

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02817170.5

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 100423776C

[22] 申请日 2002.7.2 [21] 申请号 02817170.5

[30] 优先权

[32] 2001.7.2 [33] GB [31] 0116151.2

[32] 2001.11.29 [33] GB [31] 0128638.4

[32] 2002.1.28 [33] GB [31] 0201896.8

[32] 2002.3.28 [33] GB [31] 0207509.1

[86] 国际申请 PCT/GB2002/003037 2002.7.2

[87] 国际公布 WO2003/004049 英 2003.1.16

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.2

[73] 专利权人 艾姆斯科有限公司

地址 英国东萨塞克斯

[72] 发明人 A·G·达格利什 M·卡多根

J·希尼 S·D·T·怀特

[56] 参考文献

WO 0012560 A1 2000.3.9

WO 0071160 A1 2000.11.30

WO 9813066 A1 1998.4.2

WO 9702839 A1 1997.1.30

审查员 吴希哲

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王旭

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图 15 页

[54] 发明名称

多克隆抗-HIV 山羊血清作为治疗剂的用途

[57] 摘要

在注射 HIV 抗原物质后在山羊血清中存在抗 HLA 和其它抗体，构成极其意外地有效治疗 HIV，多发性硬化和其它疾病的基础。

1. 一种山羊、马或绵羊抗 HLA 抗体在制备用于治疗涉及增殖性免疫应答的疾病的药物中的用途。
2. 按照权利要求 1 的用途，其中所述抗 HLA 抗体是山羊抗 HLA 抗体。
3. 按照权利要求 1 的用途，其中所述抗 HLA 抗体是经 HIV 攻击后产生的。
4. 权利要求 1、2 或 3 的用途，其中所述抗 HLA 抗体是多克隆的。
5. 权利要求 1 至 3 中任何一项的用途，其中所述抗 HLA 抗体具有抗 HLA 和抗 HIV 活性。
6. 权利要求 1 至 3 中任何一项的用途，其中所述药物用于治疗 HIV，炎症疾病，自身免疫性疾病，轴突或神经损伤或相关损伤，或者癌症，以及具有炎性组分的其它疾病或病症。
7. 按照权利要求 6 的用途，其中所述药物用于治疗 HIV。
8. 权利要求 1 至 3 中任何一项的用途，其中所述药物用于治疗多发性硬化。
9. 权利要求 1 至 3 中任何一项的用途，其中所述药物用于治疗类风湿性关节炎。
10. 权利要求 1 至 3 中任何一项的用途，其中所述药物用于治疗神经炎。
11. 权利要求 1 至 3 中任何一项的用途，其中所述抗 HLA 抗体与针对 FAS，多巴胺受体，5-羟色胺受体，神经生长因子受体 p75 和趋化因子 CXCL10 (IP 10) 中的一种或多种的抗体一起存在。
12. 山羊血清组合物在制备用于治疗多发性硬化的药物中的用途，其中所述山羊血清组合物是通过使用适合 HIV 体外生长的培养基或已经用于 HIV 体外生长的培养基攻击山羊而获得的。
13. 山羊血清组合物在制备用于治疗类风湿性关节炎的药物中的用途，其中所述山羊血清组合物是通过使用适合 HIV 体外生长的培养基或已经用于 HIV 体外生长的培养基攻击山羊而获得的。

14. 山羊血清组合物在制备用于治疗神经炎的药物中的用途,其中所述山羊血清组合物是通过使用适合 HIV 体外生长的培养基或已经用于 HIV 体外生长的培养基攻击山羊而获得的。

15. 权利要求 12 至 14 中任何一项的用途,其中所述培养基是细胞培养物的生长培养基的上清液。

16. 权利要求 15 的用途,其中所述细胞培养物的生长培养基是 PBMC 生长培养基。

17. 权利要求 12 至 14 中任何一项的用途,其中所述山羊血清组合物包含山羊抗 HLA 抗体。

多克隆抗-HIV 山羊血清作为治疗剂的用途

本发明涉及治疗剂，特别是，但不仅仅是用于治疗涉及增殖性免疫应答（proliferative immune response）的疾病的治疗剂。

发明背景

WO 97/02839 涉及病毒抑制，病毒感染的治疗和预防。它提供用于生产治疗患者内病毒感染的中和抗体的方法，其包含步骤：

- a. 将哺乳动物暴露于病毒以使所述哺乳动物生产针对所述病毒的中和抗体，和
- b. 从所述哺乳动物收集所述中和抗体。

在实施例中，通过将 HIV 病毒与从山羊获得的 HIV 中和抗体混合获得命名为 AAV2 的 HIV 疫苗。

WO 01/60156 涉及中和抗体和免疫调节增强组合物。它提供一种免疫调节组合物，其包含：对抗原特异的异种抗体；和抗原，其中为了与药用载体结合所述异种抗体与抗原形成复合体。

实施例与 WO 97/02839 类似，再次通过将 HIV 病毒与从山羊获得的 HIV 中和抗体混合获得命名为 AAV2 的 HIV 疫苗。

WO02/07760 涉及一种治疗剂。它提供预防 HIV 感染或治疗感染 HIV 的个体的方法，其包含下列步骤

- (1) 将山羊免疫系统暴露于治疗剂；
- (2) 在 HIV 攻击后纯化来源于山羊的抗体；和
- (3) 用在上面步骤 2 中获得的抗体治疗个体。

在基于 WO 02/07760 的抗体产品的初步临床实验中，使用来自用 HIV 攻击后的山羊的血清已经成功地治疗了 HIV 患者。

优选治疗使用一种血清组合物，其可以通过包括以下的方法获得：在山羊中产生（raise）有效抗体，从山羊中抽血，证明所抽血中的 HIV

中和能力，从血液中去掉固体，使用过饱和的硫酸铵或其它适当的沉淀剂沉淀固体，分离沉淀，将沉淀溶解于适当的水介质中，并用 5-50,000 道尔顿，优选 7-30,000 道尔顿，更优选 8,500-15,000 道尔顿，特别是大约 10,000 道尔顿的截止透析溶液。山羊免疫的方法可以是肌内的，但也可以使用其它标准技术如皮下或皮内给药。通过其它常规使用的分级作用方法（例如辛酸）也可以完成纯化过程，条件是使用总残渣。

更具体地，治疗典型地使用以下列方式获得的山羊血清。

生产山羊血清的实例

使用浓度为 10^9 个病毒颗粒/ml 的 HIV-3b 的肌肉注射，通过肌肉注射给山羊接种悬浮在常规商用上清液中的溶解的 HIV3b 病毒。在 60°C 下预先热杀病毒 30 分钟。在适当的间隔如两周后，抽取血样用于初始评估。在优选方法中，每周给山羊注射共 4 周，然后在 6 周时将动物放血以获得试剂。

在无菌操作下从山羊抽取约 400 cc 血液。削刮和用聚维酮碘（betadine）准备用于针提取的区域。使用 18 号的针从动物抽取约 400 cc 的血液。值得注意的是动物可以忍受约 400 cc 的抽血而动物不遭受任何不适作用。动物不一定必须牺牲。在它补充它的血量后大约 10-14 天内可以将动物再放血。

证实可能有效抗体的存在。一旦证实该试剂的存在，在 4-6 周之间从山羊上采血，并离心分离血清。然后过滤 300 ml 血清以去除大的凝块和颗粒物质。然后用过饱和的硫酸铵（室温下 45% 的溶液）处理血清以沉淀抗体和其它物质。在 5000 rpm 下将产生的溶液离心 5 分钟，此后除去上清液。将沉淀的免疫球蛋白重悬浮于足以再增溶沉淀的磷酸盐缓冲盐水（‘PBS 缓冲液’，参见 Sambrook 等 ‘分子克隆，实验手册’ 1989）中。

然后将溶液透析通过具有 10,000 道尔顿的分子量截止的膜。在 PBS 缓冲液中进行透析，在 24 小时期间每 4 小时更换所述 PBS 缓冲液。在 4 °C 下进行透析。

在 24 小时透析后将透析袋的内容物注入无菌烧杯。调节溶液以使每

单位体积的质量=10 mg/ml。使用 PBS 进行稀释。然后将产生的溶液过滤通过 0.2 微米的滤器到无菌容器中。在过滤后，将溶液等分成 1 ml 的单剂量并且在使用前存储在-22℃。

试剂然后随时可以使用。

在该方法中可以进行修改，如例如通过改变硫酸铵的浓度或转换为其它试剂。类似地透析截止不必为 10,000 道尔顿。

本发明

作为使用山羊血清治疗的一部分，应当指出有其它有利的结果。例如，在 I 型糖尿病的 HIV 患者中，不仅在他们原来的 HIV 感染方面，而且在糖尿病症状方面也注意到改善。对于带有某种癌症的 HIV 患者，在癌症以及 HIV 的症状方面注意到缓解。

发现在感染 HIV 的患者以及带有不同病症如多发性硬化和一些肿瘤的那些患者中的显著的临床改善，该发现具有所有这些疾病是处于慢性炎性状态的潜在的联系。

根据本发明，我们已经发现山羊血清的活性在于抗 HLA 活性的存在。

出乎我们意料之外，我们能够容易地证明 HIV 免疫的山羊生产的血清能够切断混合淋巴细胞应答测定，其是体外使用的传统活化测定中的一种。考虑到这可能是山羊血清的某种固有性质，我们注意到当未被注射时山羊血清在这些测定中未能具有任何活性。

我们还证明该活性与抗 II 类 HLA 抗体的活性紧密相关。我们不知道这是否表示分子模拟应答或者山羊是否发现当它出芽和从感染的细胞释放时由病毒携带的 II 类 HLA，或者该 HLA（MHC 分子）是与病毒分开释放但共纯化以致也产生针对该细胞膜组分的抗体。实际上，其它细胞膜分子如趋化因子受体和相关分子可能也在制剂中并诱导调节有利疗效的抗体应答，这没有逃脱我们的注意。然而如果确实如此，似乎抗-HLA 应答是绝对优势的，我们相信这在诱导观察到的抗炎应答方面可能扮演重要但未必是唯一的角色。

我们已经研究来自用不同病毒/细胞制剂免疫的不同山羊的血清，并且可以表明注射混合物的山羊产生免疫应答，其发现 HIV 包膜的隐藏即

沉默部分，该部分在未来疫苗的设计中很可能是非常重要的。

在本发明的一方面，提供用于涉及增殖性免疫应答的疾病的抗体，其识别 II 类 HLA 抗原。

关于血清中针对 II 类和 I 类 HLA 的高效价抗体，具有最高水平的抗体的是最好地切断混合淋巴细胞应答并且在临床情况下似乎具有最好功效的那些。

出乎我们意料之外，我们发现针对 FAS，一种主要的编程性细胞死亡配体的抗体非常高。实际上它们与 MHC 类别 II 抗体相关。不受理论约束，我们假设对 FAS 的高效价在抗体附着在 FAS 抗原之上的几分钟内可能导致立即的编程性细胞死亡，细胞可能被杀死。这可能导致有毒的趋化因子的抑制，该趋化因子被认为与 MS 的失能有关。

因此，关于本发明，我们报导针对 FAS 的抗体在 HIV，多发性硬化和其它病症的治疗中可能是重要的，并且在治疗中具有与针对 II 类和 I 类的其它抗体的共同益处。

在本发明的一个方面，提供用于治疗对该治疗敏感的疾病的抗 FAS 抗体。

另外，本发明还提供包含抗 HLA 抗体和/或抗 FAS 抗体的组合物，和使用该组合物治疗的方法。

本发明的主要用途是关于包含抗 HLA 作为治疗具有不适当地高水平的 HLA 的疾病的血清。这些包括多发性硬化，类风湿性关节炎，糖尿病，原发性胆道性肝硬化 (primary biliary cirrhosis)，cirrhosis 自身免疫和病毒性 b 和 c 自身免疫性疾病，其包括心脏，肺，皮肤，胃肠道，肾，脑，CNS。一般地说，通过本发明可以治疗的病症包括 HIV，炎性疾病，自身免疫性疾病，轴突或神经损伤或相关损伤，或者癌症，以及具有炎性组分的其它疾病或病症。

抗-FAS 的存在使血清特别适合于与慢性活化细胞相关的疾病，所述慢性活化细胞可能分泌损伤信使如细胞因子和趋化因子。这些包括多发性硬化，所有形式的神经系统的慢性炎性疾病，以及慢性感染如与慢性炎性病变相关的病毒性，细菌性和局部(tropical)癌症，特别是肺，胰，肝，肠，淋巴结的那些，皮肤尤其是扁平细胞和基细胞癌也可以有益于

脑和脊髓的原发性和继发性肿瘤。

在具有外伤性损伤神经的那些人中观察到的神经功能改善提示神经元生长因子性质，因此可以用于创伤，传染后损伤例如急性热病性多神经炎，恶性损伤等，糖尿病相关的神经病，酒精中毒，金属或其它毒素中毒等。

观察到的对头发和皮肤色调和色泽的益处提示其它独特的性质，其至今不能通过关于抗体等的上述观察解释，即抗老化，关于该血清的减小的继发性癌症活性提示直接的抗癌活性这个可能与 FAS 活性相关，但也可能由于其它还未鉴定的因素导致。

在一方面，优选抗体是从已经接种狂犬病疫苗的山羊获得。

在一个变体中，本发明扩展至从马，羊和其它适当的动物生产的抗体。可以以与为山羊抗体提供的类似的方法获得抗体，并可以评估抗 HLA 和/或抗 FAS 活性。在另一个变体中，不需要将 HIV 病毒用作免疫原来产生抗体，将人白细胞或来源于人的细胞系膜（cell-line-membrane）抗原用作抗原以产生有效的抗体制剂。另外，我们设想抗体可以被免疫原替代，治疗组合物可以包含 HIV 物质或白细胞。

在还有另一个变体中，在热灭活后上清液溶液也可以用作免疫原来产生适当的抗体应答，所述上清液溶液之上已经培养病毒培养物或者能够培养病毒培养物但还未用来培养培养物。可以将适于 HIV 或另外病毒的体外培养的任何上清液溶液或其它培养基用来生产可接受的免疫原，其将产生有效的抗体应答。给出细胞培养生长培养基如 PMBC 的上清液或用于培养 HIV11 1b 的无限增殖癌细胞系作为实例。不需要存在 HIV 或其它选择的病毒来生产有效的免疫原以产生抗体制剂。

优选本发明的抗体是多克隆抗体，其识别 II 类 HLA 抗原的所有组成成分和 gp 120 抗原，或者识别 FAS。我们的发现提示优选含有 II 类 HLA 抗原。

通过使用作为免疫原的选择的抗原可以产生适当的抗体，优选所述抗原是抗原混合物。可以使用多种不同的抗原产生抗体，其识别在患者中产生更强应答的抗原的共同结构。我们假设 HIV 分离物的选择将提供在结构上较小变化的表位，将产生泛抗体（pan-antibody）。

因此,为了产生血清,我们优选使用最初在 PBMC 中生产的不同 HIV 病毒的混合物,而不单独使用 T 细胞。混合物适当地包含 2, 3, 4, 5, 6 或更多的这样的病毒。优选病毒是裂解物的形式。优选裂解物的实例包括下列 HIV-1 分离物:91US056,92HT593,92US723,92US657,92US660 和 92US714。优选混合物至少包括 1, 2, 3, 4, 5 或所有 6 种这些具体的分离物。

例如使用伴刀豆凝集素 A 的细胞的激活可以产生利益,例如使用伴刀豆凝集素 A 可以获得更高水平的抗多巴胺活性。SHULA (未激活) 在抗多巴胺 R 水平方面在 O.D.基线以上未有显著的升高。同时, HIV 3B (12 只山羊和兔的平均) 有显著的升高。在混合物中伴刀豆凝集素 A 激活的 PBMC 细胞之间的多巴胺 R 水平方面也有升高。

在还有另一个变体中,适合于 HIV 病毒但不限于 HIV 体外生长的上清液将以 PBMC 或其它培养基形式,如例如为了培养 HIV 111b 使用的无限增殖细胞系将独立地生产有效的抗体制剂,而无需引入病毒,如果以常规使用的方法热杀, HIV 病毒不应该存在。

这些抗体还可以通过使用蛋白质获得,所述蛋白质包含从 HIV 裂解物,合成肽,细菌融合蛋白和来源于系统发育无关的来源的蛋白质/肽,其包含或模拟所需的细胞培养物或其它上清液碎片。可以获得和检验针对裂解物的抗体。

