

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 35/20

A61K 38/08 A61P 25/28



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97198535.9

[45] 授权公告日 2003 年 12 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1131712C

[22] 申请日 1997. 10. 3 [21] 申请号 97198535.9

[30] 优先权

[32] 1996. 10. 3 [33] PL [31] P. 316416

[86] 国际申请 PCT/GB97/02721 1997. 10. 3

[87] 国际公布 WO98/14473 英 1998. 4. 9

[85] 进入国家阶段日期 1999. 4. 5

[71] 专利权人 波兰科学院路德维克·希尔斯费尔
德免疫学和实验治疗学研究所

地址 波兰弗罗茨瓦夫

共同专利权人 乔治亚季斯生物技术有限公司

[72] 发明人 马林·雅努什 约瑟夫·利索夫斯基
安娜·杜博夫斯卡 - 因格洛特

审查员 孙俊荣

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 于 辉

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称 初乳肽及其用途

[57] 摘要

本发明涉及初乳肽的制药应用。 具体而言，
本发明涉及初乳肽及其有效片段九肽制备用于治疗
慢性中枢神经系统和免疫系统疾病的药物的应用。

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

1. 初乳肽在制备用于治疗慢性中枢神经系统疾病的药物中的应用。
2. 权利要求 1 的应用，其中所述药物是用于治疗神经病和/或精神病的药物。
3. 权利要求 1 的应用，其中所述药物是用于治疗痴呆和/或神经变性疾病的药物。
4. 权利要求 1 的应用，其中所述药物是用于治疗老年性痴呆的药物。
5. 权利要求 1 的应用，其中所述药物是用于治疗运动神经元疾病的药物。
6. 权利要求 1 的应用，其中所述药物是用于治疗精神病和/或神经官能症的药物。
7. 权利要求 1 的应用，其中所述药物是用于防止或抑制老年性痴呆发生的人用预防性药物。
8. 权利要求 1~7 之任一项的应用，其中所述初乳肽为非绵羊初乳肽。
9. 权利要求 1~7 之任一项的应用，其中所述药物为与生理学可接受的载体组合的口服剂型。
10. 权利要求 1~7 之任一项的应用，其中所述初乳肽为分离的形式。
11. 组成和氨基酸序列是 Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro 的九肽在制备用于治疗慢性中枢神经系统疾病的药物中的应用。
12. 权利要求 11 的应用，其中所述药物是用于治疗老年性痴呆的药物。

初乳肽及其用途

本发明涉及初乳肽(colostrinin)及其作为药物的用途。

初乳是由雌性哺乳动物乳房在分娩后最初数天内产出的黄色粘稠液体。分娩4至5天后它将被成熟母乳替代。与成熟母乳相比，初乳含糖较低。然而，初乳中却含有丰富的脂类、蛋白质、无机盐、维生素和免疫球蛋白。并且它还含有多种飘浮细胞，例如粒细胞、基质细胞、嗜中性白细胞、单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞，以及生长因子、激素和细胞因子。

已从哺乳动物初乳中分离并定性了多种因子。1974年，Janusz等人(FEBS Lett.,49,276-279)从绵羊初乳中分离出一种高脯氨酸含量的多肽(PRP)。该参考文献的内容在此引入作为参考。业已发现，除绵羊以外的哺乳动物都以PRP的类似物作为初乳的组分。PRP也因此称作初乳肽，并且被暂定成一类新的细胞因子。

Janusz等人在“高脯氨酸含量的多肽(PRP)——绵羊初乳中的一种免疫调制肽”(Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1993, 41, 275-279)中指出，绵羊初乳的PRP对小鼠具有亲免活性。然而，该文献却没有报导PRP对其他动物有任何治疗作用。事实上应承认，从一种对小鼠有治疗作用的组合物并不能预见到它也对其他任何动物有治疗作用。

