

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 51/10

A61K 47/48 A61K 41/00

A61K 49/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02809886.2

[43] 公开日 2004 年 6 月 30 日

[11] 公开号 CN 1509188A

[22] 申请日 2002.5.3 [21] 申请号 02809886.2

[30] 优先权

[32] 2001. 5. 15 [33] DE [31] 10123505.4

[86] 国际申请 PCT/DE2002/001606 2002. 5. 3

[87] 国际公布 WO2002/092136 德 2002. 11. 21

[85] 进入国家阶段日期 2003. 11. 14

[71] 申请人 沃尔夫冈·贝格特

地址 德国汉诺威

共同申请人 哈特穆特·科比尔克

约阿基姆·斯罗卡

[72] 发明人 沃尔夫冈·贝格特

哈特穆特·科比尔克

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

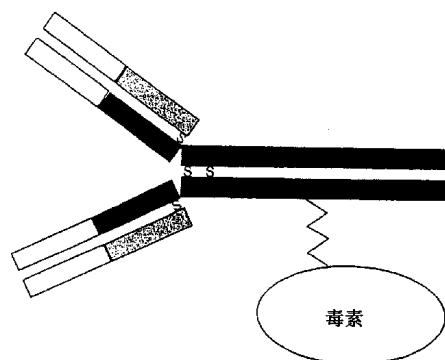
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 3 页

[54] 发明名称 由蛋黄抗体制成的免疫共轭物及其成型方法和在诊断和治疗中的应用

[57] 摘要

本发明涉及来自蛋黄抗体(IgY)中的免疫共轭物及其成型方法和在诊断和治疗中的应用。本发明的一个目的就是推出一种传统免疫共轭物的替代产品,用于诊断和治疗。就纯度和抗原靶向而言,根据本发明制备的免疫共轭物优于单克隆抗体和来自哺乳动物中的免疫血清以及优于来自常规鸡的IgY制备物。如果有可能,人抗IgY抗体的产生将会被避免,免疫共轭物以公正地对待动物保护的方式大量经济的产生。根据本发明,通过来自SPF鸡,优选转基因SPF鸡的完整蛋黄抗体(IgY)的多克隆IgY共轭物,IgY片段,Fab结构或人源化的蛋黄抗体可以完成此目的。抗原或抗原片段将作为免疫有效成分和至少另外一种的成分结合在一起,另外一种成分可以是信号物质,和活性剂或加强分子。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

5 1. 蛋黄抗体 (IgY) 的免疫共轭物, 其组成为来自转基因 SPF 鸡或根据欧洲药典和 DAB10 的无特定病原体 (SPF) 鸡的蛋中的多克隆 IgY 制备物, 形成具有人 IgG 恒定区的多克隆 IgY, 以及至少一种信号物质和/或活性剂和/或加强分子。

10 2. 根据权利要求 1 所述的蛋黄抗体 (IgY) 的免疫共轭物, 其中多克隆 IgY 制备物被纯化成蛋黄抗体 (IgY)、IgY 片段、Fab 结构或嵌合的蛋黄抗体。

15 3. 根据权利要求 1 所述的免疫共轭物, 其特征在于用于制剂的 IgY 制备物包含人源化的蛋黄抗体, 它是通过将禽源抗体和人 IgG 恒定区化学连接而成。

4. 根据权利要求 1 和 2 所述的免疫共轭物, 其特征在于 IgY 制备物包含单价或双价抗体片段, 优选的是 Fab 或 F(ab)₂。

20 5. 根据权利要求 1 和 2 所述的免疫共轭物, 其特征在于 IgY 制备物包含二、三或更多特异性的 Fab 结构。

6. 根据权利要求 1 所述的免疫共轭物, 其特征在于信号物质是诊断用放射性核素、酶、染料和/或光敏剂。

25 7. 根据权利要求 1 所述的免疫共轭物, 其特征在于活性剂是治疗用放射性核素、细胞抑制剂、毒素、化疗药物、前体药物、酶、光敏剂和/或纤溶剂。

30 8. 根据权利要求 1 所述的免疫共轭物, 其特征在于 IgY 制备物和加强分子结合, 优选的是和生物素或和补体系统的蛋白结合。

9. 根据前述权利要求中一项或多项所述的免疫共轭物，其特征在于信号物质或活性剂通过共价键或助剂如螯合剂，加强分子和/或加强分子的高亲和分子或二、三或更多特异性的 IgY 结构的一或多个分支的可变区结合到 IgY 制备物上。

10. 根据前述权利要求中一项或多项所述的免疫共轭物，其特征在于 IgY 制备物对肿瘤抗原、激素、RNA 和/或 DNA 片段、传染性病原体或他们的表面抗原、白细胞抗原、胞内分子、受体分子或凝血因子是特异的。

11. 根据前述权利要求中一项或多项所述的免疫共轭物，其中就预靶向而言，只有在通过次级人抗 IgY 抗体结合到特异抗原上之后，免疫共轭物才在体内连接到信号物质或活性剂或加强分子上。

12. 根据前述一和多个权利要求所述的免疫共轭物，其中就预靶向而言，只有在通过次级人抗 IgY 抗体途径键合到特异抗原上之后，免疫共轭物才在体内连接到信号物质或活性剂或加强分子抗原上。

13. 蛋黄抗体 (IgY) 的包装，用于制造如权利要求 1-10 所述的免疫共轭物，包含 IgY 制备物和信号物质或活性剂和/或加强分子以及附加成分中的至少一个，所述其他成分如通过薄层层析、分离柱、仪器架、冲洗和洗脱缓冲液进行质量控制的一套材料。

14. 如权利要求 1-10 所述的 IgY 共轭物的包装，包含至少一套通过薄层层析进行质量控制的材料和应用装置。

15. 根据权利要求 11 和 12 所述的包装，其中 IgY 制备物以冻干形式或和添加剂如稳定剂共同使用的悬浮液形式出现，调节到最适的 pH 值。

16. 如权利要求 1-10 所述的免疫共轭物，用来生产诊断用或治疗用试剂，优选针对非传染性炎症、传染病、凝血紊乱、自身免疫病和肿瘤病。

5

由蛋黄抗体制成的免疫共轭物及其
成型方法和在诊断和治疗中的应用

5

根据权利要求 1、13、14 和 16，本发明涉及由蛋黄抗体制成的免疫共轭物及其成型方法和在诊断和治疗中的应用。

10

为了更好地理解本发明，当本领域中的术语出现在申请中时，将会被详细的定义，在本申请中，这些术语不会有别的意思。

“无特定病原体鸡”（简称“SPF 鸡”）

15

根据欧洲药典和 DAB10 的指南，这些“SPF 鸡”是从 SPF 母鸡遗传下来的动物，从它们生下来的第一天，就保持在 SPF 状态。这些动物不含人和禽病原体及它们的抗体。

“IgY”（免疫球蛋白蛋黄）

20

这是从禽蛋蛋黄中提取出来的免疫球蛋白，和鸡血清中的 IgG 相对应。这些禽免疫球蛋白在结构上和哺乳动物 IgG 有区别，主要表现在分子量高于后者，这是因为 IgY 的 Fc 片段中恒定区数比后者多。

“特异的 IgY”

25

它在这里指的是整个 IgY 中能识别用于免疫的抗原的部分，而非特异的 IgY 指的是整个 IgY 中和免疫无关的部分，它是动物和抗原作用物质或非病原体和病原体的接触中形成的。

“完整抗体”

30

它们可以理解为未片段化的免疫球蛋白，即它们含有一个 Fc 片段和 2 个 Fab 片段，Fc 片段包括重链的恒定区，而 Fab 片段则包括重链和轻链的可变区。

“IgY 片段”

在本发明中，它的含义是禽免疫球蛋白中不含或含一小部分残余 Fc 片段的 Fab 片段。出于简单，后文中的术语“Fab”也可指诸如 F(ab)₂ 这样的片段。

“Fab 结构”

