



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112423784 B

(45) 授权公告日 2024.09.20

(21) 申请号 201980043613.4

(22) 申请日 2019.05.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112423784 A

(43) 申请公布日 2021.02.26

(30) 优先权数据
18305651.4 2018.05.29 EP
PCT/EP2019/050154 2019.01.04 EP
62/677,290 2018.05.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/064025 2019.05.29

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/229153 EN 2019.12.05

(73) 专利权人 尼奥瓦克斯公司
地址 法国巴黎
专利权人 法国国家健康和医学研究院
巴斯德研究院

(72) 发明人 G·格鲁阿德-沃格尔
E·康德加西亚 R·伯特兰
N·凯洛特 L·勒贝
P·布鲁恩斯 V·塞拉

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003
专利代理师 付文川 吴小瑛

(51) Int. Cl.
A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(56) 对比文件

Eva Conde等.Dual vaccination against IL-4 and IL-13 protects against chronic allergic asthma in mice..《NATURE COMMUNICATIONS》.2021,第12卷Article Number 2574.

Puthupparampil V.Scaria等.Protein-protein conjugate nanoparticles for malaria antigen delivery and enhanced immunogenicity.《PLOS ONE》.2017,第12卷(第12期),e0190312第1-19页.

H`el`ene Le Buanec等.Control of allergic reactions in mice by an active anti-murine IL-4 immunization.《VACCINE》.2007,第25卷第7206-7216页.

D. Zagury等.Active versus passive anti-cytokine antibody therapy against cytokine-associated chronic diseases.《Cytokine & Growth Factor Reviews》.2003,第14卷第123-137页. (续)

审查员 黎舒婷

权利要求书2页 说明书45页
序列表7页 附图10页

(54) 发明名称
用于治疗与异常的IL-4和/或IL-13表达或活性相关的病症的包含IL-4和/或IL-13的免疫原性产品

(57) 摘要
本发明涉及包含与载体蛋白偶联的细胞因子的免疫原性产品,其中细胞因子选自包含IL-

4、IL-13及其混合物的组,并且其中载体蛋白是CRM197。本发明进一步涉及一种制备本发明的免疫原性产品的方法。本发明还涉及本发明的免疫原性产品在治疗与异常的IL-4和/或IL-13表达或活性相关的炎性病症中的治疗用途。

CN 112423784 B

[接上页]

(56) 对比文件

HAI-LONG ZHANG等.A novel combined conjugate vaccine: Enhanced immunogenicity of bFGF with CRM197 as a carrier protein.《MOLECULAR MEDICINE REPORTS》.2011,第4卷第857-863页.

Yanbing Ma等.A potential immunotherapy approach: Mucosal immunization with an IL-13 peptide-based virus-like particle vaccine in a mouse asthma model.《VACCINE》.2007,第25卷第8091-

8099页.

YANBING MA等.Sustained Suppression of IL-13 by a Vaccine Attenuates Airway Inflammation and Remodeling in Mice.《AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY》.2013,第48卷(第5期),第540-549页.

Diego Bagnasco等.A Critical Evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 Strategies in Severe Asthma.《Allergy and Immunology》.2016,第170卷第1220131页.

1. 一种包含与载体蛋白偶联的至少一种细胞因子的免疫原性产品,其中该至少一种细胞因子选自由IL-4、IL-13及其混合物组成的组,其中载体蛋白是CRM₁₉₇,其中IL-4源自哺乳动物,其中IL-13源自哺乳动物,其中IL-4和IL-13均源自同一哺乳动物,并且其中该免疫原性产品通过包括下述步骤的方法获得:

a) 使所述至少一种细胞因子与N-[γ -马来酰亚胺丁酸]-琥珀酰亚胺酯接触;

b) 使所述载体蛋白与N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯接触,以产生载体-异双功能交联剂复合物;

c) 使在步骤a)获得的N-[γ -马来酰亚胺丁酸]-琥珀酰亚胺酯-细胞因子复合物与在步骤b)获得的载体-N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯复合物接触。

2. 如权利要求1所述的免疫原性产品,其中CRM₁₉₇是全长CRM₁₉₇,其中IL-4是全长IL-4,和/或其中IL-13是全长IL-13。

3. 如权利要求2所述的免疫原性产品,其中IL-4是全长人IL-4、全长鼠IL-4或全长犬IL-4,和/或其中IL-13是全长人IL-13、全长鼠IL-13或全长犬IL-13。

4. 如权利要求1所述的免疫原性产品,其中所述至少一种细胞因子是IL-4。

5. 如权利要求1所述的免疫原性产品,其中所述至少一种细胞因子是IL-13。

6. 如权利要求1至5任一项所述的免疫原性产品,其包含与IL-4和IL-13均偶联的CRM₁₉₇。

7. 一种包含至少一种如权利要求1至6任一项所述的免疫原性产品的组合物。

8. 如权利要求7所述的组合物,其包含至少两种如权利要求1至6任一项所述的免疫原性产品的混合物。

9. 如权利要求7所述的组合物,其含有包含IL-4和CRM₁₉₇的免疫原性产品与包含IL-13和CRM₁₉₇的免疫原性产品的混合物。

10. 如权利要求7所述的组合物,其包含重量比范围为10:1至1:10的包含IL-4和CRM₁₉₇的免疫原性产品与包含IL-13和CRM₁₉₇的免疫原性产品的混合物。

11. 如权利要求7所述的组合物,其进一步包含至少一种药学上可接受的赋形剂和/或至少一种佐剂。

12. 如权利要求7至11任一项所述的组合物,其是乳剂。

13. 一种生产如权利要求1至6任一项所述的免疫原性产品的方法,该方法包括以下步骤:

a) 使所述至少一种细胞因子与N-[γ -马来酰亚胺丁酸]-琥珀酰亚胺酯接触;

b) 使所述载体蛋白与N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯接触,以产生载体-异双功能交联剂复合物;

c) 使在步骤a)获得的N-[γ -马来酰亚胺丁酸]-琥珀酰亚胺酯-细胞因子复合物与在步骤b)获得的载体-N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯复合物接触。

14. 如权利要求1至6任一项所述的免疫原性产品或如权利要求7至12任一项所述的组合物在制备用于治疗炎性病症的药物中的用途,其中所述炎性病症是过敏反应、哮喘或特应性皮炎。

15. 如权利要求14所述的用途,其中所述炎性病症是食物过敏反应。

16. 如权利要求1至6任一项所述的免疫原性产品或如权利要求7至12任一项所述的组

合物在制备用于治疗炎性病症的药物中的用途,其中所述炎性病症选自慢性阻塞性肺疾病和肺纤维化。

用于治疗与异常的IL-4和/或IL-13表达或活性相关的病症的 包含IL-4和/或IL-13的免疫原性产品

发明领域

[0001] 本发明涉及免疫原性产品及其在治疗与异常的IL-4和/或IL-13表达或活性相关的病症,尤其是哮喘、特应性皮炎和变应性病症中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 变应性病症是由多种遗传和环境因素之间的相互作用导致的复杂疾病。在过去几十年中观察到的过敏反应增长主要是由同期发生的环境变化予以解释。在所有过敏反应中,过敏性哮喘、变应性鼻炎和食物过敏反应是主要的公共卫生问题,目前各影响全世界至少3亿人。此外,据估计,截止到2050年,全球一半的人口将受到变应性疾病的影响。就年死亡率而言,在全球范围内几乎有300000例由哮喘、食物过敏反应或过敏反应(anaphylaxis)导致的可避免的与过敏反应相关的死亡。因此,变应性疾病的增长已成为导致巨大社会经济负担的全球范围内的重要健康问题,并且对其仍然没有有效的长期疗法。

[0004] 变应性病症的发病机理是由于免疫系统暴露于变应原。这种暴露被认为是造成耐受性破坏的原因,导致2型免疫应答,其特征为T辅助细胞2型(Th2)细胞因子如白介素4(IL-4)和白介素13(IL-13)的产生、高水平的免疫球蛋白E(IgE)抗体以及发炎的组织内免疫细胞的浸润(infiltration)和扩张。肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞尤其参与含有预先形成的炎性介质如组胺的细胞质颗粒的释放。暴露于变应原后,此变应原被IgE识别并与肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞表面上的受体结合,其促进这些细胞的脱粒,并因此出现临床症状。值得注意的是,由于这些原因,对过敏反应的临床诊断很大程度上基于对变应原特异的IgE的测量。

[0005] 有趣的是,IL-4和IL-13细胞因子在变应性病症的发病机理中起关键作用。两种细胞因子长期以来都与变应性病症的发病机理相关,并且基于它们的生物学功能,它们是治疗上重要的细胞因子。这两种细胞因子表现相似的结构,并共有一个受体亚基(IL-4R α)。然而,尽管IL-4和IL-13有很多相似之处,它们也被认为在过敏反应中起着一些不重复的作用。

[0006] IL-4是参与过敏反应发展的多效性细胞因子(Gour N.&Wills-Karp M.,2015),因为在哮喘患者的血清和支气管肺泡灌洗液中观察到IL-4水平的升高。IL-4被认为尤其在过敏反应发展的早期阶段起作用。IL-4的关键作用在于它的多重效应,其驱动过敏反应,如诱导IgE产生、IgE受体表达上调以及0型幼稚T辅助细胞(Th0)分化成Th2淋巴细胞。

[0007] 2型免疫细胞通过控制体液免疫和B细胞在抗体应答中转换为IgE类,在过敏反应过程中发挥关键作用。因此,Th2细胞是产生Ig(例如IgE、IgG)的介体(mediator),并产生多种细胞因子以及IL-4和IL-13。

[0008] 相比之下,IL-13更多地参与变应性反应的效应物和晚期(Gour N.&Wills-Karp M.,2015)。已经显示IL-13足以诱导变应性疾病的主要表现,包括但不限于气道高反应性、粘液产生、气道平滑肌改变和表皮下纤维化。

[0009] 考虑到参与哮喘的其上已知有IL-4和IL-13起作用的细胞范围,以及与这些白介

素相关的致病功能,一种或全部两种细胞因子的中和是治疗变应性炎性病症的可靠方法。因此,由于IL-4和IL-13是治疗过敏反应的有前景的治疗靶标,显然需要改善当前策略以阻断这些分子,以便达到长期的治疗效果。

[0010] 最近,已开发出新颖疗法来治疗过敏反应。这些基于被动免疫的治疗特别靶向参与过敏反应的致病因子。例如,本领域描述了针对IL-4和IL-13或其受体的重组抗体的使用。然而,重组抗体的使用受到高成本、需要进行重复注射以及出现抗药物抗体(ADA)或其他不良反应的潜在风险的限制。

[0011] 申请人在本文提供了基于选自IL-4和IL-13的细胞因子与CRM₁₉₇的组合的新颖的免疫原性产品。这种新颖的免疫原性产品尤其可用于治疗炎性疾病,尤其是例如哮喘、特应性皮炎和变应性病症。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及包含与载体蛋白偶联的至少一种细胞因子的免疫原性产品,其中该至少一种细胞因子选自包含IL-4、IL-3及其混合物的组,并且其中该载体蛋白是CRM₁₉₇。

[0014] 在一个实施方案中,该至少一种细胞因子是IL-4。

[0015] 在一个实施方案中,其中该至少一种细胞因子是IL-13。

[0016] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与IL-4和IL-13均偶联的CRM₁₉₇。

[0017] 本发明进一步涉及一种包含至少一种如上文所述的免疫原性产品的组合物。

[0018] 在一个实施方案中,该组合物包含至少两种如上文所述的免疫原性产品的混合物。

[0019] 在一个实施方案中,该组合物包含含有IL-4和CRM₁₉₇的免疫原性产品与含有IL-13和CRM₁₉₇的免疫原性产品的混合物。

[0020] 在一个实施方案中,该组合物包含重量比范围为约10:1至约1:10的含有IL-4和CRM₁₉₇的免疫原性产品与含有IL-13和CRM₁₉₇的免疫原性产品的混合物。

[0021] 在一个实施方案中,该组合物进一步包含至少一种药学上可接受的赋形剂和/或至少一种佐剂。

[0022] 在一个实施方案中,该组合物是乳剂。

[0023] 本发明进一步涉及一种生产如本文所述的免疫原性产品的方法,该方法包括以下步骤:

[0024] a) 使该至少一种细胞因子与含有NHS-酯,优选N-[γ -马来酰亚胺丁酸琥珀酰亚胺酯(N-[γ -maleimidobutyryloxy]-succinimide ester, sGMBS)的异双功能交联剂接触;

[0025] b) 使该载体蛋白与含有NHS-酯,优选N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯(N-succinimidyl-S-acetylthioacetate, SATA)的异双功能交联剂接触,以产生载体-SATA复合物;

[0026] c) 使在步骤(a)获得的sGMBS-细胞因子复合物与在步骤(b)获得的载体SATA复合物接触。

[0027] 本发明进一步涉及如本文所述的免疫原性产品或如本文所述的组合物,其用于治疗炎性病症。

[0028] 在一个实施方案中,该炎性病症是与异常的IL-4和/或IL-13表达或活性相关的病症。

[0029] 在一个实施方案中,该炎性病症选自包含以下的组:哮喘(变应性或非变应性的)、变应性病况(例如食物过敏反应、毒液过敏反应、对动物的过敏反应、药物过敏反应、高IgE综合征、变应性鼻炎、变应性结膜炎和变应性肠胃炎)、特应性病况(如特应性皮炎、荨麻疹(包括慢性特发性荨麻疹和慢性自发性荨麻疹)、湿疹)、大疱性天疱疮(bullous pemphigoid)、呼吸系统病症(例如变应性和非变应性哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD))、鼻息肉病和其他涉及气道炎症的病况(例如嗜酸性粒细胞增多、纤维化和过多的粘液产生,包括囊性纤维化和肺纤维化、系统性硬化病(SSc));炎性和/或自身免疫病症或病况、胃肠道病症或病况(例如炎症性肠疾病(IBD)和嗜酸性食管炎(eosinophilic esophagitis,EE)以及嗜酸性介导的胃肠道疾病(eosinophilic-mediated gastrointestinal disease)、溃疡性结肠炎和克罗恩氏病);系统性红斑狼疮、肝病或病况(例如肝硬化和肝细胞癌)、硬皮病;纤维化疾病或病症(例如肝纤维化(例如由乙型和/或丙型肝炎病毒引起的纤维化))、硬皮病;实体瘤或癌症,例如白血病(例如B细胞慢性淋巴细胞性白血病)、胶质母细胞瘤、淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤)和肥大细胞增多症。

[0030] 在一个实施方案中,该炎性病症选自包含以下的组:哮喘(例如变应性哮喘)、特应性皮炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺纤维化、食物过敏反应、鼻息肉病和嗜酸性食管炎。

[0031] 在一个实施方案中,该炎性病症选自包含以下的组:哮喘(例如变应性哮喘)、特应性皮炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺纤维化和食物过敏反应。

[0032] 在一个实施方案中,该炎性病症是过敏反应、哮喘或特应性皮炎。

[0033] 在一个实施方案中,如本文所述的免疫原性产品或组合物诱导变应性受试者对变应原的脱敏。

[0034] 本发明进一步涉及如本文所述的免疫原性产品或组合物,其用于诱导对特定抗原变态反应的受试者脱敏,其中将所述免疫原性产品或组合物和所述特定抗原施用给变应性的受试者。

[0035] 本发明进一步涉及一种诱导对特定抗原变态反应的受试者脱敏的方法,其中所述方法包括将如本文所述的免疫原性产品或组合物和所述特定抗原施用给受试者。

[0036] 本发明还进一步涉及一种增加对特定变应原变态反应的受试者脱敏的效率和/或降低其持续时间的方法,其中将如本文所述的免疫原性产品或组合物施用给所述受试者,并进一步对其进行脱敏处理。

[0037] 定义

[0038] 在本发明中,下列术语具有如下含义:

[0039] -如本文所用,当指例如量、持续时间等的可测量值时,术语“约”意指涵盖偏离指定值的 $\pm 20\%$ 的变化,或在一些情况下 $\pm 10\%$,或在一些情况下 $\pm 5\%$,或在一些情况下 $\pm 1\%$,或在一些情况下 $\pm 0.1\%$,因为这样的变化适合于实施所公开的方法。

[0040] -如本文所用,“佐剂”是增强本发明的免疫原性产品的免疫原性的物质。通常给予佐剂以增强免疫应答,并且其是技术人员公知的。

[0041] -如本文所用,术语“载体蛋白分子”是指长度为至少15、30或50个氨基酸的蛋白或肽,当其为了形成杂合物与至少一种选自IL-4、IL-13及其混合物的细胞因子部分共价结合时,其使所述至少一种细胞因子的大量抗原被呈递给B淋巴细胞。

[0042] -如本文所用,术语“免疫应答”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞和由

上述细胞或肝产生的大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的行为。

[0043] -如本文所用,术语“免疫原性产品”是指与载体蛋白偶联的至少一种细胞因子,其在被施用所述免疫原性产品的受试者(优选哺乳动物)中诱导免疫应答,包括体液免疫应答,即产生中和例如内源性细胞因子的生物学活性的性质的抗体。

[0044] -如本文所用,“抑制或中和”选自IL-4、IL-13或其混合物的至少一种细胞因子的“生物学活性”的抗体旨在指,例如通过使用实施例中描述的那些功能性测定法,相比于不存在抗体时该细胞因子的活性水平,抑制该细胞因子的活性的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%或更多的抗体。

[0045] -如本文所用,术语“药学上可接受的赋形剂”是指当施用给哺乳动物(优选人)时,不产生不利的、变应性的或其他不良反应的赋形剂。它包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。药学上可接受的载体或赋形剂是指任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、封装材料或制剂助剂(formulation auxiliary)。对于人的施用,制剂应符合如FDA或EMA等监管局所要求的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0046] -如本文所用,术语“重组蛋白”是指使用重组DNA技术产生的蛋白(例如,细胞因子或载体蛋白CRM₁₉₇),例如在原核细胞(使用噬菌体或质粒表达系统)或真核细胞(例如酵母、昆虫或哺乳动物表达系统)中表达的蛋白(例如,细胞因子或载体蛋白CRM₁₉₇)。该术语也应解释为意指通过合成编码该蛋白(例如,细胞因子或载体蛋白CRM₁₉₇)的DNA分子而产生的蛋白(例如,细胞因子或载体蛋白CRM₁₉₇),并且该DNA分子表达蛋白(例如,细胞因子或载体蛋白CRM₁₉₇)或指定蛋白(例如,细胞因子或载体蛋白CRM₁₉₇)的氨基酸序列,其中已经使用了可用的且本领域公知的重组DNA或氨基酸序列技术来获得DNA或氨基酸序列。

[0047] -如本文所用,术语“受试者”旨在包括可在其中引起免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物,特别是人、灵长类动物、狗、猫、马、绵羊等)。优选地,受试者是人。在一个实施方案中,受试者可以是“患者”,即温血动物,优选人,其正在等待接受或正在接受医疗护理,或曾经/正在/将要是医疗程序的客体,或在监控其目标疾病或病况例如炎症病症的发展。在一个实施方案中,受试者是成年人(例如18岁以上的受试者)。在另一个实施方案中,受试者是儿童(例如18岁以下的受试者)。在一个实施方案中,受试者是男性。在另一个实施方案中,受试者是女性。在一个实施方案中,受试者患有,优选被诊断有炎症病症。在一个实施方案中,受试者处于发展炎症病症的风险中。风险因素的示例包括但不限于炎症病症的遗传易感性或家族史。

[0048] -如本文所用,术语“治疗有效量”是指有效实现特定生物学结果的如本文所述的免疫原性产品的量。因此,术语“治疗有效量”意指所针对的免疫原性产品的水平或量,其目的在于在不对靶标造成显著的负面或不利的副作用下,(1)延迟或预防目标疾病或病况的发作;(2)减慢或停止目标疾病或病况的一种或多种症状的进展、加重或恶化;(3)引起目标疾病或病况的症状减轻;(4)降低目标疾病或病况的严重性或发生率;或(5)治愈目标疾病或病况。为了预防(prophylactic)或防止(preventive)作用,可以在目标疾病或病况发作之前施用治疗有效量。可选地或另外地,为了治疗作用,可以在目标疾病或病况开始后施用治疗有效量。

[0049] -如本文所用,术语“治疗”是指治疗性治疗和预防性(prophylactic)或防止性

(preventative) 措施二者;其中目的是预防或减慢(减轻)目标疾病或病况。需要治疗的那些包括已经罹患该病况的那些以及易于罹患该病况的那些或想要预防该病况的那些。如果在接受治疗量的如本文所述的免疫原性产品后,受试者表现出以下一种或多种的可观察和/或可测量的改善,则成功“治疗”了受试者的疾病或病况:致病细胞的数量减少;细胞总数中致病细胞的百分比降低;在某种程度上缓解了与特定病况相关的一种或多种症状;发病率和死亡率降低,和/或生活质量问题改善。可以通过医师熟悉的常规程序容易地测量用于评估成功治疗和改善病况的上述参数。

具体实施方式

[0050] 本发明涉及包含与载体蛋白偶联的至少一种细胞因子的免疫原性产品,其中该至少一种细胞因子选自包含IL-4、IL-13及其混合物的组,并且其中该载体蛋白是CRM₁₉₇。

[0051] 发明人在本文证明,本发明的免疫原性产品与包含KLH而不是CRM₁₉₇的相同免疫原性产品相比具有优势,特别是在免疫原性方面。

[0052] CRM₁₉₇是具有序列SEQ ID NO:1的白喉毒素的无毒突变体,其归因于单个碱基取代(在位置52处从甘氨酸到谷氨酸的突变)而没有毒性。

[0053] SEQ ID NO:1

[0054] GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDN
ENPLSGKAGGVVVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSS
VEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQDAMYEMAQACAGNRVRRSVGSSLSCLNLDWDVIRDKTKTKIESLKEH
GPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKT
TAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNR
PAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNSKTHISVNG
RKIRMRCAIDGDVTFRCRKPSPVYVGNVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNKLSLFF
EIKS

[0055] 在一个实施方案中,如Hickey在2018年所述(Hickey等人2018),可以通过本领域已知的常规方法在自体系统(白喉杆菌(*C. diphtheriae*))或异源系统(大肠杆菌(*E. coli*)和荧光假单胞菌(*P. fluorescens*))中获得CRM₁₉₇。例如,可以通过培养含有包含CRM₁₉₇基因的表达载体的细胞、收获包涵体并纯化CRM₁₉₇来获得重组CRM₁₉₇。也可以从购自ATCC的细菌菌株(ATCC39255)的白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)培养物中提取CRM₁₉₇。在一个实施方案中,CRM₁₉₇是可商购的,并且可以购自例如Reagent Proteins(San Diego, CA, US)。

[0056] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含CRM₁₉₇的变体,其中所述变体与SEQ ID NO:1具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。在一个实施方案中,所述CRM₁₉₇的变体在位置52处包含从甘氨酸到谷氨酸的突变,并因此是无毒的。

[0057] 术语“同一性”或“同一的”,当用于两个或更多个核酸序列或两个或更多个多肽的序列之间的关系时,是指核酸序列或多肽之间的序列相关性程度,其分别由两个或更多个核酸或氨基酸残基的串之间的匹配数所确定。“同一性”测量由特定的数学模型或计算机程序(即“算法”)所解决的具有空位比对(如果有的话)的两个或更多个序列中的较小者之间的相同匹配的百分比。通过已知方法可以容易地计算相关核酸序列或多肽的同一性。这些

方法包括但不限于描述于以下的那些:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., 和 Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; 和 Carillo 等人, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)。设计用于确定同一性的优选方法以在所测试的序列之间给出最大的匹配。确定同一性的方法描述在公开可得的计算机程序中。用于确定两个序列之间的同一性的优选计算机程序方法包括 Clustal0 (Sievers F 等人 2011), GCG 程序包, 其包括 GAP (Devereux 等人, Nucl. Acid. Res. \ 2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))。BLASTX 程序可公开获得自国家生物技术信息中心 (NCBI) 和其他来源 (BLAST Manual, Altschul 等人 NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul 等人, 如上所述)。也可以使用公知的史密斯沃特曼算法 (Smith Waterman algorithm) 来确定同一性。

[0058] 在一个实施方案中, CRM₁₉₇ 是全长 CRM₁₉₇。

[0059] 在一个实施方案中, 本发明的免疫原性产品包含 CRM₁₉₇ 的片段, 例如包含来自 SEQ ID NO:1 的至少约 50 个、100 个、150 个、200 个、250 个、300 个、350 个、400 个、450 个或 500 个氨基酸 (优选连续氨基酸) 的片段。

[0060] 在一个实施方案中, 该至少一种细胞因子是 IL-4。

[0061] 在一个实施方案中, IL-4 是重组的。可以通过本领域已知的常规方法使用编码 IL-4 的核酸序列获得重组 IL-4。例如, 可以通过培养含有包含 IL-4 基因的表达载体的细胞、收获包涵体并纯化 IL-4 细胞因子来获得重组 IL-4。重组 IL-4 是可商购的, 并且可以购自例如 PeproTech (Rocky Hill, NJ, US)。

[0062] 在本发明的一个实施方案中, IL-4 源自哺乳动物。

[0063] 在一个实施方案中, IL-4 是哺乳动物 IL-4 的变体, 其中所述变体与其源自的哺乳动物 IL-4 具有至少约 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或更高的同一性。

[0064] 在一个实施方案中, IL-4 是全长 IL-4。

[0065] 在另一个实施方案中, 该至少一种细胞因子是 IL-4 的片段, 例如包含其源自的 IL-4 的至少约 50 个、55 个、60 个、65 个、70 个、75 个、80 个、85 个、90 个、95 个、100 个、105 个、110 个、115 个、120 个或 125 个氨基酸 (优选连续氨基酸) 的 IL-4 的片段。

[0066] 在一个实施方案中, 所述片段包含 IL-4 的至少一个特异性表位。

[0067] 在本发明的一个实施方案中, IL-4 是人 IL-4, 优选重组人 IL-4。人 IL-4 具有序列 SEQ ID NO:2 (UniProt ID: P05112-1)。

[0068] SEQ ID NO:2

[0069] HKCDITLQEI IKTLNSL TEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGAT
AQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS

[0070] 在一个实施方案中, IL-4 是 SEQ ID NO:2 的变体, 其中所述变体与 SEQ ID NO:2 具有至少约 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或更高的同一性。

