



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101061136 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 05

(21) 申请号 200580039186. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2005. 11. 16

C07K 14/55 (2006. 01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

261-2004 2004. 11. 16 CU

WO 02087304 A2, 2002. 11. 07, 全文.

WO 03045997 A2, 2003. 06. 05, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

US 6060068 A, 2000. 05. 09, 全文.

2007. 05. 16

任政华等. 人白细胞介素-2单克隆抗体的研究. 《中国生物制品学杂志》. 1996, 第9卷(第3期), 121-123.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CU2005/000009 2005. 11. 16

(87) PCT申请的公布数据

审查员 汪波莉

W02006/053508 ES 2006. 05. 26

(73) 专利权人 分子免疫中心

地址 古巴哈瓦那

(72) 发明人 J·E·蒙特罗卡西米洛

L·B·艾伦索萨戴

R·佩雷斯罗德里格斯

A·B·拉格戴维拉

(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 11038

代理人 陈轶兰

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 4 页

(54) 发明名称

具有白介素-2中和能力的免疫治疗制剂

(57) 摘要

本发明涉及药物制剂,它可用于癌症,并阻断白介素2(IL-2)与其受体的结合。具体地讲,本发明涉及通过在佐剂Montanide ISA51中将IL-2与脑膜炎奈瑟氏球菌的转运蛋白P64k结合而可增强IL-2的免疫原性的治疗制剂,用于诱导阻断IL-2与其受体结合的自身抗体。本发明还涉及治疗肿瘤包括乳腺癌的有效方法。另外,本发明还涉及基于IL-2的疫苗与基于特异性肿瘤抗原或肿瘤生长因子的其他癌症疫苗以及常规用于肿瘤学实践的放疗或化疗药物的治疗组合。

1. 抗 IL-2 单克隆抗体在制备用于增强针对肿瘤的免疫反应的治疗制剂中的用途,其中所述抗体是 IL-2 中和抗体,并且其中所述抗体降低循环 IL-2 水平,从而在有此需要的受试者中增强针对所述肿瘤的免疫反应。
2. 权利要求 1 的用途,其中所述抗 IL-2 单克隆抗体抗人 IL-2。
3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述治疗制剂包含抗 IL-2 单克隆抗体与 EGF 癌症疫苗的组合。

具有白介素 -2 中和能力的免疫治疗制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及能够增强针对白介素 -2 (IL-2) 的免疫反应并且产生自身抗体的药物制剂, 所述抗体能阻断与受体的结合, 并且所述制剂可用于治疗肿瘤。

[0002] 现有技术的说明

[0003] 免疫系统特别是 T 细胞能识别肿瘤抗原的能力的发现, 是开发用于控制免疫系统以便治疗癌症患者的策略的根本支柱之一。

[0004] 因此, 为了开发回收浸润肿瘤基质的特异性 T 细胞 (被称作肿瘤 - 浸润淋巴细胞 (TIL)) 或来自未治疗个体的外周血液或在使用治疗性癌症疫苗之后的个体的外周血液的特异性 T 细胞的方法, 主要努力方向是刺激所述细胞, 以便加强它们在体内的抗肿瘤效应能力。

[0005] 因此, 主要策略指向增强它们针对多种肿瘤相关抗原 (TAA) 的特异性细胞毒活性。主要治疗方法集中在白介素 -2 (IL-2) 的体外应用, 以便激活并且扩增来自携带肿瘤的个体的 TIL, 然后再将这些细胞重新输回到所述个体体内 (Rosenberg, S. A. 等 (1986) *Science* 233, 1318-1321 ; Kawakami, Y. 等 (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6458-6462 ; Kawakami, Y. 等 (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3515-3519)。不过, 尽管证实了在体外实现了对细胞免疫反应的刺激作用, 所述干预具有有限的治疗结果。由此导致了对基于使用治疗性癌症疫苗的主动特异性免疫方案的应用的治疗模式的评估, 设计了包含与 IL-2 结合的肿瘤抗原的疫苗载体, 以便有利于体内有效细胞免疫反应的诱导, 不过, 上述方法的结果较差 (Rosenberg, S. A., 等 (1998) *Nat. Med.* 4, 321-327)。

[0006] 目前, 主要临床策略业已转向开发基于反应性 T 细胞从患者获得性转移到其自身的肿瘤抗原的方式。在体外使用抗 CD3 单克隆抗体 (mAb) 和 IL-2 刺激并且扩增所述细胞, 在回输到血流中之后, 提供 IL-2 胃肠外用。该方法构成了为了治疗癌症患者而设计的主要治疗干预之一, 尽管治疗结果仍然是谨慎的 (Dudley, M. E., 等 (2002) *Science* 298, 850-854 ; Rosenberg, S. A. 等 (2004) *Proc Natl AcadSci USA*. 101Suppl 2, 14639-45)。

[0007] 所有这些治疗策略的合理化设计都是基于将白介素 -2 用作抗肿瘤免疫反应的细胞激活的必要分子 (US 6, 060, 068 和 US 5, 830, 452)。

[0008] IL-2 在免疫中所起作用的背景基于在体外进行的实验。从它的发现起, IL-2 就被认识到它刺激 T 细胞增殖的能力 (因此, IL-2 的同义词是 T 细胞生长因子)。进一步证实了 T 细胞增殖和功能可在体外使用抗 IL-2 或抗 IL-2 受体进行抑制, 验证了这一发现 (Smith, KA. *Immunol Rev* 51 :337-357, 1980)。

[0009] 最近, 业已通过实验证实了人类肿瘤能够通过产生具有抗肿瘤免疫性抑制能力的 T 细胞而减弱免疫系统的反应。所述细胞业已在动物模型和表现不同分化标记的患者中表征, 尽管它们的相关性与所述实验模型不同 (Bach, J. F. (2003) *Nat Rev Immunol* 3, 189-198 ; Chakraborty, N. G., 等 (2004) *Hum Immunol* 65, 794-802 ; Markus, Y. M. y Sykes, M. (2004) *J Clin Oncol* 22, 11 36-1151)。

[0010] 分化簇 25 (CD25) 构成了 IL-2 受体的 α 链。此外, 这种细胞因子的受体的结构包

括 β (CD122) 和 γ (CD132) 链。它们在静息 T 淋巴细胞中以组成型方式表达, 并且所述细胞的激活, 诱导了 α 链的合成, 高亲和力杂三聚体受体的形成和 IL-2 分泌。CD25 在 5-10% 的 CD4+T 淋巴细胞中组成型表达, 并且在低于 1% 的外周 CD8+T 淋巴细胞中表达。所述细胞是无变应性的, 并且表现出体外抑制活性 (Shevach, E. M. (2002) Nat Rev Immunol 2, 389-400)。

