

[19] 中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1063227A



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91112738.0

[51] Int.Cl⁵

A61K 37/42

[43] 公开日 1992 年 8 月 5 日

[22] 申请日 91.12.18

[30] 优先权

[32] 90.12.19 [33] US [31] 629,800

[71] 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 E·J·罗兹洪 J·F·奥康内尔
S·A·考克斯 M·D·海勒
J·施瓦茨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 曹恒兴

说明书页数: 11 附图页数: 5

[54] 发明名称 使用 IL-4 增强对疫苗中免疫原的免疫反应

[57] 摘要

公开了 IL-4 制造药物的应用, 含有 IL-4 和其适于药用载体的医药组合物, 以及与疫苗一起给哺乳动物使用有效量的 IL-4, 更好是重组人或大肠杆菌衍生的 IL-4, 以提高所说的哺乳动物对存在于所说疫苗如破伤风类毒素疫苗中的免疫原的初级免疫反应的方法。

△NOV

权 利 要 求 书

1. IL-4 在制造药物上的应用, 与疫苗一起给哺乳动物使用有效量的 IL-4, 用以提高所说的哺乳动物对存在于所说疫苗中的免疫原的初级免疫反应。

2. 用于提高哺乳动物对存在于疫苗中免疫原的初级免疫反应的医药组合物, 所说的组合物包含对于这种提高为有效量的 IL-4 及医药上可接受的载体。

3. 提高哺乳动物对存在于疫苗中的免疫原的初级免疫反应的方法, 其包括与所说的疫苗一起给所说的哺乳动物使用有效量的 IL-4。

4. 根据前述任一权利要求的医药组合物的应用或方法, 其中是将 IL-4 与所说的疫苗同时给予所说的哺乳动物的。

5. 根据前述任一权利要求的医药组合物的应用或方法, 其中 IL-4 是经胃肠道外途径给药的。

6. 根据前述任一权利要求的医药组合物的应用或方法, 其中投予的是人 IL-4, 更好是大肠杆菌衍生的重组人 IL-4。

7. 根据前述任一权利要求的医药组合物的应用或方法, 其中 IL-4 的给药量范围为每天每公斤体重 0.25 至 15 微克。

8. 根据前述任一权利要求的医药组合物的应用或方法, 其中疫苗是病毒疫苗或细菌疫苗或类毒素疫苗。

9. 根据前述任一权利要求的医药组合物的应用或方法, 其中类毒素疫苗是破伤风类毒素疫苗。

10. 用于提高哺乳动物对疫苗中免疫原之初级免疫反应的药

盒，其包含(1) I L - 4 和其医药上可接受的载体的医药组合物的容器及(2)疫苗和其医药上可接受的载体的医药组合物的容器。

说 明 书

使用 I L - 4 增强对疫苗中免疫原的免疫反应

本发明涉及含有白细胞介素 4 作为活性成分，以提高哺乳动物对疫苗中免疫原的初级免疫反应的医药组合物。本发明还涉及使用白细胞介素 4 制造医药，用于提高哺乳动物对存在于疫苗中的免疫原的初级免疫反应，以及与所说的疫苗一起给所述的哺乳动物使用有效量的白细胞介素 4，用以提高哺乳动物对存在于疫苗中免疫原的有效初级免疫反应的方法。

白细胞介素 4 [下文简称“ I L - 4 ”，也有时称为 B 细胞刺激因子 1，(B S F - 1)] 最初是由 M. Howard 等人 (J. Exp. Med. (1982), Vol. 155, pp. 914-23) 作为 T 细胞衍生的生长因子描述的，不同于 I L - 2，它可使正常小鼠 B 淋巴细胞进行长期组织培养，并可与激活的 B 淋巴细胞相互作用，以维持其增殖长达 4 个月。虽然混合的 B 淋巴细胞移植体已被用于初始培养，但似乎具有未成熟表型的 B 淋巴细胞可因组织培养物中 I L - 4 的存在而特异地增加。如参见 Perchel 等人, (J. Immunol. (1989), Vol. 142, 1558-1568), 另外, G. Trenn 等人 (J. Immunol. (1988). Vol. 140, 1101-1106) 报导 IL-4 可刺激来自静止小鼠 T 淋巴细胞中之 L y t - 2 + 亚群的细胞毒性 T 细胞的发育; H. Spits 等人 (J. Immunol. (1987) . Vol. 139, 1142-47) 述及，不同于 I L - 2，I L - 4 可以作为体外 T 细胞的 T 细胞生长因子。

已克隆并在 C O S - 7 细胞中表达了小鼠 I L - 4 基因 (参见 T .