本申请人发现，初乳肽具有许多前所未知的治疗功效。具体而言，我们发现初乳肽可显现出亲免作用和精神病治疗作用。

作为本发明的一个方面，本申请人提供了用作药物的初乳肽。所述初乳肽可作为药物用于非啮齿动物；我们还发现，所述初乳肽特别适合作为治疗人类的药物。

另一方面,本发明提供了初乳肽在制备治疗中枢神经系统疾病或免疫系统疾病用药物中的应用。

在本发明的一个优选实施例中,所述初乳肽被用来治疗中枢神经系统的疾病,尤其是中枢神经系统的慢性疾病。可以用初乳肽治疗的中枢神经系统病包括神经病和精神病。

适合用初乳肽治疗的神经病的例子包括:痴呆,诱发痴呆的疾病,例如神经变性疾病。神经变性疾病包括,例如老年性痴呆和运动神经元病;帕金森氏病是一个可用初乳肽治疗的运动神经元疾病的实例。现已发现,初乳肽在治疗称作早老性痴呆的神经变性疾病中特别有效。

适合用初乳肽治疗的精神病的例子包括:精神病和神经官能症。例如,可用初乳肽治疗情绪紊乱,特别是治疗处于抑郁状态的精神病患者的情绪紊乱—已发现初乳肽帮助患者改善感觉安宁和心境安定。初乳肽还可以在药物癖嗜者、解毒期以后以及兴奋剂依赖性人群中用作辅助性戒除治疗剂。

在本发明的另一个优选实施例中,所述初乳肽被用于治疗免疫系统的疾病,尤其是慢性免疫系统疾病。因此我们发现,可在需要免疫调节的疾病治疗中采用所述初乳肽。特别是,初乳肽适合治疗包括人类在内的非啮齿动物的上述疾病。初乳肽在治疗许多基于免疫和感染的疾病中十分有效。例如,用初乳肽治疗与细菌病原和病毒病原有关的慢性疾病,还可以治疗继发的,例如肿瘤化疗和放疗继发的获得性免疫缺损。本发明特别适合治疗需要非特异性免疫刺激和免疫校正的细菌性和病毒性慢性传染病。

通常,慢性病是一种持续时间较长的疾病,常常至少一周,更常见至少一个月,并且经常是至少3个月或至少6个月。

本发明的特征之一是用初乳肽改善新生儿免疫系统的发育。本发明的另一特征在于用初乳肽校正儿童的免疫缺乏。所述初乳肽的这些

用途特别适合未曾获得初乳的婴儿或儿童。而这种情况发生在，例如，出生后没有母乳喂养的婴儿和儿童中；在给这些婴儿和儿童的人工食物中不含有初乳肽。

本发明的另一方面中，我们提供了初乳肽作为食品强化剂的用途。所述初乳肽特别适合用作婴儿和幼童的食品强化剂，以校正其免疫系统发育中的缺乏。正如上文所述，这种缺乏发生在出生后未母乳喂养的婴儿和儿童中。所述初乳肽也可以作为接受化疗或患有恶病质或因慢性病而体重减轻的成人的食品强化剂。作为本发明的一个方面，我们提供了一种含有与生理可接受载体合用的口服可摄取初乳肽结合物的食品强化剂。该食品强化剂是液体或固体的形式；也适于将其以片剂形式供给。

本发明中可预防性给予所述初乳肽，以便有助于预防中枢神经系统疾病和免疫系统疾病的发展。

本发明上述初乳肽可以是绵羊初乳肽，或者是非绵羊产的初乳肽。非绵羊产的初乳肽可以从，例如人、母牛、马、山羊、猪、牦牛、美洲驼和驴的初乳中获得。初乳肽通常存在于上述动物分娩后1至4天后的初乳中。

此处的术语“初乳肽”是指一种从哺乳动物初乳中获得的天然形式的多肽。有时初乳肽也称作“colostrinine”，并且具有下列性质：

- (i)分子量在 16,000 至 26,000 道尔顿之间；
- (ii)它是亚单位的二聚体或三聚体，各亚单位的分子量是 5,000 至 10,000 道尔顿，优选 6,000 道尔顿；
- (iii)它含有脯氨酸，并且脯氨酸的含量高于其他任何一种氨基酸的量。