- [0071] 在一个实施方案中,IL-4是全长人IL-4。
- [0072] 在另一个实施方案中,该至少一种细胞因子是人IL-4的片段,例如包含SEQ ID NO:2的至少约50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个、110个、115个、120个或125个氨基酸(优选连续氨基酸)的人IL-4的片段。
- [0073] 在一个实施方案中,所述片段包含人IL-4的至少一个特异性表位。
- [0074] 在一个实施方案中,所述片段包含以下序列或由以下序列组成: AQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLW(SEQ ID NO:3)。
- [0075] 在本发明的一个实施方案中,IL-4是鼠IL-4,优选重组鼠IL-4。鼠IL-4具有序列SEQ ID NO:4(UniProt ID:P07750-1)。
- [0076] SEQ ID NO:4
- [0077] HIHGCDKNHLREIIGILNEVTGEGTPCTEMDVPNVLTATKNTTESELVCRASKVLRIFYLKHGKTPCLK
KNSSVLMELQRLFRFRCLDSSISCTMNESKSTSLKDFLESLSKIMQMDYS
- [0078] 在一个实施方案中,IL-4是SEQ ID NO:4的变体,其中所述变体与SEQ ID NO:4具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。
- [0079] 在一个实施方案中,IL-4是全长鼠IL-4。
- [0080] 在另一个实施方案中,该至少一种细胞因子是鼠IL-4的片段,例如包含SEQ ID NO:4的至少约50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个、110个或115个氨基酸(优选连续氨基酸)的鼠IL-4的片段。
- [0081] 在一个实施方案中,所述片段包含鼠IL-4的至少一个特异性表位。
- [0082] 在本发明的一个实施方案中,IL-4是犬IL-4,优选重组犬IL-4。犬IL-4具有序列SEQ ID NO:5(UniProt ID:077762-1)。
- [0083] SEQ ID NO:5
- [0084] HNFNITIKIIEIKMLNILTARNDSMELTVKDVFTAPKNTSDKEIFCRAATVLRQIYTHNCSNRYLRGLY
RNLSSMANKTCMNEIKKSTLKDFLERLKVIMQKKYYRH
- [0085] 在一个实施方案中,IL-4是SEQ ID NO:5的变体,其中所述变体与SEQ ID NO:5具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。
- [0086] 在一个实施方案中,IL-4是全长犬IL-4。
- [0087] 在另一个实施方案中,该至少一种细胞因子是犬IL-4的片段,例如包含SEQ ID NO:5的至少约50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个或105个氨基酸(优选连续氨基酸)的犬IL-4的片段。
- [0088] 在一个实施方案中,所述片段包含犬IL-4的至少一个特异性表位。
- [0089] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含以范围为约16:1至约1:2,优选约8:1至约2:1,更优选约4:1的IL-4:CRM₁₉₇摩尔比与CRM₁₉₇偶联的IL-4。
- [0090] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联并被抗IL-4抗体识别的IL-4。
- [0091] 可以通过本领域已知的常规方法来验证免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联并被抗IL-4抗体识别的IL-4的事实。这些方法的一个示例是使用例如用生物素标记的检测抗体、链霉亲和素HRP扩增系统和邻苯二胺二盐酸盐(o-phenylenediamine dihydrochloride, OPD)底物溶液的夹心ELISA抗细胞因子/载体蛋白。

[0092] 在一个实施方案中,本文所述的TEST A^{IL-4}可用于验证本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联并被抗IL-4抗体识别的IL-4。TEST A^{IL-4}是抗IL-4/CRM₁₉₇的ELISA试验。

[0093] 按如下进行TEST A^{IL-4}:

[0094] -用针对CRM₁₉₇的捕获抗体包被平板,例如来自Abcam (AB53828) 或Bio-Rad (3710-0956、3710-0150或3710-0100) 的抗白喉毒素抗体,

[0095] -在约37°C下将平板用封闭缓冲液(例如含2%酪蛋白(w/v)的PBS)封闭约90min,

[0096] -在约37°C下将平板用从250ng/mL开始以两倍连续稀释(two-fold-serial dilution)的免疫原性产品或用阴性对照如IL-4和CRM₁₉₇温育约90min,

[0097] -在约37°C下将平板用针对IL-4的生物素化检测抗体温育约90min,针对IL-4的生物素化检测抗体例如来自Abcam (AB84278)、R&D systems (BAF204) 或PeproTech (500-P24BT) 的抗IL-4生物素化抗体,或来自Southern Biotech (10204-08)、R&D systems (BAF404) 或PeproTech (500-P54BT) 的鼠抗IL-4生物素化抗体,

[0098] -在约37°C下将平板用链霉亲和素-HRP温育约30分钟,并用OPD底物溶液显色复合物约30分钟,

[0099] -在停止酶促反应后,通过分光光度法在490nm处确定所得颜色的强度。

[0100] 在一个实施方案中,当含有每孔约25ng的本发明的免疫原性产品的孔的光密度是含有阴性对照的孔的光密度的至少约3倍,优选至少约5倍,且更优选至少约10倍时,本领域技术人员可以得出结论:本发明的免疫原性产品(i)被抗IL-4抗体识别,并且(ii)包含与CRM₁₉₇偶联的IL-4。

[0101] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联并高度失活的IL-4,这意味着在下述的TEST B^{IL-4}条件下,该免疫原性产品显示出小于约10%的IL-4初始活性,优选小于约5%,且优选小于约1%的IL-4初始活性。TEST B^{IL-4}是比色法T细胞增殖测定法或报告基因生物测定法,其使用表达可由本发明的免疫原性产品中包含的IL-4功能性激活(即,其可以与本发明的免疫原性产品中包含的IL-4结合,并在该结合后被激活)的IL-4R α 的细胞系。

[0102] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含鼠IL-4,并且TEST B^{IL-4}是使用CTLL-2细胞(来自ECACC细胞系,由Sigma-Aldrich提供,参考号93042610-1VL)按照以下方法进行的比色法T细胞增殖测定法:

[0103] -使CTLL-2细胞在补充有2mM谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、1mM HEPES、100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素(完全RPMI或RPMIc)和10%(v/v)FBS的RPMI中的终浓度为10ng/mL的IL-2的存在下生长,

[0104] -在96孔板中将本发明的免疫原性产品(IL-4/CRM₁₉₇)和muIL-4对照两倍连续稀释在RPMIc+10%(v/v)FBS中,免疫原性产品从起始1000ng/mL到最终4ng/mL,且muIL-4从起始10ng/mL到最终0.04ng/mL,

[0105] -作为阳性对照,添加了具有10ng/mL muIL-4的6个孔,并用作最大细胞增殖对照(maximum cell proliferation control),

[0106] -将这些样品添加到每孔的20,000个CTLL-2细胞中,并将平板在约37°C、5%CO₂下在湿润培养箱中温育约48h,

[0107] -在培养结束时,使用本领域公知的方法评估细胞活力。这些方法的一个示例如

下:根据制造商的说明,将MTS/PMS溶液(Promega, Madison, WI, US) (其中MTS代表3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium),内盐;且PMS代表吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulfate))以40 μ L/孔加到孔中,并将平板在37 $^{\circ}$ C 5%CO₂下再温育4h。然后在分光光度计上在490nm处读取平板。

[0108] 在另一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含人IL-4,并且TEST B^{IL-4}是使用购自InvivoGen(San Diego, CA, US)的HEK-BlueTM IL-4/IL-13细胞系进行的报告基因测定法。在这些细胞中,用IL-4或IL-13进行的刺激激活JAK/STAT6通路,并随后产生SEAP。然后通过评估上清液中的SEAP水平来评估本发明的免疫原性产品中包含的IL-4生物学活性。

[0109] 根据该实施方案,TEST B^{IL-4}包括以下步骤:

[0110] -将HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞在由补充有10% (v/v) FBS、10mM HEPES、50U/mL青霉素和50 μ g/mL链霉素的DMEM GlutaMAXTM组成的测定培养基中培养,

[0111] -将免疫原性产品(IL-4/CRM₁₉₇)和IL-4对照在测定培养基中两倍连续稀释至最终浓度分别为8000ng/mL和1ng/mL,

[0112] -然后将这些稀释样品转移到每孔含有40,000个HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞的预接种平板中。在约37 $^{\circ}$ C下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育约24h。

[0113] -在培养结束时,使用本领域公知的方法评估激活通路。这些方法的一个示例如下:将QUANTI-BlueTM溶液(购自InvivoGen)以90 μ L/孔添加到10 μ L/孔的细胞上清液中。然后,在约37 $^{\circ}$ C下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育约1h。然后在分光光度计上在625nm处读取平板。

[0114] 有效剂量50(ED₅₀)值对应于导致50%的最大细胞信号的免疫原性产品或细胞因子的量。该值通过使用 $y = ax + b$ 公式,从经过50%拐点周围的稀释点的曲线,将50%最大细胞信号插值到横坐标轴来确定的。

[0115] 在TEST B^{IL-4}中,通过将所测免疫原性产品的ED₅₀除以IL-4对照标准曲线的平均ED₅₀来计算失活因子(inactivation factor)。失活因子>100的结果意味着对于相同量的蛋白,免疫原性产品中的IL-4活性相当于天然IL-4活性的不到1%。在一个实施方案中,失活因子大于约2、2.5、3.33、5或10,优选大于约20,更优选大于约100表明免疫原性产品被高度失活。在一个实施方案中,残余活性低于天然IL-4活性的约50%、40%、30%、20%或10%,优选低于约5%,且更优选低于约1%表明免疫原性产品被高度失活。

[0116] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联的IL-4并且是免疫原性的,这意味着该免疫原性产品能够在TEST C^{IL-4}的条件下在体内诱导抗IL-4抗体。在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品能够在例如TEST C^{IL-4}的条件下在体内诱导多克隆抗IL-4抗体。

[0117] 根据以下方法进行TEST C^{IL-4}:

[0118] 将特定总蛋白量的免疫原性产品(例如通过Bradford蛋白测定法确定的)注射到小鼠(3周龄以上)中,在120天内注射三到四次。在一个实施方案中,TEST C^{IL-4}是异源系统,例如将包含非鼠IL-4的免疫原性产品注射到小鼠中,并且该试验包括施用范围为约0.3至30 μ g的总蛋白剂量。在另一个实施方案中,TEST C^{IL-4}是同源系统,即将包含鼠IL-4的免疫

原性产品注射到小鼠中,并且该试验包括施用范围为约5至约30 μg 的总蛋白剂量。在免疫前(免疫前血清样品)和第39天至第120天之间(试验血清样品)获取血清样品。如下所述进行ELISA抗IL-4。

[0119] 简而言之,用1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用于制备免疫原性产品的IL-4包被96孔板,并在约2 $^{\circ}\text{C}$ 至约8 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内温育过夜。然后在约37 $^{\circ}\text{C}$ 下将平板用封闭缓冲液封闭约90min。将100 μL 免疫前样品和血清样品(免疫前和试验)以两倍连续稀释添加到孔中,例如从起始500 $\text{di}1^{-1}$ 到256,000 $\text{di}1^{-1}$ 。最后将标记有抗小鼠免疫球蛋白的二抗(例如偶联HRP的抗体)添加到孔中,并使用本领域已知的任何比色手段如OPD底物溶液来显色ELISA。

[0120] 在一个实施方案中,当含有试验血清样品的孔的光密度(490nm)比含有免疫前血清样品的孔的光密度高至少约1.5倍,优选至少约2倍时,免疫原性产品被认为是免疫原性的,这意味着它已经在体内诱导抗IL-4抗体。

[0121] 在这个试验中,将滴度定义为达到测定中OD_{max}减去相应免疫前样品的OD的50%的血清稀释度。这种计算模式比考虑公知的血清转化滴度要严格得多,但提供了更可靠的分析和更少的假阳性。滴度表达为血清稀释因子($\text{di}1^{-1}$)。

[0122] 在另一个实施方案中,在TEST C^{IL-4}中,滴度值 $\geq 250\text{di}1^{-1}$,优选 $\geq 500\text{di}1^{-1}$ 表明本发明的免疫原性产品允许产生抗IL-4的结合抗体。

[0123] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联的IL-4,并且能够在下文所述的TEST D^{IL-4}条件下中和IL-4活性。根据本发明,进行TEST D^{IL-4}以评价从用免疫原性产品免疫的小鼠中获得的血清的中和能力。可以使用HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞,通过用于鼠产品的比色法T细胞增殖测定法或用于人产品的报告基因生物测定法来评估这些评价。在这些细胞中,用IL-4或IL-13进行的刺激激活JAK/STAT6通路,并随后产生SEAP。然后通过评估上清液中的SEAP水平来评价由免疫原性产品的免疫诱导的中和抗体抗IL-4。

[0124] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含鼠IL-4,并且TEST D^{IL-4}是使用CTLL-2细胞按照以下方法进行的比色法T细胞增殖测定法:

[0125] -使CTLL-2细胞在RPMIc和10% (v/v) FBS中的终浓度为10ng/ml的IL-2的存在下生长,

[0126] -分别以1/200和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度添加血清样品和阳性对照多克隆抗IL-4抗体,并两倍连续稀释在培养板中的每孔25 μL 的RPMIc+10% (v/v) FBS中。

[0127] -然后将muIL-4以2ng/ml的终浓度添加到血清样品和对照中,并然后在室温下温育1小时。

[0128] -然后,将每孔20,000个CTLL-2细胞添加到预温育的样品中。然后在约37 $^{\circ}\text{C}$ 下将平板在5% CO₂的湿润培养箱中温育约48h。

[0129] -在培养结束时,使用本领域公知的方法评估细胞活力。这些方法的一个示例如下:将MTS/PMS溶液以40 μL /孔添加到孔中,并将平板在37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂下再温育4h。然后在分光光度计上在490nm处读取平板。

[0130] 在另一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含人IL-4,并且TEST D^{IL-4}是使用HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞进行的报告基因生物测定法并包括以下步骤:

[0131] -将HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞接种到由补充有10% (v/v) FBS、10mM HEPES、50U/mL青霉素和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM GlutaMAXTM组成的测定培养基中,

[0132] -分别以1/200和1 μ g/mL的终浓度将血清样品、对照抗体(多克隆山羊抗IL-4抗体)稀释在测定培养基中。将血清样品或对照抗体两倍连续稀释在存在终浓度为0.25ng/mL的IL-4的圆底96孔板中,在室温下温育一小时。

[0133] -然后将这些混合物添加到每孔含有40,000个HEK-Blue™IL-4/IL-13细胞的预接种平板中。在约37°C下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育约24h。

[0134] -在培养结束时,使用本领域公知的方法评估激活通路。这些方法的一个示例如下:将QUANTI-Blue™溶液以90 μ L/孔添加到10 μ L/孔的细胞上清液中。然后,在37°C下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育1h。然后在分光光度计上在625nm处读取平板。

[0135] NC₅₀结果表达为中和50%的muIL-4或IL-4活性的血清稀释因子(dil^{-1})。通过将导致50%的IL-4活性的血清稀释度插值到横坐标轴上来确定NC₅₀。

[0136] 在TEST D^{IL-4}中,NC₅₀值 $\geq 100\text{dil}^{-1}$,优选 $\geq 200\text{dil}^{-1}$ 表明本发明的免疫原性产品允许产生抗IL-4的中和抗体。在一个实施方案中,由施用本发明的免疫原性产品诱导的抗IL-4的中和抗体是多克隆的。

[0137] 在一个实施方案中,该至少一种细胞因子是IL-13。

[0138] 在一个实施方案中,IL-13是重组的。可以使用编码IL-13的核酸序列通过本领域已知的常规方法来获得重组IL-13。例如,可以通过培养含有包含IL-13基因的表达载体的细胞、收获包涵体并纯化IL-13细胞因子来获得重组IL-13。重组IL-13是可商购的,并且可以购自例如PeproTech(Rocky Hill,NJ,US)。

[0139] 在本发明的一个实施方案中,IL-13源自哺乳动物。

[0140] 在一个实施方案中,IL-13是哺乳动物IL-13的变体,其中所述变体与其源自的哺乳动物IL-13具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。

[0141] 在一个实施方案中,IL-13是全长IL-13。

[0142] 在另一个实施方案中,该至少一种细胞因子是IL-13的片段,例如包含其源自的IL-13的至少约50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个、110个、115个或120个氨基酸(优选连续氨基酸)的IL-13的片段。

[0143] 在一个实施方案中,所述片段包含IL-13的至少一个特异性表位。

[0144] 在本发明的一个实施方案中,IL-13是人IL-13,优选重组人IL-13。人IL-13具有序列SEQ ID NO:6(UniProt ID:P35225-1)。

[0145] SEQ ID NO:6

[0146] LTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNITQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAI
EKTQRMLSGFPCPKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKFLFREGRFN

[0147] 在一个实施方案中,IL-13是SEQ ID NO:6的变体,其中所述变体与SEQ ID NO:6具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。

[0148] 在一个实施方案中,IL-13是全长人IL-13。

[0149] 在另一个实施方案中,该至少一种细胞因子是人IL-13的片段,例如包含SEQ ID NO:6的至少约50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个、110个、115个或120个氨基酸(优选连续氨基酸)的人IL-13的片段。

[0150] 在一个实施方案中,所述片段包含人IL-13的至少一个特异性表位。

[0151] 在本发明的一个实施方案中,IL-13是鼠IL-13,优选重组鼠IL-13。鼠IL-13具有序

列SEQ ID NO:7(UniProt ID:P20109-1)。

[0152] SEQ ID NO:7

[0153] PVPRSVSLPLTLKELIEELSNITQDQTPLCNGSMVWSVDLAAGGFCVALDSLNTISNCNAIYRTQRILH
GLCNRKAPTTVSSLPDTKIEVAHFITKLLSYTKQLFRHGPF

[0154] 在一个实施方案中,IL-13是SEQ ID NO:7的变体,其中所述变体与SEQ ID NO:7具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。

[0155] 在一个实施方案中,IL-13是全长鼠IL-13。

[0156] 在另一个实施方案中,该至少一种细胞因子是鼠IL-13的片段,例如包含SEQ ID NO:7的至少约50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个或105个氨基酸(优选连续氨基酸)的鼠IL-13的片段。

[0157] 在一个实施方案中,所述片段包含鼠IL-13的至少一个特异性表位。

[0158] 在本发明的一个实施方案中,IL-13是犬IL-13,优选重组犬IL-13。犬IL-13具有序列SEQ ID NO:8(UniProt ID:Q9NOW9-1)。

[0159] SEQ ID NO:8

[0160] SPSPVTPSPTLKELIEELVNITQNQASLCNGSMVWSVNLTAGMYCAALESLINVSDCSAIQRTQRMLKALCSQKPAAGQISSERSRDTKIEVIQLVKNLLTYVRGVYRHGNFR

[0161] 在一个实施方案中,IL-13是SEQ ID NO:8的变体,其中所述变体与SEQ ID NO:8具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。

[0162] 在一个实施方案中,IL-13是全长犬IL-13。

[0163] 在另一个实施方案中,该至少一种细胞因子是犬IL-13的片段,例如包含SEQ ID NO:8的至少约50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个或110个氨基酸(优选连续氨基酸)的犬IL-13的片段。

[0164] 在一个实施方案中,所述片段包含犬IL-13的至少一个特异性表位。

[0165] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含以范围为约16:1至约1:2,优选约8:1至约2:1,更优选约4:1的IL13:CRM₁₉₇摩尔比与CRM₁₉₇偶联的IL-13。

[0166] 在本发明的一个实施方案中,免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联且被抗IL-13抗体识别的IL-13。

[0167] 可以通过本领域已知的常规方法来验证免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联并被抗IL-13抗体识别的IL-13的事实。这些方法的一个示例是使用例如用生物素标记的检测抗体、链霉亲和素HRP扩增系统和/或OPD底物溶液的夹心ELISA抗细胞因子/载体蛋白。

[0168] 在一个实施方案中,本文所述的TEST A^{IL-13}可用于验证本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联并被抗IL-13抗体识别的IL-13。TEST A^{IL-13}是抗IL-13/CRM₁₉₇的ELISA试验。

[0169] 按如下进行TEST A^{IL-13}:

[0170] -用针对CRM₁₉₇的捕获抗体包被平板,例如来自Abcam (AB53828) 或Bio-Rad (3710-0956、3710-0150或3710-0100)的抗白喉毒素抗体,

[0171] -在约37°C下将平板用封闭缓冲液(例如含2%酪蛋白(w/v)的PBS)封闭约90min,

[0172] -在约37°C下将平板用从250ng/mL开始以两倍连续稀释的免疫原性产品或阴性对照如IL-13和CRM₁₉₇温育约90min,

[0173] -在约37°C下将平板用针对IL-13的生物素化检测抗体温育约90min,针对IL-13的生物素化检测抗体例如来自SouthernBiotech (10126-08)、PeproTech (500-P13BT) 或R&D systems (BAF213) 的抗IL-13生物素化抗体,或来自Bio-Rad (AAM34B)、PeproTech (500-P178BT) 或R&D systems (BAF413) 的鼠抗IL-13生物素化抗体,

[0174] -在约37°C下将平板用链霉亲和素-HRP温育约30min,并用OPD底物溶液显色复合物约30min,

[0175] -在停止酶促反应后,通过分光光度法在490nm处确定所得颜色的强度。

[0176] 在一个实施方案中,当含有每孔约25ng的本发明的免疫原性产品的孔的光密度是含有阴性对照的孔密度的至少约3倍,优选至少约5倍,且更优选至少约10倍时,本领域技术人员可以得出结论:本发明的免疫原性产品 (i) 被抗IL-13抗体识别,并且 (ii) 包含与CRM₁₉₇ 偶联的IL-13。

[0177] 在另一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇ 偶联并高度失活的IL-13,这意味着在下述的TEST B^{IL-13} 条件下,该免疫原性产品显示出小于约15%的残余活性,优选小于约10%的残余活性,且更优选小于约5%的残余活性。TEST B^{IL-13} 是使用HEK-BlueTM IL-4/IL-13细胞的报告基因生物测定法。在这些细胞中,用IL-4或IL-13进行的刺激激活JAK/STAT6通路,并随后产生SEAP。然后通过评估上清液中的SEAP水平来评价本发明的免疫原性产品中包含的IL-13生物学活性。

[0178] 在一个实施方案中,TEST B^{IL-13} 使用购自InvivoGen的HEK-BlueTM IL-4/IL-13细胞系。在鼠或人IL-13的存在下,HEK-BlueTM IL-4/IL-13细胞系的STAT6通路被激活并产生可使用本领域公知的方法进行定量的SEAP。

[0179] TEST B^{IL-13} 包括以下步骤:

[0180] -将HEK-BlueTM IL-4/IL-13细胞接种在由补充有10% (v/v) FBS、10mM HEPES、50U/mL青霉素和50μg/mL链霉素的DMEM GlutaMAXTM组成的测定培养基中,

[0181] -将人免疫原性产品 (IL-13/CRM₁₉₇) 和IL-13对照在测定培养基中两倍连续稀释至终浓度分别为8000ng/mL和1ng/mL,

[0182] -将鼠免疫原性产品 (muIL-13/CRM₁₉₇) 和muIL-13对照在测定培养基中两倍连续稀释至终浓度分别为250ng/mL和10ng/mL,

[0183] -然后将样品转移到每孔含有40,000个HEK-BlueTM IL-4/IL-13细胞的预接种平板中。在约37°C下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育约24h。

[0184] -在培养结束时,使用本领域公知的方法评估激活通路。这些方法的一个示例如下:将QUANTI-BlueTM 溶液 (购自InvivoGen) 以90μL/孔添加到10μL/孔的细胞上清液中。然后,在约37°C下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育约1h。然后在分光光度计上在625nm处读取平板。

[0185] 有效剂量50 (ED₅₀) 值对应于导致50%的记录在所考虑样品的最大信号的免疫原性产品 (或IL-13) 的量,其可通过使用来自全部稀释点的四参数对数 (4PL) 非线性回归将OD_{max}/2值插值到相应的样品浓度来确定。

[0186] 在TEST B^{IL-13} 中,通过将所测的本发明的免疫原性产品的ED₅₀除以IL-13对照标准曲线的相应ED₅₀来计算失活因子。失活因子>20的结果意味着对于相同量的蛋白,免疫原性产品中的IL-13活性相当于天然IL-13活性的不到5%。在一个实施方案中,失活因子大于约

2、2.5、3.33、5或10,优选大于约20表明该免疫原性产品被高度失活。在一个实施方案中,残余活性低于天然IL-13活性的约50%、40%、30%、20%或10%,优选低于约5%表明该免疫原性产品被高度失活。

[0187] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联的IL-13并且是免疫原性的,这意味着该免疫原性产品能够在TEST C^{IL-13}的条件下在体内诱导抗IL-13抗体。在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品能够在例如TEST C^{IL-13}的条件下在体内诱导多克隆抗IL-13抗体。

[0188] 根据以下方法进行TEST C^{IL-13}:

[0189] 将特定总蛋白量的免疫原性产品(例如通过Bradford蛋白测定法确定的)注射到小鼠(3周龄以上)中,在120天内注射至少三次。在一个实施方案中,TEST C^{IL-13}是异源系统,例如将包含非鼠IL-13的免疫原性产品注射到小鼠中,并且该试验包括施用范围为约0.3至10 μ g的总蛋白剂量。在另一个实施方案中,TEST C^{IL-13}是同源系统,例如将包含鼠IL-13的免疫原性产品注射到小鼠中,并且该试验包括施用范围为约5至约30 μ g的总蛋白剂量。在免疫前(免疫前血清样品)和第39天至第120天之间(试验血清样品)获取血清样品。如下所述进行ELISA抗IL-13。

[0190] 简而言之,用1 μ g/mL用于制备免疫原性产品的IL-13包被96孔板,并在约2°C至约8°C的温度范围下温育过夜。然后在约37°C下将平板用封闭缓冲液封闭约90min。以两倍连续稀释将100 μ L免疫前样品和血清样品(免疫前和试验)添加到孔中,例如从起始500dil⁻¹到256,000dil⁻¹。最后将标记有抗小鼠免疫球蛋白的二抗(例如偶联HRP的抗体)添加到孔中,并使用本领域已知的任何比色手段如OPD底物溶液来显色ELISA。