Otsuka 等人, Nuc. Acids Res.(1987), Vol. 15, 333-334)。在组织培养物中该克隆的因子具有见于从T细胞培养上清液中纯化之因子的所有活性。N.Arai 等人 (J.Immunol. (1989).Vol. 142, 274-282) 和T.Yokota 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. (1986), Vol 83, 5844-5848)已描述人 IL-4 基因的克隆和表达, 且在 COS-7 细胞中产生的这种因子与组织培养中研究过的天然分子具有相似的活性。随着在人和小鼠细胞系统对 IL-4 的研究, 进而发现了该分子的其他一些体外活性: (i) IL-4 在诱导和调节 IgE 合成中起着重要作用, 一个伴随 B 淋巴细胞亚群发生的过程被诱导成为增殖过程 (参见 Pene, J.Proc. Nat'l. Acad. Sci.(1988), Vol 85, 6880-6884); (ii) 在组织培养物中, IL-4 诱导了正常人 B 淋巴细胞上的低亲和性 Fc ϵ 受体 (CD 23) (参见 T. DeFrance 等人, J.Exp.Med. (1987). Vol. 165, 1459-1467); (iii) IL-4 与其他淋巴细胞活素, 特别是 γ 干扰素 (参见 R. L. Coffman 等人, Immunol. Res. (1988). Vol. 102, 5-27 和 S.Romagnani 等人, 文献同上), 和 T 细胞 (参见 R. L. Coffman 等人, 文献同上, S. Romagnani 等人, 文献同上, 和 M. D. Widmer 等人, Nature, (1987), Vol.326, 795-98) 相互作用, 引起 B 细胞增殖和改变; (iv) IL-4 增加特异性抗体类如人 B 细胞之 Ig 的分泌 (参见 J. B. Splawski 等人 J. Immunol (1989). Vol 142, 1569-1572)。 (V) IL-4对T细胞肥大细胞和巨噬细胞具有刺激效应 (参见K.H. Grabstein 等人 J.Immunol. (1987) Vol. 139, 1148-1153; F.Lee等人, Proc. Natl.Acad.Sci. (1986), Vol 83. 2061; 和A.Zlotnik等人 J. Immunol (1987), Vol. 138, 4275-4279); 和(vi) IL-4 增加MHC II类抗原在静止B细

胞上的表达(R.Noelle 等人, PNAS 81. 6149-6153, 1984), T.R. Mosmann等人(J. Immunol. Vol. 138, 1813-1816) 公开了在氨基酸序列1-90和129-149有50%同源性和小鼠IL-4为种特异的。

在共有美国专利申请序号 0 7 / 4 9 6 , 8 3 2 (申请日 9 0 年 3 月 2 1 日) 和相应于 P C T 申请的 U S - 9 1 / 0 1 7 3 3 (申请日 1 9 9 1 年 3 月 1 9 日) 中, 公开了使用 I L - 4 增强对感染性抗原攻击, 如病毒、细菌、真菌或原生动植物衍生的慢性感染的免疫反应。

本发明提供了 I L - 4 在制造药剂方面的应用, 经与疫苗合用, 给予所述哺乳动物以有效量的 I L - 4 , 用以提高所说的哺乳动物对存在于所说疫苗中的免疫原的初级免疫反应。

本发明还提供了一种用于提高哺乳动物对存在于疫苗中的免疫原的初级免疫反应的医药组合物, 所述的组合物包含具有这种提高作用的有效量的 I L - 4 及一种医药上可接受的载体。