不受我们当前的理论约束,似乎本发明的抗体作用为抑制 HIV 或其它依赖于该免疫应答的疾病所需类型的细胞增殖。因此,例如本发明在治疗多发性硬化中获得应用。

现在知道来源于山羊血清的抗体的抗 HLA 和抗 FAS 活性的意义,评估各种这样的山羊血清的可能应用现在成为可能。简单的测定可以评估抗 HLA 和/或抗 FAS 活性的存在,并允许鉴定适合于对患者给药的候选血清。

按照本发明,提供一种制备血清,特别是山羊血清的方法,其包含对动物给药一种或多种,优选至少几种 HIV 分离物,允许免疫应答发展,从动物中抽血,监视抗 HLA 抗体和/或抗 FAS 抗体的存在,和制备适合于人类治疗的抗 HLA 和/或抗 FAS 血清。

通常将使用多种动物，可以评估提供更好产率的有效血清的动物。然后可以繁殖这种更好的动物以提供特别适合本发明的动物谱系。

通常采用质量控制方法来确保抗 HLA 抗体，典型地多种抗 HLA 抗体，和/或抗 FAS 抗体，典型地多种抗-FAS 抗体的存在。可以进行逐批（batch-to-batch）相关性对比以提供标准化的产品。

基于血清显著抑制 MLR 的能力，提出该血清可以用作强抗炎药。存在由此可以实现这个的多种机制，HLA 识别的抑制是最有可能中的一种。

另一种作用机制有可能是由于补体涉及该山羊血浆的事实，因为这是已知被热处理抑制的唯一活性。补体有可能使患者削弱的背叛者（defector）机制活跃。例如；抗体靶向病毒和肿瘤细胞致死和细胞介导的抗体定向致死都需要补体，并且在缺乏补体的情况下完全缺少效应或机制。

另外，本发明提供一种组合物，其包括活性组分，所述活性组分可以通过血清提取技术来源于适当攻击的山羊的血液，所述血清提取技术不是设计来分离单独的特异性抗体。特别是，本发明设想从受攻击的山羊的血清中分离活性组分，或者协同作用的抗-HLA 抗体和/或 FAS 抗体的混合物，而没有完全纯化和提取来获得单独的抗体。

通常，将来源于非人宿主的抗体注射到人中是违反指示的。针对外源抗体自身通常产生强免疫应答。然而，意外地，已经发现使用山羊血清提取物未激发对其它外源动物蛋白质所预料的免疫反应。免疫抑制的患者和正常个体都耐受山羊血清提取物的注射。

本发明特别使用一种血清提取物，其可能包含来源于 HIV 攻击山羊的全体抗体分子。不希望受理论限制，我们相信该方法具有显著的益处。用该血清提取物处理的患者在被治疗的数分钟内显示显著的益处。

通过肌肉注射将灭活病毒注射到明确标记的山羊中，并允许潜伏，此后抽取测定量的血液并相应地修饰。

任选地检验血清的期望抗体活性，以及抗融合能力，AIDS 病毒的中和，它增强吞噬作用的能力和它对人体的可接受性中任选的一种或多种。

在将所选山羊接种 HIV 病毒后，与早期研究一致注意到在暴露于外

源蛋白质抗原后的免疫应答。然后进一步修饰提取的血清以便将它准备给人使用。

响应接种 HIV 的动物生产的并且通过本方法修饰和精制的试剂已经显示 AIDS 复合体总体上的逆转。

对于这实际上是如何完成的解释是复杂的，但当给予 HIV 阳性或带有充分发展 AIDS 的个体时导致：

1. 在患者生活质量方面几乎立即的改善。
2. 产生 CD4 和 CD8 细胞的扩增，由此增加 CD4 和 CD8 细胞数。
3. 通常以 0.5 对数的增量将病毒负荷减少至理论发育零点 (theoretical zero)。
4. P24 值减小至 0。

本质上这意味着可以将患者的免疫系统恢复到正常并消除病毒，尽管目前未知该状态将持续多久，当前观察的是 3 年并且正在增长。

用药物已经成功治疗大约 200 个两种性别的 10 岁和 10 岁以上的人，其中没有一个已经显示任何复发或遭受任何副作用。

治疗是通过皮下注射给予的，数量在 1/10 和 10 cc 之间变化，并被设计来尽可能迅速地将药物递送到淋巴系统。关于本发明，对于 HIV 患者的优选剂量通常为每周 1 ml，或根据需要作为分剂量给予到两臂中。通常每 2 或 3 周给药，然后每 3 个月给药。对于癌症患者，每周 0.3 ml 似乎最佳。

在大多数情形中，在 3 个月期间每 4 周进行治疗一次。相同的常规观察如下：

1. 在注射后 60 分钟以内中度至重度的抑郁被逆转。
2. 患者通常在注射后 2 周内恢复他们的食欲并积极地找寻食物。
3. 在首次治疗约 2 周内患者开始增加体重。
4. 独立的实验室报告证实在首次治疗 4-6 周后病毒负荷和 P24 值显著降低并且 CD4 和 CD8 细胞显著增加。
5. 未观察到副作用。

重要的是注意本药疗法，不同于当前治疗，不要求患者保持严格的每小时或每天方案，依靠每周或每月施用的简单的注射。

优选地，组合物被纯化并且基本上只由纯化的血清提取物组成。在另一个变体中，通过常规或其它任何适当的方法还可以将抗体作为整体或按照疾病特异的要求选择和分组从复杂的血清或血浆混合物中纯化，所述方法包括但不限于例如免疫亲和层析，盐沉淀，离子交换层析，大小层析，亲和层析，当适当或需要时结合。

关于本发明的抗-HLA 抗体，和/或抗-FAS 抗体，还可以考虑联合治疗，但不是必须的。

可以将本文所述的山羊血清提取物按照本发明配制成组合物来抑制病毒体外或体内复制。同样地，本发明还涉及药物组合物，其包含本发明的山羊试剂，适合于如病毒病的疾病治疗。本发明的试剂可以与适当的药用载体混合。

药物组合物的实例包括具有适当组成的任何固体（片剂，丸剂，胶囊，颗粒剂等），或者口服，局部或肠胃外给药形式，并且它们可以包含载体。当肠胃外给药时组合物可能必须无菌。

通常使用试验剂量以查看人是否对超免疫山羊血清发生变态反应。皮内注射后等待 30 分钟，看看是否存在作为水肿，红斑（erythema），和瘙痒显示的中间反应。如果该反应是阴性的，那么假定很可能发生即发性敏感性反应（immediate sensitivity reaction）。然而变态反应不因为可能的变态反应而妨碍人接受可能拯救生命的治疗。

可以通过任何适当的方法如通过静脉输注，皮下，肌肉注射，口服制剂，腹膜内和静脉给药给药本发明的组合物。正确的剂量将根据具体的配方，施用的方式，和具体位置，宿主和治疗的疾病状况而变化。应当考虑到其它因素如年龄，体重，性别，饮食，给药时间，排泄速率，宿主的疾病状况，药物结合，反应灵敏度和疾病严重性。可以在最大耐受剂量内连续或周期性地给药。

本产品，不同于大部分其它治疗，不要求患者保持严格的每小时或每天的服药方案，依靠简单的周期性的注射的施用。在两年前治疗并已经保持方案的患者的免疫系统似乎已经稳定并恢复到正常有效水平。

对于 HIV 的治疗, 设计本产品来抑制由 HIV 导致的炎症, 因此允许无需高毒性化学药品而使人免疫系统自身改方向来抵抗病毒。不同于它的竞争者, 本药疗法可以以更小的剂量作为怀疑被感染的地方的预防剂或在疾病早期期间使用。

不同于现有药物, 其经常需要在患者剩余的生命中每日服用, 典型的治疗依靠由医生每周或每月施用的简单的注射。常规的治疗方案是 3 个月周期, 如果病毒再现, 预期在 6 个月, 12 个月和 2 年或根据需要接续方案。

本发明的组合物可以与其它药物一起使用以提供联合治疗。其它药物可以形成相同组合物的一部分, 或者作为用于同时给药的分开的组合物提供。

本发明还扩展到产生保护性组合物的方法, 所述组合物包含用于保护非山羊物种的试剂, 该方法包含用非山羊抗原 (例如病毒或异种蛋白) 免疫山羊, 和纯化在用抗原攻击后的山羊中生产的血清提取物。然后将试剂用于保护非山羊动物以防用作免疫原的抗原。

本发明另外涉及在药物中包含在用人 HIV 病毒攻击后山羊的血清提取物的组合物的用途, 和在用于治疗包括 HIV 和 AIDS 的病症的制剂中包含在用人 HIV 病毒攻击后山羊的全体抗原的组合物的用途。

优选地, 本发明的组合物通过下列各项的一种或全部处理: 用 45% 硫酸铵沉淀, -70°C 冷冻 24 小时或微量过滤。

本发明的抗体产品用于治疗具有炎性成分的疾病, 不仅包括 HIV, 而且包括糖尿病, 类风湿性关节炎, 神经炎, 多发性骨髓瘤, 结肠癌等。在 H Baum 的文章中给出更多的实例, 对此参见他的网址

www.kcl.ac.uk/kis/schools/life_sciences/life_sci/baum.Html

特别是在他关于当今免疫学中的分子模拟, 1996, 2 月 17 日, 64-70, 的文章中, 其在此引入作为参考。

在一方面, 本发明提供治疗不具有 HIV 的患者的方法。特别地, 治疗方法可以用于治疗非 HIV 患者中的糖尿病或癌症。

在许多 MS 患者中看到的恢复, 以及在接受治疗的该小时内报导的振奋的情绪, 也已经促使我们寻找针对 CNS 中的受体的活性, 所述 CNS

可能涉及神经刺激和可能再生。我们已经筛选各种血清针对许多抗原的活性，并且已经发现针对多巴胺受体，5-羟色胺受体，神经生长因子受体 p75 和趋化因子 CXCL10 (IP10) 的活性。

因此，本发明扩展到针对多巴胺受体，5-羟色胺受体，神经生长因子受体 p75 和趋化因子 CXCL10 (IP10) 中的一种或多种的抗体。这些抗体活性中的一种或多种可能单独或与抗-HLA 和/或抗-FAS 活性结合存在。

现在知道来源于山羊血清的抗体针对多巴胺受体，5-羟色胺受体，神经生长因子受体 p75 或趋化因子 CXCL10 的活性的意义，评估各种这样的山羊血清的可能应用现在成为可能。简单的测定可以评估该活性的存在，并允许鉴定适合于对患者给药的候选血清。特别是，抗 FAS 和/或抗 HLA 抗体与针对多巴胺受体，5-羟色胺受体，神经生长因子受体 p75 或趋化因子 CXCL10 中的一种或多种的抗体的组合可能是重要的，因此测定可以以不同的抗体活性为目标以确保它们存在产品中。

本发明还提供组合物，其包含针对多巴胺受体，5-羟色胺受体，神经生长因子受体 p75 或趋化因子 CXCL10 中的一种或多种的抗体，通常还与抗 FAS 抗体和/或抗 HLA 抗体一起，和使用该组合的治疗方法。

在一个变体中，本发明扩展到从马，羊和其它适当的动物中生产的抗体。可以以获得山羊抗体的类似方法获得抗体，并且可以评估针对 HLA，FAS，多巴胺受体，5-羟色胺受体，神经生长因子受体 p75 和/或趋化因子 CXCL10 中的一种或多种的活性。在另一个变体中，不需要使用 HIV 病毒作为免疫原来产生抗体，而将人白细胞用作免疫原来产生有效的抗体制剂。另外，我们设想可以用免疫原替代抗体，即治疗组合物可以包含 HIV 物质或白细胞。

一般地说，似乎使用起源于人的细胞（或蛋白质混合物）作为免疫原可以获得有效的抗体。然后在宿主物种中制造来源于这些人细胞的抗体，最终的抗体产品被用回到人中。在原始的供体和受体之间蛋白质混合物 (cocktail mixtures) 可以极端类似地同源。该同源性允许例如猿神经来源的蛋白质或细胞的概念能够应用于人。来源于紧密相关的动物的高度保守的蛋白质混合物是所考虑的。

还预计在贡献原始细胞的人的 HLA 类型和受体的 HLA 类型之间存在关系。该关系可能解释已经看到的变异性，并且当选择与患者匹配的配方时可以考虑。

另外，我们设想使用活化的或来源于身体不同部分的癌细胞系，其包括来源于神经胚细胞瘤，胰腺癌，前列腺和扁平细胞癌。可以预测在这些不同的细胞类型之间产生的抗体之间的细微差异以产生极其不同的轮廓 (profile)，并且在非常广的意义上可以帮助靶向特定的器官系统。

有一些证据显示给予山羊的狂犬病疫苗可能导致观察到的疗效。我们从在威尔士获得的山羊中筛选血清，包括 3 种不同血清（正常血清）的集合和来源于供体小山羊的血清，没有发现狂犬病或其它保护性疫苗。这些动物不含活性抗体。

在还有另一个变体中，我们设想在细胞体外繁殖期间脱落的细胞膜可以提供抗原，对其山羊或其它物种可以指导抗体应答。这可以在缺少病毒感染的情形下发生。

图

图 1 至 9 涉及确定抗-HLAclass II 抗体的存在；

图 10 至 16 涉及 MLR 研究；

图 17 至 19 涉及确定抗-FAS 抗体的存在；

图 20 至 29 涉及确定另外的抗体的存在；和

图 30 提供来源于用不同免疫原免疫的山羊的血清的轮廓。

本发明的实施例

下列细节表示我们当前制备抗体产品的方法。

山羊血清纯化的实施例

通过使用溶解的 HIV 病毒混合物并配制有弗氏佐剂的肌肉注射将山羊接种。将病毒预先在 60°C 下热杀 30 分钟。在适当的间隔如 2 周后抽取血样用于初始评估。在优选方案中，每周给山羊注射，共 4 周，然后在第 6 周于是将动物放血来获得试剂。

在无菌操作下从山羊抽取约 400 cc 血液。削刮和用聚维酮碘准备用

于针提取的区域。使用 18 号的针从动物抽取约 400 cc 的血液。值得注意的是动物可以忍受约 400 cc 的抽血而动物不遭受任何不适作用。动物不一定必须牺牲。在它补充它的血量后大约 10-14 天内可以将动物再放血。

证实可能有效抗体的存在，已经考虑所需抗体活性。一旦证实该试剂的存在，在 4-6 周之间从山羊上采血。

然后将为了产生试剂，离心基础血液制品以分离血清。然后过滤 300 ml 血清以去除大的凝块和颗粒物质。然后用过饱和的硫酸铵（室温下 45% 的溶液）处理血清，以沉淀抗体和其它物质。在 5000 rpm 下将产生的溶液离心 5 分钟，此后除去上清液。将沉淀的免疫球蛋白重悬浮于足以再增溶沉淀的磷酸盐缓冲盐水（‘PBS 缓冲液’，参见 Sambrook 等 ‘分子克隆，实验手册’ 1989）中。

然后将溶液透析通过具有 10,000 道尔顿的分子量截止的膜。在 PBS 缓冲液中进行透析，在 24 小时期间每 4 小时更换所述 PBS 缓冲液。在 4 °C 下进行透析。

在 24 小时透析后将透析袋的内容物注入无菌烧杯。调节溶液以使每单位体积的质量=10 mg/ml。使用 PBS 进行稀释。然后将产生的溶液过滤通过 0.2 微米的滤器到无菌容器中。在过滤后，将溶液等分成 1 ml 的单剂量并且在使用前存储在 -22 °C。

试剂然后随时可以使用。

血浆至血清的转化

材料：

试剂	分子式	级别	每升水需要的数量
氯化钠	NaCl	USP/EP/BP	8.76 g
正磷酸二氢钠	NaH ₂ PO ₄	USP/EP/BP	0.2 g
正磷酸氢二钠	Na ₂ HPO ₄	USP/EP/BP	1.55 g
葡聚糖硫酸酯		钠盐, 分子量 500,000	100 g
冲洗用水	N/A	Baxter	1 升
1 x 150 mL 已灭菌的 Duran	N/A	N/A	N/A
2 x 2 升已灭菌的 Duran	N/A	N/A	N/A
磁搅拌器板&已灭菌的磁 flea	N/A	N/A	N/A
1 x Sartolab 或 Midisart 滤器	N/A	0.2 µm	N/A
6 x 1L Stedim 袋			
1 x 100 mL 无菌袋	N/A	N/A	N/A