[0191] 在一个实施方案中,当含有试验血清样品的孔的光密度比含有免疫前血清样品的孔的光密度高至少约1.5倍,优选至少约2倍时,免疫原性产品被认为是免疫原性的,这意味着它已经在体内诱导抗IL-13抗体。

[0192] 在这个试验中,将滴度定义为达到测定中OD_{max}减去相应免疫前样品的OD的50%的血清稀释度。这种计算模式比考虑公知的血清转化滴度要严格得多,但提供了更可靠的分析和更少的假阳性。滴度表达为血清稀释因子(dil⁻¹)。

[0193] 在另一个实施方案中,在TEST C^{IL-13}中,滴度值 \geq 250dil⁻¹,优选 \geq 500dil⁻¹表明本发明的免疫原性产品允许产生抗IL-13的结合抗体。

[0194] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联的IL-13,并且能够在下文所述的TEST D^{IL-13}条件下中和IL-13活性。根据本发明,进行TEST D^{IL-13}以使用报告细胞系HEK-BlueTMIL-4/IL-13评价从用免疫原性产品免疫的小鼠中获得的血清的中和能力。在这些细胞中,用IL-4或IL-13进行的刺激激活JAK/STAT6通路,并随后产生SEAP。然后通过评估上清液中的SEAP水平来评价由免疫原性产品免疫诱导的中和抗体抗IL-13。

[0195] 使用HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞按照以下方法进行TEST D^{IL-13}:

[0196] 在有生物活性的IL-13的存在下,HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞系的STAT6通路被激活并产生可使用本领域公知的方法来定量的SEAP。该测定法以以下方法进行:

[0197] -将HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞在由补充有10%(v/v)FBS、10mM HEPES、50U/mL青霉素和50 μ g/mL链霉素的DMEM GlutaMAXTM组成的测定培养基中培养,

[0198] -将在施用人免疫原性产品后获得的血清样品和对照抗体(多克隆山羊抗IL-13抗

体,例如AF-213-NA)分别以1/100和4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度稀释在测定培养基中,并添加2ng/mL的IL-13。

[0199] -将在施用鼠免疫原性产品后获得的血清样品和对照抗体(多克隆山羊抗 $\mu\text{IL-13}$ 抗体,例如AF-413-NA)分别以1/100和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度稀释在测定培养基中,并添加2ng/mL的 $\mu\text{IL-13}$ 。

[0200] -然后将这些混合物在室温下温育1h,随后添加到每孔40,000个HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞中。在约37 $^{\circ}\text{C}$ 下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育约24h。

[0201] -在培养结束时,使用本领域公知的方法评估激活通路。这些方法的一个示例如下:将QUANTI-BlueTM溶液以90 μL /孔添加到10 μL /孔的细胞上清液中。然后,在约37 $^{\circ}\text{C}$ 下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育1h。然后在分光光度计上在625nm处读取平板。

[0202] NC₅₀结果表达为中和50%的 $\mu\text{IL-13}$ 或IL-13活性的血清稀释因子(dil^{-1})。通过将导致50%的IL-13活性的血清稀释度插值到横坐标轴上来确定NC₅₀。

[0203] 在TEST D^{IL-13}中,NC₅₀值 ≥ 50 ,优选NC₅₀值 $\geq 100\text{dil}^{-1}$ 表明本发明的免疫原性产品允许产生抗IL-13的中和抗体。在一个实施方案中,通过施用本发明的免疫原性产品诱导的抗IL-13的中和抗体是多克隆的。

[0204] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含IL-4和IL-13。

[0205] 在一个实施方案中,IL-4、IL-13或两者是重组的。

[0206] 在一个实施方案中,IL-4和IL-13均源自同一哺乳动物。在一个实施方案中,IL-4、IL-13或两者是人的。

[0207] 在一个实施方案中,IL-4是人IL-4的变体,其中所述变体与人IL-4具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。在一个实施方案中,IL-13是人IL-13的变体,其中所述变体与人IL-13具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性。

[0208] 在一个实施方案中,IL-4、IL-13或两者是全长的。

[0209] 在一个实施方案中,IL-4是全长IL-4的片段。在一个实施方案中,IL-13是全长IL-13的片段。

[0210] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含均与CRM₁₉₇偶联的IL-4和IL-13。

[0211] 在一个实施方案中,细胞因子(即IL-4和IL-13):CRM₁₉₇的摩尔比范围是约16:1至约1:2,优选约8:1至约2:1,更优选约4:1。

[0212] 在一个实施方案中,IL-4:CRM197的摩尔比范围是约8:1至约1:2,优选约4:1至约1:1,更优选约2:1。

[0213] 在一个实施方案中,IL-13:CRM197的摩尔比范围是约8:1至约1:2,优选约4:1至约1:1,更优选约2:1。

[0214] 在一个实施方案中,IL-4:IL-13的摩尔比范围是约5:1至约1:5,优选约2:1至约1:2,更优选约1:1。

[0215] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联并被抗IL-4和抗IL-13抗体识别的IL-4和IL-13。

[0216] 可以通过本领域已知的常规方法来验证免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联并被抗IL-4和抗IL-13抗体识别的IL-4和IL-13的事实。这些方法的一个示例是使用例如用生物素

标记的检测抗体、链霉亲和素HRP扩增系统和/或OPD底物溶液的夹心ELISA抗细胞因子/载体蛋白。

[0217] 在一个实施方案中,可以使用本文所述的TESTS A (TEST A^{IL-4}和TEST A^{IL-13}) 来验证抗IL-4和抗IL-13抗体对免疫原性产品的识别。

[0218] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联并高度失活的IL-4和IL-13,这意味着在下述的TESTS B (TEST B^{IL-4}和TEST B^{IL-13}) 条件下,该免疫原性产品显示出小于约10%的IL-4初始活性,优选小于约5%,且优选小于约1%的IL-4初始活性,以及小于约15%的IL-13初始活性,优选小于约10%,且优选小于约5%的IL-13初始活性。

[0219] 在一个实施方案中,该免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联的IL-4和IL-13并且是免疫原性的,这意味着该免疫原性产品能够(i) 在TEST C^{IL-4}的条件下在体内诱导抗IL-4抗体和(ii) 在TEST C^{IL-13}的条件下在体内诱导抗IL-13抗体。在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品能够在例如TEST C^{IL-4}的条件下在体内诱导多克隆抗IL-4抗体,以及在例如TEST C^{IL-13}的条件下在体内诱导抗IL-13抗体。

[0220] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联的IL-4和IL-13,并且能够(i) 在本文所述的TEST D^{IL-4}的条件下中和IL-4活性和(ii) 在本文所述的TEST D^{IL-13}的条件下中和IL-13活性。在一个实施方案中,通过施用本发明的免疫原性产品诱导的抗IL-4和IL-13的中和抗体是多克隆的。

[0221] 本发明进一步涉及一种生产免疫原性产品的方法,该免疫原性产品包含选自IL-4、IL-13及其混合物的至少一种细胞因子,并与优选为CRM₁₉₇的载体蛋白偶联,其中该方法包括以下步骤:

[0222] a) 使该至少一种细胞因子与含有NHS-酯,优选N-[γ -马来酰亚胺丁酸琥珀酰亚胺酯(sGMBS)的异双功能交联剂接触;

[0223] b) 使该载体蛋白与含有NHS-酯,优选N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)的异双功能交联剂接触,以产生载体-SATA复合物;

[0224] c) 使在步骤(a)获得的sGMBS-细胞因子复合物与在步骤(b)获得的载体SATA复合物接触。

[0225] 在一个实施方案中,在步骤a)中,反应缓冲液在液体溶液,优选水溶液中。

[0226] 在一个实施方案中,在步骤a)中,反应缓冲液的pH范围是约6至约8,优选约6.5至约7.5,更优选约pH 7.2。

[0227] 在一个实施方案中,在步骤a)中,细胞因子以约0.1至约10mg/mL,优选约0.5至约5mg/mL,更优选约1mg/mL的浓度范围存在于溶液中。

[0228] 在一个实施方案中,在步骤a)中,在反应缓冲液中以1mM至100mM,优选5mM至50mM,且更优选10mM的浓度范围制备含有NHS-酯,优选sGMBS的异双功能交联剂。

[0229] 在一个实施方案中,在步骤a)中,将IL-4和含有NHS-酯,优选sGMBS的异双功能交联剂以范围为约1:120至约1:1,优选约1:50至约1:10的IL-4:含有NHS-酯、优选sGMBS的异双功能交联剂摩尔比混合。

[0230] 在一个实施方案中,在步骤a)中,将IL-13和含有NHS-酯,优选sGMBS的异双功能交联剂以范围为约1:120至约1:1,优选约1:50至约1:10的IL-13:含有NHS-酯、优选sGMBS的异双功能交联剂摩尔比混合。

[0231] 在一个实施方案中,在步骤a)中,将该至少一种细胞因子与含有NHS-酯,优选sGMBS的异双功能交联剂一起温育范围约30min至约120min,优选约45至约90min,且更优选至少60min的时间段。

[0232] 在一个实施方案中,在步骤a)中,在约15°C至约35°C,优选约18°C至约27°C的温度范围下进行该至少一种细胞因子与含有NHS-酯,优选sGMBS的异双功能交联剂的接触步骤。

[0233] 在一个实施方案中,在步骤a)之后,去除存在于反应混合物中的分子量小于约10kDa、小于约5kDa或小于约3kDa的小化合物。这些小化合物主要涵盖过量的含有NHS-酯(和与NHS-酯水解相关的副产物),优选sGMBS的异双功能交联剂,以及未反应的过量分子。可以通过本领域公知的方法进行这种去除。

[0234] 在一个实施方案中,在步骤a)结束时,通过Bradford测定法或通过本领域公知的任何方法确定蛋白含量。

[0235] 在一个实施方案中,在步骤b)中,反应缓冲液在液体溶液,优选水溶液中。

[0236] 在一个实施方案中,在步骤b)中,反应缓冲液的pH范围是约6至约8,优选约6.5至约7.5,更优选约pH 7.2。

[0237] 在一个实施方案中,在步骤b)中,CRM₁₉₇以范围为约0.2至约20mg/mL,优选约1至约10mg/mL,更优选约2mg/mL的浓度存在于溶液中。

[0238] 在一个实施方案中,在步骤b)中,含有NHS-酯,优选SATA的异双功能交联剂以范围为20mM至约500mM,优选约50mM至约200mM且更优选约100mM的浓度存在于溶液中,优选于DMSO中。

[0239] 在一个实施方案中,在步骤b)中,将CRM₁₉₇和含有NHS-酯,优选SATA的异双功能交联剂以范围为约1:320至约1:10的载体:含有NHS-酯,优选SATA的异双功能交联剂摩尔比混合。

[0240] 在一个实施方案中,在步骤b)中,将CRM₁₉₇与含有NHS-酯,优选SATA的异双功能交联剂一起温育范围为约10min至约60min,优选约15min至约45min,且更优选30min的时间段。

[0241] 在一个实施方案中,在范围为约15°C至约35°C,优选约18°C至约27°C的温度下进行接触步骤b)。

[0242] 在一个实施方案中,在步骤b)之后,去除存在于反应混合物中的分子量小于约10kDa、小于约5kDa或小于约3kDa的小化合物。这些小化合物主要涵盖过量的含有NHS-酯(和与NHS-酯水解相关的副产物),优选SATA的异双功能交联剂,DMSO,以及未反应的过量分子。可以通过本领域公知的方法进行这种去除。

[0243] 在一个实施方案中,在步骤b)之后,将CRM₁₉₇与含有NHS-酯,优选SATA的异双功能交联剂之间的复合物脱保护,以将保护基团(含有NHS-酯,优选SATA的异双功能交联剂)转化为官能团。在一个实施方案中,在去除存在于反应混合物中的分子量小于约10kDa、小于约5kDa或小于约3kDa的小化合物的步骤之后进行所述脱保护步骤。

[0244] 将分子脱保护的方法的示例是本领域公知的,且包括但不限于使用羟胺、使用甲氧基胺或使用碱(例如,NaOH、KOH、K₂CO₃、MeONa、甲醇中的NH₃)。

[0245] 在一个实施方案中,脱保护步骤包括向反应混合物中添加羟胺溶液,优选以范围约10mM至约500mM,优选约20mM至约100mM,更优选约50mM的终浓度。

[0246] 在一个实施方案中,将羟胺溶液与反应混合物一起温育范围约60min至约180min,优选约90min至约150min,更优选120min的时间段。

[0247] 在一个实施方案中,在120分钟内以50mM添加羟胺溶液。

[0248] 在一个实施方案中,在范围约15°C至约35°C,优选约18°C至约27°C的温度下进行羟胺溶液与反应混合物的温育。

[0249] 在一个实施方案中,在脱保护步骤之后,去除存在于反应混合物中的分子量小于约10kDa、5kDa或3kDa的小化合物。这些小化合物主要涵盖过量的羟胺和来自先前步骤的可能的残余SATA。可以通过本领域公知的方法进行这种去除。

[0250] 在一个实施方案中,在步骤b)结束时,通过Bradford测定法或通过本领域公知的任何方法确定蛋白含量。

[0251] 然后,在本发明的方法的步骤c)中,使步骤a)的终产物与步骤b)的终产物接触,从而产生本发明的免疫原性产品。

[0252] 在一个实施方案中,在步骤c)中,使包含IL-4的步骤a)的终产物和包含CRM₁₉₇的步骤b)的终产物以范围约16:1至约1:2,优选约8:1至约2:1,更优选约4:1的IL-4:CRM₁₉₇摩尔比接触。

[0253] 在一个实施方案中,在步骤c)中,使包含IL-13的步骤a)的终产物和包含CRM₁₉₇的步骤b)的终产物以范围约16:1至约1:2,优选约8:1至约2:1,更优选约4:1的IL-13:CRM₁₉₇摩尔比接触。

[0254] 在步骤c)的另一个实施方案中,使包含IL-4的步骤a)的终产物、包含IL-13的步骤a)的终产物和步骤b)的终产物接触。在一个实施方案中,以范围约16:1至约1:2,优选约8:1至约2:1,更优选约4:1的细胞因子(即IL-4和IL-13):CRM₁₉₇摩尔比进行所述接触步骤。在一个实施方案中,以范围约8:1至约1:2,优选约4:1至约1:1,更优选约2:1的IL-4:CRM₁₉₇摩尔比进行所述接触步骤。在一个实施方案中,以范围约8:1至约1:2,优选约4:1至约1:1,更优选约2:1的IL-13:CRM₁₉₇摩尔比进行所述接触步骤。在一个实施方案中,以范围约5:1至约1:5,优选约2:1至约1:2,更优选约1:1的IL-4:IL-13摩尔比进行所述接触步骤。

[0255] 在一个实施方案中,在步骤c)中,反应缓冲液在液体溶液,优选水溶液中。

[0256] 在一个实施方案中,在步骤c)中,反应缓冲液的pH范围是约6至约8,优选约6.5至约7.5,更优选约pH 7.2。

[0257] 在步骤c)的一个实施方案中,将接触步骤进行范围为约2小时至约26小时,优选约10至18小时,更优选约12至约18小时的时间段。

[0258] 在一个实施方案中,在范围约2°C至10°C,优选约3°C至约7°C,更优选约4°C的温度下进行温育步骤c)。

[0259] 在一个实施方案中,在步骤c)之后,去除存在于反应混合物中的分子量小于约100kDa、小于约50kDa、小于约25kDa、小于约10kDa、小于约5kDa或小于约3kDa的小化合物。这些小化合物主要涵盖未反应的过量分子。可以通过本领域公知的方法进行这种去除。

[0260] 在一个实施方案中,将在步骤c)中获得的免疫原性产品进行浓缩。可以由技术人员通过本领域已知的任何技术进行免疫原性产品的浓缩,例如通过可任选地与无菌过滤组合的离心超滤方法。

[0261] 在一个实施方案中,将在步骤c)获得并任选浓缩的免疫原性产品冻干。

[0262] 本发明进一步涉及易于通过本发明的方法获得的免疫原性产品。

[0263] 本发明进一步涉及包含至少一种如上文所述的免疫原性产品或基本上由其组成或由其组成的组合物。在一个实施方案中,所述组合物可以称为免疫原性组合物。

[0264] 本发明进一步涉及包含至少一种如上文所述的免疫原性产品以及至少一种药学上可接受的赋形剂或基本上由其组成或由其组成的药物组合物。

[0265] 可用于本发明的药物组合物中的药学上可接受的赋形剂包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白例如人血清白蛋白、缓冲物质例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质(例如羧甲基纤维素钠)、聚乙二醇、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0266] 本发明进一步涉及包含至少一种如上文所述的免疫原性产品或基本上由其组成或由其组成的药物(medicament)。

[0267] 如本文所用,就组合物、药物组合物或药物而言,术语“基本上由……组成”意指该至少一种本发明的免疫原性产品是所述组合物、药物组合物或药物中唯一具有生物活性的治疗剂或剂。

[0268] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物或药物包含含有与CRM₁₉₇偶联的IL-4的免疫原性产品或基本上由其组成。

[0269] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物或药物包含含有与CRM₁₉₇偶联的IL-13的免疫原性产品或基本上由其组成。

[0270] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物或药物包含含有均与CRM₁₉₇偶联的IL-4和IL-13的免疫原性产品或基本上由其组成。

[0271] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物或药物包含重量比范围为约10:1至约1:10,优选重量比范围为约4:1至1:4的含有与CRM₁₉₇偶联的IL-4的免疫原性产品和含有与CRM₁₉₇偶联的IL-13的免疫原性产品的混合物,或基本上由其组成。

[0272] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物或药物是疫苗组合物。在本发明的一个实施方案中,本发明的疫苗组合物包含至少一种佐剂。

[0273] 本发明进一步涉及本发明的组合物、药物组合物、药物或疫苗的制剂,其中该组合物、药物组合物、药物或疫苗是佐剂化的(adjuvanted)。

[0274] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物、药物或疫苗因此包含一种或多种佐剂。

[0275] 可用于本发明的合适的佐剂包括但不限于:

[0276] (1) 铝盐(明矾),例如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等;

[0277] (2) 水包油乳剂制剂(含有或不含有其他特定的免疫刺激剂,例如,胞壁肽(定义如下)或细菌细胞壁组分),例如,角鲨烯基乳剂(例如,角鲨烯基水包油乳剂)或角鲨烷基乳剂,例如

[0278] (a) MF59(在PCT公开号W0 90/14837中描述的角鲨烯基水包油佐剂),含有5%角鲨烯、0.5% Tween 80和0.5% span 85(任选含有不同量的MTP(见下文,尽管不是必需的)),使用微流化器例如Model 110Y微流化器(Microfluidics, Newton, Mass.)将其配制成亚微米

颗粒,

[0279] (b) SAF, 含有10%角鲨烯、0.4%Tween 80、5%普卢尼克嵌段聚合物L121 (pluronic-blocked polymer L121) 和thr-MDP(见下文), 将其微流化成亚微米乳剂或将其涡旋振荡以产生更大粒径的乳剂, 和

[0280] (c) Ribi™佐剂系统(RAS), (Corixa, Hamilton, Mont.), 含有2%角鲨烯、0.2% Tween 80和一种或多种来自以下组成的组的细菌细胞壁组分: 在美国专利号4,912,094 (Corixa) 中描述的3-O-去酰基单磷脂A (MPL™)、海藻糖二霉菌酸酯 (trehalose dimycolate, TDM) 和细胞壁骨架 (CWS), 优选MPL+CWS (Detox™);

[0281] (d) 角鲨烷佐剂, 其包含但不限于以下组成: 角鲨烷3.9%, w/v, 三油酸山梨坦 (0.47%, w/v) 和聚氧乙烯 (80) 去水山梨糖醇单油酸酯 (0.47%, w/v), 分散于柠檬酸盐缓冲剂中;

[0282] (3) 油包水乳剂制剂, 例如ISA-51或角鲨烯基油包水佐剂 (例如ISA-720); 适用于油包水乳剂的油佐剂可包括矿物油和/或可代谢油。矿物油可以选自Bayol®、Marcol®和Drakeol®, 包括Drakeol® 6VR (SEPPIC, 法国)。可代谢油可以选自SP油 (在下文描述)、Emulsigen (MPV Laboratories, Ralston, NZ)、Montanide 264, 266, 26 (Seppic SA, Paris, 法国) 以及植物油、动物油例如鱼油角鲨烷和角鲨烯, 以及生育酚及其衍生物。

[0283] (4) 可以使用皂苷佐剂, 例如Quil A或STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, Mass.) (美国专利号5,057,540), 或由此产生的颗粒例如ISCOM (免疫刺激复合物);

[0284] (5) 细菌脂多糖, 合成的脂质A类似物, 例如氨基烷基葡萄糖胺磷酸酯化合物 (AGP), 或其衍生物或类似物, 其可获得自Corixa, 并且其描述在美国专利号6,113,918中; 一种这样的AGP是2-[(R)-3-十四碳酰氧基十四烷酰氨基]乙基2-脱氧-4-O-膦酰基-3-Oi[(R)-3-十四碳酰氧基十四烷酰氨基]-2-[(R)-3-十四烷酰氧基十四烷酰氨基]-b-D-吡喃葡萄糖苷 (2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino]ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-Oi[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]-b-D-glucopyranoside), 其也称为529 (以前称为RC529), 它被配制为水性形式或稳定的乳剂, 合成多核苷酸例如含有CpG基序的寡核苷酸 (美国专利号6,207,646);

[0285] (6) 细胞因子, 例如白介素 (例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18等)、干扰素 (例如, γ 干扰素)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、肿瘤坏死因子 (TNF)、共刺激分子B7-1和B7-2等;

[0286] (7) 细菌ADP-核糖基化毒素的去毒突变体, 例如野生型或突变形式的霍乱毒素 (CT), 例如根据公开的国际专利申请号W0 00/18434 (也参见W0 02/098368和W0 02/098369), 其中氨基酸位置29处的谷氨酸被另一种氨基酸 (优选组氨酸) 替代, 百日咳毒素 (PT) 或大肠杆菌不耐热毒素 (LT), 尤其是LT-K63、LT-R72、CT-S109、PT-K9/G129 (例如参见W0 93/13302和W092/19265); 和

[0287] (8) 充当免疫刺激剂以增强组合物有效性的其他物质。胞壁肽包括但不限于N-乙酰基胞壁酰基-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺 (N-acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamine, thr-MDP)、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'二棕榈酰基-sn-丙三基-3羟基磷酰基氧)-乙胺 (N-acetylnormuramyl-L-alanine-2-(1'-2'dipalmitoyl-sn-

glycero-3hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine, MTP-PE) 等。

[0288] 所使用的佐剂可部分取决于受体生物体。此外,佐剂的施用量将取决于动物的类型和大小。

[0289] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物是(或包含)进一步包含一种或多种表面活性剂,以及任选至少一种如上所述的佐剂的乳剂。在一个实施方案中,乳剂是油包水乳剂或水包油乳剂。

[0290] 可用于本发明的表面活性剂的示例是本领域公知的,且包括但不限于mannide monoleate,例如由Arlacel (SEPPIC,法国)销售的Montanide®80、Tween 20、Tween 80、span 85、Triton X-100。

[0291] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物、药物、疫苗组合物包含治疗有效量的至少一种本发明的免疫原性产品。

[0292] 在一个实施方案中并且出于存储目的,将本发明的免疫原性产品或组合物、药物组合物、药物、疫苗组合物或乳剂冻干。

[0293] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物、药物、疫苗组合物或乳剂因此可以冷冻干燥(冻干)形式存在。根据该实施方案,将本发明的免疫原性产品与一种或多种冻干助剂组合。各种冻干助剂是本领域技术人员公知的,且包括但不限于糖,例如乳糖和甘露醇。

[0294] 在一个实施方案中,可以将本发明的组合物、药物组合物、药物、疫苗组合物或乳剂与稳定剂混合,例如以保护易于降解的蛋白不被降解,以延长免疫原性产品的保质期,或以提高冷冻干燥效率。有用的稳定剂包括但不限于SPGA、碳水化合物(例如山梨糖醇、甘露醇、海藻糖、淀粉、蔗糖、葡聚糖或葡萄糖)、蛋白(例如白蛋白或酪蛋白或其降解产物)、氨基酸混合物例如赖氨酸或甘氨酸,以及缓冲剂例如碱金属磷酸盐。

[0295] 在一个实施方案中,可以通过注射、局部(例如通过经皮递送)、经直肠、经鼻腔或经阴道施用本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、疫苗组合物或乳剂。

[0296] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物、疫苗组合物或乳剂是适于注射的形式。因此,在一个实施方案中,将通过肌肉内、腹膜内或皮下注射将本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物注射给受试者。

[0297] 适用于可注射用途的形式的示例包括但不限于无菌溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。可以通过在组合物中添加防腐剂例如各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来防止微生物污染。在一个实施方案中,引入等渗剂例如糖或氯化钠以减少注射期间的疼痛可以是优选的。在一个实施方案中,可通过在组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射组合物的延长吸收。

[0298] 在一个实施方案中,将本发明的冻干疫苗组合物溶解于注射用水并轻柔混合;然后添加如上文所述的免疫佐剂;将混合物轻柔混合并装入合适的注射器中。因此,本发明还涉及医疗装置,包括填充有或预填充有本发明的疫苗组合物的注射器。

[0299] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物是适于局部施用的形式。适于局部施用的形式的示例包括但不限于聚合物贴剂或控释贴剂等。

[0300] 在另一个实施方案中,本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物、疫苗组合物或乳剂是适于直肠施用的形式。适于直肠施用的形式的示例包括但不限于栓剂、微灌肠剂、灌肠剂、凝胶、直肠泡沫、乳膏、软膏等。

[0301] 本发明还涉及为填充有或预填充有本发明的组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物的注射器的医疗装置。

[0302] 在一个实施方案中,所述注射器是双室注射器,其中一个室包含具有本发明的免疫原性产品的溶液,并且另一个室包含佐剂。

[0303] 本发明还涉及包含预填充有本发明的免疫原性产品或本发明的组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物的小瓶的医疗装置。

[0304] 本发明进一步涉及本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物,其用于治疗受试者中的炎性病症。

[0305] 因此,本发明还涉及一种治疗受试者中炎性病症的方法,包括向受试者施用本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物、疫苗组合物或乳剂。

[0306] 本发明进一步涉及一种在受试者中诱导抗IL-4、IL-13或两者的免疫应答的方法,包括向受试者施用本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物。