术语“Fab 结构”定义的是把 2 或多个不同的 Fab 片段合成在一起形成的结构（2 价或 3 价结构等），它能识别 1 或多个不同的抗原决定位点（单，双或三特异性结构等），因此能满足 1 或多种功能，换句话说，它们具单、双和三功能。

“抗原决定位点”

这是一个位于抗原上的分子结构，能被抗体特异性地识别（也叫“表位”）。

“IgY 制备物”

它们可被理解成蛋黄抗体（IgY），IgY 片段，Fab 结构或如果需要，也可理解成从蛋黄中提取和纯化的嵌合蛋黄抗体。

“信号物质”

它们指的是能对病理或生理结果以可视或成像的方式进行分析评价的一类物质。

“活性剂”

它指的是治疗上可用的物质，例如酶，抗生素，病毒抑制剂，细胞毒素如毒素或放射性核素，不排除也具有信号物质性质的活性剂。

“前体药物”

它的定义是在体内从无活性的前期物质原位转化成活性剂的一类

物质。

“加强免疫”和“维持免疫 (replenishment immunization)”

5 这个术语将会和 SPF 鸡的免疫一起提及。加强免疫是用来获得最大的 IgY 效价。维持免疫的含义指的是通过接触更新抗原，从而使 IgY 的效价直到产卵期末均能保持最大。

10 基于小鼠（鼠源 MAK）或人（人 MAK）的单克隆抗体的免疫共轭物是众所周知的。把信号物质（染料，氟化铬，诊断用放射性核素）或活性剂（如毒素，治疗用放射性核素，光敏剂，前体药物）结合抗体的许多方法已得以建立。这使得用 ELISA，RIA，荧光显微术，脉冲细胞计量术，闪烁照相术，SPECT(单光子发射计算的断层显像)，PET(正电子发射断层显像)和光子免疫诊断等方法进行检测或用放射免疫疗法，免疫毒素疗法或光动力学疗法等方法进行治疗成为可能。

15

单克隆抗体的不利之处主要是抗体的单特异性及其相对复杂和昂贵的研究和成型 (confectioning)。一般而言，单克隆抗体的成型必须在发酵罐中进行，因为利用小鼠腹水来生产单克隆抗体在许多国家是被禁止的。

20

25 哺乳动物（如绵羊，马，猪等）的多克隆免疫血清和免疫过的/受感染的供体（如来自 HIV 感染的 p24 抗体效价高的人的血）在不同的诊断过程及被动免疫疗法中均是重要的。从改善复杂抗原的靶向来看，这些免疫血清的单克隆性是有用的。然而，哺乳动物或常规鸡中的免疫血清含有相对少的确定的多特异性抗体混合物，其中所需的特异性抗体占一小部分，而非特异、因此也是不需要的抗体则占主要部分。从动物保护角度来说，从哺乳动物中获得免疫血清几乎不可接受，原因是这种做法在若干国家很大程度上被禁止。从人血捐赠者中获取免疫血清是昂贵的，也不是绝对没危险的（传播病毒，如 HIV，HCV，甚至可能是朊病毒），同时也涉及到伦理问题，因此，从宽的应用范

30

围来说，这种做法不可行。

在这些蛋黄抗体（IgY）中，禽源多克隆抗体也是众所周知的。当前，由不同制造者提供的 IgY 在用于体外诊断时，可以作为哺乳动物免疫血清或单克隆抗体的一种替代抗体。专业文献也提及到了如何将蛋黄抗体和生物素，FITC 或辣根过氧化物酶（POD）偶联，从而使其在体外诊断中有用的例子（Schade 等，2001[1]）。

口服常规鸡的禽源抗体也是众所周知的。人用药的肠胃外施用方式迄今大都是避免的，一方面是由于种系间隔，哺乳动物 IgY 既不能和补体因子 C1，也不能和 Fc 受体偶联，这样它就不能有效地和哺乳动物防卫系统相互作用，另一方面是因为 IgY 可能会引起过敏反应。此外，从常规鸡的蛋黄中获得 IgY 也无效率，而从纯度和亲和力来说，这种 IgY 质量次。原因是常规鸡会形成许多针对别的微生物作用的非特异性抗体，而对靶免疫源的应答也就相对弱，持续时间短。由于这个原因，在常规鸡的免疫中，相对全部 IgY，特异性 IgY 的比例远小于 10%（美国专利 4,550,019, Hansen 等，1998[2]；Bouhours 等，1998[3]，Gassmann 等，1990[4]）。

本领域最接近的现有技术在一个德国专利说明书 195 04 755 中所描述，它涉及用 IgY 对 HIV 感染进行被动免疫治疗。来自特异性（SPF）鸡的 IgY 被靶向到 HIV 核心抗原 p24 和 p17 上。用人免疫血清进行被动免疫疗法也是众所周知的。和免疫血清与单克隆抗体相比，IgY 的获得更容易和更便宜。用实施例 2 所述的免疫方案进行基础免疫和加强免疫的 SPF 鸡每个星期将会产 5-7 个蛋，时间长达 16 个月。因为凭经验，一个蛋黄包含至少 50mg 具所需特异性的 IgY，就此而论，从 250-350 个 SPF 鸡蛋中，能获得大约 15000mg 的特异性 IgY。此外，由于对这些动物规定了一些特异性处理，SPF 鸡所受的污染显著低于农场用来产肉和产蛋的普通鸡。因此，抗多达 19 种在常规鸡养殖中常见的具商业意义的传染病的通常主动免疫，包括两次规定的接种也

被消除了。这些免疫说明常规鸡 IgY 制备物的低质量及分离特异性 IgY 的复杂性和费用。SPF 鸡的饲养场所没有人和禽病原体病菌。为了排除食物中的病原菌，水和免疫状态都是调节控制的。为了防止动物 SPF 的隐匿状态，食物没加抗生素。

5

从医学角度来说，IgY 的优点一般在于特异性抗体对若干抗原决定簇的识别，这样就能保证改善目标抗原的靶向，因为抗体是来自禽类，以及在于禽类的免疫系统与哺乳动物和人的免疫系统在抗原识别方面是有差异的事实。由于禽类免疫系统能识别（系统发生上调节的）与人免疫系统不同的抗原决定簇，这样就增强了目标抗原的靶向作用。因此，病人身上天然存在的抗体和禽类体内抗体之间对表位的竞争就会下降。而且，禽类抗原既不能和人补体系统也不能和 Fc 受体，蛋白 A 或蛋白 G 作用，这种假定的缺点在许多情况下并不显著，甚至于变成了优点。

10

15

本发明的目的就是开发和利用传统的免疫共轭物的替代物，它们适用于诊断和治疗，并且从纯度和抗原靶向来说，要优于单克隆抗体和哺乳动物的免疫血清以及常规鸡的 IgY 制备物。此外，基本上不会形成人抗 IgY 的抗体，而且大量制备免疫共轭物是有成本效益的，也符合动物保护。

20

在本发明描述之前，还有一些术语将会被定义，以便于在后面的本发明描述和专利的权利要求书中便于理解。在本申请中，它们没有别的意思。

25

“放射性免疫共轭物”

在这个申请中，它指的是 SPF 鸡或转基因 SPF 鸡的 IgY 制备物与诊断和/或治疗用放射性核素和/或加强分子结合并用于核医学诊断和/或放射性免疫疗法方面的制备物。

30

“免疫毒素”

它是和毒素（植物毒素，细胞抑制剂，化疗药物，抗生素等）结合的 Ig 制备物制剂，并用于免疫毒素疗法中。

5 “特异性靶向”

它指通过免疫球蛋白，把信号物质或活性剂结合到所需的目标抗原上的过程。

“预靶向”

10 在这方面，它的应用包括在抗原连接和信号物质/或活性剂之间的任何阶段，通过进一步插入另一物种的抗体或别的合适分子（本文还有一个通名“加强分子”），能引起 IgY 制备物信号或效果增强。

“嵌合的蛋黄抗体”

