

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 16/42
C12N 5/20
A61K 39/395



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98811488.7

[45] 授权公告日 2005 年 7 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1210309C

[22] 申请日 1998. 10. 21 [21] 申请号 98811488. 7
[30] 优先权
[32] 1997. 10. 21 [33] CU [31] 119/1997
[86] 国际申请 PCT/CU1998/000007 1998. 10. 21
[87] 国际公布 WO1999/020656 西 1999. 4. 29
[85] 进入国家阶段日期 2000. 5. 24
[71] 专利权人 分子免疫中心
地址 古巴哈瓦那
[72] 发明人 A · M · 瓦斯奎兹罗派兹
R · 皮莱兹罗德里桂兹
E · 伊格雷西亚斯希拉
A · 皮莱兹冈萨雷兹
G · 邦比诺罗派兹
I · 比奥索雷尔戴尔加多
审查员 谢 蓉

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 陈文平

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 8 页

[54] 发明名称 抗独特型单克隆抗体,其在恶性肿瘤
主动免疫治疗中的应用以及含有它
们的组合物

[57] 摘要
一种特异抗神经节苷脂的 N - 乙醇酰残基的抗
独特型单克隆抗体,尤其是抗肿瘤细胞表达的神经
节苷脂的 N - 乙醇酰残基。 该单克隆抗体作为免疫
调节剂对肿瘤治疗有用。 具体地, 本发明的抗独
特型单克隆抗体可在异种模型中诱导优势的抗独特
型应答。 而且, 该抗独特型单克隆抗体在动物中
发挥抗恶性肿瘤的保护性效应。

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

1. 对神经节苷脂 N-乙醇酰部分的鼠科抗体 P3 特异的 γ 型抗独特型单克隆抗体, 所述 P3 抗体是以保藏号 ECACC 94113026 保藏的杂交瘤产生的, 其中所述 γ 型抗独特型单克隆抗体是由杂交细胞系 ECACC 97112901 产生的 γ 型抗独特型单克隆抗体。
2. 产生权利要求 1 的抗独特型单克隆抗体的杂交细胞系 ECACC 97112901。
3. 含有有效量的权利要求 1 的单克隆抗体和稀释剂、佐剂或载体的药物组合物。
4. 权利要求 1 的单克隆抗体在制备用于治疗肿瘤的药物中的应用。

抗独特型单克隆抗体，其在恶性肿瘤主动免疫治疗中的应用以及含有它们的组合物

技术领域

广义上，本发明涉及抗独特型单克隆抗体及其作为免疫调节剂的用途。更具体地，本发明涉及抗与 N-乙醇酰神经节苷脂及癌细胞表达的抗原起反应的鼠科单克隆抗体的鼠科单克隆抗体；及其对肿瘤生长的抑制效果。

背景

治疗癌症的策略之一是采用主动免疫治疗，即一种以激活宿主免疫系统抗肿瘤的天然潜能为目标的治疗方式。

自从 Niels Jerne 在 1974 (Jerne, N. K. 1974. 免疫学年报 (Ann Immunol) 125C, 373-389) 提出独特型网络理论后，在有效抗癌治疗的研究中打开了崭新的可能性。Jerne 的理论第一次提出免疫系统是一个抗体的网络，抗体能通过其可变区或独特型 (Id) 与其它抗体以及与大量天然表位相互作用。这套复杂的独特型-抗独特型相互作用起到调节对抗原的免疫应答的作用。那些对初始抗原应答的抗体称为 Ab1，其自身作为抗原可引发产生第二套称为抗独特型抗体或 Ab2 的抗体，而该抗体又可被称为抗抗独特型 (Ab1' 或 Ab3) 的其它抗体调节。Jerne 的最初理论不断地被修正，而且已经报道 Ab2 与带有 Ab1 的淋巴细胞相互作用并不必然导致免疫应答的抑制，而可能会刺激该应答。此外，Jerne 的理论局限于 B 淋巴细胞和抗体，而现在已清楚 T 细胞通过 T 细胞受体独特型在免疫调节中起重要作用 (Teitelbaum, D. 等, 1984 免疫学杂志 (J. Immunol.) 132, 1282-1285; Zanetti, M. 等 (1986) 免疫学杂志 137, 3140-3146; Powell, J. 等 (1988) 140, 3266-3272; Baskin, J.G. 等 (1990) 免疫学杂志 145, 202-208; Furuyama, A. 等 (1992) 抗癌研究 (Anticancer Res) 12, 27-32; Raychaudhuri, S. 等. 免疫学杂志 131, 271-278 ; Raychaudhuri

等 (1987) 免疫学杂志 139, 3902-3910; Durrant 等 (1994) 癌症研究 (Cancer Res.) 54, 4837-4840)。

免疫学上定义的独特型能与一种以上识别给定独特型的独特型决定簇或独特位的抗独特型起反应。因此, 由于一个特定的 Ab1 表达多个独特位, 当用该 Ab1 免疫同系动物时会获得一个抗独特型抗体的异质性群体。

