

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480033687.3

[51] Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月20日

[11] 公开号 CN 1882610A

[22] 申请日 2004.9.15

[21] 申请号 200480033687.3

[30] 优先权

[32] 2003.9.16 [33] FR [31] 0350543

[86] 国际申请 PCT/FR2004/050436 2004.9.15

[87] 国际公布 WO2005/028513 法 2005.3.31

[85] 进入国家阶段日期 2006.5.15

[71] 申请人 尼奥瓦克斯公司

地址 法国巴黎

[72] 发明人 B·比其尼 H·勒布阿内克

D·扎古里

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 3 页 说明书 27 页

[54] 发明名称

产生阻断人细胞因子生物活性的人抗体的高
产量方法

[57] 摘要

本发明涉及含有 IgG 同种型的天然人抗体作为
活性成分的药物组合物，其中天然人抗体中和选自
VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的人细胞因
子的活性，所述中和抗体至少抑制由量在 0.006ng
至 0.05ng 范围内的所述细胞因子体外诱导的最大生
物学活性的 50%。

1. 物组合物，其含有 IgG 同种型天然人抗体作为活性成分，所述天然人抗体中和选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的细胞因子的活性，该中和抗体至少抑制由该细胞因子体外诱导的最大生物活性的 50%。

2. 根据权利要求 1 的药物组合物，其特征在于所述人中和抗体来自以含有蛋白质免疫原性杂络物的稳定免疫原性产物免疫的个体的血清或 B 细胞，其中蛋白质免疫原性杂络物由(i)分别选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的抗原蛋白质分子和(ii)蛋白质载体分子的组合组成，其中低于 40% 的抗原蛋白质(i)通过共价键与蛋白质载体分子(ii)连接。

3. 根据权利要求 1 或 2 的药物组合物，其特征在于所述细胞因子的体外最大生物活性分别由：

(i) 0.5 ng VEGF

(ii) 0.006 ng IFN α

(iii) 0.5 ng IL-4

诱导。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的组合物，其特征在于中和抗体选自多克隆抗体和单克隆抗体。

5. 权利要求 4 的组合物，其特征在于多克隆抗体选自：

(i) 从针对所述人细胞因子免疫的人个体血清纯化的全抗体级份；

(ii) 中和该细胞因子活性的单特异性多克隆抗体的纯化级份；

(iii) 从上述多克隆抗体(i)和(ii)制备的 Fab 或 F(ab) $'_2$ 片段。

6. 权利要求 4 的组合物，其特征在于相同的单克隆抗体选自：

(i) 由细胞产生的抗体，其中细胞来自(a)针对所述人细胞因子免疫的人个体的 B 细胞和(b)抗体产生细胞系细胞之间的细胞融合，抗体产生细胞系例如骨髓瘤细胞；

(ii) 由细胞产生的抗体，其中细胞由编码免疫球蛋白的 DNA 转染或转化，所述 DNA 事先分离自 B 细胞 DNA 或针对该细胞因子免疫的人，其中

免疫球蛋白再现由免疫诱导并存在于免疫患者血清中的抗体；

(iii) 从上述单克隆抗体(i)和(ii)制备的 Fab 或 F(ab)₂ 片段；

(iv) ScFv 片段。

7. 据权利要求 1 至 6 中任一项的组合物，其特征在于其另外含有至少一种生理学可接受的赋形剂。

8. 获得高产人抗体的方法，所述人抗体中和选自 VEGF、IFN α 、IL-4 和 TGF β 的人细胞因子的活性，所述方法至少包括步骤(a)，其中纯化：

(i) 个体血清中含有的免疫球蛋白，或

(ii) 个体 B 细胞产生的免疫球蛋白，

事先针对该细胞因子以稳定的免疫原性产物免疫所述个体，其中免疫原性产物含有蛋白质免疫原性杂络物，由(i)选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的抗原蛋白质分子和(ii)蛋白质载体分子的组合组成，其中低于 40 % 的抗原蛋白质(i)通过共价键与蛋白质载体分子(ii)连接。

9. 根据权利要求 8 的方法，其特征在于其包括步骤 b)，所述步骤 b) 从步骤 a) 未获得的免疫球蛋白级份纯化 G 同种型免疫球蛋白。

10. 根据权利要求 8 或 9 的方法，其特征在于其包括另一个额外步骤，所述额外步骤获得中和所述细胞因子生物活性的单特异性多克隆抗体。

11. 根据权利要求 8 至 10 中任一项的方法，其特征在于其包括另一个额外步骤，所述额外步骤获得中和所述细胞因子生物活性的 F(ab) 或 F(ab)₂ 片段。

12. 根据权利要求 8 至 11 中任一项的方法，其特征在于其包括下列额外步骤：

(i) 为获得杂交瘤细胞系，将步骤 a) 未获得的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合；
和

(ii) 回收由这些杂交瘤产生的抗体。

13. 根据权利要求 1 至 12 中任一项的抗 VEGF 抗体在制造治疗癌症的药物组合物中的用途。

14. 根据权利要求 1 至 12 中任一项的抗 IFN α 抗体在制造治疗免疫抑

制状态的药物组合物中的用途。

15. 根据权利要求1至12中任一项的抗IL-4抗体在制造治疗过敏反应的药物组合物中的用途。

16. 根据权利要求1至12中任一项的抗TNF α 抗体在制造治疗免疫抑制状态的药物组合物中的用途。

17. 根据权利要求1至12中任一项的抗TGF β 抗体在制造治疗逆转录病毒感染或选自结肠癌、乳腺癌和前列腺癌的癌症的药物组合物中的用途。

产生阻断人细胞因子生物活性的人抗体的高产量方法

技术领域

本发明涉及含有抑制细胞因子生物活性的中和抗体的组合物、其制造方法及其用途。

背景技术

细胞因子是由许多细胞（例如淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞、肥大细胞、成纤维细胞）产生、对许多组织发挥自分泌、旁分泌和内分泌作用的蛋白质。

细胞因子影响细胞存活、增殖、分化和迁移。可以根据细胞因子的活性将其概括地分类。一些细胞因子在通过产生细胞毒性淋巴细胞或NK细胞、经直接或间接作用诱导细胞死亡中是重要的（IFN- γ 、TNF、IL-2、IL-15）。

其它细胞因子参与过敏反应，例如IL-3、IL-4、IL-5、IL-9和IL-13。若干细胞因子是调节抗体产生所必需的（IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13）而其它细胞因子发挥促炎作用（IL-1、TNF α 、IFN- γ 、趋化因子）。其它细胞因子具有抗炎特性（TGF- β 、IL-4、IL-10）。然而，该分类没有反映细胞因子与其细胞靶标之间相互作用的复杂性，不考虑激动剂和拮抗剂作用，该复杂性以重要冗余和多效性为特征。免疫系统和特别是细胞因子的这些特征解释了为什么由例如阻断细胞因子的抗体介导的对其作用机制的每个干扰导致了重要的体内效应。

迄今为止，疫苗治疗策略主要靶向于抗原攻击物（包括微生物、细胞或过敏原），但是没有集中在对抗细胞因子失调。然而，考虑在例如逃避免疫防御现象中或感染现象中涉及的细胞因子的关键作用，就作用于其活

性或产生而言，细胞因子在患者体内的失活是目前正在寻求的目标，尤其对生物不具有容许有效平衡这些细胞因子的天然拮抗剂而言。人们知道例如抗细胞因子抗体，但是由于产生这些抗体的 B 细胞处于静息，它们的效价水平非常低。另外，这些天然抗体亲和力低并且不中和相应细胞因子的活性。

