



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91101850.6

[51] Int.Cl⁵

A61K 37/02

[43] 公开日 1991年10月9日

[22]申请日 91.3.20

[30]优先权

[32]90.3.21 [33]US [31]496.832

[71]申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

[72]发明人 杰罗姆·施瓦茨
克罗德·H·纳什

[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司
代理人 曹恒兴

C12P 21/02

说明书页数: 9 附图页数: 2

[54]发明名称 含白细胞介素-4 活性组份的药物组合物的制备方法

[57]摘要

本文介绍了 IL-4 在制备诱发接受过地方性慢性传染原的哺乳动物产生有效免疫反应的药物中的应用和含有该活性组份 IL-4, 优选由大肠杆菌产生的重组 IL-4 的药物组合物, 以及通过给哺乳动物施用有效量的 IL-4, 优选施用由大肠杆菌产生的重组人 IL-4, 诱导接受过地方性慢性传染原的哺乳动物产生有效免疫反应的方法。

△
△
△

权 利 要 求 书

1. 制备用于诱导接受过地方性慢性传染原的哺乳动物产生对其有效免疫反应的药物组合物的方法，该方法包括将有效量的活性组份IL-4和药物上可接受的赋形剂相混合。

2. 根据权利要求1的制备药物组合物的方法，其中活性组份是人IL-4，最好是由大肠杆菌产生的重组人IL-4。

3. 根据权利要求1或2的制备药物组合物的方法，其中IL-4的使用量约为每天每千克体重0.25-15mg。

4. 根据权利要求1的制备药物组合物的方法，其中所述诱导包括：(a)诱导第一次或重复接受过地方性慢性传染原的哺乳动物产生有效量的抗体；或(b)增强重复接受过地方性慢性传染原的哺乳动物的免疫反应，其中由于所述哺乳动物缺乏IL-4而产生的免疫反应不能足以充分和迅速地防止疾病复发；或(c)增强初次接受过地方性慢性传染原的哺乳动物的免疫反应的方法，其中由于所述哺乳动物缺乏IL-4而产生的免疫反应不足以充分或迅速地防止发病。

5. 以上任何一项权利要求所述的方法，其中地方性慢性传染原是病毒、细菌、真菌或原生动物传染原。

含白细胞介素-4 活性组份的药物组合物的制备方法

本发明涉及含有活性组份IL-4的药物组合物，该活性组份可诱导接受过地方性慢性传染原的哺乳动物产生对其有效免疫反应。本发明还涉及IL-4在制造诱发对地方性慢性传染原有效免疫反应的药物中的应用，以及涉及通过对哺乳动物施用有效量的白细胞介素-4，诱发哺乳动物受地方性慢性传染原作用后产生对其有效免疫反应的方法。

最初M. Howard等将白细胞介素-4〔下文称为“IL-4，但也称为B细胞刺激因子1(BSF-1)〕描述为T细胞产生的生长因子(J. Exp. Med. (1982), Vol. 155, pp. 914-23)，其与IL-2不同，后者系正常的小鼠B淋巴细胞可经长期的组织培养并与活化的B淋巴细胞反应，以保持其长达4个月的繁殖。虽然混合的B淋巴细胞外植体已经用于促进培养，但似乎在组织培养中的IL-4特别能提高具有未成熟表型的B淋巴细胞。例见C. Perchel et al., J. Immunol. (1989), Vol. 142, 1558-1568。此外，G. Trenn等(J. Immunol. (1988), Vol. 140, 1101-1106)揭示了IL-4刺激静止鼠T淋巴细胞Lyt-2+亚群中的细胞毒性T细胞的发育。H. Spits等(J. Immunol. (1987), Vol. 139, 1142-47)揭示了IL-4可以作为T细胞生长因子作用于离体人细胞，因而与IL-2不同。

鼠IL-4基因已经在COS-7细胞中克隆和表达(参阅T. Otsuka et al., Nuc. Acids Res. 1987, Vol. 15, 333-334)。克隆的因子具有在由T细胞培养物上清液经纯化后所得因子的组织培养中的全部活性。关于人IL-4基因的克隆和表达，N. Arai和T. Yokota等介绍了通过组织培养方