我们发现，所述初乳肽以及组成它的亚单位都是非极性的。

在 SDS(十二烷基硫酸钠)存在下采用电泳法可对所述初乳肽的分子量进行测定；这种技术也可显示出存在的二聚体和三聚体。还原

或非还原条件的电泳皆表明，亚单位之间的键是非共价键。通过常规的氨基酸分析技术可以确定存在的脯氨酸。非极性色谱可能够证实初乳肽的非极性。

本发明所用初乳肽可以是绵羊初乳肽或非绵羊初乳肽。绵羊初乳肽的分子量约为 18,000 道尔顿，并且由三个非共价键合亚单位组成，每个亚单位的分子量分别是约 6,000 道尔顿，其中含有 22% 重量的脯氨酸。每个亚单位的氨基酸组成由数量如下的残基构成：赖氨酸—2、组氨酸—1、精氨酸—0、天门冬氨酸—2、苏氨酸—4、丝氨酸—3、谷氨酸—6、脯氨酸—11、甘氨酸—2、丙氨酸—0、缬氨酸—5、蛋氨酸—2、异亮氨酸—2、亮氨酸—6、酪氨酸—1、苯丙氨酸—3 和半胱氨酸—0。

如上所述，天然形式的初乳肽来源于哺乳动物的初乳。通过除去初乳中的脂类和多数蛋白质可以获取哺乳动物初乳的初乳肽。广义上，初乳肽是从例如大型畜牧动物的初乳中通过柱色谱技术和其他生物技术获得，或者通过基因工程技术来制得。

具体而言，可以通过下列步骤从哺乳动物初乳中分离出初乳肽：

(i) 脱脂，例如通过离心法；

(ii) 去除蛋白质(例如酪蛋白)，例如通过降低 pH；

(iii) 分离出与免疫球蛋白键合的初乳肽，例如通过：

(a) 对脱脂和除蛋白后的乳清进行离子交换色谱；和

(b) 用磷酸盐缓冲盐水洗脱，并收集含有与免疫球蛋白，例如绵羊的 IgG2 键合的初乳肽的馏分；

(iv) 从免疫球蛋白上分离初乳肽，例如采用筛分色谱法；和

(v) 提纯初乳肽，优选通过：

(a) 将分子量低于 30,000 道尔顿的部分进行脱盐；和

(b) 为免疫球蛋白引入抗体，由此除去此类蛋白质，得到终产物。

尽管上述定义是指天然的哺乳动物初乳肽，但此处的术语“初乳肽”也包括其生物活性基本相同的类似物和片断，以及通过 DNA 重组技术生产的哺乳动物初乳肽、其类似物或片断。此处的初乳肽还包括通过多肽合成技术制备的、组成与天然初乳肽基本相同的生物活性多肽。

本发明另一方面提供了一种用初乳肽治疗中枢神经系统疾病或免疫系统疾病的方法。上文已对适合用本发明所述方法治疗的疾病作了描述。在本发明一个优选实施例中，患者接受初乳肽的第一阶段给药，该第一阶段中每天给予约 1 至 2 个治疗单位，随后是没有初乳肽给药的第二阶段。所述第一阶段优选是约 2 至 4 周，更优选约 3 周；并且，第二阶段优选约 2 至 5 周，更优选约 4 周。优选至少重复一次这种治疗循环，并且更优选重复不止一次。

本发明方法中所用的治疗单位优选 25 至 1,000 微克，更优选 50 至 100 微克的初乳肽。

可以将初乳肽制成适当的形式来给药。例如，制成口服、直肠或非肠道给药的形式。具体而言，可将初乳肽配制成注射剂给药，或者优选配制成适合通过口腔/鼻咽腔粘膜、食道或其他粘膜表面吸收的形式给药。所述口服制剂可以是适于吞咽的形式；或优选溶于唾液的形式，这种制剂是在口腔/鼻咽腔粘膜内吸收。所述口服制剂也可以是口服给药的片剂、糖锭(即适合留在口腔内含服的甜片)、可咀嚼成口胶的粘性凝胶。还可将所述初乳肽配制成胶用粘性硬膏或贴剂。所述初乳肽还可以是涂敷在生殖泌尿器官粘膜上的制剂。