15 它的意思是指 1) 把鸡 Fab 片段和人 IgG 的 Fc 片段通过生化手段连接在一起的人源化免疫球蛋白，或 2) 转基因 SPF 鸡的人源化免疫球蛋白，其中编码 IgY 恒定区的基因部分或多或少地被人 IgG 恒定区所取代。

20 “IgY 共轭物”

在本申请中，这个术语包括多克隆 IgY 制备物（免疫组分）和信号物质和/或活性剂（诊断或治疗用组分）和/或加强分子结合的制备物。

25 根据本发明，通过完整的蛋黄抗体（IgY），IgY 片段，Fab 结构或来自 SPF 鸡，优选来自转基因 SPF 鸡的人源化蛋黄抗体结合的多克隆 IgY 共轭物可以完成目标。作为一种免疫活性成分，抗体或抗体片段至少可以结合一种别的成分，它可以是信号物质、活性剂或加强分子。

30

本发明涉及 IgY 共轭物在医学诊断和治疗中的应用，以及涉及在动物（如小鼠，绵羊或非人的灵长类动物）中的实验用途。它的使用并不局限于肠胃外应用，而是取决于应用的目标，它包括外用（如对黑色素瘤）和内用（如对食管癌）。

5

此外，本发明也涉及到 IgY 共轭物的成型，作为备用的诊断剂或药物，既可作为单独的成分，作标记试剂盒，也可作为备用的制备物。考虑的目标抗原均是蛋白，多肽，糖蛋白，核酸，多糖和脂蛋白。首先，本发明涉及抗肿瘤抗原，激素，受体蛋白，RNS 和 DNS 部分，
10 传染性病原体，朊病毒或这些目标抗原的部分抗原决定簇的 IgY 共轭物。IgY 共轭物包括多特异性 IgY 的多少取决于用于免疫的抗原的复杂性。

本发明的其他方面涉及预靶向方法，在这种方法中，或 1) 生物素化的 IgY 和目标抗原相连，用作标记的亲合素或链亲合素的媒介，
15 或 2) 未结合的 IgY 和目标抗原相连，用作人或人源化抗 IgY 结合物的媒介。在第一种情况下，生物素和亲合素或链亲合素酸之间强键结合，因此 IgY 共轭物中的生物素成分也可称作加强分子。

最后，本发明涉及 IgY 共轭物的制备物及其应用，通过这些制备物和应用，IgY 共轭物的诊断和/或治疗特性可以被改善，如手术过程，
20 化疗，免疫调节剂和旁免疫诱导剂（paraimmunity inducer）。

本发明的 IgY 共轭物中和本发明直接相关的成分，它们的功能，
25 效果及应用将在后面详细表征，它们的溶液也会详细列举出来。

a) 免疫成分

根据本发明，免疫活性成分由下列任一组成：

- 1) 完整的蛋黄抗体 (IgY)，IgY 片段，Fab 结构或
- 30 2) 嵌合的蛋黄抗体，即通过生化手段人源化的 IgY 或，优选的

是通过遗传技术从转基因 SPF 鸡的蛋中获得的人源化 IgY。

在这点上，Fab 片段可以是一价、二价或三价，可以单特异性、双特异性或三特异性方式发挥效应（即它们可以识别一个、二个或不同的抗原决定簇）。Fab 片段可以通过酶消化产生。嵌合抗体可以通过把禽源片段和另一生物的 Fc 片段连接而成（在这点上，优选的是人 Fc 片段）。可以从转基因鸡中获得人源化的 IgY，其中只有高可变区是来自鸡 IgY，而所有的恒定区均来自人 IgG。利用嵌合抗体，不仅可能减少或防止抗 IgY 的不需要抗体的形成，而且使得利用人 IgG 恒定区的效应机制成为可能。

b)信号物质

包含在本发明的 IgY 共轭物中的诊断用成分是信号物质，如放射性核素（ γ 发射体，如钨 99m，铟 111，碘 123，碘 125，碘 131，铀 201，硒 75，镓 67，氙 133），酶（如过氧化物酶，碱性磷酸酶和半乳糖苷酶），光敏剂（卟啉衍生物等）或染料（氟化铬，胶体金）。10-1850MBq(27-50mCi)的活性对闪烁照相诊断是必需的，这取决于应用的目的方式，抗体亲和力及核素。具体而言，例如，对于碘 131，37-370MBq(1-10mCi)(优选的是 37-74MBq)可以考虑，对于碘 123，185-370MBq(5-10mCi)可以考虑，对于钨 99m，74-1480MBq(2-40mCi)(优选的是 74-740MBq(2-20mCi))可以考虑，对碘 111 和镓 67，74-185MBq(2-5mCi)可以考虑，或者对于硒 75，大约 10MBq(27mCi)则可以考虑。

c)活性剂

作为一种治疗成分，本发明的 IgY 共轭物可选择性地或附带地包含放射性核素（ β 发射体， α 发射体或螺旋电子发射体），例如，磷 32，锶 89，钇 90，碘 125，碘 131，钷 153，钆 169，镱 186，镱 188，氙 85，铯 166，碲 211，铋 212，铋 213，镭 224，钷 225。像诊断中一样，放射性免疫疗法中所需的活性取决于几个因素：疾病的种类，病变细

胞对放射的敏感度，将要治疗的细胞的质量，扩散的程度及模式，抗原表达，应用方式，抗体亲和力及放射性核素的能谱。例如，对于碘¹³¹，活性范围在 370MBq-11.1GBq(10-30mCi)均可考虑。一般而言，这些活性只能用一次，但可以每隔几周或几个月（优选 3-6 周）分级发生，或者在恢复原状时，它们可被重复直至总剂量为 40-80GBq(1-2Ci)。肿瘤特异性 IgY 和细胞抑制剂的结合可以减少传统化疗的不利。肿瘤学中的一个最大的问题是在阶段检查中有限诊断的不确定性（尤其缺乏技术来证明或排除微转移的存在）以及由于高毒性及同时产生的低特异性而导致细胞抑制剂窄的治疗范围。相对治疗过程而言，这些因子会不停地导致显著的不确定性。由于抗体而产生的具低副作用的特异细胞抑制剂将有利于对化疗做出决定，也因此将会有助于减少复杂的昂贵的和/或费力的阶段检查。从本发明来说，蛋黄抗体也可和不同的细胞抑制剂结合（如 alkylants，长春花生物碱，居间抗生素，抗代谢物，紫杉醇）。本发明的 IgY 共轭物也可包含作为治疗活性成分的毒素（蓖麻毒蛋白 A，相思豆毒蛋白，假单孢菌外毒素，白喉毒素，gelonin 及其它）。化疗药物（细胞抑制剂，抗生素，抗病毒物质），纤溶剂（如链激酶，尿激酶，rt-PA），用来激活前体药物的酶（如细菌羧肽酶 ECPG2，它能催化还原或非还原叶酸的水解）或前体药物本身也适合作为本发明的 IgY 共轭物中的治疗成分。最后，本发明的 IgY 共轭物可以包含作为有效成分的光敏物质，用于通过光动力学疗法来选择性地破坏病变细胞。例如，光敏剂可以是 photofrin, 5-氨基乙酰丙酸或 Foscan。

d)加强分子

对于诊断和治疗应用，本发明的 IgY 共轭物可以包含生物素，用来增强以亲和素-生物素或链亲和素-生物素结合为基础的信号和效果（所谓的预靶向）。此外，IgY 共轭物的信号和效果可以通过与 IgY 分子进一步结合成分（如补体）而得到增强。

