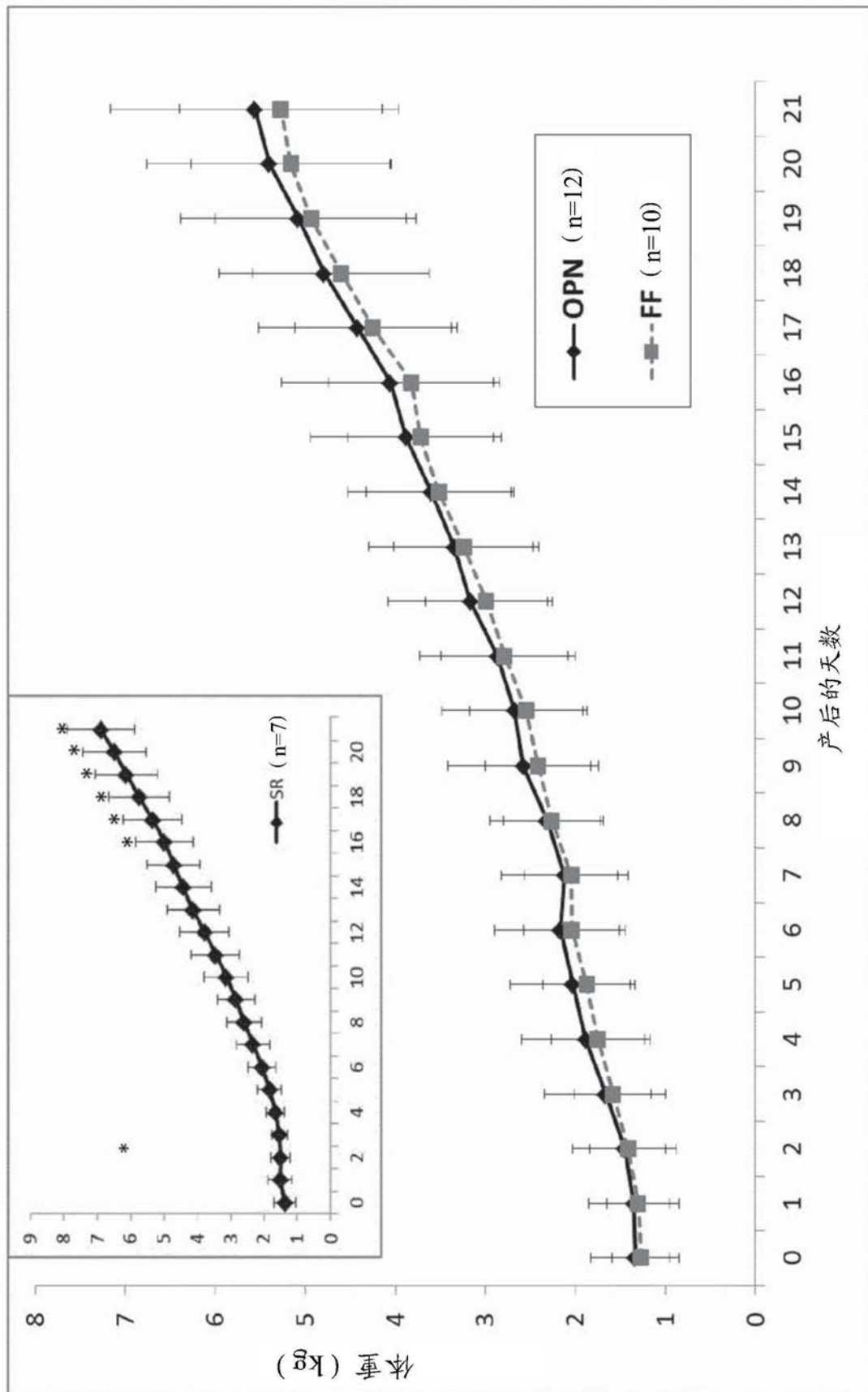


图2

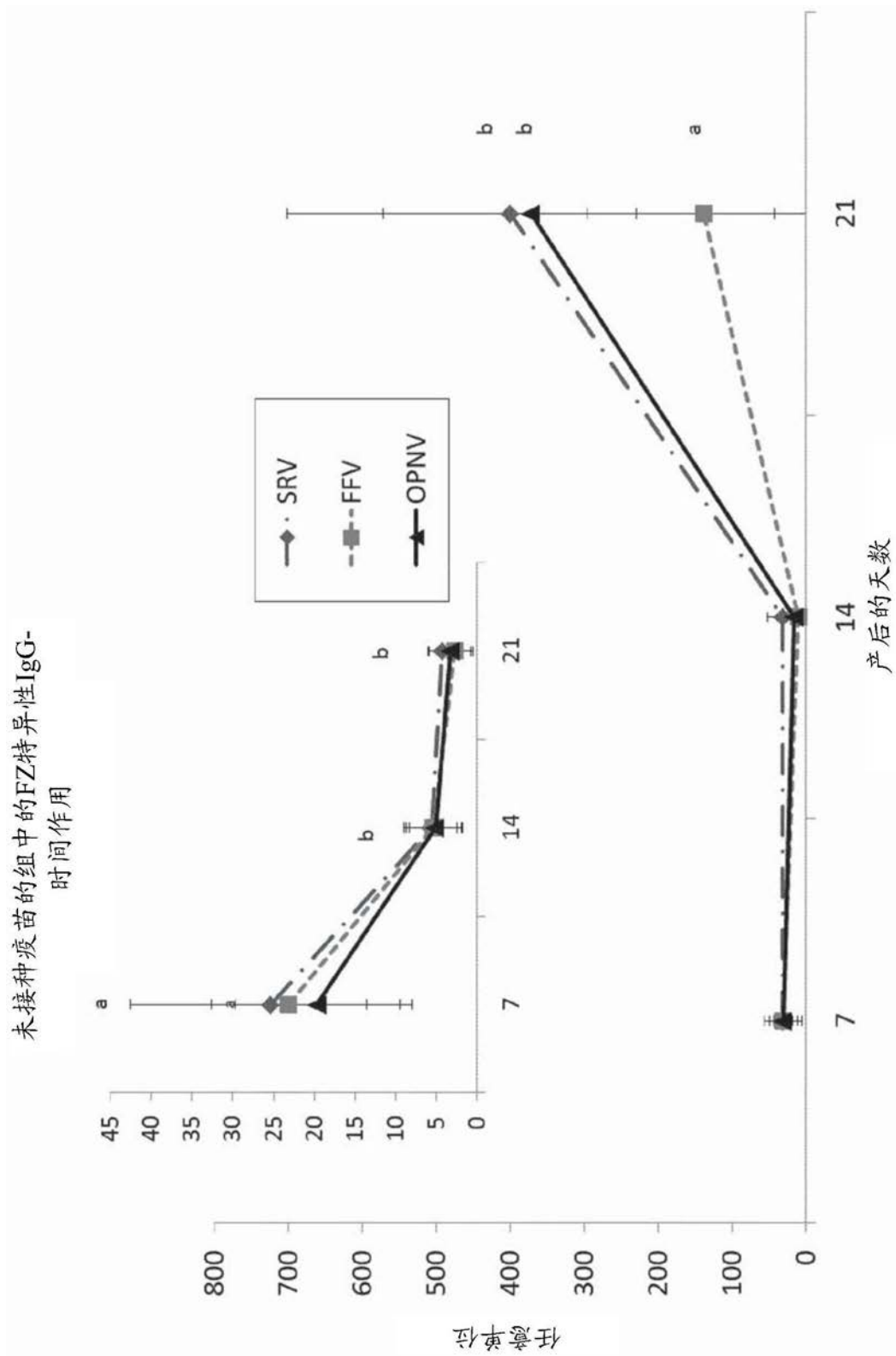


图3

