(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118678885 A
(43)申请公布日 2024.09.20

(21)申请号 202280088962.X
(22)申请日 2022.11.15
(30)优先权数据
2021903675 2021.11.16 AU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2022/051362 2022.11.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/087052 EN 2023.05.25
(71)申请人 诺迈有限公司
地址 澳大利亚新南威尔士州
(72)发明人 T·摩西 F·巴尔迪 S·库库詹 T·狄金斯 A·恩贾普里 B·特拉泽拉 C·班宁 N·巴特利特 C·A-G·埃斯诺
(74)专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587
专利代理师 杨巍 柴春玲
(51)Int.Cl.
A23J 1/20(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 38/40(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
C07K 1/18(2006.01)
C07K 1/34(2006.01)
C07K 14/79(2006.01)

权利要求书2页 说明书29页 附图6页

(54)发明名称

用于产生乳铁蛋白粉的方法以及其用途

(57)摘要

本文公开了一种用于产生乳铁蛋白粉的方法。所述方法包括从天然含乳铁蛋白的物质中提取乳铁蛋白,并将所提取的乳铁蛋白浓缩,以产生液体浓缩物,在所述液体浓缩物中,所述所提取的乳铁蛋白的稳定性有所改善。然后通过将所述液体浓缩物加热到可有效对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌的温度并持续可有效对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌的时间来对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌,之后使经巴氏灭菌的液体浓缩物在非变性条件下干燥,以产生乳铁蛋白粉,在所述乳铁蛋白粉中,所述乳铁蛋白中的基本上所有乳铁蛋白都是天然乳铁蛋白。

CN 118678885 A

1.一种用于产生乳铁蛋白粉的方法,所述方法包括:

从天然含乳铁蛋白的物质中提取乳铁蛋白,并将所提取的乳铁蛋白浓缩,以产生液体浓缩物,在所述液体浓缩物中,所述所提取的乳铁蛋白的稳定性有所改善;

将所述液体浓缩物加热到能有效对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌的温度并持续能有效对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌的时间;以及

使经巴氏灭菌的液体浓缩物在非变性条件下干燥,以产生乳铁蛋白粉,在所述乳铁蛋白粉中,所述乳铁蛋白中的基本上所有乳铁蛋白都是天然乳铁蛋白。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述所提取的乳铁蛋白的稳定性由于在所述液体浓缩物中不存在使所述乳铁蛋白失稳的物种而有所改善。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述所提取的乳铁蛋白的稳定性由于在所述液体浓缩物中存在使所述乳铁蛋白稳定的物种而有所改善。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述液体浓缩物包括以下中的一种或多种:pH调节剂、稳定矿物质和溶解气体。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述天然含乳铁蛋白的物质是乳。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述天然含乳铁蛋白的物质是脱脂乳。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述脱脂乳是使用冷转鼓脂肪分离过程产生的。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述乳铁蛋白使用离子交换色谱法从所述天然含乳铁蛋白的物质中提取。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述所提取的乳铁蛋白使用超滤进行浓缩。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述所提取的乳铁蛋白被浓缩到约9wt%至12wt%。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中使所述经巴氏灭菌的液体浓缩物在巴氏灭菌后立即冷却。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述经巴氏灭菌的液体浓缩物通过喷雾干燥进行干燥。

13.根据权利要求12所述的方法,其中所述喷雾干燥包括多级喷雾干燥。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述乳铁蛋白粉中的超过90%的所述乳铁蛋白是天然乳铁蛋白。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述乳铁蛋白粉基本上由乳铁蛋白组成。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述乳铁蛋白粉的D50粒径为约50微米。

17.一种乳铁蛋白粉,其是通过根据权利要求1至16中任一项所述的方法产生的。

18.一种食品产品,其包括通过根据权利要求1至16中任一项所述的方法产生的乳铁蛋白粉。

19.一种鼻喷雾,其包括通过根据权利要求1至16中任一项所述的方法产生的乳铁蛋白粉。

20.一种药物组合物,其包括通过根据权利要求1至16中任一项所述的方法产生的乳铁蛋白粉以及药学上可接受的赋形剂。

21.一种用于预防或治疗患者的病毒感染的方法,所述方法包括向所述患者施用调配物,所述调配物包括通过根据权利要求1至16中任一项所述的方法产生的乳铁蛋白粉或根据权利要求20所述的药物组合物。

22.根据权利要求21所述的方法,其中所述施用是通过所述患者的气道进行的。

23.一种用于预防或治疗患者的病毒感染的方法,所述方法包括经鼻地向所述患者施用调配物,所述调配物包括通过根据权利要求1至16中任一项所述的方法产生的乳铁蛋白粉或根据权利要求20所述的药物组合物。

24.根据权利要求21至23中任一项所述的方法,其中所述调配物预防性地施用,以预防所述病毒感染。

用于产生乳铁蛋白粉的方法以及其用途

技术领域

[0001] 本文描述了一种用于产生乳铁蛋白粉的方法以及此类粉末的用途。

背景技术

[0002] 乳铁蛋白是一种存在于许多动物分泌液,包含动物乳中的蛋白质。乳铁蛋白被视为具有许多健康作用或益处,并且是许多乳替代调配物,如婴儿调配物中的一种成分。

[0003] 乳铁蛋白可以重组地或通过从乳或其它乳产品,如奶酪乳清中提取所述乳铁蛋白产生。用于由乳或奶酪乳清产生乳铁蛋白的典型方法涉及用于减少微生物载量的初始巴氏灭菌步骤,随后是从乳/乳清基质中浓缩和提取乳铁蛋白。然后,典型地使乳铁蛋白浓缩物冷冻干燥,以产生主要由乳铁蛋白组成的微粒物质。如果需要具有特定粒径和/或粒径分布的乳铁蛋白,则可以对经冷冻干燥的颗粒进行研磨。

[0004] 提供用于产生乳铁蛋白的替代性方法将是有利的。

发明内容

[0005] 在第一方面中,本发明提供了一种用于产生乳铁蛋白粉的方法。所述方法包括:

[0006] 从天然含乳铁蛋白的物质中提取乳铁蛋白,并将所提取的乳铁蛋白浓缩,以产生液体浓缩物,在所述液体浓缩物中,所述所提取的乳铁蛋白的稳定性有所改善(即,相较于在其处于所述含乳铁蛋白的物质中时);

[0007] 将所述液体浓缩物加热到可有效对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌的温度并持续可有效对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌的时间;以及

[0008] 使经巴氏灭菌的液体浓缩物在非变性条件下干燥,以产生乳铁蛋白粉,在所述乳铁蛋白粉中,所述乳铁蛋白中的基本上所有乳铁蛋白都是天然乳铁蛋白。

[0009] 本发明,即本申请的主题的诸位发明人已经意识到,用于由乳或奶酪乳清产生乳铁蛋白的传统方法包含其中乳铁蛋白所经历的条件导致其蛋白质结构发生某种程度的降解/变性的步骤。这导致在产物中的天然乳铁蛋白的比例方面,所回收的乳铁蛋白的量和/或含乳铁蛋白的产物的质量随后降低。如将理解的,相较于天然乳铁蛋白,变性的乳铁蛋白的功能和生物活性将可能降低。一段时间以来,这种质量下降在本领域中未被认识到,因为用于表征含乳铁蛋白的产物的技术不一定会相当充分地区分乳铁蛋白的天然形式与非天然形式,并且所述产物含有足以具有某种功能水平的天然乳铁蛋白。在本发明中,相较于许多常规方法的情况,可以回收更多乳铁蛋白,并且相较于通常的情况,所回收的乳铁蛋白更少变性。实际上,本发明的乳铁蛋白粉中的乳铁蛋白保留了其生物活性的大部分,但是,是以经处理且经巴氏灭菌的形式存在的。

[0010] 像许多蛋白质一样,乳铁蛋白是热敏感型的,并且发现当在升高的温度下暴露于pH值变化时,特别容易降解,如有时在液体,如乳、乳清被加热(尤其是在处于和高于巴氏灭菌温度下)时可能发生的情况一样。另外,已经发现乳铁蛋白通常源自于的液体的其它组分有助于使乳铁蛋白失稳,从而使其在加热时更容易降解。诸位发明人已经发现,在已经从未

经巴氏灭菌的乳基质中提取呈现用于巴氏灭菌级(具体地,尽管将理解,还可以在方法的其它级施加热)的乳铁蛋白并将其提取成液体浓缩物的情况下,可以产生基本上所有(如下文所定义的)乳铁蛋白都是天然(即,未变性的)乳铁蛋白的含乳铁蛋白的粉末,在所述液体浓缩物中,乳铁蛋白的稳定性有所改善(即,在相较于乳铁蛋白在天然含乳铁蛋白的物质,如乳中的稳定性时)。

[0011] 以这种方式,乳铁蛋白不会暴露于此类失稳效应(这对于食品产品的许多行业标准的监管合规性来说至关重要),所述失稳效应可能发生在巴氏灭菌期间加热如乳等液体时,并且已经发现本发明的方法对乳铁蛋白的结构破坏较小,如常规方法中的情况一样。事实上,诸位发明人观察到,乳的巴氏灭菌会产生约25%的乳铁蛋白回收率损失,并且当在乳基质中进行巴氏灭菌时,乳铁蛋白可能存在一些其它构象变化。此外,在本发明中,含乳铁蛋白的粉末在最少数量的方法步骤中产生,并且不包含常规地用于产生乳铁蛋白粉的步骤,如蒸发等。诸位发明人认识到,每个额外的方法步骤都可能破坏乳铁蛋白和/或导致总回收率较低。

[0012] 在一些实施例中,所提取的乳铁蛋白的稳定性可能由于在液体浓缩物中不存在使乳铁蛋白失稳的物种而有所改善。例如,通常存在于乳基质中的物种包含蛋白质,如酪蛋白和乳清蛋白、脂多糖、糖和离子物种,如钙离子和镁离子,这些物质中的一些或全部可能会有害地影响乳基质中的乳铁蛋白的稳定性(直接或间接,例如,通过引起pH移位)。对不含有此类潜在地有害的物种的含乳铁蛋白的液体浓缩物进行巴氏灭菌意指,在存在可能对乳铁蛋白产生失稳效应的物种的情况下不对乳铁蛋白进行加热。

[0013] 在一些实施例中,所提取的乳铁蛋白的稳定性可能由于在液体浓缩物中存在使乳铁蛋白稳定的物种而有所改善。例如,所述液体浓缩物可以包含以下中的一种或多种:pH调节剂、稳定矿物质和溶解气体。下文将描述这些物种的具体实例以及诸位发明人对其保护机制的理解。

[0014] 在一些实施例中,天然含乳铁蛋白的物质可以是乳,优选地脱脂乳。已经发现,冷转鼓脂肪分离有利于产生脱脂乳,因为其不涉及在乳铁蛋白仍然包含在乳基质中时,使乳铁蛋白经受甚至轻微升高的温度。如下文进一步详细描述的,乳铁蛋白可能在此初始步骤中易于变性。

[0015] 在一些实施例中,所述乳铁蛋白可以使用离子交换色谱法从天然含乳铁蛋白的物质中提取。乳铁蛋白可以从离子交换柱中与物质的其它组分(如乳基质)分开洗脱。

[0016] 在一些实施例中,所提取的乳铁蛋白可以使用超滤浓缩,所述乳铁蛋白包含在滤液中,用于随后重构在液体浓缩物中。

[0017] 在一些实施例中,经巴氏灭菌的液体浓缩物可以在巴氏灭菌后立即冷却,从而使乳铁蛋白在升高的温度下花费的时间长度减少到绝对最小值(同时仍符合关于巴氏灭菌的监管要求)。

[0018] 在一些实施例中,经巴氏灭菌的液体浓缩物可以在非变性条件下通过喷雾干燥进行干燥,以产生含乳铁蛋白的产物。诸位发明人已经有利地发现喷雾干燥(特别是多级喷雾干燥)会减少对如蒸发等步骤的需要,这些步骤必然涉及在最终粉末形成级期间的进一步热施加和/或处理之前,施加潜在地破坏量的热。在使用多级喷雾干燥的情况下,可以实现特别的优点,其中参数(如喷嘴大小、入口和出口温度以及停留时间)用于促进甚至进一步

降低累积施加的温度,并因此有助于产生具有具体特性(如具体期望的粒径和/或粒径分布)的基本上天然的含乳铁蛋白的粉末。

[0019] 在一些实施例中,所述乳铁蛋白粉可以基本上由乳铁蛋白组成。在替代性实施例中,乳铁蛋白粉中可以存在至多约10%w/w(优选地小于约5%w/w)的其它物质,此类物质是本发明的方法不可避免的副产物。例如,最终产物中可以含有水分和其它非特异性蛋白质,前提是所述水分和其它非特异性蛋白质的存在不会有害地影响产物的效用。

[0020] 在第二方面中,本发明提供了一种乳铁蛋白粉,其是通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的。

[0021] 在第三方面中,本发明提供了一种食品产品,其包括通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉或基本上由其组成。

[0022] 诸位发明人还已发现,根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉中所含有的高度功能性且生物活性乳铁蛋白由于乳铁蛋白粉的独特特性而可以具有治疗活性或增强的治疗活性。具体地说,诸位发明人所进行的实验(如下所述)已经证明,根据本发明产生的粉末状乳铁蛋白在体外和体内对病毒复制具有抑制作用。诸位发明人认为,初步实验的结果产生对本文所公开的治疗应用的合理预测。目前正在进行和所计划的另外的实验预期会证实诸位发明人的预测。

[0023] 因此,在第四方面中,本发明提供了一种鼻喷雾,其包括通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉。

[0024] 在第五方面中,本发明提供了一种药物组合物,其包括通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉以及药学上可接受的赋形剂。

[0025] 在第六方面中,本发明提供了一种用于预防或治疗患者的病毒感染的方法,所述方法包括向所述患者(例如,通过所述患者的气道)施用调配物,所述调配物包括通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉或根据本发明的第五方面所述的药物组合物。

[0026] 在第七方面中,本发明提供了一种用于预防或治疗患者的病毒感染的方法,所述方法包括经鼻地向所述患者施用调配物,所述调配物包括通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉或根据本发明的第五方面所述的药物组合物。

[0027] 在第八方面中,本发明提供了通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉,其用作药物。

[0028] 在第九方面中,本发明提供了通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉,其用于预防或治疗患者的病毒感染。

[0029] 在第十方面中,本发明提供了通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉的用途,其用于制备用于预防或治疗患者的病毒感染的药物。

[0030] 诸位发明人还注意到,乳铁蛋白表现出免疫调节和抗炎活性。诸位发明人注意到,通过根据本发明的第一方面所述的方法产生的乳铁蛋白粉可以提供乳铁蛋白的改进的递送形式,以治疗和预防与此类活性相关的病状。

[0031] 下文将描述本发明的其它方面、特征和优点。

附图说明

[0032] 下文将参考以下附图进一步详细描述本发明的实施例,在附图中:

[0033] 图1是本发明的第一方面的实施例的块状流程图;

[0034] 图2是示出了使用来自n＝1名哮喘患者的细胞的初步BEC研究的病毒载量的图。具有OC43病毒载量的经分化的原代人支气管上皮细胞在用100ug/mL(LF100■)或1000ug/mL(LF1000▲)的乳铁蛋白处理后;

[0035] 图3是示出了使用n＝2个健康供体(n＝4个复制品/每个供体,总计＝8个)的未经处理的(●)和1000ug/mL(LF1000▲)的另一个初步研究的病毒载量的图;

[0036] 图4是示出了2x健康供体(n＝4个复制品/每个供体,总计＝8个)的未经处理的(●)、100ug/mL(LF100■)和1000ug/mL(LF1000▲)的传染性病毒的数量随时间变化的图;

[0037] 图5是示出了n＝1名健康供体(n＝3个复制品/每个供体,总计＝6个,在48小时时补充乳铁蛋白)的未经助理的(●)和100ug/mL(LF1000■)的传染性病毒的数量随时间变化的图;

[0038] 图6描绘了(A)体内研究1和2以及(B)体内研究3的实验计划;

[0039] 图7A是示出了未经处理的(媒剂)小鼠相对于用1.5ug乳铁蛋白鼻内地处理的小鼠的鼻甲中的在48小时时间过程内的OC43病毒载量的图;

[0040] 图7B是示出了在鼻冲洗样品中使用TCID¬¬50测定在MRC-5细胞中测得的OC43传染性病毒的图;

[0041] 图8A是示出了未经处理的(媒剂)小鼠相对于用1.5ug乳铁蛋白鼻内地处理的小鼠的鼻甲中的在48小时时间过程内的OC43病毒载量的图;

[0042] 图8B是示出了在鼻冲洗样品中使用TCID¬¬50测定在MRC-5细胞中测得的OC43传染性病毒的图;