e)佐剂，补充措施

为了优化治疗的目标，本发明的 IgY 共轭物可以和别的活性剂结合。禽源抗体可以起始人抗 IgY 抗体的形成。这样，IgY 共轭物的重复使用会中和用于诊断和治疗的抗体或甚至于产生过敏反应。例如可以利用环孢菌素来抑制免疫系统，从而防止这种现象发生。另一方面，使用放射性碘可以导致甲状腺不需要地暴露在放射线中。为此，在这种情况下，用 IgY-碘 131 进行放射性治疗之前，通过施用碘化钾或高氯酸钠来阻断甲状腺的功能是可取的。在病毒感染的免疫疗法中，自由的病毒粒子将会诱捕 IgY 共轭物，这样 IgY 共轭物对特异性地靶复制病毒的细胞将不再有效的。因此，用一种或多种具抗病毒或抗反转录病毒活性的化疗药物进行预处理，从而减少病毒复制的方法是可取的。如果有必要，可以暂时不施用这种药物疗法，以引发或诱导更新的抗原表达。此外，病毒粒子的释放可通过稳定细胞膜的手段（如 α -干扰素）来降低。另一方面，在休眠病毒感染（如 HIV 或 EBV 感染）中，刺激感染细胞的抗原表达（如利用白细胞介素-2）或利用别的抗病毒剂（如 α -干扰素和/或治疗丙型肝炎过程中的三氮唑核苷）来增加 IgY 共轭物的有效性都是必要的。在细菌感染的治疗中，进一步补充施用活性剂（抗生素）是可取的。以此类推，在肿瘤病中，补充放射性免疫疗法是必需的，这种疗法通过施用细胞抑制剂或通过局部外部辐射的免疫毒素治疗来进行。一般而言，免疫成型剂或旁免疫诱导剂将有利地影响放射性免疫疗法，免疫毒素疗法或光动力学疗法的效果。

f) 标记过程

许多已经建立数年的方法均可用来放射性地标记鼠或人单克隆抗体 (Peters J.H., Baumgarten H.(编):单克隆抗体 (Monoclonal antibodies), Springer-Verlag, Berlin, 1992)。金属的放射性核素如镓 99m, 铟 111 或铷 211 通常利用络合剂 (Complexing agent) 如二乙撑三胺五乙酸 (DPTA) 或去铁敏 (DFO), 或通过将抗体的二硫桥部分还原 (如通过 2-巯基乙醇) 连接到抗体上。许多放射性的碘同位素也可通过直接的亲电取代结合到抗体上被激活的芳族基 (如酪氨酸的酚环)。碘酸

钾 (KIO_3), 溶解的氯胺 T 或吸附到载体 (如聚苯乙烯珠) 上的氯胺 T(碘代珠)或 iodogen (1,2,3,4,6-四氯-3 α , 6 α -二苯基-glycouril) 通常被用作氧化剂, 形成碘离子。每一个单独的抗体至少可以被一种放射性的原子所标记。为了获得更高的亲和力, 而不至于对抗体特定的结合能力有不利的影
5 响, 结合必须在目标抗原存在的情况下进行。它随后又被分开, 因此, 高可变区中放射性核素的结合得以阻止。在抗体氨基反应的基础上, 氟化铬, 光敏剂, 细胞抑制剂, 毒素可以通过许多过程结合到抗体上, 在某种程度上, 也可利用商业上获得的间隔物, 在抗体中插入 SH 基因。其他过程是基于裂解抗体, 释放 SH 基, 而
10 信号物质和活性剂可结合在 SH 基上。此外, 抗体的碳水化合物残基可被过碘酸所氧化, 过碘酸会产生信号物质和活性剂可结合的醛基。最后, 双功能或三功能 Fab 结构可以通过活性剂结合到分子的一或 2 个 Fab 片段上, 并利用自由的 Fab 片段停靠到目标抗原上。

15 g)成型方法

在本发明中, 带有 IgY 制备物的标记试剂盒 (制剂试剂盒) 可用来提供放射性免疫共轭物, 以使用户利用通常半寿期短的放射性核素将它们原位标记。假设半寿期足够长, 和核素结合的 IgY 制备物 (即完全的放射性免疫共轭物) 也可直接提供给用户。在标记试剂盒或全
20 部制备物中, IgY 制备物或现成的放射性免疫共轭物以一种无菌等渗的注射液获得, 如果有必要, 也可带有合适添加剂 (如稳定剂) 的缓冲液 (优选 PBS, pH7.4), 并且包装在一个合适的容器中 (塑料/玻璃安瓿瓶/刺吸小瓶, 假设有必要, 也用铅制容器, 深层冷却到 4~-20EC)。在标记试剂盒中, IgY 制备物在第一个安瓿瓶/刺吸小瓶中, 而还原剂 (例如用镅 99m 标记) 或氧化剂 (如用碘 131 标记) 则放在
25 第二个安瓿瓶/刺吸瓶中。为了纯化放射性免疫共轭物, 每个标记试剂盒可包含一个层析柱以及用于控制质量的一套薄层层析装置。根据给定的需求, 标记试剂盒可以包含用于一个或若干个应用的 IgY 制备物或现成的 IgY 共轭物。

根据本发明，提供了下列使用和应用领域：

5 a)总的使用领域：根据本发明，IgY 制备物能和下列许多抗原反应：生理分子，肿瘤特异性抗原，传染性的病原体及它们的抗原，朊病毒及 RNS-或 DNS 部分或者与其相关的分子。根据信号物质或活性剂的不同（放射性核素、酶、纤溶剂、染色剂、光敏剂、毒素），本发明的 IgY 共轭物可以用于肿瘤，传染病，凝血缺损病和自身免疫病的体外和体内诊断和治疗。

10 b)生理性目标抗原：根据 CD 分类（NK 细胞抗原，B 细胞抗原，myeloic 抗原，祖抗原，激活抗原，附着抗原，细胞因子受体），可视为本发明 IgY 共轭物的分子中有白细胞抗原，以及胞内分子（例如细胞角蛋白），受体（雄激素受体，雌激素受体，多巴胺 D2 受体或促生长素抑制素受体等）或如凝血因子（如血纤蛋白或纤溶酶原）。

15 c)病理目标抗原：可考虑用于 IgY 共轭物的肿瘤特异性抗原有预定的高表达白细胞抗原（如 CD20, CD22），高表达的雄激素或雌激素受体，降钙素，甲状腺球蛋白以及范围更小一点的肿瘤标记物，如 Egp34, Ca 15-3, 唾液酸-Le^a-抗原, BCA225, 黑色素瘤相关抗原（MMA），CEA, 17-1A, PAP, 神经元特异性烯醇化酶（NSE），末端脱氧核苷酸转移酶（TdT），溴脱氧尿苷（BrdU），Ki67, PCNA, 髓过氧化物酶（MPO）和突变的 p53。可以被本发明 IgY 共轭物靶向的传染性病原体有细菌（炭疽杆菌，疏螺旋体，布鲁氏菌，分枝杆菌，绿脓杆菌（*Pseudomonas aeruginosa*），沙门氏菌，葡萄球菌，弓形虫，密螺旋体属，锥虫），病毒（HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HCV 和其它黄病毒，HBV, EBV, HSV, HHV-8, 柯萨奇病毒，脊髓灰质炎病毒，cymegalo 病毒，流感病毒，风疹病毒，乳头瘤病毒，登革病毒，汉坦病毒，沙粒病毒（*arenavirus*），布尼亚病毒（*bunyina virus*），丝状病毒），原生动物（疟原虫，弓形虫，棘阿米巴），霉浆菌（*mykoplasma*），真菌（念珠菌属，曲霉属），寄生虫（蛔虫，棘球包虫（*echinococci*），
20
25
30 利氏曼原虫，罗阿丝虫，旋盘尾丝虫，*masonella*，布氏丝状虫，囊尾蚴，

血吸虫，班氏丝虫）和传染性粒子（朊病毒）。传染性病原体的抗原决定簇在以本发明 IgY 共轭物作为靶的肿瘤诊断和/或治疗中也很重要，如伯基特淋巴瘤，鼻咽癌，何杰金病，T 细胞淋巴瘤和免疫母细胞性淋巴瘤，它们的特点是表达 EBV 相关抗原（EBNA 1-3, LMP 1-2），
5 在 Sarkosi-Sarkom 和 AIDS 相关淋巴瘤中，这两种肿瘤均和 HHV-8 相关，或者和 HTLV-1 感染相关的成人 T 细胞白血病（ATL）或和 HPV 相关的生殖癌中。

d)应用的形式：

10 根据需要，本发明的 IgY 共轭物可以体外或体内应用。体内应用时，可以外用或内用(如在光动力学治疗以及肠胃外应用的情况下（如采用闪烁照相术，SPECT，放射性免疫疗法或放射性毒素治疗）)。如在这里使用一样，术语“肠胃外”包括静脉内，动脉内，皮下，皮内，鞘内，间质，海绵窦内和病斑内或肿瘤内的应用。