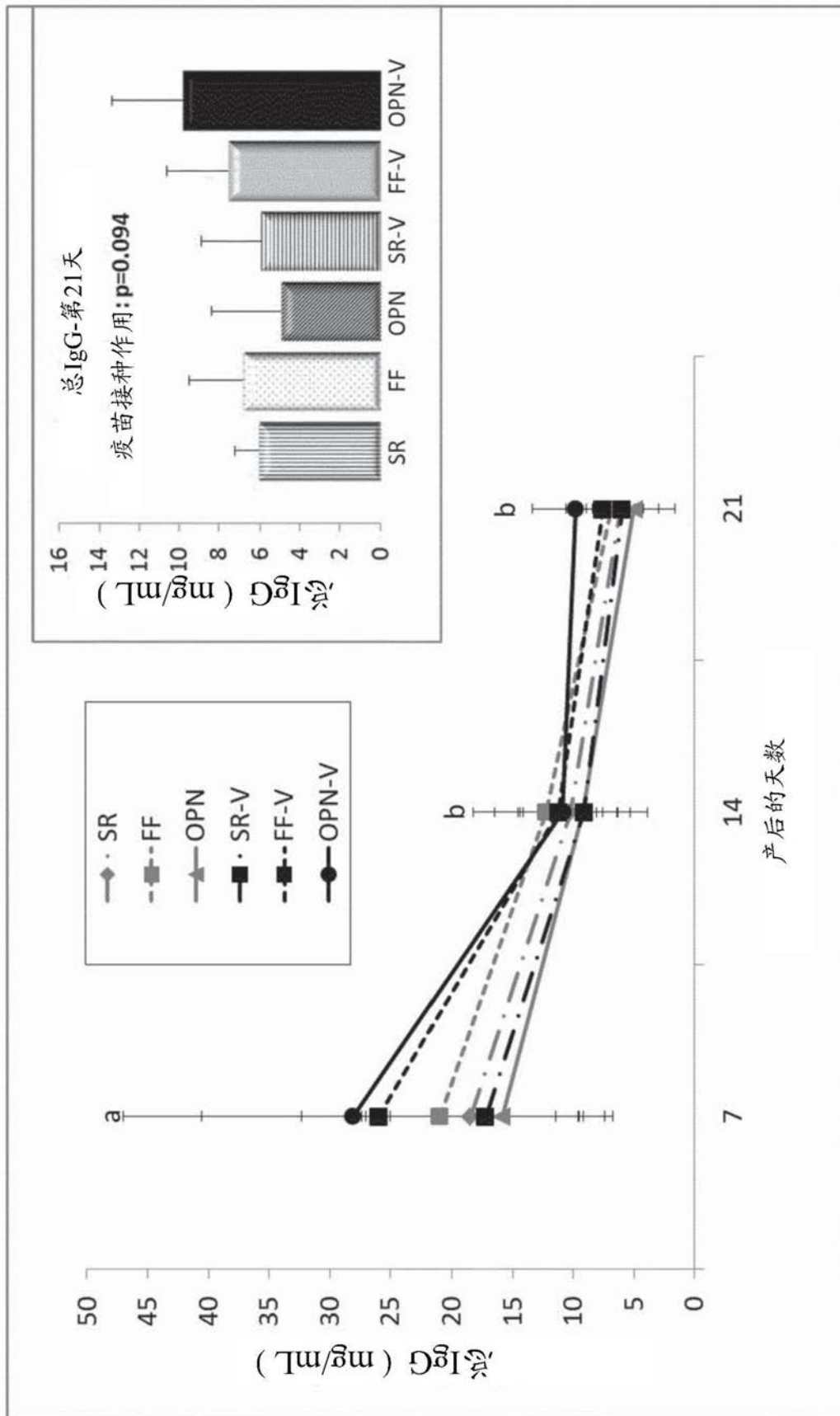


图4

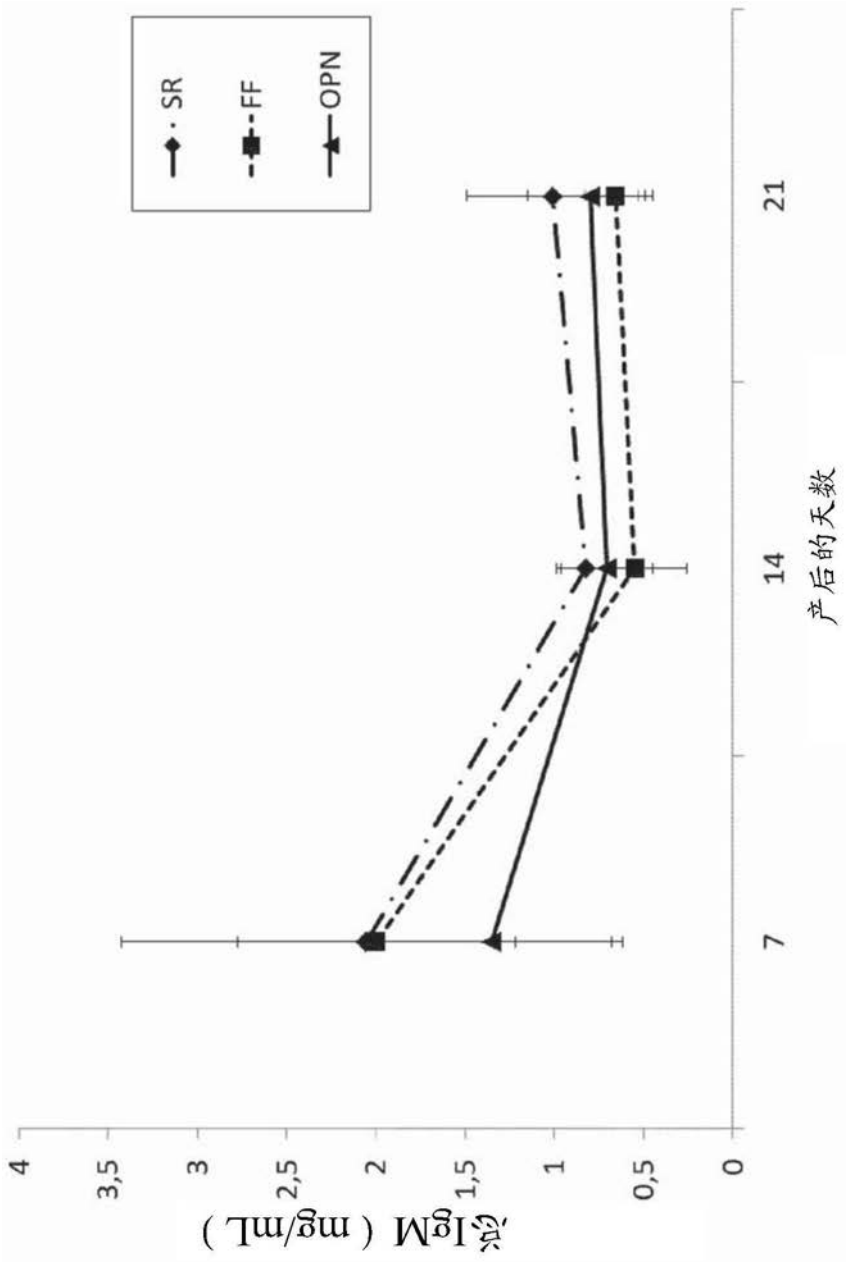


图5