当然，尽管能够以完整初乳的形式给予所述初乳肽，但这并不可取，因为完整的初乳具有不适的味道并且难以储存。

本发明所用初乳肽可以来源于任何哺乳动物，例如取自人类或动物，例如母牛、马、山羊、猪、牦牛、绵羊、美洲驼或驴、骆驼等。

对绵羊初乳肽和人初乳肽进行试验。绵羊的初乳肽以

Colostrinin™的商标出售。

在动物试验中发现，初乳肽的特征是其体内外亲免作用，这种亲免作用是基于对胸腺细胞向活性 T 细胞分化和成熟的发展的调节性质，基于对免疫反应的刺激或抑制作用，并且基于对胸腺细胞上多种表面标记的表达的诱导作用。在对小鼠腹膜内给药中，初乳肽可抑制 NZB 系小鼠溶血性贫血的发展，也抑制小鼠肉瘤 180 的生长，并且对于受到 γ 射线照射的小鼠，初乳肽可以保护该动物对抗放射病。小鼠的毒理学试验表明，口服和非肠道给药后毒性极低，这是由于 LD50 高于 1.25g/kg 体重。初乳肽还表现出对人和试验动物中免疫活性细胞的生长、成熟和分化的刺激能力。在人外周血液的淋巴细胞培养物(包括从脐带血中分离出的淋巴细胞的培养物)中，初乳肽的特征在于：它可刺激细胞因子，特别是 γ -干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素类(例如 IL-6 和 IL-10)以及多种生长因子的产生。通过已知方法可以定量测定所生产的细胞因子。

在自然状况下，分娩后 1 至 4 天内，人的初乳和所有哺乳动物，尤其是大型畜牧动物(例如母牛、马、山羊、猪、牦牛、绵羊、美洲驼或驴、骆驼等)的初乳中都存在具有该生化活性的绵羊初乳肽类似物。初乳肽在新生动物吸吮和吞咽母体初乳的过程中进入到体内。由于初乳肽分子量较低，初乳肽可以在口腔/鼻咽腔粘膜上通过细胞受体起作用，甚至进行简单扩散(ordinary diffusion)。研究表明，由于消化道上段的粘膜和上皮含有某些免疫调制剂的受体，所述初乳肽可以以片剂和舌下含片、吞咽用片剂和胶囊、粘性凝胶形式以及与树胶固定在一起的粘性硬膏形式来给药。也可以将初乳肽涂敷在生殖泌尿器官的粘膜上。

以弄清初乳肽所诱导的生化活性为目的的科学试验还揭示了，来源于产后 1 至 7 天妇女的人类初乳具有类似生物活性。人体原料中初乳肽的分离方法类似于从畜牧动物的初乳，尤其是绵羊初乳中获取初

乳肽的方法。由产后 1 至 7 天妇女乳腺分泌的初乳含有多肽类的初乳肽，它的量取决于泌乳作用，并且在 2 至 3 天内最佳，此时 1 升初乳中可检测出 300mg 初乳肽。这样的人初乳肽产量可见于绵羊初乳中。现已证明，人初乳肽具有许多与例如绵羊产类似物相似的生物性质。来源于人初乳的初乳肽可刺激初乳所含淋巴细胞以及脐血淋巴细胞分泌细胞因子，所述细胞因子主要包括干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 TNF- α 、白介素类(IL-10 和 IL-6)或其它细胞因子。这些细胞因子参与体液和细胞的免疫反应。