抗独特型抗体分类的焦点是其结合于抗原结合位点内还是该独特型的某一其它区域。如果 Ab2 与 Ab1 的结合可被相关抗原抑制而且该 Ab2 能够诱导该 Ab1 同样特异性的抗体应答, 该 Ab2 就模拟了天然抗原, 定为 Ab2 β 类; 这类 Ab2 被称为内影象抗独特型, 可充当抗原的替代品。不被抗原抑制的抗独特型定为 Ab2 α 类, 这些 Ab2 与结构上跟抗原结合位点无关的 Ab1 独特位相互作用。1984 年 Bona 和 Köhler 提出了由于空间干扰受到抗原抑制的第三类抗独特型抗体 (Ab2 γ), 这类抗独特型与结构上跟抗原结合位点相关的独特位作用, 但不能模拟 Ab1 所识别的抗原表位 (Bona 和 Köhler (1984) 抗独特型抗体和内影象 (Anti-idiotypic antibodies and internal image)。单克隆抗独特型抗体: 受体结构和功能的探针 (Monoclonal and anti-idiotypic antibodies: Probes for receptor structure and function), Venter JC, Frasser CM, Lindstrom J (编), NY, Alan R. Liss, pp 141-149, 1984)。

根据 Jerne 的理论已发展了两种主要寻找大量抗原 (包括肿瘤相关抗原) 的疫苗的方法。第一种方法采用 Ab2 β , 以不同分子环境中的表位呈递为基础。含有该类抗独特型抗体的疫苗已能诱导抗病毒、细菌和寄生虫的保护性应答 (Kennedy 等 (1986) 232, 220-223; McNamara 等 (1985) 科学 (Science) 226, 1325-1326)。而且, Ab2 β 已用于诱导对肿瘤相关抗原的免疫应答并在动物模型和临床试验中获得阳性结果 (Raychaurhuri 等 (1986) 免疫学杂志 137, 1743-1749; Raychaurhuri 等 (1987) 免疫学杂志 139, 3902 - 3910; Bhattacharya-Chatterjee 等 (1987) 免疫学杂志 139, 1354-1360; Bhattacharya-Chatterjee 等 (1988) 免疫学杂志 141, 1398-1403; Herlyn, D. 等 (1989) 国际免疫学回顾 (Intern.

Rev. Immunol.) 4, 347-357; Chen, Z-J 等 (1990) 细胞免疫、免疫治疗和癌症 (Cell Imm. Immunother. Cancer) 351-357; Herlyn, D. 等 (1991) In Vivo 5, 615-624; Furuya 等 (1992) 抗癌研究 12, 27-32; Mittelman, A. 等 (1992) 美国科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89, 466-470; Durrant, LG. 等 (1994) 癌症研究 (Cancer Res.) 54, 4837-4840; Mittelman, A. 等 (1994) 癌症研究 54, 415-421; Schmitt, H. 等 (1994) 杂交瘤 (Hybridoma) 13, 389-396; Chakrobarty, M. 等 (1995) 免疫治疗杂志 (J. Immunother.) 18, 95-103; Chakrobarty, M. 等 (1995) 癌症研究 55, 1525-1530; Foon, K. A. 等 (1995) 临床肿瘤研究 (Clin. Cancer Res.) 1, 1285-1294; Herlyn, D. 等 (1995) 杂交瘤 14, 159-166; Sclebusch, H. 等 (1995) 杂交瘤 14, 167-174; Herlyn, D. 等 (1996) 癌症免疫和免疫治疗 (Cancer Immunol. Immunother.) 43, 65-76)。然而, 已证明 Ab2 的 β 特性并不足以预测能诱导该 Ab2 的生物学效应 (Raychaurhuri 等 (1986) 免疫学杂志 137, 1743-1749; Raychaurhuri 等 (1987) 免疫学杂志 139, 231-278); Maruyama 等 (1996) 国际癌症杂志 (Int. J. Cancer) 65, 547-553)。

第二种方法的依据是通过调节性独特位的网络操作, 该调节性独特位与抗原结合无关但包含与其它抗体或 T 细胞共有的独特位。积累的证据表明这些抗 Id 抗体也能产生免疫应答和保护性效应 (Paul, W. E. 和 Bona, C. (1982) 现代免疫学 (Immunology Today) 3, 230-234; McNamara M. K. 等 (1985) 科学 226, 1325-1326; Köhler y cols (1992) 第八届布达佩斯国际免疫学大会会刊 (Proc. 8th Inter. Cong Immunol. Budapest), 第 619 页)。

神经节苷脂是含有唾液酸的鞘糖脂, 在大多数哺乳动物细胞膜上表达。尽管这些抗原存在于正常组织中, 但在恶性细胞表面可发现更大数量的该抗原并且其表现出一种不同的结构和构象 (Hakomori, S. (1985) 癌症研究 45, 2405-2415; Miraldi, F. (1989) 第 19 届核医学研讨会 (Seminars in Nuclear Medicine XIX), 282-294; Hamilton 等 (1993) 国际癌症杂志 53, 1-81)。

尽管神经节苷脂是有用的免疫应答目标,但由于其碳水化合物性质和自身抗原情况,其免疫原性极弱(Livingston, P. 等, (1995) 第6届癌症生物学研讨会 (Seminars in Cancer Biology 6), 357-366)。