100 mg/mL 葡聚糖硫酸酯的制备。

将所需数量的氯化钠，正磷酸二氢钠和正磷酸氢二钠溶解于 1 升水中以制备 1 升磷酸盐缓冲盐（PBS）溶液中。

当完全溶解时将 10 g 葡聚糖硫酸酯泼洒到 100 mL 磁搅拌的 PBS 中。混合最少 10 分钟以完全增溶溶解。过滤 0.2 μm 至无菌容器（例如 100 mL 袋）中并室温下保存，如果不需要立即使用。这是葡聚糖硫酸酯储液。

血浆转化为血清

使用 1.0275 的换算因子，即 1000 mL 重 1027.5 g 称出待处理的所需体积的血浆。

将 10 mL 葡聚糖硫酸酯储液加入每 1000 mL 的血浆（1 mg/mL 的终浓度）。

在室温下磁力搅拌 30 分钟。转移至 1 升 Stedim 袋中。

在 22°C 下 4000-4200 rpm（相对离心力=4910 g）离心最少 30 分钟。

小心将上清液吸入 1 L Stedim 袋中并丢弃沉淀。

定所需数量的 1 L Stedim 袋的皮重。

将上清液过滤 0.2 μm 至 1 L Stedim 袋中。每只袋包含大约 500 ml 过滤的上清液。

记录每袋中血清的体积。将每只袋编号和标记。

如果血清不是立即处理冷冻保存在 4-8°C 下可达 7 天的时期或在 -20°C 下更长时期。

36% w/v 硫酸钠的制备

材料

试剂	分子式	级别	每升水需要的数量
无水硫酸钠		USP/EP/BP	360 g
用于冲洗的水	N/A	Baxter	1.5 升
1 x 2 升已灭菌的 Duran	N/A	N/A	N/A
磁搅拌器板&已灭菌的磁 flea	N/A	N/A	N/A
1 x Sartolab 或 Midisart 滤器	N/A	0.2 μm	N/A
2 x 1L Stedim 袋	N/A	N/A	N/A

称出 1.5 升水（假设 1 mL=1 克）至 2 L 已灭菌的 Duran 中。

通过将 Duran 放入预先加热的恒温箱中至少 1 小时将水加热至 30-35 °C。

导入一个无菌磁 flea 并放置在磁搅拌器上。

搅拌同时缓慢加入 360 g 硫酸钠。

保持搅拌直至盐完全溶解并且溶液清澈。

如果溶液不够温热或允许冷却，盐将开始从溶液中结晶出来。通过将溶液加热至 50 °C 可以将盐再增溶。

将 1 升 36% w/v 硫酸钠溶液过滤 0.2 µm 至 1 升的 Stedim 袋中。相应地给袋作标记。

将剩余的 500 mL 过滤到分开的 Stedim 袋中。通过过滤继续加入另外 500 mL 注射用水并给这个袋标记 18% w/v 硫酸钠。

使用硫酸钠从血清中沉淀免疫球蛋白

注意。在用硫酸钠处理之前必须通过葡聚糖硫酸酯将血浆去纤维蛋白。

材料：

试剂	分子式	级别	数量
过滤的血清			1 升
36%硫酸钠溶液	N/A		1.5 升
18%硫酸钠溶液	N/A		1 升
磷酸盐缓冲盐水	N/A		2 升
冲洗用水	N/A	Baxter	N/A
深度滤器（depth filter）	N/A	N/A	N/A
0.2 µm 滤器	N/A	0.2 µm	N/A
用于渗滤的 Stedim 袋	N/A	N/A	N/A

使用设置在 30-35 °C 的恒温箱加热在 Stedim 袋中的过滤血清。取 2 x 5 mL 样品。

将等体积的加热的 36%硫酸钠溶液加至袋中的血清，例如 500 mL 盐溶液：500 mL 血清。

通过用手摇动袋子，或者放置在摇摆器盘上温和混合盐：血清混合物（乳白色溶液）。混合 30 分钟。

称量和平衡袋子并在 4000-4200 rpm 下 25-30 °C 离心最少 30 分钟。

小心吸取上清至废物。尽力避免扰动沉淀。取 1 x 5 mL 上清样品。

向每袋沉淀加入足量的 18% w/v 硫酸钠，将每袋的重量补足到大约 1000 g。

用手或用摇摆器至少 10 分钟混合以将残存的清蛋白从免疫球蛋白中洗脱。

将袋转移至离心机并如上所述重复离心。

小心吸取上清至废物。尽力避免扰动沉淀。

向每袋沉淀加入足量的磷酸盐缓冲盐水，将每袋的重量补足到大约 1000 g。

用手或用摇摆器至少 10 分钟混合并将袋转移至冷冻储藏过夜。

从储藏中取出袋并确保沉淀已经再增溶。

过滤 0.2 μm 至适当大小的渗滤袋。

取 2 x 5 mL 样品。

免疫球蛋白溶液的 bulk 制剂

用至少 0.1 m² 30,000 MWCO 的膜装配超滤（UF）装置。

通过再循环 0.5 M-1 M 氢氧化钠溶液最少 30 分钟将系统消毒。

将系统排放氢氧化钠溶液并继续用冲洗用水冲洗直至水的 pH 为中性。

将包含免疫球蛋白溶液的渗滤袋与 UF 连接。

通过蠕动泵将包含 PBS（10 x 体积的免疫球蛋白溶液）的袋与渗滤袋连接。

将渗余物导管与渗滤袋连接。

将渗滤物导管与废物袋连接。

继续通过超滤装置加工产品，使用泵速和阀门调节将入口和出口压力调整为入口 2.0 巴和出口 0.5 巴。

继续将免疫球蛋白溶液离心至大约 50 g/L。这是通过考虑初始浓度和测量去除液体的量来计算的。例如：

初始溶液是 2 升，25 g/L=50 g。在渗滤中去除的溶液体积为 1 升。因此浓度是 50/1=50 g/L。

测量渗滤流速并将来自包含 PBS 的袋的泵速调整为等于该流速。

继续进行渗滤直至已经交换 10 体积的缓冲液，即 1 升 IgG 溶液需要 10 升 PBS。

将系统浓缩的渗滤的 IG 溶液排放到渗滤袋中。断开袋并将包含至少 1 升 PBS 的 PBS 袋直接与系统连接。

再循环 PBS 冲洗液并将该冲洗物（rinsate）回收包含 IgG 溶液的袋中。

继续过滤 0.2 μm 散装(buck)配制的 IgG 溶液至预先称重的 Stedim 袋中。

当完成时取 1 mL 过滤的溶液样品并评估蛋白质浓度。

将袋子称重并计算 IgG 溶液的体积。

使用蛋白质浓度和 IgG 体积计算将溶液稀释至 10 mg/mL 的终浓度所需的 PBS 体积，例如：

IgG 的体积=1300 mL。蛋白质浓度=30 mg/mL

IgG 总量=39000 mg

需要量=10 mg/mL 终浓度。

因此最后所需体积=39000/10=3900 mL。当前体积为 1300 mL。因此需要加入的 PBS 体积为 3900-1300=2600 mL。

将 PBS 过滤到包含散装配制的 IgG 溶液的袋中以达到 10 mg/mL 的所需终体积。

试剂随时可以使用并可以冷冻储藏达 1 周，或者为了更长储藏需要冷冻至-20℃。

在这些方法中可以进行改变，如例如通过改变硫酸钠的浓度或转换它们的试剂。类似地渗析截止不需要为 10,000 道尔顿。

活性方法

介绍

私人观察显示给予来源于 HIV 免疫的山羊的血清的 AIDS 患者有时似乎明显改善，我们寻找潜在的机制。尽管用 HIV 注射山羊并且免疫应答被认为是高度特异性，这个根据未解释对于多发性硬化和有时癌症患

者观察到的益处。

研究的科学根据

尽管 Dalglish 和同事几年前已经发现 CD4 受体作为 HIV 的侵入门户，HIV 杀死 CD4 细胞的传统解释不是发病机理的适当解释，所述 CD4 细胞随着感染进展成 AIDS 显著下降。与该解释不很好符合的主要观察包括：

- (1) 从感染至 AIDS 发作的长时期（大约 10 年）。
- (2) 在几乎所有黑猩猩中和在大约 5% HIV 感染人群中疾病的缺少。黑猩猩具有与人相同的受体和共同受体并且在它们的 CD4 数量未下降的感染的黑猩猩中可以容易地检测到病毒。

基于这些观察，研究者已经寻找经感染后发展疾病的那些个体和不发展疾病的那些个体之间的解释性的差异。疾病的主要预示是在首次感染后的免疫激活和它持续的水平。换句话说，免疫激活越高，到疾病的时间越短。中等程度的激活可以导致在 AIDS 发展之前的更长时间和缺少免疫激活，甚至当病毒复制在黑猩猩和稀有个体中起作用时。

应当指出本文中的术语“免疫激活”指全免疫激活，即免疫系统的所有方面都被激活，包括 T 细胞以及 B 细胞的所有亚型。仅存在 3 种认识的全免疫激活的原因。

这些中的第一个是 HIV 明显显示的抗原的高变异性，然而在未进展的感染的人和黑猩猩中检测到高变异性。

第二种可能性是超抗原，其回避抗原特异性机制并导致整个免疫系统的激活。尽管 10 年前的最初的热情，还未发现令人信服的超抗原与 HIV 相关，解释这些发现。Westby 和 Dalglish 显示已经提示超抗原的可能性的 T-细胞所有组成成分的变异性完全是 CD4 群体的下降的结果，并且差异可以通过随机 CD4 破坏来解释。

唯一另外的解释是身体发现异种细胞或器官并且对它产生慢性应答。这在临床上移植和特别是骨髓移植后经常发生，并称为慢性移植物抗宿主反应（GVH）疾病。在这种情况下甚至几个异种细胞的存活足以

激活整个免疫系统，导致与在感染 HIV 患者中看到的类似的攻击性自身免疫应答。该疾病的临床特征如此显著类似于 AIDS 以致在发现病毒之前，美国领衔免疫学家，NIH (USA) 的 Gene Shearer 提出疾病可能是由通过输血或性交传递的异种细胞引起的。几个月后病毒的发现和通过因子 VIII (非细胞产物) 的传递导致该观察被忽略的意义。

全激活的另外的解释的缺乏导致 Dalglish 和 Habeshaw 寻找病毒可能能够模拟 I 类或 II 类 HLA (其是鉴定自身和本发明抗原的分子) 证据。尽管已经公开 GP120 的一些序列，具有与 HLA 较小的同源性，我们能够鉴定 HIV 包膜 (GP120) 的主要区域，其与 I 类 HLA 和 II 类 HLA 具有显著的结构同源性。在详细结构已知的那些 HLA 分子以外 Elizabeth Hounsell (MRC) 能够模拟 GP120。基于这些分子和序列，Habeshaw 和 Hounsell 预测病毒可能是被具有 HLA-B8 的人看成“异种的”，还被具有 HLA-B27 的人看成“自身的”。在由 MRC 在英国进行的全-HIV HLA 标记研究中唯一重要的差别是具有 HLA B8 的人要以比剩余群体快得多的速率发展疾病，并且长期无进展者或极慢的进展者是 HLA-B27 现在是公布事实的问题。

随后的工作已经显示：

- (1) 响应异种细胞 (即不同的 HLA 类型) 攻击产生的杀伤 T 细胞也将杀死感染 HIV 的自身细胞。
- (2) 称为 GP120 的 HIV 病毒的包膜 (我们相信与鉴别自身的 HLA 分子具有结构同源性) 可以以与 HLA 非常类似的方法与肽结合。另外，针对肽产生的 T 细胞和模拟 GP120 的 HLA 也将响应含有肽的 GP120，但不响应不含肽的 GP120，提示与肽结合的能力可能在它的确认中非常重要，因此在易感受试者中导致慢性免疫激活的能力。
- (3) 新近我们已经显示肽在 HLA 上结合的区域存在 GP120 上，如果去除分子的该部分，如由波士顿 Dana Faber 的 Sodroski 教授友好地进行的，该肽将不再结合。

上述观察的影响提示系统的免疫激活理论上可以被切断，因此疾病

可以不进展。在这点上有两个主要的观察，其中之一是作为本科学结果的临床研究，其中对由于骨髓衰竭导致可能不再服用 AZT 的患者施用甾类化合物，一种强效（heavy hitting）抗炎药，其不能长期给予而无显著的副作用。我们能够看见使用甾类化合物显著改善具有强烈类似于 GUH 疾病的常规特征的非常病重的患者，并能够显示发挥该作用所需的剂量极高，从长远观点来看不是实际的提议。新近杜克大学（美国）小组已经显示在针对 HIV 给药甾类化合物的患者中病毒负荷下降，其现在越来越多争论什么被认为是自身免疫（慢性移植抗宿主反应疾病的常规特征）。简而言之，诱导途径的抗炎药可能在 HIV 感染中有益存在科学根据，所述抗炎药特别作用于 I 类或 II 类 HLA。

测定和结果

为了看山羊血清是否具有任何炎症性质，我们将它加到通过混合具有不同遗传背景的不同个体的细胞形成的反应中。出乎我们意料之外，它在抑制该反应上极其有效。使用大量分子抗体，我们能够看到唯一接近山羊反应性的抗体是抗 II 类 HLA。抗 I 类抗体只部分减少该反应。非常让人感兴趣的是针对 HIV V3 的抗体实际上使该全激活更差，所述抗体被科学界的大部分认为是疫苗的主要目标。该发现可能符合免疫激活理论，因为针对病毒的免疫应答实际上给病毒提供生长和刺激而转移，这可以解释为什么针对该区域的疫苗如此无效。

考虑到神奇的性质已经经常被授予山羊，来源于其它动物的血清可能在具体测定中具有意外的活性，我们获得未接种的山羊的血清，其根本不具有活性。我们然后从具有不同接种方案的山羊获得另外的血清。出乎我们意料之外我们可以显示该血清只发现 HIV 包膜和 II 类 HLA。实际上，已知与 HLA 具有显著同源性的病毒的较小部分没有在血清中被发现。

我们因此非常感到惊讶地发现混合物注射和分开注射之间的重大差别，因为 GP120 中保守的 HLA 区域的所有组成成分被注射混合物的山羊的血清有效识别。

注射 HIV 的山羊生产强烈的类似于抗 II 类 MHC 的应答的事实概括

这个数据的解释，所述应答可以通过使用不同分离物扩展。这是如何发生的可能解释如下：

- (1) HIV 全部组成成分与 II 类 HLA 如此类似以致它因此被具有完全不同的 HLA 所有组成成分的山羊免疫系统识别。
- (2) 第二种可能性是在免疫原，即病毒制剂中，位于病毒出芽的细胞表面上的 HLA 被识别，免疫应答不是针对病毒而是针对共同联合 (co-associated) 的 HLA。
- (3) 第三种解释涉及上述两种解释的结合。可能在它制备时出芽病毒已经与 HLA 融合，该组合被山羊血清强烈发现。近来的报导显示除非病毒通过具有 HLA 的细胞出芽并将 HLA 结合到膜内，那么病毒保持无传染性。这意味着它必须具有来源与宿主细胞的一些 HLA 以激活细胞进入机制。

这里我们已经显示注射 HIV 制剂的山羊针对 II 类 HLA 分子产生强烈的抗体应答。已知许多疾病产生纯粹破坏性的炎症损伤，因为细胞涉及过量表达 II 类 HLA。尽管多种类型的自身免疫疾病显示该性质，但是最著名的实例之一是多发性硬化。因此情况可能是山羊的免疫应答破坏了对这些分子的耐受性，该过程可能允许体内发生强烈的抗炎过程，其可能与临床益处有关。如果无显著的副作用，如果慢性给药山羊血清，如果情况是这样，将明显优于长期高剂量的甾类化合物的使用。