采用公开在波兰专利(PL 170592B1)和欧洲专利 EP-B-0609225 中的性能试验免疫学方法，可对人和动物来源的初乳肽的生物活性进行测定。

在对人类志愿者的研究中发现，用至少含有 25 μ g 初乳肽的含片以每天至少一片的剂量给药约 3 周后，没有观察到任何副作用；另一方面，却形成一种对诱导 IFN- γ 以及部分肿瘤坏死因子 TNF- α 的低反应状态。在停止初乳肽给药后，这种低反应性状态将恢复正常。这些反应的结果是 Th1 和 Th2 淋巴细胞和辅助细胞产生细胞因子。

临床试验还表明，初乳肽具有免疫调节作用以及对中枢神经系统的作用，它可以预防性和治疗性地应用于下列疾病，例如，用于预防老年性痴呆的出现和进行，并缓解这种疾病；也可应用于一些其它起因的老年性痴呆，并可治疗与免疫和感染有关的慢性疾病。

可用具有下列组成和氨基酸序列的、缩写为 NP 的九肽取代初乳肽：Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro。通过糜蛋白酶的消化作用和柱色谱的分离，可从初乳肽中获取 NP，或者通过化学合成法来制得 NP。NP 是初乳肽有效片段的一个例子。现已发现，NP 具有与初乳肽相似的生物作用，特别是，它适合治疗上述慢性

免疫疾病和中枢神经系统疾病(尤其是早老性痴呆)。可以用 NP 治疗上述任何一种疾病。也可以将它应用于食品强化剂中。可以按照与初乳肽相同的方法来配制它。NP 适合治疗哺乳动物,尤其是人类。

为了更全面地理解本发明,可以参考下列仅作说明作用的实施例。

实施例 1

分子量 18,000 道尔顿的绵羊初乳肽是由三个非共价连接的亚单位构成,亚单位的分子量为 6000 道尔顿,各亚单位具有下列氨基酸组成:

氨基酸	每个亚单位中的残基数量
赖氨酸	2
组氨酸	1
精氨酸	0
天门冬氨酸	2
苏氨酸	4
丝氨酸	3
谷氨酸	6
脯氨酸	11
甘氨酸	2
丙氨酸	0
缬氨酸	5
蛋氨酸	2
异亮氨酸	6
酪氨酸	1
苯丙氨酸	3
半胱氨酸	0

所用初乳肽来源于在绵羊分娩至多 24 小时后泌乳开始后的绵羊初乳。将原料在 35000×g 离心，以便除去脂肪及部分酪蛋白。将所得部分的 1g 置于 DEAE-纤维素柱中，从而分离出与免疫球蛋白 IgG2 络合的多肽初乳肽，利用葡聚糖凝胶 G-100 柱色谱法以及用葡聚糖凝胶 G-75 再次进行的色谱，可从柱中洗脱出与 IgG2 分离的初乳肽。随后，将一部分多肽通过结合有绵羊 IgG2 抗体的琼脂糖凝胶柱，以除去痕量的 IgG2 杂质。所得制备物通过葡聚糖凝胶 G-25 的方式脱盐并冷冻干燥，此后将其储存在 +4℃ 或 -20℃ 下。

所得初乳肽的商标名被命名为 Colostrinin™。

在有 SDS 存在的聚丙烯酰胺凝胶电泳中，在与分子量 5 800 道尔顿相对应处可以观察到一个强带，同时还出现两个弱带，它们分别与分子量 12 400 道尔顿和 18 200 道尔顿相对应。

实施例 II

从实施例 1 所述初乳肽中可以得到九肽 NP，NP 的组成和氨基酸序列为 Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro。

通过 10 个活性单位的蛋白水解酶糜蛋白酶在 30℃ 的温度下对 50mg 初乳肽进行 20 小时的消化。对消化产物的分离应通过至少一个循环的葡聚糖凝胶 G-10 柱色谱。冻干所得制备物，随后储存在 +4℃ 或 -20℃ 的温度下。通过测定 N-末端氨基酸对九肽进行分离。