[0011] 最近业已证实, 被动施用抗 CD25mAb, 在某些实验肿瘤中能诱导抗肿瘤反应, 尽管其他肿瘤对这种治疗有耐受性 (Onizuka, S. 等 (1999) Cancer Res 59, 31 28-31 33)。

[0012] 免疫系统诱导针对自身分子的反应的能力是有限的, 特别是对诸如生长因子的可溶性分子。然而, 用与载体蛋白缀合并且在佐剂中乳化的这些因子进行主动免疫, 能促进针对所述分子的免疫反应的诱导 (U. S. 5. 984. 018)。针对自体或异源分子产生的特异性自身抗体, 能抑制其与它们的受体的结合, 阻止通过这种结合触发的增殖的机制。

[0013] 根据以上结果可以将抗肿瘤反应依赖于 IL-2 的存在视为现有技术。因此, 我们决定表征体内抗 IL-2 自身抗体对肿瘤演变的影响, 所述抗体是通过用存在于佐剂中的与载体分子缀合的 IL-2 主动免疫诱导的。

[0014] 令人吃惊的是, 阻断 IL-2 与它的受体结合的自身抗体的诱导能促进肿瘤生长的减弱, 即使是对通过被动施用抗 CD25mAb 诱导的抗肿瘤作用具有耐受性的肿瘤。另外, 所述自身抗体的存在不会影响治疗对象中对癌症疫苗的免疫反应。

[0015] 发明详述:

[0016] 本发明涉及对治疗肿瘤有作用的治疗制剂, 对于所述肿瘤来说, 对象免疫系统的作用是重要的。具体地讲, 本发明包括制备能够产生自身抗体的免疫治疗制剂, 所述自身抗体能阻断白介素 -2 与它的受体的结合, 并且抑制肿瘤生长。

[0017] 本发明的目的是能抑制 IL-2 与它的受体结合的治疗制剂, 可用于治疗癌症患者, 其中, 该制剂包括与载体蛋白结合的 IL-2 或它的肽; 另外, 它含有合适的佐剂。具体地讲, 本发明的治疗制剂包括来自脑膜炎奈瑟氏球菌的载体蛋白 P64k, 且佐剂选自氢氧化铝和 MontanideISA 51。

[0018] 在本发明的一种实施方案中, 所述治疗制剂包括通过化学缀合与 P64k 缀合的 IL-2。在本发明的另一种实施方案中, 所述制剂包括融合蛋白形式的 IL-2 或它的肽与 P64k。

[0019] 本发明还包括能抑制 IL-2 与它的受体结合的治疗制剂, 可用于治疗患有癌症的个体, 并且, 该制剂包括抗人 IL-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体。

[0020] 本发明的另一个目的是治疗癌症患者的方法, 其需要阻断 IL-2 与其受体结合, 以便触发针对肿瘤的合适的免疫反应, 该方法包括施用含有 IL-2 或抗 IL-2 抗体的疫苗组合物。

[0021] 在本发明的另一方面, 披露了基于 IL-2 的疫苗和基于特异性肿瘤抗原或肿瘤生长因子的其他癌症疫苗以及实际常规应用的化疗剂或放疗的治疗组合。

[0022] 术语“治疗组合”表示物理组合 (即混合物形式), 关于两者作为不同和单独的构成组织 (例如以试剂用具形式) 并当它们联合用于治疗患者时的关联。因此, 药物组合是在涉及施用两种化合物的治疗方案中的有用组合, 或通过物理结合, 如同在治疗过程中给同一患者施用的独立剂量。

[0023] 术语“癌症疫苗”表示主动免疫治疗中的有用制剂,以便在接受治疗的对象体内引起免疫反应,该免疫反应识别用于所述疫苗中的抗原,并且可以进行测量。

[0024] 1. - 获得免疫原性组合物。

[0025] 本发明的疫苗组合物包括与载体蛋白缀合的人重组白介素-2(hIL-2r)作为活性成分,所述载体蛋白优选是来自脑膜炎奈瑟氏球菌的外膜复合物的蛋白 P64k(0474313 EPA2 和 U. S. 5. 286. 484)。另外,该疫苗组合物包括合适的佐剂。本发明的疫苗组合物优选使用 Montanide ISA 51 作为佐剂。

[0026] hIL-2r 和载体蛋白之间的缀合可以通过化学缀合,或者是构建通过遗传工程技术获得的融合蛋白。

[0027] - 获得包括通过化学缀合与 P64k 蛋白缀合的 hIL-2r 的疫苗组合物。

[0028] 为了获得 hIL-2r 和 P64k 蛋白之间的蛋白缀合,以 20 : 1-5 : 1(hIL-2r 的摩尔数与 P64k 蛋白的摩尔数之比)的可变比例混合这两种成分,优选 10 : 1(hIL-2r 的摩尔数与 P64k 蛋白的摩尔数之比)。将戊二醛添加到该混合物中,至最终浓度为 0.02-0.1%,优选 0.5%,并且在室温(RT)下温育 1-5 小时。最后,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液进行充分透析。通过 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳验证所述缀合反应(Laemmli UK(1970)Nature 277,680-685)。

[0029] - 获得包括 hIL-2r 和 P64k 蛋白之间的融合蛋白的疫苗组合物。

[0030] 通过聚合酶链式反应(PCR),使用特异性引物扩增编码人 IL-2 的基因(447pb)。消化所得到的 DNA 片段,并且连接在表达载体的特定结合位点中,在该载体中克隆编码所述载体蛋白的基因,以便所得到的蛋白包括这两种分子的一个或多个拷贝。可以使用来自哺乳动物细胞和来自细菌或酵母的任何表达载体。所述载体在载体蛋白的 N-末端还可包括六个组氨酸。通过以下方法验证所得到的质粒:在琼脂糖凝胶电泳中进行限制分析,使用酶 Sequenace 2.0(Amersham-USB)分析 DNA 序列,最后,通过“Western 印迹”技术,使用特异性抗 hIL-2 单克隆抗体,分析所述融合蛋白在大肠杆菌的任何表达菌株中的生产。为了获得所述蛋白,使用强力破碎方法破碎细胞壁,然后通过使用硫酸铵的示差沉淀方法和层析方法的组合来纯化所述蛋白。最后,在无菌条件下过滤所述蛋白并且在 -20°C 下保存或者冻干并且在 4°C 下保存待用。