抗-HIV 应答，其是强烈的抗 II 类 HLA，有可能提供关于抗 AIDS 疫苗的真正要求的重要联系，我们意欲分析该应答以生产候选 HIV 疫苗。

HIV-1 免疫的山羊血清和抗炎性质 介绍

提供来源于用 HIV-3B 病毒裂解物或 6 种不同 HIV-1 分离物的 NIH 病毒混合物免疫的动物的血清。该血清中的一些先前已经被用作实验性治疗方案的一部分达到好的效果，然而它作用的机制未知。为了确定作用机制我们在 ELISA 板上针对 HIV-1 gp120，HLA-DR1 筛选血清，从病毒表面糖蛋白的不同区域选择肽，一些与 HLA 具有序列同源性。

材料和方法

血清和抗体

提供原始的 HIV-3B 免疫的山羊血清样品以及关于放血和免疫日期的信息，所述山羊血清样品已经与来源于许多 HIV-3B 病毒裂解物免疫的山羊的样品（在 1999 年 9 月 14 日免疫，在 1999 年 9 月 21 日和再次在 2000 年 9 月 29 日和 11 月 07 日免疫的动物#0125, #0126, #0127, #0128, #0129）一起用于患者治疗。对于 ELISA, 我们简单地选择筛选从后期（2000 年 11 月 30 日和 2000 年 12 月 01 日）生产放血（production bleed）采集的血清样品。使用由下列 HIV 分离物（92HT593, 92US657, 92US660, 92US714, 92US723, 91US056）组成的 NIH 病毒混合物免疫动物#378。免疫是在 11 月 7 日和 28 日进行。将在 2001 年 1 月 25 日从生产放血采集的血清用于 ELISA 筛选。还提供对照山羊血清。在 ELISA 和混合淋巴细胞反应研究中，与血清一起我们包括抗人 HLA-DR 和抗人 HLA-DP 和 DQ（Pharmingen），在 MLR 研究期间包括对于 HIV-1 IIIB 的 V3 结构域（IRIQRGPGR）特异的小鼠抗-gp 120 IgG（EVA3047），其是通过 Harvey Holmes 博士（MRC AIDS 试剂计划，国家生物标准和控制研究院，Potter's Bar, 英国）从 J Laman 博士获得的。

肽和蛋白质

重组 HIV-1 IIIB gp 120 是在中国仓鼠卵巢细胞中生产，由 J Raina 博士通过 MRC AIDS 试剂计划的 Harvey Holmes 博士提供。重组的 HLA-DR 1 是由 Don C. Wiley 教授提供的相同蛋白质，其在肽结合实验期间使用。本研究使用的 HIV-1 肽在表 1 中列出。肽 ARP7022, ARP710, ARP740-23, -28, -42, -44, -45, -46 和 47 是从 MRC AIDS 试剂计划的 Harvey Holmes 博士获得。对照肽 P12 表示 HIV-1 gp120 的 CS 区域的混杂序列，由英国伦敦 Birkbeck 大学，生物和化学科学学院 E. F. Hounsell 教授提供。肽等分保存在 -20°C 直至使用。

ELISA

按照与 Brown 等（J. Immunological methods 1997, 200:79-88）所述

类似的方案进行 ELISA。将肽和蛋白质与 0.05M pH 9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐结合缓冲液分别以 16 $\mu\text{g/ml}$ 和 1 $\mu\text{g/ml}$ 混合,并一式两份涂布在 Immulon 4 LIBX 高度结合微量滴定板 (Dynex Technologies, INC. 14340 Sullyfield Circle, Chantilly, VA 20151-1683, USA) 上 40°C 过夜。使用 PBS 中的 5 mg/ml 酪蛋白将孔封闭并让它在 40°C 下过夜。将山羊血清在 PBS/0.25% 酪蛋白中稀释 1/500 和 1/1000 倍,而将纯化的抗体分别稀释 1/1000 和 1/3000 倍,并在 37°C 下温育 1 小时。使用 Wellwash 4 机器 (Denley) 用 PBS/0.05% 吐温 20 将孔洗涤 3 次。

使用与在 PBS/0.25% 酪蛋白/0.01% 吐温 20 中稀释 1/1000 的小鼠单克隆抗-山羊/绵羊 IgG 克隆 GT-34 (SIGMA) 偶联的过氧化物酶检测固定化的山羊抗体,使用在 37°C 下温育 1 小时的山羊抗-小鼠 IgG 过氧化物酶偶联物 (SIGMA) 检测抗-HLA 抗体。在另一轮洗涤后,在黑暗中室温下在孔中温育新鲜制备的邻苯二胺二盐酸盐(dihydrochloride)底物 (OPD; SIGMA),在 15 分钟后通过加入 50 μl /孔 2.5 M H_2SO_4 终止反应。使用微量培养板读数器在 492 nm 下测量 OD 值。

表 1. 在测定过程中使用的肽

ARP7022: (DQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNC)

来源于 HIV gp41 保守区域的 24 个残基的肽 (593-616), 其被大多数欧洲和非洲 HIV 阳性血清识别。对照肽。

ARP710: (VKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR)

来源于导致 gp120/41 切割位点的、HIV gp120 保守的 C-末端 (CS) 区域的 23 残基的肽。包含与 HLA 的结构同源性 (486-508)。

ARP740/23: (RPVVSTQLLLNGSLAEEVV)

来源于 gp120 的 C2 区域的 20 个残基的肽 (252-271)。

包含与 HLA DR40-链的序列同源性。

ARP740/28: (NTRKRIRIQRGPGRAFVTIG) (302-321)

来源于 V3 环 HIV-1 gp120 的 20 个残基的肽。

ARP740/42: (GQIRCSSNITGLLLTRDGGNS) (438-458)

包含与 DR- β 1 链的同源性。

ARP740/44: (NNESEIFRLGGGDMRDNQRS) (459-478)

包含与 HLA-A2 的序列同源性

ARP740/45: (GQDMRDMWRSELYKYKVVKI) (469-488)

被 M38 识别的序列，与 HLA-C 和 C5 区域交叉反应的抗体。

ARP740/46: (ELYKYKVVKIEPLGVAPTKA) (469-478)

来源于 gp120 的 C5 末端的 20 个残基的肽。在 C-末端包含同源性的开始的 3 个残基。

ARP740/47: (EPLGVAPTKAKRRVVQREKR) (479-498)

来源于 gp120 的 C5 区域的 20 个残基的肽。包含与 HLA 的结构同源性。

P 12. (RAKTVERKVERRK)

HIV gp120 的 CS 区域的混杂序列，由 E. Hounsell 提供。不被 WV 阳性血清识别。对照序列。

混合淋巴细胞反应抑制测定

供血者

在许可下通过伦敦，Tooting，南泰晤士河输血服务的 Liz Buckland 从供血者提供 HLA class II 错配的血样。

PBMC 制剂

将新鲜抽取的静脉血稀释在 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS; SIGMA) 中，小心覆盖在 Histopaque (SIGMA) 上并在 800 g 下 20°C 离心 25 分钟。使用巴氏滴管从密度界面收获 PBMC，在 HBSS 中洗涤 3 次并使用贝克曼库乐尔特颗粒计数器计数。

混合淋巴细胞抑制测定

对于给定的 MLR，将来源于 2 位 II 类 HLA 错配的个体的 PBMC 再悬浮在包含 10% 热失活的人 AB 血清 (SIGMA)，4 nM L-谷氨酰胺，青霉素 (100 U/ml) 和链霉素 (100 µg/ml) (SIGMA) 的 RPMI 1640 培养基中，并命名为刺激物或效应器细胞。将细胞平板接种，一式三份，

刺激物 1 x 细胞/孔，效应器 1 x 10⁵~细胞/孔以产生 10:1 的效应器-刺激物比率。为了测定由山羊血清和各种抗体施加的对细胞增殖的抑制作用，将 3 μ l 未稀释的山羊血清或 1 μ l 纯化的抗体加入包含混合细胞培养物的孔中，并在 37°C 下在 5% CO₂ 中温育 6 天。在第 5 天，细胞收获前 18 小时用 1 μ Ci 含氚的胸腺嘧啶脱氧核苷 (³H-Thd; Amersham) 脉冲。使用 Tomtec Harvester 96 Mach III 细胞收集器将细胞收获在玻璃纤维滤垫上，并使用 Wallach 1450 microbeta 液体闪烁计数器测量结合的 ³H-Thd。结果显示为平均的每分次数 (cpm)。

结果

存在于山羊血清中的抗 II 类 HLA 抗体

我们研究不同山羊血清可以识别取自贯穿 HIV1 gp120 的不同区域 of HIV-1 gp120 肽的程度，所述 HIV-1 gp120 肽许多与 HLA 具有序列和结构同源性 (表 1)。我们还包括可溶解的 HIV-1 gp120 和 HLA-DR1 在这些测定中。结果在图 1 至 9 中显示。Bg 表示本底水平。高于 0.1 的 OD 水平被认为是阳性结果，条件是与免疫前的血清发现的任何抗原缺乏反应性。

不同的血清给出不同的结果，但通常指向与 HLA-DR1 反应的趋势。免疫前的血清不与任何筛选的肽或蛋白质反应，血清#0125 和血清#0126 未显示任何强烈的反应性。然而其它所有血清显示了与 HLA-DR1 的高水平的反应性，特别是#0127 和#0128，具有极高的反应性。为了清楚在图 9 中将与 HLA-DR 的反应性与抗人 HLA-DR 和抗人 HLA DR, DQ 和 DP 比较。

抗 HLA 活性是有趣的，因为它很可能表示针对 HLA 分子的活性，所述 HLA 分子正是来源于在免疫前培养病毒的细胞。当 HIV 在它的包膜中趋向拖动比它表达 gp120 分子更多的 HLA 分子时，特别是在细胞中上调的 II 类 HLA 分子，结合的抗 gp120 和抗 II 类 HLA 活性可能表示对 HIV 的良好保护性应答。某些血清的情况如此，特别是#0127 和#0128，通过使用病毒免疫在这些山羊中诱导强烈的“变态 (allo)”应答，所述病毒在它的表面上携带高水平的 II 类分子。

来源于用 NIH 病毒混合物的山羊的血清#0378 显示对多种 HIV-I 肽的最好的各方面的交叉反应性，抗 HLA DR1 水平大约与原始的抗 LILV-3B 山羊血清相同，提示该血清总体上可以更好地进行抵抗 HIV。该血清与与 HLA 具有同源性的各种 HIV-1 肽很好地反应。血清中没有一个与混杂的对照序列 P12 反应，证明反应性对于 HIV 肽是特异性的。在与 HIV-i gp120 结合方面血清#0127 和#0128 代表最好的血清，同时包含极高量的抗 HLA DR 活性。

山羊血清的 MLR 抑制

关于图 10 和 11 的 MLR，我们使用来源于随机错配的个体的细胞。尽管这些不一定产生最大的增殖（在那个时候培养基存在问题），出现的趋势证明在 MLR 期间通过山羊血清（在每种情形下使用的原始 HIV-3B 免疫的血清）抑制增殖。随后我们开始使用 II 类 HLA 错配的细胞（图 12），其产生更好的增殖。如同抗 HLA DR 抗体一样，山羊血清成功完全抑制细胞增殖并且似乎具有抗炎活性。

通过我们已经从 ELISA 结果所看到的来判断，很可能抗 HLA DR 抗体导致抑制作用。我们强调抗 HLA DR 而不是整个抗 II 类，因为似乎广泛范围的抗体无论多近抑制增殖都不如抗 HLA DR 单独有效。为什么这可以发生是神秘的，然而可能是 HLA-DR 代表涉及炎症活性的主要的 II 类抗原，针对它的抗体可在细胞内导致信号发送来抑制复制。因此山羊血清似乎作为抗炎剂，抑制细胞增殖。这可能预示在 HIV-1 感染的情形中的阳性结果，在 HIV-1 感染中病毒诱导的细胞激活对于病毒复制是必需的。尽管在表面上它似乎是反生产性（counter-productive）的，引入温和的免疫抑制剂可以作用来抑制病毒复制和控制疾病，因为 HIV，不同于相关的逆转录病毒 HTLV-1 或 HTLV-2，不使细胞无限增殖化和导致癌症，因此完全依靠细胞激活来增殖。

至今对于 HIV 还未鉴定已知的 T 细胞超抗原，其导致似乎装配相对不好，激活它感染的细胞的病毒是如何能设法导致疾病的要点。我们正在研究病毒诱导变态激活（alloactivation）为基础的理论，条件是它与病毒相关 HLA 分子有关或者在 HIV 和 HLA 之间看到的分子模拟。山羊血清可能

简单地通过限制该全激活 (pan-activation) 而有助于患者的健康。Saifuddin M 等在文章 (Clin. Exp. Immunology 2000, 221:324-331) 中已经沿着类似的路线进行观察, 其证明了 II 类 HLA 分子, 特别是 HLA-DR 在病毒复制中的重要性。他们注意到针对 II 类 HLA 分子的抗体在 II 类表达细胞中抑制病毒的表达, 提示可诱导的 II 类 MHC 反式激活蛋白 (CIITA) 涉及 HIV-1 转录的增强。我们可以在山羊血清的情形中有效地发现这些效果。将这与抗 V3 环抗体比较, 所述抗 V3 环抗体导致增加的增殖, 因此可能在事情的总规划中是反生产性的。gp120 的高度可变的 V3 环区域不仅允许病毒逃避突变型, 而且作为免疫系统更多轮次的激活的诱饵。不幸地该区域的当务之急是最终有益于病毒和使免疫应答远离更保守的区域, 针对其的活性可能更有效。

如果抗炎作用实际上是血清活性的主要方式, 它可能获得应用于多种其它的病症, 其中过兴奋和细胞增殖是疾病症状的基础, 例如多发性硬化。对于将来的实验重要的是对所有血清重复 ELISA 以证实抗 HLA 和 gp120 活性的程度。在该情形中我们对来源于用 NIH 病毒混合物免疫的动物的血清#0378 非常感兴趣, 因为它与许多与 HLA 抗原以及 HLA-DR1 具有同源性的 HIV 肽有效地反应。

更多的实验

下列数据来自与先前采取的那些类似的实验, 其中我们鉴定山羊血清中的抗-HLA 抗体, 当常规治疗不再适合时所述山羊血清已经被用作遭受多发性硬化和 AIDS 的志愿者治疗的形式。我们的工作涉及研究治疗后在这些患者的恢复中提出的山羊血清作用的抗炎机制。当注意抗 HLA 抗体时这先前被提出。然而我们现在给存在于山羊血清中的抗 FAS 抗体增加一个功能, 给予它们在数小时内诱导表达 FAS 受体的细胞编程性细胞死亡的能力。

FAS/APO-1 (CD95) 大量地显著存在于活性淋巴细胞上, 在与 FAS-配体或抗-FAS 抗体交联后通过其发送信号 (signalling) 可以诱导细胞自杀。这些分子的作用不仅在用于杀伤感染的细胞的细胞毒性免疫应答中, 而且在抗原已经消失后下调免疫应答以防止可能对宿主有害的细胞不断扩

增中极其重要。因此该途径被认为对于维持平衡的免疫应答是极为重要的。

在 HIV 感染的情况下，发现免疫系统异常活跃，给病毒复制提供大量空间因为对于该过程它要求激活的细胞。在多发性硬化患者中，高度激活的细胞贯穿血脑屏障并且导致对髓鞘的破坏，引起斑点形成和神经功能的丧失。

通过在山羊血清中存在的抗 HLA 抗体（至少抗 HLA DR）介导的抗炎机制可能是患者恢复后的机制。我们现在已经发现抗 FAS 抗体不同程度地存在于山羊血清中，并且打算在该提出的关于多发性硬化和 AIDS 患者的活性模型的抗炎机制中结合抗 HLA 和抗 FAS 抗体的作用。我们提出这些抗体把活性最高的细胞作为目标，导致它们的死亡而抗 HLA 抗体抑制任何免疫活性。然后可能接着细胞因子和趋化因子的产量显著降低，导致在多发性硬化的情形中对髓磷脂的免疫攻击终止，或者在感染 HIV 的患者的情形中病毒负荷减少，条件是缺乏激活的细胞和正在分泌或将分泌病毒的细胞的死亡。

实验工作

我们开始寻找抗 FAS 抗体，条件是观察到当加入混合淋巴细胞反应（MLRs）时来源于效应器的山羊血清破坏细胞。MLR 是来源于 2 个具有不同 HLA 类型的不同人的淋巴细胞以非特异性的方式反应的结果，导致淋巴细胞增殖和增强的周转。我们感觉这是检验抗炎抗体的好系统，因为自身免疫反应全都针对在 HLA 类型 2 分子上不适当的表达自身肽。