实施例 III

吸吮片形式的剂量单位具有下列组成：

活性成分：	实施例 1 所得的 Colostrinin® 多肽	0.0001g
稳定剂：	白蛋白，无杂质，主要 I.P.S	0.000135g
润滑剂/粘合剂：	硬脂酸镁	0.003g

载体： 甘露糖醇 0.1g(0.1497g)

将上述组分悬浮在 0.0001M NaCl 中。吸吮片主要用于治疗早期和晚期痴呆症(包括早老性痴呆)以及不同时期的老年性痴呆；还可以治疗慢性细菌性及病毒性感染、所需的非特异性免疫刺激和免疫校正以及由多种试剂诱发的获得性免疫缺乏。此外，也可用它治疗情绪紊乱，特别是治疗不同抑郁状态的精神病患者，从而改善他们的全身安全感和心境稳定性；初乳肽还可以在药物癖嗜者、解毒期以后以及兴奋剂依赖性人群中用作辅助性戒除治疗剂。Colostrinin™ 也可以作为人工食品来校正新生儿和幼童的营养缺乏。

实施例 IV

制备具有下列组成的粘膜涂敷用凝胶形式：

活性成分： 实施例 1 所得 Colostrinin™ 多肽

稳定剂： 白蛋白

胶凝载体： Orabase-Plain® ， 它含有果胶、胶凝、羧甲基纤维素钠和碳氢化合物胶

每 1ml 凝胶载体使用 0.0003g 多肽 Colostrinin™ 和 0.0015g 白蛋白。如此配制的剂量单位主要用于口腔和上呼吸道细菌性及病毒性感染的循环治疗。

实施例 V

肌肉内、皮下或静脉内注射形式的制剂。

活性成分： 实施例 1 所得 Colostrinin™ 多肽

稳定剂： 人白蛋白，无杂质

胶凝载体： 灭菌的无热原水

每 1ml 安瓿中使用 0.0003g Colostrinin™ 多肽、0.0015g 白蛋

白、作为抗菌剂的 0.001% 硫柳汞(即乙汞硫代水杨酸钠盐)。这种剂量单位主要用于细菌性和病毒性感染的循环治疗。

实施例 VI

肌肉内、皮下或静脉内注射形式的制剂。

活性成分： 实施例 II 所得 NP

稳定剂： 白蛋白，无杂质

胶凝载体： 灭菌的无热原水

每 1ml 安瓿中使用 0.0003gNP、0.0015g 白蛋白、作为抗菌剂的 0.001% 硫柳汞(即乙汞硫代水杨酸钠盐)。这种剂量单位主要用于细菌性和病毒性感染的循环治疗。

实施例 VII

按照下列方法从接受实施例 III 所述药物形式循环治疗的健康和患病志愿者中采集血液，分析血中多肽 Colostrinin™ 对体外细胞因子的诱导作用。

将不含防腐剂但每 1ml 含有 10 个单位肝素的全血以 1:10 的配比稀释在 RPMI1640 培养基中。在 37°C 和含有 5% 二氧化碳的条件下于相同培养基中孵育 20 小时，孵育所用培养基不含有诱导物(阴性对照)，或者含有 1 至 100 μ g/ml 多肽 Colostrinin™，或含有 2 μ g/ml 血的植物凝集素(PHA)和 2 μ g/ml 血的脂多糖(LPS)。含有 PHA 和 LPS 的混合物的样品作为阳性对照物，原因在于它们可以刺激最高量的细胞因子。表 1 和 2 中列出了试验结果。结果表明，Colostrinin™ 在 1 至 100 μ g/ml 的浓度下以剂量依赖方式刺激细胞因子的产生。与阴性对照物(不含诱导物)比较，这些结果有统计学意义($p < 0.0001$)。早老性痴呆患者的 IFN 生产能力降低，并且 TNF 的也较小程度地降低。