[0043] 图9是示出了如通过qPCR评估的媒剂处理的小鼠与乳铁蛋白处理的小鼠之间的A)IFN-β水平和B)IFN-λ2/3水平的图;并且

[0044] 图10是示出了未经处理的(媒剂)小鼠相对于在感染时以及此后每天两次用150ug乳铁蛋白以及BAL处理的小鼠的鼻甲中的(A)巨噬细胞、(B)嗜中性粒细胞和(C)淋巴细胞的图。

具体实施方式

[0045] 如上所述,本发明提供了一种用于产生乳铁蛋白粉的方法,其中诸位发明人认为所述乳铁蛋白粉具有独特的特性,因为粉末组合物中的乳铁蛋白保留了其生物活性的大部分,即使已进行巴氏灭菌并被处理成粉末。所述方法包括从天然含乳铁蛋白的物质中提取乳铁蛋白,并将所提取的乳铁蛋白浓缩,以产生液体浓缩物,在所述液体浓缩物中,所述所提取的乳铁蛋白的稳定性相较于在其处于含乳铁蛋白的物质中时有所改善(如通过粉末中的乳铁蛋白基本上保留其生物和功能特性以及其回收率%所证明的,如下所述)。然后通过将所述液体浓缩物加热到可有效对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌的温度并持续可有效对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌的时间来对所述液体浓缩物进行巴氏灭菌,之后使经巴氏灭菌的液体浓缩物在非变性条件下干燥,以产生乳铁蛋白粉,在所述乳铁蛋白粉中,所述乳铁蛋白中的基本上所有乳铁蛋白都是天然乳铁蛋白。

[0046] 由于其天然乳铁蛋白的比例更高,如此产生的乳铁蛋白粉的生物活性相较于许多其它含乳铁蛋白的粉末有所改善。乳铁蛋白粉的功能特性也是有利的(例如,由于其溶解度、可共混性、特定粒径属性和形态等)。在与乳铁蛋白提取发生在巴氏灭菌后的方法相比时,本发明的方法还可以改善天然乳铁蛋白的产率。

[0047] 本发明产生了乳铁蛋白粉,在所述乳铁蛋白粉中,所述乳铁蛋白中的基本上所有乳铁蛋白都是天然乳铁蛋白。天然乳铁蛋白是未变性的或仅发生可忽略的变化,其中乳铁蛋白保留其结构并且因此保留其生物活性和健康作用。如将理解的,可能并非所有根据本发明处理的乳铁蛋白都是完全未变性的。小程度的变性可能是不可避免的。例如,乳铁蛋白粉可以含有大于90%的天然乳铁蛋白、大于95%的天然乳铁蛋白或大于98%的天然乳铁蛋白。乳铁蛋白粉例如可以含有约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%的天然乳铁蛋白。

[0048] 通过本发明产生的乳铁蛋白粉可以基本上由乳铁蛋白组成(即,除了少量的不可避免的杂质、副产物、降解产物等之外,产物的实体是乳铁蛋白)。然而,可能不需要这么高水平的纯度,并且在一些实施例中(例如,在更便宜的产物具有商业吸引力的情况下),乳铁蛋白粉中存在至多约10%w/w的其它组分可能是足够的。此类其它组分可以包含本发明的方法的不可避免的副产物,但出于功能原因,还可以包含所提供的添加剂(例如,抗结块剂、防腐剂等)。

[0049] 通过本发明产生的乳铁蛋白粉可以具有任何适当的粒径或粒径范围,并且这将在下文在干燥步骤的上下文中进一步详细描述。举例来说,根据本发明产生并由诸位发明人表征为细粉末的一种含乳铁蛋白的粉末的粒径分布D50=38.2微米,并且D90=72.3微米。根据本发明产生并由诸位发明人表征为中间体粉末的另一种含乳铁蛋白的粉末的粒径分布D50=46.2微米,并且D90=98.7微米。根据本发明产生并由诸位发明人表征为粗粉末的含乳铁蛋白的粉末的粒径分布D50=56微米,并且D90=130微米。

[0050] 含乳铁蛋白的粉末的任何给定样品中的天然乳铁蛋白的比例可以结合已发布的技术如下文所述进行确定。一般来说,天然乳铁蛋白的分子量为大约80kDa,铁饱和度为大约10-20%,并且颜色为鲑鱼粉色。天然乳铁蛋白粉的生物活性还将与其来源的生物活性相当,而被破坏的乳铁蛋白的生物活性将被破坏。

[0051] 诸位发明人用于确定乳铁蛋白粉中的乳铁蛋白纯度(例如,样品中的乳铁蛋白相对于其它蛋白质的纯度百分比)但其认为不适于定量或区分天然形式(即,非变性的)与变性形式的乳铁蛋白的测定是中国GB RP-HPLC(GB 1903.17-2016)法。由中国标准局(Standards Administration ofChina)实施用于测试进口到中国的牛乳铁蛋白粉的此方法涉及注入高浓度的蛋白质(50μl 10mg/ml样品(每次注入0.5mg)),这接近于柱结合能力的上限。因此,在牛乳铁蛋白确定时观察到一些显著差异。

[0052] 诸位发明人用于确定成品粉末中的乳铁蛋白量(以百分比计)的测定是卡拉翰创新院RP-HPLC法(Callaghan Innovation RP-HPLC method),在所述方法中,天然乳铁蛋白可与变性的乳铁蛋白区分开,因为进天然乳铁蛋白与HPLC柱结合。卡拉翰创新院法描述于J.Billakanti等人,《国际乳品杂志(International Dairy Journal)》99(2019)104546中,并使用Aeris™3.6μm WIDEPORE XB-C8 200 Å分析LC柱(部件-00G-4481-E0,250[1]4.6mm)、C8Security Guard Ultra支架(部件-AJ0-9000)和Security Guard Ultra筒(部件-AJ0-

8771)进行,并在280nm的波长下进行检测。所述方法使用w/w样品制备,而不是其它方案中使用的基于v/v的样品制备,所述基于v/v的样品制备随着时间的推移产生可复制且可靠的结果,并由此提供更准确的分析。

[0053] 诸位发明人发现,此类测定的组合使得能够确定具体含乳铁蛋白的粉末的乳铁蛋白量(即,回收率百分比)和质量(即,未变性的乳铁蛋白的比例)。如上提到的,本发明,即本申请的主题至少部分地涉及认识到需要这两种测定以充分地表征含天然乳铁蛋白的粉末。

[0054] 本发明的关键特征之一是巴氏灭菌仅在从天然含乳铁蛋白的物质中提取乳铁蛋白并将其浓缩后进行。液体浓缩物中的乳铁蛋白的稳定性相较于在其处于天然含乳铁蛋白的物质中时有所改善,并且因此不易于发生为了对产物进行巴氏灭菌而必须施加的温度所引起的变性。为了满足监管(和安全)要求,必须满足巴氏灭菌条件(最低温度、时间等),但是,在本发明中,乳铁蛋白对所施加的热的稳定性大于在乳铁蛋白包含在天然含乳铁蛋白的物质中时进行巴氏灭菌的情况下的稳定性。以此种方式,液体浓缩物中的乳铁蛋白中的基本上所有乳铁蛋白都可以保持其天然形式。相比之下,例如,乳的巴氏灭菌会使乳中的至多25%的天然乳铁蛋白变性,从而使乳铁蛋白回收率在一开始就对应降低。

[0055] 在本发明的上下文中,特征“乳铁蛋白的稳定性有所改善”等应被理解为意指,乳铁蛋白在液体浓缩物中的稳定性大于乳铁蛋白在天然含乳铁蛋白的物质中的稳定性。可以使用常规测试(包含下文所述的测试)以评估乳铁蛋白在不同载体中的相对稳定性。

[0056] 乳铁蛋白可以经历热降解和化学(例如,因为pH的移位导致变性)降解中的一种或两种,除非以本文所述的方式对其进行保护。乳铁蛋白的热稳定性可能由于在液体浓缩物中不存在使乳铁蛋白失稳的物种而有所改善。可替代地或另外,乳铁蛋白的热稳定性可能由于在液体浓缩物中存在使乳铁蛋白稳定的物种而有所改善。

[0057] 如上所述,乳产品,如乳清和乳中通常存在的物种包含蛋白质,如酪蛋白和乳清蛋白、糖(例如,乳糖)、脂肪(例如,脂多糖)和离子物种,如钙离子和镁离子。这些物种中的任何或所有物种可能直接(例如,通过在加热时变性或以其它方式与乳铁蛋白反应)或间接(例如,通过引起在更高温度下使乳铁蛋白失稳的pH移位)导致乳铁蛋白相对缺乏热稳定性。从天然含乳铁蛋白的物质的基质中分离乳铁蛋白防止(或至少减少)任何此类有害的相互作用发生。

[0058] 含乳铁蛋白的液体浓缩物可以包含另外的物种,所述另外的物种可能有助于使乳铁蛋白在其被加热时稳定。此类物种将需要与乳铁蛋白粉的最终用途相容(例如,为GRAS,与食品产品相容等)并且不会以其它方式有害地影响本发明的性能。这些物种可以添加到液体浓缩物中,或者可以已经存在于浓缩物中(例如,洗脱液中)。

[0059] 在一些实施例中,液体浓缩物可以例如包含加工助剂,如以下中的一种或多种:pH调节剂、稳定矿物质和溶解气体。此类物种可以通过载体液体/气体或直接以其巴氏灭菌前的当前形式添加到液体浓缩物中。

[0060] 液体浓缩物的电导率(这是浓缩物传递或承载电流的能力的量度)可以例如通过操纵浓缩物中的矿物质,如氯化钠或城镇供水中存在的矿物质的量来调整。本发明可以通过控制电导率来维持乳铁蛋白的天然方面,以在巴氏灭菌前进一步使乳铁蛋白浓缩物稳定。液体浓缩物可以是RO水,但是具有小矿物质含量的水(例如,城镇用水)可能不会不利地影响过程,并且可能有助于降低过程的总成本。事实上,含有低水平的矿物质的水还可以起

到进一步使乳铁蛋白稳定的作用。

[0061] 液体浓缩物的pH可以以防止产生不需要的污染物或为了满足进口国要求或客户规范的方式进行控制。一般来说,例如,乳铁蛋白的pH需要符合5.2-7.2之间的范围,以符合监管要求。液体浓缩物的pH调整可以在两种情况下使用,第一种是使乳铁蛋白对于巴氏灭菌稳定,或第二种是确保最终符合标准。

[0062] 诸位发明人注意到,铁不饱和乳铁蛋白(apo-lactoferrin)(非铁结合的)比铁饱和乳铁蛋白(holo-lactoferrin)(铁结合的)更容易受损,所述铁饱和型乳铁蛋白更稳定。因此,液体浓缩物中有利于形成铁饱和乳铁蛋白的条件可以改善乳铁蛋白的耐热性。

[0063] 使用某些酸以降低pH可能是适当的,因为这可能有助于减少变性的影响。然而,这样做可能会增加浓缩物中的污染物水平或负面地影响浓缩物中的感官特性,这是不期望的并且在一些市场上在含乳铁蛋白的产品中可能是不允许的。

[0064] 还发现使用碳酸氢钠(或其它碳酸氢盐)会使乳铁蛋白在巴氏灭菌期间稳定,这可能是由于乳铁蛋白分子的C叶和N叶处的碳酸氢根离子与铁结合位点之间的相互作用引起的。这还可以有助于管理最终产物的pH,以便所述最终产物处于介于5.2-7.2之间的pH(优选地5.7),如食品产品/添加剂所要求的。

[0065] 仅使用本文所公开的信息以及常规试验和实验来确定是否可以在本发明的方法中使用任何特定物种在本领域的技术人员的能力范围内。

[0066] 如上所提到的,出于满足监管要求的目的,可能需要在过程期间添加另外的组分。例如,食品产品的pH需要大于5.2,并且在一些实施例中,可能需要在巴氏灭菌后添加pH调节剂,以使本发明的最终产物合规。使用本文所包含的教导以及仅仅常规测试来确定对这种另外的组分的需要并选择这种另外的组分在本领域的技术人员的能力范围内。

[0067] 诸位发明人还注意到,为了实现相同的作用,可以使用另外的处理步骤而不是添加另外的组分。例如,可以使用阴离子交换以调整样品的pH,并且有时进行阴离子交换而不是添加另外的物质以调整样品的pH可能是有利的。

[0068] 乳铁蛋白可以从任何天然含乳铁蛋白的物质中提取。通常,天然含乳铁蛋白的物质是乳,所述乳供应充足且未被任何加工助剂污染(例如,来自奶酪制作过程的乳清的情况那样)。脱脂乳是优选的,因为含脂肪的物质可能负面地影响离子交换过程中的乳铁蛋白结合能力。理想地,脂肪水平应保持低于0.1%。

[0069] 在天然含乳铁蛋白的物质是脱脂乳的实施例中,可以使用冷转鼓脂肪分离过程产生脱脂乳,此过程避免热转鼓脂肪分离的温度升高。虽然此类温度仅为大约50℃(明显低于巴氏灭菌温度),但可以最佳避免在乳铁蛋白保留在乳基质中时对其进行的任何加热,以免其损害乳铁蛋白中的甚至一些乳铁蛋白。此外,在低温下细菌生长较低,这使经热转鼓分离的乳质量有所改善。

[0070] 在本发明中,乳铁蛋白从天然含乳铁蛋白的物质中提取。任何合适的提取技术都可以用于此步骤,条件是其与本发明的结果相容。一种合适的技术是使用阳离子交换色谱法从天然含乳铁蛋白的物质中提取乳铁蛋白。

[0071] 一般来说,离子交换色谱法涉及使天然含乳铁蛋白的物质(例如,脱脂乳)穿过柱。乳铁蛋白与柱结合并保留在柱上,而乳基质的其余组分穿过柱。随后可以使用不同的溶剂,如氯化钠洗脱剂来洗脱保留的乳铁蛋白。在一具体实施例中,此方法可以使用由用磺酸根

(SP)强阳离子交换基团修饰的大的经交联的琼脂糖珠粒(100-300μm)构成的SP Sepharose Big Bead树脂。在此过程期间,带正电荷的乳铁蛋白与带负电荷的树脂结合。

[0072] 在本发明中,所提取的乳铁蛋白被浓缩,以产生液体浓缩物,在所述液体浓缩物中,乳铁蛋白的热稳定性有所改善。同样,任何合适的技术都可以用于此步骤,只要其与本发明的结果相容。用于浓缩乳铁蛋白的一种合适的技术是超滤。

[0073] 一般来说,超滤涉及将含乳铁蛋白的所选择的液体载体(例如,RO水)浓缩,同时去除其它污染物(例如,来自提取步骤的洗脱液)。在一具体实施例中,使用被设计成保留具有具体分子量(高于10-50kDa)的蛋白质的超滤膜过滤介质以浓缩乳铁蛋白。

[0074] 巴氏灭菌前液体浓缩物中的乳铁蛋白的量可以例介于如约9wt%至12wt%之间(例如,为约11%固体)。乳铁蛋白的此量高于常规方法中通常存在的乳铁蛋白的量,所述常规方法中通常存在的乳铁蛋白的量可以在6-8wt%的范围内。有利的是,在本发明的方法中发生再浓缩时,所述再浓缩使浓缩物中的乳铁蛋白的比例较高,诸位发明人发现这可以使浓缩物干燥(例如,通过喷雾干燥),从而在不添加另一个另外的浓缩过程的情况下产生具有更好粒径灵活性的粉末。

[0075] 在本发明中,通过将液体浓缩物加热到可有效对液体浓缩物进行巴氏灭菌的温度并持续可有效对液体浓缩物进行巴氏灭菌时间来对液体浓缩物进行巴氏灭菌。巴氏灭菌是一种充分实践的技术,并且本领域的技术人员可以容易地确定给定样品的适当的巴氏灭菌条件。通过将含乳铁蛋白的液体浓缩物加热到72℃的最低温度持续最少时间15秒,可以实现有效的巴氏灭菌。其它形式的巴氏灭菌是本领域已知的,并且预期本发明的有利作用也可以适用于此。

[0076] 最后,使经巴氏灭菌的液体浓缩物在非变性条件下干燥,以产生乳铁蛋白粉,在所述乳铁蛋白粉中,所述乳铁蛋白中的基本上所有乳铁蛋白都是天然乳铁蛋白。常规干燥技术包含冷冻干燥和喷雾干燥,其中在本发明中喷雾干燥是优选的,因为对于产生粒径相对均质的颗粒来说这通常更好,并且其通常不需要研磨产物,如有时冷冻干燥的情况也是如此。经冷冻干燥的粉末有时也可能缺乏功能,例如,其粒径可能较粗,并且不容易共混到乳粉中。

[0077] 可以使用任何合适的喷雾干燥技术和设备。通常,喷雾干燥设备允许操纵参数,包含喷嘴大小、入口和出口温度以及停留时间,所有这些参数都可以进行调整,以产生具有期望的物理特性的粉末。诸位发明人注意到,所产生的粉末的物理特性还直接影响其功能特性,如其与水性液体的可混合性和可流动性。