本发明还提供了一种提高哺乳动物对存在于疫苗中之免疫原的初级免疫反应的方法, 其包括与所述的疫苗一起对所述的动物使用对这种提高为有效量的 I L - 4 。

本发明还提供了一种提高哺乳动物对存在于病毒疫苗中免疫原的初级免疫反应的方法, 其包括与所述的疫苗一起给所述的哺乳动物使用诱导有效量的 I L - 4 。

本发明进一步提供了提高哺乳动物对存在于抗破伤风类毒素疫苗中免疫原的初级免疫反应的方法, 其包括为上述目的, 与破伤风类毒素疫苗一起给所述的哺乳动物使用有效量的 I L - 4 。

本发明还提供了提高哺乳动物对存在于疫苗中免疫原的初级免疫反应的方法, 其中由所说的哺乳动物产生的初级免疫反应在没有 I L

- 4 存在的情况下，不能足够强或快地预防疾病，该方法包括为此目的，与所说的疫苗一起，给所说的哺乳动物使用有效量的 I L - 4。

本发明还提供了用于提高哺乳动物对存在于疫苗中免疫原的初级免疫反应的药盒，其包含(1) I L - 4 医药组合物和其药用载体的容器，以及(2)疫苗的医药组合物和其药用载体的容器。

图 1 图群显示按照本发明方法，对犬猴投予重组人 I L - 4 和破伤风类毒素疫苗所达到的免疫反应的依时间次序的变化表。

图 2 - 5 图群显示，按本发明方法对犬猴模型投予 0 . 5 mcg/kg 和 20mcg/kg 的重组人 I L - 4 和破伤风类毒素疫苗后，作为时间的函数出现抗破伤风类毒素疫苗的破伤风抗体的情况。

我们已令人惊异地发现，给犬猴使用重组人 I L - 4 (下称“rh I L - 4”)同时合用破伤风类毒素疫苗，可提高猴的初级免疫反应。这一结果是特别令人惊异的，因为在给予重组乙型肝炎病毒疫苗 (rHBVax) 后约两个月用 rHBVax 作加强接种期间对犬猴投予 rhIL-4 时，以及在使用 Salk 失活的脊髓灰白质类病毒疫苗后约一个月，用 Salk 失活的脊髓灰白质类病毒疫苗作加强接种期间对犬猴投予 r h I L - 4 时，没有抗体再生反应，即没有观察到次级或记忆反应。本发明提供的联合给予 I L - 4 和疫苗的方法具有下列优点。因为在 I L - 4 存在下，较少抗原即引发至少相当于单用疫苗即可达到的免疫学反应，故可减少上述待用疫苗的总抗原量。因为按照本发明给予 I L - 4 时，每次疫苗接种只需要较少抗原，故可减少出现与目前使用的某些疫苗有关的不良付作用的可能性。再者，因为只须用较少免疫原即可达到有效的保护作用，故可降低用于每个病人之疫苗的总费用。对于某些对疫苗接种反应差的个体，可按照本发明给予 I L - 4 以提高其免疫

反应。可从本发明方法中得到好处者包括下列类型的个体：(1)具有受损伤的免疫反应性的各类型个体，如有某些免疫缺陷的新生儿，(2)对某些疫苗无反应的假定为正常的个体，以及(3)经受免疫抑制治疗如经受照射和皮质类固醇类治疗的个体。

因此，我们已发现了(1)提高这些哺乳动物对疫苗中免疫原的有效初级免疫反应的方法；(2)提高接触疫苗中免疫原之哺乳动物体内有效抗体水平的方法；以及(3)提高哺乳动物对存在于疫苗中的免疫原的初级免疫反应的方法，其中在没有 I L - 4 存在情况下，所说哺乳动物的免疫反应不能足够强或快地防止疾病。在没有 I L - 4 存在时，所说哺乳动物的免疫反应可能不会足够强或快地防止所说哺乳动物体内的疾病，但我们已发现了解决这一问题的方法，该方法包括给这样的哺乳动物使用对各个目的来说为有效量的 I L - 4，更好是重组人 I L - 4。