唾液酸的 N-乙醇酰基变体在大多数哺乳动物正常组织上表达;但在人的正常组织中极难检测到其存在(Watarai, S. 等 (1995) 生物化学杂志(J. Biochem.)117, 1062-1069)。另一方面,已报导这些抗原存在于结肠癌、黑素瘤、成视网膜细胞瘤和乳腺癌等中(Higachi, H 等 (1984) 日本癌症研究杂志(癌症) (Jpn J Cancer Res (Gann)) 75, 1025-1029; Higachi, H 等 (1985) 癌症研究 45, 3796-3802; Hirabayashi, I. 等 (1987) 日本癌症研究杂志(癌症) 78, 1614-1620; Higachi, H. 等 (1988) 日本癌症研究杂志(癌症) 79, 952-956; Miyake, M. 等(1990) 癌症 65, 499-505; Devine, P. L. 等 (1991) 癌症研究 51, 5826-5386; Vázquez, A. M. 等 (1995) 杂交瘤 14, 551-556; Marquina, G. 等 (1996) 癌症研究 56, 5165-5171)。

用含神经节苷脂的疫苗进行免疫导致黑素瘤病人产生抗神经节苷脂抗体,并延长了其生存(Livingston, P. 等 (1987) 美国科学院院刊 84, 2911-2915; Livingston, P. 等 (1989) 癌症研究 49, 7045-7050; Livingston, P. (1995) 免疫学综述 (Immunological Reviews) 145, 147-166)。然而,抗原的弱免疫原性使得抗独特型抗体的使用成为在该抗原模型中进行主动免疫治疗的一个具有吸引力的替代方法。鼠科抗独特型单克隆抗体(4C10)是抗识别人黑素瘤 GM3 的人 IgM 单克隆抗体(L612)的。用与钥孔血蓝蛋白(KLH)偶联的该抗独特型单克隆抗体免疫小鼠,该小鼠血清与抗原阳性黑素瘤细胞系和纯化的 GM3 发生强烈反应,这说明含有 GM3 内影象的该抗独特型单克隆抗体(Ab2 β)可作为主动特异免疫治疗黑素瘤病人的有效工具(Yamamoto, S. 等 (1990) J. Natl. Cancer. Inst. 82, 1757-1760; Irie, R. F. 美国专利 5,208,146)。对该抗独特型单克隆抗体的 VL 和 VH 进行了克隆、测序并将其表达成嵌合性鼠/人 IgG1 抗体(Hastings, A. 等 (1992) 癌症研究 52, 1681-1686)。

而且,抗人单克隆抗体 L612 产生的 α 型抗独特型单克隆抗体在免疫

诊断过程中是有用的(Irie, R. F. 美国专利 5,208,146)。

BEC-2 单克隆抗体是一种抗识别 GD3 神经节苷脂的鼠科单克隆抗体 (mAbR24) 的鼠科抗独特型单克隆抗体, 其能模拟 GD3 并且尽管正常兔组织表达 GD3, 其也能诱导抗该神经节苷脂的抗体(Chapman, P. B. 和 Houghton, A. N. (1991) 88, 186-192)。初步研究结果显示 BGE-2 加 BGG 佐剂显著地增强了患有小细胞肺癌的病人的存活(Scrip Magazine (1996) pp 56-59;第 33 届美国临床肿瘤学协会年会 (33rd American Society of Clinical Oncology annual meeting) (1997))。

用特异抗 GD2 的鼠科单克隆抗体 (3F8) 免疫大鼠, 产生抗独特型单克隆抗体, 当在小鼠中作为免疫原测试时可激活与神经节苷脂 GD3 反应的抗体。这说明该抗独特型单克隆抗体可能对构建疫苗是有用的(Cheung, N-K. V. 等 (1993) 国际癌症杂志 54, 499-505)。

此外, 采用特异抗 GD2 的鼠科单克隆抗体 14G2 治疗的病人的外周血单核细胞生产了人抗独特型单克隆抗体。以该人抗独特型单克隆抗体免疫兔子, 诱导了抗 GD2 抗体以及对抗原阳性肿瘤细胞的 DTH 反应。这说明该抗体可潜在地作为人抗独特型疫苗用于患恶性黑素瘤的病人(Saleh, M. N. 等 (1993) 免疫学杂志 151, 3390-3398)。

题为“神经节苷脂疫苗: 作为抗原替代物的抗独特型单克隆抗体”的文章(Iglesias, E 等, Biotecnología Aplicada, Vol. 14, No. 1, 1997, p50, XP-00291466) 描述了七种与 P3 MAb 强烈反应但未见与试验的其他抗神经节苷脂 IgM Mab 反应的 IgG1 抗独特型单克隆抗体 (MAb)。这七种抗独特型 MAb 在 1-10 μ g/ml 的浓度下具有阻断 P3 与 NGcGM3 结合的能力。这些抗独特型中的 5 种能激发抗 NGcGM3 的体液应答, 被归类于 Ab2 β 和 Ab2 α 抗独特型单克隆抗体。

另外, Pérez 等 (“神经节苷脂对独特型网络揭示了什么”, Biotecnología Aplicada, Vol. 14, No.1, 1997, P42, XP-00291467) 还指出抗神经节苷脂抗体 P3 在 Bal b/c 小鼠中激发强 IgG 抗独特型应答 (Ab2, 滴度 1/10000 至 1/50000)。所获得的这些特异性 Ab2 克隆大部分能够阻断 P3 MAb 与 GM3 (NeuGc) 的结合。如上所述相同, 这些抗体能够

诱导对神经节苷脂的天然自身抗体应答, 也被归为 Ab2 β 抗独特型抗体。

从上述背景可明显看出, 迄今没有生产出抗识别 N-乙醇酰神经节苷脂的单克隆抗体, 并能够在动物模型中起抗肿瘤作用的 γ 型抗独特型单克隆抗体。

本发明的公开

广义上, 本发明涉及抗独特型 (抗-Id) 单克隆抗体 (mAbs) 及其作为免疫调节剂在癌症治疗中的应用。更具体地, 本发明涉及抗与 N-乙醇酰神经节苷脂及癌细胞表达的抗原起反应的鼠科单克隆抗体的鼠科 γ 型抗 Id 单克隆抗体。