[0078] 多级喷雾干燥可以有利地在本发明中使用,因为除其它优点外,其使得能够在对乳铁蛋白粉进行喷雾和干燥时施加较低的喷嘴温度。如上所述,乳铁蛋白暴露于相对较高温度的时间越少越好。

[0079] 例如,使用单级干燥器,出口温度控制离开粉末温度。然而,多级干燥器能够使用二次加热/冷却来操纵离开粉末温度(通过流化床实现二次温度操纵-所述流化床具有其自身的加热和冷却源)。二次干燥系统允许出口中的干燥温度不太强烈,因为二次干燥系统可以补偿温度并在较低温度下完成干燥,从而保留乳铁蛋白的结构。诸位发明人注意到,此类喷雾干燥还有助于改善粉末中的乳铁蛋白的健康作用/功能益处,并且本发明的方法中的所有步骤的累积影响可以使粉末具有改善的功能性乳铁蛋白。

[0080] 调整喷雾干燥器的各种参数以使乳铁蛋白不变性并产生具有期望的功能特性的粉末在本领域的技术人员的能力范围内。下文将描述诸位发明人在此方面进行的两个试验的具体实例。

[0081] 喷嘴大小试验

[0082] 诸位发明人发现,各种喷嘴大小、目标喷嘴压力和多级喷雾干燥器的使用的组合允许产生具有特定且独特的粒径分布的乳铁蛋白粉。

[0083] 如下所述,两个示例性粒径分布为目标,每个粒径分布与成品产品中的具体功能特性相关,即可混合性(粉末和/或水性)和粉末可流动性。喷雾干燥器操作的具体要素有所变化,包含:(1)喷嘴涡流室和孔口大小组合;(2)主室的入口和出口温度;(3)喷嘴压力;(4)团聚程度,这部分地取决于过程中细微粒再进入的点;(5)以及进料流中的固体的浓度。

[0084] 在这些喷嘴大小试验期间,实时进行粉末性能测试,并实时调整参数,以实现有利的粒径分布(即,如下文所述的更细和更粗的变体)。这允许在试验期间修改运行条件,从而立即验证过程。

[0085] 试验的结论产生了两种主要变体,即更细的粉末和更粗的变体。更细的粉末的特征在于,D_{50}值为大约35-40μm,并且d_{90}值为大约50-55μm,而更粗的变体的特征在于,D_{50}值为大约50-60μm,并且D_{90}值为125-130μm。实现了粉末中所需的目标水性可混合性和粉末可流动性特性。

[0086]

0.34 喷嘴 - 更细的粉末 0.58 喷嘴 - 粗粉末	0.58 喷嘴 - 更粗的粉末 0.34 喷嘴 - 细粉末
干燥器入口处的空气温度目标为大约180-190℃。乳铁蛋白浓缩物不会达到这些高温，而是相反暴露于干燥，持续较短停留时间（<2 分钟），其中粉末温度通常维持在65℃，并且永远不大于 75℃。从过程的离开温度小于 40℃。 喷雾干燥期间的喷嘴压力为大约 150 - 160 巴，从而产生更细的粒径。 变体使用较小的喷嘴孔口大小，通常为 0.34 THOU（千分之一英寸）。	干燥器入口处的空气温度目标为大约175-185℃。乳铁蛋白浓缩物不会达到这些高温，而是相反暴露于干燥，持续较短停留时间（<2 分钟）。粉末温度通常维持在 65℃，并且永远不大于 75℃。从过程的离开温度小于 40℃。通常在浓缩物进料流速的变化的情况下保持粉末停留时间。 喷雾干燥期间的喷嘴压力为大约 100 - 110 巴，从而产生更大的粒径。 变体使用较大的喷嘴孔口大小，通常为 0.55 THOU。

[0087] 多级喷雾干燥器

[0088] 使用多级喷雾干燥器(MSD)可以通过以下三个级通过经加热的空气去除水来极大地帮助保持乳铁蛋白粉的天然结构;(1)主干燥室;(2)静态流化床以及(3)振动流化床。相较于单级干燥器,MSD允许在级1之后通过级2和级3过程进一步去除水。这些过程允许在较低温度下进一步去除水,在较低温度下,活性已经降低,并且乳铁蛋白容易受到由较高温度引起的破坏。静态流化床(级2)温度永远不大于75℃。

[0089] 与MSD相比,当使用单级干燥器时,不可能匹配干燥的温度谱。单级干燥器需要使用更高的干燥温度或更长的停留时间以实现类似的结果。这在使用单级干燥器时,导致对热的暴露增加,并且增加了对乳铁蛋白粉的天然结构的破坏。

[0090] 乳铁蛋白浓缩物试验中的固体百分比

[0091] 还试验了进入到喷雾干燥器中的具有较低固体浓度的进料流。上游超滤装置将乳铁蛋白浓缩物浓缩到10-12%固体,然后对其进行巴氏灭菌,并将其供应到喷雾干燥器。

[0092] 向进料流应用修改的加热谱和喷雾模式,这允许维持上文定义的可混合性和可流动性以及粒径分布,同时改善乳铁蛋白定量。通常,降低进料流的固体百分比将影响粉末的粒径分布,降低平均粒径并使粒径分布的大小向下移位。发现操纵其它过程参数,包含:(1)喷嘴涡流室;(2)喷嘴孔口大小;以及(3)喷嘴压力,以在对较低固体百分比的进料流进行喷雾干燥时维持粒径分布会使乳铁蛋白回收率增加。

[0093] 巴氏灭菌和喷雾干燥在相同的固体浓度下完成,即10-12%。相比之下,诸位发明人知道的现有技术方法通常在较低固体(7-8%)下进行巴氏灭菌,应用蒸发浓缩技术,并且然后在较高固体百分比下喷雾干燥。这允许实现较高的回收率百分比,与已发布的文献中的教导一致,但对所回收的乳铁蛋白的结构和生物功能具有上述不良后果。因此,虽然其它方法可以通过在较低固体浓度下进行巴氏灭菌来实现比本发明的方法更大的乳铁蛋白回收率,但本发明可以通过在使浓缩物干燥之前使用较高固体百分比来实现相同的回收率百分比。

[0094] 现在将参照图1所示的流程图详细描述本发明10的方法的具体实施例。

[0095] 1)乳递送/搬运-至现场

[0096] 全乳是使用双壳罐车从农场收集的。在拾取点处,验证乳温度,以确保其符合监管要求。将乳递送到现场并卸下,并储存在温度<5℃的冷却筒仓中。对乳的保质期进行监测,以确保在接收到现场后24-48小时内进行处理。对乳温度进行监测,并通过测试所递送的每个罐车负载的乳的酸度水平来管理乳质量。

[0097] 2)脂肪分离(冷转鼓脱脂)12

[0098] 乳的分离是乳处理设备的重要过程。在此步骤处,将全乳分离成奶油和脱脂部分,用于进一步处理。传统分离涉及使用热转鼓密封分离器,所述热转鼓密封分离器在分离处理期间需要将乳加热到50℃,这会促进细菌生长。然而,在本发明的方法中,冷转鼓乳分离技术是优选的,所述技术允许在24-26℃的温度下将奶油与脱脂部分有效分离,从而确保乳质量得以保持,并使处理期间的细菌生长最小化。

[0099] 3)脱脂预处理(澄清/过滤)

[0100] 将脂肪含量<0.1%的经脱脂的乳转移到乳铁蛋白过程中,在所述乳铁蛋白过程中,使其经历澄清和过滤。澄清是利用GEA细菌去除系统(BRS)进行的,所述BRS是一种被设计成减少处理期间经脱脂的乳的细菌载量的过程。所关注的细菌包含产芽孢菌,如蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus),所述产芽孢菌对高达128℃具有耐热性,并且同时具有耐冷性,这可能会负面地影响上游过程的乳的保质期。还对乳进行过滤,以确保在柱中的离子交换(即,乳铁蛋白去除)过程之前去除了过量的脂肪和其它杂质。

[0101] 4)离子交换过程14

[0102] 从脱脂乳中提取乳铁蛋白通过离子交换过程进行,在所述离子交换过程中,使脱脂乳穿过含有特定SP Sepharose Big Bead树脂的柱(保持容器)。树脂由用磺酸根(SP)强阳离子交换基团修饰的大的经交联的琼脂糖珠粒(100-300μm)构成。所述琼脂糖珠粒被设计用于工业应用,并且基底基质的大粒径和物理稳定性使得树脂能够用于大体积商业提取过程。将树脂的离子交换能力与来自脱脂乳的乳铁蛋白结合,用于通过洗脱过程进行收集。离子交换过程是分批过程,其需要用乳铁蛋白来对柱上样,直到上样效率下降到93%以下。在此级处,使用共洗脱过程以提取乳铁蛋白。

[0103] 5)洗脱液收集和储存

[0104] 柱上样过程完成后,使用专门制备的缓冲溶液将乳铁蛋白从树脂上清洗掉,这是两步洗脱过程。洗脱过程的第一部分使用较低缓冲液浓度,所述较低缓冲液浓度被设计成去除不期望的蛋白质杂质,所述杂质大多数由乳过氧化物酶组成,但此时还将去除其它杂质,如乳清蛋白和矿物质。洗脱过程的步骤二使用较高缓冲液强度以使乳铁蛋白从Sepharose big bead上剥离,并将其收集到储存容器中用于进一步处理。控制缓冲液电导率水平以确保杂质被去除,这会影响乳铁蛋白产物的最终功效水平(即,含量和纯度)。

[0105] 6)超滤16

[0106] 多次洗脱的累积是超滤过程的前提。方法中的此步骤被专门设计成从乳铁蛋白中去除缓冲试剂,直到在乳铁蛋白溶液中达到期望的电导率水平。所述电导率水平被设计成去除杂质,如钠、氯化物和硝酸盐等。然后,过滤过程将继续进行,以达到用于巴氏灭菌的产物的最终浓度。仔细管理此步骤完成时浓缩物的总固体和pH,以维持天然乳铁蛋白结构。总固体和pH可以使用工艺用水进行调整,并且此时可以使用其它pH调节添加剂,以确保浓缩物在所需的容差水平内。

[0107] 7)巴氏灭菌18

[0108] 巴氏灭菌被具体设计成确保根据澳大利亚法规(澳大利亚和新西兰食品标准(FoodStandards Australia and New Zealand))实现食品安全要求。如上所述,巴氏灭菌步骤是维持乳铁蛋白的天然状态的关键步骤,并且被设计成使温度的暴露对乳铁蛋白浓缩物的破坏作用最小化。浓缩物必须经历达到72℃的加热持续最少15秒,并且可以操纵此过程,以确保实现最低监管要求,同时维持加热介质与产物温度之间的最小温度差。使乳铁蛋白浓缩物在此步骤之后立即冷却可以有助于维持乳铁蛋白的生物活性水平。

[0109] 8)浓缩物储存

[0110] 在巴氏灭菌后,将浓缩物储存在5℃以下,以积累足够的体积,以通过流化床喷雾干燥器进行处理。对浓缩物的持续监测在此过程期间发生,以确保总固体和pH值维持在使天然乳铁蛋白产量最大化所需的严格限值。

[0111] 9)喷雾干燥20

[0112] 经巴氏灭菌的乳铁蛋白浓缩物通过多级喷雾干燥过程进行处理,所述多级喷雾干燥过程使乳铁蛋白在比常规喷雾干燥过程的温度更低的温度下温和地干燥。干燥过程的第一级被设计成减少形成粉末颗粒的浓缩物中的大部分水分。干燥过程的此部分使用气流、空气温度和浓缩物喷嘴压力进行专门控制,以实现专门设计的粉末颗粒,以满足客户要求和规格。干燥的第二级由干燥流化床组成,在干燥流化床中,使用较低温度的空气和空气流速来温和地调理乳铁蛋白粉,使蛋白质基质冷却,同时温和地将水分含量调整到期望的水平。然后使产物穿过振动筛分器,以确保在包装前去除了较大颗粒/异物。

[0113] 10)包装

[0114] 过程的最后级涉及将乳铁蛋白粉分配到专门设计的重锡箔袋中。包装材料已经过仔细选择,以确保其具有优异的屏障特性,以确保在产物的长保质期内维持乳铁蛋白产物的完整性。包装形式通常为5kg。然而,这可以根据客户要求而变化。

[0115] 本发明还提供了一种通过上述方法产生的乳铁蛋白粉,以及包括通过所述方法产生的乳铁蛋白粉的食品产品。这些产品的应用包含:

[0116] • 婴儿、较大婴儿(follow-on)和幼儿营养

[0117] • 所列出的、所评估的和所注册的治疗性用品和药品(例如胶囊、片剂、鼻喷雾)

[0118] • 膳食补充剂

[0119] • 成人营养

[0120] • 运动营养

[0121] • 乳产品(饮料、酸奶和奶粉)

[0122] • 功能性食品

[0123] • 营养品和营养药品

[0124] 通过上述方法产生的乳铁蛋白粉的物理特性包含:

[0125] • 更小、更均匀的乳铁蛋白颗粒允许改善共混和溶解度结果

[0126] • 经喷雾干燥的乳铁蛋白的形状更均匀,颗粒更轻、更蓬松,并且光散射效果低

[0127] • 可流动性可以根据客户需要和所期望的大小而变化

[0128] • 中性/清淡口味且无结块

[0129] • 热敏感性

[0130] • 经喷雾干燥的乳铁蛋白颜色(即,柔粉色)比经冷冻干燥的乳铁蛋白更适于干共混,因为其颜色更好地与基底粉末“共混”

[0131] 如上所述,诸位发明人还发现上述高度功能性且生物活性乳铁蛋白粉具有治疗活性。下文描述的实验证明了根据本发明产生的粉末状乳铁蛋白对病毒复制具有抑制作用,并且可以在体内刺激免疫应答,并且诸位发明人认为,这些实验的结果使得能够合理地预测本文所公开的治疗应用。事实上,乳铁蛋白已被建议作为用于治疗或预防病毒感染,包含由SARS-CoV-2病毒引起的COVID-19的潜在治疗剂,并且鉴于上述有利的生物和功能特性,诸位发明人期望此类治疗的功效将在使用根据本发明产生的乳铁蛋白粉的情况下得到增强。实际上,本发明提供了呈粉末形式的乳铁蛋白,但其保留了天然乳铁蛋白的基本上所有生物活性,并且对于在药物应用中调配,还具有有益的功能特性(例如,混合特性、溶解度等)。

[0132] 因此,本发明提供了用于预防或治疗患者的病毒感染的方法。在一种方法中,可以向患者施用包括如上所述产生的乳铁蛋白粉的调配物(例如,通过患者的气道)。在另一种方法中,可以经鼻地向患者施用包括如上所述产生的乳铁蛋白粉的调配物。

[0133] 在其它实施例和方面中,包括如上所述产生的乳铁蛋白粉的调配物可以口服地(例如,在胶囊中)施用于患者。

[0134] 还提供了鼻喷雾以及药物组合物,所述鼻喷雾包括通过上述方法产生的乳铁蛋白粉,所述药物组合物包含通过上述方法产生的乳铁蛋白粉和药学上可接受的赋形剂。

[0135] 诸位发明人设想了,基于乳铁蛋白的鼻喷雾可以每天使用至多4次,作为针对病毒感染的预防性预防或暴露后预防。鉴于乳铁蛋白是通常存在于粘膜分泌物中的高度保守的天然蛋白质,因此牛乳铁蛋白不太可能是免疫原性的,并且应当是耐受良好的(患有乳过敏症的人除外)。这将乳铁蛋白独特地定位为基于高度保守的天然存在的蛋白质的同类首个鼻喷雾递送的粘膜泛病原体抑制剂。目前正在开发许多合成病毒阻断性鼻喷雾,但此类鼻喷雾不具有乳铁蛋白的多效性免疫增强功能。

[0136] 诸位发明人设想的一种具体治疗应用是作为COVID-19以及由其它病毒毒株,如引

起普通感冒(鼻病毒)和流感的病毒毒株引起的疾病的潜在预防和辅助治疗。因此,已经进行了实验,以通过在人支气管上皮细胞研究和人类临床研究中检查乳铁蛋白是否改善对COVID-19的应答,来研究根据本发明产生的乳铁蛋白是否可以有效作为针对COVID-19的治疗剂。下文将对这些实验进行描述。

[0137] 实例

[0138] 实例1-乳铁蛋白粉的产生

[0139] 现在将描述根据本发明的实施例并在下文中(参见实例2)被称为PnF20224和PnF21329的乳铁蛋白粉的批次通过其的方法。

[0140] 乳源自澳大利亚维多利亚州的古尔本山谷(the Goulburn Valley in Victoria, Australia)。将生全乳分离,并将脱脂乳转移到乳铁蛋白设备进行处理。脱脂乳在整个储存过程中保持处于冷藏温度,然后通过减少生脱脂乳中的细菌载量的细菌去除分离器(澄清器)进行处理,并随后通过一系列过滤器,所述过滤器去除任何残留的异物、脂肪、脂溶性化合物和不溶物。随着乳通过每个过滤器进行处理,这些过滤器变得越来越精细,最终达到形成1μm过滤器。