图 13 至 16 是取自一些近来 MLR 的照片，含有或不含血清。

图 13 是混合淋巴细胞反应 72 小时后的照片。

图 14 是与免疫前的血清混合 72 小时的 MLR。

在所有的情形中不存在从 MLR 自身的显著变化。事实上，免疫前的血清促进 MLR。

图 15 是加入血清#0125 的 MLR。该血清来自山羊，其被认为对免疫无应答因为存在低或可忽略的 HLA 和/或 FAS 抗体，当我们在效应器中鉴定抗 HLA DR 时一些与我们先前 ELISA 结果相关的事情。

图 16 是加入血清#0127 的 MLR, 其已经显示是非常好的效应器。在 MLR 中存在许多 PBMC 的显著的细胞破坏。对于与当前用于处理的血清制剂一起的所有强效应器该结果类似。

我们决定寻找能够诱导破坏高活性细胞的抗体, 如可能在 MLR 的情况下。我们因此寻找针对 FAS 的抗体的存在, 所述抗体可能能够交联 FAS 受体并诱导出现编程性细胞死亡所需的信号。因此我们进行针对 FAS 的 ELISA, 其证明该抗体的存在于被认为是最好的效应器和以抗 HLA 抗体补充先前结果的山羊血清中。

这些结果, 连同我们先前的数据一起, 与我们在我们的 MLR 结果中已经看到的良好地联系起来, 在 MLR 结果中由于细胞破坏导致减少的细胞增殖。

从近来的 ELISA 结果我们开始鉴定山羊血清中另外的可能的活性组分, 所述山羊血清已经被用作对于遭受常规治疗不再适合的多发性硬化 (MS) 和 AIDS 的志愿者的治疗形式。

以下结果来源于 1/1000 稀度的免疫前的血清的 ELISA 筛选。筛选的抗原为卵清蛋白, HLA DR1 (DR1), Fas, 神经生长因子受体 p75 (NGFr), 5-羟色胺受体 (Ser R), 多巴胺受体 (Dop R), CXCL 10 和单核因子, 其由 γ 干扰素 (MIG) 诱导。

已经明显的是针对多巴胺受体的抗体高浓度地存在于血清中, 而对于其它任何抗原无活性。然而在先前已经被用于治疗原始 3B 血清, 和从用 T 细胞系中生产的 HIV IIIb 免疫的山羊生产的血清 0127 中存在针对这些抗原中的许多的活性, 包括针对 NGFr, 多巴胺受体和 CXCL 10 的活性。

针对 HLA 和 FAS 的活性再次是明显的并且与我们已经提出的抗炎机制一致。与该主题一致我们现在可以加上针对 CXCL10 和神经生长因子受体 p75 (NGF R p75) 的活性。通过多发性硬化的鼠模型中大大减轻疾病的严重性, 针对 CXCL 10 的抗血清最近已经显示是有益的, 所述减轻疾病的严重性是通过减少 CD4⁺ T 细胞和巨噬细胞侵入 CNS, 减少 TH1 细胞因子 IFN- γ 的表达和增加髓鞘再生 (remyelination)。假定炎症损伤的局部细胞通常生产 CXCL 10, 其通过它的受体 CXCR3 结合并吸引炎

性 TH1 细胞，这是令人感兴趣的。因此通过山羊血清中的抗体中和该趋化因子或封闭它的受体很可能是我们对于山羊血清已经提出的作用的抗炎机制的一部分。

同时针对低亲和力的神经生长因子受体 NGF R p75 的抗体通过阻止 NGF 与受体接触与感染 HIV 的单核细胞和巨噬细胞中的细胞死亡有关，其又代表另外的抗炎机制。使人感兴趣的是我们已经发现针对这些受体的最强水平的抗体存在血清 0378 中，该血清是通过使用最初在 PBMC 中生产的 6 种不同 HIV 病毒的混合物而不是单独 T 细胞免疫山羊生产的。即使使用 1/4000 的稀度活性仍然非常高。

我们因此增加这些抗原的活性，与在两种疾病情形中的血清提出的作用的抗炎机制一致。我们还增加导致与治疗相关的健康感觉的多巴胺和 5-羟色胺受体的活性。

我们筛选许多新的山羊（707-718），其最近已经用 HIV 以及来源于这些山羊的免疫前的血清接种。尽管它们中没有一个显示类似如上所示的原始免疫前的血清的针对多巴胺受体的抗体，通过与未具有狂犬病疫苗的来自威尔士的山羊比较山羊中的一些平均具有高水平的该抗体。在原始免疫前的样品中看到的更高水平可能是由于过去有时暴露于一些环境因素，接着强烈应答所导致。

备选免疫原

在另一个变体中，不需要使用 HIV 病毒作为免疫原来产生抗体，将人白细胞用作免疫原来产生有效的抗体制剂。图 30 为来源于用 HIV 混合物，和用命名为 SHULA 的人白细胞免疫的山羊的血清提供轮廓。