按照本发明，可考虑使用的疫苗包括用于人体主动免疫的细菌疫苗、类毒素疫苗（灭活的毒素）及病毒疫苗或其混合物（“多抗原”）（如参见名为“Immunizing Agents”75章in Remington's Pharmaceutical Sciences 14th Edition, 1990 Mack Publishing Co. P 1426-1441）以及由 F D A 批准并列于Physician's Desk Reference, 44th Ed. 1990 的210页（产品目录索引）上的抗毒素、类毒素、疫苗和活疫苗。适用的疫苗包括抗下列疾病实体或疾病状态的细菌疫苗：霍乱、百日咳、鼠疫、伤寒、脑膜炎、肺炎球菌性肺炎、乙型溶血性流感病毒感染、麻风病、淋病、B组脑膜炎双球菌、B组链球菌、革兰氏阴性菌、大肠杆菌及铜绿色极毛杆菌感染。适用的类毒素包括白喉类毒素、肉毒杆菌类毒素及破伤风类毒素。适

用的病毒疫苗包括抗下列疾病或疾病状态的活的或失活的病毒疫苗：脊髓灰质炎、麻疹、黄热病、流行性腮腺炎及乙型肝炎。

适用的“多抗原”包括白喉和破伤风类毒素、三联抗原—白喉、百日咳和破伤风类毒素，如得自connaught Laboratories, Inc. Swiftevater, PA 18370. 的三联抗原。在D. O. White & F. Fenner, Medical Virology, (1986) 3rd Edition Academic Press Inc. Orlando, Fla. 一书中第10章（题目为“Immunization against viral diseases”）表10-6和10-7（分别在第4页，第283-301页27行）中公开了在不同国家和免疫程序中使用的多种病毒株及细胞基质。

术语“与……合用”是指在给予疫苗期间或给疫苗前差不多同时给予IL-4。例如可在给予适当疫苗前或后给予IL-4计10至14天。一般情况下应在使用适当疫苗之前给予IL-4达足够时间，以便使哺乳动物淋巴组织中有稳定的IL-4水平。可使用常规药物动力学方法检测这一水平。在使用疫苗后连续给予IL-4达一定时间，以使存在于疫苗中的免疫原受到该哺乳动物免疫系统加工，并保证IL-4能提供一个增强的初级免疫反应。可按照对每种疫苗的推荐的途径和强度使用之。

任何适当的IL-4均可应用于本发明。IL-4的互补DNA（cDNA）目前已在许多实验室被克隆并测定了序列，如参见Yokota等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1986) Vol 83: 5894-5898（人），Lee. 等人Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1986) Vol. 83: 2061~2065（小鼠）；Noma等人，Nature (1986) Vol. 319: 640-646（小鼠）；及Genzyme Corporation, Boston,

Massachusetts (人和小鼠) , 此外, 也已从各种培养物上清液中纯化了非重组的 I L - 4 , 如参见Sanderson 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1986) Vol. 83:437-440 (小鼠) ; Grabstein等人, J. Exp. Med. (1985) Vol. 163:1405-1413 (小鼠) ; Ohara等人, J. Immunol. (1985) Vol. 135:2518-2523 (小鼠 B S F - 1) ; Butler等人, J. Immunol. 133: (1984) Vol. 251-255 (人 B C G F) , 和 Farrar等人, J. Immunol. (1983) Vol. 131:1838-1842 (小鼠 BCGF) 。上述所有涉及 D N A 和氨基酸序列和得到适用于本发明的 I L - 4 材料的方法的文章均列入本文参考文献。

用于本发明的 I L - 4 较好是人 I L - 4 , 更好是在大肠杆菌中表达并由其中分离的 (美国专利申请 079, 666 号, 申请日 1987 年 7 月 29 日和 194, 799 号, 申请日 1988 年 7 月 12 日), 具有 Yokoto 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) Vol. 83: 5894-5898 和 PCT 专利申请 87/02990 号, 1987 年 5 月 21 日公开) 所述序列的人变体。在共有美国专利申请 S N 386, 937 (1989 年 7 月 28 日申请) 中描述了从 C H O 细胞生产 I L - 4 的方法。共有美国专利申请 S N 429, 588 (申请日 1989 年 10 月 31 日) 中描述了从大肠杆菌产生 I L - 4 的方法。上述文章, P C T 申请和美国专利申请均列为本文参考文献。

本文中所用的术语“有效量”即按照本发明给予有效量的 I L - 4 , 意思是指所给 I L - 4 的量引起抗体水平提高, 足以增加抗感染因子的保护作用。抗体水平的精确增加可被看作是相当小的。所给予的 I L - 4 的有效量一般较好是每天每公斤体重 0 . 25 至 15 微克, 且较好是由大肠杆菌或 C H O 细胞重组产生的人 I L - 4 。更好