[0307] 本发明进一步涉及一种在受试者中诱导生产抑制IL-4、IL-13或二者的生物学活性或中和IL-4、IL-13或二者的生物学活性的抗体的方法,包括向受试者施用本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物。在一个实施方案中,抗体是多克隆抗体。

[0308] 在一个实施方案中,受试者患有,优选被诊断有炎性病症,尤其是与异常的IL-4和/或IL-13表达或活性相关的病症。

[0309] 在一个实施方案中,受试者是人。优选地,根据该实施方案,本发明的免疫原性产品中包含的该至少一种细胞因子是人的。

[0310] 在一个实施方案中,受试者是非人哺乳动物(例如宠物)。优选地,根据该实施方案,本发明的免疫原性产品中包含的该至少一种细胞因子源自所述非人哺乳动物。

[0311] 在一个实施方案中,炎性病症是与异常的IL-4和/或IL-13表达或活性相关的病症。

[0312] 炎性病症的示例包括但不限于哮喘(变应性或非变应性的)、变应性病况(例如食物过敏反应、毒液过敏反应、对猫的过敏反应、药物过敏反应、高IgE综合征、变应性鼻炎、变应性结膜炎和变应性肠胃炎)、特应性病症(如特应性皮炎、荨麻疹(包括慢性特发性荨麻疹和慢性自发性荨麻疹)、湿疹)、大疱性天疱疮、呼吸系统病症(例如变应性和非变应性哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD))、鼻息肉病和其他涉及气道炎症的病况(例如嗜酸性粒细胞增多、纤维化和过多的粘液产生,包括囊性纤维化和肺纤维化、系统性硬化病(SSc));炎性和/或自身免疫病症或病况、胃肠道病症或病况(例如炎症肠疾病(IBD)和嗜酸性食管炎(eosinophilic esophagitis,EE)以及嗜酸性介导的胃肠道疾病(eosinophilic-mediated gastrointestinal disease)、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病和系统性红斑狼疮);系统性红斑狼疮、肝病或病况(例如肝硬化和肝细胞癌)、硬皮病;纤维化疾病或病症(例如肝纤维化(例如由乙型和/或丙型肝炎病毒引起的纤维化))、硬皮病;实体瘤或癌症,例如白血病(例如B细胞慢性淋巴细胞性白血病)、胶质母细胞瘤、淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤)和肥大细胞

增多症。

[0313] 在一个实施方案中,炎性病症选自包含以下的组:哮喘(例如变应性哮喘)、特应性皮炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺纤维化、食物过敏反应,鼻息肉病和嗜酸性食管炎。

[0314] 在一个实施方案中,炎性病症选自包含以下的组:哮喘(例如变应性哮喘)、特应性皮炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺纤维化和食物过敏反应。

[0315] 在一个实施方案中,炎性病症是过敏反应、哮喘或特应性皮炎。

[0316] 在一个实施方案中,炎性病症是变应性哮喘。

[0317] 在一个实施方案中,炎性病症是实体瘤。在一个实施方案中,本发明的方法用于预防实体瘤转移。

[0318] 本发明进一步涉及一种诱导对特定抗原变态反应的受试者脱敏的方法,其中所述方法包括向受试者施用本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物和所述变应原。

[0319] 如本文所用,术语“脱敏”,也称为变应原免疫疗法、脱敏或低敏化(hypo-sensitization)或过敏反应疫苗接种,是指针对环境性过敏反应例如变应性哮喘的药物治疗。这种治疗涉及使人们暴露于越来越大量的变应原,以试图在变应原存在下减少免疫系统的应答。

[0320] 变应原的示例包括但不限于吸入性变应原、摄入性变应原和接触性变应原。

[0321] 吸入性变应原的示例包括但不限于来自无气门亚目(Astigmata)的变应原(例如粗足粉螨(Acarus siro)(贮藏螨(Storage mite),Aca s 13)、热带无爪螨(Blomia tropicalis)(螨虫,Blo t)、美洲尘螨(Dermatophagoides farinae)(美国房尘螨(american house dust mite),Der f)、微角尘螨(Dermatophagoides microceras)(房尘螨(house dust mite),Der m)、屋尘螨(Dermatophagoides pteronyssinus)(欧洲房尘螨(European house dust mite),Der p)、梅氏嗜霉螨(Euroglyphus maynei)(房尘螨,Eur m)、家食甜螨(Glycyphagus domesticus)(贮藏螨,Gly d 2)、害鳞嗜螨(Lepidoglyphus destructor)(贮藏螨,Lep d)、腐食酪螨(Tyrophagus putrescentiae)(贮藏螨,Tyr p)); 蜚蠊目(例如德国小蠊(Blattella germanica)(德国蜚蠊(German cockroach),Bla g)、美洲大蠊(Periplaneta americana)(美洲蜚蠊(American cockroach),Per a)); 鞘翅目(例如异色瓢虫(Harmonia axyridis)(亚洲瓢虫,Har a)、双翅目(例如,埃及伊蚊(Aedes aegypti)(黄热蚊(Yellow fever mosquito),Aed a)、花翅摇蚊(Chironomus kiiensis)(摇蚊(Midge),Chi k)、Chironomus thummi thummi(摇蚊(Midge),Chi t)、台湾蛭螳(Formicomyia taiwana)(螳(Biting midge),For t)、刺舌蝇(Glossina morsitans)(萨凡纳采采蝇(Savannah Tsetse fly),Glo m)、半翅目(Hemiptera):长锥蝽(Triatoma protracta)(加州接吻虫(California kissing bug),Tria p))、膜翅目(例如中华蜜蜂(Apis cerana)(东方蜂(Eastern hive bee),Api c)、大蜜蜂(Apis dorsata)(巨型蜜蜂(Giant honeybee),Api d)、西方蜂(Apis mellifera)(蜜蜂,Api m)、Bombus pennsylvanicus(熊蜂(Bumble bee),Bom p)、欧洲熊蜂(Bombus terrestris)(熊蜂,Bom t)、长黄胡蜂(Dolichovespula arenaria)(大黄蜂(Yellow hornet),Dol a)、白脸长黄胡蜂(Dolichovespula maculata)(白脸大黄蜂(White face hornet),Dol m)、杰克跳蚁(Myrmecia pilosula)(澳大利亚跳蚁(Australian jumper ant),Myr p)、胡蜂(Polistes

annularis) (黄蜂(Wasp), Pol a)、造纸胡蜂(polistes dominulus) (地中海纸黄蜂(Mediterranean paper wasp), Pol d)、鸣黄蜂(Polistes exclamans) (黄蜂, Pol e)、北方纸巢蜂(Polistes fuscatus) (黄蜂, Pol f)、柞蚕马蜂(Polistes gallicus) (黄蜂, Pol g)、长足胡蜂(Polistes metricus) (黄蜂, Pol m)、Polybia paulista (黄蜂, Pol p)、Polybia scutellaris (黄蜂, Pol s)、热带火蚁(Solenopsis geminata) (热带火蚁(Tropical fire ant), Sol g)、红火蚁(Solenopsis invicta) (入侵红火蚁(Red imported fire ant), Sol i)、里氏火蚁(Solenopsis richteri) (黑火蚁(Black fire ant), Sol r)、残暴火蚁(Solenopsis saevissima) (巴西火蚁(Brazilian fire ant), Sol s)、黄边胡蜂(Vespa crabro) (欧洲大黄蜂(European hornet), Vesp c)、大虎头蜂(Vespa mandarinia) (亚洲巨大黄蜂(Giant asian hornet), Vesp m)、Vespula fiavopilosa (黄夹克(Yellow jacket), Vesp f)、德国黄胡蜂(Vespula germanica) (黄夹克, Vesp g)、额斑黄胡蜂(Vespula maculifrons) (黄夹克, Vesp m)、西部黄胡蜂(Vespula pensylvanica) (黄夹克, Vesp p)、南方黄胡蜂(Vespula squamosa) (黄夹克, Vesp s)、黄胡蜂(Vespula vidua) (黄蜂, Vesp vi)、大胡蜂(Vespula vulgaris) (黄夹克, Vesp v))、真蜱目(Ixodida) (例如, 卷边锐缘蜱(Argas reflexus) (鸽蜱(Pigeon tick), Arg r))、鳞翅目(Lepidoptera) (例如家蚕(Bombix mori) (蚕蛾(Silk moth), Bomb n)、印度谷斑螟(Plodia interpunctella) (印度谷螟(Indian meal moth), Plo i)、松异舟蛾(Thaumetopoea pityocampa) (松异舟蛾(Pine processionary moth), Tha p))、缨尾目(Thysanura) (例如蠹鱼(Lepisma saccharina) (银鱼((Silverfish), Lep s))、蚤目(Siphonaptera) (例如猫栉首蚤(Ctenocephalides felis felis) (猫蚤(Cat flea), Cte f))、食肉目(Carnivora) (例如家犬(Canis familiaris) (狗, Can f)、家猫(Felis domesticus) (猫, Fel d));兔形目(例如欧洲兔(Oryctolagus cuniculus) (兔, Ory c)、Perissodactyla:马(Equus caballus) (家养马, Equ c))、鲧形目(Pleuronectiformes) (例如帆鳞鲆(Lepidorhombus whiffiagonis) (帆鳞鲆(Megrim), Whiff, Gallo, Lep w))、啮齿目(例如豚鼠(Cavia porcellus) (豚鼠, Cav p)、小家鼠(Mus musculus) (小鼠, Mus m)、褐家鼠(Rattus norvegicus) (大鼠, Rat n));松柏目(Coniferales):台湾扁柏(Chamaecyparis obtusa) (日本扁柏(Japanese cypress), Cha o)、绿干柏(Cupressus arizonica) (柏, Cup a)、日本柳杉(Cryptomeria japonica) (日本柳杉(Sugi), Cry j)、地中海柏木(Cupressus sempervirens) (普通柏(Common cypress), Cup s)、Juniperus ashei (雪松(Mountain cedar), Jun a)、刺柏(Juniper oxycedrus) (刺桧(Prickly juniper), Jun o)、Juniperus sabinoides (雪松, Jun s)、北美圆柏(Juniperus virginiana) (东部红柏(Eastern red cedar), Jun v));龙胆目(Gentianales) (例如长春花(Catharanthus roseus) (紫长春花属(Rosy periwinkle), Cat r));禾本目(Poales) (例如黄花茅(Anthoxanthum odoratum) (甜春草(Sweet vernal grass), Ant o 1)、狗牙根(Cynodon dactylon) (百慕大草(Bermuda grass), Cyn d 1, Cyn d 7, Cyn d 12, Cyn d 15, Cyn d 22w, Cyn d 23, Cyn d 24)、果园草(Dactylis glomerata) (果园草(Orchard grass), Dae g 1, Dae g 2, Dae g 3, Dae g 4, Dae g 5)、草甸羊茅(Festuca pratensis) (牛尾草(Meadow fescue), Fes p 4)、绒毛草(Holcus lanatus) (天鹅绒草(Velvet grass), Hol l 1, Hol l 5)、大麦(Hordeum vulgare) (大麦(Barley), Hor v 1, Hor v 5, Hor v 12, Hor v 15, Hor v 16, Hor v 17, Hor v 21)、黑麦草(Lolium

perenne) (黑麦 (Rye grass), Lol p 1, Lol p 2, Lol p 3, Lol p 4, Lol p 5, Lol p 11)、水稻 (*Oryza sativa*) (稻, Ory s 1, Ory s 12)、百喜草 (*Paspalum notatum*) (巴哈雀稗 (Bahia grass), Pas n 1)、球茎草芦 (*Phalaris aquatica*) (金黄草 (Canary grass), Pha a 1, Pha a 5)、猫尾草 (*Phleum pratense*) (梯牧草 (Timothy), Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11, Phl p 12, Phl p 13)、草地早熟禾 (*Poa pratensis*) (肯塔基六月禾 (Kentucky blue grass), Poa p 1, Poa p 5)、黑麦属 (*Secale cereale*) (黑麦 (Rye), Sec c 1, Sec c 20)、石茅 (*Sorghum halepense*) (约翰逊草 (Johnson grass), Sor h 1)、普通小麦 (*Triticum aestivum*) (小麦, Tri a 12, Tri a 14, Tri a 185, Tri a 19, Tri a 25, Tri a 26, Tri a 27, Tri a 28, Tri a 29, Tri a 30)、玉米 (*Zea mays*) (玉米 (Maize), Zea m 1, Zea m 12, Zea m 14, Zea m 25)、壳斗目 (Fagales): 普通赤杨 (*Alnus glutinosa*) (赤杨 (Alder), Aln g 1, Aln g 4)、疣皮桦 (*Betula verrucosa*) (桦树 (Birch), Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 5, Bet v 6, Bet v 7)、*Carpinus betulus* (角树 (Hornbeam), Car b 1); 唇形目 (Lamiales) (例如欧洲白蜡树 (*Fraxinus excelsior*) (白蜡树 (Ash), Fra e 1)、普通女贞 (*Ligustrum vulgare*) (女贞 (Privet), Lig v)、紫丁香 (*Syringa vulgaris*) (丁香花 (Lilac), Syr v)); 金虎尾目 (Malpighiales) (例如巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) (帕拉胶树 (para rubber tree) (乳胶), Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10, Hev b 11, Hev b 12, Hev b 13)); 山龙眼目 (Proteales) (例如二球悬铃木 (*Platanus acerifolia*) (英国梧桐 (London plane tree), Pla a 1, Pla a 2, Pla a 3)、三球悬铃木 (*Platanus orientalis*) (法国梧桐 (Oriental plane), Pla or 1, Pla or 2, Pla or 3))。

[0322] 在一个实施方案中,吸入性变应原选自包含以下或由其组成的组:粗足粉螨 (贮藏螨, Aca s 13)、美洲尘螨 (美国房尘螨, Der f)、微角尘螨 (房尘螨, Der m)、屋尘螨 (欧洲房尘螨, Der p)、梅氏嗜霉螨 (房尘螨, Eur m)、家食甜螨 (贮藏螨, Gly d 2)、胡蜂 (黄蜂, Pol a)、造纸胡蜂 (地中海纸黄蜂, Pol d)、鸣黄蜂 (黄蜂, Pol e)、北方纸巢蜂 (黄蜂, Pol f)、柞蚕马蜂 (黄蜂, Pol g)、长足胡蜂 (黄蜂, Pol m)、*Polybia paulista* (黄蜂, Pol p)、*Polybia scutellaris* (黄蜂, Pol s)、家猫 (猫, Fel d)、禾本目和疣皮桦 (桦树, Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 5, Bet v 6, Bet v 7)。

[0323] 摄入性变应原的示例包括但不限于来自真菌子囊菌的变应原,例如座囊菌目 (Dothideales) (例如互隔交链孢霉 (*Alternaria alternata*) (链格孢腐菌 (*Alternaria rot fungus*), Alt a)、支孢样支孢霉 (*Cladosporium cladosporioides*) (Cla c)、草本支孢霉 (*Cladosporium herbarum*) (Cla h)、月牙弯孢菌 (*Curvularia lunata*) (Cur l)、-散囊菌目 (Eurotiales): 黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*) (Asp fl)、烟曲霉菌 (*Aspergillus fumigatus*) (Asp f)、黑曲霉菌 (*Aspergillus niger*) (Asp n)、米曲霉菌 (*Aspergillus oryzae*) (Asp o)、短密青霉菌 (*Penicillium brevicompactum*) (Pen b)、产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*) (Pen ch)、桔青霉菌 (*Penicillium citrinum*) (Pen c)、草酸青霉菌 (*Penicillium oxalicum*) (Pen o)、肉座菌目 (Hypocreales) (例如大刀镰刀菌 (*Fusarium culmorum*) (Fus c)); 甲爪团囊属 (Onygenales) (例如红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*) (Tri r)、断发毛癣菌 (*Trichophyton tonsurans*) (Tri t)、酵母目 (Saccharomycetales): 白色念珠菌 (*Candida albicans*) (酵母, Cand a)、博伊丁假丝酵母

(*Candida boidinii*) (酵母, Cand b); 瘤座孢目 (Tuberculariales) (例如黑附球菌 (*Epicoccum purpurascens*) (Epi p)), 来自真菌担子菌 (Fungi Basidiomycota) 的变应原, 例如层菌纲 (Hymenomycetes) (例如毛头鬼伞 (*Coprinus comatus*) (毛头鬼伞 (Shaggy mane), Cop c)、古巴光盖伞 (*Psilocybe cubensis*) (神奇蘑菇 (Magic mushroom), Psi c)、锈菌纲 (Urediniomycetes) (例如胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*) (酵母, Rho m)); 黑粉菌纲 (Ustilaginomycetes) (例如糠秕马拉色菌 (*Malassezia furfur*) (花斑糠疹感染 (Patriasis versicolor infect. Agent, Mala f), 合轴马拉色菌 (*Malassezia sympodialis*) (Mala s)); 抗生素 (例如青霉素、头孢菌素、氨基苷 (Aminoside)、喹诺酮类、大环内酯类、四环素、磺胺类 (Sulfamid)); 药物 (例如乙酰水杨酸、疫苗、吗啡及衍生物); 维生素, 例如维生素K1; 以及食物变应原 (例如来自奶、蛋、花生、树坚果 (核桃、腰果等)、鱼、贝类、大豆、小麦和胡萝卜、苹果、梨、鳄梨、杏、桃中的变应原)。

[0324] 在一个实施方案中, 摄入性变应原是食物变应原。

[0325] 在一个实施方案中, 食物变应原选自包含以下或由其组成的组: 来自奶、蛋、花生、树坚果 (核桃、腰果等)、鱼、贝类、大豆、小麦和胡萝卜、苹果、梨、鳄梨、杏、桃的变应原。

[0326] 接触性变应原的示例包括但不限于重金属 (例如镍、铬、金)、乳胶、半抗原如氟烷、胍苯吡嗪。

[0327] 在一个实施方案中, 变应原选自包含以下或由其组成的组: 粗足粉螨 (贮藏螨, Aca s 13)、美洲尘螨 (美国房尘螨, Der f)、微角尘螨 (房尘螨, Der m)、屋尘螨 (欧洲房尘螨, Der p)、梅氏嗜霉螨 (房尘螨, Eur m)、家食甜螨 (贮藏螨, Gly d 2)、胡蜂 (黄蜂, Pol a)、造纸胡蜂 (地中海纸黄蜂, Pol d)、鸣黄蜂 (黄蜂, Pol e)、北方纸巢蜂 (黄蜂, Pol f)、柞蚕马蜂 (黄蜂, Pol g)、长足胡蜂 (黄蜂, Pol m)、*Polybia paulista* (黄蜂, Pol p)、*Polybia scutellaris* (黄蜂, Pol s)、家猫 (猫, Fel d)、禾本目和疣皮桦 (桦树, Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 5, Bet v 6, Bet v 7) 和食物变应原。

[0328] 本发明还进一步涉及用于增加对特定变应原变态反应的受试者的脱敏的功效和/或减少其持续时间的方法, 其中通过脱敏治疗所述受试者, 并进一步施用本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物。

[0329] 在一个实施方案中, 在本发明的方法中, 首先向受试者施用本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物, 并且然后施用变应原。

[0330] 在一个实施方案中, 在本发明的方法中, 首先给受试者施用变应原, 并且然后施用本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物。

[0331] 在另一个实施方案中, 在本发明的方法中, 受试者接受本发明的免疫原性产品、组合物、药物组合物、药物或疫苗组合物和变应原的组合施用。

[0332] 本发明进一步涉及如上文所述的组合物、药物组合物、药物或疫苗, 其中所述组合物、药物组合物、药物或疫苗进一步包含至少一种变应原。

[0333] 在一个实施方案中, 向或将要向受试者施用治疗有效量的至少一种本发明的免疫原性产品。在一个实施方案中, 治疗有效量对应于使用本领域公知的Bradford蛋白测定法所确定的总蛋白量。

[0334] 在一个实施方案中, 将要向受试者施用的免疫原性产品的量诱导免疫保护应答而无显著不良作用。

[0335] 在一个实施方案中,将要向受试者施用的免疫原性产品的量诱导变应原脱敏而无显著不良作用。

[0336] 可以通过标准研究来确定本发明的免疫原性产品的最佳分量,包括观察受试者中适当的免疫应答。初次接种疫苗后,受试者可接受适当间隔的一次或多次加强免疫。

[0337] 在一个实施方案中,治疗由一段时间内的单个剂量或多个剂量组成。

[0338] 在本发明的一个实施方案中,一个月内向待治疗的受试者施用至少两次治疗有效量的如上所述的免疫原性产品。

[0339] 在本发明的另一个实施方案中,一个月内向待治疗的受试者施用两次治疗有效量的本发明的免疫原性产品。在这个实施方案中,可以在第0天向受试者施用一次,并在第7天至第28天之间施用第二次。在一个实施方案中,在第0天向受试者施用一次,并在第28天施用第二次。

[0340] 在本发明的另一个实施方案中,一个月内向待治疗的受试者施用三次治疗有效量的本发明的免疫原性产品。在这个实施方案中,可以在第0天向待治疗的受试者施用一次,并在第7天至第14天之间施用第二次,并在第21天至第28天之间施用第三次。在一个实施方案中,在第0天向受试者施用一次,并在第7天施用第二次,并在第28天施用第三次。

[0341] 在本发明的另一个实施方案中,可进一步每三个月向待治疗的受试者施用一次治疗有效量的本发明的免疫原性产品。

[0342] 在本发明的一个实施方案中,如上所述,在一个月内向待治疗的受试者施用三次,并且然后进一步每三个月施用一次治疗有效量的本发明的免疫原性产品。

[0343] 在本发明的另一个实施方案中,当获得自受试者的血清样品中检测不到抗IL-4的抗体量时,可进一步向受试者施用治疗有效量的如上所述的免疫原性产品。

[0344] 在本发明的另一个实施方案中,当获得自受试者的血清样品中检测不到抗IL-13的抗体量时,可进一步向受试者施用治疗有效量的如上所述的免疫原性产品。

[0345] 在本发明的另一个实施方案中,当获得自受试者的血清样品中检测不到抗IL-4和IL-13的抗体的量时,可进一步向受试者施用治疗有效量的如上所述的免疫原性产品。

[0346] 附图简要说明

[0347] 图1是通过添加硫醇-马来酰亚胺将sGMBS修饰的IL-4或IL-13和标记有SATA的载体蛋白进行化学偶联以用于制备本发明的免疫原性产品的方案。

[0348] 图2是显示 μ IL-4和 μ IL-13免疫原性产品的抗原性的组图。用抗CRM₁₉₇抗体(A、C)或抗KLH抗体(B、D)进行捕获,并用生物素化的多克隆抗 μ IL-4抗体(A、B)或生物素化的多克隆抗 μ IL-13抗体(C、D)进行检测。显示的OD值是二重实验的OD平均值。

[0349] 图3是Ba1b/c小鼠中免疫的研究方案。将均乳化于角鲨烯佐剂中的免疫原性产品(具有充当载体蛋白的CRM₁₉₇或KLH)、未偶联的 μ IL-4或 μ IL-13+CRM₁₉₇和仅CRM₁₉₇和PBS的四次免疫在第0、7、28和49天以i.m.注射到每组10只小鼠中,除了对照组仅5只小鼠。在给药之前和第39天以及第120天采集血液样品。

[0350] 图4是显示小鼠血清中的抗 μ IL-4(A)、抗 μ IL-13(B)、抗CRM₁₉₇(C)和抗KLH(D)抗体滴度的组图。每组十只小鼠用于免疫原性产品组中,且五只小鼠用于对照组中。条形代表中位数。

[0351] 图5是显示小鼠血清中的 μ IL-4中和能力的图。每组十只小鼠用于免疫原性产品

组中,且五只小鼠用于对照组中。条形代表中位数。

[0352] 图6是显示小鼠血清中的muIL-13中和能力的图。每组十只小鼠用于免疫原性产品组中,且五只小鼠用于对照组中。条形代表中位数。

[0353] 图7是Ba1b/c小鼠中免疫和哮喘致敏的研究方案。

[0354] 图8是显示小鼠血清中的抗muIL-4 (A) 和抗muIL-13 (B) 抗体滴度的组图。每组十二只小鼠。条形代表中位数。

[0355] 图9是显示小鼠血清中的muIL-4 (A) 和muIL-13 (B) 中和能力的组图。每组十二只小鼠。条形代表中位数。

[0356] 图10是显示对吸入的乙酰甲胆碱的气道高反应性的图。通过非侵入性全身体积描记法来测量增强的呼吸间歇 (Enhanced pause (Penh)) 值。每个HDM致敏的/攻毒的小鼠组使用7-8只小鼠,且PBS对照为n=16,来获得数据。*或**或***:相对于CRM197-HDM组, $P < 0.5$ 或0.1或0.001,使用未配对的Mann-Whitney U检验。

[0357] 图11是显示在疫苗接种前 (A) 和最后一次用HDM或PBS攻毒后24小时 (B) 收集的血清中的循环IgE水平的组图。每个HDM致敏的/攻毒的小鼠组使用7-8只小鼠,且PBS对照为n=16,来获得数据。***:相对于CRM₁₉₇-HDM组, $P < 0.001$,使用未配对的Mann-Whitney U检验。

[0358] 图12是显示最后一次用HDM攻毒后24小时收集的BAL中的CD45+细胞 (A) 和嗜酸性粒细胞 (B) 水平的组图。每个HDM致敏的/攻毒的小鼠组使用7-8只小鼠,且PBS对照为n=16,来获得数据。*或**或***:相对于CRM₁₉₇-HDM组, $P < 0.5$ 或0.1或0.001,使用未配对的Mann-Whitney U检验。

[0359] 图13是显示IL-4免疫原性产品 (A)、IL-13免疫原性产品 (B) 和组合的免疫原性产品 (A和B) 的抗原性的组图。使用抗CRM₁₉₇抗体进行捕获,并使用生物素化的多克隆抗huIL-4抗体 (A) 或生物素化的多克隆抗huIL-13抗体 (B) 进行检测。显示的OD值是二重实验的OD平均值。

[0360] 图14是Ba1b/c小鼠中免疫的研究方案。

[0361] 图15是显示小鼠血清中的抗IL-4 (A) 和抗IL-13 (B) 抗体滴度的组图。每组十只小鼠。条形代表中位数。

[0362] 图16是显示小鼠血清中的抗IL-4 (A) 和抗IL-13 (B) 中和能力的组图。每组十只小鼠。条形代表中位数。

[0363] 实施例

[0364] 通过以下实施例进一步说明本发明。

[0365] 本发明涉及使用CRM₁₉₇作为载体蛋白的免疫原性产品。通过以下实施例说明本发明的免疫原性产品的性质。另外,将本发明的产品与由KLH制备的免疫原性产品进行比较,以将本发明与现有技术区分开并显示其相对于现有技术的优越性。