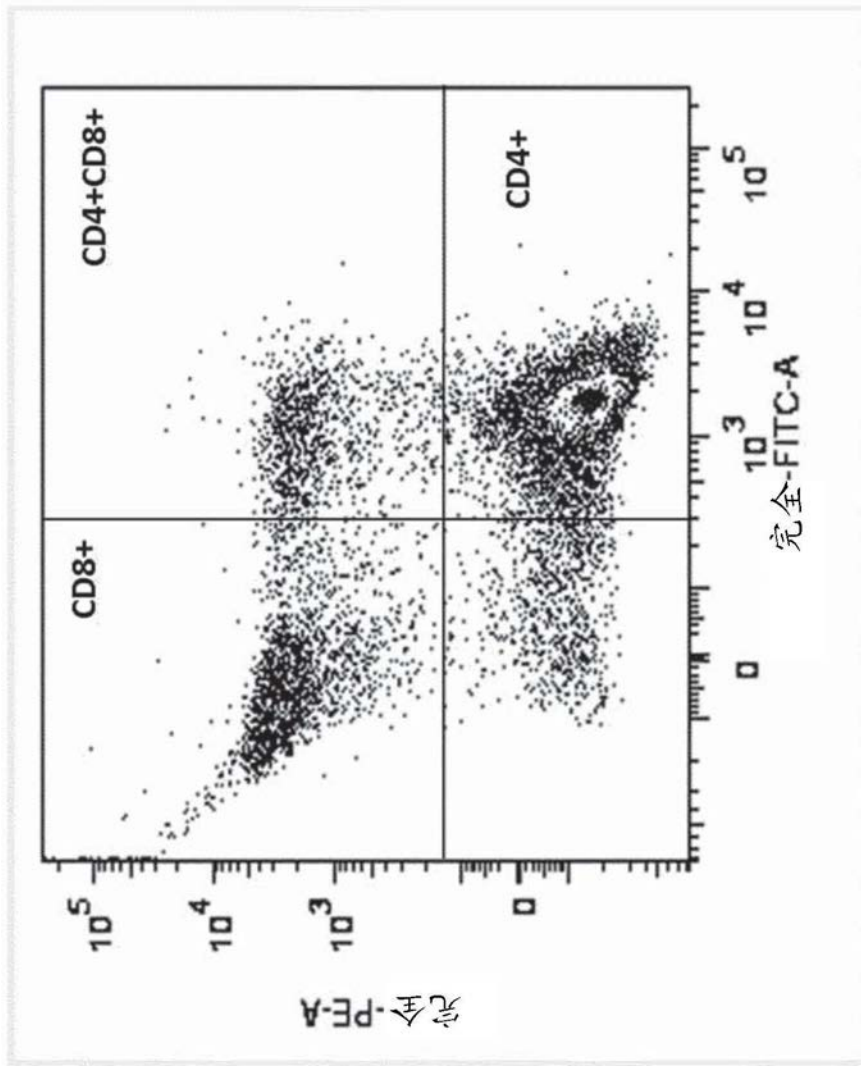


图6

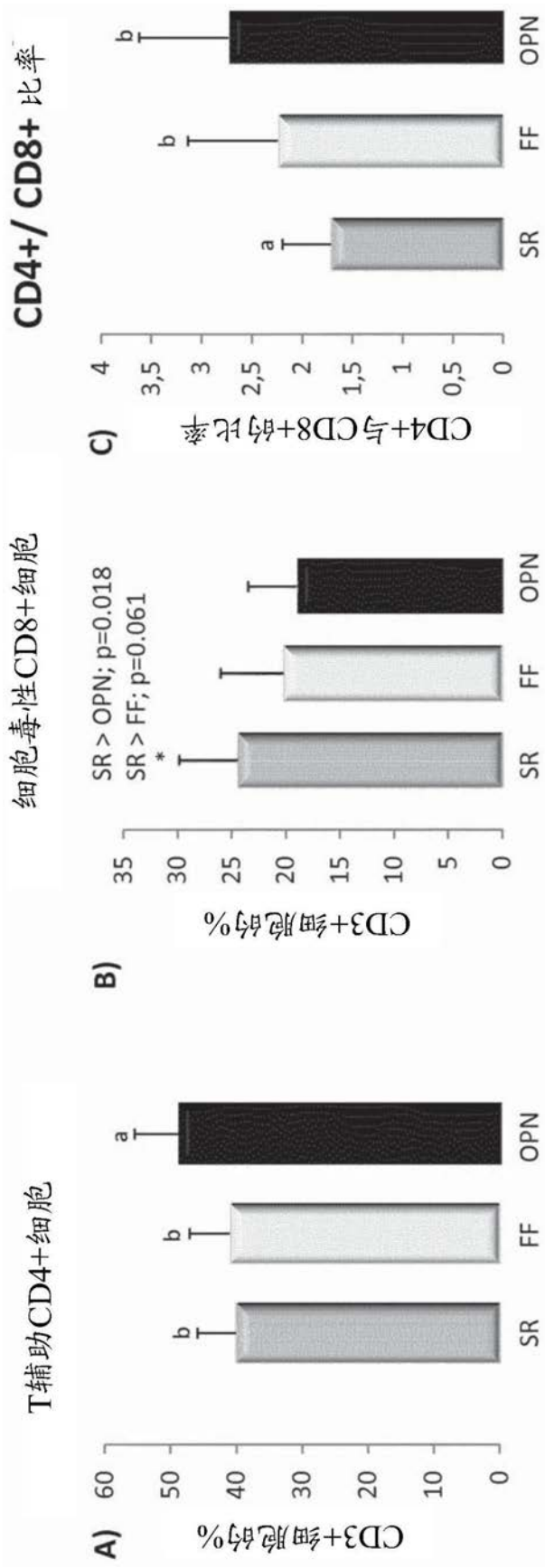


图7