是哺乳动物每天每公斤体重使用 0.25 至 5 微克 rhIL-4, 且最好是每天每公斤体重 0.25 至 1 微克 rhIL-4。

给药量, 频率及期间可依据特定抗体的浓度水平、被诱导之抗体的类别、疫苗类型及病人年龄、营养条件等因素而异。一般最初是每天给药, 并可在病人终生周期性连续使用。可在最初检查特定抗体浓度期间确定给药剂量和频率, 并在抗体浓度增加的基础上放大 IL-4 的效应。

可选用静脉内、鼻内、胃肠道外、口服、皮下、肌肉内、局部、透皮或任何其他可接受的方法给药。IL-4 可按任何数目的常规剂量形式给药, 胃肠道外给药制剂包括无菌溶液剂或悬浮剂。可以鼻内或口内喷雾剂的形式进行吸入或吹入给药。局部用药的剂型包括乳剂、软膏、洗剂、透皮植入剂(如带常用储药池或基质贴片者)等。

可使用常规技术, 用常规药用赋形剂及添加剂制备包含于上述剂型中的药物组合物。

目前, 优选通过静脉内途径使用 IL-4。可将 IL-4 的冻干粉末重新配成溶液剂并可另外含有防腐剂、缓冲剂、分散剂等。

可用 10 微摩尔有适当 pH 的柠檬酸缓冲剂和无防腐剂无菌水重新配制 IL-4, 使其最大浓度不超过每毫升 100 微克, 并经连续静脉内输注或静脉注射给药。连续输注时, 可将每日剂量加到 5 ml 生理盐水中并借助蠕动泵或重力进行输注。

材料和方法

下述实验中使用的重组 IL-4 是由 CHO 产生的, 有关其制备方法已在美国专利申请 SN 386, 937 (申请日 1989 年 7 月 29 日) 中述及。

实验设计：

猴：

由东南亚得到的成年雄性犬猴 (Cynomolgus monkeys) 购自商业来源，如 Hazelton and Charles River Laboratories。使用前所有猴最少隔离 90 天。

破伤风类毒素和动物接种：

用于本实验中的破伤风类毒素疫苗是注册登记的得自 Lederle Laboratories, Pearl River, NY 10965 的破伤风类毒素流体 tetanus toxoid purgonated[®]。

在开始进行该项研究之前，用灵长动物细胞巨大病毒 (PCMV) 感染 15 只成年雄性犬猴。此时，所有动物均表现有可检测浓度的 PCMV 抗体。设置这一内部对照组的目的是试验 IL-4 治疗是否会非特异地影响抗体水平。因为没有给予 PCMV 疫苗，所以我们期望 IL-4 不会引起抗 PCMV 抗体水平的提高。用于检测抗体反应的标准方法是针对 PCMV 的放射免疫检测法及针对 rHB Vax 和 Salk 灭活之脊髓灰质炎病毒疫苗的固相放射免疫检测法 (参见 Berzofsky, J.A. 等人, "Antigen-Antibody Interactions and Monoclonal Antibodies" "In Fundamental Immunology", (1989) 2nd Edition (W.E. Paul ed.) 的 P 315-356 Raven Press N.Y., N.Y.)。

放血得到用于检测 PCMV 和破伤风类毒素抗体的血液，在给予 IL-4 之前每周检测 1 次共 9 周 (图 1 中的 2-7)，且在本研究中每周检测 2 次共 22 周 (8 至 30)。静脉注射给予 rhIL-4 给药量为每天剂量水平的两倍 (5.0 和 20.0 $\mu\text{g/Kg/天}$, B.I.D.)。在第 8 周中期和第 12 周中期开始给予安慰剂并共连续

25天。在给予rh IL-4后的第11天, 对15只猴各肌肉注射破伤风类毒素疫苗(0.5ml含有5Lf单位破伤风类毒素)。对三组所作破伤风类毒素抗体浓度检测结果(组平均值)示于图2和表1中。图2图群显示, 与对照组和20 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{天}$ 组相比, 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 天组提高了抗体生成反应。5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 组的反应(示于图2和4)实质上比图2和3中所示的对照组的反应更显著。