[0366] CRM₁₉₇是白喉毒素的无毒形式,归因于在其毒素结构域中位置52处的甘氨酸到谷氨酸的单碱基取代而没有毒性 (Uchida等人1973J Biol Chem)。作为替代,还检测了在节肢动物和软体动物中发现的一种含铜蛋白-匙孔血蓝蛋白 (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH),并将其与CRM₁₉₇进行了比较。

[0367] 使用以下开发的制备过程生产本发明的免疫原性产品。

[0368] 采用硫醇-马来酰亚胺偶联来制备IL-4和IL-13免疫原性产品。将巯基部分引入具

有SATA的载体蛋白CRM₁₉₇中并随后进行羟胺脱保护,而通过含马来酰亚胺剂sGMBS将细胞因子muIL-4或muIL-13进行衍生化。SATA和sGMBS均是含有NHS-酯的异双功能交联剂,其可与伯胺(例如赖氨酸残基的ε-氨基和蛋白N-末端)反应。图1提供了经由硫醇-马来酰亚胺偶联来合成免疫原性产品的概述。

[0369] 实施例1:用两种载体蛋白制备本发明的鼠IL-4和IL-13免疫原性产品

[0370] a) 载体蛋白功能化

[0371] 将CRM₁₉₇或KLH稀释在包含70mM磷酸钠缓冲液、150mM NaCl、5mM EDTA (pH 7.2) 的修饰缓冲液中。将SATA稀释在DMSO中以达到100mM浓度。然后,将SATA添加到CRM₁₉₇或KLH中,并在室温下在摇床(nutator)上温育30分钟后,根据制造商的说明使用Zeba™脱盐离心柱去除过量的SATA。

[0372] 随后,将羟胺以500mM稀释在相同的缓冲液中。然后,将CRM₁₉₇-SATA或KLH-SATA和50mM终浓度的羟胺溶液一起在室温下在摇床上温育2小时。最后,将混合物脱盐并使用Zeba™脱盐离心柱去除过量的试剂。

[0373] b) muIL-4和muIL-13功能化

[0374] 将muIL-4或muIL-13溶解在修饰缓冲液(70mM磷酸钠缓冲液、150mM NaCl、5mM EDTA, pH 7.2)中。将sGMBS以10mM稀释在修饰缓冲液中。然后,将sGMBS添加到muIL-4或muIL-13中,并在室温下在摇床上温育1小时后,使用Zeba™脱盐离心柱去除过量的sGMBS。

[0375] c) 偶联

[0376] 在CRM₁₉₇、KLH、muIL-4和muIL-13功能化后,通过Bradford测定法确定每种制备物的蛋白含量。

[0377] 将功能化的CRM197或功能化的KLH分别以1:2(载体:muIL-4或载体:muIL-13)和1:20的摩尔比加入功能化的muIL-4或功能化的muIL-13中。基于KLH和CRM₁₉₇之间的分子量差异(CRM₁₉₇ ~ 58 kDa vs 该制备中使用的KLH亚基 ~ 400 kDa),并基于制造IFN免疫原性产品(一种目前在狼疮患者的IIb期临床试验(NCT02665364)评估中的疫苗)的先前经验,对KLH选择比例1:20,以允许在所有制备中混合相似量的细胞因子和载体。

[0378] 将单独的免疫原性产品制备物在4℃下在摇床上温育过夜。然后使用Amicon(3kDa截留膜)将所得的免疫原性产品浓缩,以0.22μm过滤,并保存在4℃下。

[0379] d) 对照(未偶联的细胞因子和CRM₁₉₇)

[0380] 作为对照,制备了两种无蛋白功能化的混合物(称为未偶联的细胞因子和CRM₁₉₇):

[0381] -以1:2的摩尔比(CRM₁₉₇:细胞因子)将muIL-4和CRM₁₉₇混合。以700μg/mL制备混合物,不使用任何偶联剂。

[0382] -以1:2的摩尔比(CRM₁₉₇:细胞因子)将muIL-13和CRM₁₉₇混合。以700μg/mL制备混合物,不使用任何偶联剂。

[0383] 两种混合物均以0.22μm过滤,并保存在4℃下。

[0384] e) 免疫原性产品的定量

[0385] 根据制造商的说明通过Coomassie Plus (Bradford) 蛋白测定法来确定muIL-4免疫原性产品和muIL-13免疫原性产品的浓度。

[0386] 实施例2:鼠产品的抗原性

[0387] 进行夹心ELISA以评估细胞因子与载体蛋白的偶联,并且还评估在制备过程中是

否保留了表位。

[0388] 简而言之,将捕获抗体(抗载体蛋白抗体)包被在96孔板上。在使用含2% (w/v) 酪蛋白的PBS进行封闭步骤后,添加免疫原性产品样品并进行2倍连续稀释。在37°C下温育90分钟后,使用生物素化的抗muIL-4抗体(多克隆山羊IgG抗muIL-4)或生物素化的抗muIL-13抗体(多克隆山羊IgG抗muIL-13)检测结合的免疫原性产品,并然后用抗生蛋白链菌素-HRP和OPD底物进行显示。使用硫酸终止酶促反应,并在490nm处读取光密度(OD)。结果如图2所示。

[0389] 该试验证实了本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇或KLH偶联的muIL-4或muIL-13。此外,这些结果证实了免疫原性产品是抗原性的(即被抗muIL-4或抗muIL-13抗体识别)。

[0390] 实施例3:免疫原性产品的免疫原性

[0391] 将免疫原性产品作为乳剂与角鲨烯基佐剂一起施用给小鼠。用PBS将免疫原性产品稀释至所需浓度,并将稀释液与等体积的佐剂混合。

[0392] 小鼠免疫方案

[0393] 每只Ba1b/c小鼠接受均用角鲨烯基佐剂乳化(1:1)的免疫原性产品(具有CRM₁₉₇或KLH)或对照例如PBS、未偶联的细胞因子加CRM₁₉₇或仅CRM₁₉₇的四次肌肉内(i.m.)注射。如表1和图3所详述,在第0、7、28和49天进行注射。在7周龄时进行首次免疫。

[0394] 表1:施用剂量时间表

	物品	每组小鼠数量	天数	剂量/注射 (μg)	佐剂
	muIL-4 免疫原性产品 (CRM ₁₉₇)	10	0 / 7 / 28 / 49	30 / 30 / 10 / 10	
	muIL-4 免疫原性产品 (KLH)	10	0 / 7 / 28 / 49	30 / 30 / 10 / 10	
	muIL-13 免疫原性产品 (CRM ₁₉₇)	10	0 / 7 / 28 / 49	30 / 30 / 10 / 10	
[0395]	muIL-13 免疫原性产品 (KLH)	10	0 / 7 / 28 / 49	30 / 30 / 10 / 10	
	未偶联的 muIL-4 + CRM ₁₉₇	5	0 / 7 / 28 / 49	30 / 30 / 10 / 10	角鲨烯水包 油佐剂
	未偶联的 muIL-13 + CRM ₁₉₇	5	0 / 7 / 28 / 49	30 / 30 / 10 / 10	
	CRM ₁₉₇	5	0 / 7 / 28 / 49	30 / 30 / 10 / 10	
	DPBS	5	0 / 7 / 28 / 49	-	

[0396] 在给药前以及第39、60和120天进行血液采集。在室温下凝血并离心以去除血块后,制备血清样品。在第120天通过致死性麻醉处死小鼠。

[0397] 通过ELISA确定抗细胞因子和抗载体蛋白抗体的滴度

[0398] 通过ELISA评估免疫小鼠的血清样品中抗细胞因子抗体和抗载体蛋白抗体的存在。

[0399] 简而言之,将muIL-4、muIL-13、CRM₁₉₇或KLH包被在96孔板上。用酪蛋白封闭后,添加血清样品,并进行两倍连续稀释。在37℃下温育后,用偶联HRP的抗小鼠IgG来检测结合的抗体,并使用OPD底物显示平板。用硫酸终止反应,并记录在490nm处的吸光度。

[0400] 用于抗muIL-4抗体、抗muIL-13抗体、抗KLH抗体和抗CRM₁₉₇抗体滴度的阳性对照分别是大鼠单克隆抗muIL-4IgG1抗体、小鼠单克隆抗muIL13抗体、收集自用KLH免疫的小鼠的血清池以及抗白喉毒素A小鼠单克隆IgG1。

[0401] 从500di1⁻¹稀释开始至256,000di1⁻¹对样品进行分析,除了仅在500di1⁻¹对免疫前血清进行分析之外。

[0402] 抗muIL-4、抗muIL-13、抗CRM₁₉₇和抗KLH滴度表达为导致最大OD的一半的血清稀释度。

[0403] 结果显示在图4中。在所有用免疫原性产品处理以及对于注射了佐剂化的DPBS或载体蛋白或未偶联的制备物的小鼠的组中,在给药前未检测到抗muIL-4、抗muIL-13、抗KLH和抗CRM₁₉₇。此外,在接受佐剂化的DPBS的小鼠中,在任何时间点均未检测到抗细胞因子或抗载体抗体。

[0404] 在第39、60和120天,在所有用CRM₁₉₇对照处理的组中以及在用未偶联的muIL-4+CRM₁₉₇或用未偶联的muIL-13+CRM₁₉₇处理的组中均检测到抗CRM₁₉₇滴度。在第39、60和120天,在所有由用CRM₁₉₇制备的免疫原性产品处理的组中均检测到抗muIL-4、抗muIL-13和抗CRM₁₉₇滴度。在第39、60和120天检测到抗muIL-4、抗muIL-13和抗KLH滴度,但不是在所有由用KLH制备的免疫原性产品处理过的组中的所有小鼠中。值得注意的是,由用CRM₁₉₇制备的免疫原性产品免疫的小鼠中的抗IL-4抗体水平高于由用KLH制备的免疫原性产品免疫的小鼠中的抗IL-4抗体水平。

[0405] muIL-4中和生物测定

[0406] 在使用改编自Soman等人,2009的CTLL-2细胞的增殖测定中进一步评估由施用muIL-4免疫原性产品诱导的抗体的抗muIL-4中和能力。简而言之,使CTLL-2细胞在补充有2mM谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、1mM HEPES、100单位/mL青霉素、100μg/ml链霉素和10% (v/v) FBS的RPMI中的终浓度为10ng/mL的IL-2的存在下生长。对于中和生物测定,用muIL-4替代IL-2。因此,在注射免疫原性产品后诱导的可能的中和性muIL-4抗体将阻止CTLL-2生长。

[0407] 以1/200的终浓度添加血清样品,并以1μg/mL的终浓度添加阳性对照多克隆抗muIL-4抗体,并2倍连续稀释于培养板中的每孔25μL RPMI+10% (v/v) FBS中。然后将muIL-4以2ng/mL的终浓度添加到血清样品中,并在室温下温育1小时。然后将20,000个CTLL-2细胞添加到预温育的样品(血清或阳性对照加muIL-4)中。将平板在37℃、5%CO₂下在湿润培养箱中温育48h。通过MTS/PMS测定法定量细胞活力。向每孔添加40微升MTS/PMS,并在37℃、5%CO₂下在湿润培养箱中4h后,读取490nm处的OD。

[0408] NC₅₀结果表达为在血清存在下中和50%的muIL-4活性的血清稀释因子(di1⁻¹)。通过将导致50%的IL-4活性的血清稀释度插值到横坐标轴上来确定NC₅₀。值得注意的是,如果NC₅₀≥200di1⁻¹,则在这个实验中将小鼠视为应答者(responder)。

[0409] 在给药前,没有小鼠表现出抗muIL-4中和抗体(图5和表2)。在对照组中,在任何时间点均未检测到具有中和能力的抗muIL-4抗体。对于用由CRM₁₉₇制备的免疫原性产品免疫的小鼠,在10只小鼠中有9只可检测到具有抗muIL-4的中和能力的抗体。相反,在用由KLH制备的免疫原性产品免疫的小鼠中,抗IL-4中和抗体的水平在任何时间点均低于当以CRM₁₉₇做为载体时观察到的水平,且较少的血清表现出中和抗体(在最佳时间点仅6个血清具有中和能力(在第120天))。这些结果表明,用由CRM₁₉₇制备的muIL-4免疫原性产品的处理比由KLH制备的偶联疫苗更具免疫原性。

[0410] 表2:针对IL-4的NC₅₀应答者

	muIL-4 免疫原性产品 (CRM ₁₉₇)				muIL-4 免疫原性产品 (KLH)				muIL-4 + CRM ₁₉₇ (未偶 联的)			
	D0	D39	D60	D120	D0	D39	D60	D120	D0	D39	D60	D120
[0411] 应答者 (NC50 > 200 dil-1)	0/10	5/10	7/10	9/10	0/10	2/10	4/10	6/10	0/5	0/5	0/5	0/5
	CRM ₁₉₇				PBS							
	D0	D39	D60	D120	D0	D39	D60	D120				
[0412] 应答者 (NC50 > 200 dil-1)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5				

[0413] muIL-13中和生物测定

[0414] 在给药前以及第39、60和120天,通过muIL-13中和生物测定法评估通过施用muIL-13免疫原性产品诱导的抗体的中和能力。

[0415] 使用HEK-BlueTMIL-4/IL-13报告基因生物测定法(InvivoGen#hkb-il413)通过监测STAT6通路激活来评估抗muIL-13抗体的中和能力。应答于该激活时,该细胞系产生可使用QUANTI-BlueTM(在λ=625nm处)进行定量的分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)。因此,在注射免疫原性产品后诱导的可能的中和性muIL-13抗体将阻止STAT6通路激活,并可以被评估。

[0416] 简而言之,将HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞接种在由补充有10% (v/v) FBS、10mM HEPES、50U/mL青霉素和50μg/mL链霉素的DMEM GlutaMAXTM组成的测定培养基中。然后,将muIL-13(终浓度为2ng/mL)以及以1/100终浓度开始的两倍连续稀释的血清样品或以1μg/mL终浓度开始的两倍连续稀释的对照抗体(多克隆山羊抗muIL-13抗体)的混合物添加到40,000个HEK-BlueTMIL-4/IL-13细胞中。在37°C下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育24h。然后,在新的平底平板中,将每孔10μL细胞上清液添加到每孔90μL的QUANTI-BlueTM中,并在37°C下在5%CO₂的湿润培养箱中1h后,读取625nm处的吸光度。

[0417] NC₅₀结果表达为在血清存在下中和50%的muIL-13活性的血清稀释因子(dil⁻¹)。通过将导致50%的IL-13活性的血清稀释度插值到横坐标轴上来确定NC₅₀。值得注意的是,如果NC₅₀ ≥ 100dil⁻¹,则在这个实验中将小鼠视为应答者。

[0418] 在任何时间点,在给药前的所有组以及对照组中均未检测到muIL-13中和抗体(图

6和表3)。用由CRM₁₉₇制备的免疫原性产品处理的小鼠产生了具有可检测到的抗muIL-13的中和能力的抗体(图6和表3)。在用由KLH制备的免疫原性产品免疫的小鼠中,没有小鼠血清表现出抗muIL-13的中和抗体。值得注意的是,在未偶联的muIL-13和CRM₁₉₇组中,如通过ELISA评估的,即使有一只小鼠表现抗muIL-13抗体(图4-B),这些抗体也不是中和抗体。这些结果证明,用由CRM₁₉₇制备的免疫原性产品的处理比由KLH制备的免疫原性产品更具免疫原性。

[0419] 表3:针对IL-13的NC₅₀应答者

	muIL-13 免疫原性产品 (CRM ₁₉₇)				muIL-13 免疫原性产品 (KLH)				muIL-13 + CRM ₁₉₇ (未偶联的)			
	D0	D39	D60	D120	D0	D39	D60	D120	D0	D39	D60	D120
[0420] 应答者 (NC50 > 100 dil-1)	0/10	5/10	4/10	5/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/5	0/5
	CRM ₁₉₇				PBS							
	D0	D39	D60	D120	D0	D39	D60	D120				
应答者 (NC50 > 100 dil-1)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5				

[0421] 如预期的,在任何时间点在CRM₁₉₇和DPBS对照组中均未检测到中和性抗muIL-4和抗muIL-13抗体。在将细胞因子和CRM₁₉₇混合而没有化学功能化(未偶联)的对照组中,免疫未引发抗muIL-4和抗muIL-13中和抗体,这突显了细胞因子与载体蛋白之间的偶联对于破坏B细胞对细胞因子的自身耐受是必不可少的。此外,对于用由KLH制备的免疫原性产品免疫的小鼠,未观察到抗IL-13中和抗体,而对于用由CRM₁₉₇制备的免疫原性产品免疫的小鼠,在10只小鼠中有5只可检测到具有抗muIL-13的中和能力的抗体。这些结果表明,用由CRM₁₉₇制备的muIL-13免疫原性产品的处理比由KLH制备的偶联疫苗更具免疫原性。

[0422] 实施例4:免疫原性产品的残余活性

[0423] muIL-4免疫原性产品的残余活性

[0424] 如下所述(改编自Soman等人,2009),评估了muIL-4免疫原性产品的残余活性。

[0425] 简而言之,使CTLL-2细胞在IL-2下生长。培养基由补充有终浓度为10ng/mL的IL-2和10% (v/v) FBS的RPMIc培养基组成。

[0426] 对于残余活性生物测定,用muIL-4替代IL-2。将本发明的免疫原性产品(含有CRM₁₉₇或KLH)和muIL-4对照两倍连续稀释在96孔板中的RPMI+10% (v/v) FBS中,免疫原性产品从1000ng/mL开始至4ng/mL,且muIL-4从10ng/mL开始至0.04ng/mL。作为阳性对照,添加了6个含有10ng/mL muIL-4的孔并用作最大细胞增殖对照。将这些样品添加到每孔20,000个CTLL-2细胞中,并将平板在37°C、5% CO₂下在湿润培养箱中温育48h。通过MTS/PMS测定法定量细胞增殖。每孔添加40微升MTS/PMS,并在37°C、5% CO₂下4小时后,读取490nm处的平板。

[0427] 有效剂量50 (ED₅₀) 值对应于导致最大细胞信号的50%的免疫原性产品或细胞因子

的量。该值通过使用 $y = ax + b$ 公式,从经过50%拐点周围的稀释点的曲线,最大细胞信号的50%插值到横坐标轴来确定的。

[0428] 通过将所测免疫原性产品的 ED_{50} 除以muIL-4对照标准曲线的平均 ED_{50} 来计算失活因子。

[0429] 表4: ED_{50} 和失活因子

	物品	ED_{50} [ng.mL ⁻¹]	muIL-4 对照 ED_{50} [ng.mL ⁻¹]	失活因子
[0430]	muIL-4 免疫原性产品(CRM ₁₉₇)	620.3	1.67	370
	muIL-4 免疫原性产品(KLH)	21.5	1.03	21

[0431] 如表4所示,muIL-4残余活性在用CRM₁₉₇制备的免疫原性产品中相比于用KLH制备的免疫原性产品降低更多(用CRM₁₉₇制备的muIL-4免疫原性产品的失活因子高得多)。

[0432] muIL-13免疫原性产品的残余活性

[0433] 如下所述使用HEK-BlueTM IL-4/IL-13报告细胞系监测muIL-13免疫原性产品的残余活性。

[0434] 简而言之,将muIL-13免疫原性产品和muIL-13对照两倍连续稀释在圆底平板中的测定培养基(DMEM、10% (v/v) FBS、10mM HEPES缓冲液、50U/mL青霉素、50μg/mL链霉素)中,分别以250ng/mL和10ng/mL的终浓度开始。将这些混合物添加到每孔40,000个HEK-BlueTM IL-4/IL-13细胞中。在37°C下将平板在5%CO₂的湿润培养箱中温育24h。然后,在新的平底平板中,将每孔10μL培养上清液添加到每孔90μL的QUANTI-BlueTM中,并在37°C下在5%CO₂的湿润培养箱中1h后,读取625nm处的OD。

[0435] 有效剂量50 (ED_{50}) 值,对应于导致对所考虑样品记录的最大信号的50%的免疫原性产品(或IL-13)的量,其可通过使用来自全部稀释点的四参数对数(4PL)非线性回归将 $OD_{max}/2$ 值插值到相应的样品浓度来确定。

[0436] 通过将muIL-13免疫原性产品的 ED_{50} 除以muIL-13对照标准曲线的对应 ED_{50} 来计算失活因子。

[0437] 表5: ED_{50} 和失活因子

	物品	ED_{50} [ng.mL ⁻¹]	muIL-13 对照 ED_{50} [ng.mL ⁻¹]	失活因子
[0438]	muIL-13 免疫原性产品(CRM ₁₉₇)	737	0.31	2369
	muIL-13 免疫原性产品(KLH)	297	0.41	723

[0439] 如表5所示,muIL-13残余活性在用CRM₁₉₇制备的免疫原性产品中相比于用KLH制备的免疫原性产品降低更多(用CRM₁₉₇制备的muIL-13免疫原性产品的失活因子高得多)。

[0440] 与用KLH作为载体制备的免疫原性产品相比,当免疫原性产品由CRM₁₉₇制备时,针

对抗IL-4和抗IL-13的免疫应答的强度更高。此外,相比于用KLH制备的免疫原性产品,用CRM₁₉₇制备的免疫原性产品中的细胞因子残余活性降低更多。根据这些结果,我们决定对使用CRM₁₉₇作为载体蛋白制备的本发明的产品进行概念验证。此外,在过敏反应中,IL-4和IL-13均参与,因此我们决定引入一组将接受包含具有CRM₁₉₇的IL-4和IL-13偶联物的免疫原性产品的小鼠。从现在开始,将使用CRM₁₉₇作为载体蛋白来制备所有免疫原性产品,且它们的混合物将被称为组合的免疫原性产品。

[0441] 实施例5:本发明的免疫原性产品在变应性小鼠模型中的功效

[0442] 在所有过敏反应中,变应性哮喘和食物过敏反应是主要的公共卫生问题,目前分别影响全球3亿多人。过敏反应被认为是由于耐受性破坏引起的,导致以产生TH2细胞因子如IL-4和IL-13、高水平的IgE抗体以及发炎组织内免疫细胞(尤其是肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和T细胞)的浸润和扩张为特征的2型免疫应答。

[0443] 房尘螨(HDM)是变应原的主要来源,其影响超过50%的变应性患者(Meyer等人,1994)。在小鼠中,用HDM鼻内反复攻毒会重现人慢性哮喘的关键特征,包括气道高反应性(AHR)、气流阻塞、气道壁重塑、粘液产生和以高水平嗜酸性粒细胞为特征的肺部炎症反应。

[0444] 制备muIL-4/IL-13免疫原性产品

[0445] a) CRM₁₉₇的功能化

[0446] 将CRM₁₉₇稀释在包含70mM磷酸钠缓冲液、150mM NaCl、5mM EDTA(pH 7.2)的修饰缓冲液中。将SATA稀释在DMSO中以达到100mM浓度。然后,将SATA添加到CRM₁₉₇中,并在室温下在摇床上温育30分钟后,根据制造商的说明使用Zeba™脱盐离心柱去除过量的SATA。

[0447] 随后,将羟胺以500mM稀释在相同缓冲液中。然后,将CRM₁₉₇-SATA与50mM终浓度的羟胺溶液一起在室温下在摇床上温育2小时。最后,将混合物脱盐并使用Zeba™脱盐离心柱去除过量的试剂。

[0448] b) muIL-4和muIL-13的功能化

[0449] 将muIL-4溶解在修饰缓冲液(70mM磷酸钠缓冲液,150mM NaCl,5mM EDTA,pH 7.2)中。将sGMBS以10mM稀释在修饰缓冲液中。然后,将sGMBS添加到muIL-4中,并在室温下在摇床上温育1小时后,使用Zeba™脱盐离心柱去除过量的sGMBS。

[0450] 将muIL-13溶解在修饰缓冲液(70mM磷酸钠缓冲液,150mM NaCl,5mM EDTA,pH 7.2)中。将sGMBS以10mM稀释在修饰缓冲液中。然后,将sGMBS添加到muIL-13中,并在室温下在摇床上温育1小时后,使用Zeba™脱盐离心柱去除过量的sGMBS。

[0451] c) 偶联

[0452] 在CRM₁₉₇、muIL-4和muIL-13的功能化后,通过Bradford测定法确定每种制备物的蛋白含量。

[0453] 将功能化的CRM197以1:2(载体:muIL-4)和1:4(或载体:muIL-13)的摩尔比添加到功能化的muIL-4或功能化的muIL-13中。将单独的免疫原性产品制备物在4℃下在摇床上温育过夜。然后使用Amicon(3kDa截留膜)将所得的免疫原性产品浓缩,以0.22μm过滤,并保存在4℃下。

[0454] d) 免疫原性产品的定量

[0455] 根据制造商的说明通过Coomassie Plus(Bradford)蛋白测定法确定muIL-4免疫原性产品和muIL-13免疫原性产品的浓度。

[0456] muCombo免疫原性产品的制备

[0457] 在浓缩步骤和0.22 μ m无菌过滤步骤之后,以1-1重量比将独立合成的muIL-4免疫原性产品和muIL-13免疫原性产品混合在一起,并将所得的muCombo免疫原性产品保存在4 $^{\circ}$ C下。

[0458] 小鼠免疫,变应性哮喘规程和血液采样

[0459] 每只Ba1b/c小鼠在第0、7、28和55天接受均用角鲨烯基佐剂乳化的仅免疫原性产品或muCombo免疫原性产品或仅CRM₁₉₇ (作为对照)的四次肌肉内(i.m.)注射,如表6和图7详述。在7周龄时对小鼠进行首次免疫。

[0460] 表6:施用剂量时间表

	物品	每组小鼠数 量	天数	剂量(μ g)	佐剂
	muIL-4 免疫原性产品	12	0 / 7 / 28 / 55	30 / 30 / 10 / 10	
[0461]	muIL-13 免疫原性产品	12	0 / 7 / 28 / 55	30 / 30 / 10 / 10	角鲨烯水包油佐剂
	muCombo 免疫原性产品	12	0 / 7 / 28 / 55	30 / 30 / 10 / 10	
	CRM ₁₉₇	12	0 / 7 / 28 / 55	15 / 15 / 5 / 5	