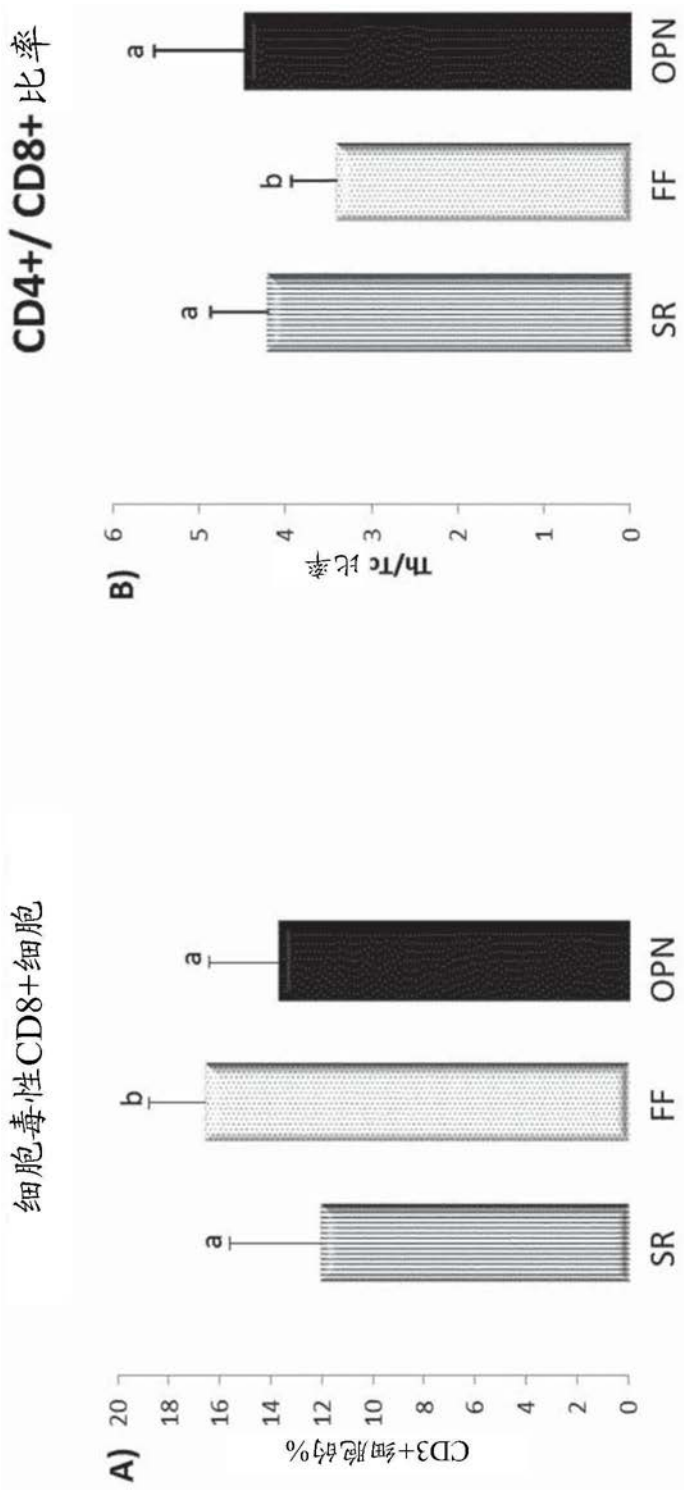


图8

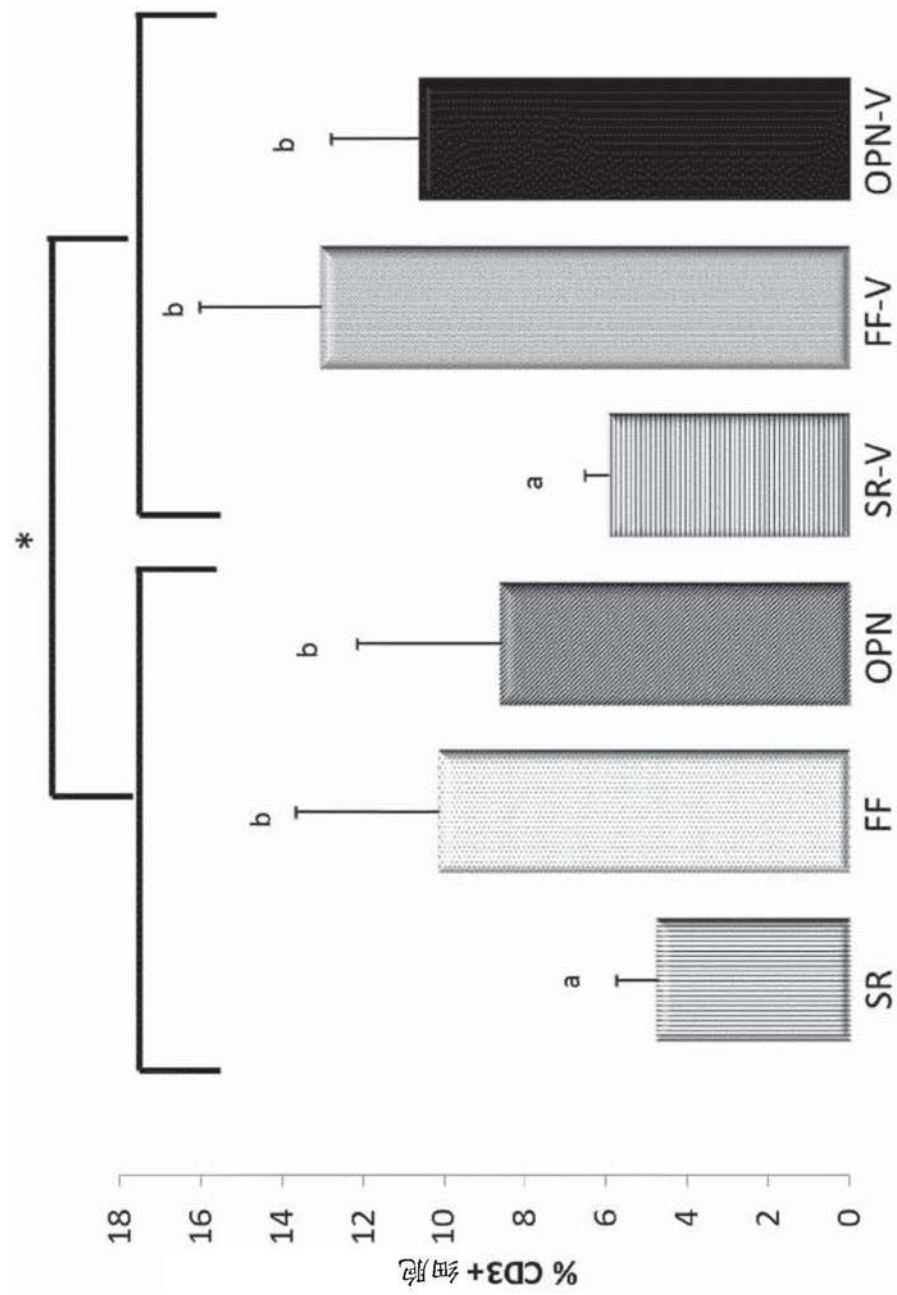


图9

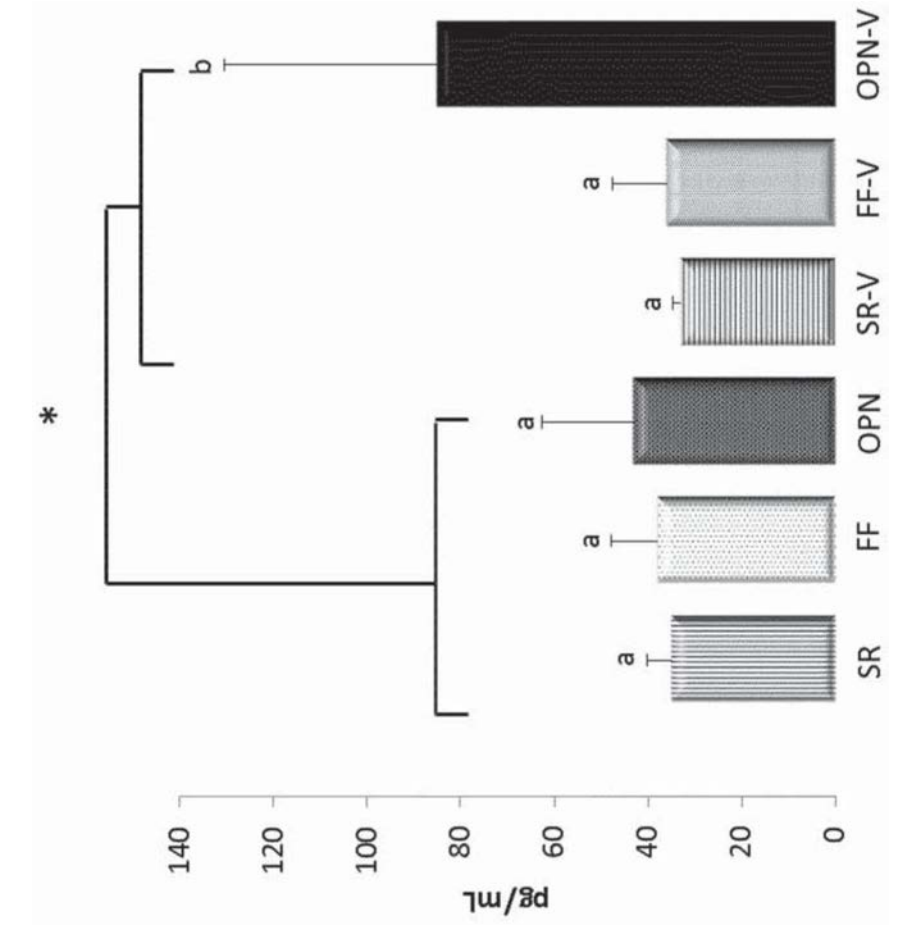