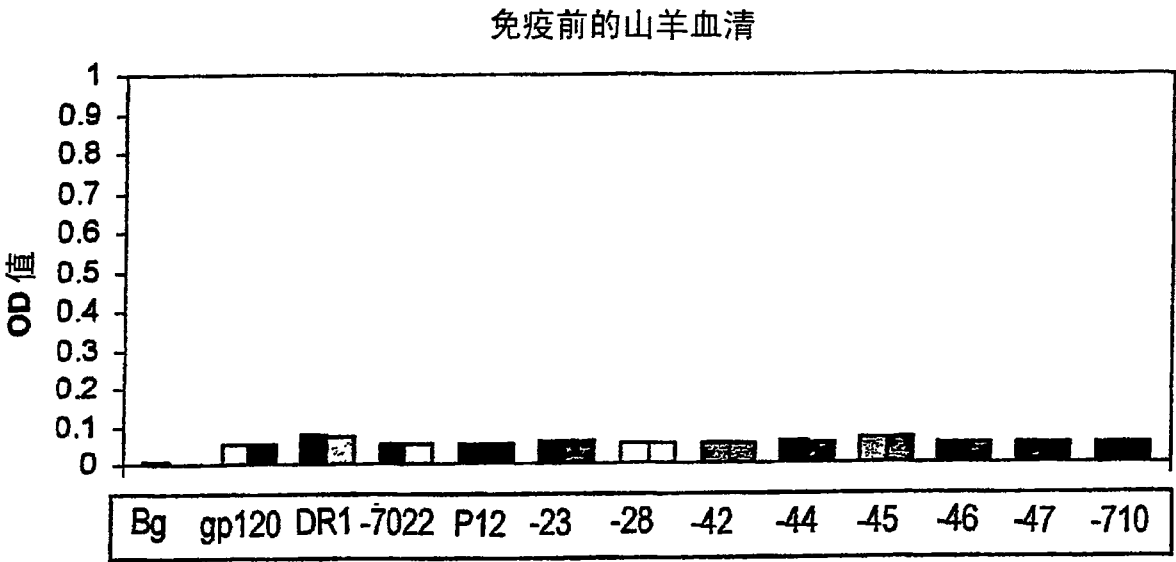


图 1

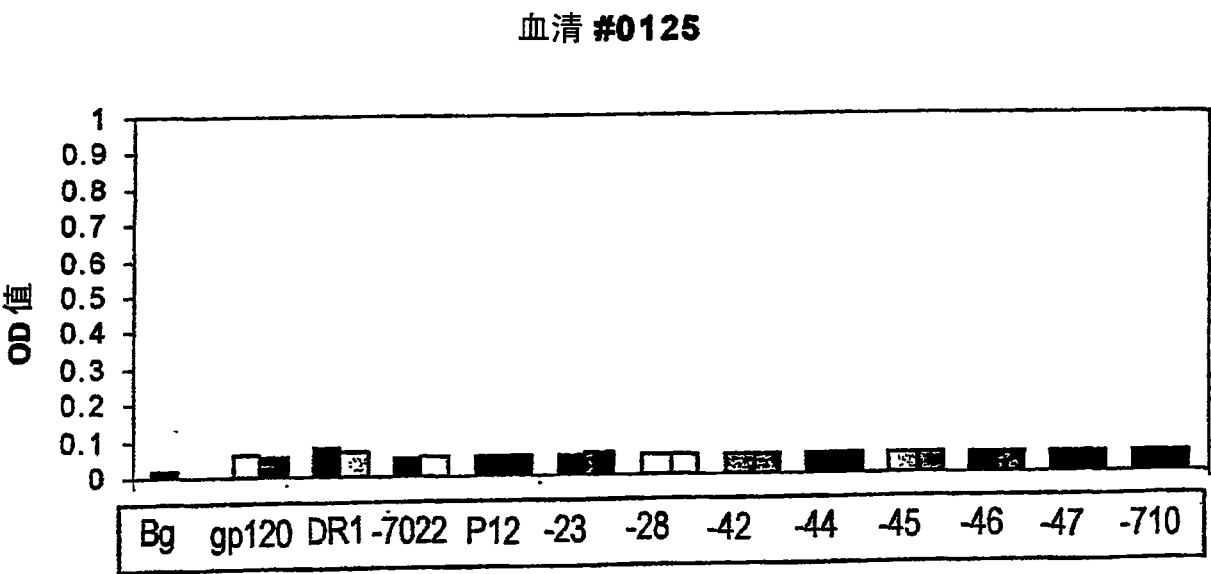


图 2

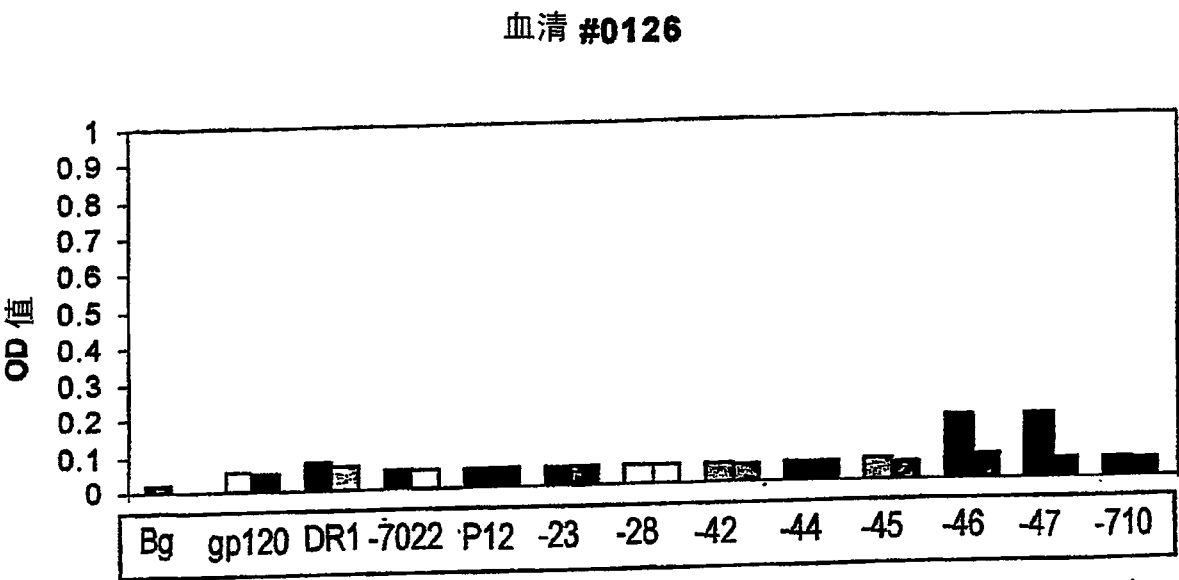


图 3

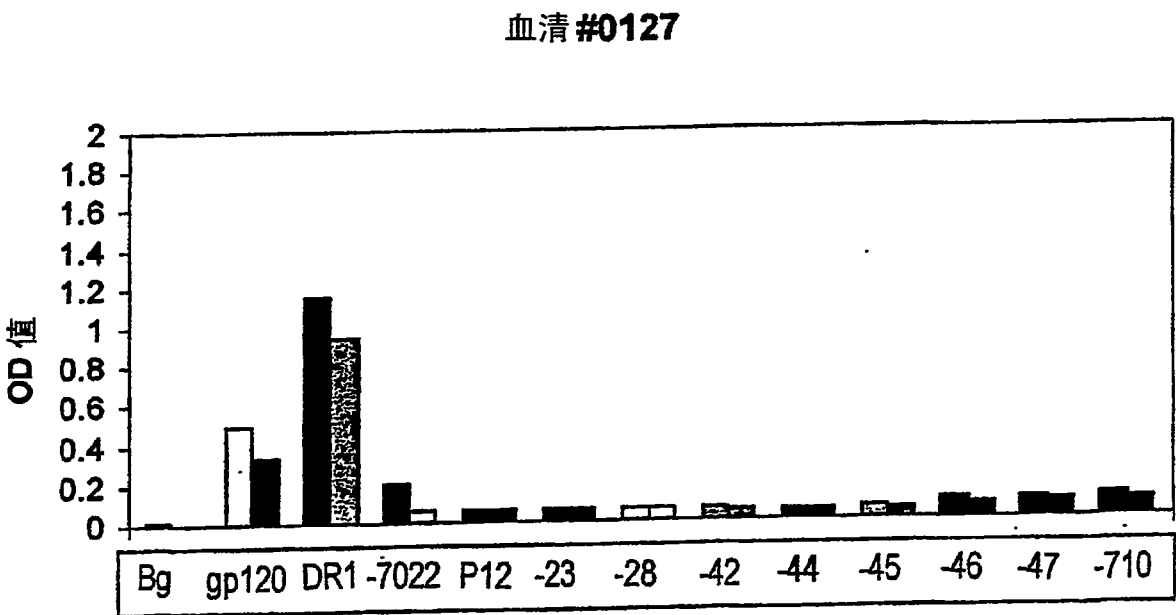


图 4

血清 #0128

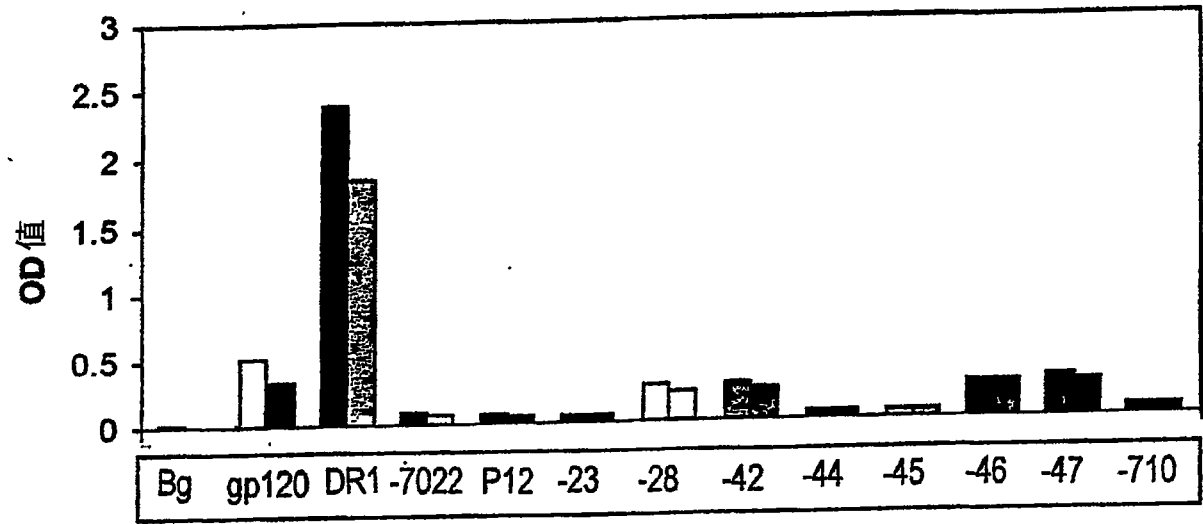


图 5

血清 #0129

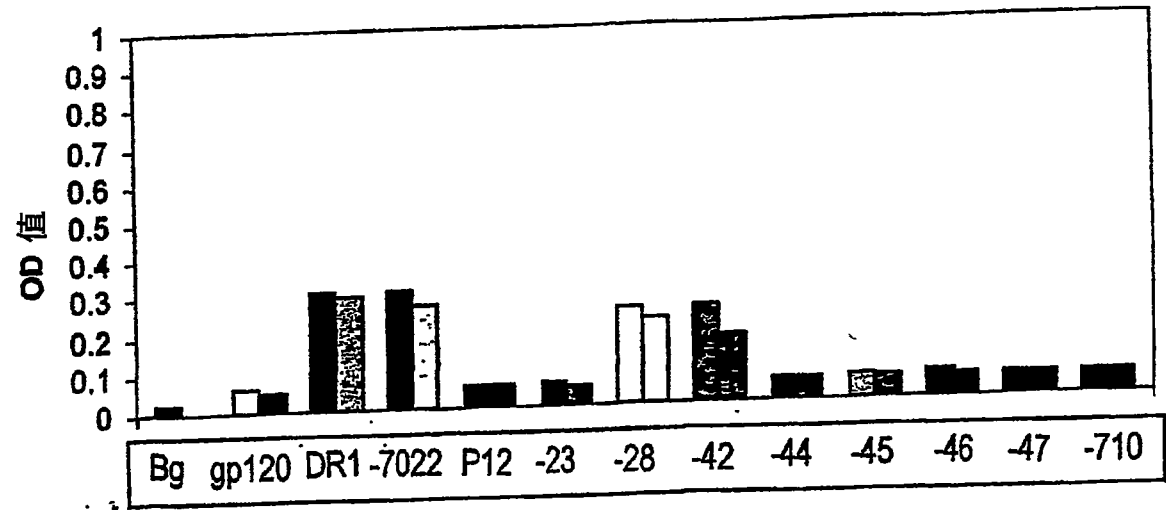


图 6

原始抗-HIV-3b 血清

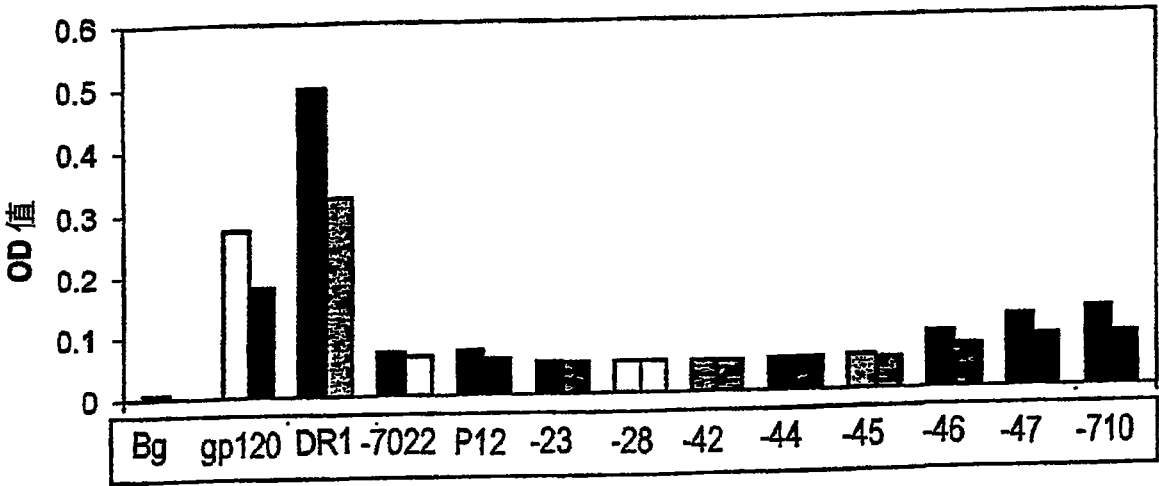


图 7

血清 #0378

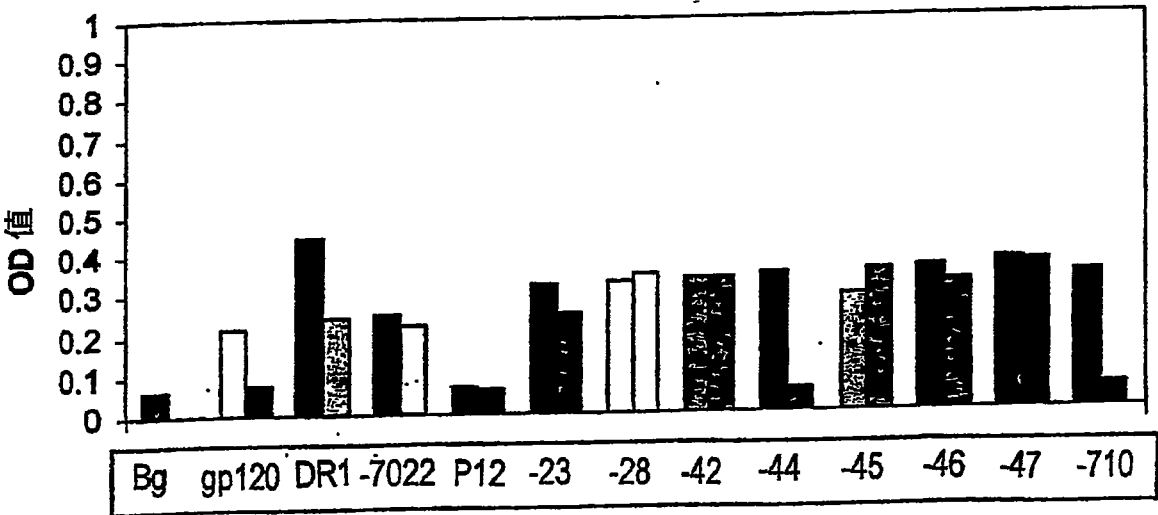


图 8

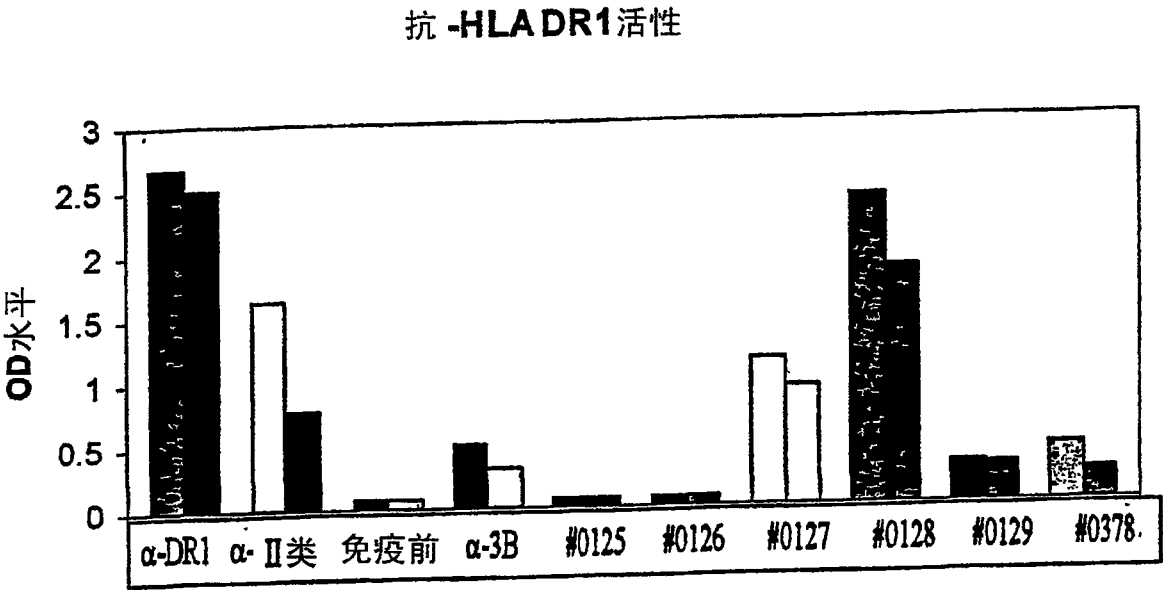
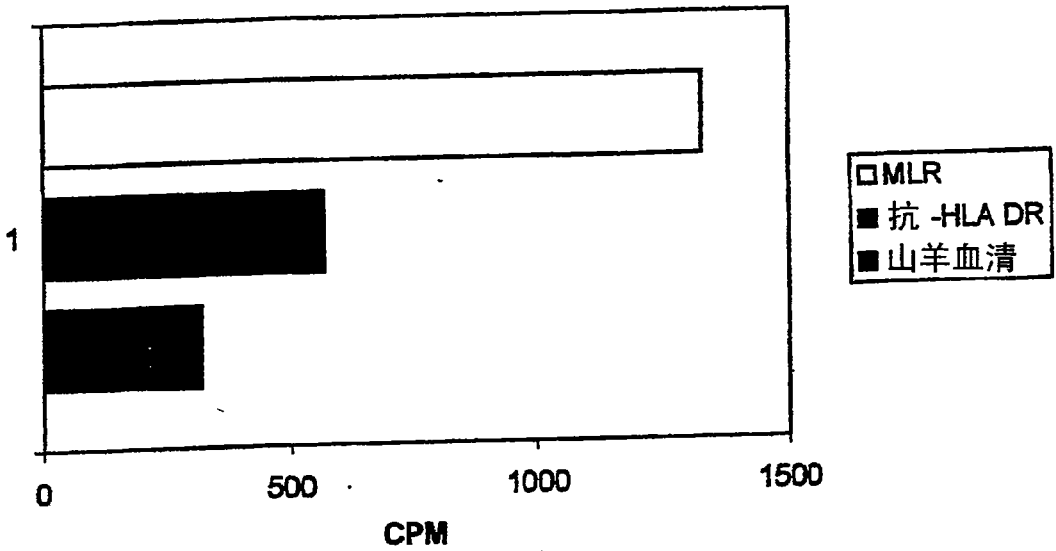
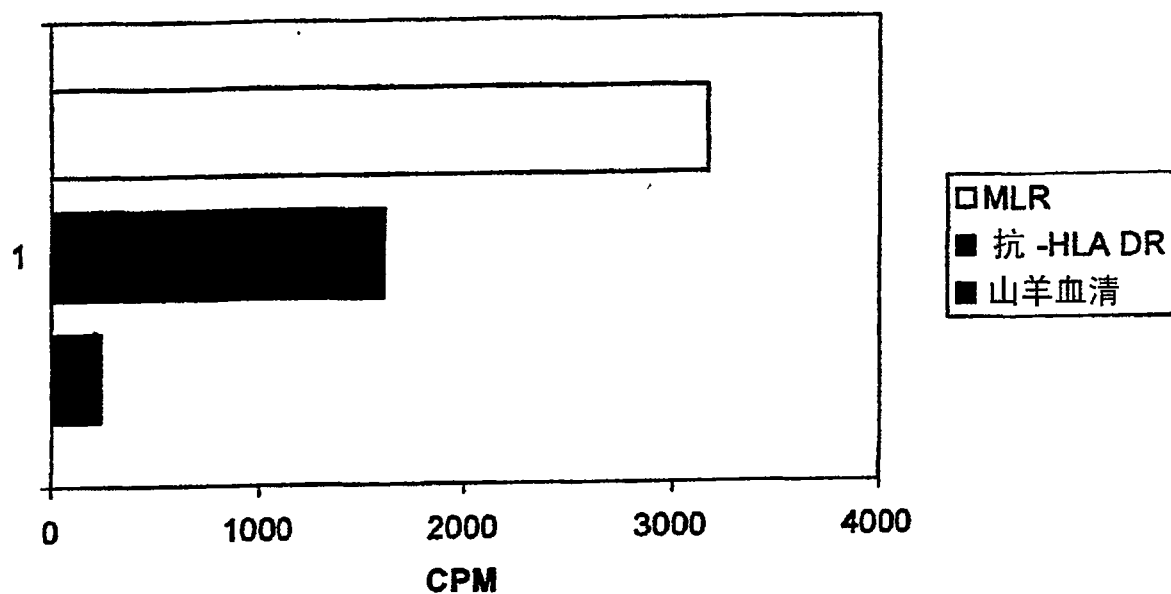


图 9



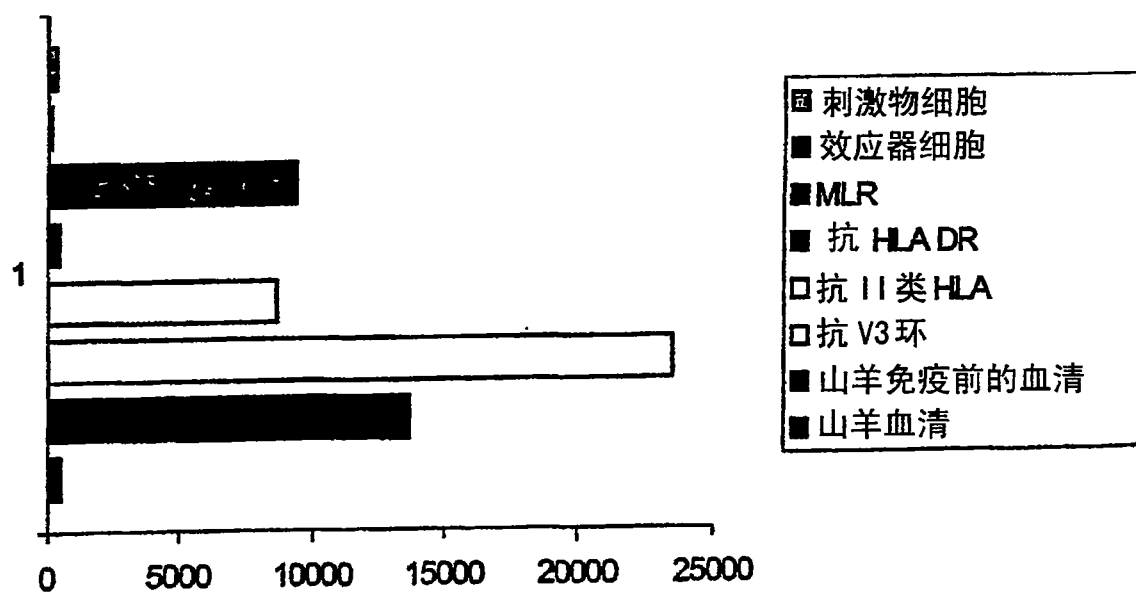
1. 刺激物细胞单元型 : A2,33/ B62,65/ Cw 8,9 ; 效应器 : A2,3/ B47,57/Cw6,x

图 10



2. 刺激物细胞单元型 : A2,33/ B62,65/ Cw 8,9; 效应器 : A3,32/ B7,60/ Cw7,10

图 11



3. 效应器 A18,24/ B7,35/Cw4,7; DR11,15,52 / DQ 6, 7; 刺激物 A1,23/ B44,38/ Cw4,12; DR7, 13, 52, 53/ DQ 2, 6.