法, 在COS-7 细胞中产生的因子具有类似于天然分子的活性(N. Arai et al., J. Immunol. 1989, Vol. 142, 274-282 和T. Yokota et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1986, Vol. 83, 5844-5848)。对人和鼠细胞系统的IL-4的研究, 可以认为, 产生附加的体外的活性是由于分子的原因, 即 i) IL-4在诱导和调节IgE 合成中起着重要的作用, 产生B 淋巴细胞亚群的方法可以诱导繁殖 (参阅S. Romagnani et al., Clin. Immunol, Immunopathol. 1989, Vol. 50, 513-523); ii) 在组织培养中的正常人B 淋巴细胞上, IL-4可以诱导低亲和力的Fc ϵ 受体(CD23) (参阅T. De France et al., J. Exp. Med. 1987, Vol. 165, 1459-1457); iii) 采用非常精确的方法, IL-4可与其他淋巴细胞活素尤其是干扰素- γ 和 T细胞相互作用 (参阅R. L. Coffman et al., Immunol. Res. 1988, Vol. 102, 5-27 和S. Romagnani et al., 引文同上, 以及M. D. Widmer et al., Nature, 1987, Vol. 326, 795-798), 从而使 B细胞繁殖和改变。

但是仍然需要证明的是所报导的人IL-4体外活性能够增加和增强免疫反应, 例如哺乳动物受地方性慢性传染原作用后增加抗体水平。

我们出乎意料地发现, 对接受过地方性慢性传染原的哺乳动物 (例如人) 施用有效量的IL-4, 可以在接受或重复接受这类传染原的哺乳动物体内诱导对这类传染原的有效免疫反应。

因此, 本发明提供了对接受过地方性慢性传染原的哺乳动物诱导对这类传染原的有效免疫反应的药物组合物, 所述组合物含有活性组份IL-4。

本发明还提供IL-4在制造对接受过地方性慢性传染原的哺乳动物诱导对该传染原的有效免疫反应的药物中的应用。

本发明还提供了诱导接受过地方性慢性传染原的哺乳动物对该传染原的有效免疫反应的方法, 该方法包括给所述哺乳动物施用有效诱导量

的IL-4。

本发明还提供了诱导初次或重复接受过地方性慢性传染原的哺乳动物产生有效量的抗体的方法，该方法包括施用有效诱导量的IL-4。

本发明还提供了对重复接受过地方性慢性传染原由于没有IL-4免疫反应还不能足以充分或迅速地防止疾病复发的哺乳动物，增强其免疫反应的方法，该方法包括给所述哺乳动物施用有效量的IL-4。

本发明还提供了对初次接受过地方性慢性传染原由于没有IL-4，其免疫反应还不能足以充分或迅速地防止发病的哺乳动物，增强其免疫反应的方法，该方法包括给所述哺乳动物施用有效量的IL-4。

附图1 说明根据本发明给人病毒病（猿猴水痘病毒）的猿猴模拟（非洲绿猴）施用人IL-4获得的免疫反应。

附图2 说明根据本发明施用重组人IL-4产生对人病毒病的抗体。

本发明的任务在于将已经报导的组织培养中的许多人IL-4活性转变为对哺乳动物即猿猴模拟的体内活性。为了确定IL-4的体内活性，选择了人水痘疱疹病毒传染的猿猴模拟。在该模拟中，用猿猴水痘病毒(SVV) 对非洲绿猴(*Cercopithecus aethiops*)。进行几乎致命的攻击。通过用SVV 再感染，残存者提高了对疾病的稳定的免疫性，而这种免疫性根据E. D. Roberts 等介绍，分别是由固定的和/ 或循环的 B淋巴细胞产生的循环抗SVV 抗体得到的（参阅E. D. Roberts et al., Am. J. Vet. Res. 1984, 45, 523-530）。本领域专业人员采用这种传统的体内哺乳动物模拟方法来确定可能的人抗水痘疱疹抗病毒性和该哺乳动物模式的具体细节及其使用的实例已由K. F. Soike 等(Antimicrob. Ag. Chemother., 1986, Vol. 29, 20-25和Antiviral Res., 1981, Vol. 1, 325-337) 作了介绍。D. W. Horohov 等也报导了在组织培养中，IL-4诱导的免疫细胞的改变能够影响复制流感病毒。1 型人T 细胞白血病病毒的复制已由S. Miyatake 等作了介绍(Nuc. Acids Res., 1988, Vol. 16,