图10

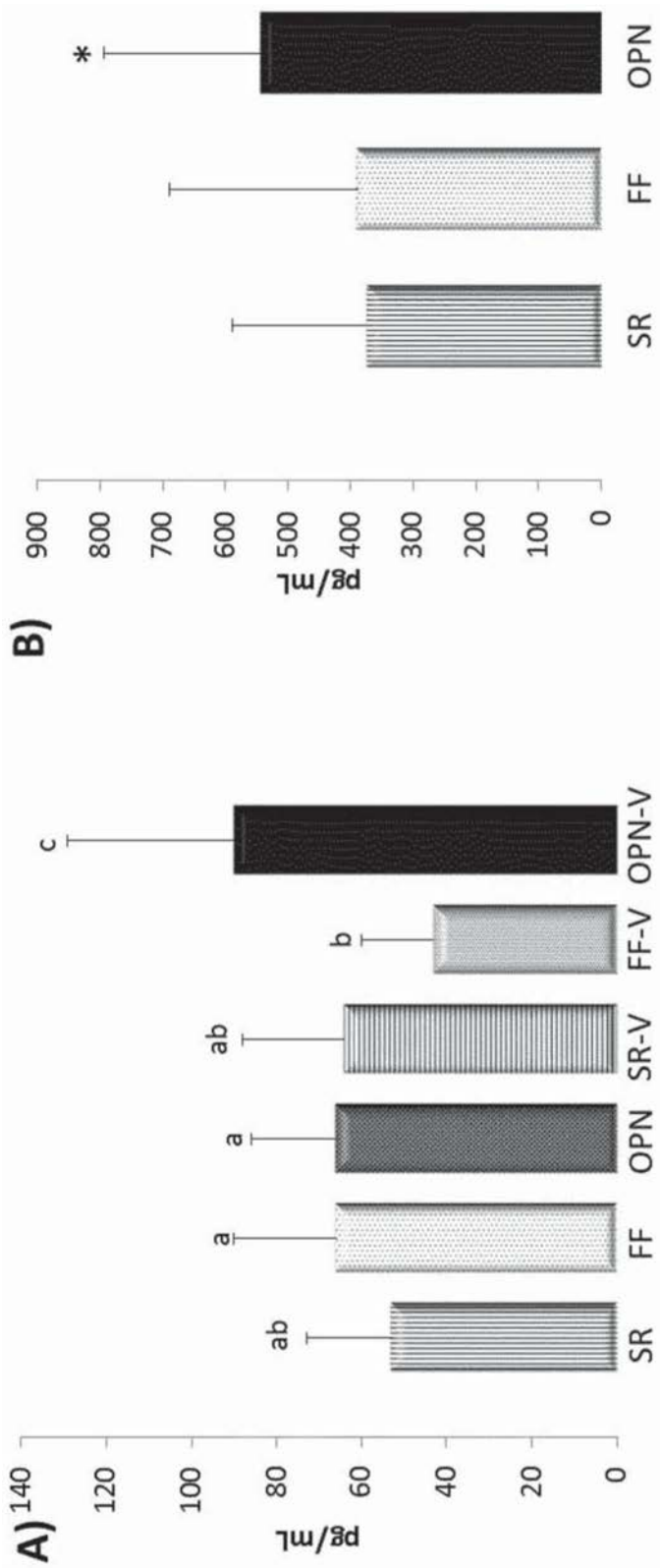


图11

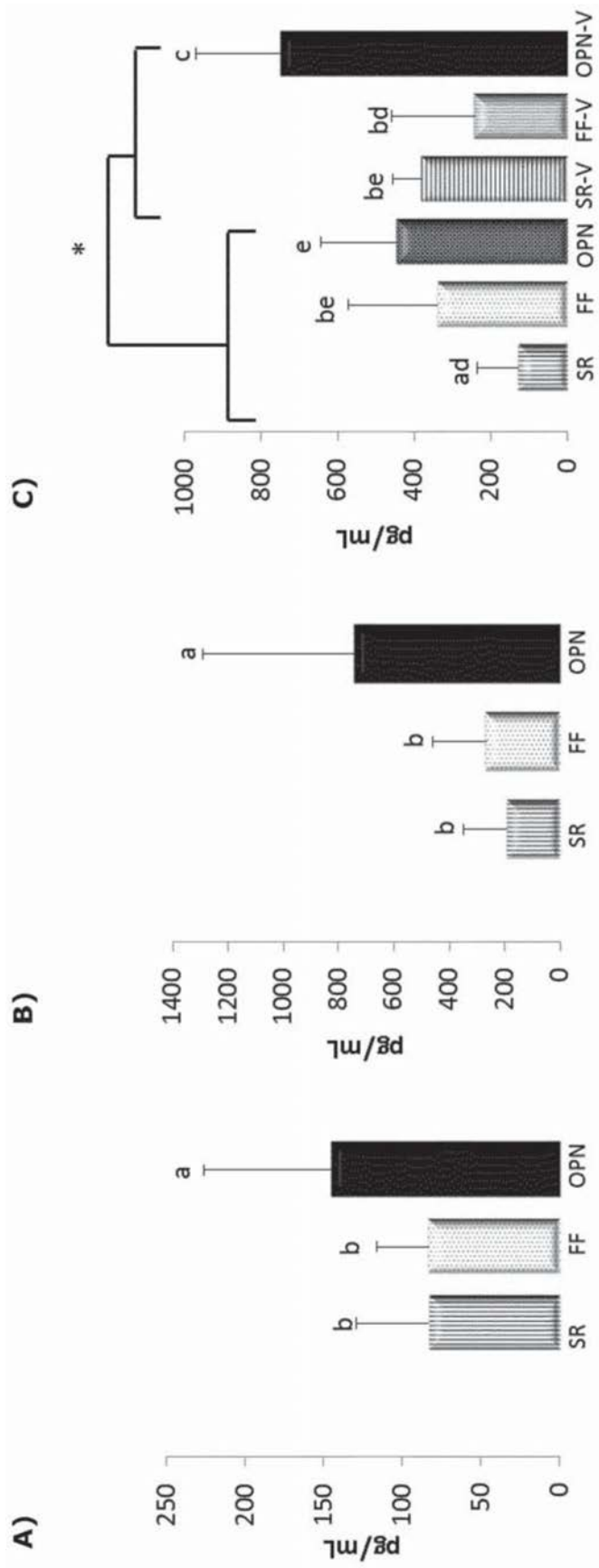