15 本发明将在后面的实施例中详细地解释和描述。从附图和说明书中概括出来的特征将在本发明的其它实施方案中以单一形式或与相互间任何所需的组合形式应用。下列应用和实施方案仅代表一些实施例，这些实施例并没完全提出基于 SPF 鸡的本发明 IgY 共轭物的可能性。本领域的技术人员将因此会进一步推断出其他的实施方案和应用，
20 这些方案和应用都落入了本发明权利要求中的范围。

在附图中：

图 1：描绘的是鸡免疫球蛋白及用作比较的哺乳动物免疫球蛋白。

25 图 1a：表示鸡 IgY。

图 1b：表示哺乳动物包括人的 IgG。

图 2：表示在完整 IgY 基础上的放射性免疫共轭物。

图 3：表示在单价 IgY Fab 片段基础上的放射性免疫共轭物。

图 4：描绘的是在二价 IgYF(ab)₂ 基础上的放射性免疫共轭物。

30 图 5：描绘的是三个融合的 IgY Fab 片段（三价 Fab 结构）基础

上的放射性免疫共轭物。

图 6: 描绘的是人源化 IgY (IgYFab+人 Fc) 基础上的放射性免疫共轭物。

图 7: 描绘的是完整 IgY 基础上的免疫毒素。

5

实施例 1:

为了获得本发明的 IgY 共轭物, 用 50-1,000 μ g(优选的是 50-200 μ g)目标抗原或其片段和弗氏完全佐剂, 优选在第 14 周对 SPF 鸡或转基因的 SPF 鸡进行皮下 (s.c.) 免疫, 优选的是肌肉 (i.m.) 免疫。紧接着 3 次加强免疫, 直到 IgY 的效价达到最大值, 然后在几乎整个产蛋期分别用 50-1,000 μ g(优选的是 50-200 μ g)同样的抗原和弗氏不完全佐剂进行三次维持免疫, 以使 IgY 效价保持在最大。例如每次注射液包含 1mL 抗原悬浮液和 0.5mL 佐剂, 因此用于 SPF 状态鸡的优选的免疫方案按下列时间顺序进行。

15

第 0 天*: 第一次免疫 (基础免疫) 肌肉注射;

第 28 天: 第二次免疫 (第一次加强免疫) 肌肉注射;

第 56 天: 第三次免疫 (第二次加强免疫) 肌肉注射, 产生 IgY;

第 84 天: 第四次免疫 (第三次加强免疫) 肌肉注射, 产生 IgY;

20

第 168 天: 第五次免疫 (第一次维持免疫) 肌肉注射, 产生 IgY;

第 252 天: 第六次免疫 (第二次维持免疫) 肌肉注射, 产生 IgY;

第 336 天: 第七次免疫 (第三次维持免疫) 肌肉注射, 产生 IgY;

第 490 天: 终止产生 IgY。

*: 生命的第 14 周。

25

在 12-14 个月时, 保持在 SPF 状态的鸡下的蛋可以收集和加工。根据 Schade 等的标准方法, 蛋黄最初从蛋清中分离出来, 并被加工 (鸡蛋黄抗体的生产及应用 (Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application) Springer-Verlag, Berlin, 2001[1])。SPF 鸡的明显优势在于它们是 SPF 鸡的后代并保持在 SPF 条件下, 因此在免疫学上不会由于

30

免疫或特异性传染病带来的不利影响。因此，这些动物会和它们用来免疫的抗原产生特别剧烈的免疫应答，这样产生的特异抗体在量级上（50-90%的特异性 IgY）要高于对常规鸡的免疫。此外，在加强免疫后，通过重复的维持免疫长达生命的 16 周，可使特异性抗体的高效价保持稳定。按照本发明，这对于 IgY 共轭物是很有意义的，因为已经很好地证明，通过对免疫记忆不停的刺激，使淋巴细胞群发生改变，从而形成特别高亲和力的抗体。出于这个原因，来自 SPF 鸡蛋中的 IgY 制备物和来自常规鸡的 IgY 制备物在对特异性抗原的亲合力上也存在差异。在一个分子平面上，更高亲和力被这些抗体的高可变区的结构所制约，相对于低亲和力抗体的高可变区的结构，它们和抗体更匹配。按照本发明，来自 SPF 鸡的 IgY 共轭物在最终的分析中，和来自常规鸡的 IgY 共轭物在分子平面（即它们高可变区的特定结构）上存在可复制的差异。

15 实施例 2

本实施例描述的是来自转基因鸡的人源化的 IgY 的产生。转染以如美国专利 5,162,215, 6,020,465 和 WO 00/75300 所描述的本身已知的方式进行。它也可以通过公鸡的精子进行微注射来完成。这个特征然后通过人工授精插入卵细胞并传给后代。此外，也可通过对精子进行反转录病毒感染来完成转染。一个复制缺陷的反转录病毒携带有人 Fc 片段基因，人 IgG 恒定区的基因片段可以通过同源重组整合进 SPF 鸡的免疫球蛋白基因位点。其中在人的“敲进 (knock in)”基因靶向载体携带有和人 IgG 恒定区的外显子同源的序列和启动子。新霉素，胸苷激酶表达盒及禽源 IgY 恒定区的缺失均可利用短暂的 Cre-重组酶表达来完成。用这种方式，转基因鸡通过微生物途径把人源化 IgY 的基因传递给它们的后代。转基因鸡的选择可利用血液或鸡蛋白的人恒定区来证明 IgY。ELISA, Western 印迹或 PCR 适合用来检测人源化抗体。

30 实施例 3

由于完整抗体从血液中消失得慢 (HWZ: 1-3), 因此在免疫闪烁照相中, 其通常有足够长的检查时间, 直到获得将要呈递的病斑和背景之间的最佳对照。在治疗应用中, 问题更可能存在于难以把完整的抗体放入实体瘤或血脑屏障之外的事实。出于这个原因, 在某些情况下, 基于 Fab 片段的共轭物会提供一些明显的优势。为了制造 Fab 共轭物, 用实施例 1 所描述的方法, 用 50-1,000 μ g (优选的是 50-200 μ g) 目标抗原或其片段对 SPF 鸡或转基因鸡进行免疫。这些鸡蛋用上述的方式进行加工, 而 IgY 通过亲和层析从特定抗原 (目标抗原) 中分离出来, 然后完整的抗体通过酶裂解如利用胃蛋白酶在铰链区进行酶解, 从而获得 Fab 和 Fc 片段。根据特异性的抗原, 特异性的 Fab 片段从 Fc 片段和非特异性 Fab 片段中通过亲和层析被分开和分离出来。用这种方式得到的 Fab 片段在无菌环境下过滤。它们可以标记试剂盒的形式用于临床, 和一种半寿期短的放射性核素 (如锝 99m) 结合, 这种试剂盒的第二个刺吸小瓶中装的是用于标记的还原剂。放射性的免疫共轭物也可以由制造者用半寿期长的放射性核素 (如碘 131) 集中标记, 然后被分发。在这种情况下, 按照当前管理放射性保护的规则, 运输到用户手中必须是在标记的同一天, 这样就能使由于放射性核素衰变及抗体解离而导致的产物质量损失降到最低。如果 IgY 制备物是和化疗药物, 毒素, 氟化铬, 酶或前体药物结合, 集中标记也有可能。