[0031] - 获得包括与 P64k 蛋白化学缀合或作为融合蛋白结合的来自 hIL-2r 的肽的疫苗组合物。

[0032] 通过化学合成获得的来自 IL-2 的氨基酸序列的肽可以通过化学缀合而结合到 P64k 蛋白上,如 U. S. 5, 984, 018 中所述。另外,来自 hIL-2r 的肽与 P64k 蛋白的融合蛋白大体上是按照前面部分所述相同方法获得的,例子可以包括来自以下区域的肽:

[0033] 1) 肽 $N^{33}-A^{50}$

[0034] 氨基酸数目: 18

[0035] 序列: NPKLTRMLTFKFPYMPKKA

[0036] 2) 肽 $T^{113}-T^{133}$

[0037] 氨基酸数目: 21

[0038] 序列: TIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0039] - 化学缀合的 hIL-2r-P64k 的电泳。

[0040] 可以用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳 (Laemmli U.K. (1970) Nature 277, 680-685)。每个孔添加 15 μ g 样品, 并且用考马斯染料染色。

[0041] 2. - 由包括 hIL-2r 和蛋白 P64k 的疫苗组合物产生的效果的特征。临床前研究。

[0042] - 疫苗组合物的免疫原性。

[0043] 为了在动物中研究本发明疫苗制剂的免疫原性, 使用了 8-12 周龄, 体重 18-20g 的雌性 BALB/c 小鼠。在实验期间, 小鼠在按照 GoodPractices of Care of and Use of the Experimental Animals 的标准操作程序 (SOP) 下建立的饲养和操作的条件下圈养。

[0044] 可以遵循不同的免疫接种方案:

[0045] - 方案 A, 通过肌肉途径每 2 周施用 0.1mL 的 4 μ g 当量剂量的以 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫苗形式缀合的 hIL-2r 的四个剂量, 交替肢体的接种部位。

[0046] - 方案 B, 通过肌肉途径施用 0.1mL 的 10 μ g 当量剂量的以 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫苗形式缀合的 hIL-2r 的四个剂量。前两个剂量是在两个肢体的独立的免疫接种部位同时施用的, 并且在两周之后, 在另外两个肢体上施用两个剂量。

[0047] - 评估由 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫苗诱导的针对 hIL-2r 的抗体反应。

[0048] 可检测血清中的自身抗体滴度, 通过现有用于测定封闭性抗体或评估外周血液中特异性免疫反应的方法之一, 测定特异性抗体或 B 细胞。

[0049] 由疫苗 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 诱导的抗 hIL-2r 抗体可以通过间接 ELISA (酶联免疫吸附测定) 评估, 使用来自免疫动物的血清, 参见下文:

[0050] 用 50 μ l/孔的 hIL-2r 覆盖 96 孔平底微量滴定板 (Costar, HighBinding, USA), 用碳酸盐-碳酸氢盐 0.1M, pH 9.6 溶液制备成 10 μ g/mL 的浓度。在 4°C 下温育所述平板过夜, 并且用 200 μ l/孔含有 0.05% Tween 20 的 PBS (PBS-Tween 20) 洗涤 2 次。在 37°C 下与 100 μ l/孔含有 1% 的牛血清白蛋白的 PBS (PBS-BSA 1%) 温育 1 小时之后, 用 200 μ l/孔的 PBS-Tween 20 洗涤平板, 然后添加在 PBS-BSA 1% 中不同稀释度的血清样品 50 μ l/孔。在 37°C 下温育 1 小时之后, 用 PBS-Tween 20 洗涤平板, 并且添加 50 μ l/孔的与碱性磷酸酶 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 缀合的绵羊抗小鼠血清 (它是以 1/5000 的比例用 PBS-BSA 稀释的), 并且在 37°C 下温育 1 小时。洗涤平板, 并且添加 50 μ l/孔的底物溶液, 该溶液由 1 μ g/mL 的对硝基苯磷酸 (Sigma) 在 pH 9.8 的二乙醇胺缓冲溶液中组成。在室温 (RT) 下温育平板 30 分钟之后, 通过 ELISA 读数器 (Organon Teknika, Austria) 在 405nm 波长下测量反应产物的吸光度。

[0051] - 评估由基于 EGF 的疫苗诱导的抗 hEGF 抗体反应

[0052] 可以检测血清中的自身抗体滴度, 通过现有用于测定封闭性抗体或评估外周血液中的特异性免疫反应的方法之一, 测量特异性抗体或 B 细胞。

[0053] 通过基于 EGF 的疫苗诱导的抗 hEGF 抗体可以通过间接 ELISA (酶联免疫吸附测定) 评估, 使用来自免疫动物的血清, 参见 Gonzalez, G., 等 (2002) Vaccine Research 5, 233-244。

[0054] - 在与来自用 hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 免疫接种的动物血清或针对 hIL-2r 的特异性单克隆抗体 (mAb) 温育之后对 CTLL-2 细胞系增殖的影响。

[0055] 将 IL-2 依赖型 T-细胞系 CTLL-2 保持在含有 1U/mL 的 hIL-2h 的 RPMI-1640 培养基中, 使它处在连续增殖状态。CTLL-2 培养是在装有 25mL 含有 8-20% 的胎牛血清 (FCS)

的 RPMI-1640 和 $0.5 \times 10^5 - 10^6$ 细胞 /mL 细胞悬浮液的 75cm² 细胞培养瓶中进行的。所述细胞在体外扩增两天之后使用。

[0056] 为了进行所述分析,从体外培养物中提取细胞,并且用 RPMI-1640 或 PBS 洗涤不少于四次。在 96 孔平底培养平板 (Costar, High Binding, USA) 中,接种 5×10^3 细胞。用来自免疫动物的血清稀释液处理这些细胞,所述动物是使用 hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 疫苗免疫的,对 IL-2 的 ELISA 滴度为 1 : 10000,或使用抗 IL-2 特异性 mAb 处理细胞,并且添加 1U/mL 的 hIL-2r。在 37°C 下在潮湿气氛中在含有 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 小时。通过在培养的最后 18-24 小时用 [³H] 胸苷 (1 μ Ci/ 孔) 进行脉冲而测定增殖。通过液体闪烁计数器测定胸苷掺入。所有操作都是在无菌条件下进行的。