表1显示: (1)在破伤风类毒素疫苗接种后4-6周, 接受5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ IL-4的实验组比使用安慰剂的对照组有实质上更高的抗体浓度; (2)在疫苗接种后7-9周, 所有接受IL-4(5.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 和20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$)的两组比安慰剂对照组有更高的破伤风抗体浓度。

表1

对初级破伤风疫苗的抗体反应: IL-4的效应

组	IL-4剂量水平 ⁽¹⁾	11周	12-13周	14-16周	17-19周
I	0	37 $\pm$ 21 ⁽²⁾	2127 $\pm$ 606	2456 $\pm$ 488	1223 $\pm$ 139
II	5	49 $\pm$ 30	2178 $\pm$ 529	5333 $\pm$ 697	3973 $\pm$ 631
III	20	46 $\pm$ 20	1560 $\pm$ 228	2355 $\pm$ 152	1677 $\pm$ 227

(1) - $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 动物体重

(2) - 数值代表不同时间后的平均抗体浓度;

N=每组5只猴($\pm$ = S. E. M.)

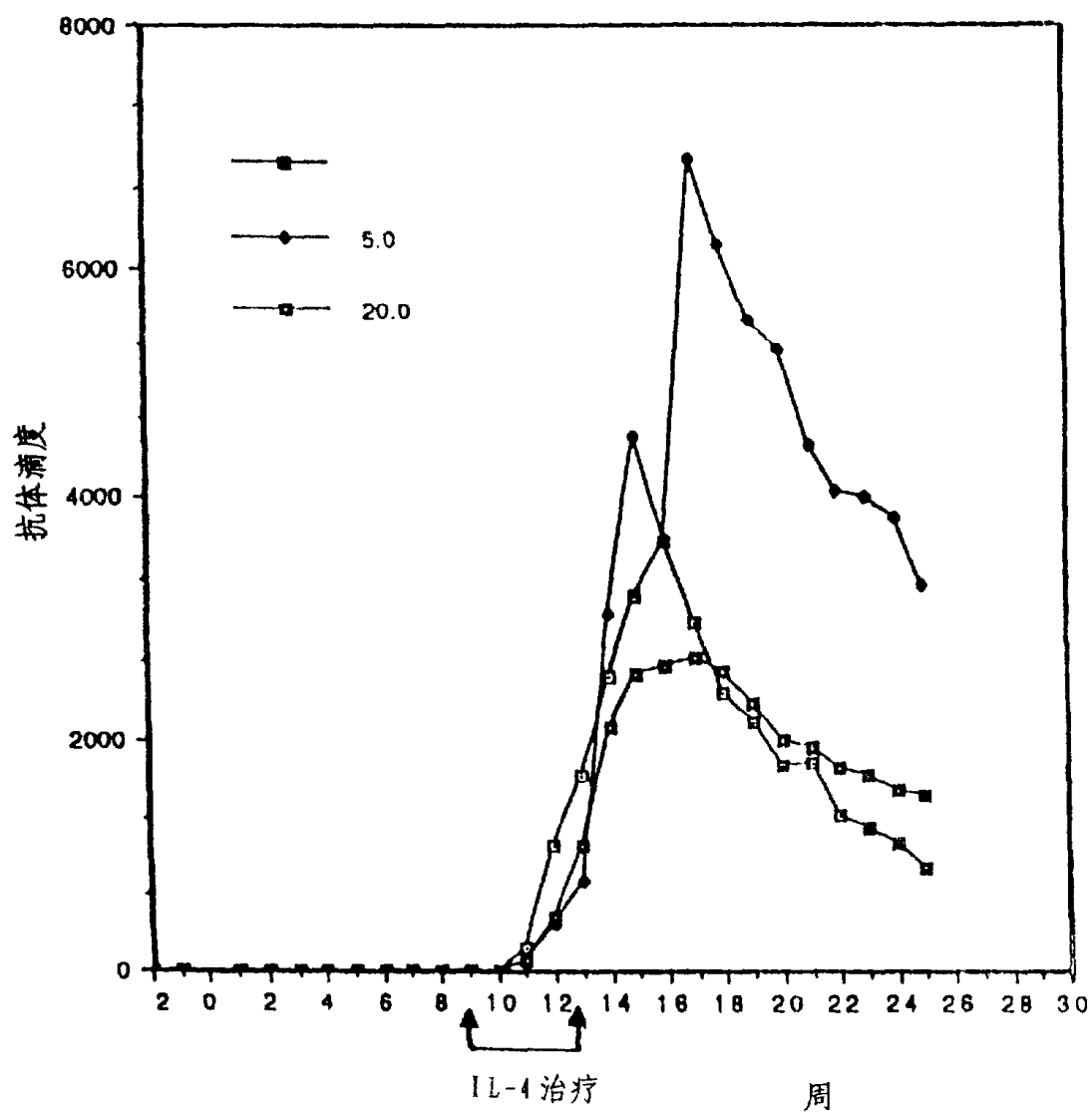
综观上述实验结果 可期望 IL-4, 特别是rh IL-4 能在哺乳动物初次接触疫苗后, 使该免疫反应不能足够强或快地阻止疾病的