表 1

绵羊 Colostrinin™(系列 A 1993)在健康志愿者或老年性痴呆患者的全血淋巴细胞培养物中的细胞因子诱导作用

供血者	诱导物	剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞因子(单位/ $\text{ml}\pm\text{SD}$)	
			IFN	TNF
	Colostrinin™	100	344 \pm 254	670 \pm 560
健康志愿者	Colostrinin™	10	50 \pm 59	316 \pm 371
	PHA+LPS	2+2	171 \pm 162	521 \pm 447
	空白对照	-	9 \pm 21	19 \pm 26
	Colostrinin™	100	21 \pm 14	249 \pm 187
老年性痴呆	Colostrinin™	10	15 \pm 9	182 \pm 158
患者	PHA+LPS	2+2	117 \pm 76	397 \pm 252
	空白对照	-	2 \pm 3	18 \pm 26

健康志愿者组(22人)的年龄各不相同(年龄在20至64岁间)。老年性患者组(50人)年龄也不相同(年龄 63 ± 7.5 岁)。尽管不含(无)诱导物的空白对照组之间的标准偏差(\pm SD)差异性较大,但 Colostrinin™有统计学意义($p<0.001$)。

表 2

绵羊 Colostrinin™(A 系列 1993)在用健康志愿者和多种疾病患者全血
进行的试验中对干扰素(IFN)生产的刺激例

供血者 (诊断)	诱导物	剂量($\mu\text{g/ml}$)	IFN 的效价, 其测定通过	
			抗病毒 生物试验 (单位/ml)	ELISA IFN- γ pg/ml
Z.B.	Colostrinin™	100	300	2920
健康	Colostrinin™	10	300	3402
年轻士兵	Colostrinin™	1	100	1413
	PHA+LPS	2+2	200	3308
	空白对照	-	<3	24
C.D.	Colostrinin™	100	600	3941
健康	Colostrinin™	10	200	3778
年轻士兵	Colostrinin™	1	100	2690
	PHA+LPS	2+2	600	4631
	空白对照	-	5	55
M.J.	Colostrinin™	100	40	400
早老性	Colostrinin™	10	20	427
痴呆患者	PHA+LPS	2+2	300	3757
	空白对照	-	3	46
S.E.	Colostrinin™	100	6	29
精神	Colostrinin™	10	6	29
分裂症	PHA+LPS	2+2	30	243
	空白对照	-	3	19
F.W.	Colostrinin™	100	70	523
乳腺癌	Colostrinin™	10	50	307
	PHA+LPS	2+2	600	2833
	空白对照	-	40	150

附注：对存在的 IFN 进行的生物试验可以测出不同类型干扰素的含量，而 ELISA 试验仅检测免疫活性 IFN- γ 的水平。

实施例 VIII

从 Wroclaw 的地区专业医院的妇产科获得脐带血。在产后 4 至 6 小时获取的脐带血的淋巴细胞中，ColostrininTM 通过下列途径体外有效诱导细胞因子。

用每 100ml 含有 5.7g Ficoll 400 和 9.0g 泛影酸钠的 Ficoll-Paque[®] 梯度物分离淋巴细胞。以每 1ml 培养基 2×10^6 个淋巴细胞的密度将分离的淋巴细胞悬浮在 RPMI-1640 培养基中。向该淋巴细胞悬浮液中加入浓度为 1 至 20 μ g/ml 的 ColostrininTM 或 10 μ g/ml 植物凝集素。将该培养物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 小时。随后通过生物学方法对培养液中细胞因子的水平进行检测。表 3 中给出了一个典型实例。1 至 100 μ g/ml 浓度的 ColostrininTM 所具有的细胞因子(IFN 和 TNF)刺激作用与传统 IFN- γ 诱导物—植物凝集素的相类似。

表 3

ColostrininTM(A 系列 1996)在脐带血淋巴细胞培养物(CBL)中的细胞因子诱导作用

N	诱导物	剂量(μ g/ml)	细胞因子(单位/ml \pm SD)	
			IFN	TFN
32	Colostrinin TM	20	89 \pm 79	59 \pm 41
39	Colostrinin TM	10	78 \pm 80	37 \pm 35
17	Colostrinin TM	1	38 \pm 66	16 \pm 17
50	PHA	10	75 \pm 66	83 \pm 69
50	空白对照	—	3 \pm 3	3 \pm 4