依据本发明, 本发明的目的是提供一种新的抗-Id mAb, 其可在异种模型中诱导优势的抗独特型应答以及可在带有恶性肿瘤的小鼠或其它动物物种中产生保护性效应。本发明还提供产生该抗-Id mAb 的杂交细胞系, 其依据布达佩斯条约于 1997 年 11 月 29 日保藏在英国的欧洲细胞培养物保藏中心 (ECACC), 保藏号 97112901。

本发明的详细描述

获得抗神经节苷脂 mAbs 的抗独特型 (Ab2) 抗体应答的免疫过程

在有或没有佐剂以及选择性地偶联转运蛋白的情况下, 以 25-200ug 剂量的纯化抗神经节苷脂 mAbs 免疫小鼠和其它哺乳动物物种。动物接受 2-6 个剂量的抗神经节苷脂 mAbs, 每剂间隔 14 到 30 天。可能的免疫途径有腹膜内、皮下、静脉内或其组合。

在免疫前和免疫期间采取动物血清样本, 以任何已知的免疫测定方法测定 Ab2 抗体的应答水平。动物血清稀释物与用作免疫原的抗神经节苷脂 mAbs 或本免疫方法未使用的其它抗神经节苷脂 mAbs 一起孵育。

并且进行实验以确定免疫动物血清阻断作为免疫原的抗神经节苷脂 mAbs 结合其抗原的能力。

抗抗神经节苷脂 mAbs 的抗独特型 mAb 的产生

在获得产生抗体的细胞前三天, 以作为免疫原的 mAb 再免疫具有高

Ab2 抗体效价的小鼠。尽管优选采用脾细胞；也可以选择其它产生抗体的细胞。

这些细胞与骨髓瘤细胞相融合，使杂交细胞或杂交瘤具有了在体外和体内繁殖的性质。细胞融合可用任何已知方法进行。

杂交瘤产生的抗体用免疫测定法测定，优选免疫-酶实验，其中杂交瘤上清液与作为免疫原的 mAb 和所述免疫中未用的其它抗神经节苷脂 mAbs 一起孵育。

通过将该上清液与足量抗神经节苷脂 mAb 稀释液一起孵育后再将所述抗体与其抗原一起孵育，以测定杂交瘤上清液阻断作为免疫原的抗神经节苷脂 mAb 结合其抗原的能力。

选择的杂交瘤至少克隆两次，然后按如上所述在体外和体内生产形成的 mAbs。

所获的抗独特型 mAbs 识别抗神经节苷脂的 mAbs 并且具有阻断该抗神经节苷脂 mAb 结合其抗原的能力。

在异种模型中获得对 Ab2 mAbs 的抗-抗独特型 (Ab3) 抗体应答的免疫过程

用抗独特型 mAbs 免疫猴或其它异种物种。这些 mAbs 在用作免疫原之前可任选性地偶联转运蛋白，可与或不与佐剂一起施用。

每只动物接受 2-8 剂每剂 250ug 到 2mg 的抗独特型 mAb，每剂间隔 7 到 30 天。

免疫途径可采用皮内、皮下、静脉内、腹膜内或其组合。

在免疫前或免疫期间采取动物血液样本，用任何已知的免疫测定方法来监测 Ab3 抗体应答的存在。

将抗神经节苷脂 mAbs 免疫所产生的抗独特型 mAbs 施用于动物，能诱导抗作为免疫原的该抗独特型 mAb 的独特型的优势抗体应答，而不诱导抗原特异性抗体应答。

抗独特型 mAbs 治疗的抗肿瘤效应

施用有效量的抗独特型 mAbs, 有或没有佐剂, 使用前任选性地与转运蛋白偶联。术语有效量应理解为获得抗肿瘤效应所需的抗独特型 mAb 的量。在向动物实验性施用恶性细胞之前或之后, 采用抗独特型 mAb 进行治疗。

动物接受 1-5 剂每剂 10-200ug 的抗独特型 mAbs, 每剂间隔 7-30 天。免疫途径可采用皮内、腹腔内、皮下、静脉内或其组合。

用抗独特型 mAb 治疗后, 比较用相同方式处理和维持的对照组与抗独特型 mAb 治疗组的肿瘤发生率和动物存活率。

抗独特型 mAb 的治疗显著增加了肿瘤动物的存活率并减少了肺转移瘤。

实施例 1: 在同系模型中生产抗 P3 mAb 的抗独特型抗体。

以两剂每剂 50ug 的与 KLH 偶联的纯化 P3 mAb (抗含 N-乙醇酰的神经节苷脂, ECACC 保藏号 94113026, 欧洲专利申请 EP 657471 A1; Vázquez, AM. 等, 杂交瘤 (1995) 14, 551-556) 免疫 6-8 周龄 Balb/c 雌鼠, 两剂间隔 14 天。