[0057] 3-hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 疫苗的抗肿瘤效果。临床前研究。

[0058] 为了在动物中研究本发明疫苗制剂的抗肿瘤效果,使用了 8-12 周龄的体重 18-20g 的雌性 BALB/c 小鼠。可按照前面详述的方案 A 和 B 用 hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 疫苗对动物进行免疫接种,并且在一周之后通过皮下途径同位接种肿瘤细胞系,如乳腺癌 F3II,接种量为 5×10^4 细胞 / 动物。将具有可触及的肿瘤的小鼠评分为阳性,并且使用测径器测量肿瘤生长,确定最大表面长度 (a) 和它的垂直宽度 (b),并且将肿瘤大小报道为 a×b。定期检查肿瘤。

[0059] 令人吃惊和出乎预料的是,本发明的作者业已发现了在携带恶性肿瘤对象体内 IL-2 与它的受体的结合中和,增强了针对该肿瘤的免疫反应,诱导了肿瘤尺寸的缩小。现有技术表明,这种作用会导致抑制个体免疫系统对肿瘤的反应。

[0060] 作者业已发现,当对象接受本发明的疫苗组合物的主动治疗时,在循环 IL-2 水平显著降低时,获得了对肿瘤生长的这种作用,正如这种减轻作用在用抗 IL-2 单克隆抗体被动治疗下获得时。

[0061] 为此,本发明产生了在治疗患有恶性肿瘤患者方面的不可否认的优点,并且提供了用 IL-2 进行免疫接种的方法,该方法有效,简单,并且与这些情况下使用的常规治疗相比对患者来说更容易接受和攻击性更小。

[0062] 以下实施例包括说明本发明主题的疫苗组合物的免疫学效果的实验细节。

实施例:

[0063] 用于本发明的疫苗组合物中的人重组 IL-2(hIL-2r) 可通过商业渠道获得 (U. S. 5. 614. 185)。用在该疫苗中的来自脑膜炎奈瑟氏球菌的蛋白 P64k 是通过重组 DNA 技术获得的,参见 EP 0474313A2 和 U. S. 5, 286, 484。

[0064] 实施例 1 :由 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫苗诱导的抗体反应。

[0065] 为了促进针对人白介素 -2 的免疫原性,通过化学方法将它缀合到来自脑膜炎奈瑟氏球菌的载体蛋白 P64k 蛋白上。所述化学缀合可以通过戊二醛方法实现 (U. S. 5. 984. 018)。通过 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳验证缀合的效率,分别添加每一种成分样品 (hIL-2r, P64k),与化学缀合物 hIL-2r-P64k 和标准分子量图谱进行比较。可以通过添加 hIL-2r-P64k 的泳道中的连续存在验证获得了缀合物 (图 1)。

[0066] 为了评估由 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫苗诱导的针对 hIL-2r 的抗体反应,用方案 A 和 B 对 BALB/c 小鼠进行免疫。将来自对 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫

苗有反应的动物的超免疫血清用作阳性对照,并且将免疫前血清用作阴性对照。它被定义为免疫动物的抗体滴度,血清的光密度大于免疫前血清的光密度的平均值加上五倍标准偏差的较大稀释度。为了确定对照动物的滴度,使用与之前相同的标准,所不同的是用 PBS-BSA1% 取代免疫前血清作为阴性对照。

[0067] 诱导抗体反应达到 1 : 100-1 : 50000 的滴度。该免疫方案持续大约 52 天,这是必须对该方案进行改进以便在较短时间内获得相似或更好抗体滴度的原因,因此我们使用方案 B 并且获得了类似结果,参见图 2。

[0068] 实施例 2 :用来自使用 hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 疫苗免疫的动物的血清处理的 CTLL-2 细胞系的增殖实验

[0069] 通过与 IL-2 依赖型 T- 细胞系 CTLL-2 培养评估在用 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫苗免疫接种的动物体内产生的血清抗体的体外 IL-2 结合能力。在存在 IL-2 的条件下将 CTLL-2 细胞接种到培养平板中,让它们生长,并且添加来自动物的抗体滴度为大约 1 : 10000 的不同的血清稀释液。观察到了血清浓度和对 CTLL-2 细胞系增殖的抑制作用之间的正相关(图 3)。证实了来自免疫动物的血清的体外 IL-2 中和能力。

[0070] 实施例 3 :用 hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 疫苗处理的动物的抗肿瘤实验。

[0071] 按照方案 B 用 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫苗对动物进行免疫。一周之后,用 5×10^4 F3II 肿瘤细胞攻击动物。与用 PBS-P64k/Montanide ISA 51 接种的对照组相比,用 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 免疫的动物的肿瘤生长动力学较缓慢(图 4a)。观察到了这两组之间肿瘤大小在统计学上的显著差异。

[0072] 实施例 4 :用抗 IL-2 特异性 mAb 处理的 CTLL-2 细胞系的增殖试验。

[0073] 通过与 IL-2 依赖型 T- 细胞系 CTLL-2 一起培养评估由 S4B6 (ATCC#HB-8794) 杂交瘤产生的针对 hIL-2r 的特异性抗体的体外 IL-2 结合能力。在存在 IL-2 的条件下将 CTLL-2 细胞接种到培养平板中,使它们生长,并且添加不同的抗体稀释液。发现了抗体浓度和对 CTLL-2 细胞系增殖的抑制作用之间的正相关(图 5)。发现 1 : 100 的抗体稀释度能够抑制 80% 以上的 CTLL-2 细胞系增殖,证实了所述单克隆抗体的体外 IL-2 中和能力。

[0074] 实施例 5 :抗 IL-2mAb 和抗 CD25mAb(ATCC-PC61) 的抗肿瘤效果。F3II 实验模型(乳腺癌)。

[0075] 连续五天每天用剂量为 1mg 的特异性单克隆抗体(抗 IL-2mAb 或抗 CD25mAb) 处理小鼠。两天之后,用 5×10^4 细胞 / 小鼠的实验乳腺癌 F3II 通过皮下垂直注射而攻击小鼠。定期测量最大表面长度 (a) 的它的垂直宽度 (b)。对照组(用 PBS 处理)的肿瘤尺寸比用抗 IL-2mAb 处理组的尺寸大(图 6)。两个实验组之间的肿瘤尺寸在统计学上是有差异的。不过,抗 CD25mAb(ATCC-PC61) 处理的动物的肿瘤尺寸与对照组类似。这一结果表明,IL-2 中和抗体具有有效的抗肿瘤效果,即使对于其中消除 CD25 调控细胞没有作用的肿瘤也是如此。