[0141] 通过离子交换过程进行从脱脂乳中提取乳铁蛋白,在所述离子交换过程中,使脱脂乳穿过含有专用离子交换树脂的径向流动柱。树脂由大的经交联的琼脂糖珠粒(100-300μm)构成,并且被定制用于工业应用,并且基底基质的大粒径和物理稳定性使得树脂能够用于大体积商业提取过程。将树脂的离子交换能力与来自脱脂乳的乳铁蛋白结合,用于通过洗脱过程进行收集。

[0142] 使用一系列浓度增加的氯化钠缓冲溶液将结合的乳铁蛋白从树脂中洗脱,其中最高浓度为大约10%w/v。收集乳铁蛋白洗脱液,并将其储存以供进一步处理。

[0143] 乳铁蛋白洗脱液的超滤和渗滤从乳铁蛋白溶液中去除了氯化钠离子,并增加了溶液中的固体。

[0144] 巴氏灭菌被具体设计成确保根据澳大利亚法规(澳大利亚和新西兰食品标准)实现食品安全要求。巴氏灭菌步骤被设计成使乳铁蛋白浓缩物的热谱最小化。为了满足监管要求,浓缩物必须经历达到72℃的加热持续最少15秒,或同等条件。使乳铁蛋白浓缩物在巴氏灭菌剂之后立即冷却可以有助于维持乳铁蛋白的生物活性水平。

[0145] 然后将乳铁蛋白浓缩物通过多级喷雾干燥过程进行处理,所述多级喷雾干燥过程使乳铁蛋白在比常规喷雾干燥过程的温度更低的温度下温和地干燥。干燥过程的第一级被设计成从形成粉末颗粒的浓缩物中去除大部分水分。干燥过程的此部分使用气流、空气温度和浓缩物喷嘴压力进行专门控制,以实现专门设计的粉末颗粒,以满足客户要求和规格。干燥的第二级由干燥流化床组成,在干燥流化床中,使用较低温度的空气和空气流速来温和地调理乳铁蛋白粉,使蛋白质基质冷却,同时温和地将水分含量调整到期望的水平。然后,使产品穿过振动筛分器,之后进行包装。

[0146] 过程的最后级涉及将乳铁蛋白分配到专门设计的重锡箔袋中。使乳铁蛋白粉穿过金属检测器并进入到包装材料中,所述包装材料具有优异的屏障特性,在产品的长保质期内保持PUREnFERRIN产品的完整性。包装形式通常为5kg;然而,这可以因客户要求而变化。

[0147] 上述过程中使用的设备的参数示出在下表1中。

[0148] 表1-过程参数

[0149]

乳特性	量度单位	PnF20224	PnF21329
所使用的大约脱脂乳	L	5,690,000	925,080
可滴定酸度	-	0.15	0.14
脂肪含量	% M/v	0.08	0.07
蛋白质含量	% M/v	3.80	3.60
总固体	% M/v	9.79	9.72
非脂肪固体（SNF）	% M/v	9.65	9.47
乳铁蛋白柱	**量度单位**	**PnF20224**	**PnF21329**
柱的数量	-	3	3
柱进料速率	CV/分钟	1	1
柱进料温度	℃	50	50
离开冷却器温度	℃	6	6
第一缓冲液电导率	mS/cm	42.5 - 43.5	42.0 - 43.0
第一缓冲液体积	CV	7	7
第一缓冲液流速	CV/分钟	0.25	0.25
第二缓冲液电导率	mS/cm	≥ 102	≥ 102
第二缓冲液体积	CV	3	3
第二缓冲液流速	CV/分钟	0.25	0.25
超滤（UF）装置	**量度单位**	**PnF20224**	**PnF21329**
巴氏灭菌前乳铁蛋白浓缩物的平均白利糖度	Bx	21.0	13.5
巴氏灭菌前乳铁蛋白浓缩物的平均电导率	mS/cm	0.3	0.4
所使用的 pH 调节化学品		氢氧化钠	不适用
巴氏灭菌前 pH	-	5.83 - 6.47	5.96

[0150]

巴氏灭菌剂	量度单位	PnF20224	PnF21329
巴氏灭菌温度	℃	73 - 75	73 - 75
巴氏灭菌时间	秒	17.5	17.5
热水温度	℃	76 - 78	75 - 77
产物流速	升/小时	80	80
干燥器进料流特性	**量度单位**	**PnF20224**	**PnF21329**
储存期间温度	℃	2.3	< 4.0
浓缩物的体积	L	5,451	607
浓缩物进料密度	kg/m³	1,041.9	1036.0
浓缩物进料流速	千克/小时	178.3	184.5
浓缩物进料温度	℃	49.9	49.8
高压泵进料压力	巴	5	5
喷雾干燥器运行条件	**量度单位**	**PnF20224**	**PnF21329**
喷嘴组合	涡流大小/孔口大小	S4/0.34	S4/0.34
主入口气流	千克/小时	5,146	5,037
主入口空气温度	℃	175.6	189.6
出口空气温度	℃	91.4	98.4
喷嘴压力	巴	170.8	190.6
室流化床气流	立方米/小时	240.2	252.5
室流化床粉末温度	℃	64.9	70.7
室流化床空气温度	℃	68.3	79.9
流化床干燥气流	立方米/小时	180.0	186.0
流化床干燥空气温度	℃	58.1	74.2
流化床冷却气流	立方米/小时	140.0	177
流化床冷却空气温度	℃	41.9	44.1
流化床粉末排放温度	℃	34.3	36.9
精细物目的地	-	筛分器	筛分器
流化床堰	-	开放	开放

[0151] 实例2-本发明的乳铁蛋白粉与可商购获得的乳铁蛋白粉的比较

[0152] 测量根据本发明产生的粉末形式的乳铁蛋白的铁饱和水平、鉴定、定量和质量，并将所述铁饱和水平、鉴定、定量和质量与其它可商购获得的乳铁蛋白粉的铁饱和水平、鉴定、定量和质量进行比较(参见表2)。描述了根据本发明并由不同制造商产生的商业牛成品乳铁蛋白粉的使用阳离子交换色谱法、反相高效液相色谱法(RP-HPLC)和质谱法(MS)的铁饱和水平、鉴定和定量。

[0153] 1.材料和方法

[0154] 1.1.化学品

[0155] 使用了HPLC或分析级的所有试剂和化学品，包含乙腈(FSBA955-4)、Optima®LC-MS级的水(FSBW6-4)、纯度为99％的三氟乙酸(FSBT/3258/PB05-100mL)和三盐酸盐(#BP153-500)，购自澳大利亚的飞世尔化学品公司(Fisher Chemicals,Australia)。氯化钠(#71380-5kg)购自澳大利亚的西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich,Australia)。氢氧化钠(#1.06469.1000)购自澳大利亚的默克密理博公司(Merck Millipore,Australia)。牛乳铁蛋白标准品(来自牛乳的乳铁蛋白，98.10％；产品编号:127-04122;批号:CAG5602)购自

澳大利亚的诺瓦化学公司(Novachem,Australia)。

[0156] 1.2.铁和铁饱和度分析

[0157] 此方法用于通过465nm处的吸光度测量来确定乳铁蛋白的铁饱和度百分比。100%饱和的10mg/mL乳铁蛋白溶液的在465nm处的吸光度＝0.48。基于这一事实,可以估计未知溶液的Fe^{3+}饱和度。必须对溶液进行稀释以进行A280测量,以产生介于1.00与1.50之间的值。必须通过0.45μm乙酸纤维素过滤器对溶液进行过滤,之后以A465和A280进行测量。由澳大利亚维多利亚州北墨尔本的必维国际检验集团质量(BVAQ)实验室(Bureau Veritas Asure Quality(BVAQ)laboratory,North Melbourne,Victoria,Australia)使用方法GB 5009.268.2-2016(铁)和LFST 0106.03(铁饱和度)进行分析。

[0158] 表2-所分析的牛乳铁蛋白粉

[0159]

序号	样品描述	制造商
1	牛乳铁蛋白粉 - PnF20224*	澳大利亚的诺迈集团有限公司（Noumi Limited, AUS）
2	牛乳铁蛋白粉 - PnF21329*	澳大利亚的诺迈集团有限公司
3	牛乳铁蛋白粉	美国的兰普利诺食品公司（Leprino Nutrition, US）
4	牛乳铁蛋白粉	澳大利亚的尼平河乳制品公司（Nepean River Dairy, AUS）
5	牛乳铁蛋白粉	澳大利亚的塔图拉公司（贝加乳酪公司）（Tatura (A Bega Cheese Company), AUS）

[0160] *＝根据本发明产生的乳铁蛋白

[0161] 1.3.样品制备

[0162] 1.3.1.乳铁蛋白标准品以及使用快速高效液相色谱法(FPLC)和超高效液相色谱法(UHPLC)的校准曲线的构建

[0163] 用于建立标准品的乳铁蛋白参考材料购自富士胶片和光纯药株式会社(FUJIFILMWako Pure Chemical Corporation,日本大阪(Osaka,Japan)),其中产品编号为#127-04122并且批号为#CAG5602。通过将1克乳铁蛋白溶解在具有100ml MQ的120ml容器中以获得10mg/ml浓度来制备储备溶液。使样品在Intelli公司混合器(Intelli mixer,ELMIRM-2L)上在室温下轻轻溶解3.5小时。由储备溶液制备工作乳铁蛋白校准标准品,以获得0.25mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml和5mg/ml的工作标准品。

[0164] 对于UHPLC校准,通过将200mg乳铁蛋白溶解在20ml MQ中来制备浓度为10mg/ml的储备溶液。通过将储备溶液稀释在MQ中制备工作标准品。用于校准曲线的浓度为0.05mg/ml、0.075mg/ml、0.1mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml和2.5mg/ml。

[0165] 使用每个靶标对其相应乳铁蛋白的相对应答来建立乳铁蛋白的校准曲线。

[0166] 1.3.2.用于使用FPLC进行阳离子交换色谱法分析的商业牛乳铁蛋白粉样品制备

[0167] 通过在50mL Falcon管中准确称量200mg粉末来制备乳铁蛋白粉储备溶液(10mg/ml)。将MQ水添加到管中,达到20mL或20g的最终体积。每种粉末一式三份制备。使样品在Intelli公司混合器(ELMI RM-2L)上在室温下轻轻溶解3.5小时,并穿过0.45μm过滤器。将储备样品稀释到2mg/ml,以使用阳离子交换色谱法(Capto HiRes阳离子交换色谱法柱,思拓凡公司(Cytiva))进行定量。

[0168] 1.3.3.用于MS和卡拉翰创新院RP-HPLC分析的商业乳铁蛋白粉样品制备

[0169] 通过在50mL Falcon管中准确称量100mg粉末来制备乳铁蛋白粉储备溶液(10mg/ml)。将MQ水添加到管中,达到10mL或10g的最终体积。每种粉末一式三份制备。使样品在Intelli公司混合器(ELMI RM-2L)上在室温下轻轻溶解3.5小时,并穿过0.45μm过滤器。

[0170] 将储备样品稀释到1.5mg/ml,用于质谱法和卡拉翰创新院RP-HPLC分析。

[0171] 1.4.阳离子交换色谱法

[0172] 在室温下用分析型预填充Capto HiRes S 5/50柱(#29275877,思拓凡生命科学公司(Cytiva Lifesciences))使用AKTApure 25M2FPLC系统(美国通用电气医疗集团(GE Healthcare,USA))对天然乳铁蛋白进行高分辨率分离来进行阳离子交换色谱法实验。梯度随后是通用电气医疗集团提供的方案。在每次运行后,根据制造商说明使柱再生。

[0173] 1.5.LC/Q-TOF

[0174] 使用配备有二极管阵列检测器(DAD)和Advanced Bio 6545XT LC/Q-TOF仪器的安捷伦科技公司UHPLC 1290Infinity Quarter LC系统(Agilent Technologies UHPLC 1290Infinity Quaternary LC system)进行MS和MS/MS分析。在来自飞诺美公司(Phenomenex)的Aeris™3.6mm WIDEPORE XB-C8 200 Å分析型LC柱(部件-00G-4481-E0,250x4.6mm)、C8Security Guard Ultra支架(部件-AJ0-9000)和Security Guard Ultra筒(部件-AJ0-8771)上进行卡拉翰RP-HPLC分析。根据Billakanti等人,2019(14)用两种溶剂的混合物进行梯度洗脱。溶剂A由含0.1%三氟乙酸(TFA)的水组成,并且溶剂B为含0.1%TFA的乙腈。在280nm的波长下进行检测。注射体积由20-μl组成。对每种样品进行至少三次独立分析,并且示出了代表性结果。使用安捷伦公司Mass Hunter定性分析软件10用于数据分析。

[0175] 通过在正电喷雾电离模式下,将20-μl注射到具有双AJS ESI的安捷伦科技公司6545XT Advanced Bio LC/Q-TOF仪器上以从样品中搜索和鉴定乳铁蛋白完整蛋白来进行MS分析。电离源条件设置如下:毛细管电压,4.5kV;源温度,干燥气体温度250℃,干燥气体流量8升/分钟,雾化气体压力2巴。碰撞气体是高纯氮气。所有LC-MS测量均一式三份进行。使用安捷伦公司MassHunter BioConfirm 10软件和Sequence Manager软件进行数据分析。

[0176] 2.结果和讨论

[0177] 2.1.铁含量和铁饱和水平

[0178] 结果显示,乳铁蛋白粉中的总铁浓度和铁饱和水平各不相同(表3)。乳铁蛋白粉中的铁含量如下:105mg/kg(兰普利诺食品公司)、109mg/kg(PnF20224)、129mg/kg(PnF21329)、129mg/kg(塔图拉公司)、147mg/kg(尼平河乳制品公司)和180mg/kg(富士胶片和光纯药株式会社),其中尼平河乳制品公司铁含量排名最高。

[0179] 六种不同的乳铁蛋白粉的铁饱和度的百分比是基于根据BVAQ实验室,通过UV-Vis光谱法测得的465nm和280nm处的光吸收率计算的。铁饱和水平在16%到23%的范围内(表3)。通常,天然形式的乳铁蛋白的特征在于,铁饱和度介于15-20%之间,并且颜色为鲑鱼粉色。诺迈集团和兰普利诺食品公司乳铁蛋白粉均含有16%,而塔图拉公司为14%,尼平河乳制品公司为23%(所有所分析的样品中最高),并且来自富士胶片和光纯药株式会社的乳铁蛋白参考材料铁饱和度为19%。

[0180] 铁饱和水平会影响成品乳铁蛋白粉的物理化学特性,所述物理化学特性会影响乳铁蛋白的功能和功效,因为乳铁蛋白功能取决于其正确的三维结构。铁结合促进乳铁蛋白

在其三级结构方面的变化并增加其热稳定性,并且天然乳铁蛋白表现出比其它形式略高的热稳定性。由于诺迈集团乳铁蛋白粉符合被称为天然乳铁蛋白的具有16%铁饱和度的鲑鱼粉色的标准,因此也可以预期其表现出略高的热稳定性。

[0181] 表3:商业牛乳铁蛋白粉中的铁和铁饱和水平

[0182]

序号	样品描述	制造商	国家	铁(mg/kg)	铁饱和度(%)
1	牛乳铁蛋白粉 PnF20224*	诺迈集团有限公司	澳大利亚	109	16
2	牛乳铁蛋白粉 PnF21329*	诺迈集团有限公司	澳大利亚	129	16
3	牛乳铁蛋白粉	兰普利诺食品公司	美国	105	16
4	牛乳铁蛋白粉	尼平河乳制品公司	澳大利亚	147	23
5	牛乳铁蛋白粉	塔图拉公司(贝加乳酪公司)	澳大利亚	129	14
6	乳铁蛋白粉,来自牛乳	富士胶片和光纯药株式会社	日本	180	19

[0183] *=根据本发明产生的乳铁蛋白

[0184] 2.2.通过阳离子交换色谱法的乳铁蛋白粉中的乳铁蛋白定量

[0185] 选择高分辨率预填充Capto HiRes S 5/50柱,用于乳铁蛋白的定量,以提供卓越的峰分辨率。结果显示,乳铁蛋白被很好地分离和洗脱,以进行准确定量。在280nm处记录色谱图。

[0186] 为了确定乳铁蛋白浓度,如方法部分所述生成校准曲线。参考乳铁蛋白在所选择的浓度范围(0.25-5mg/ml)内产生了良好的线性校准曲线,其中R2值为0.9997。随后,分析来自4个不同制造商的牛乳铁蛋白粉,以由通用电气医疗集团在Capto HiRes S 5/50柱上使用优化的测定条件对乳铁蛋白含量和纯度进行定量(表4)。