最后一次免疫后三天, 摘取含有高血清水平抗 P3 mAb Ab2 抗体的小鼠的脾脏, 通过不锈钢筛挤压该组织或灌注脾脏以制备细胞悬液。

细胞融合采用稍作修改的 Köhler 和 Milstein 所述方法 (1975, 自然 (Nature) (Lond) 256, 495-497)。

鼠脾细胞与非分泌性鼠骨髓瘤 P3/X63 Ag8 6.5.3 的细胞 (可获自 ECACC, 编号 85011420) 按 10:1 比例在 0.5ml 融合培养液 (含 42% 聚乙二醇的 RPMI-1640 培养液) 中融合。融合后细胞在 HAT (次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶) 选择培养液中于 5% CO₂ 潮湿空气中 37℃ 培养。

融合后 10 到 15 天通过 ELISA 鉴定杂交瘤上清液中抗体的存在。将 ELISA 板 (高结合性 COSTAR) 在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 pH9.8 中与 10ug/ml P3 mAb 和其它 IgM 抗神经节苷脂 mAb 于 4℃ 孵育过夜。用含有 0.05% Tween 20 的 PBS 洗涤后, 该板用含有 1%BSA 的同样缓冲液 37℃ 封闭 1 小时。

重复洗涤步骤, 然后每孔加入 50ul 上清液。孵育 2 小时后, 再次洗涤该板并加入碱性磷酸酶与羊抗鼠 IgG Fc 区结合物抗血清。洗涤后每孔加入 100ul 底物溶液 (用二乙醇胺缓冲液 pH9.8 稀释的 1mg/ml 对硝基苯磷酸)。在 ELISA 读数器中测定 405nm 的吸光度。

此外, 为测定上清液阻断 P3 mAb 结合 NeuGcGM3 的能力, 在固定有 NeuGcGM3 的聚氯乙烯活化板 (ICN-FLOW) 上进行间接 ELISA, 方法如下: 每孔加入 50ul 溶于甲醇的 4ug/ml 神经节苷脂溶液。37℃ 放置 1 小时以蒸发甲醇。之后, 每孔加入 150ul 含 1% BSA 的 0.05M TRIS-HCl 缓冲液 (pH7.8), 于 37℃ 孵育 30 分钟。

杂交瘤上清液与 4ug/ml P3 mAb 在 37℃ 共同孵育 3 小时, 然后每孔加入 50ul 该混合液, 将测定板在 37℃ 孵育 90 分钟。

以 200ul PBS 洗涤板孔 4 次, 加入 50ul 适当稀释的碱性磷酸酶与抗鼠免疫球蛋白结合物抗血清。PBS 洗涤后, 按如前所述在板孔中加入底物溶液进行孵育。

获得的 IgG1 亚型的抗独特型抗体命名为 1E10。该 1E10 抗-IdP3 mAb 极特异地针对作为免疫原的 P3 mAb。其不与其它抗神经节苷脂抗体如 E1、A3 和 F6 发生反应 (图 1)。该抗独特型 mAb 可抑制 P3 mAb 结合 NeuGcGM3 (图 2) 和 P3 阳性乳腺癌细胞系。

实施例 2: 在异种模型中生产对 1E10 抗-Id mAb 的抗-抗独特型 (Ab3) 抗体应答。

用氢氧化铝沉淀的 1E10 抗-IdP3 mAb 皮内免疫猕猴, 每次注射 2 mg 剂量的该 mAb, 每次免疫间隔 14 天。所述动物接受了数个剂量的该 mAb。

免疫之前和之后采取血清样本。通过 ELISA 鉴定猴血清中 Ab3 抗体应答的存在。ELISA 板 (高结合性 Coster) 在 pH9.8 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中与 10ug/ml 1E10 mAb 或其 F(ab')₂ 片段于 4℃ 孵育过夜。用含有 0.05% Tween 20 的 PBS 洗涤后, 该板用含 1%BSA 的同样缓冲液于 37℃ 封闭 1 小时。

重复洗涤步骤, 每孔加入 50ul 不同的血清稀释液。37℃ 孵育 2 小时

后,再次洗涤并加入碱性磷酸酶与羊抗人免疫球蛋白抗-IgM或抗-IgG的结合物抗血清。洗涤后,按如前所述加入底物溶液。

进行阻断实验以区分抗同型和抗独特型抗体应答。500ug/ml 具有 1E10 mAb 相同同型但不同特异性的 mAb 与猴血清在 4℃ 孵育过夜。然后,按以上所述通过 ELISA 测定剩余的抗 1E10 mAb 血清活性。

采用如上描述的 ELISA 方法,检测该猴血清抑制生物素化 P3 mAb 结合包被于 ELISA 板上的 1E10 mAb F(ab')₂ 片段的能力,但此处血清稀释液与包被板孵育之后,每孔加入 50ul 生物素化 P3 mAb。37℃ 孵育 1 小时后,洗涤该板并每孔加入 50ul 抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合体,37℃ 放置 1 小时。洗涤后,加入底物缓冲液(8mg 邻苯二胺溶解于 12ml pH5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液)。在 ELISA 读数器中测定 492nm 吸光度。