6541-6566)。因此，确定SVV 猿猴模拟中的IL-4对确定IL-4对抗体产生和免疫细胞繁殖的作用是适宜的。

我们将未得到重组人IL-4的猴子作对比，出乎意料地发现，通过再感染或再接受而得到有效量的重组人IL-4的非洲绿猴对SVV 产生了统计学上较强而快速的免疫反应。

本文所说“对接受过地方性慢性传染原的哺乳动物诱导其对该传染原的有效免疫反应”包括：(1)对初次接受这类地方性慢性传染原的哺乳动物诱导有效量的抗体；(2)诱导重复接受过地方性慢性传染原的哺乳动物产生有效量的抗体；(3)对重复接受过地方性慢性传染原但由于没有IL-4而不能产生足够强或足够迅速地防止疾病复发的免疫反应的哺乳动物，增强其免疫反应；(4)对初次接受过地方性慢性传染原但由于没有IL-4而不能产生足够强或足够迅速地防止发病的免疫反应的哺乳动物，增强其免疫反应。尽管所述哺乳动物由于没有IL-4所产生的免疫反应不能足够强或足够迅速地防止该哺乳动物发病，但我们仍然发现了有效的方法，该方法包括给所述哺乳动物施用各种有效量的IL-4，最好施用重组人IL-4。

本文所述“地方性慢性传染原”系指诱导哺乳动物免疫反应的那些传染原，包括病毒传染原，如产生人免疫缺陷病毒(HIV)即爱滋病病毒的病毒传染原；引起细菌传染的细菌传染原，如葡萄球菌属；产生真菌传染的传染原，如假丝酵母菌sp.；以及引起原生动物传染的原生动物传染原，如毛滴虫属sp.。

任何适合的IL-4都可用于本发明。最近许多实验室已经对IL-4的互补DNA(cDNA)进行了克隆或编定顺序，例如Yokota等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, Vol. 83, 5894-5898 (人)；Lee等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, Vol. 83, 2061-2065 (鼠)；Noma等(Nature, 1986, Vol. 319, 640-646 (鼠)，以及麻省波士顿的Genzyme

公司（人和鼠）。此外，由各种培养物上清液纯化得到非重组IL-4，例如Grabstein等(J. Exp. Med., 1985, Vol. 163, 1405-1413 (鼠); Ohara等(J. Immunol., 1985, Vol. 135, 2518-2523 (鼠BSF-1)。所有上述论文涉及用于本发明的DNA、氨基酸顺序和获得适宜的IL-4材料的方法，都结合在本文内容中。

用于本发明的IL-4优选用人IL-4，特别优选的是具有下列文献所述顺序的人IL-4：Yokota et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1986), Vol. 83, 5894-5898和1987年5月21日公开的PCT专利申请No87/02990，该文介绍了在大肠杆菌中表达并由大肠杆菌中分离得到的人IL-4（1987年7月29日申请的美国专利No079666和1988年7月12日申请的美国专利No194799）。由CHO细胞生产IL-4已由1989年7月28日申请的美国专利SN386937作了介绍。由大肠杆菌生产IL-4已由1989年10月31日申请的美国专利SN429588作了介绍。上述论文、PCT申请和美国专利申请的内容都作为参考文献结合在本文中。

根据本发明，哺乳动物施用有效量的IL-4，可防止由接受地方性慢性传染原而引起的发病或疾病复发，增加抗体水平和/或对初次接受和/或重复接受地方性慢性传染原的有效免疫反应。这样的有效量被限定为能显著增加抗体水平的任何量的IL-4，但至少增加25%，优选增加50%则被认为是有意义的。优选的施用量为每天每千克体重约0.25-15mg的IL-4，最好由大肠杆菌或CHO细胞经重组方法产生的人IL-4。对哺乳动物更优选的施用量为每天每千克体重约5-15.0mg的hIL-4，哺乳动物最优选的施用量为每天每千克体重约5-10.0mg的hIL-4。

常用或定期使用的量视诸因素可以改变，例如嗜中性白细胞和单核细胞数（如单核细胞减少或粒细胞减少的严重程度）、患者的年龄和营养水平等。通常开始时IL-4每天施用，然后在患者活着期间可以定期继续施用。在开始检查中性白细胞数和IL-4对提高抗体水平的作用程度，

可以确定剂量和施药次数。

药物可以通过静脉、鼻腔、非肠胃道、口服、皮下、肌肉、局部、皮肤或任何其他可接受的方法施用。IL-4 可以任何数量的常规剂量形式施用。非经肠胃道的制剂包括无菌溶液或混悬液。吸入用药可以采用鼻腔或口腔喷雾或吹入方法。局部剂量形式包括冷霜，软膏，洗剂，皮肤装置（例如常规的储器或基质贴片）等。