值得一提的是，由诱导细胞免疫原位瘫痪(*in situ paralysis*)介导的宿主细胞免疫防御逃逸现象由许多癌症使用的策略组成，并且是其生存所必需的。最初，因为个体仍然能够对抗其它侵袭（例如感染）免疫抑制，保持局限在肿瘤水平。然而在后期，免疫抑制可能蔓延和泛化，超出化学治疗和放射治疗引起的效果，如转移扩散所示和如癌症患者对感染的高度易感性所示。概括而言，免疫系统控制逃逸由阻止免疫系统正常行使功能的免疫系统瘫痪（免疫抑制）引起。所述免疫抑制涉及由癌症细胞或由其环境产生的瘫痪因子，包括细胞因子。免疫系统细胞的局部瘫痪或免疫抑制因此代表使癌症细胞从宿主免疫系统逃逸的主要武器。

由诱导细胞免疫防御原位瘫痪介导的宿主细胞免疫防御逃逸现象也是 HIV 使用的策略。在 AIDS 中观察到的广泛的免疫抑制其特征尤其在于抗原呈递细胞（特别为 2 型树突状细胞(DC2)）过度产生 $IFN\alpha$ 。 $IFN\alpha$ 的免疫抑制活性是由于其诱导调节性 T 细胞(正式称为抑制性 T 细胞)产生 IL-10 细胞因子的能力。

抑制细胞因子生物活性的第一个策略由给患者注射免疫原性构建体组成。例如，为了诱导 B 细胞识别目的抗原（例如细胞因子），在本领域实施了多种免疫原性构建体。这些免疫原性构建体的一个实施方案由目的抗原和载体分子之间的共价偶联组成，所述被携带的分子携带由辅助 T 淋巴细胞（也称为“T 辅助”细胞）识别的与主要组织相容性复合物（MHC）II 类分子组合的结构，所述主要组织相容性复合物（MHC）II 类分子活化淋巴细胞而产生多种细胞因子（包括 IL-2），细胞因子依次将活化对目的抗原特异的 B 细胞克隆。一旦被活化，对目的抗原特异的 B 细胞将增殖并产生对目的抗原特异的抗体，此即寻求的目标。一般而言，这类免疫原性

构建体由目的抗原和载体分子之间的共价化学偶联产物组成，纯化步骤之后和去除非偶联产物之后，该构建体由具有充分说明的化学结构的终产物组成。

然而，这类免疫原性构建体具有缺点，其中可以列举注射该构建体与出现抗靶向细胞因子的免疫应答之间的长时程。另外，当所述细胞因子影响免疫应答的强度或性质时，有时不可能用抗细胞因子免疫原性构建体对患者有效接种。事实上，例如在观察到高度免疫抑制的癌症或 AIDS 的情况下，为了有效，应当在疾病早期，特别是在免疫抑制非常严重之前施用免疫原性组合物。

本领域因此需要能够治疗免疫系统崩溃的患者的抗细胞因子抗体。这些抗体直接作用于涉及免疫抑制或炎症过程的细胞因子。这类抗细胞因子抗体治疗至少能暂时恢复免疫应答，并因此可以在施用免疫原性组合物前使用。

抗细胞因子抗体已为本领域所公知。例如，专利申请 EP 1 285 930 以及相应的美国专利 N° US 6,509,015 公开了人抗体，具体为与 TNF α 特异性结合的人重组抗体，其中 TNF α 是由许多细胞类型产生的细胞因子，因其在自身免疫病、感染或移植排斥中的作用而众所周知。

也可以引用国际申请 N°WO 00/56772，所述国际申请 N°WO 00/56772 公开了与人 IL-2 特异性结合、并中和其体内和体外活性的人抗体，优选重组体。

最后可以引用美国专利申请 N°2003/0099647，所述美国专利申请 N°2003/0099647 公开了与 γ 干扰素结合的制剂，特别是与 γ 干扰素选择性结合的抗体或抗原的结合结构域，并可以用于预防或治疗炎症或自身免疫病，例如风湿性关节炎或狼疮。

考虑到上文回顾的细胞因子的关键作用，对具有结合目的细胞因子并（至少部分地）中和其生物活性的新抗体组合物长期存在需求。重要的是，这类组合物应当不昂贵、易于制备并可重复地合成。

发明概述

作为本发明的目的之一，本发明具有获得中和选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的人细胞因子生物活性的人抗体的高产量方法，该方法至少包括步骤(a)纯化：

- (i) 个体血清中含有的免疫球蛋白，或
- (ii) 个体 B 细胞产生的免疫球蛋白，

事先以含有蛋白质免疫原杂络物的稳定免疫原性产物针对所述细胞因子免疫所述个体，其中蛋白质免疫原杂络物由(i)选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的抗原蛋白质分子和(ii)载体蛋白质分子之间的组合组成，其中少于 40% 的抗原蛋白质(i)通过共价键与蛋白质载体分子(ii)连接。

本发明也提供含有抗细胞因子天然人抗体作为活性成分的新组合物，所述抗细胞因子天然人抗体能克服上面公开的现有技术免疫原性构建体中面临的问题，本发明也提供已知的抗细胞因子抗体组合物的备选方案。

选作活性成分的天然人中和抗体优选为多克隆或单克隆抗体，且多克隆抗体选自：

- (i) 从针对所述人细胞因子而免疫的人血清纯化的完整抗体级份；
- (ii) 中和该细胞因子活性的单特异性多克隆抗体的纯化级份；
- (iii) 从上述多克隆抗体(i)和(ii)获得的 Fab 或 F(ab) $'_2$ 片段。

单克隆抗体优选自：

(i) 细胞产生的抗体，其中细胞于(a)针对所述人细胞因子免疫的人类个体的 B 细胞和(b)抗体产生细胞系的细胞（例如骨髓瘤细胞）之间的细胞融合之后获得；

(ii) 细胞产生的抗体，其中细胞以编码免疫球蛋白的 DNA 转染或转化，所述免疫球蛋白再生由免疫诱导并存在于免疫患者血清中的抗体，事先从针对所述细胞因子免疫的人类个体的 B 细胞 DNA 分离所述 DNA；

- (iii) 从上述多克隆抗体(i)和(ii)制备的 Fab 或 F(ab) $'_2$ 片段；
- (iv) ScFv 片段。

发明详述

根据本发明显示可以在针对所述细胞因子免疫人类个体之后产生具有高度中和人细胞因子活性能力的新的人抗体，不需要现有技术方法中面临的复杂的细胞筛选和纯化步骤。为了更加清楚，需要明确指出没有针对细胞因子免疫的个体不天然具有中和该细胞因子活性的抗体。

这类抗细胞因子抗体可用于多种其中涉及这些细胞因子的病理情况。

例如，可以列举感染、自身免疫病、移植排斥及通常所有与炎症反应有关的疾病，例如过敏。根据本发明的抗体和含有这些抗体的组合物因此可用于对抗这类紊乱并且又易于获得。

本发明涉及获得中和选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的人细胞因子生物活性的人抗体的高产量方法，至少包括步骤(a)，其中纯化：

- (i) 个体血清中含有的免疫球蛋白，或
- (ii) 个体 B 细胞产生的免疫球蛋白，

事先以免疫原性产物针对所述细胞因子免疫所述个体，免疫原性产物例如于 2002 年 9 月 16 日提交的法国专利申请 N° FR 02 11 455 中公开的免疫原性产物。这类产物由含有蛋白质免疫原性杂络物的稳定免疫原性产物组成，所述蛋白质免疫原性杂络物由(i) 选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的抗原蛋白质分子和(ii)载体蛋白质分子之间的组合组成，其中少于 40% 的抗原蛋白质(i)通过共价键与蛋白质载体分子(ii)连接。

在此有时把 VEGF (血管内皮生长因子) 以及 IL-4 (白介素 4)、IFN α (干扰素 α)、TNF α (肿瘤坏死因子 α) 和 TGF β (转化生长因子 β) 以相同的专业术语称为本说明书下文中的“目的细胞因子”。