[0462] 在首次免疫原性产品免疫后的第39天,通过在第39、43和46天的三次来自美洲尘螨(Dermatophagoides farinae) (购自Greer)的100 μ g HDM的鼻内注射在小鼠中诱发慢性气道炎症。从第50天开始,使小鼠每周用两次25 μ g HDM的鼻内注射进行攻毒(共攻毒9次)。

[0463] 在给药前7天,第39、64天和最后一次HDM攻毒后24小时(小鼠处死)进行血液采集。如前所述制备血清样品,并保存在-20 $^{\circ}$ C下直至分析。

[0464] 在这项研究中评估了以下:

[0465] -通过ELISA和生物测定法评估的所注射产品的免疫原性,

[0466] -通过全身体积描记法测量的气道高反应性(AHR),

[0467] -生物标志物:通过ELISA评估的血清中的循环IgE水平,通过FACS分析和气道组织学以及炎性细胞浸润评估肺和支气管肺泡灌洗液(BAL)中的气道炎症。

[0468] a) 通过ELISA和生物测定法评估的注射产品的免疫原性

[0469] 通过ELISA(如上所述)从收集自四个处理组中的小鼠血清中测量抗muIL-4和抗muIL-13的抗体滴度。

[0470] 在所有时间点的给药前的所有组中以及接受CRM₁₉₇的组中均未检测到细胞因子抗体滴度。在muIL-4免疫原性产品和muCombo免疫原性产品免疫后的所有时间点,在所有小鼠中均检测到抗muIL-4抗体滴度(图8-A)。在接受muIL-4免疫原性产品的小鼠中观察到与muCombo免疫原性产品相比更高的水平。在muIL-13免疫原性产品组中,从D39开始在小鼠中检测到抗muIL-13抗体滴度,并且在D65时在100%的应答小鼠(responding mice)中检测到(图8-B)。在muCombo免疫原性产品组中,最早在D39时也检测到抗muIL-13抗体,并且在D65时在12只应答小鼠中有9只检测到。总体而言,如预期的,用muIL-4和muIL-13免疫原性产品免疫后的血清中观察到的抗体滴度高于用muCombo免疫原性产品的,因为muCombo组中的小鼠接受了一半的单独的免疫原性产品剂量(图14)。

[0471] 如上所述,使用两种不同的生物测定法在体外评估每种免疫原性产品的中和活

性。值得注意的是,如果IL-4的 $NC_{50} \geq 200 \text{dil}^{-1}$,且IL-13的 $NC_{50} \geq 100 \text{dil}^{-1}$,则在此实验中将小鼠视为应答者。

[0472] 在至少一个时间点,分别在12只的 $n=11$ 或12只的 $n=9$ 中,在用muIL-4免疫原性产品和muCombo免疫原性产品免疫的小鼠中观察到高的抗muIL-4的中和能力(图9-A和表7)。

[0473] 表7:针对IL-4的 NC_{50} 应答者

	muIL-4 免疫原性产品			muCombo 免疫原性产品			CRM ₁₉₇		
	D0	D39	D65	D0	D39	D65	D0	D39	D65
[0474] 应答者 ($NC_{50} > 200$ dil-1)	0/12	10/12	11/12	0/12	7/12	9/12	0/12	0/12	0/12

[0475] 有趣的是,在用muIL-4或muCombo免疫原性产品免疫后一年,在小鼠中仍检测到抗IL-4抗体(数据未显示)。

[0476] 在至少一个时间点,分别在12只的 $n=10$ 或12只的 $n=7$ 中诱导了在用muIL-13免疫原性产品和muCombo免疫原性产品免疫的小鼠中的抗muIL-13中和能力(图9-B和表8)。

[0477] 表8:针对IL-13的 NC_{50} 应答者

	muIL-13 免疫原性产品			muCombo 免疫原性产品			CRM ₁₉₇		
	D0	D39	D65	D0	D39	D65	D0	D39	D65
[0478] 应答者 ($NC_{50} >$ 100 dil-1)	0/12	8/12	10/12	0/12	3/12	7/12	0/12	0/12	0/12

[0479] 有趣的是,用muIL-13或muCombo免疫原性产品免疫后一年,在小鼠中仍检测到抗IL-13抗体(数据未显示)。

[0480] 值得注意的是,未事先化学偶联的muIL-4和/或muIL-13和CRM₁₉₇的共同注射未引起抗IL-4和抗IL-13抗体,这突显了细胞因子与载体蛋白之间的偶联是破坏B细胞对细胞因子的自身耐受所必需的。

[0481] 免疫后产生了不同类别的抗IL-4和抗IL-13抗体(尤其包括IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgE和IgM),主要是IgG1(数据未显示)。

[0482] b) 通过全身体积描记法测量的气道高反应性(AHR)

[0483] 最后一次攻毒后二十四小时,通过全身体积描记法评估AHR。在清醒的小鼠中测量对乙酰甲胆碱(一种支气管收缩剂)的应答。

[0484] 通过气雾剂施用不同剂量的乙酰甲胆碱:0mg/mL、3.5mg/mL、7mg/mL和14mg/mL。增强的呼吸间歇(Penh)已用于评估肺功能的变化(Hamelmann等人,1997)。该量度概念化了胸腔流量和鼻腔流量曲线之间的相移:相移增加与呼吸系统阻力增加相关。通过公式 $Penh = (Te/RT - 1) \times PEF/PIF$ 计算Penh,其中Te是呼气时间,RT是松弛时间,PEF是峰值呼气流量,且PIF是峰值吸气流量。在每次乙酰甲胆碱攻毒后的5分钟内记录Penh值,并在图中记录期间的最大值。

[0485] 在CRM₁₉₇对照组中观察到由HDM致敏的小鼠中的高度支气管狭窄(bronchoconstriction)(图10)。muIL-13免疫原性产品和muIL-4免疫原性产品部分抑制了

支气管狭窄,而在用muCombo免疫原性产品免疫的小鼠中支气管狭窄几乎被消除,显示出本发明产品的高保护作用。实际上,在muCombo组中观察到的残余支气管狭窄水平与在未由HDM致敏的小鼠中观察到的水平相似(图10中的圆圈)。

[0486] 使用侵入性气道反应测量证实了这些结果。实际上,与经PBS处理的对照组相比,经HDM处理的对照组小鼠在乙酰甲胆碱攻毒后显现出肺抗性和弹性的显著提高,而在经muIL-4、muIL-13或muCombo免疫原性产品处理的小鼠中,这两个特征部分降低(数据未显示)。

[0487] 总之,这些结果表明,抗IL-4和IL-13的双重疫苗接种可以阻断AHR。

[0488] c) 生物标志物

[0489] 通过ELISA评估的血清中的循环IgE水平

[0490] 在免疫原性产品疫苗接种之前和最后一次HDM攻毒后24小时,按照制造商的说明通过ELISA(Mouse IgE ELISA Quantitation Set, Bethyl Labs E90-115)测量总循环IgE水平(图11)。

[0491] 疫苗接种前未检测到循环IgE。在最后一次HDM攻毒后24小时,归因于HDM致敏而诱导了总循环IgE(图11-B)。该水平在所有接受免疫原性产品的组中降低,证明了本发明的产品相比于CRM₁₉₇免疫的小鼠的保护作用。值得注意的是,当通过ELISA仅测量对HDM特异的IgE时,获得相似的结果(数据未显示)。

[0492] 经HDM处理的小鼠也表现出对HDM特异的IgG抗体水平提高。但是,这些水平不受muIL-4和/或muIL-13免疫原性产品处理的影响(数据未显示)。

[0493] 肺和支气管肺泡灌洗液(BAL)中的气道炎症

[0494] 对由HDM或PBS致敏的小鼠的肺和支气管肺泡灌洗液(BAL)中的细胞变化进行了详细的时程分析。

[0495] 根据制造商的说明,使用以下抗体(表9)通过FACS对来自BAL的炎性细胞进行分析:CD45-FITC、Ly6G-PE、CD11b-VG、SiglecF-PECy7、B220-APC和CD3-APC。

[0496]

抗体	供应商-目录号(克隆)
Ly6G-PE	BD Pharmingen-561104(克隆1A8,大鼠IgG _{2a} ,κ)
CD3-APC	BD Pharmingen-561826(克隆145-2C11,亚美尼亚仓鼠IgG1,κ)
CD45-FITC	Miltenyi 130-110-658(克隆REA737,重组人IgG1)
SiglecF-PECy7	Miltenyi 130-112-334(克隆REA798,重组人IgG1)
CD11b-VG	Miltenyi 130-110-559(克隆REA713,重组人IgG1)
B220-APC	Miltenyi 130-102-259(克隆RA3-6B2,大鼠IgG2aκ)

[0497] 在对照小鼠的肺中,与经PBS处理的动物相比,慢性鼻内暴露于HDM导致主要由嗜酸性粒细胞(CD45⁺、Ly6G⁻、CD11b⁺、SiglecF⁺)组成的造血起源的CD45⁺细胞浸润的数量显著增加(数据未显示)。有趣的是,免疫原性产品的疫苗接种阻止了CD45⁺浸润细胞中的嗜酸性粒细胞浸润,尤其是在表现出统计学上显著下降的muCombo免疫原性产品组中。

[0498] 在支气管肺泡灌洗液中,HDM致敏导致炎症反应,其特征主要在于主要由嗜酸性粒细胞(CD45⁺、Ly6G⁻、CD11b⁺、SiglecF⁺)组成的造血起源的CD45⁺细胞浸润(图12)。有趣的是,免疫原性产品的疫苗接种阻止了CD45⁺浸润细胞中的嗜酸性粒细胞浸润,尤其是在表现出统计学上显著下降的muCombo免疫原性产品组中。

[0499] 有趣的是,本发明的免疫原性产品的疫苗接种对血液中的嗜酸性粒细胞水平没有影响(数据未显示),这表明在经疫苗接种的小鼠中观察到的气道嗜酸性粒细胞减少是嗜酸性粒细胞向肺部的募集减少而不是对嗜酸性粒细胞或嗜酸性粒细胞祖细胞数量的全身性作用的结果。

[0500] 气道组织学

[0501] 通过组织学分析检查了致敏和疫苗接种对气道的影响。简而言之,在死后切除左肺,在室温下用4%PFA固定24h,并保存在70%乙醇中。进行纵向切片,并用以下染色:

[0502] -苏木精和曙红(H&E),用于评估白细胞浸润,

[0503] -甲苯胺蓝,用于定量肥大细胞数量,或

[0504] -高碘酸希夫(PAS)染色,用于评估杯状细胞增生和粘液产生。

[0505] 在全球范围内,这些肺组织学分析证实,与未经疫苗接种的经HDM处理的动物相比,对经HDM处理的动物进行muIL-4、muIL-13或muCombo免疫原性产品的疫苗接种显著减少白细胞和上皮内肥大细胞的数量(数据未显示)。

[0506] PAS组织学分析还证实,与未经疫苗接种的经HDM处理的动物相比,对经HDM处理的动物进行muIL-4、muIL-13或muCombo免疫原性产品的疫苗接种显著降低杯状细胞增生/粘液分泌(数据未显示)。这些结果支持了免疫原性产品(尤其是muIL-13和muCombo免疫原性产品)可以控制由HDM致敏诱导的粘液过度分泌。

[0507] 总之,我们已经证明了由CRM₁₉₇制备的本发明产品是免疫原性的,并且无论是单独注射还是组合注射(muCombo免疫原性产品)均会诱导抗细胞因子中和抗体。抗细胞因子中和抗体的存在与HDM诱导的AHR的降低有关,其通过吸入乙酰甲胆碱后的Penh值测量得到。此外,这些抗细胞因子中和抗体能够限制循环IgE水平以及肺中的肥大细胞数量和气道中的嗜酸性粒细胞浸润。

[0508] 因此,这些结果证明,本发明的免疫原性产品能够破坏B细胞对IL-4和IL-13的耐受,并且表明这些免疫原性产品可以代表在对哮喘和/或过敏反应的治疗中有前景的新治疗策略,且尤其是在对变应性哮喘的治疗中。

[0509] 有趣的是,单独的免疫原性产品是有活性的,但当将免疫原性产品组合(muCombo免疫原性产品)时观察到对哮喘和/或过敏反应症状(且尤其是对变应性哮喘症状)以及生物标志物的优异的有益作用。

[0510] 实施例6:本发明的人免疫原性产品的制备

[0511] 按照与上述相同的制备过程,使用人细胞因子IL-4和IL-13代替鼠细胞因子,进行人IL-4免疫原性产品、IL-13免疫原性产品和组合免疫原性产品的制备。

[0512] IL-4和IL-13免疫原性产品的制备

[0513] a) CRM₁₉₇的功能化

[0514] 如对鼠产品所述地进行CRM₁₉₇的功能化。

[0515] b) IL-4和IL-13的功能化

[0516] 使溶解在缓冲液(70mM磷酸钠缓冲液,150mM NaCl,5mM EDTA,pH 7.2)中的IL-4或IL-13与先前以10mM浓度溶解在缓冲液中的sGMBS反应。在室温温和搅拌下反应一小时后,用Zeba脱盐柱去除过量的sGMBS。

[0517] c) 偶联

[0518] 在CRM₁₉₇、IL-4和IL-13的功能化后,通过Bradford测定法确定每种制备物的蛋白含量。以1:4的摩尔比(载体:IL-4或载体:IL-13)将功能化的CRM₁₉₇添加到功能化的IL-4或功能化的IL-13中。在4℃下将单独的免疫原性产品制备物在摇床上温育过夜。将偶联物送入脱盐柱以去除来自先前步骤的可能杂质,例如残余的羟胺。将得到的免疫原性产品浓缩,并通过0.22μm的过滤器过滤,并保存在4℃下。

[0519] 组合的免疫原性产品的制备

[0520] 可以使用以下两种不同的方法进行组合的免疫原性产品的制备:通过将两种修饰的细胞因子共同与修饰的载体蛋白一起温育(同时合成),或者通过将两种独立合成的IL-4和IL-13免疫原性产品混合(混合制备)。

[0521] 经由同时合成的组合免疫原性产品制备

[0522] a) CRM₁₉₇的功能化

[0523] 如对鼠产品所述地进行CRM₁₉₇的功能化。

[0524] b) IL-4和IL-13的功能化

[0525] 如单独的免疫原性产品制备所述地进行IL-4或IL-13的功能化。

[0526] c) 偶联

[0527] 在CRM₁₉₇、IL-4和IL-13的功能化后,通过Bradford测定法确定每种制备物的蛋白含量。将磷酸盐缓冲液,150mM NaCl,5mM EDTA,pH 7.2中的所有三种修饰蛋白以2-2-1的IL-4-IL-13-CRM₁₉₇摩尔比混合。在4℃下过夜进行反应。将偶联物送入脱盐柱以去除来自先前步骤的可能杂质,例如残余的羟胺。将得到的免疫原性产品浓缩,并通过0.22μm的过滤器过滤,并保存在4℃下。

[0528] 经由混合制备的组合的免疫原性产品制备

[0529] 在浓缩步骤和0.22μm无菌过滤步骤后,将独立合成的IL-4和IL-13免疫原性产品以1-1的重量比混合在一起。将组合的免疫原性产品保存在4℃下直至使用。

[0530] 实施例7:人产品的抗原性

[0531] 进行夹心ELISA以评估细胞因子与载体蛋白的偶联,并且还评估在制备过程中是否保留了表位。使用的规程与上述的规程相同,使用生物素化的抗人IL-4和IL-13抗体。

[0532] 结果显示在图13中。该试验证实了本发明的免疫原性产品包含与CRM₁₉₇偶联的IL-4或IL-13。此外,这些结果证实了免疫原性产品是抗原性的(即,被抗IL-4或抗IL-13抗体识别),组合的免疫原性产品也一样。

[0533] 实施例8:人产品的免疫原性

[0534] 小鼠免疫规程

[0535] 每只Ba1b/c小鼠(每组10只小鼠)在第0、7、28和49天接受四次用角鲨烯佐剂乳化的免疫原性产品的肌肉内(i.m.)注射,均以4μg剂量进行,如图14详述。在7周龄时进行首次免疫。在给药之前以及在第38、59、90和120天进行血液采集。在室温下凝血并离心以去除血块后,制备血清样品。

[0536] 通过ELISA确定抗IL4和抗IL-13抗体滴度

[0537] 通过ELISA测量收集自每组的小鼠血清中的抗细胞因子抗体滴度。

[0538] 如上所述,通过将人IL-4和IL-13包被在96孔板上,来评估用免疫原性产品或组合免疫原性产品免疫后的血清中每种抗体滴度的确定。

[0539] 在给药前在所有组中均未检测到细胞因子抗体滴度。在用IL-4免疫原性产品和muCombo免疫原性产品免疫后的所有时间点,在所有小鼠中均检测到抗IL-4抗体滴度(图15-A)。在接受IL-4免疫原性产品和组合的免疫原性产品的小鼠中观察到相似的水平,表明我们可能已经到达免疫应答的平台。在IL-13免疫原性产品组中免疫后的所有时间点在所有小鼠中均检测到抗IL-13抗体滴度(图15-B)。在组合的免疫原性产品组中,最早在D38时,且在D59的10只小鼠中的8只中检测到抗IL-13抗体。在用IL-13免疫原性产品免疫后的血清中观察到的抗IL-13抗体滴度高于用组合的免疫原性产品时,因为组合组的小鼠接受了一半的单独的免疫原性产品剂量。

[0540] 确定免疫后的中和能力

[0541] 如上所述,使用HEK-Blue™ IL-4/IL-13报告细胞系评估抗IL-4和抗IL-13的中和能力。值得注意的是,在本实验中,如果IL-4的 $NC_{50} \geq 200 \text{dil}^{-1}$ 且IL-13的 $NC_{50} \geq 100 \text{dil}^{-1}$,则将小鼠视为应答者。

[0542] 在免疫后的所有时间点,在用IL-4免疫原性产品和组合的免疫原性产品免疫的组中观察到100%的应答小鼠均具有高的抗IL-4的中和能力(图16-A和表10)。

[0543] 表10:针对IL-4的 NC_{50} 应答者

[0544]	IL-4 免疫原性产品					组合的免疫原性产品					
	D0	D38	D59	D90	D120	D0	D38	D59	D90	D120	
[0545]	应答者 ($NC_{50} > 200$ dil-1)	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10

[0546] 在用IL-13免疫原性产品和组合的免疫原性产品免疫的小鼠中也诱导了具有抗IL-13的中和能力的抗体,其中在D59时100%的应答小鼠均有(图16-B和表11)。

[0547] 表11:针对IL-13的 NC_{50} 应答者

[0548]	IL-13 免疫原性产品					组合的免疫原性产品					
	D0	D38	D59	D90	D120	D0	D38	D59	D90	D120	
[0548]	应答者 ($NC_{50} > 200$ dil-1)	0/10	9/10	10/10	9/10	9/10	0/10	9/10	10/10	10/10	10/10

[0549] 总之,本发明的产品能够诱导具有强中和能力的高的抗细胞因子抗体滴度。

[0550] 人免疫原性产品的残余活性

[0551] 如上对IL-4和IL-13的残余活性所述地,使用HEK-Blue™ IL-4/IL-13报告细胞系监测人IL-4免疫原性产品、IL-13免疫原性产品和组合的免疫原性产品的残余活性。

[0552] 表12:针对IL-4的 ED_{50} 和失活因子

	物品	ED ₅₀ [ng.mL ⁻¹]	IL-4 对照 ED ₅₀ [ng.mL ⁻¹]	失活因子
[0553]	IL-4 免疫原性 产品	231	0.043	5287
	组合的免疫原 性产品	382	0.043	8765
[0554]	表13: 针对IL-13的ED ₅₀ 和失活因子			
	物品	ED ₅₀ [ng.mL ⁻¹]	IL-13 对照 ED ₅₀ [ng.mL ⁻¹]	失活因子
[0555]	IL-13 免疫原性 产品	444	0.258	1848
	Combo 免疫原 性产品	268	0.258	1116

[0556] 如表12和表13所示,人免疫原性产品中针对IL-4或IL-13的失活因子均大于1000(并且高达8765),这表明免疫原性产品中的细胞因子残余活性相比于天然细胞因子降低了至少三个数量级。

[0557] 这些高度降低的残余活性是支持本发明产品安全性的重要要素。

[0558] 实施例9:本发明的免疫原性产品在食物过敏反应模型的小鼠模型中的治疗功效

[0559] 食物过敏反应是西方国家的主要健康问题,在过去的几十年中愈发流行,并且缺乏根治疗法。几种主要食品,包括奶、花生、大豆和小麦,均可以引起食物变应性反应。食物过敏反应反映了对无害食物变应原的口服耐受性下降,导致了失调的Th2免疫应答的发展, Th2细胞因子(主要是IL-4和IL-13)的分泌,对变应原特异的IgE的分泌以及效应细胞向胃肠(GI)道的募集。

[0560] 使用IL-4raF709突变小鼠研究了本发明的免疫原性产品在食物过敏反应中的治疗功效。IL-4raF709小鼠携带在IL-4受体(IL-4R)α链中的功能获得性突变,其破坏了含有Src同源域2的蛋白酪氨酸磷酸酶1(SHP-1)与受体亚基的结合,并导致了通过IL-4和IL-13的转录激活子6(STAT6)激活的信号转导子及激活子的增强。这些小鼠表现出增强的Th2细胞应答和IgE产生。因此,该突变是许多促进受体信号传导并与特异性有关的人IL-4Rα多态性的原型。

[0561] 制备muIL-4/IL-13和ImuCombo免疫原性产品

[0562] 如上文所述合成muIL-4、muIL-13和ImuCombo免疫原性产品。

[0563] 小鼠免疫、食物过敏反应模型、过敏反应(anaphylaxis response)、组织学分析和血液采样

[0564] 在第0、7、28天用均用角鲨烯基佐剂乳化的muIL-4、muIL-13或muCombo免疫原性产品或CRM₁₉₇(作为对照)免疫每只IL-4raF709突变小鼠,并随后加强免疫。

[0565] 并行地,通过口服管饲法用PBS或悬浮在250μl 0.1M碳酸氢钠(pH 8.0)中的23mg

花生 (PE) 酱 (对应于5mg花生蛋白) 使小鼠致敏。用稀释在水中的450mg花生酱 (100mg蛋白) 的肠内推注攻毒小鼠 (Burton等人, 2014)。

[0566] 在刚攻毒后, 在一个小时内以及在腹泻发作后追踪核心体温 (core body temperature)。

[0567] 还确定了临床评分: 0, 无临床症状; 1, 重复的口/耳抓挠和用后肢挖耳道; 2, 活动减少, 自我孤立, 眼睛和/或嘴周围浮肿; 3, 不活动期超过一分钟, 胃部俯卧 (lying prone on stomach); 4, 对须 (whisker) 刺激无应答, 对戳刺的应答减少或无应答; 5, 震颤抽搐或死亡。

[0568] 收集肠组织切片用于组织学分析 (例如肥大细胞的定量)。

[0569] 还收集血液以研究炎症水平 (例如肥大细胞脱粒产物)、抗体水平 (例如抗细胞因子滴度、中和能力、对变应原特异的IgG和对变应原特异的IgE以及总IgE)。

[0570] 实施例10: 本发明的免疫原性产品在特应性皮炎的小鼠模型中的治疗功效

[0571] 特应性皮炎 (AD) 是一种慢性或慢性复发性的瘙痒性炎症性皮肤病。在过去三十年中, AD的发病率在工业化国家中急剧上升。AD的免疫学异常的特征通常在于由各种变应原 (例如食物、空气变应原、微生物和自体变应原) 致敏, 高血清IgE水平以及具有凋亡的角质形成细胞的皮肤损伤和分泌Th2细胞因子 (例如IL-4、IL-5和IL-13) 的免疫细胞的浸润。

[0572] 通过使用动物模型来研究本发明的免疫原性产品在AD中的治疗功效, 在该动物模型中, 重复表皮施用房尘螨 (HDM) 提取物和葡萄球菌肠毒素B引起湿疹性皮肤损伤。

[0573] 制备muIL-4/IL-13和muCombo免疫原性产品

[0574] 如上文所述合成muIL-4、muIL-13和muCombo免疫原性产品。

[0575] 小鼠免疫、特应性皮炎诱导、临床严重程度测量、组织学分析和血液采样

[0576] 用均用角鲨烯基佐剂乳化的muIL-4、muIL-13或muCombo免疫原性产品或CRM₁₉₇ (作为对照) 免疫小鼠。

[0577] 并行地, 如先前在Ando等人 (J Invest Dermatol. 2013年12月; 133 (12): 2695-2705) 中描述地诱导特应性皮炎。简而言之, 将500ng葡萄球菌肠毒素 (SEB) 和10μg美洲尘螨提取物 (Der f是房尘螨, HDM) 的溶液涂在放置于剃毛区域的纱布上。使用绷带用Tegaderm™ 透明敷料将这一部分背部皮肤封闭。三天后, 将敷料换成新的。又过4天后, 去除敷料并在下一周使小鼠保持不治疗。将一周的Der f/SEB处理再重复两次, 因此将小鼠进行了三个周期的这种处理。

[0578] 由一名不知道小鼠身份的研究人员在去除最后一个周期的敷料后2天对临床严重程度进行评分。临床评分基于四种可能症状 (发红、出血、发疹和脱屑) 的严重程度 (0, 无症状; 1, 轻度; 2, 中度; 3, 严重)。最高可能得分为12。

[0579] 评分后立即将小鼠安乐死, 获得对应于所治疗区域的背部皮肤样本用于表皮厚度和嗜酸性粒细胞的组织学分析。还收集血液以研究炎症水平和抗体水平 (例如抗细胞因子滴度、中和能力、对变应原特异的IgG和对变应原特异的IgE以及总IgE)。

[0580] 实施例11: 本发明的免疫原性产品在慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的小鼠模型中的治疗功效

[0581] COPD的特征在于通常与对吸入的刺激物的过度炎症性应答有关的进行性气流受限 (progressive airflow limitation), 其导致慢性阻塞性支气管炎和肺实质的破坏, 称