由上述剂量形式组成的药物组合物可采用常规技术和药物上可接受的常规赋形剂和添加剂进行制备。

IL-4 最好采用静脉注射方式施用。施用溶液以采用冻干粉末进行配制，还可含有防腐剂、缓冲液和分散剂等。

IL-4 优先采用10毫摩尔柠檬酸缓冲液和不含防腐剂的无菌水配制成最高浓度不超过100 mg/ml，通过连续静脉滴注或静脉注射施用。连续滴注可将日剂量药物加到5ml 标准盐水中，采用机械泵或重力方法进行溶液滴注。

通过提高哺乳动物抗体水平，IL-4 在增强对病毒传染原的免疫反应上的作用，可以采用下述测定方法测定。

用于下述两个试验的人重组IL-4是由CHO 细胞产生的，其制备方法在1989年7月29日申请的美国专利SN386937中已经作了介绍。

所做的两个试验可鉴定由CHO 细胞产生的人重组IL-4（“rHuIL-4”）对于人抗体SVV 再攻击的反应的作用和对血细胞参数的作用。

将开始就经受由SVV 试验性感染引起的严重疾病的非洲绿猴用于再攻击试验，以便确定IL-4的作用。动物获得IL-4为15天，在0天、给药期和给药后测定血清SVV 中和抗体和血细胞量。在下述试验1中，静脉注射30和5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的由CHO 细胞产生的IL-4，每天注射2次；在下述试验2中，以与试验1同样方式给药，用药量为5.0，1.0 和0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的由CHO 细胞产生的IL-4。以4头动物为一组，分配在各试

验中, 各组在 0 天时, 中和SVV 抗体水平的分布相同。

由索马里得到的非洲绿猴(*Arcopithecus aethiops*) 是通过商业途径买到的野生动物。全部猴子至少在使用前90天进行检疫, 它们都是捕获的野生动物, 不同性别和年龄混合在一起, 体重为 2 至 6kg。选择处理组的猴子应该每组的性别比率和平均体重相似。

用于这些研究的猿猴水痘病毒 (“SVV”) 都是由受天然传染的 patas 猴(*Erythrocebus patas*) 中分离得到的。将该分离物在非洲绿猴中传代, 制造病毒原种。在受传染猴的周围血淋巴细胞的Vero细胞培养物中分离出SVV。刮下受感染的细胞与新鲜接种的Vero培养物以1:3 的比例, 通过传代增加受感染的培养物。在传代到第 5 代时, 将从表面上刮下受感染的Vero细胞接种到培养瓶中, 悬浮在含5% (重量) 的胎牛血清和35% (重量) 山梨醇的Eagle 基本培养基中。将SVV 原种分散在安瓿瓶中, 在 -70℃下贮藏。

用原种SVV 的预定稀释液感染猴子, 即将 1.5ml 稀释液经气管进入环状软骨组织, 并将 1.5ml 稀释液经皮下进入腹部区。在进行各试验时, 滴定接种物在Vero细胞中形成噬菌斑的单位。

在每个试验的 0天和规定的时间测定SVV 中和抗体的量。滴定度用中和80% 病毒所需要的最大稀释度的倒数表示, 以测定在Vero细胞上SVV 噬菌斑的形成。扼要地说, 将猴血清样品与SVV 的 100-200个噬菌斑形成单位一起在37℃温育60分钟。温育后, 将混合物置于已在37℃下温育60分钟的细胞上, 用琼脂层复盖。在37℃下温育 7天后, 细胞被染色, 测定留存SVV 噬菌斑数。

采用以前已由E. D. Roberts (E. D. Roberts et al., Am. J. Vet. Res., 1984, Vol. 45, 523-530) 和K. F. Soivic (K. F. Soivic et al., Antimicro. Ag. Chemother, 1986, Vol. 29, 20-25和Antiviral Res., 1981, Vol. 1, 325-337) 所述方法, 测定每个血清样品中的红血细胞、

白血细胞和亚类的总数、以及每毫升血小斑数。此外，采用本领域专业人员已知的方法，测定血红蛋白和血细胞容量。

下述两个试验是测定由CHO 细胞产生的IL-4 对用SVV 在非洲绿猴再感染的免疫反应的作用。

试验1

使用开始由SVV 进行严重感染而仍存活的非洲绿猴。用SVV 再攻击，可以看到抗体迅速增加。在每天不注射或静脉注射两种剂量(5.0 和 30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ ，每天 2 次) 的rHuIL-4 和安慰剂的条件研究再攻击的反应。每组有 4 只动物，在 0 天开始给药，连续15 天。在给rHuIL-4 或安慰剂的第 8 天，用SVV 再次攻击动物。在不同的时间采取血样，以检测SVV 中和抗体、白血细胞量和其他血液参数。SVV 中和抗体的测定结果示于图1 。