[0187] 基于综合色谱图的主要乳铁蛋白峰百分比确定蛋白质纯度。在乳铁蛋白粉样品中发现不同的乳铁蛋白纯度和定量水平(表3)。分别地,PnF20224和PnF21329的蛋白质纯度计算为98.76%和98.58%,乳铁蛋白(尼平河乳制品公司)的蛋白质纯度计算为98.36%,并且乳铁蛋白(塔图拉公司)的蛋白质纯度为94.84%。分别地,PnF20224和PnF21329的乳铁蛋白回收率百分比为82%和81%,尼平河乳制品公司的乳铁蛋白回收率为62%,并且塔图拉公司的乳铁蛋白回收率为74%。乳铁蛋白回收率的差异可以归因于各种乳铁蛋白商业制造商所使用的各种纯化过程。

[0188] 表4:商业牛乳铁蛋白粉中的乳铁蛋白回收率的百分比

[0189]

序号	样品描述	制造商	所回收的LF(%)
1	牛乳铁蛋白粉PnF20224	诺迈集团有限公司	82
2	牛乳铁蛋白粉PnF21329	诺迈集团有限公司	81
3	牛乳铁蛋白粉	兰普利诺食品公司	79
4	牛乳铁蛋白粉	尼平河乳制品公司	62
5	牛乳铁蛋白粉	塔图拉公司(贝加乳酪公司)	74

[0190] 2.3.商业乳铁蛋白粉中的乳铁蛋白的分子质量

[0191] 为了鉴定商业乳铁蛋白粉中存在的乳铁蛋白的分子质量,使用Q-TOF质谱仪。测量了PnF20224、PnF21329、尼平河乳制品公司和塔图拉公司的完整乳铁蛋白的分子质量。结果

显示,这些都与乳铁蛋白的理论分子质量一致:PnF20224为83,194Da,PnF21329为82,853Da,尼平河乳制品公司为83,373Da,并且塔图拉公司为83,984Da。质谱法结果呈现在表5中。

[0192] 先前的研究显示,已从牛初乳和成熟乳中分离出多种分子质量形式的乳铁蛋白,其被命名为乳铁蛋白-a(分子质量约84,000)和乳铁蛋白-b(分子质量约80,000)。这些多种重量形式天然地在各种乳样品中存在,并且不同的形式至少部分地是由于糖基化程度的差异造成的。诺迈集团的乳铁蛋白样品(即,本发明的乳铁蛋白样品)均在83,000Da的范围内,这指示诺迈集团的乳铁蛋白在其样品中的分子质量形式方面是均质的。尼平河乳制品公司(NRD)乳铁蛋白和塔图拉公司乳铁蛋白两者均含有一种以上分子质量乳铁蛋白形式(NRD:83,373Da-85,595Da,以及塔图拉公司:83,984Da-88009Da),这表示乳铁蛋白的质量低。

[0193] 表5:商业牛乳铁蛋白粉中的乳铁蛋白的分子质量

[0194]

序号	样品描述	制造商	LF分子质量(Da)
1	牛乳铁蛋白粉PnF20224	诺迈集团有限公司	83194
2	牛乳铁蛋白粉PnF21329	诺迈集团有限公司	82853
3	牛乳铁蛋白粉	尼平河乳制品公司	83373
4	牛乳铁蛋白粉	塔图拉公司(贝加乳酪公司)	83984

[0195] 2.4.使用卡拉翰创新院RP-HPLC分析的乳铁蛋白定量

[0196] 开发了卡拉翰创新院RP-HPLC分析方法,用于同时确定商业乳铁蛋白产品中的乳铁蛋白纯度和量。对于当前实验,校准曲线在0.05-2.5mg/ml的范围内,在相关系数(R^2)值为1的情况下是线性的。确定了所测试的乳铁蛋白粉中的乳铁蛋白含量,并且所述乳铁蛋白含量汇总在表6中。PnF20224的乳铁蛋白回收率为81.20%,PnF21329的乳铁蛋白回收率为83.00%,尼平河乳制品公司的乳铁蛋白回收率为71.37%,并且塔图拉公司的乳铁蛋白回收率为81.79%。对乳铁蛋白粉中的受污染的蛋白质的研究超出了本研究的范围,但Lonnerdal等人在2020年对塔图拉公司乳铁蛋白粉进行了研究,发现,与约80,000Da的大LF蛋白一起,还鉴定出了约25,000Da的小乳铁蛋白片段,这表示乳铁蛋白在产生过程期间是片段化的。

[0197] 表6:使用卡拉翰RP-HPLC分析的商业牛乳铁蛋白粉中的乳铁蛋白回收率的百分比

[0198]

序号	样品描述	制造商	所回收的LF(%)
1	牛乳铁蛋白粉PnF20224	诺迈集团有限公司	81.20
2	牛乳铁蛋白粉PnF21329	诺迈集团有限公司	83.00
5	牛乳铁蛋白粉	尼平河乳制品公司	71.37
6	牛乳铁蛋白粉	塔图拉公司(贝加乳酪公司)	81.79

[0199] 在本研究中,对诺迈集团和其它两家澳大利亚乳铁蛋白制造商(尼平河乳制品公司和塔图拉公司)的乳铁蛋白粉的铁含量、铁饱和水平、蛋白质纯度和定量(阳离子交换和RP-HPLC)进行了评估。所有乳铁蛋白在铁饱和度、纯度和定量中都表现出相当大的差异。阳离子交换色谱法和RP-HPLC分析型乳铁蛋白定量都揭示了,这两种分析技术在研究不同的物理化学特性以鉴定乳铁蛋白定量方面具有各自的优势。FPLC、阳离子交换色谱法和RP-HPLC结果显示出乳铁蛋白回收率的差异,其中诺迈集团乳铁蛋白(即,根据本发明)的回收率高。将阳离子交换技术和RP-HPLC技术组合可以更好地了解牛乳铁蛋白分离的粉末:阳离

子交换分析提供了对乳铁蛋白在天然缓冲液条件下发生热诱导的变化的见解,而RP-HPLC不会提供此类信息(14,21)。两种色谱法定量分析都表明,诺迈集团乳铁蛋白粉(PnF20224和PnF21329)的回收率高,并且乳铁蛋白在制造条件期间是稳定的,这使生物活性的损失最小化,并且适用于临床研究、膳食补充剂和营养配方。

[0200] 实例3-抗病毒活性的体外研究

[0201] 进行人类肺细胞研究、随后的体内啮齿动物研究和人类临床研究的多管齐下的研究方法将旨在提供本文所述的处理作用的证据。除非另有说明,否则实例3和4中对"乳铁蛋白"的提及是指根据本发明的方法产生的含乳铁蛋白的粉末形式的乳铁蛋白。

[0202] 伦理声明、供体募集和pBEC收集。

[0203] 原代支气管上皮细胞(pBEC)由P.A.B.Wark(纽卡斯尔大学(The University of Newcastle))提供,在支气管镜检查期间从健康的非吸烟供体中在具有书面知情同意书的情况下获得。所有受试者均根据标准指南进行纤维光导支气管镜检查。pBEC是使用在直接视觉下应用的单护套尼龙细胞学刷获得的。从第二代到第三代支气管进行了大约4-8次刷布。

[0204] pBEC以及经条件重编程的pBEC的空气-液体界面培养

[0205] 根据先前描述的方法在空气-液体界面处培养和分化(Loo SL,Wark PAB,Esneau C,Nichol KS,Hsu AC,Bartlett NW."人类冠状病毒229E和OC43在经分化的原代人支气管上皮细胞中复制并诱导不同的抗病毒应答(Human coronaviruses 229E and OC43replicate and induce distinct antiviral responses in differentiated primary human bronchial epithelial cells)".《美国生理学杂志-肺细胞分子生理学(Am JPhysiol Lung Cell Mol Physiol)》2020;319:L926-L931)。在空气-液体界面处培养之前,使从一个哮喘供体获得的pBEC生长并分化,直到融合为止。对于从健康患者获得的pBEC,根据先前发布的方案,通过与经辐照的成纤维细胞共培养对细胞进行条件重编程(Martinovich KM,Iosifidis T,Buckley AG,Looi K,Ling KM,Sutanto EN,Kicic-Starcevich E,Garratt LW,Shaw NC,Montgomery S,Lannigan FJ,Knight DA,Kicic A,Stick SM."经条件重编程的原代气道上皮细胞维持形态、谱系和疾病特异性功能特性(Conditionally reprogrammed primary airway epithelial cells maintain morphology,lineage and disease specific functional characteristics)".《科学报告(Sci Rep)》2017;7:17971)。分化25-30天后,通过假复层结构的存在、纤毛上皮以及粘液/粘液产生细胞的存在证实了培养物已准备好。

[0206] 病毒储备液和传播

[0207] OC43病毒储备液从ATCC(VR-1558)获得。美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection,ATCC)指示,OC43在HCT-8细胞上繁殖,其中传代次数未知。ATCC提供的OC43滴度为2.8×105中位组织培养物感染剂量/毫升(TCID50/mL),并且在接收ATCC储备液后,病毒在MRC-5细胞中传代三次以产生工作储备液:OC43滴度为2×108TCID50/mL,并用于根据WHO指南进行研究。使用Spearman-Karber法,在MRC-5中通过TCID50测定测量病毒滴度。

[0208] 乳铁蛋白处理和感染

[0209] 将牛乳铁蛋白(LF)粉(澳大利亚的诺迈集团)在PBS中稀释到10mg/mL的储备液浓

度。在完全分化后,通过添加在BEBM最小培养基(MM)中稀释的50uL 100μg/mL(LF100)和1000μg/mL(LF1000)利用LF进行顶端处理。用OC43以0.1的moi感染经分化的pBEC。将病毒接种物以LF的对应浓度稀释在200uL MM中,以保持在结合期间暴露于LF。

[0210] 感染前,将细胞用PBS洗涤一次,并仅在顶端表面上用对应浓度的50μL LF(或MM对照)预处理3小时。三小时后,在不去除LF处理的情况下,将病毒接种物直接添加到孔中(总感染体积250uL)。在35℃下温育2小时后,去除接种物。将细胞用500ul PBS洗涤,以去除未结合的病毒。最后,向顶端处添加50uL LF处理,对应于时间过程的开始。在时间过程持续时间期间维持处理,并在感染后0小时、24小时、48小时和96小时采集pBEC。在适用的情况下(图5),在感染后48小时向顶端表面处添加50uL LF处理(或MM对照),以更新处理。

[0211] 从ALI培养物的样品采集和分析

[0212] 采集后,通过添加450uL(或通过在感染后48小时时更新LF处理时添加400uL)PBS收集顶端洗涤液,持续5分钟,以测量传染性病毒的释放。将半膜收集在含有1%2-巯基乙醇(2ME)的RLT缓冲液(凯杰公司(Qiagen))中用于分子分析,并收集在含有蛋白酶抑制剂混合物(罗氏公司(Roche))的RIPA缓冲液中用于蛋白质分析。所有样品均储存在-80℃下,直至进一步使用。

[0213] 通过TCID50得到的所释放的传染性病毒的量度

[0214] 使用TCID终点稀释方法测量顶端洗涤液中的OC43工作储备液滴度和所释放的传染性病毒。将MRC-5以1.105个细胞/孔的浓度接种在10%FCS EMEM培养基(海克隆公司(Hyclone)),平底96孔板中。第二天,当细胞达到40%汇合时,用在1%EMEM培养基中连续稀释的样品感染细胞。保留一排作为对照。将板在35℃下温育5天,并使用显微镜进行检查,以确定每个柱中存在或不存在CPE。使用这些结果,使用Spearman-Karber法确定传染性病毒单位。

[0215] 通过qPCR得到的病毒载量的量度

[0216] 使用miRNAeasy小提试剂盒(凯杰公司)提取总RNA。通过分光光度法(Nanodrop公司(Nanodrop))对经纯化的RNA进行定量。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(ABI)合成cDNA。使用质粒产生用于qPCR的标准品,以进行OC43核衣壳基因PCR检测。使用靶向OC43N基因的taqman测定(协云基因公司(Geneworks)),使用ABI 7500实时PCR系统进行病毒载量qPCR分析。使用18S(应用生物系统公司(AppliedBiosystems),赛默飞世尔科技公司(Thermofisher Scientific))对所有靶标进行归一化。表7示出了用于这两种测定的引物和探针。

[0217] 表7:qPCR引物和探针

[0218]

靶基因	反向引物	正向引物	探针
N-OC43	5'-CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT	5'-CCTTCCTGAGCCTTCAATATAGTAACC	5'-FAM-TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT-TAMRA
18S	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT	5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTCG	5'-FAM-ACCGGCGCAAGACGGACCAGA-TAMRA

[0219] 统计分析

[0220] 使用GraphPad Prism 8.2.1版软件对所有数据进行分析。通过双向ANOVA与Šidák多重比较检验对qPCR数据(图3)进行比较。通过双向ANOVA与Šidák多重比较检验,对通过

TCID50测得的对数变换的传染性病毒数据(图4和5)进行比较。P值<0.05被视为是统计学上显著的。

[0221] 结果

[0222] 人经分化的原代人支气管上皮细胞研究

[0223] 如图2中可以看到的,使用乳铁蛋白的顶端处理显示出,OC43病毒载量在从一名患有哮喘的供体中获得的在空气液体界面处分化的pBEC中在96小时时间过程内减少。在存在或不存在于最小培养基(MM)中稀释的乳铁蛋白处理(LF100:100ug/mL;LF1000:1000ug/mL)的情况下,用OC43以0.1的moi感染细胞。使用靶向N基因的OC43特异性测定测量OC43病毒载量。使用18s特异性测定将数据相对于18s管家基因归一化。N=1

[0224] 如图2所示,经分化的原代人支气管上皮细胞的使用1000ug/mL乳铁蛋白(根据本发明产生)的单次处理在感染后至多4天产生100%的抑制。低10倍的100ug/mL剂量也是有效的,显示出在2天后对病毒复制100%阻断,以及在感染后4天大约90%的减少。

[0225] 如图3中可以看到的,使用1000ug/mL乳铁蛋白的顶端处理也显示出,OC43病毒载量在感染后96小时显著减少。从两个健康供体获得的pBEC在空气液体界面处分化。在存在或不存在于最小培养基(MM)中稀释的乳铁蛋白处理的情况下,用OC43以0.1的moi感染细胞。使用靶向N基因的OC43特异性测定测量OC43病毒载量。使用18s特异性测定将数据相对于18s管家基因归一化。使用双向ANOVA与Šidák多重比较检验进行统计分析,并且误差条表示平均值+/-SD;N=8;p<0.05(图表上的*)。

[0226] 随后的实验显示,传染性病毒在气道上皮培养物的顶端表面处脱落(图4和5)。如图4中可以看到的,使用1000ug/mL乳铁蛋白的顶端处理显示出,OC43释放的传染性病毒在感染后48小时显著减少。从两个健康供体获得的pBEC在空气液体界面处分化。使用Spearman-Karber计算通过TCID50测定测量释放的传染性病毒,并通过双向ANOVA与Šidák多重比较检验分析数据的对数变换。在存在或不存在于最小培养基(MM)中稀释的乳铁蛋白处理的情况下,用OC43以0.1的moi感染细胞。

[0227] 如图5中可以看到的,使用1000ug/mL乳铁蛋白的顶端处理显示出,OC43释放的传染性病毒在感染后48小时显著减少。从一个健康供体获得的pBEC在空气液体界面处分化。在存在或不存在于最小培养基(MM)中稀释的乳铁蛋白处理的情况下,用OC43以0.1的moi感染细胞。使用Spearman-Karber计算通过TCID50测定测量释放的传染性病毒,并通过双向ANOVA与Šidák多重比较检验分析数据的对数变换。误差条表示平均值+/-SD;N=3;p<0.05(图表上的*)。这些数据显示,在96小时时,LF1000在统计上低于未经处理的(在48小时时补充乳铁蛋白)。

[0228] 感染时的乳铁蛋白处理在48小时时将传染性病毒的产生显著抑制了超过2个对数。到96小时时,病毒开始在经处理的细胞中追赶上来(图4),但当在48小时时补充乳铁蛋白时,其仍在统计上低于(LF1000)未经处理的细胞(图5),并且没有免疫系统的帮助。在体内,预期乳铁蛋白将在感染的前几天内提供保护窗口,同时刺激免疫,以提供持续的抗病毒支持。体内小鼠研究(如下所述)有望说明这一点。

[0229] 因此,根据本发明产生的乳铁蛋白减少了使用经分化的原代人支气管上皮细胞的体外模型中的人冠状病毒(CoV)OC43的感染(数据是保密的,但可根据要求获得以进行讨

论)。这些积极的结果令人印象深刻,因此正在计划进行体外和体内(即,啮齿类动物模型)研究,以研究COVID-19通过新的处理模式(将乳铁蛋白局部应用于动物的鼻腔中)、作为抗病毒药物(例如,用于COVID-19)和非处方柜台买卖药物应用来引起病毒抑制的作用。