所述抗体优选由“中和”或“封闭性”抗体组成。根据本发明，将“中和”抗体或“封闭性”抗体定义为结合靶细胞因子而封闭该细胞因子生物活性的抗体，当该抗体针对的细胞因子对宿主生物具有有害的生物活性时，这也是根据本发明寻求的主要目标。

根据本发明，如实施例中所阐述，通过免疫个体中抗细胞因子抗体的高血清水平检测对个体事先获得的针对目的细胞因子的免疫。根据本发明，

观察到在所有免疫个体中获得中和目的细胞因子的有害活性的天然人抗体。

不希望受任何具体理论限制，发明人相信作为本发明主题的抗细胞因子天然人抗体由高亲合力抗体组成。换言之，根据本发明人，在所述抗体和这些抗体针对的细胞因子之间形成的复合体不解离或难以解离，导致施用本发明说明书中所定义的抗体的个体中游离细胞因子的循环浓度剧烈下降。

可以通过本领域技术人员已知的任何方法针对细胞因子免疫个体。可以优选将细胞因子施用于个体，所述细胞因子的生物活性事先通过物理和/或化学处理（例如组合 (formulation)、酰胺化、马来酰亚胺化 (maleimination)、通过氧气泡氧化 (oxidation by oxygen bubbling)，或通过遗传重组，或也通过佐剂调节 (adjuvant conditioning)）失活到 70%、90% 或甚至到 95%，该处理为产生中和或封闭该细胞因子的抗体保留了充分的免疫原特性。

人血清或产生该抗体的人 B 细胞最优选来源于以免疫原性产物免疫的个体，其中免疫原性产物例如于 2002 年 9 月 16 日提交的法国专利申请 N° FR 02 11 455 中所公开的。这类产物是含有蛋白质免疫原性杂络物的稳定免疫原性产物，其中蛋白质免疫原性杂络物由 (i) 选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的抗原蛋白质分子和 (ii) 蛋白质载体分子之间的组合组成，其中低于 40% 的抗原蛋白质 (i) 通过共价键与蛋白质载体分子 (ii) 连接。在此以“抗原蛋白质”指细胞因子（任选地经过化学失活）或长度至少十个氨基酸残基的细胞因子片段，该细胞因子或细胞因子片段能够被来自宿主生物（人或动物，具体为任何哺乳动物）的 B 淋巴细胞表达的抗原受体特异性识别，该抗原蛋白质一旦包含于免疫原性产物中，即刺激识别该细胞因子的抗体产生。

目的抗原蛋白质也可以由天然细胞因子的同源寡聚体或同源多聚体组成，或天然细胞因子肽片段的同源寡聚体或同源多聚体组成。目的抗原蛋白质也可以由异源寡聚体或异源多聚体组成，所述异源寡聚体或异源多聚

体含有最初包含于天然细胞因子中的若干不同肽片段的组合。

在此包含于免疫原性产物中的“蛋白质载体分子”旨在指长度至少 15 个氨基酸的任何蛋白质或肽，无论其氨基酸序列如何，当该蛋白质或肽与目的抗原分子以部分共价的方式联合以形成免疫原性产物的蛋白质杂络物时，其允许大量所述目的抗原分子向淋巴细胞呈递。蛋白质载体分子优选为 KLH 型（匙孔槭血蓝蛋白）。

免疫原性产物优选另外含有 CpG 寡脱氧核苷酸作为佐剂，所述 CpG 寡脱氧核苷酸能提高中和目的细胞因子活性的抗体的产生。就增强免疫应答的而言，CpG 寡脱氧核苷酸作为佐剂化合物在免疫原性组合物中的用途公开于下列文件中：McCluskie MJ 等人，2000；Gallichan WS 等人，2001；和 Eastcott JW 等人，2001。

就诱导免疫的而言，作为含有有效杂络物的稳定免疫原性产物的实例，可以列举蛋白质载体分子 KLH（匙孔槭血蓝蛋白）与人干扰素 α 分子之间的组合，此后将这种杂络物产物称为干扰素 α -KLH。优选的免疫原性产物选自含有下列杂络物的免疫原性产物，其中一方面的抗原蛋白质(i)和另一方面的蛋白质载体分子(ii)分别为：

- a) (i) VEGF 和(ii) KLH;
- b) (i) 干扰素 α 和(ii) KLH;
- c) (i) IL-4 和(ii) KLH;
- d) (i) TNF α 和(ii) KLH;
- e) (i) TGF β 和(ii) KLH.

在根据本发明的免疫原性产物中，可以由本领域技术人员容易地检测通过共价键连接在一起的蛋白质载体分子和目的抗原蛋白质的百分率。

例如，在根据本发明的免疫原性产物中，可以按照实施例 10 中公开的方案测定通过共价键与蛋白质载体分子结合的目的抗原分子的百分率。

例如，含有蛋白质载体分子 KLH（匙孔槭血蓝蛋白）和人 α 干扰素分子之间的杂络物的免疫原性产物中，仅 3% 的干扰素 α 分子与蛋白质载体分子 KLH 共价连接。

可以按照下列步骤制备含有如上定义的免疫原性杂络物的免疫原性产物:

a) 在交联化学试剂的存在下将抗原蛋白质(i)和载体分子(ii)以(i):(ii)为5:1至50:1的摩尔比孵育;

b) 回收在步骤 a)中制备的含有免疫原性杂络物的免疫原性产物。

交联化学试剂优选由戊二醛组成。最优选上述方法进一步以在步骤 a)后及实施回收该杂络物的步骤 b)之前通过甲醛稳定含有免疫原性杂络物的产物的步骤为特征。

优选地,当使用戊二醛作为交联化学剂时,其以包含 0.002 M 和 0.03 M 之间的终浓度(优选以 0.026 M 的终浓度)存在于偶联反应介质中。

在 20 至 25°C 温度范围内,在 20 分钟至 60 分钟(优选 30 分钟)期间以戊二醛方便地进行偶联反应。

偶联步骤后,通过例如以具有 3 kDa 截留阈(cut off threshold)的透析膜进行透析去除过量的戊二醛。于 4°C 在调节至 pH 7.6 的缓冲液中方便地实施透析步骤。

为稳定含有在步骤 a)中制备的蛋白质杂络物的产物,可以由甲醛(例如由终浓度 3 mM 的甲醛)在溶液中处理该产物。稳定反应有利地具有 12 至 48 小时之间、优选 20 至 30 小时之间、最优选 24 小时的时程。通过(优选以 0.1 M 的终浓度)添加甘氨酸在 20 至 25°C 的温度范围内持续 1 小时方便地终止甲醛稳定反应。

优选在去除过量戊二醛步骤之后添加 CpG 寡脱氧核苷酸。

在实施例 1、2、3 和 4 中对制备含有如上定义的免疫原性杂络物的免疫原性产物进行了进一步说明。

尽管没有在实施例中说明,可以根据与实施例 1 至 4 中公开的方案相似的方案制备杂络物 TGFβ-KLH。

一般而言,根据本发明的天然人中和抗体至少中和目的细胞因子体外最大生物活性的 50%。

例如,根据本发明显示,以天然人中和抗体 10^{-3} μg 至 10^{-2} μg 范围内

的量通常获得目的细胞因子最大生物活性至少 50% 的体外抑制。

目的细胞因子的体外最大生物活性优选分别由

- (i) 引起人脐静脉内皮细胞最大增殖的 VEGF 最小量;
- (ii) 引起疱疹性口腔炎病毒 (VSV) 导致的 MDBK 细胞系细胞裂解最大抑制的 IFN α 最小量;
- (iii) 引起 IL-4 依赖的 TF-1 细胞系最大增殖的 IL-4 最小量;
- (iv) 引起 TNF α 依赖的 L929 细胞系最大增殖的 TNF α 最小量;
- (v) 引起 TGF β 依赖的 NRK 49F 细胞系最大增殖的 TGF β 最小量诱导。