实施例 4

如今, 不明确的贵重放射性源通过粒细胞闪烁照相术可通过一种有差异的诊断方式加以阐明。目前用的鼠源单克隆抗体均能识别在早幼粒细胞, 中幼粒细胞和粒细胞中表达的非特异交叉反应的抗原, 不管是 NCA-95(=CD66b) 还是 NCA-90(=CD66c)。它们标记有诊断用放射性核素 (γ 发射体), 然后通过静脉内注射。在血液和传染源中, 它们和粒细胞结合。通过这种方式, 感染过程, 如骨髓炎, 能通过闪烁照相术显示出来。为了制造本发明的放射性免疫共轭物, 采用如实施例 1 所述的方式, SPF 鸡用 NCA-90 或 NCA-95 或其片段免疫和加

强免疫。NCA-90 或 NCA-95 特异性 IgY 分别根据 NCA-90 和 NCA-95，通过亲和层析分离出来。然后，无菌的 IgY 作为一种标记试剂盒在商业上销售，例如，带有 1mg 的等渗 NaCl，第二个刺吸瓶中有还原剂。为了标记得 99m，用户原位制备的抗 NCA-IgY-Tc-99m 在利用试剂盒附带的柱子分离出未结合的放射性核素，并且用高效液相层析（HPLC），或者优选采用薄层层析对终产物的放射性化学纯度进行最终质量控制后可以通过静脉注射。和只能识别和结合一个抗原决定簇的常规单克隆抗体相比，NCA90 或 NCA95 上不同的抗原决定簇可以同时被多克隆的蛋黄抗体识别，从而导致相对背景而言带有高特异吸收的改进的图像再现。

实施例 5

IgY 共轭物也可用来检测淋巴结。当淋巴腺和恶性黑色素瘤，乳房或前列腺癌一起出现时，扩大的淋巴腺切除通常和高的发病率联系在一起。从这个原因考虑，对位于肿瘤旁流区域的淋巴结转移进行检测可以为治疗过程提供很重要的信息。迄今为止，用标记有 Tc99m 或 Tc99m 毫微胶体（nanocolloid）的胶体白蛋白（colloidal albumen）进行了这方面的工作。这个粒子的直径是 100-1,000nm。在瘤周围注射放射性胶体后，用 γ 相机上，以 15 分钟到大约 6 小时的间隔，按规定程序制作三个连续的平面图。这个方法的缺点在于粒子的大小和缺乏肿瘤特异性。一方面，大量的放射性活性剂仍留在注射位点，使通过多余辐射进行的淋巴结呈递变得复杂。另一方面，不用感染而能进行淋巴结的呈递也就被证明了。相反，如果应用淋巴细胞特异或肿瘤特异的放射性免疫共轭物，这些缺点在一定程度上或全部被避免。溶解的 IgY 或 Fab 共轭物通过淋巴通道比胶体白蛋白引流得更快，这样就使得注射位点的残余活性更少，因此淋巴结就更高密可见。同时，由于抗体能结合到与淋巴细胞或转移的肿瘤细胞特异性结合的淋巴结上，所以产生了一种特异性的检测方法。这些淋巴结也可能在手术期内检查，然后用合适的 γ 探针切除。此外，或者说除了检查淋巴结外，如果在诊断中使用了含治疗用核素（如碘 131）或毒素（紫杉醇）的 IgY

共轭物或第二 IgY 共轭物，那些淋巴结或淋巴结转移容易遭受大量的选择性放疗或化疗。可以用抗 p210 的放射性免疫共轭物来检查黑色素瘤的淋巴结转移，p210 是一种黑色素瘤相关抗原 (MAA)。为了获得本发明的放射性免疫共轭物，根据实施例 1，用 50-1,000 μ g (优选的是 50-200 μ g)p210 对 SPF 鸡进行免疫。IgY 从蛋黄中被分离出来。然后用无菌方式过滤纯化的 IgY，并把它冻干或悬浮在灭菌的等渗 PBS (pH7.4) 中。例如，从商业上获得的制备物试剂盒包含，在第一个刺吸小瓶中有 100mg 特异性 IgY，而第二个刺吸小瓶中则是用 Tc99m 标记的还原剂。在计划检查之前，IgY 制备物和 10-1,000MBq (优选的是 20-100MBq) Tc99m 立即结合。在瘤周围组织注射放射性免疫共轭物后，用 γ 相机根据程序从三个平面摄平面图，时间长达 24 小时 (优选 3-6 小时)。如果有必要，也可以对质疑的区域补充用 SPECT 检测。此外，受影响的淋巴结可在以后的手术期内用合适的人工检测装置进行检测，然后选择性地去除。

15

实施例 6

用放射性免疫共轭物通过闪烁照相术来诊断内分泌肿瘤。嗜铬细胞瘤，成神经细胞瘤，类癌和副神经节瘤均是从神经内分泌 (APUD) 系统的细胞发育而来，而神经内分泌系统的细胞遍布机体全身。这样，它们一般都具有促生长素抑制素受体，利用这些受体，神经内分泌肿瘤在标记有铟 111 的奥曲肽 (octrotide) (促生长素抑制素类似物) 的帮助下，在闪烁照相中是可见的。然而，促生长素抑制素类似物以 1:1 的比率结合到受体上。而多克隆的 IgY 则能识别受体上的几个抗原决定簇。这样就会导致更好地靶向和诊断改进的图像再现。为了获得抗促生长素抑制素受体的 IgY 制备物，用实施例 1 所述的方法对 SPF 鸡再次进行免疫。这种特异性的 IgY 在商业上以实施例 3, 4 或 5 所述的标记试剂盒形式提供。它可以被用户用 γ 发射体 (如铟 99m) 原位标记。在静脉注射 100mg 特异性的 IgY-Tc99m(10-1,000MBq, 优选的是 50-200MBq)后 1-24 小时，在两个平面上摄取平面图，如果有必要，也可采用 SPECT。在手术期内，通常很难检测的神经内分泌肿瘤在下

20

25

30

列操作程序中，则很容易被发现和切除。

实施例 7

放射性免疫共轭物的进一步应用是治疗非何杰金氏淋巴瘤。低恶性的非何杰金氏淋巴瘤对化疗应答很弱。而放射性免疫疗法在这种情况下表现得特别有效。在大多数研究中，碘 131 标记的鼠源单克隆抗体被用来抗 CD20，CD20 是一种抗原，它在 95% 的 B 细胞淋巴瘤细胞表面表达。然而，单克隆抗体只能识别这种抗原的一个抗原决定簇。结合比率也因此只有 1:1。相反，用能同时识别这种抗原若干表位的 CD20 特异的 IgY 可以改善寻靶。在这种方式中，减少骨髓接触放射线，而在没必要移植骨髓的情况下，可提高放射剂量的应用。用亲和素或链亲和素标记的单克隆抗体和放射活性剂标记的生物素进行预靶向，从而减少放射剂量。通过一个寻找蛋白的预靶向过程，放射性免疫疗法中 IgY 的治疗效果也可以得到改进。为此，如实施例 1 的方法，用 50-1000 μ g (优选的是 50-200 μ g) CD20 对 SPF 鸡进行免疫。在 12-14 个月的产蛋期，收集鸡蛋，根据 IgY 和 CD20 的结合，用亲和层析分离和纯化完整的 IgY。为了预靶向，特异的 IgY 以一种无菌的方式进行过滤，和亲和素（或链亲和素）结合，然后另与助剂一起冻干或溶解在等渗 NaCl 溶液（或 PBS，pH7.4）中。在这种情况下，标记试剂盒中优选含有，第一个刺吸小瓶中是 IgY-亲和素共轭物（100 μ g-5mg，优选的是 1mg），第二个刺吸小瓶中是以冻干状态或溶解状态存在的生物素（11-1,000 μ g），而第三个刺吸小瓶中是用于标记碘 131（1-4MBq）的氧化剂（例如 iodogen）；此外，进一步含有诸如层析柱和 DC 试剂盒的助剂。或者，生物素也可以由制造商集中标记，然后和 IgY-亲和素共轭物一起被分送。通过静脉注射 IgY-亲和素共轭物以标记淋巴细胞，从而起始治疗。在此后的 1 至几天，再通过静脉注射碘 131 标记的生物素。或者，放射性免疫疗法也可用 α 发射体如钷 211 来进行。