[0230] 实例4-啮齿动物中的抗病毒活性的体内研究

[0231] 许多病毒(包含β-冠状病毒,如OC43和SARS-CoV-2)使用蛋白聚糖作为共受体,以加速与细胞的结合并促进感染。通过与这些细胞表面蛋白聚糖结合,天然乳铁蛋白已显示出干扰病毒感染。体外(在细胞系中)研究报告了,乳铁蛋白对包含SARS-CoV-2在内的一系列呼吸道病毒的抗病毒活性。进行下述实验,以确定根据本发明制备的乳铁蛋白粉中的乳铁蛋白是否保留天然乳铁蛋白的生物活性。

[0232] 如上所述,乳铁蛋白的抗病毒特性已在感染有地方性人冠状病毒(例如,OC43和229E)的经分化的原代人支气管上皮细胞中得到证实。已经进行了随后的实验,以便获得在人气道上皮的这种有生理学信息的体外模型中针对SARS-CoV2的功效的早期概念验证。

[0233] 使用作为本领域的标准的并且技术人员熟知的程序进行下述实验。

[0234] 针对小鼠体内的OC43感染的鼻内处理功效

[0235] 基本原理

[0236] 抗病毒剂可能在遏制COVID-19以及治疗许多当前和未来的呼吸道病毒性疾病方面发挥关键作用。天然乳铁蛋白的抗微生物/抗病毒活性是公认的,被提议通过与细胞表面上的糖结构(例如,乙酰肝素、基于唾液酸的分子)的结合介导,这些糖结构被许多病毒用于感染期间的细胞结合。例如,人类呼吸道病毒,如冠状病毒利用基于糖的分子结构进行细胞结合:SARS-CoV-2与硫酸乙酰肝素结合。相关的人β冠状病毒OC43利用基于聚糖的受体9-O-乙酰化的唾液酸。

[0237] 这些实验将集中于使用独特小鼠冠状病毒(OC43)感染模型测试根据本发明(例如,实例1所述)产生的鼻内递送的乳铁蛋白粉在阻断OC43感染方面的功效,所述模型被内部开发以提供支持将乳铁蛋白调配物开发为抗呼吸道病毒鼻喷雾的概念验证证据。如先前提到的,除非另有说明,否则本实例中对“乳铁蛋白”的提及是根据本发明的方法产生的呈含乳铁蛋白的粉末的形式的乳铁蛋白。

[0238] 目的

[0239] 1.确定鼻内乳铁蛋白处理是否减少小鼠体内的人冠状病毒(CoV)OC43的感染。

[0240] 2.分析乳铁蛋白和免疫转录组生物标志物的抗病毒作用

[0241] 研究设计

[0242] 进行三个单独的体内实验,以提供支持将乳铁蛋白调配物开发为抗呼吸道病毒鼻喷雾的概念验证证据。每项研究的实验设计的汇总可在表8和图6中获得错误!找不到参考来源。

[0243] 研究1:乳铁蛋白的概念验证

[0244] 在感染时和感染后每天用乳铁蛋白对小鼠(8只/组)进行鼻内处理(100ug/mL*15uL鼻内,对应于每只小鼠1.5ug总剂量,基于体外研究),以对暴露后预防进行建模。在初始乳铁蛋白处理后,根据已建立的方案,使小鼠感染$1x10^6$TCID50/mL OC43(或UV灭活的病毒对照-UV-OC43),以对OC43上呼吸道感染过程进行建模。在感染后2小时和48小时评估实验终点。收集鼻甲和鼻冲洗液,用于分别通过qPCR评估OC43病毒载量并通过病毒中值组织

培养物感染剂量(TCID50)评估感染。

[0245] 研究2:重复实验

[0246] 在感染时和感染后每天用乳铁蛋白对小鼠(8只/组)进行鼻内处理(100ug/mL*15uL鼻内,对应于每只小鼠1.5ug总剂量),以对暴露后预防进行建模。在此重复实验中,在时间过程中的每一天对乳铁蛋白处理进行更新。在初始乳铁蛋白处理后,根据已建立的方案,使小鼠感染1x10^{6}TCID50OC43/mL(或UV灭活的病毒对照-UV-OC43),以对OC43上呼吸道感染过程进行建模。在感染后2小时和48小时评估实验终点。收集鼻甲,用于通过qPCR评估OC43病毒载量和先天性抗病毒免疫应答(干扰素IFN-β和IFN-λ2/3)。收集鼻冲洗液,用于分别通过病毒中位组织培养物感染剂量(TCID50)评估感染。

[0247] 研究3:免疫转录组生物标志物

[0248] 在感染时和感染后每天两次用乳铁蛋白对小鼠(8只/组)进行鼻内处理(10mg/mL*15uL鼻内,对应于每只小鼠150ug总剂量),以对暴露后预防进行建模。在初始乳铁蛋白处理后,根据已建立的方案,使小鼠感染1x10^{6}TCID50/mL OC43(或UV灭活的病毒对照-UV-OC43),以对OC43上呼吸道感染过程进行建模。在感染后2小时和48小时评估实验终点。收集鼻甲,用于通过qPCR评估OC43病毒载量。收集支气管肺泡灌洗液,用于白细胞枚举。另外,由Nanostring公司使用来自Nanostring公司(华盛顿州西雅图的Nanostring公司(Nanostring,Seattle,WA))的nCounter小鼠免疫学v2表达套组分析鼻组织中的免疫转录组生物标志物单位,所述套组评估n>500个普通小鼠免疫学相关基因的表达。

[0249] 表8:每个*PUREnFERRIN*®体内研究的研究设计和处理的总结。

	小鼠 8 只/组	实验组	施用方案	采集(感染后小时数)	终点
研究 1/2	2 组 16 只小鼠/采集 2 次采集	1.媒剂/OC43 2.1.5 μg 乳铁蛋白/OC43	LF 或媒剂 第 0 天 +此后每天	2，48	通过 PCR 分析鼻组织中的病毒滴度和干扰素基因表达（仅研究 2）。 通过 $TCID_{50}$ 测定分析鼻冲洗液中的活感染病毒单位。
	总计：32				

[0250]

	小鼠 8 只/组	实验组	施用方案	采集(感染后小时数)	终点
研究 3	4 组 32 只小鼠/采集 2 次采集	1.媒剂/OC43 2.1.5 μg 乳铁蛋白/OC43 3.150 μg 乳铁蛋白/PBS 4.经处理的/感染的模拟物	LF 或媒剂 第 0 天 +此后每天两次	2，48	通过 PCR 分析鼻组织中的病毒滴度。 支气管肺泡灌洗液中的白细胞枚举。 由 Nanostring 公司分析鼻组织中的免疫转录组生物标志物单位
	总计：64				

[0251] 结果

[0252] 研究1:乳铁蛋白鼻内处理显示出OC43病毒载量和传染性病毒减少的趋势

[0253] 图7A示出了未经处理的(媒剂)小鼠相对于用1.5ug乳铁蛋白鼻内地处理的小鼠的鼻甲中的在48小时时间过程内的OC43病毒载量。在病毒接种后2小时,媒剂处理的小鼠与乳

铁蛋白处理的小鼠之间的OC43病毒载量相当。直到感染48小时,观察到OC43病毒载量增加2个对数,这表明在上呼吸道中的病毒复制。对于乳铁蛋白处理的小鼠,在感染后48小时,在使用2向ANOVA统计检验和Sidak多重比较检验进行分析时,存在病毒载量减少的趋势(p＝0.3368)。

[0254] 图7B示出了在鼻冲洗液样品中使用TCID50测定在MRC-5细胞中测得的OC43传染性病毒。在病毒接种后2小时,在未经处理的(媒剂)样品与LF处理的样品之间没有观察到传染性病毒剂量的显著差异,但在乳铁蛋白处理的组中存在传染性病毒减少的趋势(p＝0.6727)。对于传染性病毒TCID50测定,感染后48小时时的OC43活传染性病毒降低到TCID50测定的检测限(LOD)以下。

[0255] 如图7中可以看到的,在乳铁蛋白鼻内处理后,OC43病毒载量和传染性病毒趋向于减少。小鼠在感染时和之后每天用1.5ug乳铁蛋白鼻内地进行处理。分别通过qPCR和TCID50测定来评估媒剂处理的小鼠与乳铁蛋白处理的小鼠之间的A)病毒载量;以及B)传染性OC43水平。通过2向ANOVA使用Sidak多重比较检验对结果进行分析。N＝8;LOD＝检测限(63.2TCID50/mL)。

[0256] 研究2:乳铁蛋白鼻内处理显示出OC43病毒载量在感染后48小时减少的趋势,这与IFN mRNA的减少相关。

[0257] 由于初始初步研究显示出OC43病毒RNA和传染性病毒减少的趋势,因此重复实验。与其中乳铁蛋白处理由储备乳铁蛋白浓缩液的先前冷冻的等分试样制备的初始实验相比,由诺迈集团提供的乳铁蛋白粉在处理的每一天都被稀释更新。

[0258] 在乳铁蛋白鼻内处理后,OC43病毒载量和传染性病毒趋向于减少。小鼠在感染时和之后每天用1.5ug乳铁蛋白鼻内地进行处理。分别通过qPCR和TCID50测定来评估媒剂处理的小鼠与乳铁蛋白处理的小鼠之间的A)病毒载量;以及B)传染性OC43水平。通过A)2向ANOVA使用Sidak多重比较检验以及B)未配对T检验对结果进行分析,n＝8。

[0259] 观察到OC43病毒载量的结果与第一项研究中的结果相似。图8A示出了未经处理的(媒剂)小鼠相对于用1.5ug乳铁蛋白鼻内地处理的小鼠的鼻甲中的在48小时时间过程内的OC43病毒载量。病毒接种后2小时,媒剂处理的小鼠与LF处理的小鼠之间的OC43病毒载量相当。观察到OC43病毒载量在病毒接种后48小时增加了2个对数,这表明上呼吸道中的病毒复制。在LF处理的小鼠中感染后48小时,存在病毒载量减少的趋势;2向ANOVA统计检验和Sidak多重比较检验(p＝0.2929)。

[0260] 基于来自研究1的结果,OC43滴度到48小时时低于TCID50测定的检测限,因此,仅在感染后2小时测量活病毒。图8B示出了在病毒接种后2小时,在鼻冲洗液样品中使用TCID50测定在MRC-5细胞中测得的OC43传染性病毒。在LF处理的组中观察到传染性病毒减少的趋势(p＝0.3748)。

[0261] 然后使用内部IFN-β和IFN-λ2/3qPCR测定研究鼻组织中的天然抗病毒免疫应答。IFN-β和IFN-λ2/3的结果分别呈现于图9A和9B中。在图9中,OC43感染后先天免疫基因表达的量值随病毒载量而变化。小鼠在感染时和之后每天用1.5ug乳铁蛋白鼻内地进行处理。通过qPCR评估媒剂处理的小鼠与乳铁蛋白处理的小鼠之间的A)IFN-β水平和B)IFN-λ2/3水平。通过2向ANOVA使用Sidak多重比较检验对结果进行分析。N＝8

[0262] 对于两种IFN分子,在感染后48小时存在mRNA水平下降的趋势,这与在48小时时观

察到的病毒载量的减少相符(错误!找不到参考来源A);使用2向ANOVA统计检验和Sidak多重比较检验进行分析(分别地,对于IFN-β和IFN-λ2/3,p=0.25139和0.5183)。

[0263] 研究3:乳铁蛋白鼻内处理

[0264] 在最终研究中,研究了乳铁蛋白鼻内处理在高100倍的剂量下并且在更频繁的给药的情况下的抗病毒功效。在此实验中,用150ug乳铁蛋白鼻内地对小鼠进行处理,并到感染后48小时时间点接受总共5次鼻内剂量。在实验设计中添加了两个另外的对照组:UV-OC43/未经处理的(模拟物媒剂)和UV-OC43/LF处理的(模拟物+LF)。

[0265] 在感染了UV-OC43的组的鼻甲中,病毒RNA低于检测限,这指示鼻组织中的病毒RNA水平是由活病毒引起的,而非对初始接种物的持续检测引起的。在OC43感染的组中,观察到在感染2小时与48小时之间,媒剂处理的组和乳铁蛋白处理的组两者的OC43病毒载量增加了一个对数。最后,在2小时时间点和48小时时间点两者,媒剂处理的组与LF处理的组之间不存在病毒载量的差异。

[0266] 本研究中的乳铁蛋白剂量是早期研究的乳铁蛋白剂量的100倍,以确定耐受性和功效的上限水平。然而,这似乎过高,并且没有观察到对病毒载量的影响。诸位发明人注意到,例如,增加体积的鼻喷雾可能仅从小鼠的鼻腔中掉出来。进一步的实验将会仅是高两倍(或大约两倍)。

[0267] 然后研究支气管肺泡灌洗液(BAL)中的白细胞募集,以评估上呼吸道乳铁蛋白处理在下呼吸道中产生保护性免疫细胞募集的能力。如图10中可以看到的,OC43感染和乳铁蛋白鼻内处理。在感染时和之后每天两次用150ug乳铁蛋白对小鼠鼻内地进行处理,并在媒剂处理的组与乳铁蛋白处理组之间以及模拟物感染的组与感染的组之间枚举BAL(A)巨噬细胞、(B)嗜中性粒细胞和(C)淋巴细胞。在“混合效应”统计检验中使用图基多重比较检验(Tukey's multiple comparison test)分析结果。每组n=8。

[0268] 图10A示出了下呼吸道中的巨噬细胞。在感染后2小时,观察到组之间的显著差异。与感染了OC43的组相比,接种有UV灭活的OC43的两个组均显示出显著更高的巨噬细胞计数($p<0.01$)。另外,OC43乳铁蛋白处理的组的巨噬细胞计数往往低于其未经处理的对应物的巨噬细胞计数;使用图基多重比较的混合效应统计检验(p=0.1337)。到感染48小时时,所有组内的巨噬细胞计数不存在差异。图10B示出了OC43接种后2小时和48小时时的BAL嗜中性粒细胞计数。两个时间点的嗜中性粒细胞计数不存在显著差异。图10C示出了下呼吸道中的淋巴细胞计数。2小时后,模拟物感染的未经处理的组的淋巴细胞计数显著低于OC43感染的媒剂组的淋巴细胞($p<0.05$)。与模拟物感染媒剂处理的组相比,乳铁蛋白处理的组的淋巴细胞存在增加的趋势(分别地,对于OC43媒剂和OC43乳铁蛋白处理的,p=0.2006和p=2101)。到感染48小时时,淋巴细胞计数不存在差异。

[0269] 这些数据表明,可能需要更定期地施用乳铁蛋白。在人类中,需要4次天鼻喷雾,以获得病毒感染预防效应。进一步的实验将更频繁地处理小鼠,这与将在典型的人类治疗方案中进行的实验一致。

[0270] 研究3续:乳铁蛋白免疫转录组生物标志物

[0271] 为了研究乳铁蛋白免疫调节活性,使用Nanostring公司小鼠免疫学v2表达套组(华盛顿州西雅图的Nanostring公司)分析鼻组织免疫转录组生物标志物单位,所述套组评估n>500个普通小鼠免疫学相关基因的表达。将未感染且未经处理的组与未感染的乳铁蛋

白组进行比较,并去除两个异常值(一个值在媒剂处理的组中,并且一个值在乳铁蛋白处理的组中),以用于此分析。

[0272] Nanostring公司揭示了参与T细胞信号传导和抗原呈递、淋巴细胞募集(IL20CXLC13和凋亡(胱天蛋白酶8))、来自巨噬细胞和T细胞的免疫系统通路(CD2、CD22、ITG B2)、白细胞迁移通路(ITGB2、ICAM 2、ITGA4、CD2、SELL)和JAK-STAT信号传导通路(SHP1、STAT)以及造血细胞谱系(CD127、HLA-DR、CD19、CD22、CD20)的生物标志物的上调。

[0273] 进一步分析了通过乳铁蛋白处理进行的通路富集的数据。乳铁蛋白促进围绕淋巴细胞募集、结合、成熟的多种通路以及抗原呈递和信号转导通路(TLR/NFkB/IFN/TNF信号传导)的富集。

[0274] 最后,此分析揭示了,鼻内乳铁蛋白处理促进鼻免疫细胞募集。与媒剂处理的相比,LF处理的组中富集了CD45(白细胞标志物)、B细胞以及低水平嗜中性粒细胞和T细胞。一个例外是细胞毒性t细胞。

[0275] 结论

[0276] 在本报告中,使用小鼠冠状病毒(OC43)感染模型研究了鼻内递送的乳铁蛋白对OC43感染的功效,所述模型被开发以提供支持将乳铁蛋白调配物开发为抗呼吸道病毒鼻喷雾的概念验证证据。

[0277] 这是在三项体内研究的跨度上进行的,以确定鼻内乳铁蛋白处理是否减少小鼠体内的人冠状病毒(CoV)OC43的感染,并对乳铁蛋白免疫转录组生物标志物进行分析。

[0278] 研究1和2通过研究媒剂与用1.5ug乳铁蛋白处理的小鼠之间的病毒载量和传染性病毒而集中于乳铁蛋白处理的抗病毒效应。重要的是,在这两项研究中,感染后48小时时的病毒载量存在减少的趋势。