[0076] 实施例 6 :抗 IL-2mAb 和抗 CD25mAb(ATCC-PC61) 的抗肿瘤效果。EL4 实验模型(淋巴瘤)。

[0077] 用 5×10^4 细胞 / 小鼠的 EL4 淋巴瘤皮下攻击 C57BL/6 动物。在肿瘤攻击之前两天用一个剂量的 1mg 的抗 CD25mAb(PC61) 静脉内处理动物,或连续五天每天用 1mg 剂量的抗 IL-2mAb(S4B6) 处理,在肿瘤接种之前六天开始。其他组基于前面所述的类似方案同时施用

抗 CD25 和抗 IL-2mAb。

[0078] 记录每一组小鼠的肿瘤生长。在肿瘤攻击之后,每周两次沿两个垂直维度测量每一只小鼠的肿瘤尺寸。EL4 肿瘤的统计学差异为 * $p = 0.0232$, ** $p = 0.0039$, *** $p < 0.0001$ 。图 7 显示两种单克隆抗体的组合对肿瘤生长具有强烈作用。

[0079] 实施例 7:诱导抗 IL-2 自身抗体不影响对 EGF 癌症疫苗的反应。

[0080] 为了评估由疫苗 hEGF-P64k/Montanide ISA 51 诱导的抗 hEGF 的抗体反应是否受先前用 hIL-2r 免疫(诱导自身抗体)的影响,按照方案 A 用制备的 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫苗对 BALB/c 动物进行免疫,并且在 19 天之后用制备的 hEGF-P64k/Montanide ISA 51 或 hEGF/Montanide ISA 51 疫苗免疫。在所有实验中,当用 hEGF 疫苗接种时,通过肌肉途径施用在 0.1mL 体积中制备的缀合在疫苗中的 $4\mu\text{g}$ 当量的 hEGF。将对疫苗 hEGF-P64k/Montanide ISA 51 有反应的动物的超免疫血清用作阳性对照,将免疫前血清用作阴性对照。将它定义为免疫动物的抗体滴度,血清的光密度大于免疫前血清的光密度的平均值加上 5 倍标准偏差的较大稀释度。为了确定动物对照的滴度,采用了与之前相同的标准,所不同的是用 PBS-BSA 1% 取代免疫前血清作为阴性对照。发现通过用 EGF/Montanide ISA 51 或 hEGF-P64k/Montanide ISA 51 免疫诱导的抗 EGF 抗体的滴度不受抗 hIL-2r 自身抗体的诱导的影响,参见图 8。

[0081] 实施例 8:在体内中和白介素 -2 恢复细胞裂解活性,在携带肿瘤的宿主的淋巴结细胞中进行评估。

[0082] 在携带肿瘤的宿主体内评估了 IL-2 中和作用对于对标称抗原的免疫反应的影响。在标准圈养条件下维持雌性 C57BL/6J 小鼠(H-2b)。对所有实验来说,使用 6-12 周龄的小鼠。卵白蛋白(OVA)和肽:VII 级 OVA(Sigma, St. Louis, MO)是在这些实验中使用的模型蛋白 Ag。所使用的优势肽 OVA₂₇₅₋₂₈₄(SIINFEKL)的纯度 > 90%。增殖试验:用 10^4 细胞的 MB16F10 肿瘤或 PBS 通过皮下途径在 C57BL/6 小鼠的左肋进行攻击。定期测量肿瘤直径。三周之后,对所述小鼠进行皮下免疫接种,在第 0 天使用 1mg 的 OVA 与 100g/小鼠的聚肌胞苷酸 [poly I:C] (PIC) (Sigma, St. Louis, MO),而在随后 2 天只施用 PIC。同时,连续五天用对 hIL-2r 的特异性单克隆抗体 (α IL-2) 或 PBS 处理动物。用通过荧光染料 CFSE (Molecular Probes, Paisley, UK) 差示标记的来自幼稚小鼠的脾细胞测定体内细胞裂解活性。将标记 CFSE^{high} 的细胞用作靶标,并且用 SIINFEKL 脉冲 ($1\mu\text{M}$; 90 分钟, 37°C , 5% CO_2), 而标记 CFSE^{low} 的细胞不进行脉冲,以便用作内部对照。对经肽脉冲的靶细胞进行充分洗涤,以便除去游离肽,然后以 1:1 的比例对先前免疫的小鼠静脉内共同注射。十六小时之后,取出淋巴结和脾脏,并且通过流式细胞计测量与两种荧光强度 (CFSE^{low} 和 CFSE^{high}) 相应的总事件。计算未包被的与 SIINFEKL 包被的百分比之间的比例 (CFSE^{int}/CFSE^{igh}), 以便获得细胞毒性的数值。在体内在用 OVA 加上 PIC 免疫的 C57BL/6 小鼠中评估的淋巴结细胞对 OVA 肽的细胞裂解活性产生了最大的反应。连续 5 天每天通过静脉内注射施用 1mg 剂量的抗 IL-2 单克隆抗体在这些动物中不影响细胞裂解反应。用 MB16F10 肿瘤攻击的 C57BL/6 小鼠受到免疫抑制,对 OVA 的细胞裂解活性降低。不过,体内施用具有 IL-2 中和能力的单克隆抗体恢复了淋巴结细胞的免疫反应(图 9)。

[0083] 实施例 9:在体内中和白介素 -2 恢复细胞裂解活性,在携带肿瘤的宿主的脾细胞中评估。

[0084] 在携带肿瘤的宿主体内评估了 IL-2 中和作用对于对标称抗原的免疫反应的影响。用 OVA 和 PIC 对 C57BL/6 小鼠进行免疫,并且在体内评估脾细胞对 OVA 肽的细胞裂解活性,获得了最大反应。连续 5 天每天通过静脉内注射施用 1mg 剂量的抗 IL-2 单克隆抗体不会影响所述动物中的细胞裂解反应。

[0085] 用 MB16F10 肿瘤攻击的 C57BL/6 小鼠受到免疫抑制,对 OVA 的细胞裂解活性降低。不过,体内施用具有 IL-2 中和能力的单克隆抗体恢复脾细胞的免疫反应(图 10)。