N-被检测 CBL 样品数

学生 t-检验中, Colostrinin™ 的显著性差异几率 (p)

—IFN 和 TNF 中所用的“无”是 $p < 0.0001$ 。

由于脐带血中富含未成熟干细胞,而这种细胞能够繁殖成造血细胞和多种免疫活性细胞,所以 Colostrinin™ 极大地加快了干细胞的成熟。结果还表明, Colostrinin™ 可以有效治疗不同类型的免疫缺陷,也可以在例如外伤、感染、化疗和放疗后用于刺激造血系统。在生物医学研究中,具有类似作用的天然产物很罕见。

实施例 IX

对一组患有早期和中期老年性痴呆症的志愿者进行中枢神经系统疾病疗法的试验。所用剂量单位以吸吮片形式在两餐之间给药,该剂量单位含有 0.00015 实施例 I 和 III 所述的 Colostrinin™。首先,每天使用一片并持续 3 周,随后中止治疗达 2 至 4 周,此后再次进行治疗并且每天服用 2 片且持续 3 周。发现 Colostrinin™ 疗法可诱导一种低反应性或耐受的状态。这表明没有合成 IFN 及肿瘤坏死因子 TNF- α 的能力。可以用这种现象对活性剂的功效进行定量测定。

在中止上述药物的给药后,这种耐受状态也发生自发性逆转。Colostrinin™ 的这种暂时性耐受状态归因于由 Th1 和 Th2 淋巴细胞、辅助细胞所产生的细胞因子,所述辅助细胞例如是单核细胞、巨噬细胞、树状细胞、内皮细胞及其产物。其结果是,可在老年性痴呆患者中观察到人际关系的改善和心境高涨。

附图 1 图示了女性老年性痴呆患者(J.M)中的对于 γ -干扰素(IFN- γ)诱导作用的低反应性状态部分耐受的出現以及自然消失,这些患者每隔一天服用 100 μ g 的 Colostrinin™ 片剂并持续 3 周。随后将治疗中止 3 周(在暂定期间,对诱导物的耐受性恢复正常)。每周采集血样以用于检测 Colostrinin™ 和空白对照(PHA-10 μ g/ml)的 IFN- γ 刺激作用。上文部分已描述了进行细胞因子诱导试验及其定量测定的

方法。

被诱导 IFN- γ 水平的检测结果表明，低反应性早在服用 Colostrinin™(每 2 天 100 μ g/片)的第一周即出现并在治疗的第三周达到最高值。在中止治疗的 3 周内(即治疗开始后第 6 周内)，对 IFN- γ 诱导作用的耐受状态发生自发性逆转。并且，该附图表示，“特别是”绵羊 Colostrinin™(OvCal)，这种低反应性在观察的第 6 周仍能够维持，而 PHA 低反应性却完全消失。

实施例 X

对一组患有早期老年性痴呆症的志愿者进行中枢神经系统疾病疗法的试验。所用剂量单位以吸吮片形式在两餐之间给药，该剂量单位含有 0.00015 实施例 II 所述 NP。首先，每天使用一片并持续 3 周，随后中止治疗达 3 周，此后再次进行治疗并且每天服用 2 片且持续 3 周。发现 NP 疗法可诱导一种低反应性或耐受的状态。这表明没有合成 IFN 及肿瘤坏死因子 TNF- α 的能力。可以用这种现象对活性剂的功效进行定量测定。

在中止上述药物的给药后，这种耐受状态发生自发性逆转。NP 的这种暂时性耐受状态归因于由 Th1 和 Th2 淋巴细胞、辅助细胞所产生的细胞因子，所述助细胞例如是单核细胞、巨噬细胞、树状细胞、内皮细胞及其产物。其结果是，可在老年性痴呆患者中观察到人际关系的改善和心境高涨。