[0279] 在其中乳铁蛋白剂量增加了100倍(1.5ug至150ug)的第三项研究中,媒剂处理的组与OC43处理的组之间的病毒载量相似,这表明从1.5ug至150ug的乳铁蛋白剂量可能过高,并且未能有效地预防感染。测试另外的处理剂量,例如15ug(即,仅高10倍),是用于确定通过鼻内乳铁蛋白处理来预防OC43病毒载量的最佳剂量的下一步骤。

[0280] 当观察鼻冲洗液样品中的传染性OC43时(研究1和2)时,与媒剂处理的相比,接种后2小时时的OC43结合显示出在乳铁蛋白处理的组中减少的趋势。其中小鼠数量增加的进一步研究将有助于提供达到统计显著性所需的统计能力(更早且更频繁地使用乳铁蛋白处理除外,如人类治疗模型那样)。在感染后48小时时,传染性病毒单位下降到测定的检测限以下。到感染后48小时传染性OC43的缺乏,与通过qPCR观察到的病毒RNA的增加形成对比,可能是实验模型的假象,需要进一步优化。

[0281] 研究3进一步集中于评估在更高剂量(每次处理150ug)下和更频繁的剂量(每天两次)的情况下进行的乳铁蛋白处理后的免疫生物标志物;然而,每天两次的处理仍可能太少,因为在人类鼻喷雾应用中,在应用频率方面,每天四次是典型的。研究3的目的首先是通过枚举支气管肺泡灌洗液中的白细胞来确定上呼吸道乳铁蛋白处理是否可以在下呼吸道中产生保护性免疫细胞募集。在上呼吸道中感染OC43后两小时时,诱导了淋巴细胞的显著募集,但没有诱导巨噬细胞或嗜中性粒细胞的显著募集($p<0.05$)。在病毒激发后48小时,与UV-OC43对照相比,OC43媒剂处理的组和OC43乳铁蛋白处理的组的白细胞计数没有变化,这可能表示,白细胞计数的变化可能仅与短暂扰动有关,或者此类效应可以是初始免疫系统

“致敏”相关的。

[0282] 最后,使用Nanostring公司小鼠免疫学v2表达套组(华盛顿州西雅图的Nanostring公司)分析媒剂处理的组和LF处理的组之间的鼻组织免疫转录组生物标志物单位。乳铁蛋白处理促进MHC-II表达、T细胞和B细胞标志物以及CXCL13产生,所述CXCL13是在B细胞和T细胞归巢中发挥重要作用的细胞因子。此结果表明,这些可以是鼻刷中合适的生物标志物。通路富集分析揭示,乳铁蛋白鼻内处理促进围绕淋巴细胞募集、结合、成熟的多种通路以及抗原呈递和信号转导通路(TLR/NFkB/IFN/TNF信号传导)的富集。免疫细胞群,如B细胞和T细胞、嗜中性粒细胞和富集的CD45(白细胞标志物)的富集核心进一步补充了这一点。

[0283] 方法

[0284] OC43传播、纯化和定量

[0285] 原始OC43(ATCC编号VR-1558)传代史未知,在HCT-8细胞上传播。以2.8x 105TCID50/ml的浓度接收来自ATCC的初始储备液,并使其在MRC-5细胞中传代3次,以产生如前所述的工作储备液(7)。使用MRC-5细胞系,以使用Spearman-Karber法进行TCID50测定,以对病毒载量进行定量。

[0286] 病毒激发和处理施用

[0287] 6-8周龄雌性BALB/c小鼠获得自澳大利亚生物资源公司(Australian Bioresources,新南威尔士州悉尼市莫斯维尔(Moss Vale,Sydney,NSW))。使用异氟烷在轻度麻醉下进行治疗剂的施用和病毒激发。用浓度为1.15x 106TCID50的于15μL(研究1和2)或10uL PBS中的OC43鼻内地激发小鼠,以对上呼吸道感染进行建模。研究3中使用的UV-OC43是灭活的,如先前对呼吸道病毒所描述的。

[0288] 鼻灌洗液、支气管肺泡灌洗液和细胞分析

[0289] 对小鼠气管进行插管,并用HBSS(海克隆公司,通用电气生命科学公司)灌洗上呼吸道,从而在鼻孔处收集鼻灌洗液。将鼻灌洗液储存在-80℃下。如前所述的对支气管肺泡灌洗液进行处理,以枚举白细胞和细胞因子。

[0290] RNA提取和逆转录

[0291] 将鼻甲切除,并在含有1%β巯基乙醇的RLT中涡旋30秒。去除鼻甲碎屑,并将裂解物储存在-80℃下。根据供应商的方案,使用miRNAeasy试剂盒(凯杰公司)提取RNA。通过分光光度法(Nanodrop公司)测量RNA,并根据制造商的建议使用500ng RNA与高容量cDNA逆转录试剂盒(ABI)进行逆转录反应。

[0292] 定量PCR

[0293] 在QuantStudio 6上使用TaqMan基因表达主混合物(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))和引物-探针组合(赛默飞世尔科技公司)进行定量PCR(qPCR),如所概述的(表9)。将已知浓度的标准品用于所关注基因的绝对定量。使用18s作为参考基因以对所关注基因的拷贝数归一化。

[0294] 表9:qPCR引物/探针序列表。引物和探针均以5μM的最终浓度使用。TaqMan探针均含有5’FAM报告基因和3’TAMRA淬灭剂。

[0295]

基因	引物	序列
OC43	FWD	5'CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT
	REV	5'CCTTCCTGAGCCTTAATATAGTAACC
	探针	5'FAM-TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT-TAMRA
IFN-β	FWD	5'CGCCGCATTGACCATCTA
	REV	5'TTAGCCAGGAGGTTCTCAACAATAGTCTCA
	探针	5'FAM-TCAGACAAGATTCATCTAGCACTGGCTGGA-TAMRA
IFN-λ 2/3	FWD	5'AAAGGATTGCCACATTGCTC
	REV	5'TCAAGCAGCCTCTTCTCGAT
	探针	5'FAM-TCCCCAAAAGAGCTGCAGGC-TAMRA
18s	FWD	5'CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT
	REV	5'CATTCTTGGCAAATGCTTTCG
	探针	5'FAM-ACCGGCGCAAGACGGACCAGA-TAMRA

[0296] 病毒中位组织培养物感染剂量(TCID50)病毒感染力测定

[0297] 使用10％FCS EMEM生长培养基和1％FCS EMEM测定培养基在MRC-5细胞中对OC43冠状病毒进行TCID50测定。将MRC-5细胞重悬于生长培养基中,并接种在96孔板中(1x105个细胞/100μL/孔)。在30-40％汇合处(通常在过夜温育后),用鼻冲洗液样品感染细胞,开始是2倍稀释,随后在含有1％FCS的EMEM中进行10倍稀释系列。在33℃/5％CO2下温育5天后,通过光学显微术检查板的细胞病理学效应。然后使用Spearman-Karber法确定每种样品的病毒滴度。

[0298] 免疫转录组表达分析

[0299] 将鼻甲RNA与nCounter小鼠免疫学套组(NanoString公司)杂交,并根据制造商的说明在Nanostring制备站上以用于高灵敏度结合的设置进行处理。在nCounter数字分析仪上对555个视场进行计数。在用于内容归一化QC的nSolver分析软件4.0中,对原始数据进行质量控制(QC)检查,并将其相对于阳性/阴性对照以及管家基因表达进行归一化。将原始计数导入到nSolver高级分析软件(v2.0.134)中,使以用GENorm软件和通路/细胞富集分析进行自动归一化。高级分析平台使用线性回归模型以鉴定DEG。DEG是在GraphPad Prism 9.1.2中绘制的火山图。使用Heatmapper软件,以基于Nanostring公司高级分析输出产生样品的平均欧几里德聚类(Euclidean clustering)和基因表达模式,以及通路富集z评分的视觉表示和细胞富集谱。

[0300] 本发明领域的技术人员应当理解,在不背离本发明的精神和范围的情况下,可以进行许多修改。

[0301] 在附随的权利要求和本发明的前述描述中,除非上下文由于表达语言或必要的暗示而另外需要,否则词语“包括(comprise)”或变型,如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”以包含性意义使用,即存在指定所陈述的特征但不排除本发明的各个实施例中存在或添加另外的特征。

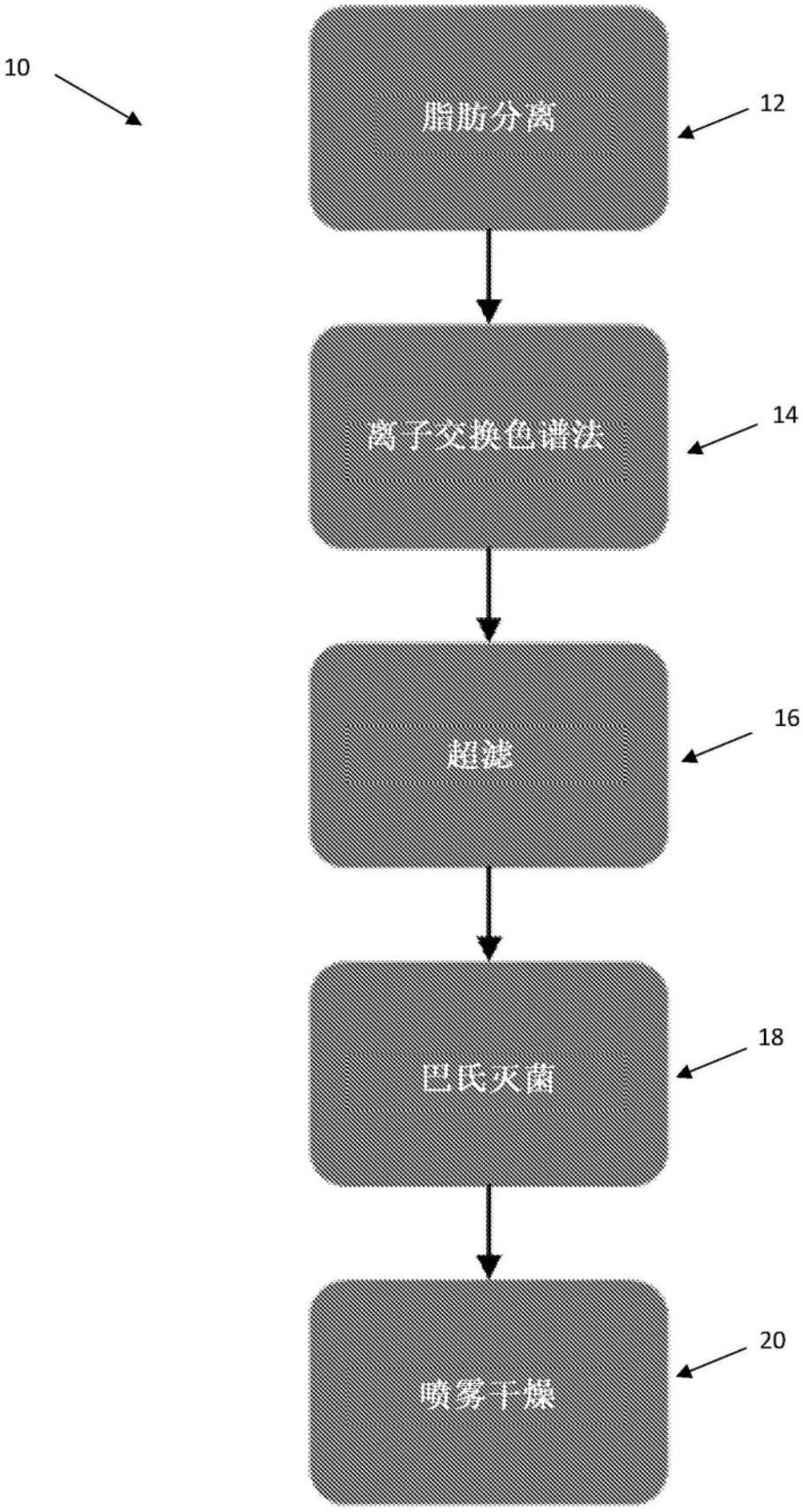

图1

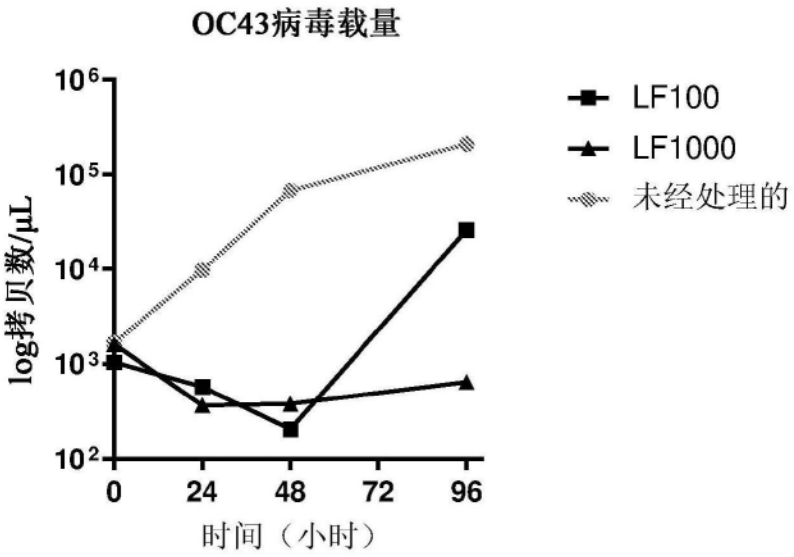
OC43病毒载量
log拷贝数/μL
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
0
24
48
72
96
时间（小时）
LF100
LF1000
未经处理的

图2

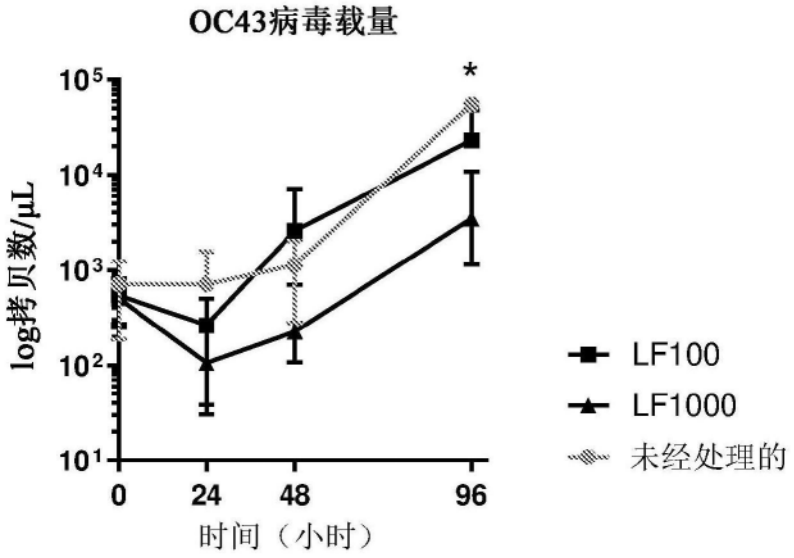
OC43病毒载量
log拷贝数/μL
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
*
0
24
48
96
时间（小时）
LF100
LF1000
未经处理的

图3

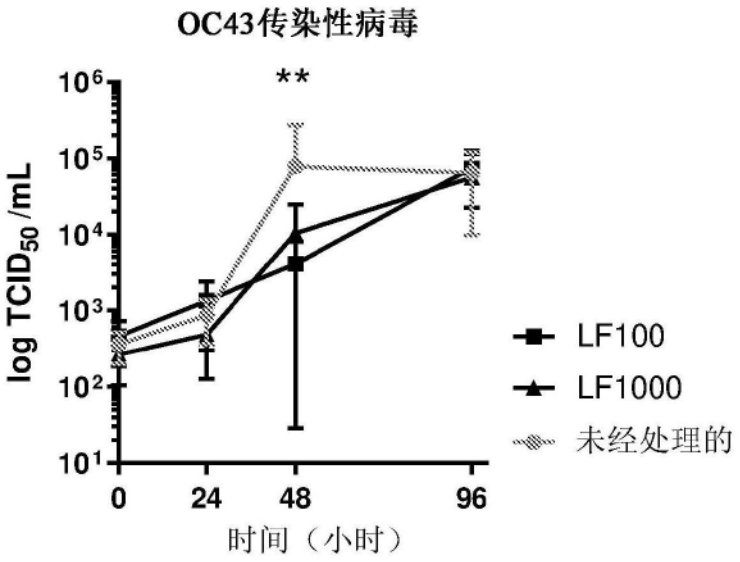
OC43传染性病毒
**
log TCID50 /mL
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0
24
48
96
时间（小时）
LF100
LF1000
未经处理的