图12

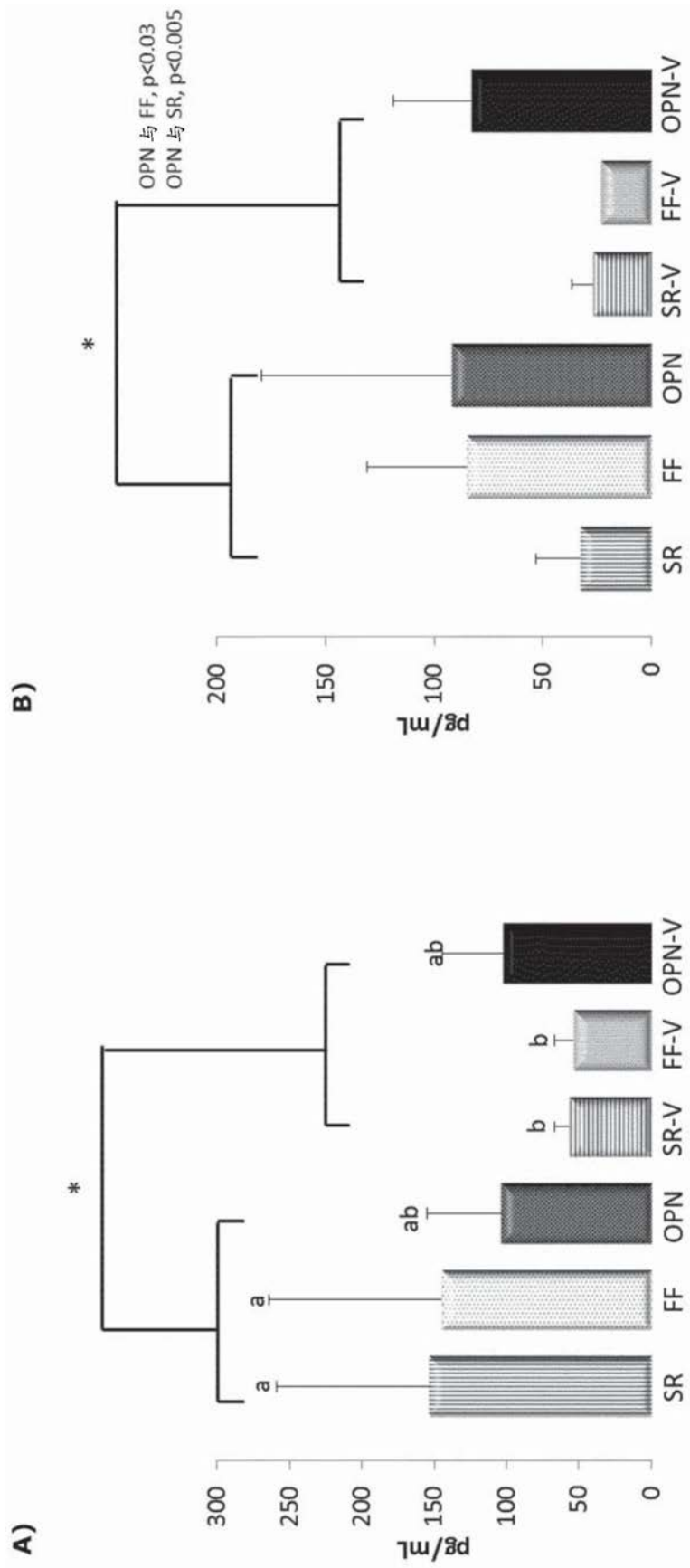


图13

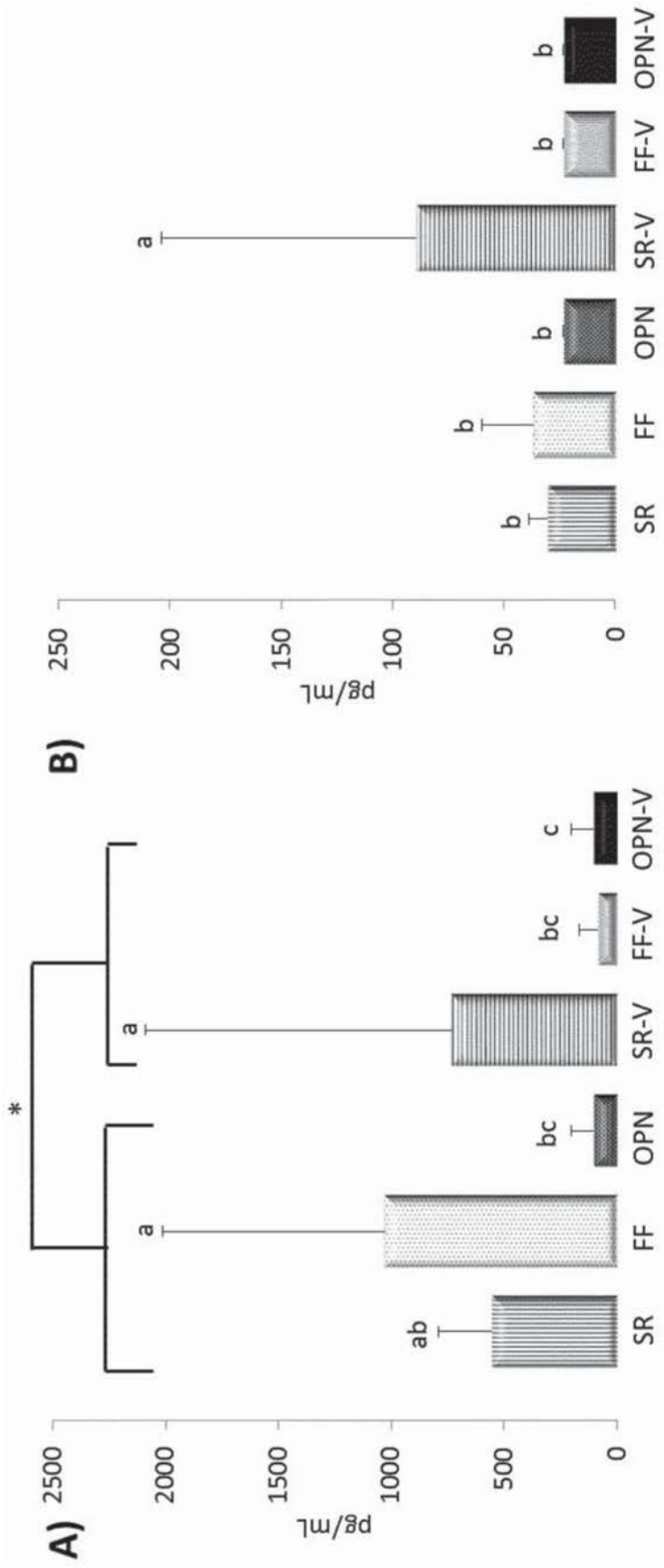