哺乳动物提高免疫反应。

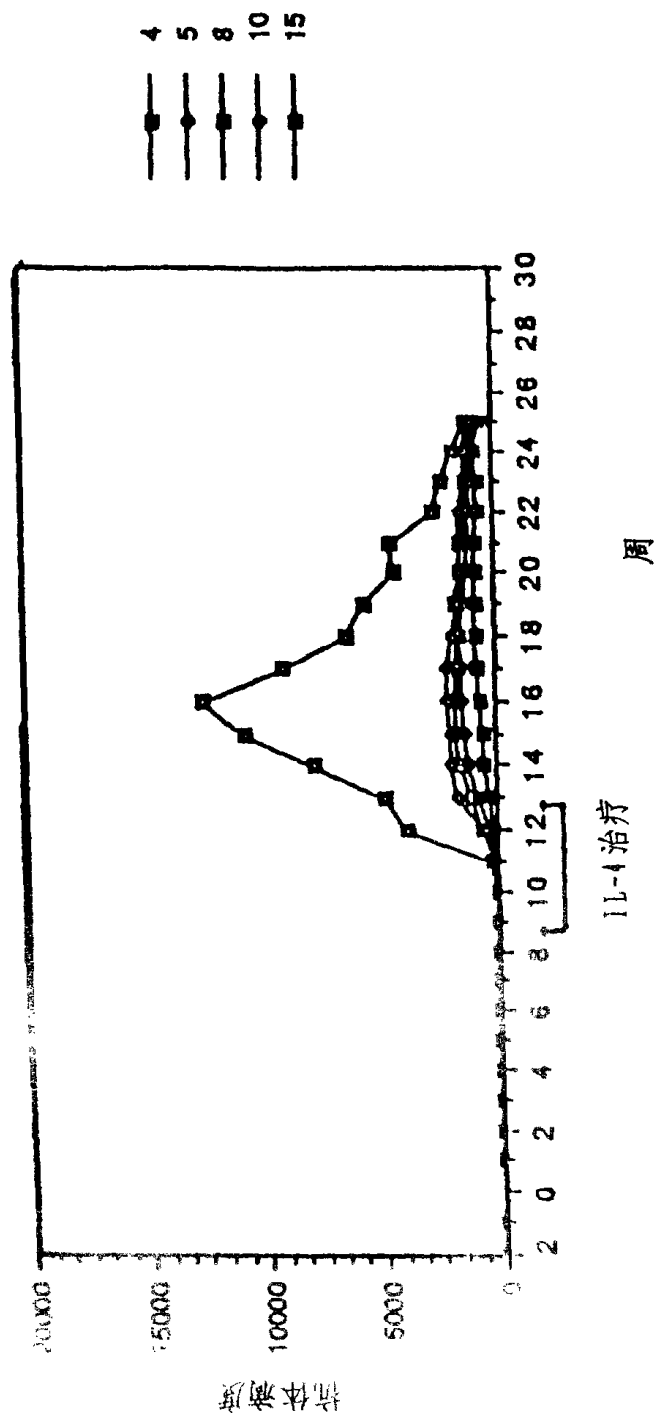
同时可望对于细菌和病毒疫苗及它们与类毒素的混合物也能获得相似结果。

图 2

破伤风抗体滴度: 组平均值