可以具体根据分别在实施例 5、6、7 和 8 中公开的方案进行 VEGF、人 IFN α 、IL-4 和 TNF α 的生物活性测定。当使用 NRK 49F 成纤维细胞系时，可以用与以上公开方案的类似方法或根据本领域技术人员公知的方法实施 TGF β 的生物活性测定。

该方法优选包括从步骤(a)末获得的免疫球蛋白级份纯化 G 同种型免疫球蛋白的步骤(b)。

根据本发明的方法尤其有利，因其可以获得高水平的抗体反应和高比率的循环 B 细胞，所述循环 B 细胞产生中和目的细胞因子活性的抗体。

可以通过例如将这些 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合而直接使用分离的 B 淋巴细胞群，以产生抗细胞因子天然人抗体，这能够避免复杂的纯化过程。

根据本发明的方法能够避免使用例如 B 细胞纯化方法，例如筛选、通过含有尼龙偶联抗体的柱过滤或流式细胞术分选(FACS[®])。

从免疫个体获得 B 细胞是简单的。第一个方法组成为：通过在由多糖多聚体(Ficoll[®])和碘重化合物三碘苯甲酰氨基葡萄糖的混合物组成的密度梯度中离心，从外周血分离 B 淋巴细胞。在分界面获得与红细胞和大多数多核细胞分离的 B 淋巴细胞群。

从免疫个体获得 B 细胞的另一个方法组成为：从组织且特别从淋巴器官（如脾、胸腺、骨髓、淋巴结）或黏膜相关的淋巴组织（例如腭扁桃体）

分离 B 淋巴细胞。

根据本发明的方法可以任选地包括另一个额外步骤，该步骤获得中和所述细胞因子生物活性的单特异性多克隆抗体。

根据本发明的方法也可以包括另一个额外步骤，该步骤获得中和所述细胞因子生物活性的 F(ab)或 F(ab)₂ 片段。

根据本发明的方法也可以包括下列额外步骤：

- (i) 使用在步骤(a)末获得的 B 细胞与骨髓瘤细胞，以获得杂交瘤系，且
- (ii) 回收由该杂交瘤产生的抗体。

此后将在本说明书中更详细地公开与药物组合物有关的完整步骤。

本发明也涉及药物组合物，该药物组合物特征在于其含有 IgG 同种型的天然人抗体作为活性成分，所述天然人抗体中和选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的人细胞因子的活性，该中和抗体至少抑制由所述细胞因子体外诱导的最大生物活性的 50%。

根据本说明书，来自事先针对所述目的细胞因子免疫的个体的血清或 B 细胞获得如上定义的药物组合物中含有的人抗体。

一般而言，根据本发明的天然人抗体至少体外抑制由 0.006 ng 至 0.5 ng 范围内的目的细胞因子所诱导生物活性的 50%。

例如，根据本发明显示，当例如以上文明确的量使用目的细胞因子时，通常以量在 10^{-3} μ g 至 10^{-2} μ g 范围内的抗细胞因子天然人中和抗体获得该细胞因子最大生物活性至少 50% 的体外抑制。

可以用本领域技术人员公知的任何方法针对细胞因子免疫个体，在 INF α 的情况下，具体通过以实施例 9.1 中公开的条件注射事先经二甲基甲酰胺失活的 INF α 、或通过与已经公开的涉及本发明方法一致的那些技术进行免疫。

优选从事先以稳定的免疫原性产物免疫的个体血清或 B 细胞获得天然人中和抗体，所述稳定的免疫原性产物含有由(i)分别选自 VEGF、IFN α 、IL-4、TNF α 和 TGF β 的蛋白质抗原分子和(ii)蛋白质载体分子之间的组合组成的蛋白质免疫原性杂合物，其中少于 40% 的抗原蛋白质(i)通过共价键与

蛋白质载体分子(ii)连接。

在此以“天然抗体”专指这样的抗体，例如它们由免疫个体天然产生，特异性针对目的细胞因子，所述天然抗体包含于所述个体的血清中，或这些天然抗体由该个体在免疫后活化的 B 细胞产生。

可以根据与已经公开的涉及本发明方法一致的技术定义、获得杂络物并确定抗原蛋白质和载体蛋白质之间的共价键百分数。

所述细胞因子的最大体外生物活性优选分别由：

- (i) 0.5 ng VEGF;
- (ii) 0.006 ng IFN α ;
- (iii) 0.5 ng IL-4

诱导。

根据本发明的抗细胞因子天然人中和抗体由多克隆或单克隆抗体组成。

多克隆抗体优选自：

- (i) 从针对人细胞因子免疫的人类个体血清纯化的全抗体级份；
- (ii) 中和该细胞因子活性的单特异性多克隆抗体的纯化级份；
- (iii) 从上述多克隆抗体(i)和(ii)制备的 Fab 或 F(ab) $'_2$ 片段。

获得从针对人细胞因子免疫的人类个体血清纯化的全抗体级份(i)优选包括下列步骤：

a) 给人类个体注射免疫原性组合物，优选例如上文公开的免疫原性组合物；

b) 从该人类个体回收免疫血清，其中含有中和施用的抗原活性的抗体；

c) 从该免疫血清纯化抗体级份。

下文中详细公开了该方法的每一个步骤。如本领域技术人员所知回收免疫血清，例如通过离心从全血样品分离血清，例如通过亲和层析、硫酸铵沉淀、离子交换层析、凝胶过滤、使用蛋白质 A/G 柱层析或免疫亲和层析从免疫患者的免疫血清纯化抗体级份。

在欧洲专利申请 EP 662 480 中公开了非常适合于本发明的抗体纯化的

额外步骤。所述方法能在抗体混合物中（特别是在步骤(b)获得的免疫血清中）去除抗载体分子抗体。

可以通过将目的细胞因子上的抗原模式结合到柱上进行亲和层析而从全抗体级份(i)获得中和目的细胞因子活性的单特异性多克隆抗体的纯化级分(ii)，其中全抗体级份(i)纯化自针对所述人细胞因子免疫的人类个体免疫血清。

可以根据专利申请 N° US 2002/0164327 中公开的方法从上文公开的多克隆抗体或从免疫血清或从血浆纯化 $N(ab)'_2$ 片段，所述方法包括由胃蛋白酶消化血浆或血清的步骤以及纯化和分离步骤，直到获得不含白蛋白、完整抗体并基本不含热原性物质的 $F(ab)'_2$ 片段。

分离 $F(ab)$ 和 $F(ab)'_2$ 片段能够获得特定的优点，例如与目的细胞因子结合而不与免疫系统其它效应分子相互作用的能力。

可以通过类似方法获得 $F(ab)$ 片段，所述方法由以胃蛋白酶消化来自针对目的细胞因子免疫的人类个体的免疫血清、血浆或多克隆抗体纯化级份(i)、(ii)和(iii)组成。

可另选的是，抗体为单克隆并选自：

(i) 由细胞产生的抗体，所述细胞来自(a)针对所述人细胞因子免疫的人类个体 B 细胞和(b)抗体产生细胞系细胞(例如骨髓瘤细胞)的细胞融合；

(ii) 以编码免疫球蛋白的 DNA 转染或转化的细胞产生的抗体，所述 DNA 事先分离自针对所述人细胞因子免疫的人类个体的 B 细胞 DNA；根据具体特征，所述免疫球蛋白再现由免疫诱导并存在于免疫患者血清中的抗体；