图14

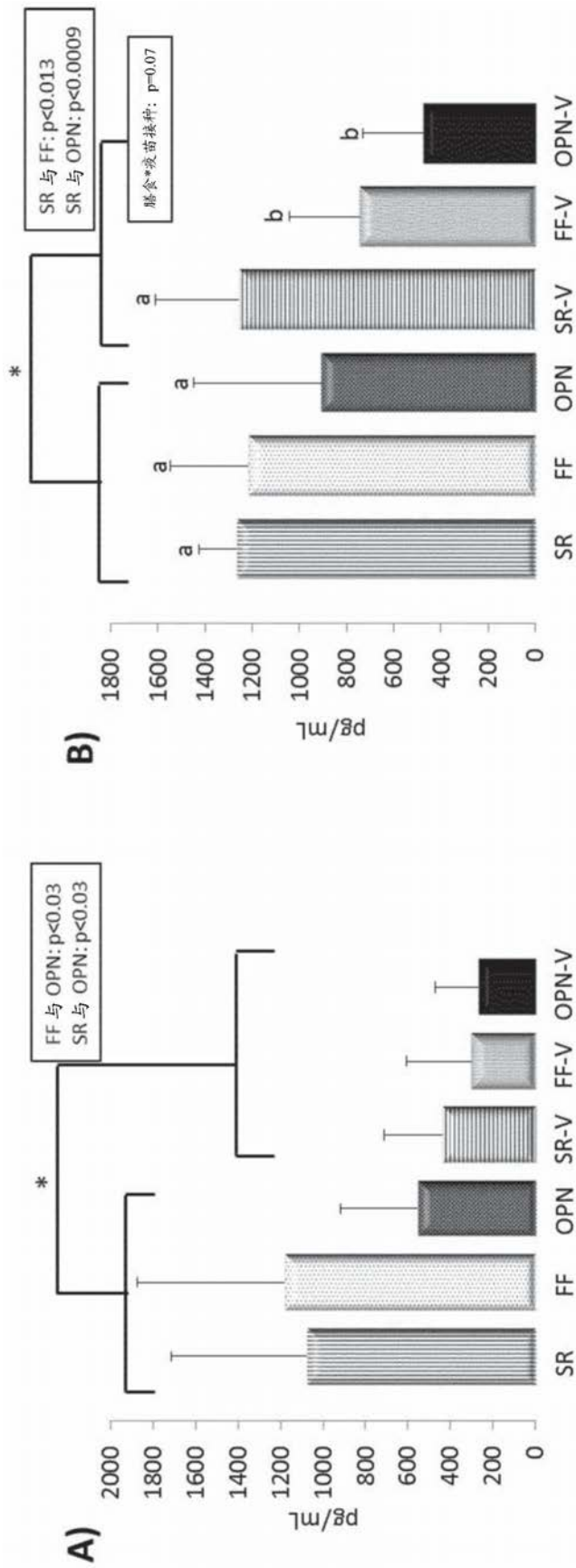


图15

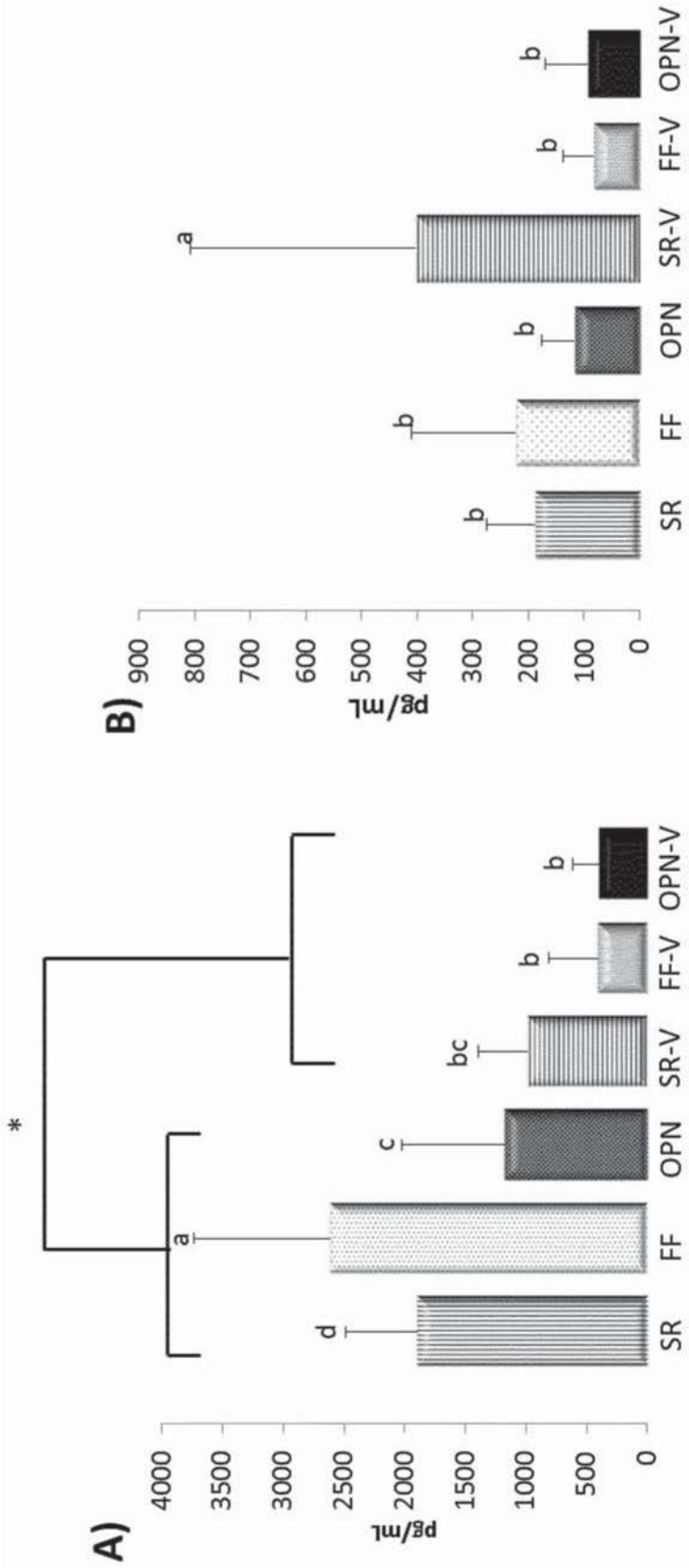