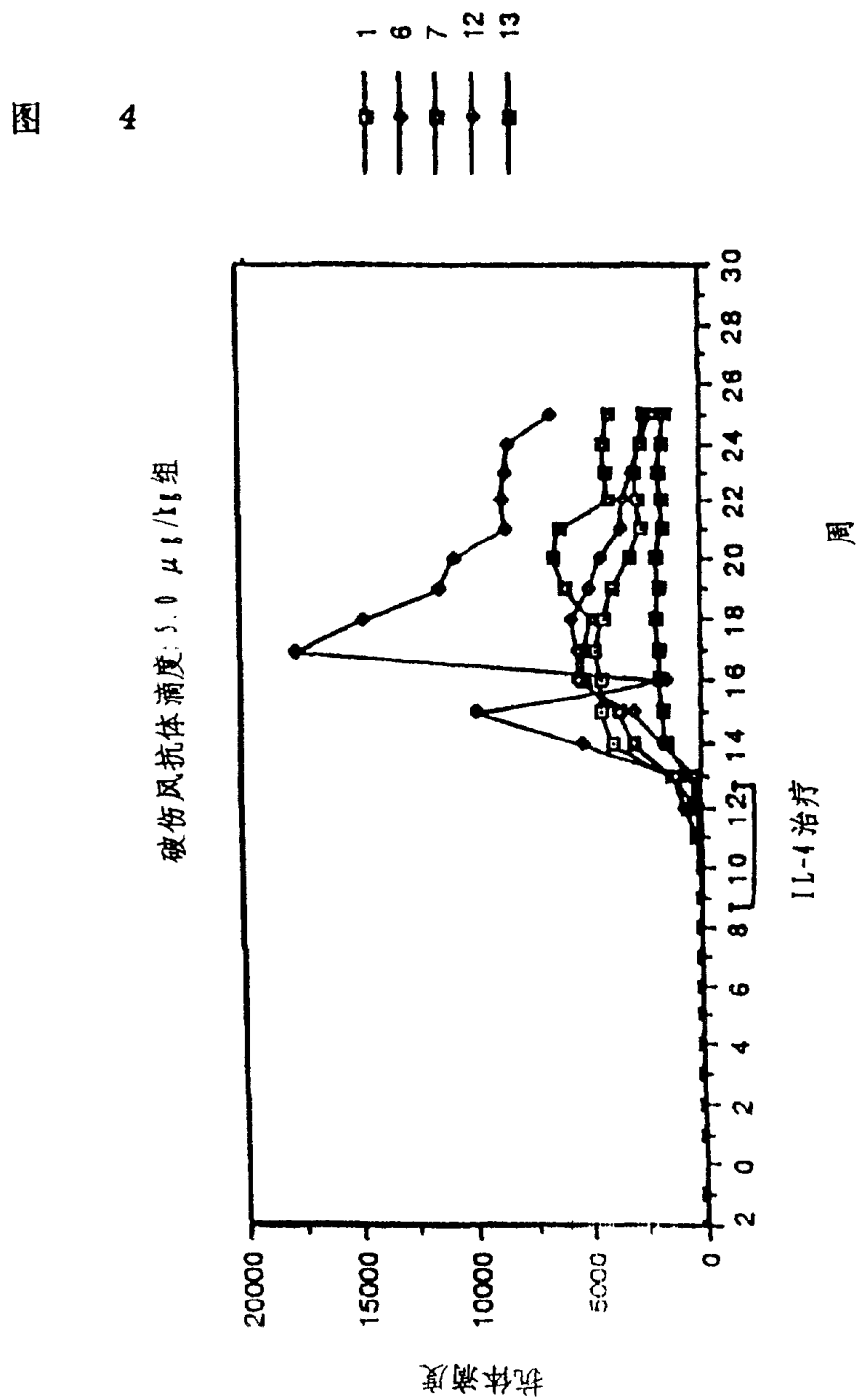


破伤风抗体滴度: 对照组



图

3



图

4

破伤风抗体滴度: $20.0 \mu\text{g/kg}$ 组

图

5