(iii) 从上述多克隆抗体(i)和(ii)制备的 Fab 或 $F(ab)'_2$ 片段；

(iv) ScFv 片段。

可以根据下列方式获得单克隆抗体(i)：

第一个步骤由从针对人细胞因子免疫的人类个体分离 B 淋巴细胞组成。第一个方法组成为：通过在由多糖多聚体(Ficoll®)和重碘化合物三碘苯甲酰氨基葡萄糖混合物组成的密度梯度中离心，从外周血分离 B 淋巴细胞。

在分界面获得与红细胞及大多数多核细胞分离的单核细胞群。通过淘选方法，即通过与包被抗体的基质结合（所述抗体允许 B 淋巴细胞的特异性粘附），B 淋巴细胞群然后可以与骨髓瘤细胞融合或经过任意的补充纯化步骤。也可以经过含有包被(Coate)钢棉(steel wool)的尼龙偶联抗体的柱过滤细胞，该柱允许包括 B 淋巴细胞在内的不同细胞群的洗脱。

这些技术可以在提供高度纯化细胞群的 FACS[®]分选之前提供预备步骤。

另一个方法组成为：从组织特别是从淋巴器官（如脾、胸腺、骨髓、淋巴结）或黏膜相关淋巴组织（例如腭扁桃体）分离 B 淋巴细胞。

在局部免疫应答的情况下，可以在免疫反应位点分离淋巴细胞。

因此，将分离的淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，然后根据杂交细胞或杂交瘤对目的细胞因子的亲合力对其进行选择；然后鉴定产生具有所需特异性的抗体的杂交瘤，并通过传代培养克隆。

由这类杂交瘤产生的抗体由单克隆抗体级份(i)组成，所述杂交瘤产生针对目的细胞因子的高亲合力抗体。

在与骨髓瘤细胞融合前，也可以通过有限稀释培养进行分离并根据产生的抗体结合目的细胞因子的能力选择特定类型的 B 淋巴细胞。

然后可以分离来自 B 淋巴细胞或杂交瘤的 DNA，所述杂交瘤因其产生针对细胞因子的高亲合力抗体的能力而被选择，并可以根据分子生物学常规技术扩增编码该抗体的 DNA 序列。然后将由此扩增的 DNA 插入细胞中，从而能够表达选择的 B 淋巴细胞抗体。由此产生的抗体由级份(ii)组成。

可以根据与上文公开的关于多克隆抗体的方法一致的酶方法分离 F(ab)和 F'(ab')₂ 片段(iii)。

可以根据下列方法合成 scFv 片段(iv)或“单链可变片段”：

从来自上文公开的 B 淋巴细胞或杂交瘤的 DNA 选择编码重链可变结构域和轻链可变结构域的 DNA 序列。可以根据分子生物学常规技术通过选择特异性引物进行选择。然后将这类 DNA 与编码合成肽的序列克隆到表达载体中，所述合成肽将整个与可变结构域结合。

然后将该表达载体插入宿主细胞。下文提供适于表达抗体和抗体片段的表达载体及宿主细胞的实例。

作为非常适于合成 scfv 片段的宿主细胞的实例,可以列举由 Rippmann 等人 (1998) 公开的奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) L 型细胞。

由于 scFv 片段小,使其易于向组织内扩散,合成该片段能够获得特定优点。

也可以根据关于 sc Fv 片段公开的方法合成 F(ab)和 F(ab)₂ 片段。

根据本发明,抗细胞因子天然人中和抗体可以存在于重组抗体中,尽管这并不由本发明的优选实施方案组成。在该实施方案中,将来自 B 淋巴细胞或根据上文公开方法选择的杂交瘤的 DNA 片段进行修饰。具体地,为增强抗体可变结构域,特别为重链(VH)和轻链(VL)可变结构域对目的细胞因子的亲合力,可以随机突变编码这些片段的 DNA。也可以根据与体细胞突变类似的方法在 CDR3 区内突变可变结构域,其中 CDR3 区在天然免疫应答过程中负责抗体的成熟和亲合力。为扩增并突变 VL 和 VH 结构域,可以通过聚合酶链反应(PCR)并使用含有随机突变的与 CDR3 区互补的引物扩增编码 VL 和 VH 结构域的序列,进行体外成熟和亲合。然后对其结合目的细胞因子的能力重新筛选这些结构域,并选择对该细胞因子表现最重要亲合力的结构域。然后将编码 VL 和 VH 结构域的 DNA 重新插入编码其来源的抗体恒定区的序列内或编码任何其它免疫球蛋白恒定区的序列内。

然后将由此获得的编码完整重组抗体或 scFv 片段或 VH 或 VL 结构域的 DNA 序列引入表达载体和宿主细胞中,其中表达载体和宿主细胞的实例将在下文提供。

也可以通过使用表达噬菌体文库筛选获得本发明定义所包括的其它抗体,其中表达噬菌体文库可以使用编码 VL 和 VH 结构域的 cDNA 制备,这些 cDNA 来自人淋巴细胞的 mRNA 制备。制备这些文库的方法本身已知。关于这类表达噬菌体文库的实例,可以列举 Pharmacia 出售的“重组噬菌体抗体系统”。在美国专利 N°5.223.409 和国际申请 N° PCT WO

92/20791 中提供了获得和筛选表达噬菌体文库的实施方案。

在本发明的优选实施方案中，将例如上文公开的抗细胞因子人单克隆抗体用于选择具有结合相似细胞因子特性的 VH 和 VL 结构域。例如通过表位印记方法或通过国际申请 N° PCT WO 93/06213 中公开的方法选择。根据本发明使用的抗体文库将优选为 scFv 文库。

一旦选择了 VH 和 VL 结构域，即将其混合并根据其结合所选细胞因子的能力对其筛选。为增强对所选细胞因子亲合力，可以之后随机突变编码 VH 和 VL 结构域对的 DNA 序列。也可以根据与体细胞突变类似的方法在 CDR3 区突变 VH 和 VL 结构域对，其中 CDR3 区在天然免疫应答过程中负责抗体的成熟和亲合力。

关于因其细胞因子结合能力而被选择的 B 淋巴细胞 DNA，可以根据此后公开的方法实施体外亲合力成熟。因为出现序列差异，可以然后将所选 VH 和 VL 结构域的氨基酸序列与生殖系细胞的相应氨基酸序列比较，其中序列差异归结于例如在第一次筛选中使用的文库类型。在这种情况下，为发现最初氨基酸序列，可以在相应 DNA 序列中进行回复突变。

可以根据引入特定突变（例如定点诱变）的分子生物学常规方法实施这类回复突变。

这类选择后，可以根据常规技术将编码目的抗体的核酸克隆到表达载体中。该核酸也可以经过额外步骤，该步骤由产生本发明定义包括的其它抗体组成。例如，该步骤可以由添加编码额外的免疫球蛋白结构域（例如额外的恒定区）的序列组成。

为产生因其目的细胞因子结合能力而被选择的抗体，可以将编码重组抗体或抗体片段，特别是 VH 和 VL 结构域的 DNA 序列引入合适的细胞系中，例如用于制备杂交瘤的非抗体产生骨髓瘤细胞。

也可以将该 DNA 序列克隆到重组表达载体中，其中重组表达载体被引入到例如下文公开的哺乳动物宿主细胞内。

优选的宿主细胞是 CHO 细胞（中国仓鼠卵巢细胞）、骨髓瘤细胞 NSO、COS 细胞和 SP2 细胞。当把含有编码这些抗体、重组抗体和抗体片段的序

列的表达载体引入宿主细胞时，在长度足以在该宿主细胞中产生这些抗体或这些片段、或最好将其释放到宿主细胞所处的培养基中的时期内培养这些细胞。然后通过标准蛋白质纯化技术回收抗体。