1E10 抗-IdP3 mAb 免疫的猴血清与 1E10 F(ab')₂ 片段强烈反应(图 3)。免疫猴血清特异地结合免疫的 1E10 mAb,而非相关 mAb (ior C5) 只有较少的反应。将所述动物血清与非相关 mAb 同时孵育后,由于吸附的血清与 1E10 抗-IdP3 mAb 的强烈反应,进一步证实了抗 1E10 独特型抗体的存在;令人惊奇的是,诱导的抗独特型抗体应答超过了产生的抗同型抗体应答(图 4)。猴 Ab3 血清还抑制生物素化 P3 mAb 结合 1E10 抗-Id mAb,说明猴 Ab3 血清与 P3 mAb 具有共同的独特位(图 5)。1E10 抗-IdP3 mAb 免疫产生了优势的 IgG 抗体反应(图 6)。甚至在该动物接受最后一次免疫之后 4 个月,该猴血清仍与 1E10 F(ab')₂ 片段发生反应(图 7),同时也检测到了具有抑制 P3 mAb 结合 1E10 能力的 Ab3 抗体。在该动物血清中未检测到抗 NeuGcGM3 抗体。

因为 1E10 抗独特型 mAb 可抑制 P3 mAb 结合其抗原,但又不能在动物中诱导 P3 样抗体的产生,所以说明 1E10 抗独特型 mAb 是 γ 型。

实施例 3: 用 1E10 抗-Id mAb 治疗小鼠

以 5 剂每剂 50ug 的氢氧化铝沉淀之 1E10 抗-IdP3 mAb 免疫 C57BL/6 小鼠,每剂间隔 14 天。一周后,小鼠皮下注射 5×10^3 B16 黑素瘤细胞。

同样方式处理但未接受该 mAb 的小鼠作为对照。图 8 显示了 Kaplan-Meier 存活曲线；1E10 抗-IdP3 mAb 免疫组的存活率显著比对照高。

C57BL/6 小鼠静脉内接种 50×10^3 Lewis 肺癌细胞。14 天后静脉内注射 10ug 1E10，再 6 天后将小鼠处死并对肺转移瘤计数。非相关 IgG mAb 处理或仅接受 PBS 的小鼠作为对照。1E10 抗-P3 mAb 处理的 10 只小鼠，7 只未产生肺转移瘤，其余 3 只转移瘤总数最大是 3。相反，所有非相关 IgG1 处理或仅接受 PBS 的小鼠均产生肺转移瘤。这些结果说明用该 γ 型抗-Id mAb 进行治疗具有抗肿瘤的保护性效应。

附图简要说明：

图 1：显示 1E10 抗-IdP3 mAb 抗 P3、E1、A3 和 F6 抗神经节苷脂 mAb 的反应性。

图 2：显示抑制实验的结果，其中 P3 mAb 与 1E10 抗-IdP3 mAb 一起孵育，之后通过 ELISA 测定 P3 mAb 与 NeuGcGM3 的反应性。

图 3：显示动物接受不同剂量的氢氧化铝沉淀之 1E10 抗-Id mAb 后，通过 ELISA 测定的猴血清抗体与 1E10 F(ab')₂ 片段的反应性。

图 4：显示抑制实验的结果，其中通过 ELISA 测定了猴非预吸附血清与 1E10 mAb (-■-) 以及猴非预吸附血清与非相关 ior C5 mAb (-●-) 匹配的同型的反应性，还测定了血清抗体与 1E10 mAb (-□-) 以及血清抗体与非相关 ior C5 mAb (-○-) 的结合。箭头指示免疫时间和采血持续线时间。

图 5：显示通过 ELISA 测定的 1E10 mAb 免疫猴血清对 P3 mAb 结合 1E10 抗-Id mAb 的抑制。箭头指示免疫时间和采血持续线时间。

图 6：显示 ELISA 测定的抗独特型 mAb 免疫的猴血清中抗 1E10 mAb 的 IgM 和 IgG 抗体应答动力学。箭头指示免疫时间和采血持续线时间。

图 7：显示了猴免疫前血清、猴接受最后一次剂量的氢氧化铝沉淀之 1E10 抗独特型 mAb 后采取的血清、以及动物最后一次免疫后 4 个月采取的血清，对 1E10 F(ab')₂ 片段的识别。