实施例 8

大约半数的乳腺癌含有雌激素受体，并取决于激素。抗雌激素受

体的蛋黄抗体不仅仅能竞争性抑制受体上的雌激素结合，作为一种放射性免疫共轭物，它们还适合用来检测转移和用于内部放疗。为了免疫 SPF 鸡，带有雌激素受体的胞外抗原决定簇的多肽被应用。SPF 鸡的免疫以及鸡蛋的制备和 IgY 的纯化都按实施例 1 所述的方法进行，
5 以及根据上述其它实施例之一进行生产。

实施例 9

商业上获得的抗体如 URO7 能识别肾细胞癌，但不能和健康肾组织结合。因此肾细胞癌及它们的转移可以通过放射性免疫共轭物被特异性地检测和/或治疗。为了鉴定一个合适的抗原，匀浆肾癌细胞得到的蛋白可通过电泳被分开和分离。SPF 鸡用这些抗原来免疫，并用肾癌细胞或具特异性和交叉反应性的生理组织来检查产生的蛋黄抗体。只能识别恶性细胞的选择性抗体和治疗用放射性核素如碘 131 或和细胞毒素如蓖麻毒蛋白 A 结合并被用于治疗。
10

15

实施例 10

放射性免疫共轭物的进一步应用见于 HIV 感染的治疗中。在 HIV 感染中，反转录病毒基因组被整合进宿主细胞的染色体。HIV 感染不可能用传统的复制抑制剂来治疗。HIV 复制宿主细胞在其细胞表面表达 HIV 结构蛋白 (p24, gp120 和 gp41)。抗这些结构蛋白的抗体能识别这些细胞并和其结合。假设它们和放射性核素或另一种细胞毒素结合，它们会破坏这些细胞，因此，也就破坏了 HIV 产生的场所。有效靶向细胞的前提是血液中的自由细胞数目减少，例如利用抗反转录病毒药物补充复制抑制。这开辟了有效治疗 HIV 感染的新的可能性。从序言中提及的那些原因考虑，使用来自 SPF 鸡特异性 IgY 的多克隆抗体比 DE198 09 785 中所述的那种单克隆抗体更具优点。为了生产抗体，如实施例 1 所述，用 HIV p24, HIV-1 gp120 或 HIV-1 gp41 对 SPF 鸡进行免疫。保持在确定条件下的鸡蛋在 12-14 个月产蛋期收集。蛋黄从蛋清中分离出来，而 IgY 通过一种标准方法分离。HIV 特异的抗体通过亲和层析与特异性抗原结合而被纯化，而非特异的 IgY 则被去
20
25
30

除。无菌的 IgY 制备物和一种治疗用放射性核素结合（如碘 131 或砷 211）。一般来说，对每一次治疗应用，100 μ g 的特异 IgY 都用 1-4GBq 的碘 131 来标记。在 HIV 感染的情况下，由于感染细胞数相对低（和淋巴瘤恶性退化细胞数比较），基本上较低的活性可被证明是有效的。标记可以通过不同的确定程序来进行。IgY-碘 131 可优选由 iodogen 方法来生产。放射性免疫共轭物结合以后的产量以及和未结合的放射性核素分离以后的纯度可以通过 HPLC 或 DC 来控制。在无菌设备中制备和/或无菌过滤的放射性免疫共轭物可以等渗溶液的形式输注。

10 实施例 11

此外，IgY 共轭物可以用来治疗自身免疫疾病。CD-4 阳性细胞在自身免疫疾病的病理上和机体移植的排斥反应中扮演了重要的角色。对于 M. Crohn，抗 CD4 受体的单克隆抗体表现在红斑狼疮，风湿关节炎，但在小鼠皮肤移植后效果并不显著。为了产生有效的 CD4 阳性细胞损耗，抗体能和治疗用的放射性核素、细胞抑制剂或毒素结合在一起。根据实施例 1，SPF 鸡被免疫抗 CD4 或 CD4 片段。完整的 IgY 从蛋黄中分离出来，而 CD4 特异的 IgY 可以通过 CD4 的亲亲和层析纯化出来。如果有必要，抗体可以被酶切，禽源 Fc 片段可以被 Fc 片段所取代。然后，根据本发明，IgY 制备物可以以非结合状态或标记有放射性核素的 IgY 共轭物的形式被销售用于临床应用（优选的是静脉注射）。

实施例 12

IgY 制备物用于治疗血栓，是它的一种进一步应用。血栓一般通过全身性应用纤溶剂（链激酶，尿激酶，rt-PA）来治疗。链激酶被体内蛋白酶快速地降解，而尿激酶和 rt-PA 可以被肝快速代谢掉。它在把纤溶剂固定到血栓上有用处（Bode 等，J. Biol. Chem, 1989, 264(2):944-8; Lijinen 等，Thromb Res, 1990, 57(3):333-42）。SPF 鸡或转基因鸡可以用实施例 1 所述的方法免疫抗人血纤蛋白。特异性的 IgY 被分离和纯化。如果有必要，可以将抗体进行酶切，从而将 Fc 片段

5 分离出来。然后完整的 Fab 片段抗体 (5-50mg) 和 rt-PA (5-50mg) 结合, 优选的比率是 1:1。这些 IgY 制备物可以冻干状态或以无菌溶液形式被提供用于注射目的。通过合适大小的包装用来治疗深层腿部血栓、肺部栓塞、脑血管损伤或心肌梗塞。此外, 第二组 SPF 鸡被免疫来抗 rt-PA (优选的是活性中心外的区域)。第一组 Fab 片段可以和第二组 Fab 片段进行杂交。用这种方式, 通过一个分支途径, 血纤蛋白特异的双功能 Fab 片段可以被生产用来和 rt-PA 结合。

实施例 13

10 IgY 制备物和光敏剂结合在一起用于光动力学诊断或治疗。光动力学治疗代表一种创伤性极小的治疗手段, 主要用于治疗皮肤或粘膜表面癌, 卡波氏肉瘤和黑色素细胞瘤。它是建立在肿瘤选择性富集光敏物质基础上的一种疗法, 通过吸收光波, 光敏物质会产生光动力作用 (荧光或细胞受伤自由基的形成及肿瘤血管形成的破坏)。光动力学疗法的成功在很大意义上依赖于光敏剂在坏死和健康组织中的相对分布。光敏剂在肿瘤细胞中的固定可被肿瘤特异抗体显著地增强, 如食管癌或恶性的黑色素瘤。诊断和治疗可以通过合适的光源进行。在诊断应用中, 紫光会引发恶性退化细胞发出荧光。在光动力学疗法中, 15 恶性退化组织在红光冲击下变成坏死。