药物组合物及施用

根据本发明的组合物优选是含有如上公开的抗细胞因子天然人中和抗体（包括抗体片段）的药物组合物。具体而言，根据本发明的组合物额外含有至少一种生理学可接受的赋形剂。

术语“生理学可接受的赋形剂”包括例如溶剂、分散剂、抗菌剂、抗真菌剂或允许达到等渗的稀释剂。在根据本发明的这些赋形剂中，可以列举水、磷酸缓冲液、右旋糖、甘油、乙醇及它们的组合。通常也优选将等张制剂例如糖、多元醇（如甘露醇或山梨醇）、或氯化钠加入该组合物。该组合物可以另外含有将增强本发明组合物效率或使用时间的辅助物质，如乳化剂、防腐剂或缓冲液。本发明的组合物可以以多种形式存在，可以是例如液体或打算在注射前灌注的固体或半固体注射剂形式。也可以考虑其它形式，例如悬浮液、分散液、片剂、粉末剂、脂质体或栓剂。与用于人被动接种本申请公开之外的抗体的组合物相似，优选的组合物是用于注射的溶液形式。这些组合物的优选施用模式是胃肠外途径（例如皮下或肌肉内途径）或静脉内。

本发明的组合物应当是无菌的，并且在常规制造和贮存条件下稳定。本发明的组合物可以是溶液、微乳状液、分散液、脂质体和其它形式。可以通过将活性成分（即抗体或抗体片段）与适量溶剂和如上所公开的其它赋形剂整合，然后通过过滤除菌而制备无菌可注射组合物。

最终可以设想本发明的组合物含有中和细胞因子活性的第一类抗体（例如上文所公开的抗体）和针对例如该细胞因子的已知受体或靶标的第二类抗体。

考虑到细胞因子的多效性作用，特别是炎症反应和感染应答当中的作用，将本发明的组合物与额外的涉及对抗炎症、感染、哮喘或移植排斥或

自身免疫病的活性成分组合是有利的。

可以与本发明的抗体组合使用的对抗炎症的治疗剂的实例为：

Budenosid、皮质类固醇、环孢霉素、柳氮磺吡啶、氨基水杨酸、6-巯基嘌呤、硝基咪唑硫嘌呤、甲硝唑、脂氧化酶抑制剂、5-氨基水杨酸、偶氮水杨酸、巴柳氮、抗氧化剂化合物、凝血酶抑制剂(thrombosane inhibitors)、IL-10 受体拮抗剂、抗 IL-1 β 单克隆抗体、抗 IL-6 单克隆抗体、弹性蛋白酶抑制剂、可溶形式的 1 类补体受体及其它。

可以与本发明的抗体组合使用、对抗感染的治疗剂的实例为抗生素、铁螯合剂、以脂肪再生的载脂蛋白 1 (apolipoprotein 1)、氧肟酸（合成的抗细菌剂）。

本发明的药物组合物可以含有“有效药物量”的本发明的抗体或抗体片段。在此“有效药物量”旨在指能够引起足够时程的所需治疗结果的给药剂量。该量依赖于多种因素（例如受治患者的病理状态、性别、重量和年龄以及抗体在患者体内诱导效应的能力）而变化。与以本发明的组合物治疗带来的好处相比，这样的量应当导致较低的副作用或毒性作用。

可为获得最佳反应而调整剂量。例如，可以通过单剂或通过以规则的时期施用若干剂而施用该药物组合物。

根据本发明的用途

考虑到本发明的组合物中所含抗体结合细胞因子的能力，可以使用常规技术例如亲和层析、“ELISA”型技术（酶联免疫吸附测定法）或“RIA”（放射免疫测定法）将本发明的抗体用于体外检测细胞因子。

本发明因此涉及检测样品中细胞因子的方法，包括将本发明的组合物与待分析样品接触的步骤和检测抗体与细胞因子之间形成的复合物的步骤。

为了便于检测复合物，可以用可检测物质标记所述抗体，例如酶（如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶）、辅基（如链酶亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素）、荧光分子（如伞形花内酯、

荧光素、罗丹明、藻红蛋白)或放射性分子(如 ^{125}I ; ^{131}I 、 ^{35}S 、或 ^3H)。

本发明也涉及通过竞争性抑制滴定来检测构成未知的样品中细胞因子的存在和量的方法。该方法使用本发明的抗体和标记的参照细胞因子。

根据该滴定方法,将生物样品、标记的参照细胞因子和本发明的抗体组合,然后测定与该抗体结合的参照细胞因子的量。样品中细胞因子的量与和本发明的抗体结合的参照细胞因子的量负相关。

本发明也涉及:

- 抗 VEGF 抗体在制造治疗癌症的药物组合物中的用途。
- 抗 FN α 抗体在制造治疗免疫抑制状态的药物组合物中的用途;
- 抗 IL-4 抗体在制造治疗过敏反应的药物组合物中的用途。
- 抗 TNF α 抗体在制造治疗免疫抑制状态的药物组合物中的用途。
- 抗 TGF β 抗体在制造治疗逆转录病毒感染或治疗癌症的药物组合物中的用途,其中癌症选自结肠癌、乳腺癌和前列腺癌。

根据本发明的治疗方法

优选本发明的组合物可以在抗细胞因子疫苗的框架内使用,作为常规接种的预备步骤,其目标是中和或阻断基质(stroma)的免疫毒性作用并允许针对抗原性攻击物调节的免疫反应的正常发生。

本发明因此也以治疗方法为目标,该方法至少包括下列步骤:

- (i) 给患者施用本发明的组合物;
- (ii) 给该患者施用含有诱导免疫应答的抗原或抗原组合的免疫原性组合物,所述免疫应答是针对该抗体或该抗原组合的所求免疫应答。

在对患者接种造成免疫崩溃的试剂,所述两步法能够重建患者的免疫应答。

实施例 1: KLH-人 VEGF 杂络物

该杂络物目的主要用于在免疫患者体内诱导产生中和人 VEGF 的抗体。

将 0.58 mg KLH 蛋白质溶解于 0.5 ml 10mM 磷酸缓冲液 (pH 8.5) 中。将溶解在 1 ml 相同缓冲液中的 1 mg 人 VEGF 加入该溶液。

然后于实验室温度以终浓度 0.026M 的戊二醛将由此获得的混合物处理 30 分钟。

通过每个持续两小时时程的三个连续透析步骤去除过量的戊二醛，其中于 4°C 以 3 kDa 截留阈的透析膜对 200 ml 磷酸缓冲液 (pH 7.6、10 mM) 透析。

然后以终浓度 33 mM 的甲醛将该混合物处理 24 小时。通过于室温以 1 小时加入终浓度 0.1 M 的甘氨酸终止反应。

然后将该混合物在与前文公开的透析步骤相同的条件下透析。

实施例 2: KLH-IFN α 杂络物的制备

该缀合物目的在于主要在免疫个体体内诱导产生中和人 IFN α 的抗体。

将 0.625 mg KLH 蛋白质溶解于 0.6 ml 磷酸缓冲液 (10mM、pH 8.5) 中。将溶解在 1 ml 相同缓冲液中的 1 mg 人 IFN α 蛋白质加入该溶液。

然后于室温以终浓度 0.026M 的戊二醛将由此获得的蛋白质混合物处理 30 分钟。

通过每个持续两小时的三个连续透析步骤去除过量的戊二醛，其中于 4°C 以 3 kDa 截留阈的透析膜对 200 ml 磷酸缓冲液 (pH 7.6、10 mM) 透析。

然后以终浓度 33 mM 的甲醛将该混合物处理 48 小时。通过于室温以 1 小时加入终浓度 0.1 M 的甘氨酸终止反应。然后将该混合物在与前文公开的透析步骤相同的条件下透析。

实施例 3: KLH-人 IL-4 杂络物的制备

该杂络物目的在于主要在免疫个体体内诱导产生中和人 IL-4 的抗体。

将 1 mg KLH 蛋白质溶解于 1 ml 磷酸缓冲液 (10mM、pH 8.5) 中。将溶解在 1 ml 相同缓冲液中的 1 mg 鼠 IL-4 蛋白质加入该溶液。