图 12

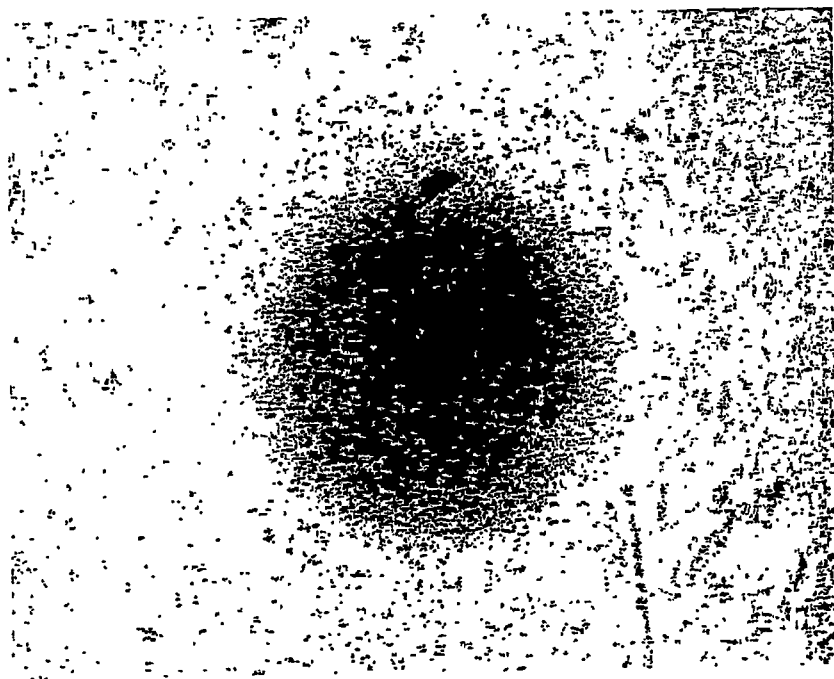


图 13

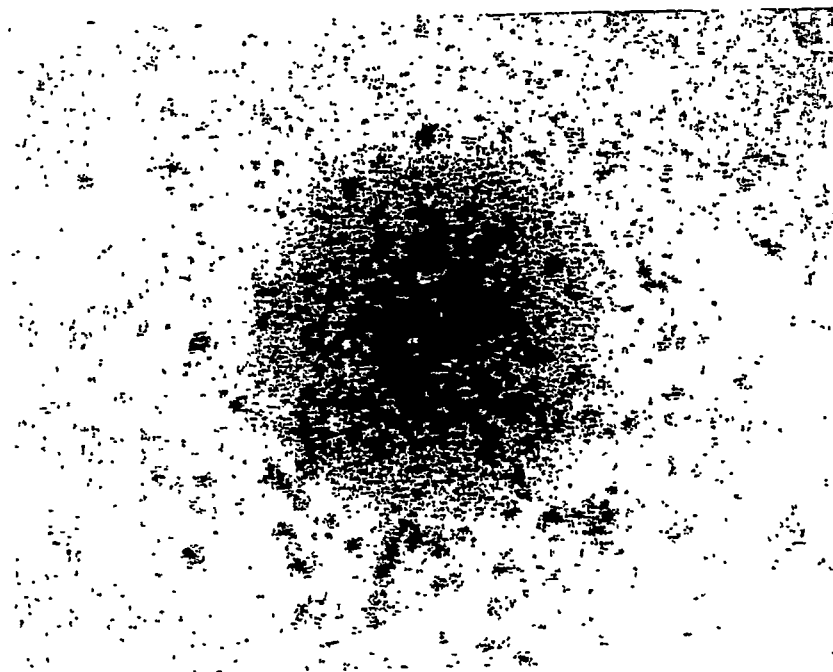


图 14

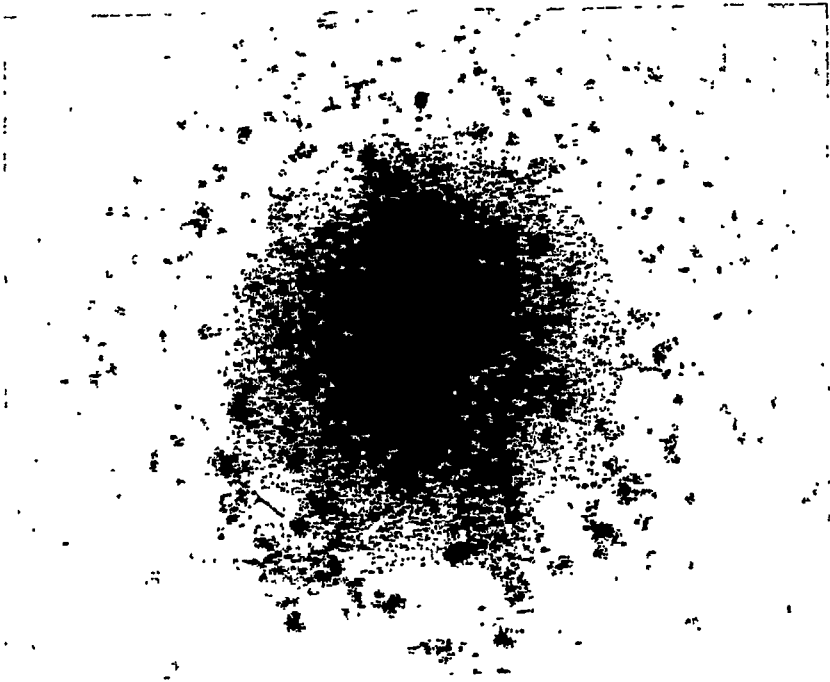


图 15

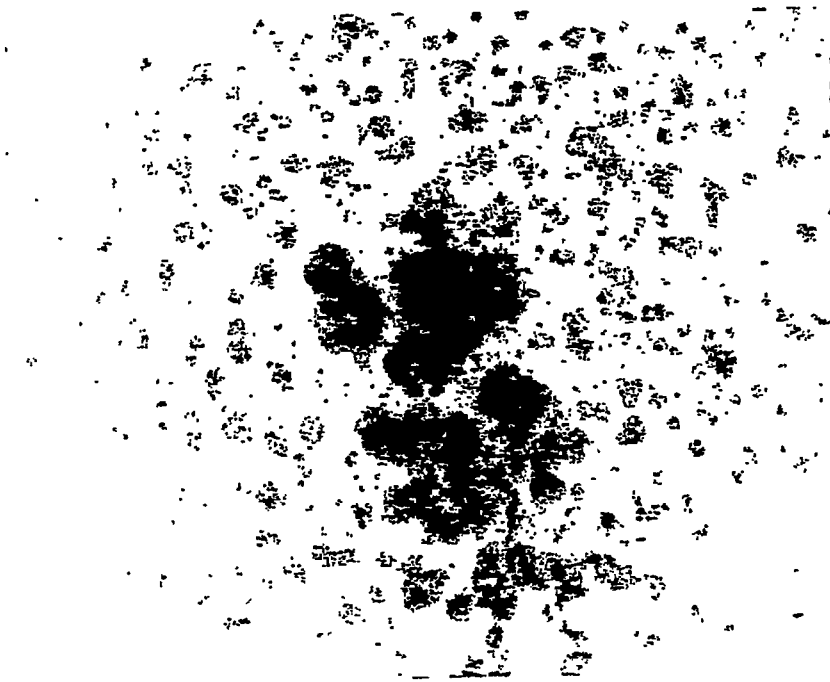


图 16

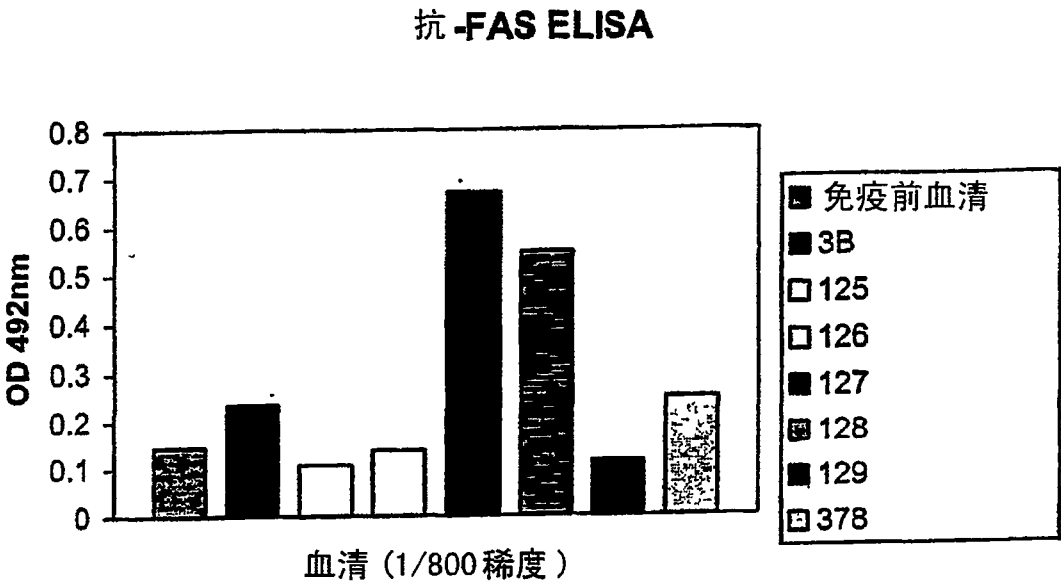


图 17

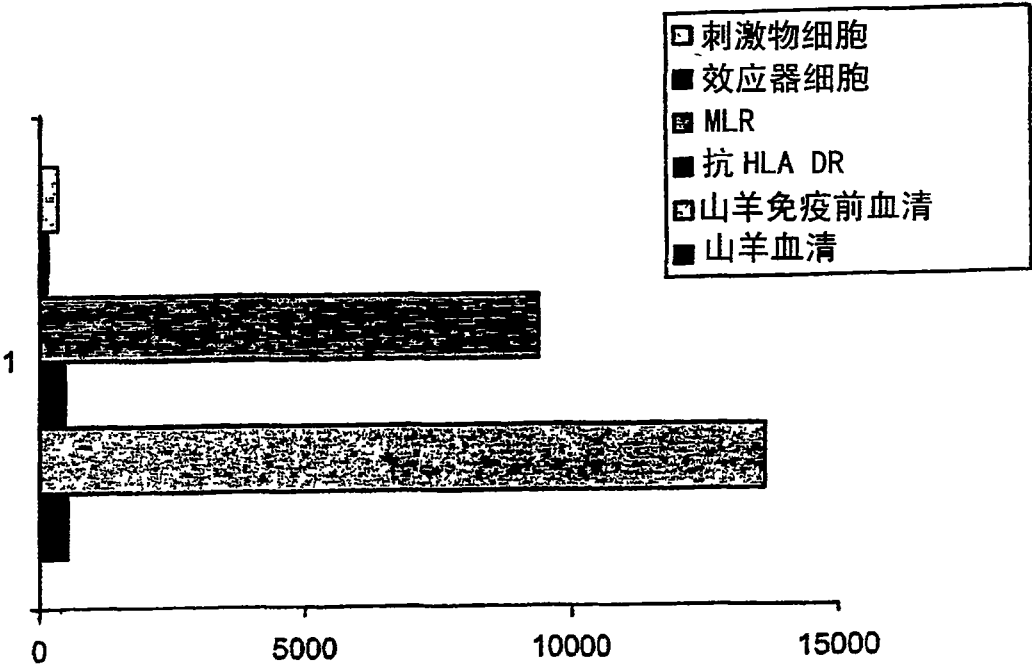


图 18

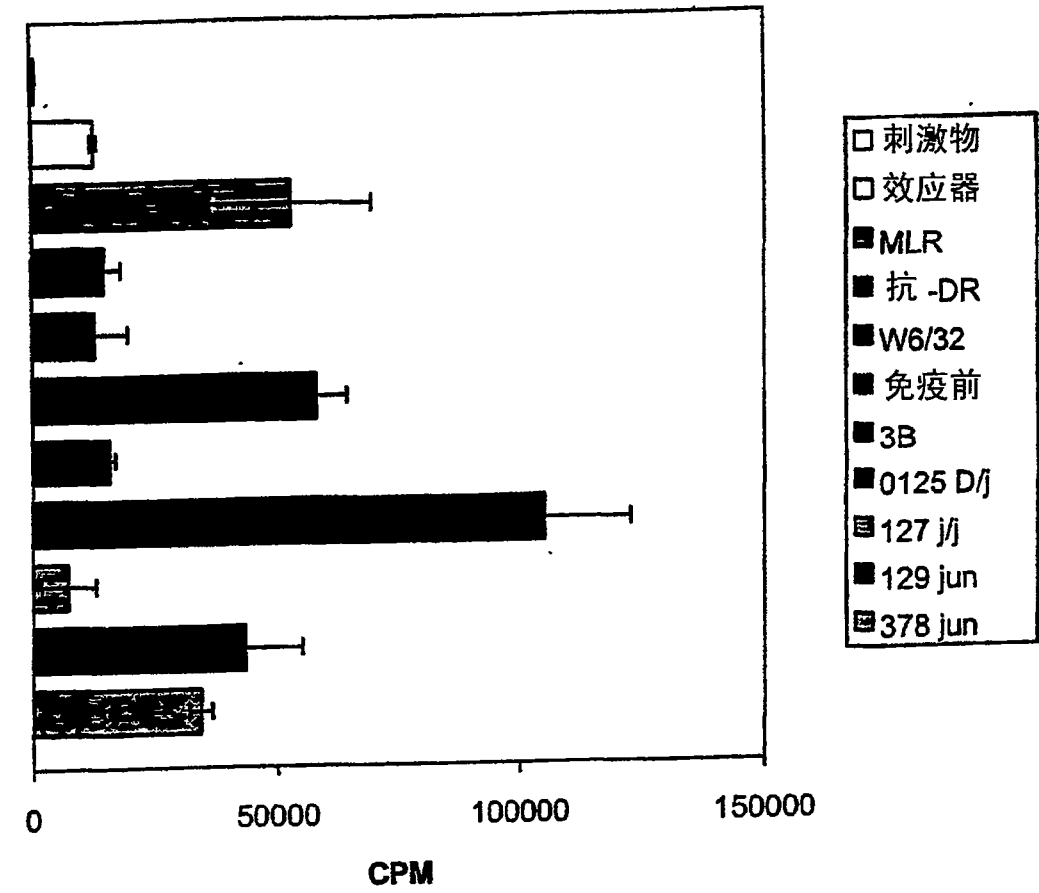


图 19

免疫前 1/1000

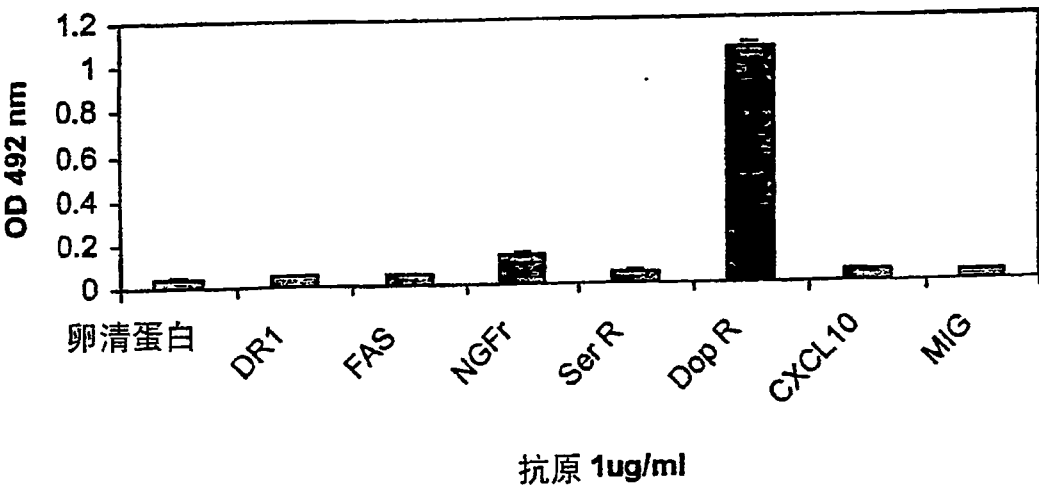


图 20