图16

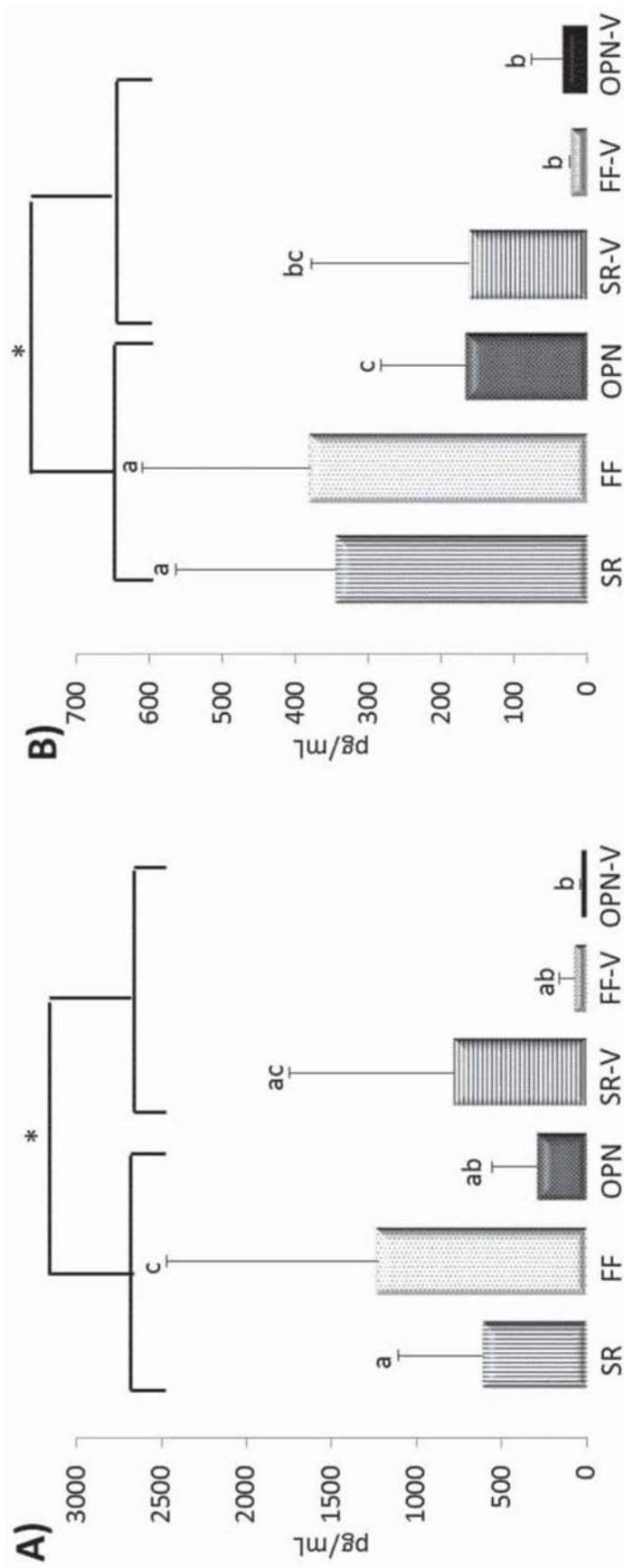


图17

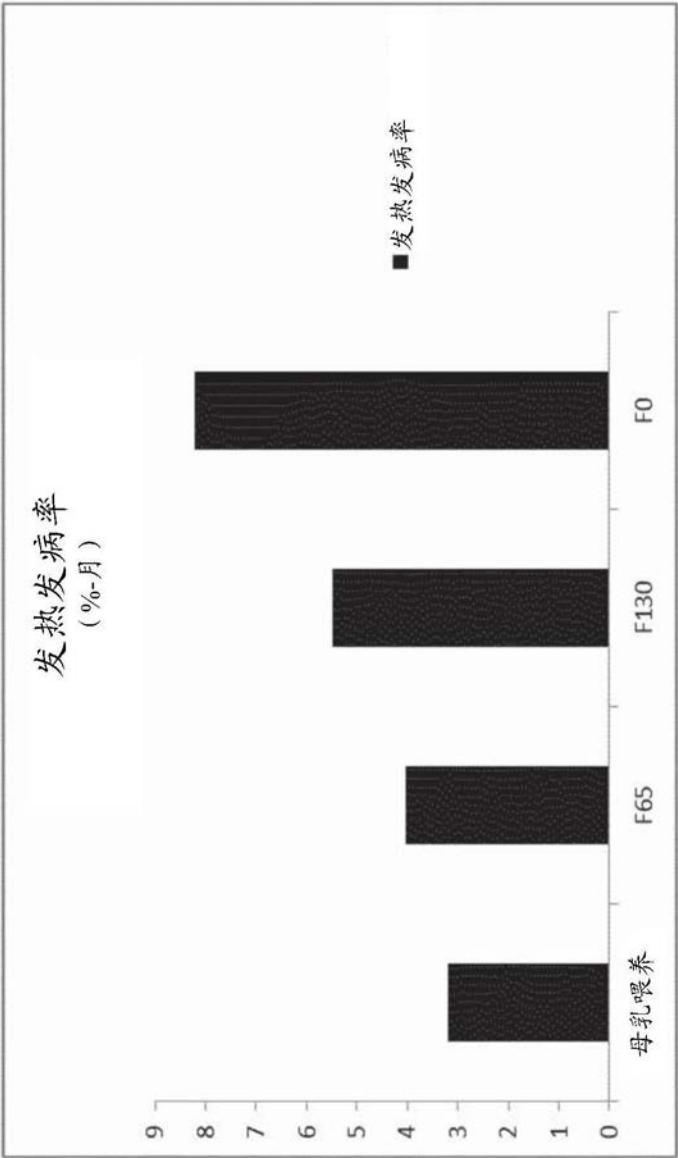


图18