然后于室温以终浓度 0.026M 的戊二醛将由此获得的蛋白质混合物处理 30 分钟。

通过每个持续两小时的三个连续透析步骤去除过量的戊二醛，其中于 4°C 以 3 kDa 截留阈的透析膜对 200 ml 磷酸缓冲液 (pH 7.6、10 mM) 透析。

然后以终浓度 33 mM 的甲醛将该混合物处理 24 小时。通过于室温以 1 小时加入终浓度 0.1 M 的甘氨酸终止反应。然后将该混合物在与前文公开的透析步骤相同的条件下透析。

实施例 4: KLH-鼠 TNF α 杂络物的制备

该缀合物目的在于主要在免疫个体体内诱导产生中和鼠 TNF α 的抗体。

将 0.625 mg KLH 蛋白质溶解于 0.6 ml 硼酸缓冲液 10mM pH 8.8, 150 mM NaCl 中。将溶解在 1 ml 相同缓冲液中的 1 mg 人 INF α 加入该溶液。

然后于室温以终浓度 0.026M 的戊二醛将由此获得的蛋白质混合物处理 45 分钟。

通过每个持续 4 小时的三个连续透析步骤去除过量的戊二醛，其中于 4°C 以 3 kDa 截留阈的透析膜对 200 ml 磷酸缓冲液 (pH 7.6、10 mM)、150 mM NaCl 透析。

然后以终浓度 33 mM 的甲醛将该混合物处理 48 小时。通过于室温以 1 小时加入终浓度 0.1 M 的甘氨酸终止反应。

然后将该混合物在与前文实施的透析步骤相同的条件下透析。

实施例 5: VEGF 生物活性测定

以每孔 3000 个细胞的细胞密度在微量细胞培养板的平底孔中培养人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)。然后向培养的内皮细胞添加抗体的多个稀释物。细胞培养于 37°C、5% CO₂ 的潮湿空气中持续 3 天。孵育结束前 18 小时，向各孔添加 0.5 μ Ci 含氚胸苷。

中和抗体阻止鼠 VEGF 诱导内皮细胞增殖，而非中和抗体允许细胞增殖。

实施例 6: 人 IFN α 生物活性测定

以每孔 350 000 个细胞的密度在微量细胞培养板的圆底孔中培养 MDBK 细胞。然后向 MDBK 细胞添加 IFN α 的多个稀释物。

于 37°C 在 5% CO₂ 的潮湿空气中培养细胞 20 小时后，去除稀释物，清洗细胞，然后添加 100 μ l 含有 100 DL₅₀ (50% 致死剂量) 的 VSV。添加病毒 18 小时后，测量该病毒的裂解效果。

中和抗体允许 VSV 裂解细胞，而非中和抗体阻止该裂解。

实施例 7: 人 IL-4 生物活性测定

本测定使用人细胞系 TF-1 细胞，其生长依赖于人 IL-4 (Kitamura, T. 等人, 1989. J. Cell. Physiol 140 : 323-34)。以每孔 10000 个细胞的密度在微量细胞培养板的圆底孔中培养 TF-1 细胞。然后向 TF-1 细胞添加多个稀释物。细胞培养于 37°C、5% CO₂ 的潮湿空气中持续 3 天。孵育结束前 4 小时，向各孔加入 0.5 μ Ci 含氚胸苷。

中和抗体阻止人 IL-4 诱导 TF-1 细胞增殖，而非中和抗体允许这些细胞的增殖。

实施例 8: TNF α 生物活性测定

在微量细胞培养板的平底孔中培养 L929 细胞。然后向细胞添加 TNF α 的多个稀释物。细胞培养于 37°C 在 5% CO₂ 的潮湿空气中持续 3 天。孵育结束前 4 小时，加入 5 mg/ml MTT (MTT 可从 SIGMA Chemical 公司, St-Louis, Mo 获得)。

中和抗体阻止 TNF α 诱导内皮细胞死亡，非中和抗体则相反。

实施例 9: 本发明的抗体与商业提供的中和抗体之间的生物活性比较

实施例 9.1: 抗干扰素 α 多克隆抗体在人体内的产生

通过肌肉途径施用人 α 干扰素免疫一组志愿个体, 所述人 α 干扰素经过以二甲基甲酰胺化学处理失活。在 0 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 42 天给每个志愿个体注射 710 μg 失活的 IFN α 。

以时间函数确定抗干扰素 α 抗体的产生曲线。在产生峰值(当由此产生的抗 IFN α IgG 同种型免疫球蛋白的水平约为每毫升 9.5 μg 时), 从各免疫个体内抽取血液样品 20 ml, 并制备血清库。通过 ELISA 确定该血清库的抗 α 干扰素活性, 抗体效价为 128 000 (给定 0 天的稀释度为 0.300 的稀释度的倒数)。

通过以 35% 饱和度的硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀从该血清库的部分分离 IgG 级份。透析后, 由此以 80% 的得率获得含有中和 IFN α 活性的 IgG 抗体的溶液, 其呈现的 ELISA 结果为 512 000。

抗 α 干扰素全血清和来自其中的 IgG 的中和能力(允许抑制 1 UI 人 α 干扰素 50% 生物活性的抗体量)分别为 0.004 μg 和 0.001 μg 。

表 1

	实施例 9.1 的抗体	兔多克隆 抗体(1)	绵羊多克 隆抗体(2)	小鼠单克 隆抗体(3)
人 IFN α (1 UI)	0.04 μg	0.01 μg	0.0005 μg	0.8 μg

表 1 建立了如上公开产生的抗 α 干扰素多克隆抗体的中和能力与商业提供抗体的中和能力之间的比较。如上公开产生的抗体获得的中和能力比小鼠单克隆抗体获得的效价约高 200 倍。

(1) 抗 IFN α 兔多克隆抗体, 可从 PBL Biomedical Pharmaceutical 公司获得, 目录 n° 31 100-1。

(2) 抗 IFN α 绵羊多克隆抗体, 可从 PBL Biomedical Pharmaceutical 公司获得, Ser. N° 31130-1。

(3) 抗 IFN α 小鼠单克隆抗体, 可从 PBL Biomedical Pharmaceutical 公司获得, Ser. N° 21105-1。

实施例 9.2: 抗 IL-4 多克隆抗体在人类个体内的产生

通过肌肉施用 KLH-人 IL-4 缀合物免疫人志愿受试者。

在 0 天、第 21 天和第 60 天给个体受试者注射 120 μ g 经二甲基甲酰胺化学失活的人 IL-4。

以时间函数确定抗 IL 抗体的产生曲线。在抗体合成的峰值(当由此产生的抗 IL-4 IgG 同种型免疫球蛋白的水平约为 12 μ g/ml 时), 进行血液取样并收集抗 IL-4 血清。血清活性的 ELISA 测量给出 512,000 的抗体效价(给定 ELISA 测量值为 0.300 的血清稀释度的倒数)。分离含有抗 IL-4 抗体的 IgG 级份后, 以胃蛋白酶消化该级份, 并以 60% 的得率收集 F(ab')₂ 抗体片段。ELISA 活性测定给出测量值 310,000。确定抗 IL-4 全血清的中和能力(允许抑制 0.5 ng 白介素 4 的 50% 生物活性的抗体量)为 0.02 μ g, 对于 F(ab')₂ 片段为 0.1 μ g。

表 2

	实施例 9.2 的抗体	山羊多克 隆抗体(1)	兔多克隆 抗体(2)	小鼠单克 隆抗体(3)
人 IL-4(0.5 ng)	0.02 μ g	0.08 μ g	0.01 μ g	1 μ g