图 8：显示 1E10 抗-IdP3 mAb 处理并接种 B16 黑素瘤细胞的小鼠的 Kaplan-Meier 存活曲线。

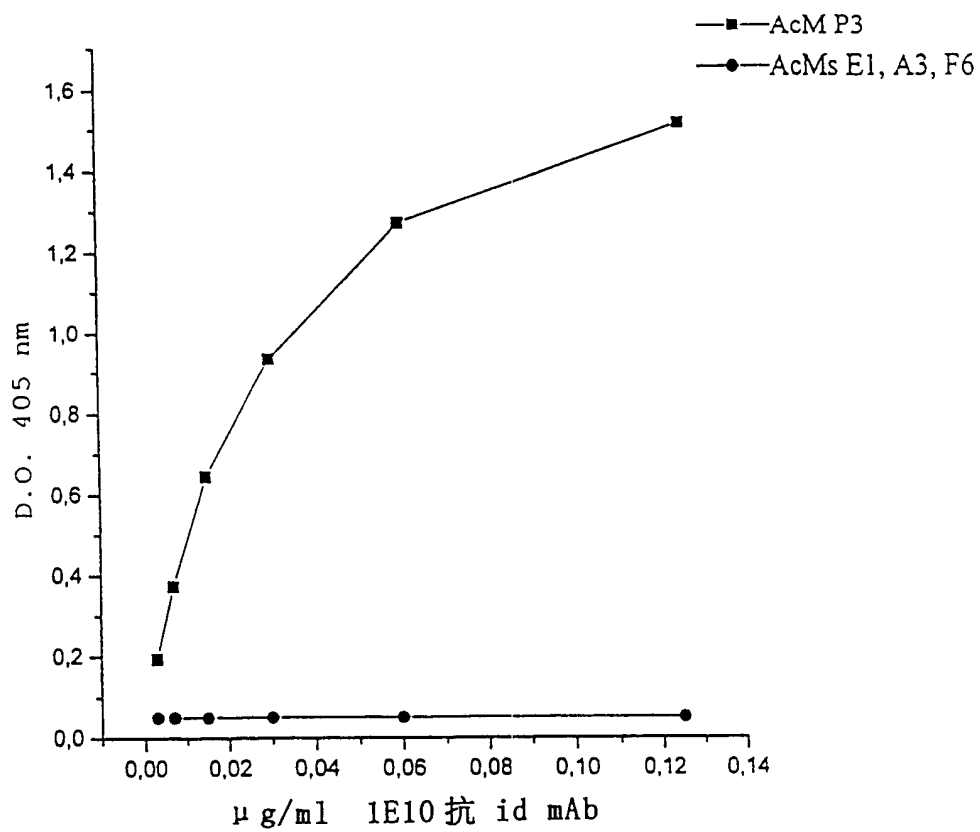


图 1

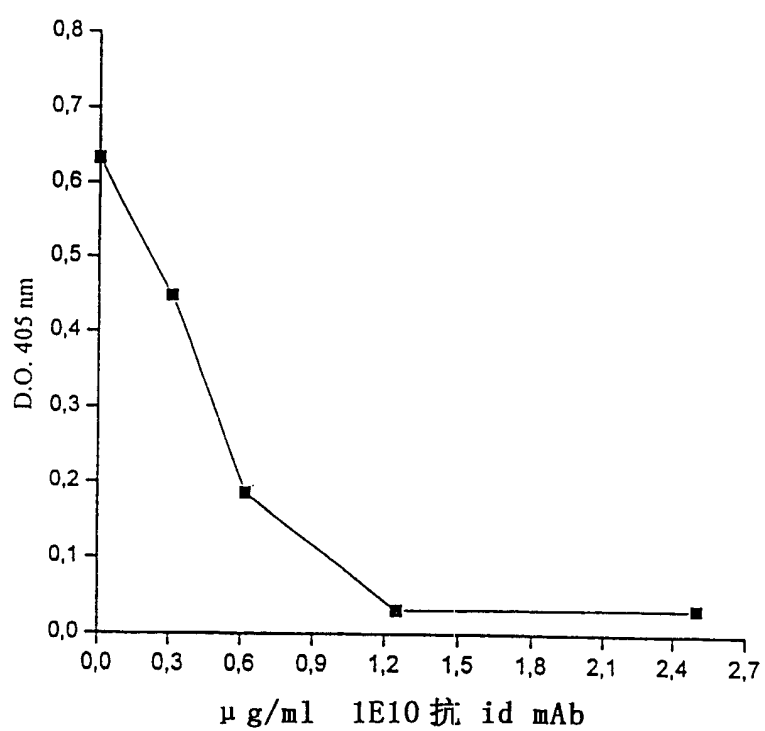


图 2

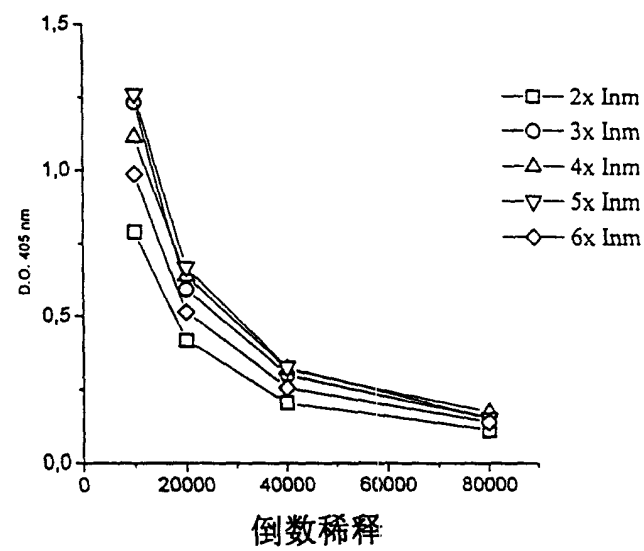


图 3