为肺气肿。

[0582] 已经建立了几种COPD动物模型以阐明COPD的开始和发展的潜在机制。在此,使用蛋白酶诱导的模型以评估本发明的免疫原性产品在COPD中的治疗功效。

[0583] 制备muIL-4/IL-13和muCombo免疫原性产品

[0584] 如上文所述合成muIL-4、muIL-13和muCombo免疫原性产品。

[0585] 小鼠免疫、特应性皮炎诱导、白细胞定量和组织学分析

[0586] 用均用角鲨烯基佐剂乳化的muIL-4、muIL-13或muCombo免疫原性产品或CRM₁₉₇ (作为对照)免疫小鼠。

[0587] 并行地,使用例如猪胰弹性蛋白酶的弹性蛋白酶的鼻内滴注引发COPD样症状,例如肺气肿的形成。简而言之,用30μL PBS中的0.6U猪胰弹性蛋白酶对BALB/c小鼠进行鼻内处理(Shibata等人Proc Natl Acad Sci USA.2018年12月18日;115(51):13057-13062)。

[0588] 在第一个实验中,在第5天将小鼠安乐死用于评估白细胞:通过流式细胞术定量支气管肺泡灌洗(BAL)液和肺细胞的单细胞悬浮液中的白细胞(例如单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、B细胞和嗜酸性粒细胞)数量。通过对先前用苏木精和曙红(H&E)染色的肺组织进行组织学检查来进行对肺中白细胞浸润的额外评估。还收集血液以研究炎症水平和抗体水平(例如抗细胞因子滴度、中和能力)。

[0589] 在第二个实验中,在弹性蛋白酶处理后的第21天处死小鼠以用于在H&E染色的肺组织切片中通过组织学评估肺气肿,其使用平均线性截距(MLI)作为肺空域扩大(lung airspace enlargement)的指标。还收集血液以研究炎症水平和抗体水平(例如抗细胞因子滴度、中和能力、对变应原特异的IgG和对变应原特异的IgE以及总IgE)。

[0590] 实施例12:本发明的免疫原性产品在肺纤维化的小鼠模型中的治疗功效

[0591] 肺纤维化代表了以不同程度的肺部炎症、肺成纤维细胞的过度增殖以及肺胶原含量增加为特征的广谱疾病。

[0592] 使用动物模型研究本发明的免疫原性产品在肺纤维化中的治疗功效,其中在肺中施用博来霉素(BLM)导致促炎性细胞因子和趋化因子的分泌、白细胞的募集、增加的胶原蛋白产量、重塑和纤维化肺炎症。

[0593] 制备muIL-4/IL-13和muCombo免疫原性产品

[0594] 如上文所述合成muIL-4、muIL-13和muCombo免疫原性产品。

[0595] 小鼠免疫、肺纤维化诱导、白细胞定量和组织学分析

[0596] 用均用角鲨烯基佐剂乳化的muIL-4、muIL-13或muCombo免疫原性产品或CRM₁₉₇ (作为对照)免疫小鼠。

[0597] 并行地,如先前由Reber等人(J Immunol 2014年2月15日;192(4):1847-54)所述在C57BL/6小鼠中诱发肺纤维化。简而言之,通过鼻内(i.n.)施用BLM盐酸盐(0.1mg于25μl PBS中;12.5μl/鼻孔)来诱导肺纤维化。

[0598] 每周监测体重5次直至实验结束,并在BLM处理后7天或14天将小鼠安乐死以评估肺纤维化。

[0599] 通过流式细胞术定量支气管肺泡灌洗(BAL)液和肺细胞的单细胞悬浮液中的白细胞(例如单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、B细胞和嗜酸性粒细胞)数量。

[0600] 对用苏木精和曙红(用于评估白细胞浸润)、masson三色(masson trichrome)(用

于评估纤维化)或甲苯胺蓝(用于评估肥大细胞数量)染色的肺组织进行组织学检查。

[0601] 还收集血液以研究炎症水平和抗体水平(例如抗细胞因子滴度、中和能力)。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 尼奥瓦克斯公司(NEOVACS)
- [0003] 法国国家健康和医学研究院(INSERM,Institut National de la Santé
- [0004] et de la Recherche Médicale)
- [0005] 巴斯德研究院(INSTITUT PASTEUR)
- [0006] G·格鲁阿德-沃格尔(Grouard-Vogel Géraldine)
- [0007] E·康德加西亚(Conde García Eva)
- [0008] R·伯特兰(Bertrand Romain)
- [0009] N·凯洛特(Caillot Noémie)
- [0010] L·勒贝(Reber Laurent)
- [0011] P·布鲁恩斯(Bruhns Pierre)
- [0012] V·塞拉(Serra Vincent)
- [0013] <120> 用于治疗与异常的IL-4和/或IL-13表达或活性相关的病症的包含IL-4和/或
- [0014] IL-13的免疫原性产品
- [0015] <130> CV-1058/PCT/2
- [0016] <160> 8
- [0017] <170> BiSSAP 1.3.6
- [0018] <210> 1
- [0019] <211> 535
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <220>
- [0023] <223> CRM197
- [0024] <400> 1
- [0025] Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
- [0026] 1 5 10 15
- [0027] Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
- [0028] 20 25 30
- [0029] Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
- [0030] 35 40 45
- [0031] Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
- [0032] 50 55 60
- [0033] Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
- [0034] 65 70 75 80
- [0035] Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
- [0036] 85 90 95
- [0037] Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu

[0038]	100	105	110
[0039]	Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly		
[0040]	115	120	125
[0041]	Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser		
[0042]	130	135	140
[0043]	Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser		
[0044]	145	150	155
[0045]	Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp		
[0046]	165	170	175
[0047]	Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg		
[0048]	180	185	190
[0049]	Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val		
[0050]	195	200	205
[0051]	Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly		
[0052]	210	215	220
[0053]	Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu		
[0054]	225	230	235
[0055]	Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu		
[0056]	245	250	255
[0057]	His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val		
[0058]	260	265	270
[0059]	Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val		
[0060]	275	280	285
[0061]	Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu		
[0062]	290	295	300
[0063]	Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala		
[0064]	305	310	315
[0065]	Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser		
[0066]	325	330	335
[0067]	Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp		
[0068]	340	345	350
[0069]	Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe		
[0070]	355	360	365
[0071]	Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His		
[0072]	370	375	380
[0073]	Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr		
[0074]	385	390	395
[0075]	Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His		
[0076]	405	410	415

[0077]	Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
[0078]	420 425 430
[0079]	Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
[0080]	435 440 445
[0081]	His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
[0082]	450 455 460
[0083]	Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
[0084]	465 470 475 480
[0085]	Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
[0086]	485 490 495
[0087]	Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
[0088]	500 505 510
[0089]	Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
[0090]	515 520 525
[0091]	Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
[0092]	530 535
[0093]	<210> 2
[0094]	<211> 129
[0095]	<212> PRT
[0096]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0097]	<220>
[0098]	<223> 人IL-4
[0099]	<400> 2
[0100]	His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
[0101]	1 5 10 15
[0102]	Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
[0103]	20 25 30
[0104]	Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
[0105]	35 40 45
[0106]	Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
[0107]	50 55 60
[0108]	Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Lys Gln Leu Ile
[0109]	65 70 75 80
[0110]	Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
[0111]	85 90 95
[0112]	Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
[0113]	100 105 110
[0114]	Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
[0115]	115 120 125

[0116] Ser
 [0117] <210> 3
 [0118] <211> 22
 [0119] <212> PRT
 [0120] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0121] <220>
 [0122] <223> 人IL-4的片段
 [0123] <400> 3
 [0124] Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg
 [0125] 1 5 10 15
 [0126] Leu Asp Arg Asn Leu Trp
 [0127] 20
 [0128] <210> 4
 [0129] <211> 120
 [0130] <212> PRT
 [0131] <213> 小家鼠(Mus musculus)
 [0132] <220>
 [0133] <223> 鼠IL-4
 [0134] <400> 4
 [0135] His Ile His Gly Cys Asp Lys Asn His Leu Arg Glu Ile Ile Gly Ile
 [0136] 1 5 10 15
 [0137] Leu Asn Glu Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Cys Thr Glu Met Asp Val
 [0138] 20 25 30
 [0139] Pro Asn Val Leu Thr Ala Thr Lys Asn Thr Thr Glu Ser Glu Leu Val
 [0140] 35 40 45
 [0141] Cys Arg Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe Tyr Leu Lys His Gly Lys
 [0142] 50 55 60
 [0143] Thr Pro Cys Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Leu Met Glu Leu Gln Arg
 [0144] 65 70 75 80
 [0145] Leu Phe Arg Ala Phe Arg Cys Leu Asp Ser Ser Ile Ser Cys Thr Met
 [0146] 85 90 95
 [0147] Asn Glu Ser Lys Ser Thr Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys
 [0148] 100 105 110
 [0149] Ser Ile Met Gln Met Asp Tyr Ser
 [0150] 115 120
 [0151] <210> 5
 [0152] <211> 108
 [0153] <212> PRT
 [0154] <213> 犬(Canis)

[0155] <220>
 [0156] <223> 犬IL-4
 [0157] <400> 5
 [0158] His Asn Phe Asn Ile Thr Ile Lys Glu Ile Ile Lys Met Leu Asn Ile
 [0159] 1 5 10 15
 [0160] Leu Thr Ala Arg Asn Asp Ser Cys Met Glu Leu Thr Val Lys Asp Val
 [0161] 20 25 30
 [0162] Phe Thr Ala Pro Lys Asn Thr Ser Asp Lys Glu Ile Phe Cys Arg Ala
 [0163] 35 40 45
 [0164] Ala Thr Val Leu Arg Gln Ile Tyr Thr His Asn Cys Ser Asn Arg Tyr
 [0165] 50 55 60
 [0166] Leu Arg Gly Leu Tyr Arg Asn Leu Ser Ser Met Ala Asn Lys Thr Cys
 [0167] 65 70 75 80
 [0168] Ser Met Asn Glu Ile Lys Lys Ser Thr Leu Lys Asp Phe Leu Glu Arg
 [0169] 85 90 95
 [0170] Leu Lys Val Ile Met Gln Lys Lys Tyr Tyr Arg His
 [0171] 100 105
 [0172] <210> 6
 [0173] <211> 122
 [0174] <212> PRT
 [0175] <213> 智人(Homo sapiens)
 [0176] <220>
 [0177] <223> 人IL-13
 [0178] <400> 6
 [0179] Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser
 [0180] 1 5 10 15
 [0181] Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn
 [0182] 20 25 30
 [0183] Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu
 [0184] 35 40 45
 [0185] Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser
 [0186] 50 55 60
 [0187] Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys
 [0188] 65 70 75 80
 [0189] Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp
 [0190] 85 90 95
 [0191] Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu
 [0192] 100 105 110
 [0193] Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn

[0194]	115	120
[0195]	<210> 7	
[0196]	<211> 110	
[0197]	<212> PRT	
[0198]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
[0199]	<220>	
[0200]	<223> 鼠IL-13	
[0201]	<400> 7	
[0202]	Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Leu Thr Leu Lys Glu Leu Ile	
[0203]	1 5 10 15	
[0204]	Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln Asp Gln Thr Pro Leu Cys Asn Gly	
[0205]	20 25 30	
[0206]	Ser Met Val Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly Gly Phe Cys Val Ala	
[0207]	35 40 45	
[0208]	Leu Asp Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys Asn Ala Ile Tyr Arg Thr	
[0209]	50 55 60	
[0210]	Gln Arg Ile Leu His Gly Leu Cys Asn Arg Lys Ala Pro Thr Thr Val	
[0211]	65 70 75 80	
[0212]	Ser Ser Leu Pro Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala His Phe Ile Thr Lys	
[0213]	85 90 95	
[0214]	Leu Leu Ser Tyr Thr Lys Gln Leu Phe Arg His Gly Pro Phe	
[0215]	100 105 110	
[0216]	<210> 8	
[0217]	<211> 113	
[0218]	<212> PRT	
[0219]	<213> 犬 (Canis)	
[0220]	<220>	
[0221]	<223> 犬IL-13	
[0222]	<400> 8	
[0223]	Ser Pro Ser Pro Val Thr Pro Ser Pro Thr Leu Lys Glu Leu Ile Glu	
[0224]	1 5 10 15	
[0225]	Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Ala Ser Leu Cys Asn Gly Ser	
[0226]	20 25 30	
[0227]	Met Val Trp Ser Val Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu	
[0228]	35 40 45	
[0229]	Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Asp Cys Ser Ala Ile Gln Arg Thr Gln	
[0230]	50 55 60	
[0231]	Arg Met Leu Lys Ala Leu Cys Ser Gln Lys Pro Ala Ala Gly Gln Ile	
[0232]	65 70 75 80	

[0233]	Ser Ser Glu Arg Ser Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ile Gln Leu Val
[0234]	85 90 95
[0235]	Lys Asn Leu Leu Thr Tyr Val Arg Gly Val Tyr Arg His Gly Asn Phe
[0236]	100 105 110
[0237]	Arg