[0086] 实施例 10:用制备的疫苗 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 免疫的动物的血细胞计数。

[0087] 为了评估用制备的疫苗 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 免疫是否会诱导血细胞数量的改变,对红细胞,白细胞和血小板进行计数,用制备的疫苗免疫过的动物(按照方案 A)或者没有免疫过的动物,一直到首次免疫之后 100 天。参见图 11,在分析组之间没有发现细胞计数的差异。

[0088] 附图的简要说明:

[0089] 图 1- 化学缀合的 hIL-2r-P64k 的电泳。从左到右的条带分别相应于 P64k, hIL-2r, hIL-2r-P64k 和分子量的标准模式。

[0090] 图 2- 通过用 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 免疫诱导的抗 hIL-2r 的抗体的滴度,使用前面所披露的两种免疫方案。y 轴表示抗 IL-2 的抗体滴度的几何平均值。x 轴表示相应于用以下物质免疫的动物的组:

[0091] 对照:P64k/Montanide ISA 51。

[0092] Sch A IL-2:hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51,按照方案 A。

[0093] Sch B IL-2:hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51,按照方案 B。

[0094] 图 3- 在存在 hIL-2r 和来自动物血清的不同稀释液条件下 CTLL-2 细胞系的增殖,所述动物是用疫苗 hIL-2r-P64k/MontanideISA 51 免疫接种的,并且血清滴度数量级为 1:1000-1:50000。

[0095] 图 4- 用疫苗 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 或 P64k/MontanideISA 51(对照组)免疫并且随后用 F3II 肿瘤攻击的动物的肿瘤生长。y 轴表示肿瘤面积,定义为由较大的直径乘以垂直选定的较小的直径。

[0096] 图 5- 在存在 hIL-2r 和抗 IL-2 抗体的不同稀释液条件下 CTLL-2 细胞系的增殖。

[0097] 图 6- 用抗 IL-2mAb,抗 CD25mAb 或 PBS(对照组)处理并且用 F3II 肿瘤细胞系攻击的动物的肿瘤生长。y 轴表示肿瘤面积,定义为较大直径乘以垂直选定的较小直径。

[0098] 图 7- 用 α IL-2mAb,抗 CD25mAb 或 PBS(对照组)处理并且随后用淋巴瘤 EL4 攻击的动物的肿瘤生长。y 轴表示肿瘤面积,定义为较大直径乘以垂直选定的较小直径。

[0099] 图 8- 通过用 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 和 hEGF-P64k/Montanide ISA 51 接种诱导的对 EGF 的抗体滴度。y 轴表示对 EGF 的抗体滴度的几何平均值。x 轴表示用以下物质免疫的组:

[0100] hIL-2r:hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51

[0101] hEGF:hEGF/Montanide ISA 51

[0102] hIL-2r+hEGF:hIL-2r-P64k/Montanide+hEGF/Montanide。

[0103] hEGF/P64k:hIL-2r-P64k/Montanide+hEGF/Montanide。

[0104] hIL-2r+hEGF/P64k ;hIL-2r-P64k/Montanide+hEGF/P64k/Montanide。

[0105] 图 9- 诱导的对白介素 -2 的抗体恢复细胞裂解活性,在携带肿瘤的宿主的淋巴结细胞中进行评估。

[0106] 所有小鼠在第 0 天用 1mg 的 OVA 和 100 μ g/ 小鼠的 PIC 进行皮下免疫接种,并且在随后 2 天仅施用 PIC。使用来自幼稚小鼠的脾细胞测定体内细胞裂解活性,所述细胞是用荧光染料 CFSE 进行差示标记的。将标记 CFSE^{high} 的细胞用作靶标,并且用 SIINFEKL 脉冲,而标记 CFSE^{low} 的细胞不进行脉冲,用作内部对照。然后以 1 : 1 的比例对先前免疫过的小鼠进行共同静脉内注射。在淋巴结细胞中评估细胞裂解活性。

[0107] 对照 - 用 PBS 处理的动物, α IL-2- 用 IL-2 中和单克隆抗体处理的动物, MB16F10- 与对照类似但用 MB16F10 攻击的动物, α IL-2+MB16F10- 用 IL-2 中和单克隆抗体处理的携带 MB16F10 肿瘤的小鼠。

[0108] 图 10- 诱导的对白介素 -2 的抗体恢复细胞裂解活性,在携带肿瘤的宿主脾细胞中进行评估。

[0109] 所有小鼠在第 0 天用 1mg 的 OVA 和 100 μ g/ 小鼠的 PIC 进行皮下免疫接种,并且在随后 2 天仅施用 PIC。使用来自幼稚小鼠的脾细胞测定体内细胞裂解活性,所述脾细胞是用荧光染料 CFSE 进行差示标记的。标记 CFSE^{high} 的细胞被用作靶标,并且用 SIINFEKL 脉冲,而标记 CFSE^{low} 的细胞不进行脉冲,用作内部对照,然后以 1 : 1 的比例对先前免疫过的小鼠进行共同静脉内注射。在脾细胞中评估细胞裂解活性。

[0110] 对照 - 用 PBS 处理的动物, α IL-2- 用 IL-2 中和单克隆抗体处理的动物, MB16F10- 与对照类似但用 MB16F10 攻击的动物, α IL-2+MB16F10- 用 IL-2 中和单克隆抗体处理的携带 MB16F10 肿瘤的小鼠。

[0111] 图 11- 用 hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 疫苗免疫的动物的血细胞计数 (白细胞 (白血球),红细胞 (红血球) 和血小板) 与对照 (P64k/Montanide ISA 51) 的比较。