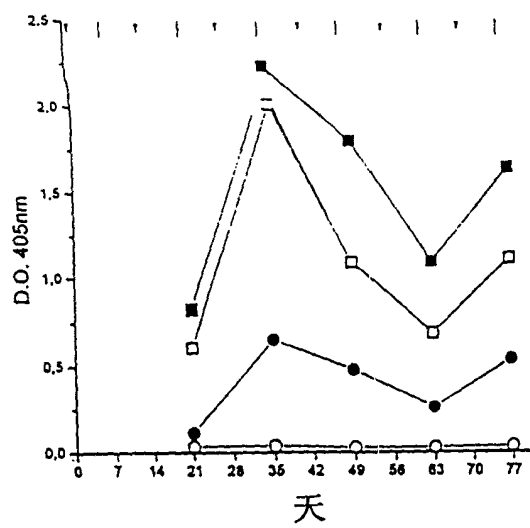


图 4

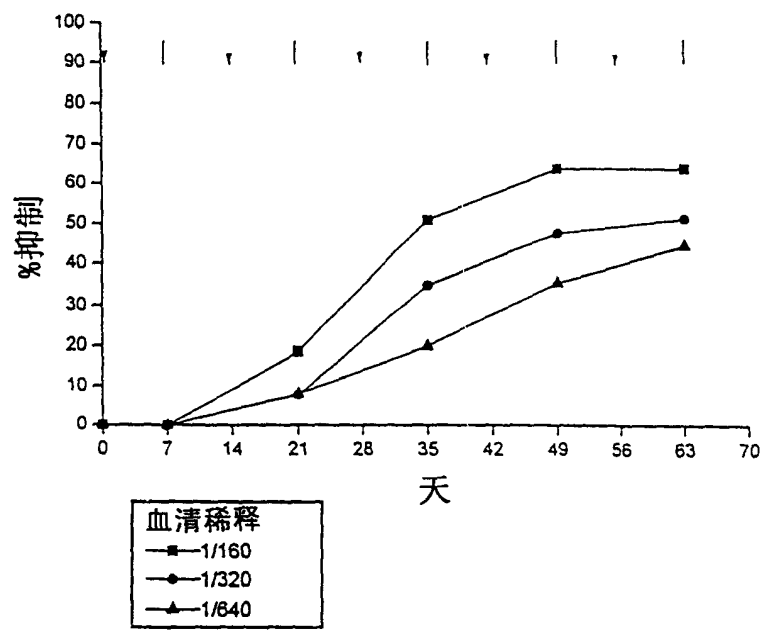


图 5

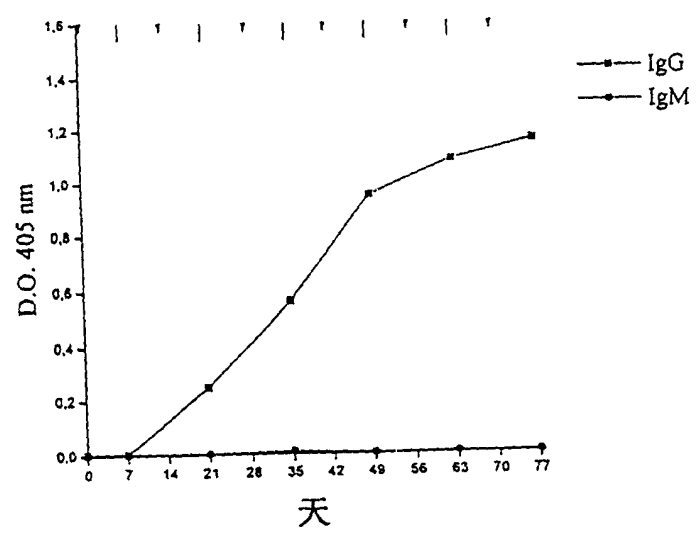


图 6

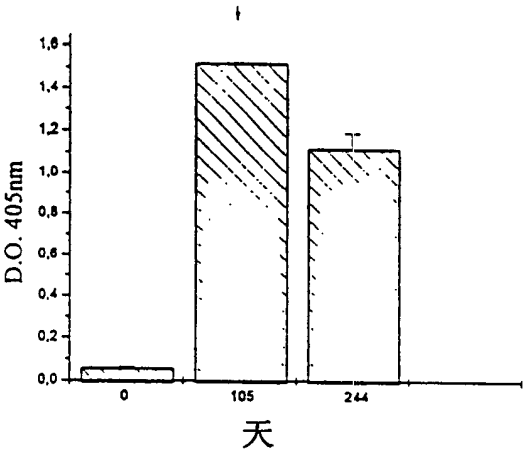


图 7

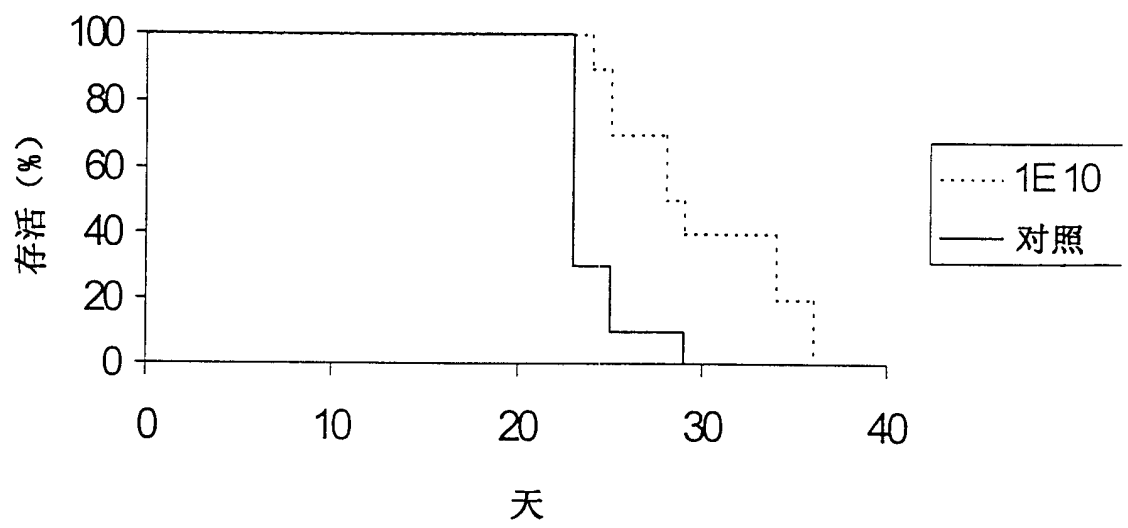


图 8