表 2 建立了如上公开产生的抗 IL-4 多克隆抗体的中和能力与商业提供抗体的中和能力之间的比较。如上公开产生的抗体获得的抗体效价比小鼠单克隆抗体获得的抗体效价约高 50 倍。

(1) 抗 IL-4 山羊多克隆抗体, 可从 R&D 公司获得, 目录 N° AF-204-NA。

(2) 抗 IL-4 兔多克隆抗体, 可从 Peptotech 公司, 目录 N° 500-P24。

(3) 抗 IL-4 小鼠单克隆抗体, 可从 R&D 公司获得, 目录 N° MAB204。

实施例 9.3: 抗鼠 VEGF 多克隆抗体在小鼠中的产生

使用与实施例 7.1 和 7.2 公开方法的类似方法。通过使用 KLH-鼠 VEGF 杂络物免疫一组 20 只小鼠。在 0 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 42 天给每只小鼠注射 20 μ g 由二甲基甲酰胺化学活化的 VEGF。

参照抗 VEGF 抗体产生曲线, 于应答高峰在所有小鼠中进行血液取样, 并制备抗 VEGF 血清库。

通过以饱和度 35% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀分离 IgG 级份。测定 ELISA 活性，等于 256 000，IgG 级份的中和活性（允许抑制 0.5 ng 鼠 VEGF 活性的 50% 的抗体量）为 0.012 μg 。

表 3

	实施例 9.3 的抗体	山羊多克 隆抗体(1)	兔多克隆 抗体(2)	小鼠单克 隆抗体(3)
VEGF(0.5 ng)	0.012 μg	0.001 μg	0.007 μg	0.003 μg

表 3 建立了如上公开产生的抗鼠 VEGF 多克隆抗体的中和能力与商业提供抗 VEGF 抗体的中和能力之间的比较。

(1) 抗 VEGF 山羊多克隆抗体，可从 R&D 公司获得，目录 AF-293-NA。

(2) 抗 VEGF 兔多克隆抗体，可从 Peprotech 公司获得，Ser.N° 500-P10。

(3) 抗 VEGF 小鼠单克隆抗体，可从 R&D 公司获得，目录 N°MAB293。

实施例 9.4: 抗人 $\text{IFN}\alpha$ 重组单克隆抗体的产生

材料:

人外周血单核细胞(PBMC)来自以化学活化的人 $\text{IFN}\alpha$ 免疫的受试者。

从 B95-8 细胞系的培养上清液制备 EB 病毒(EBV)，并以 10^5 TD_{50}/ml 的浓度使用。

培养:

在 Ficoll 密度梯度上纯化人 PBMC，然后以病毒感染。然后以添加 20% 胎牛血清 SVF (Gibco BRL, Life Technologies) 的 RPMI 1640 (培养基) (Gibco BRL, Life Technologies) 在圆底 96 孔培养板上以 5×10^3 - $10^4/\text{ml}$ 的细胞浓度培养 EBV 转化的细胞。每四天时期更换培养基。细胞培养 4 至 6 周后，将细胞转移到 24 孔板中，最后转移到六孔培养板中。然后通过 ELISA

技术分析培养上清液。

产生抗 IFN α 单克隆抗体的克隆的选择

选择产生抗 IFN α 抗体的克隆并进行大量细胞培养。通过在琼脂糖 A 蛋白柱上的吸附从培养上清液纯化单克隆抗体。通过吸附纯化由此产生的单克隆抗体。含有纯化的抗 IFN α 单克隆抗体的溶液具有 1 mg/ml 单克隆抗体的含量，其中和活性（抑制 1 UI IFN α 活性的 50% 的能力）或 ND50 等于 0.7 μ g。

通过使用本领域技术人员所熟知并在本申请中公开的噬菌体展示技术，这些单克隆产生代表用于产生抗人 IFN α 人单克隆抗体的高产率细胞材料的高亲和力抗体。

表 4

	实施例 9.4 的抗 体	兔多克隆 抗体(1)	绵羊多克 隆抗体(2)	小鼠单克 隆抗体(3)
人 IFN α (1 UI)	0.7 μ g	0.01 μ g	0.0005 μ g	0.8 μ g

表 4 建立了如上公开产生的 IFN α 单克隆抗体的中和能力与商业提供抗体的中和能力之间的比较。

如上公开产生的抗体获得的抗体效价比小鼠单克隆抗体获得的抗体效价约高 50 倍。

(1) 抗 IFN α 兔多克隆抗体，可从 PBL Biomedical Pharmaceutical 公司获得，目录 N° 31100-1。

(2) 抗 IFN α 绵羊多克隆抗体，可从 PBL Biomedical Pharmaceutical 公司获得，目录 N° 31130-1。

(3) 抗 IFN α 小鼠单克隆抗体，可从 PBL Biomedical Pharmaceutical 公司获得，Ser. N° 21105-1。

实施例 10: 通过双夹层 ELISA 技术确定与蛋白质载体分子(KLH)结合的

细胞因子的百分数

使用特异性抗载体蛋白质的捕捉抗体通过双夹层 ELISA 技术测定与蛋白质载体分子(KLH)连接的细胞因子的百分数。

于 37°C 将 100 μ l 稀释于磷酸缓冲液 (10 mM, pH 7.3, NaCl 150 mM) (PBS) 中的马抗 KLH 多克隆抗体 (1 mg/ml) 在微量滴定板 (高结合, Costar) 的孔中固定 2 小时。在 PBS/0.1% Tween 20 (PBST) 中清洗 3 次后, 以含有 2% BSA 的 PBS 使孔饱和, 为期 1 小时 30 分钟的饱和作用之后, 将孔以 PBST 清洗三次, 然后将杂络物的两倍稀释物 (10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 和 0.156 μ g/ml) 一式两份加入孔中 (100 μ l/孔)。孵育 2 小时后, 将孔以 PBST 清洗三次。存在于清洗缓冲液中的解离剂能够去除与 KLH 非共价结合的所有分子, KLH 特异性固定在捕捉抗体上。然后, 根据两种方式处理两个杂络物稀释物:

- a) 将第一个系列与抗 KLH 抗体孵育,
- b) 将第二个系列与抗该细胞因子的抗体孵育。

于 37°C 1 小时 30 分钟的孵育期后, 如上所述将孔清洗并与偶联过氧化物酶的二级抗体孵育, 所述二级抗体抗一级抗体来源的动物物种。于 37°C 1 小时 30 分钟的孵育期后, 将孔再次清洗。然后添加过氧化物酶底物 (即邻苯二胺(OPD)) 得以显示与捕捉抗体结合的 KLH 及与 KLH 共价连接的细胞因子的存在。

使用采用 ELISA 技术完成的定标曲线计算与捕捉抗体结合的 KLH 的量及与 KLH 共价结合的细胞因子的分子的量。

然后确定与 KLH 共价结合的共价结合细胞因子的百分数。

参考文献:

Eastcott JW, Holmberg CJ, Dewhirst FE, Esch TR, Smith DJ, Taubman MA. (2001) Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid. Vaccine. 2001 Feb 8;19(13-14):1636-42.

Gallichan WS, Woolstencroft RN, Guarasci T, McCluskie MJ, Davis HL, Rosenthal KL. (2001) Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. J Immunol. 2001 Mar 1;166(5):3451-7.

Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, Piao YF, Miyazono K, Urabe A, Takaku F.. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. J Cell Physiol Aug;140(2):323-34.

McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL (2000) Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution. Mol Med. Oct;6(10):867-77.

Rippmann JF, Klein M, Hoischen C, Brocks B, Rettig WJ, Gumpert J, Pfizenmaier K, Mattes R, Moosmayer D. (1998) Procaryotic expression of single-chain variable-fragment (scFv) antibodies: secretion in L-form cells of *Proteus mirabilis* leads to active product and overcomes the limitations of periplasmic expression in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 1998 Dec;64(12):4862-9.