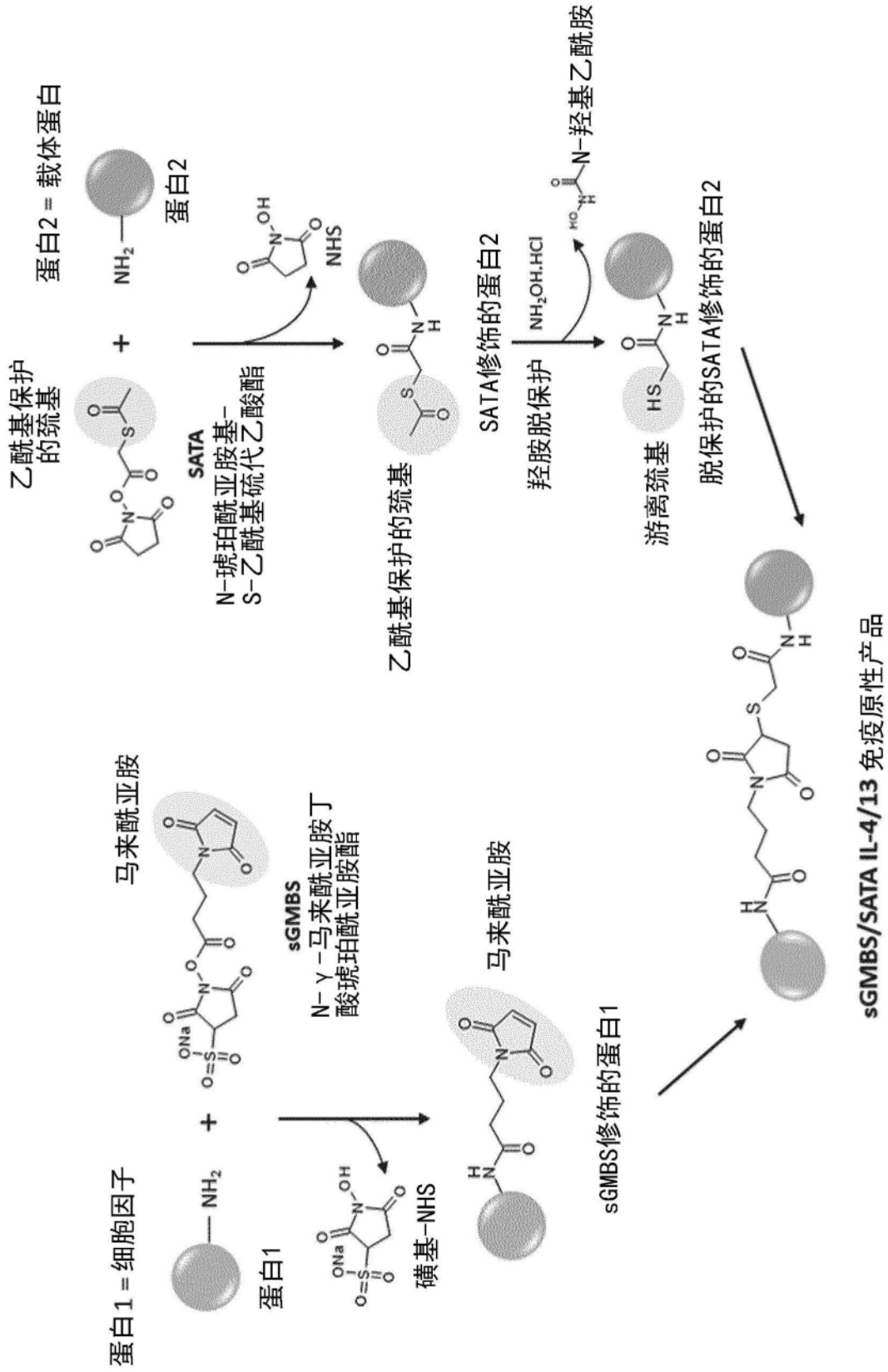


图1

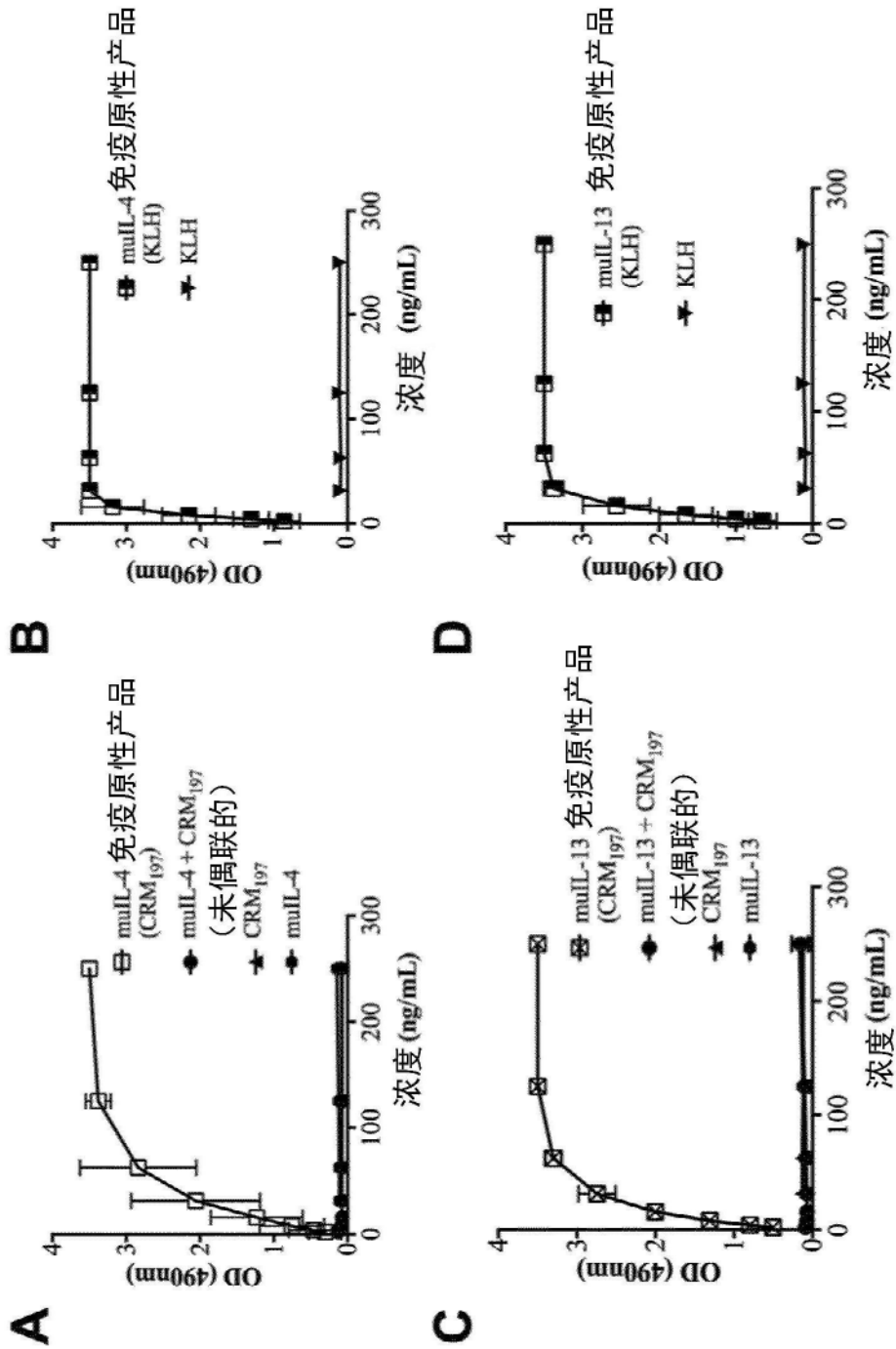


图2

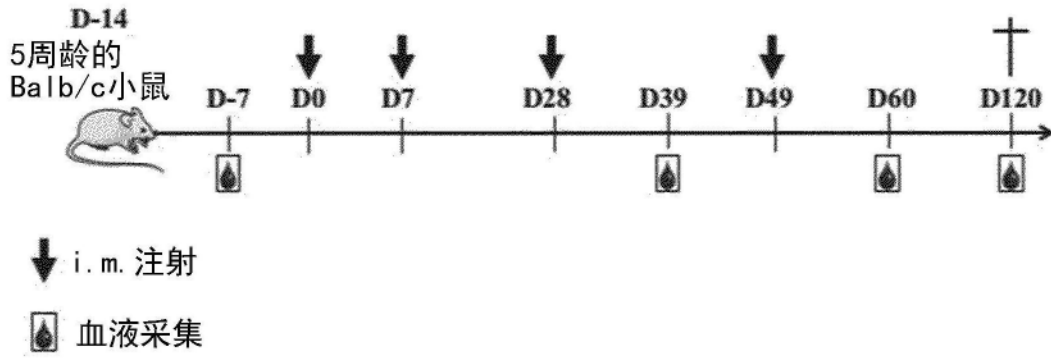


图3

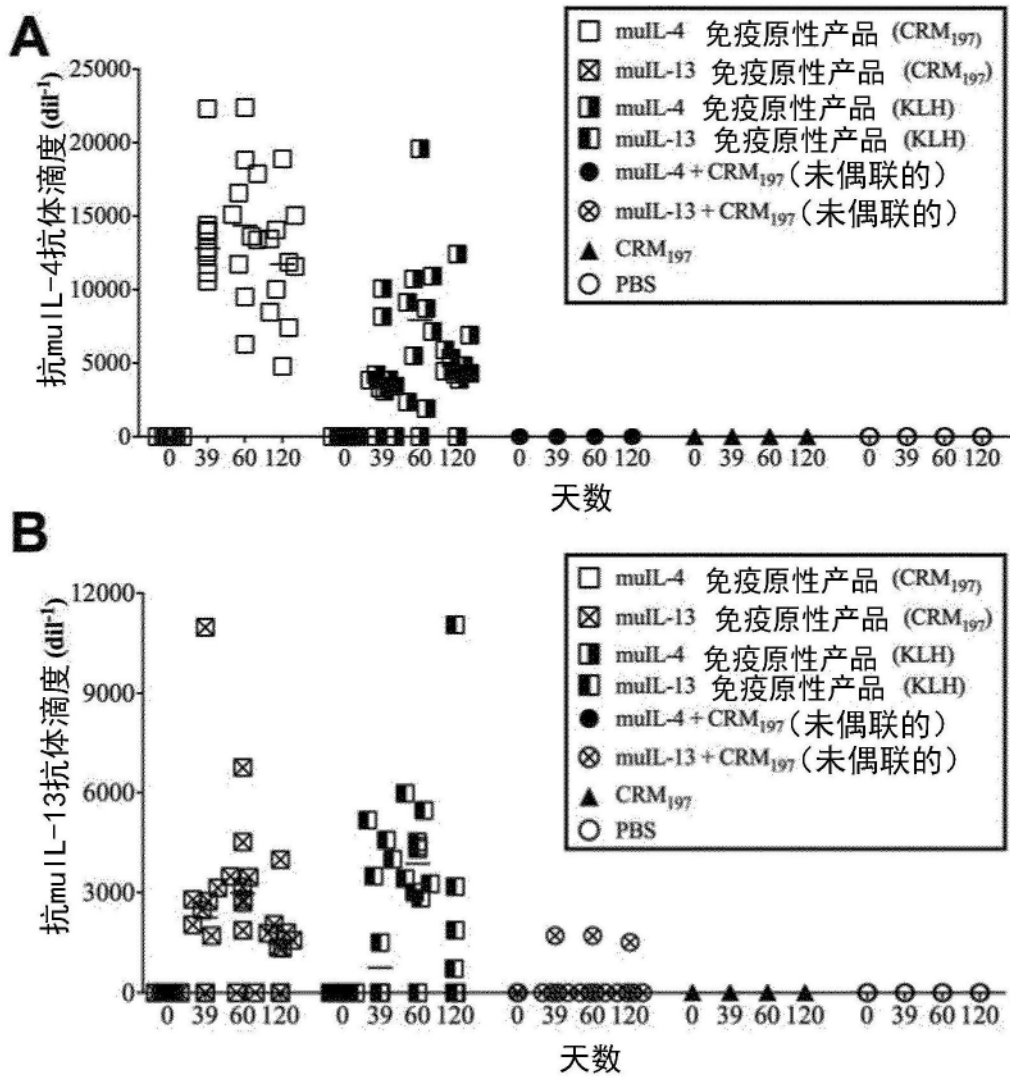


图4A-B

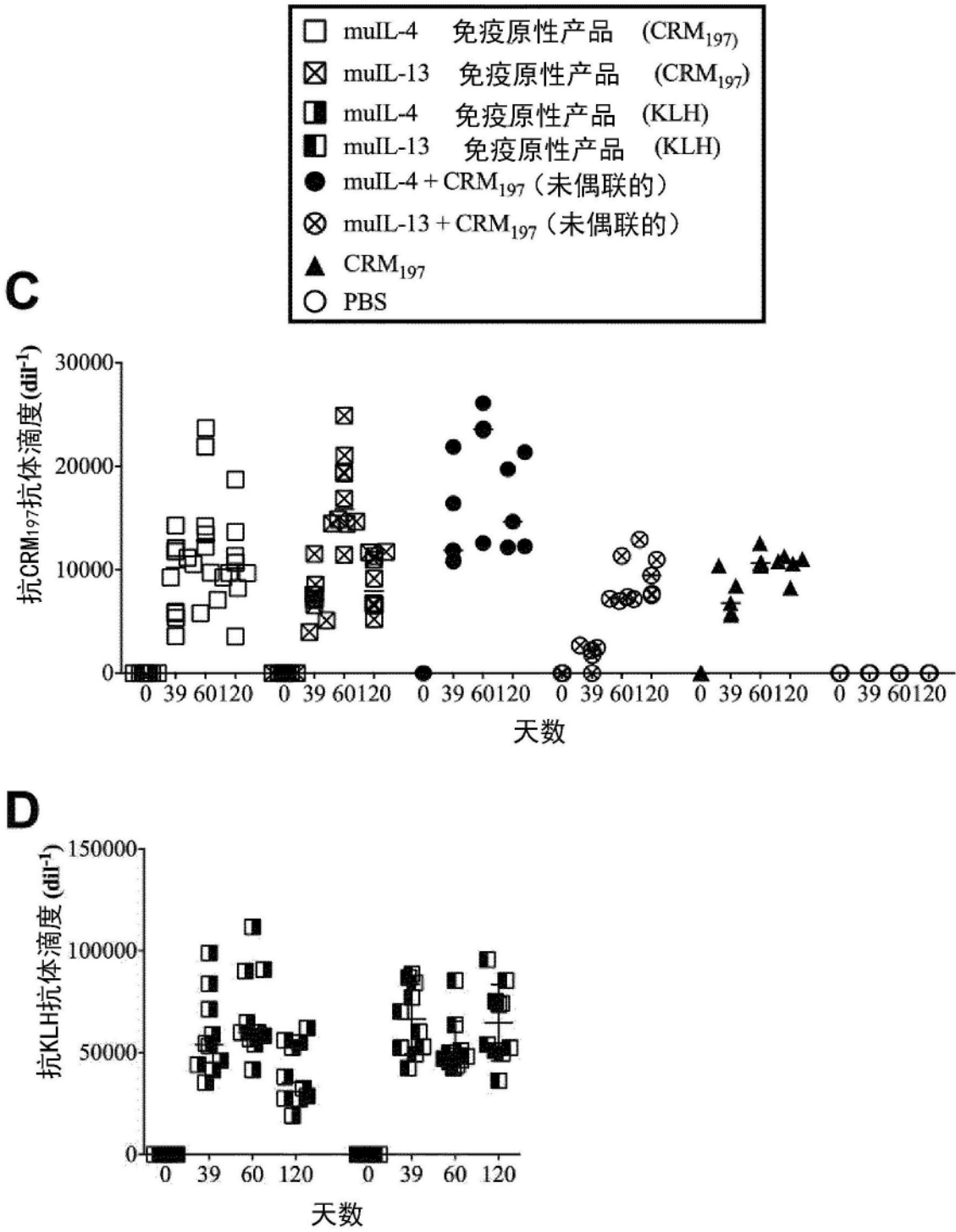


图4C-D

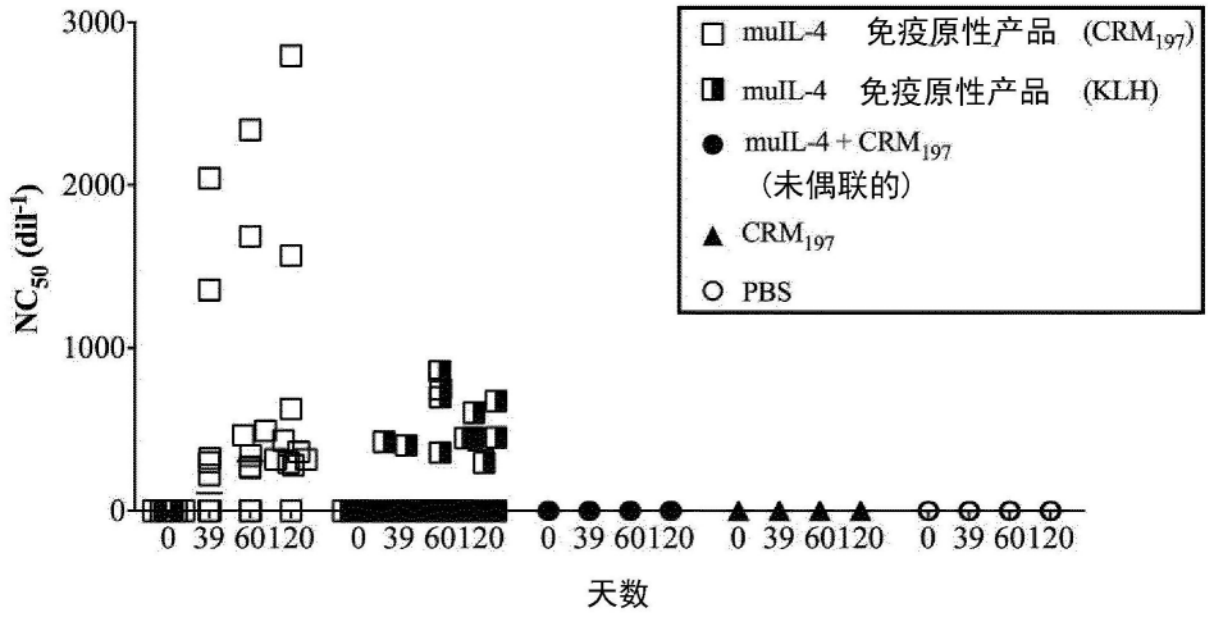


图5

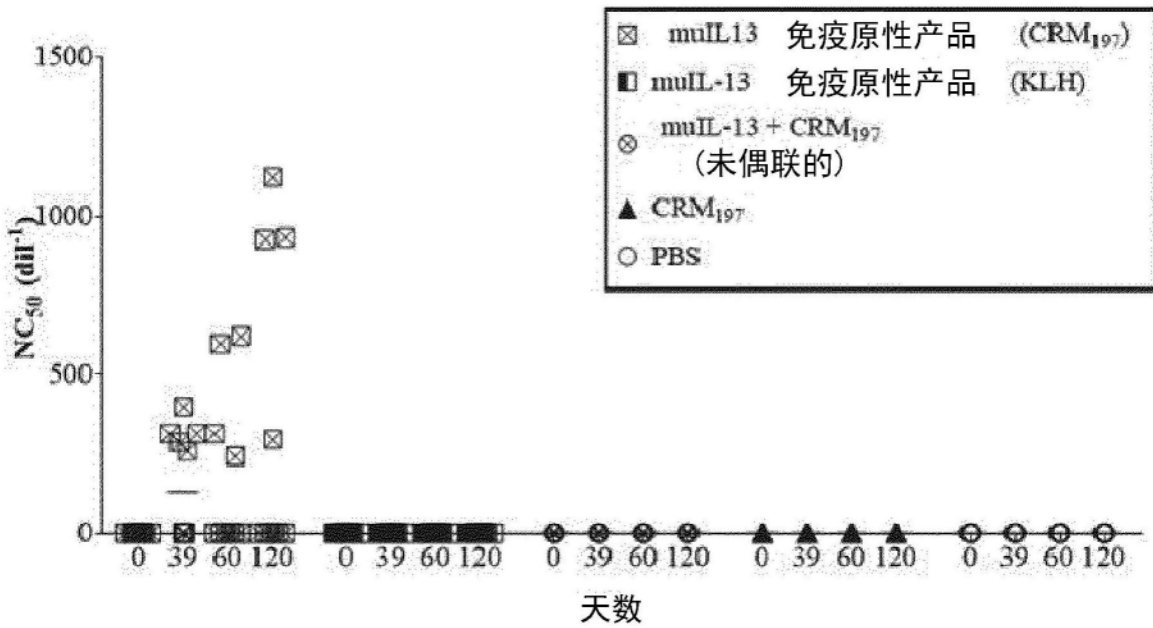


图6

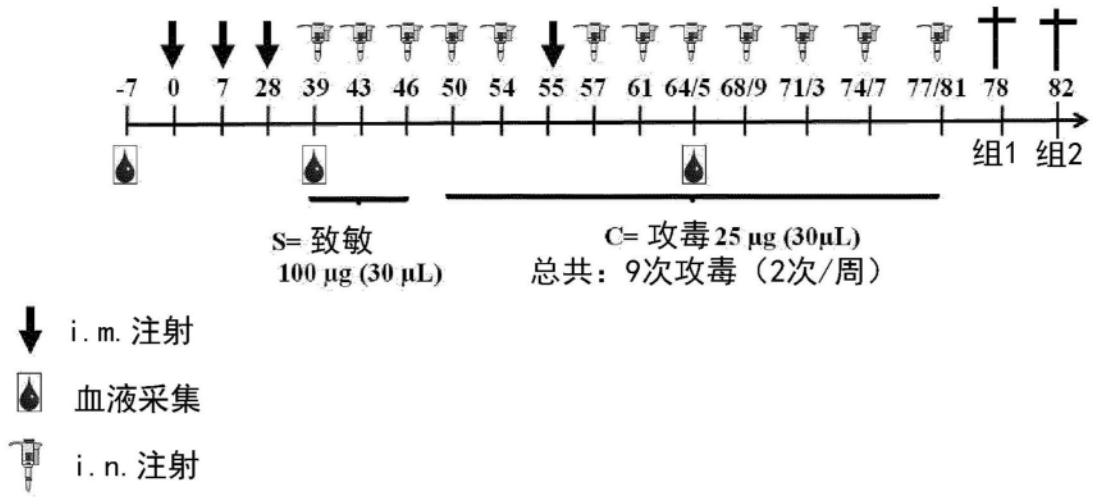


图7

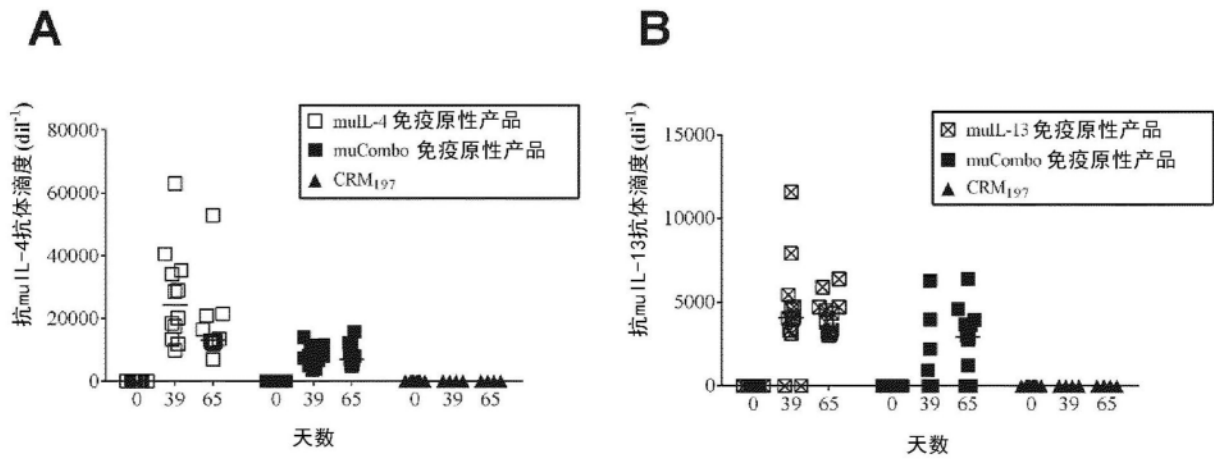


图8

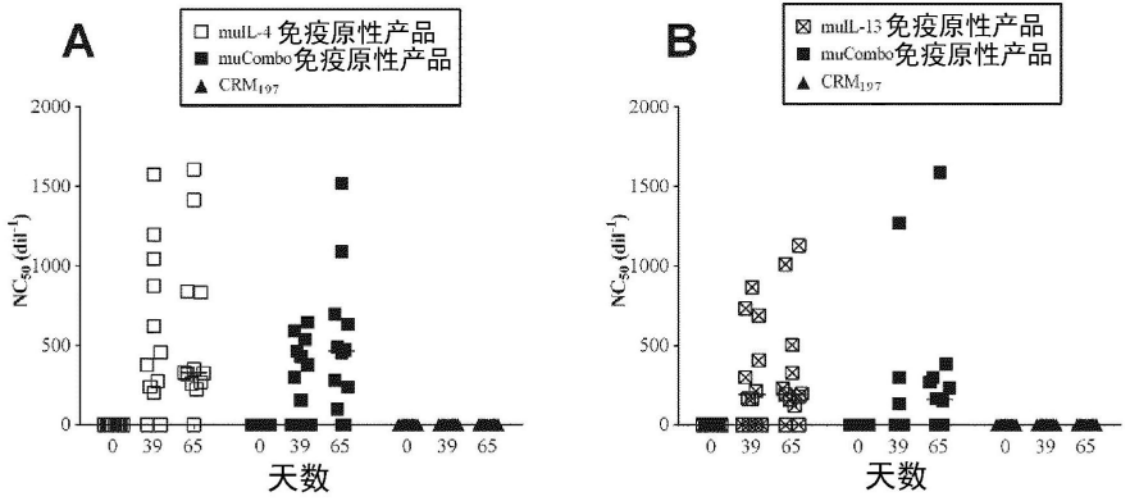


图9

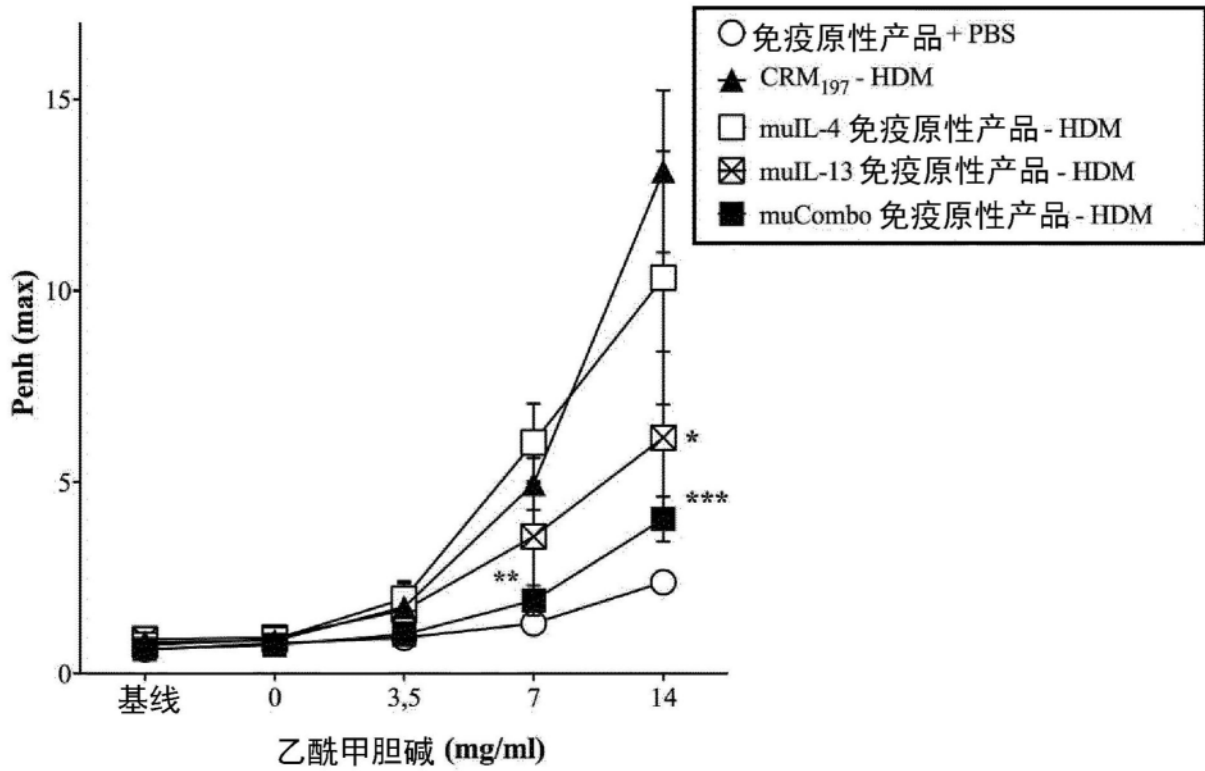


图10

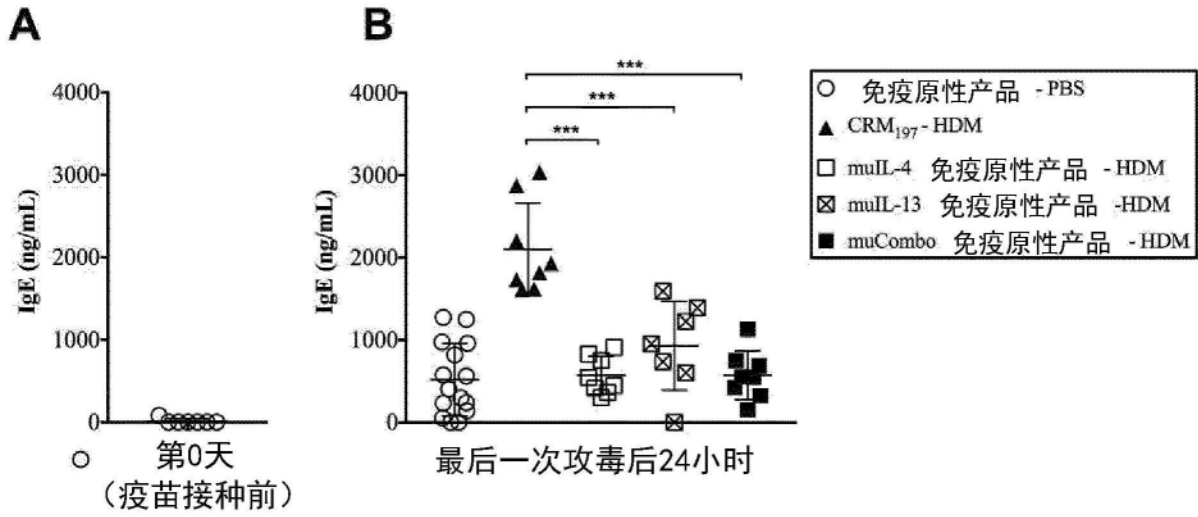


图11

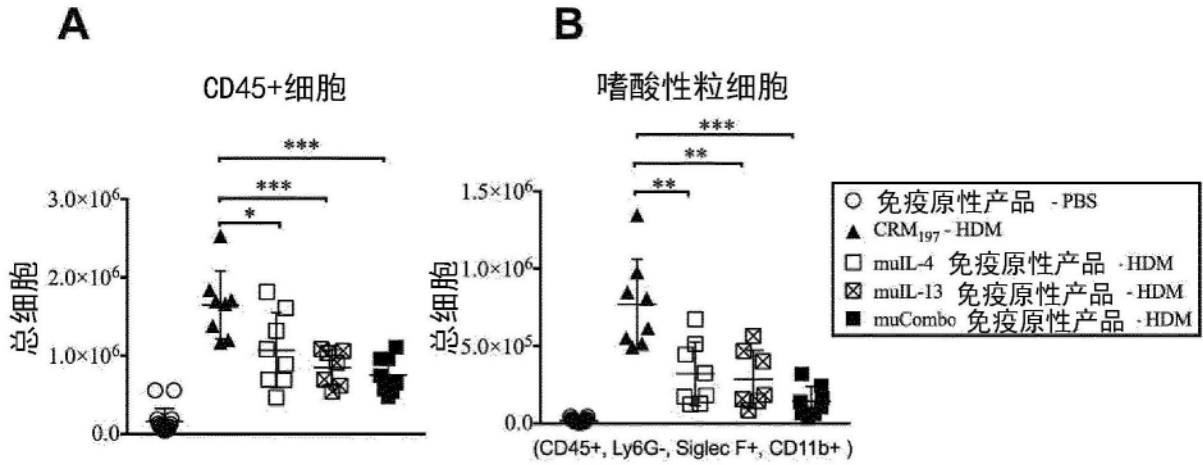


图12

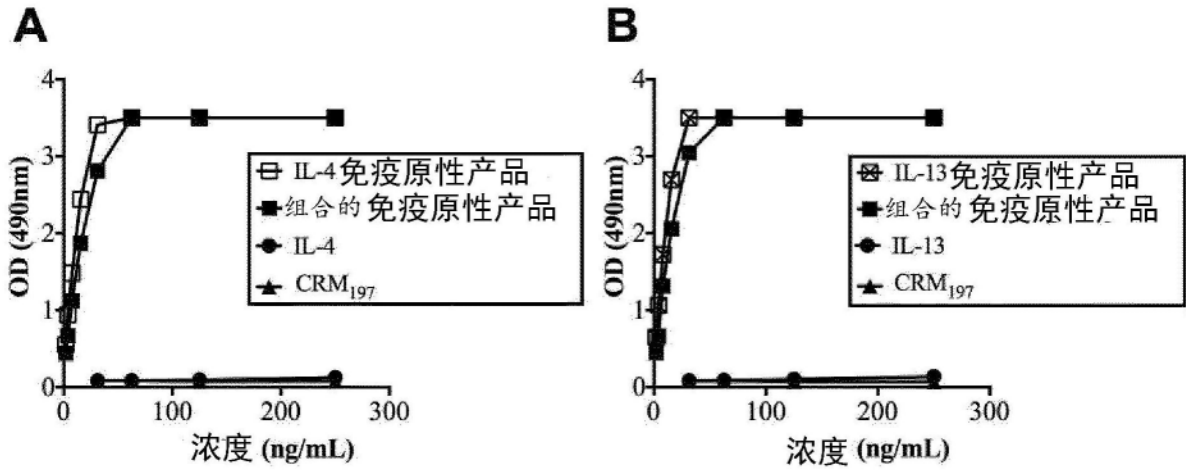


图13

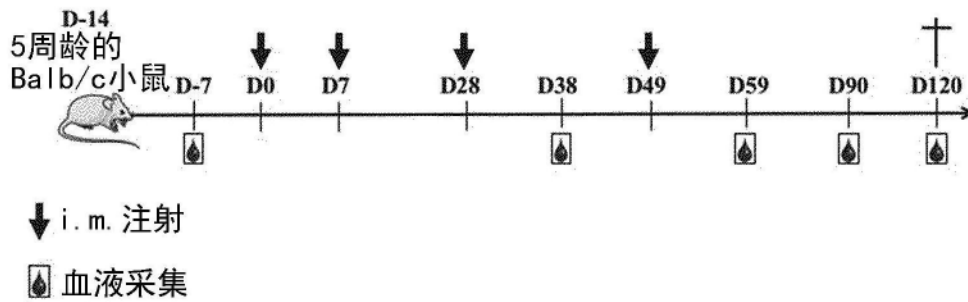


图14

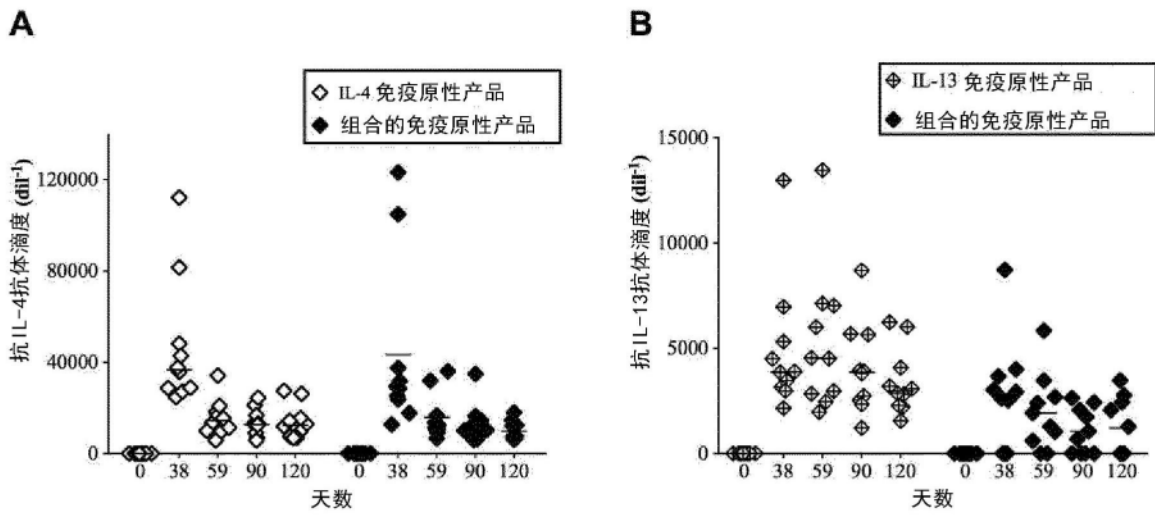


图15

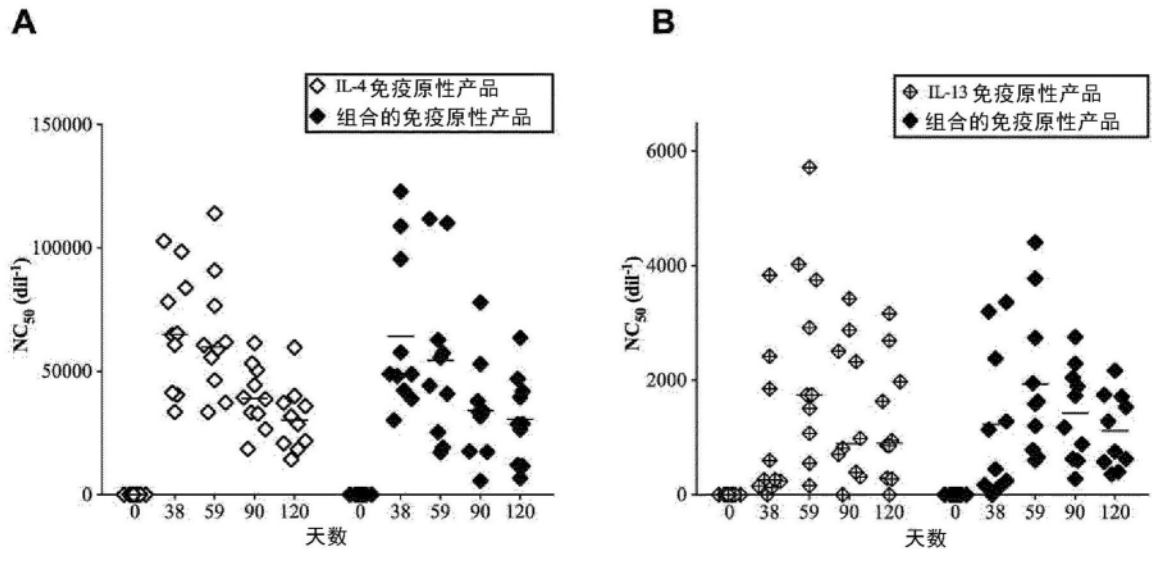


图16