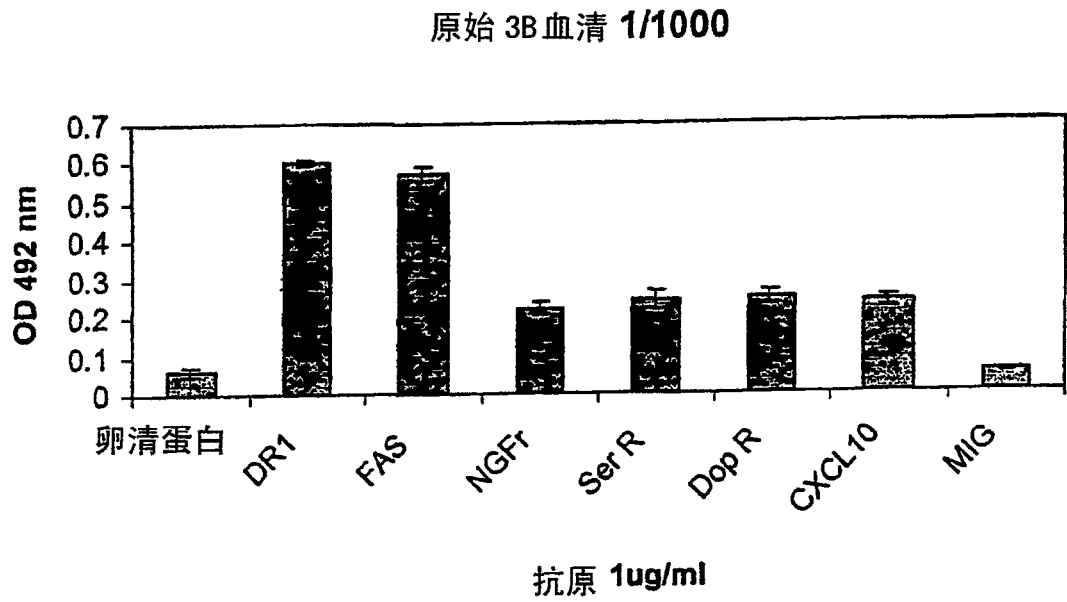


图 21

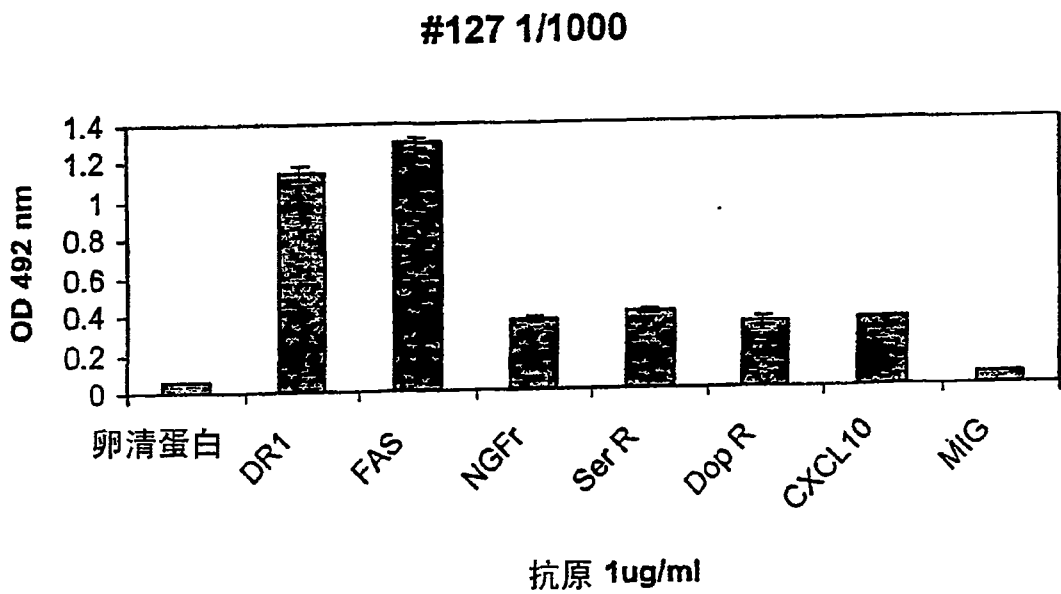


图 22

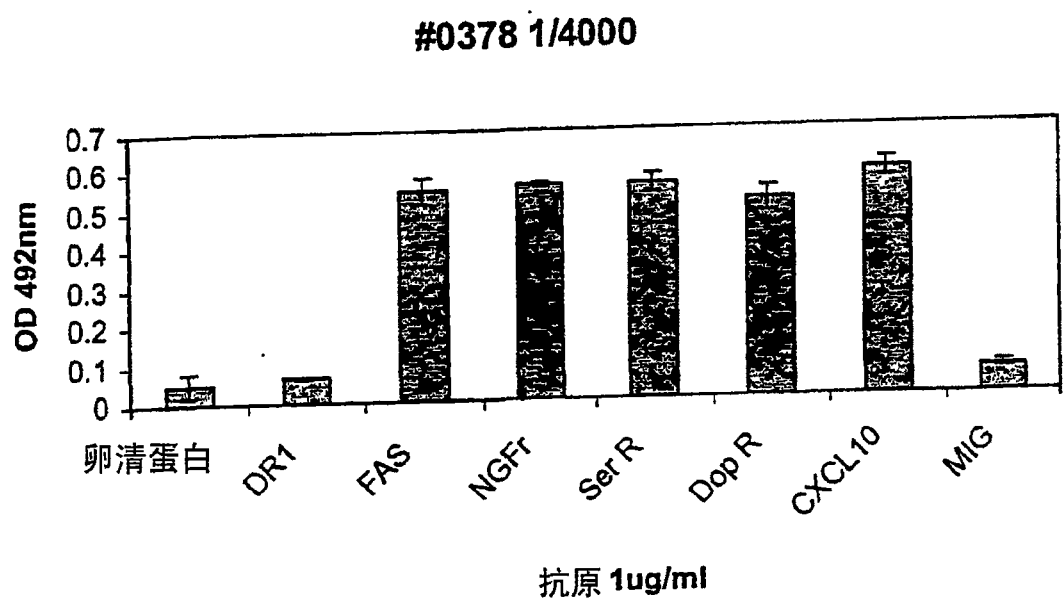


图 23

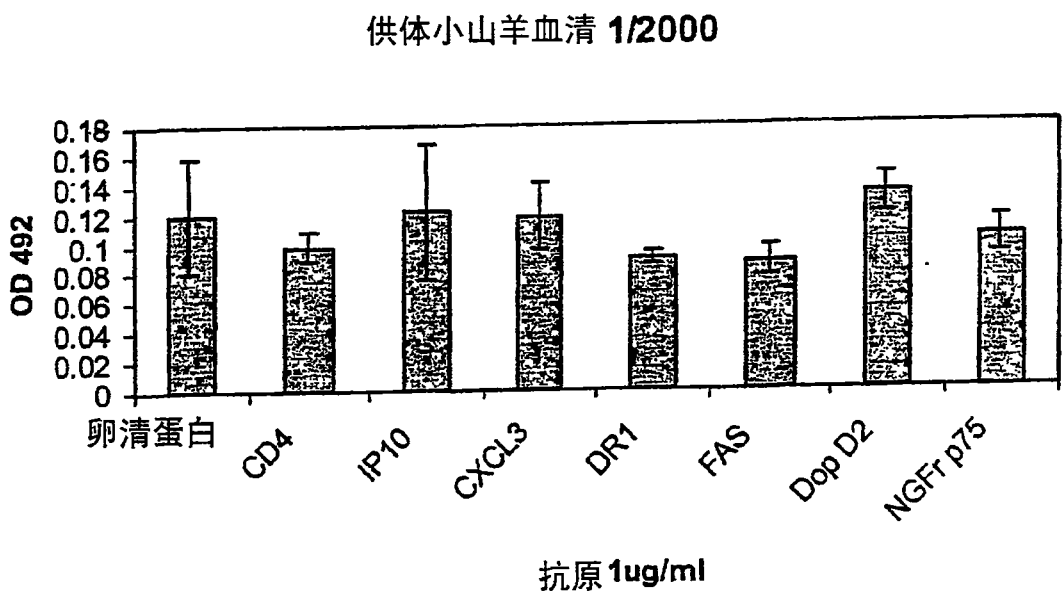


图 24

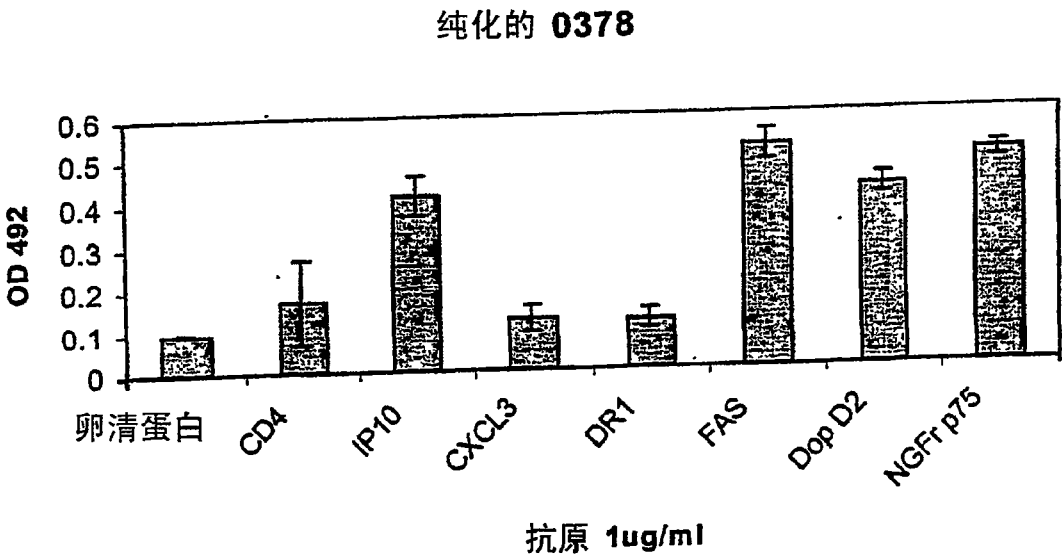


图 25

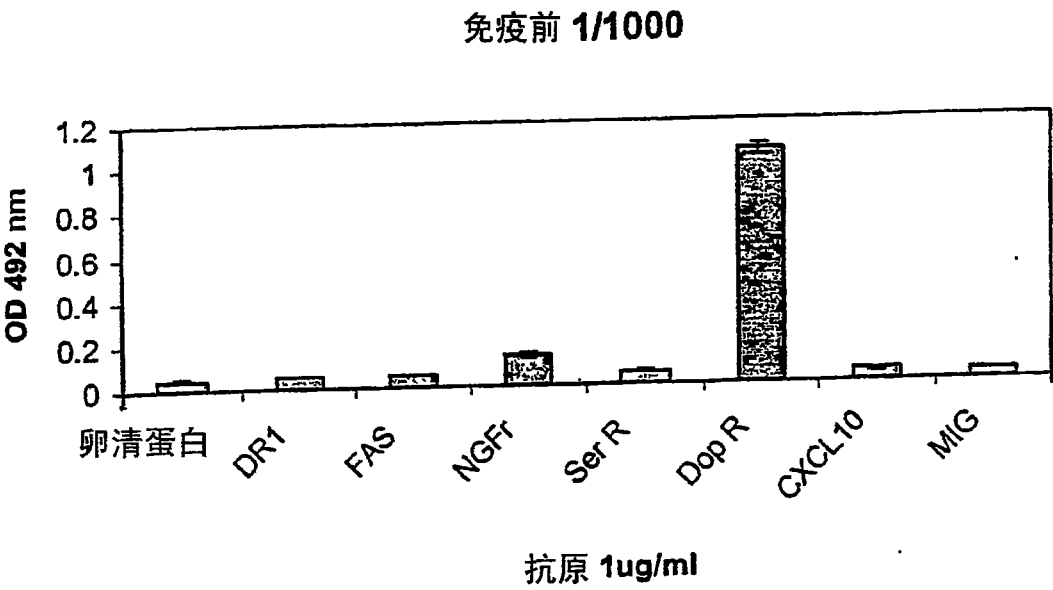


图 26

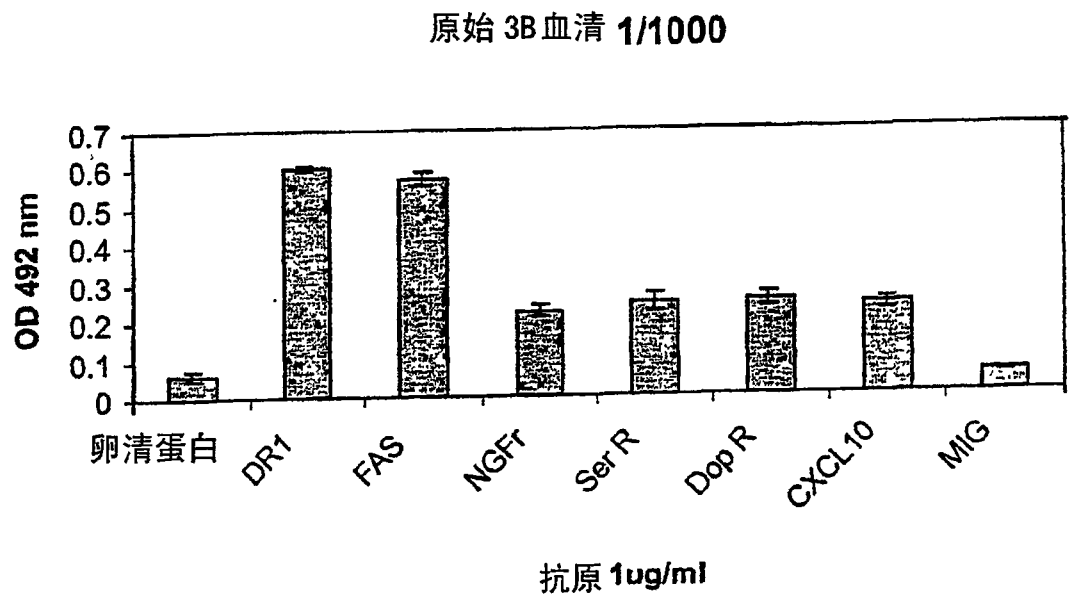


图 27

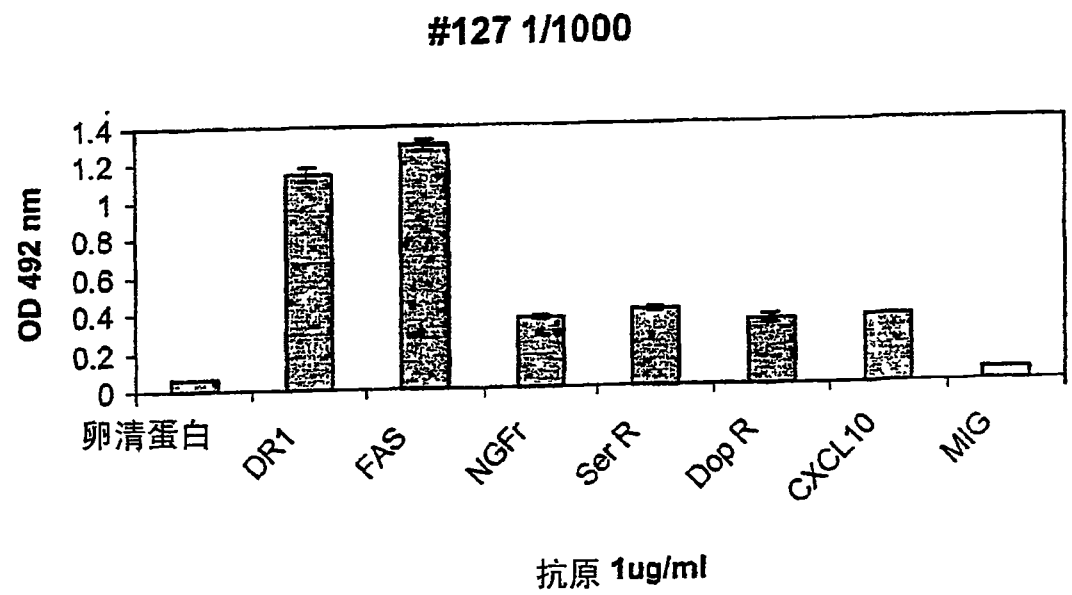


图 28

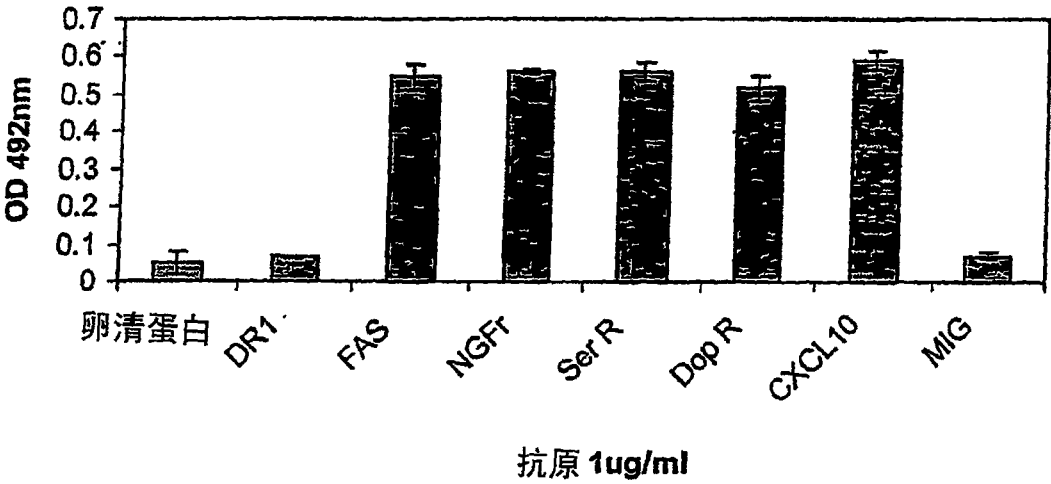


图 29