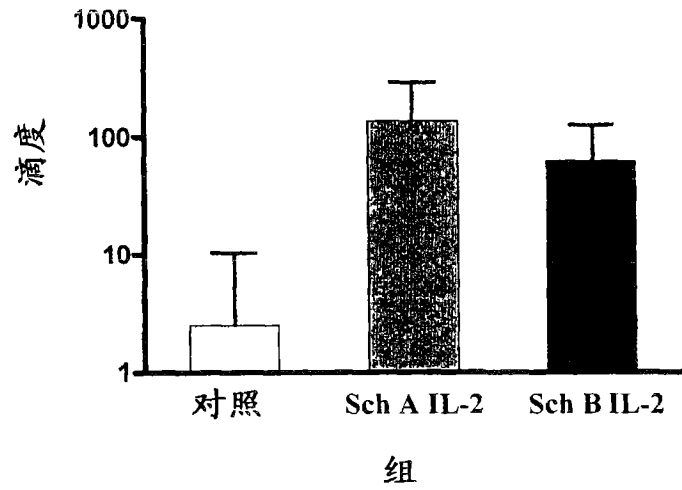


图 1

图 2

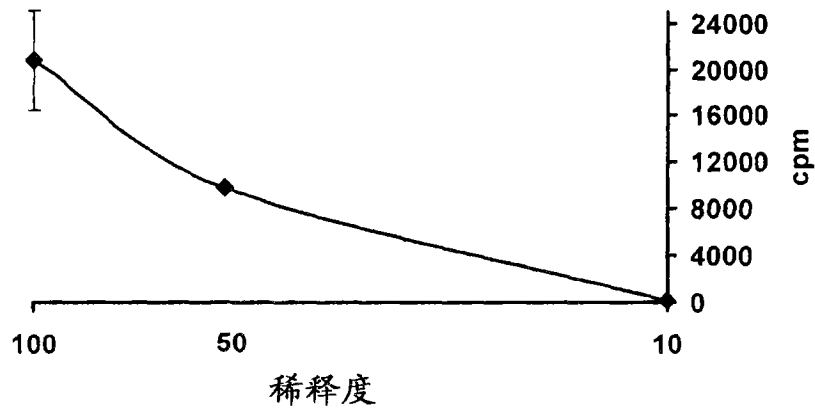


图 3

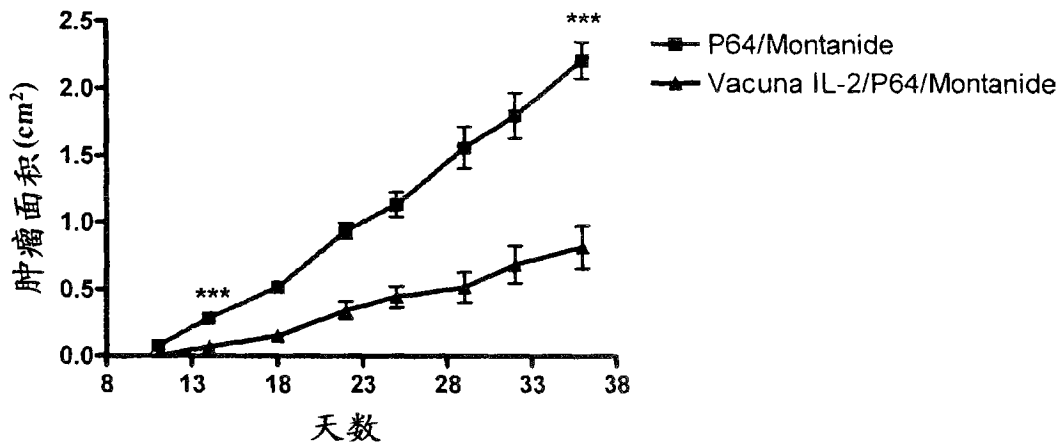


图 4

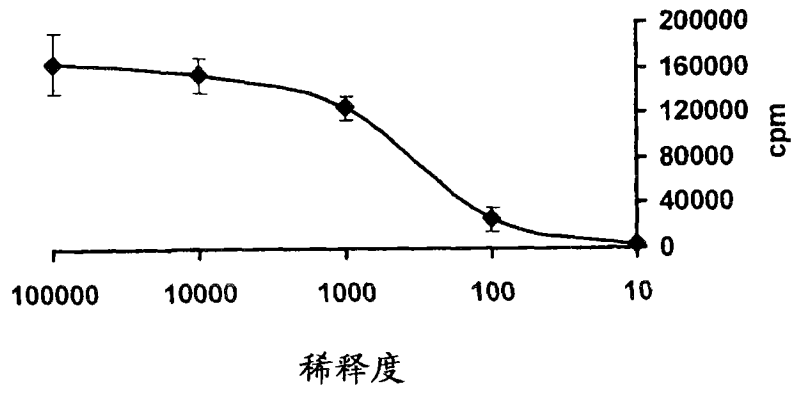


图 5

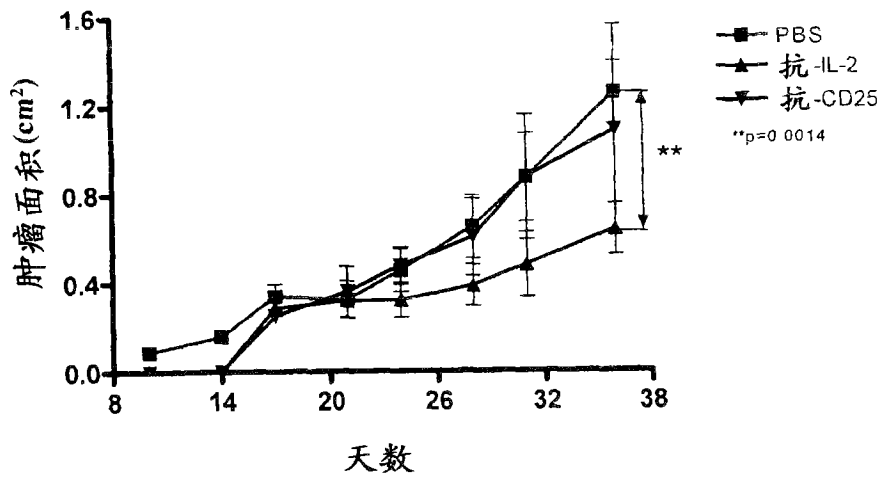