图4

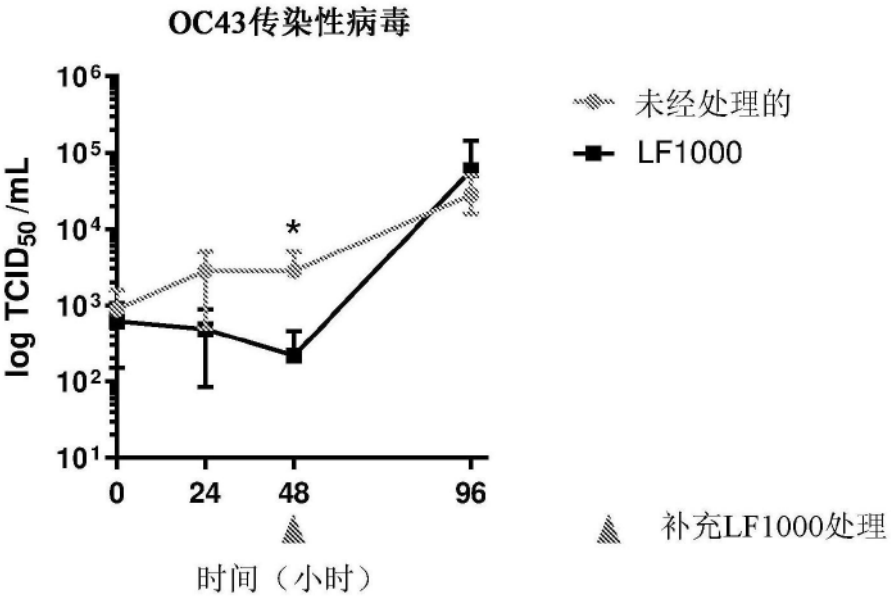
OC43传染性病毒
log TCID50 /mL
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
*
0
24
48
96
时间（小时）
未经处理的
LF1000
补充LF1000处理

图5

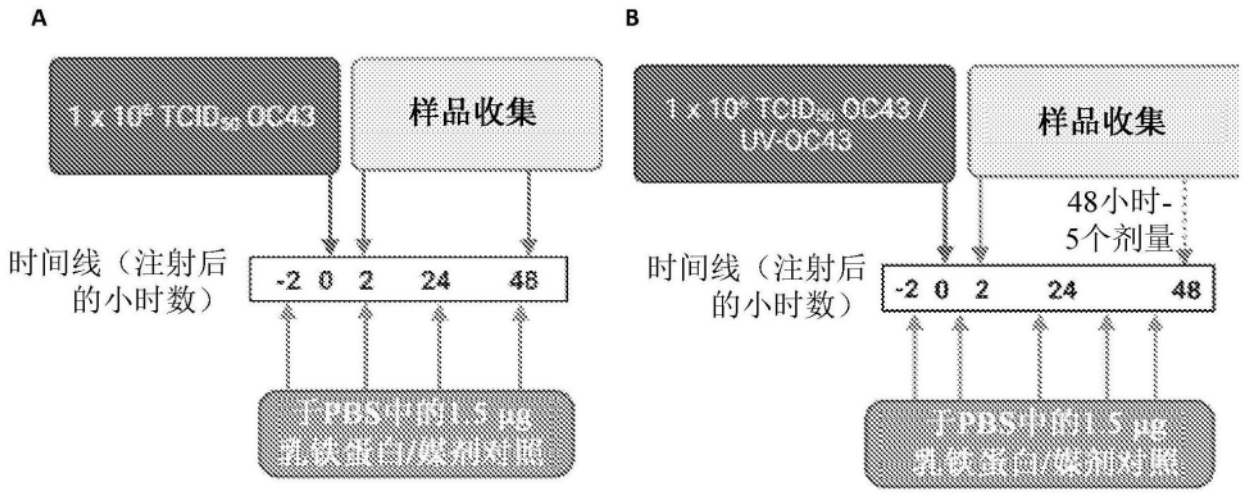
A
1 x 10⁶ TCID₅₀ OC43
样品收集
时间线（注射后的小时数）
-2 0 2 24 48
于PBS中的1.5 μg乳铁蛋白/媒剂对照
B
1 x 10⁶ TCID₅₀ OC43 / UV-OC43
样品收集
48小时-5个剂量
时间线（注射后的小时数）
-2 0 2 24 48
于PBS中的1.5 μg乳铁蛋白/媒剂对照

图6

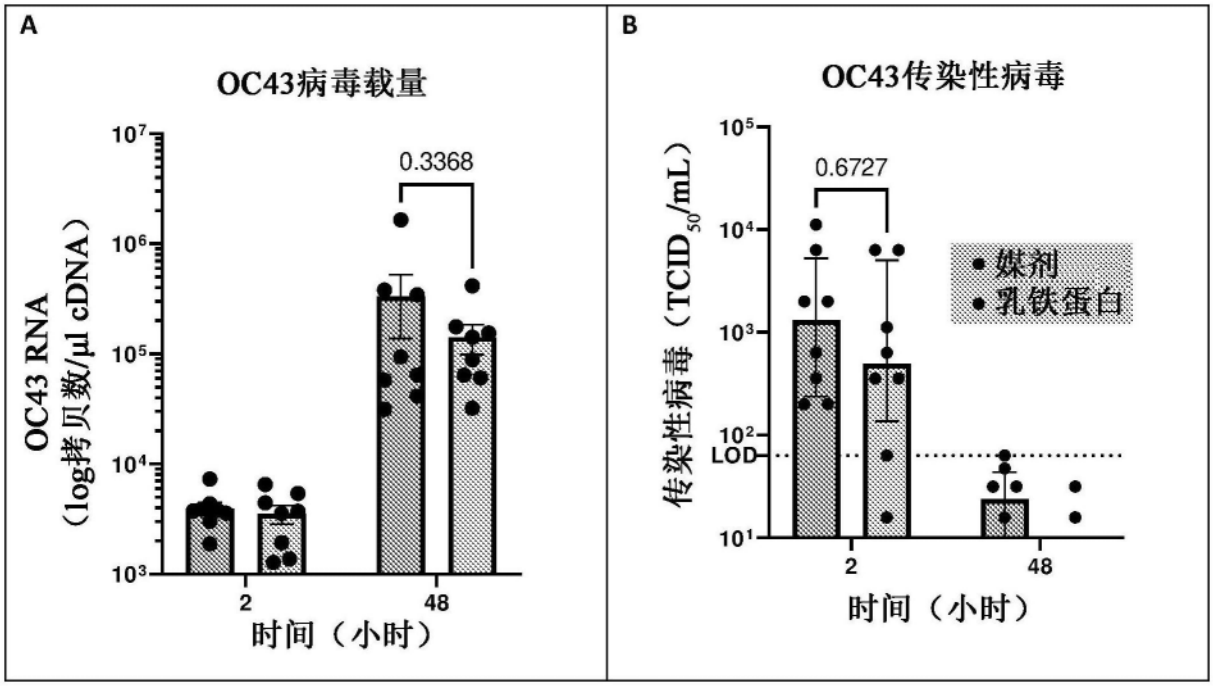
A
OC43病毒载量
OC43 RNA（log拷贝数/μl cDNA）
0.3368
时间（小时）
B
OC43传染性病毒
传染性病毒（TCID₅₀/mL）
0.6727
媒剂
乳铁蛋白
LOD
时间（小时）

图7

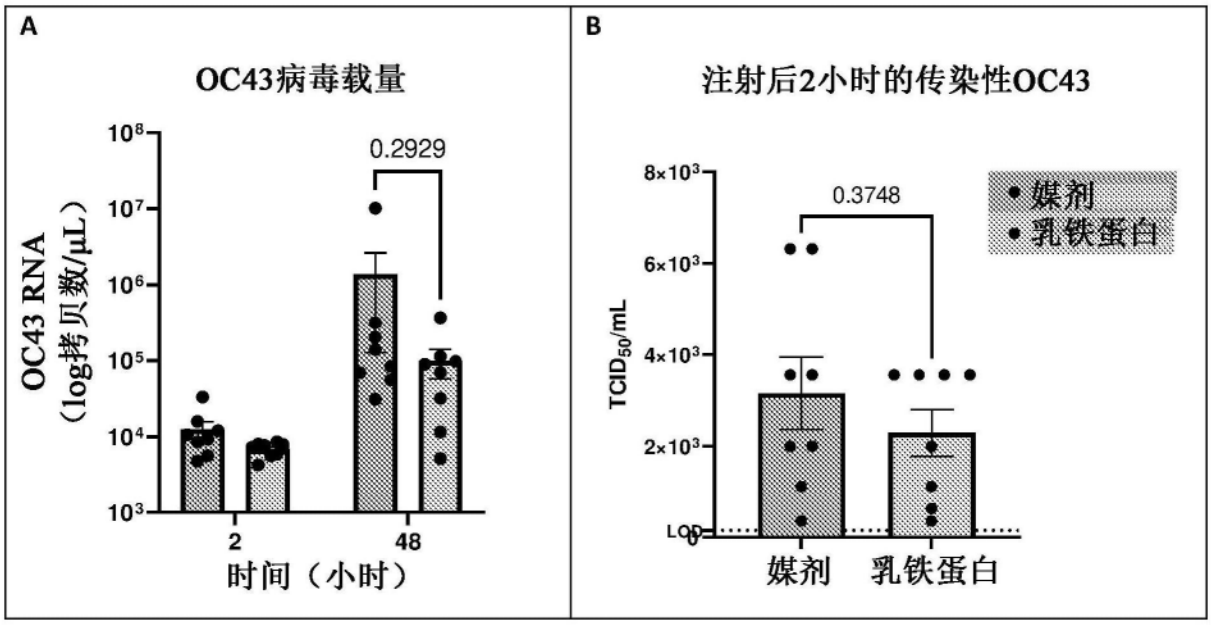
A
OC43病毒载量
OC43 RNA
（log拷贝数/μL）
0.2929
时间（小时）
B
注射后2小时的传染性OC43
TCID50/mL
0.3748
媒剂
乳铁蛋白
LOD
媒剂
乳铁蛋白

图8

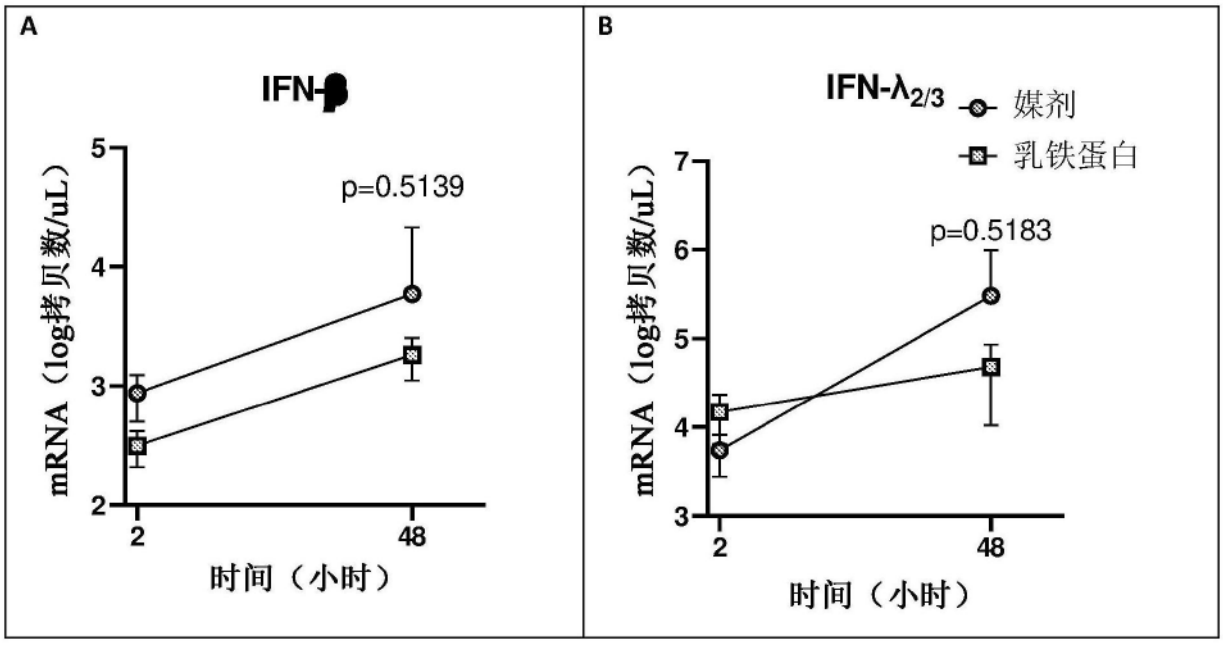
A
IFN-β
mRNA（log拷贝数/uL）
p=0.5139
时间（小时）
B
IFN-λ2/3
媒剂
乳铁蛋白
mRNA（log拷贝数/uL）
p=0.5183
时间（小时）

图9

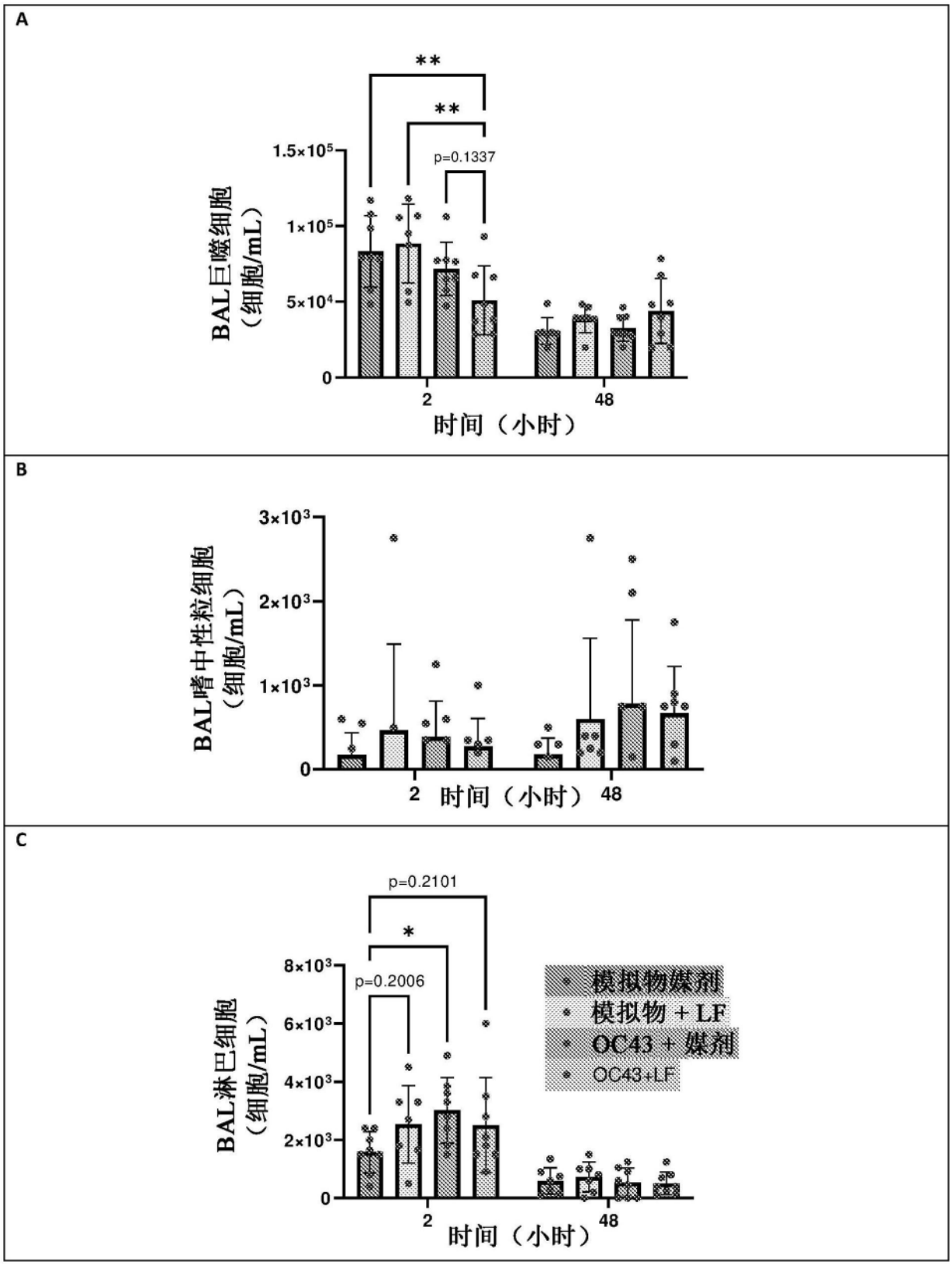
A
**
**
p=0.1337
1.5×10⁵
1×10⁵
5×10⁴
0
BAL巨噬细胞
（细胞/mL）
2
48
时间（小时）
B
3×10³
2×10³
1×10³
0
BAL嗜中性粒细胞
（细胞/mL）
2
时间（小时）
48
C
p=0.2101
*
p=0.2006
8×10³
6×10³
4×10³
2×10³
0
BAL淋巴细胞
（细胞/mL）
模拟物媒剂
模拟物 + LF
OC43 + 媒剂
OC43+LF
2
48
时间（小时）

图10