5.0 和30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的rHuIL-4 对SVV 再攻击产生了具有统计学上意义的高水平的抗体反应。 5.0 的反应显著高于30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 。没有剂量反应可能是由于对组织培养中的IL-4 的最佳剂量。

此外，获得rHuIL-4 的动物，其抗体水平的计算斜度也不同，说明在这些动物组中的抗体出现比安慰剂组迅速。

试验2

试验方法与试验1 相似，但使用 3 个剂量水平的由CHO 产生的 rHuIL-4 。采用与试验1 相似方法，在15 天内静脉注射 5.0、 1.0 和 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ ，每天 2 次。每组有 4 只动物。

SVV 抗体产生的结果示于图2 。虽然在低剂量时不存在有统计学意义的显著差异，但是 5.0 μg 的剂量，在第22 天出现趋向于抗体量增高。低剂量(1.0 和0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$) 对增强抗体反应无效。试验1 和2 都证明，增加抗体发生在 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 和接受过SVV 地方性慢性传染的猴中。

基于上述试验的结果, 可以期望哺乳动物在最初或第一次接受过地方性慢性传染后产生的免疫反应还不能充分或迅速地足以防止发病时, IL-4 优选rHuIL-4 能够增强哺乳动物的免疫反应。

图 1

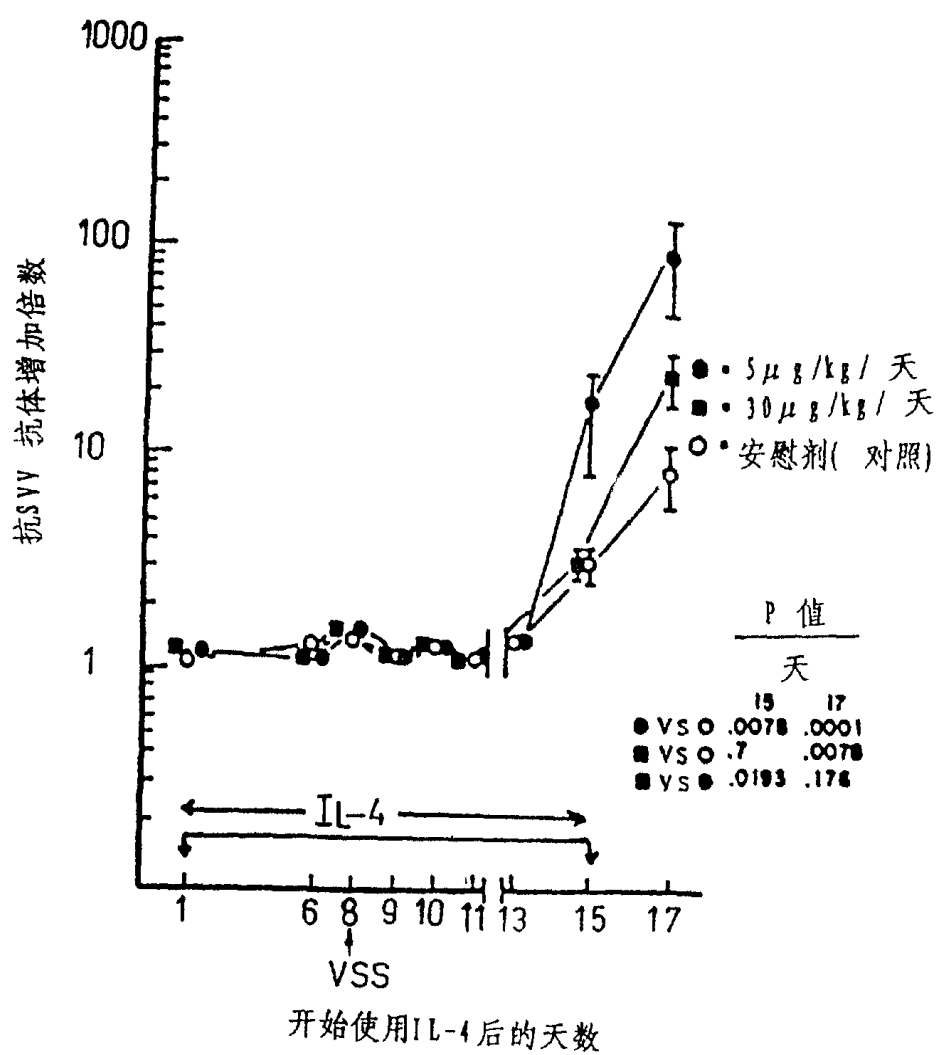


图 2