图 6

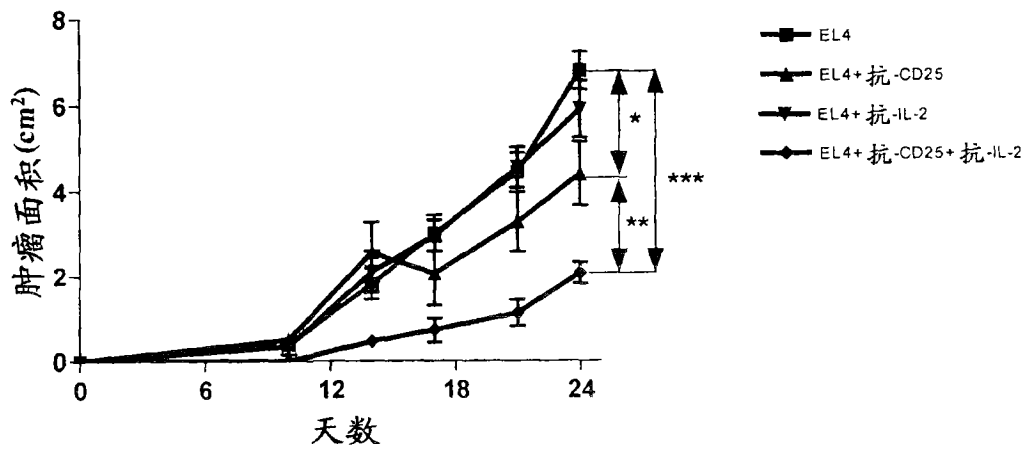


图 7

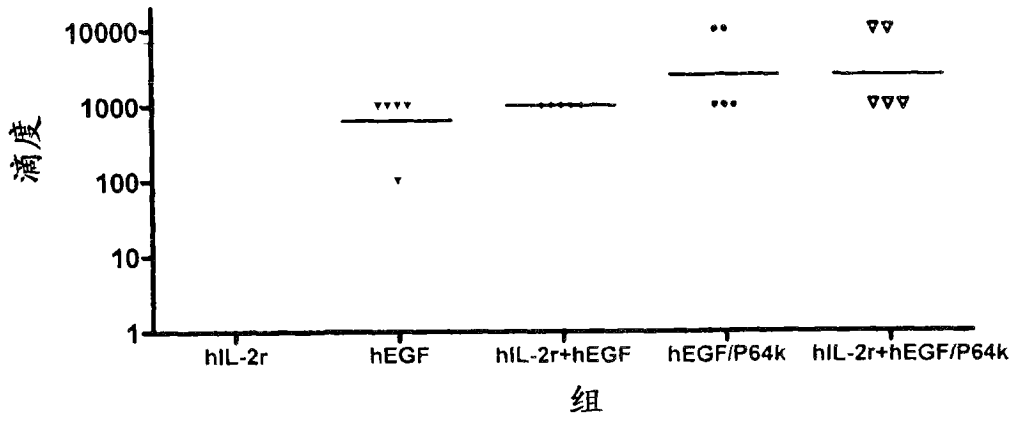


图 8

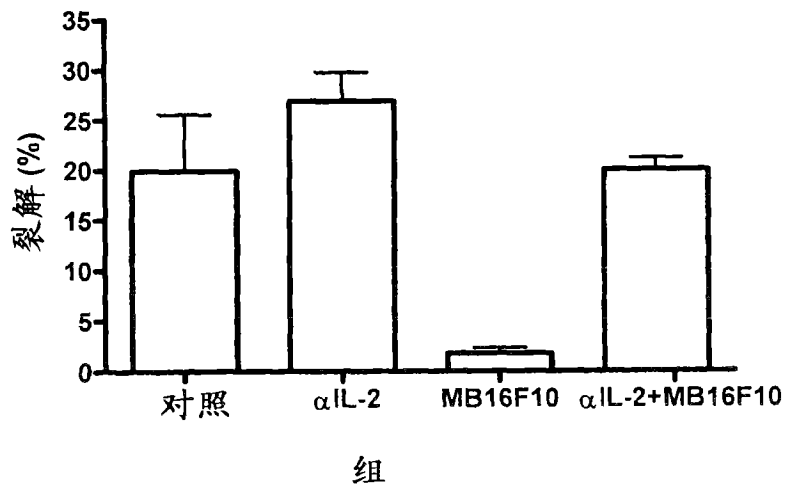


图 9

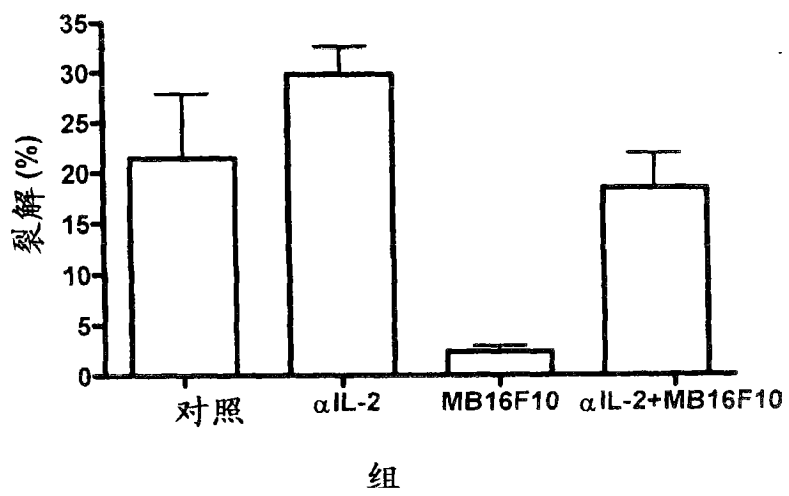


图 10

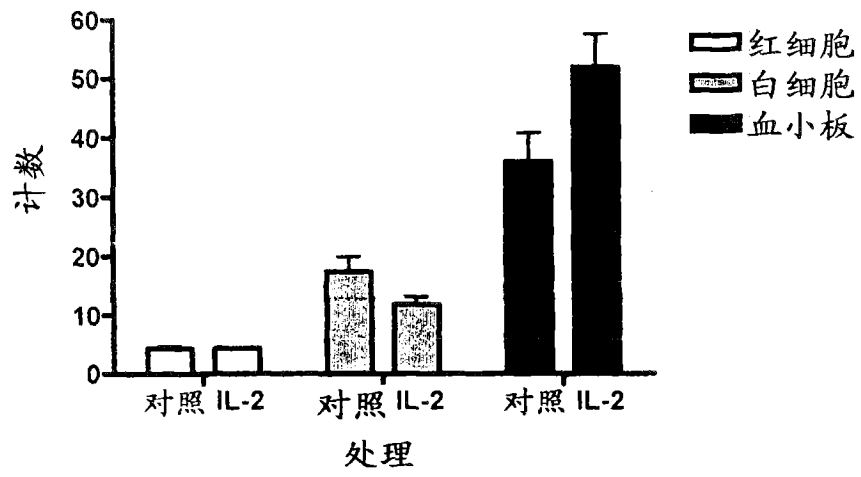


图 11