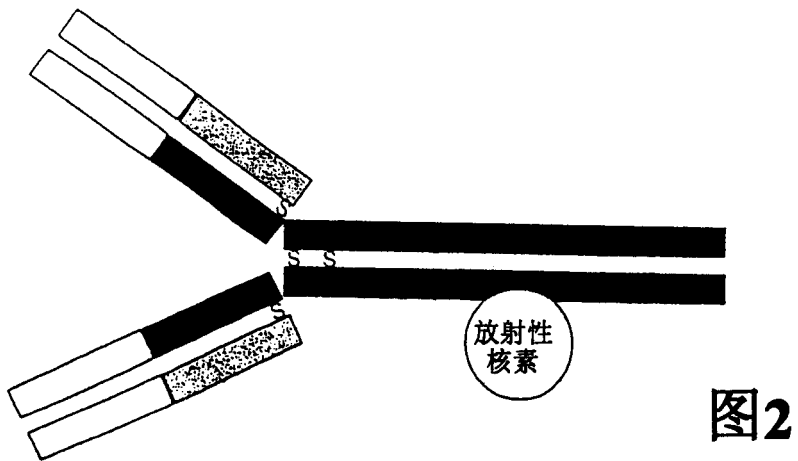
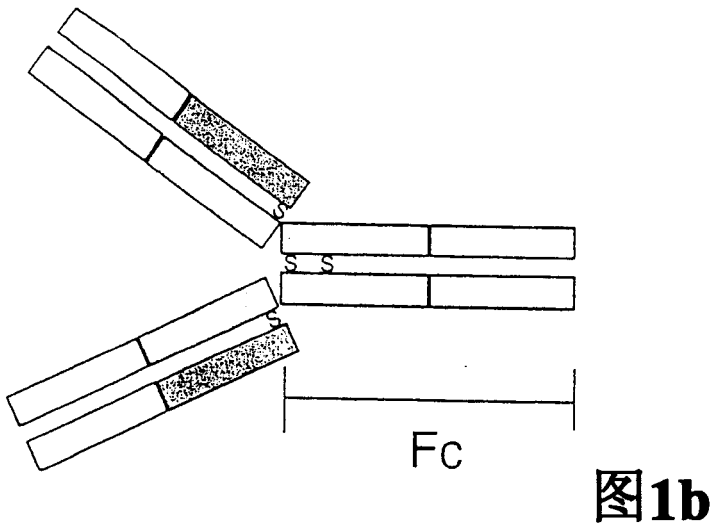
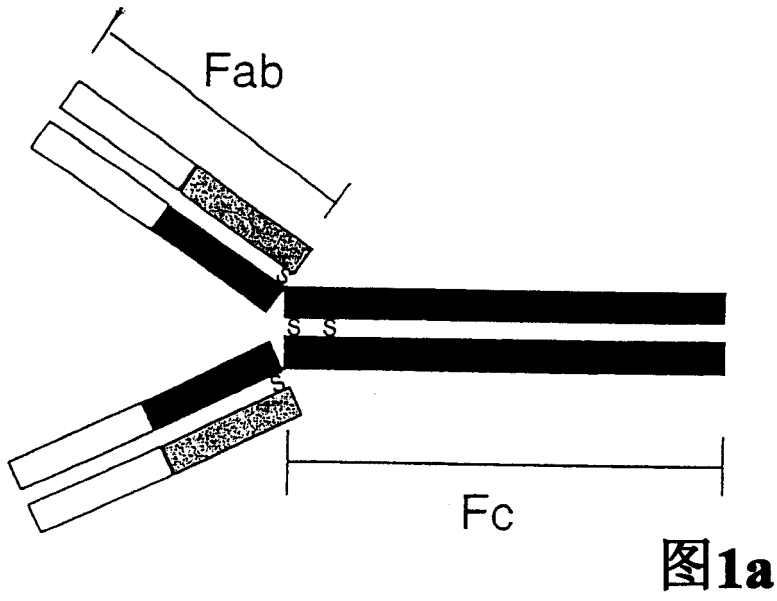




图3

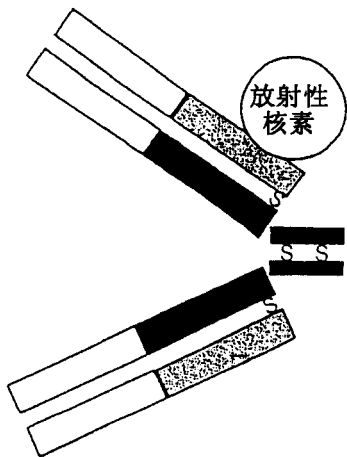


图4

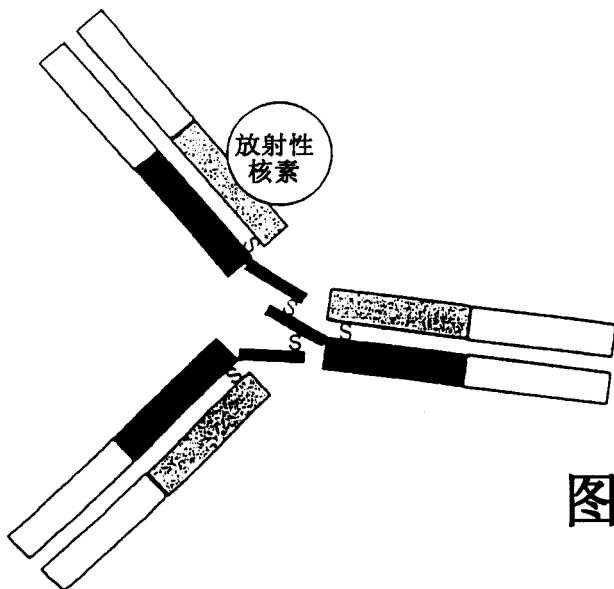


图5

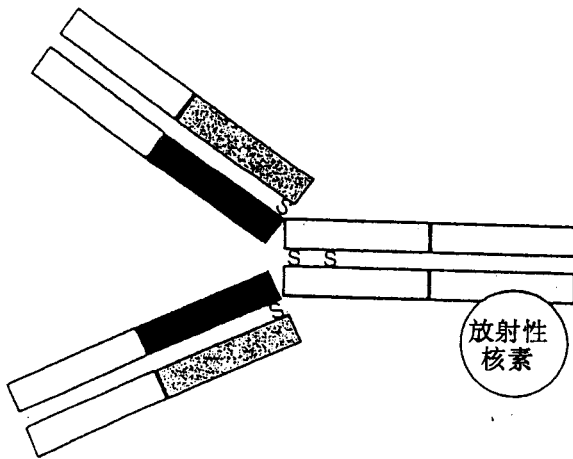


图6

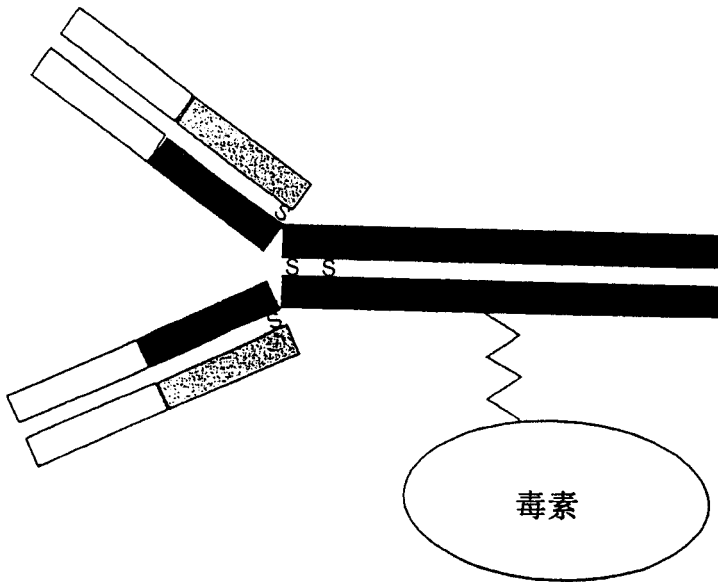


图7

专利名称(译)	由蛋黄抗体制成的免疫共轭物及其成型方法和在诊断和治疗中的应用		
公开(公告)号	CN1509188A	公开(公告)日	2004-06-30
申请号	CN02809886.2	申请日	2002-05-03
发明人	沃尔夫冈·贝格特 哈特穆特·科比尔克		
IPC分类号	G01N33/531 A61K39/395 A61K41/00 A61K47/48 A61K51/00 A61K51/10 A61P7/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02 A61K49/00		
CPC分类号	A61K41/0057 A61K51/1093 A61K47/48753 A61K51/1036 A61K51/1027 B82Y5/00 A61K51/1006 A61K41/0071 A61K47/6898 A61P7/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02		
代理人(译)	丁业平 王维玉		
优先权	10123505 2001-05-15 DE		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及来自蛋黄抗体(IgY)中的免疫共轭物及其成型方法和在诊断和治疗中的应用。本发明的一个目的就是推出一种传统免疫共轭物的替代产品，用于诊断和治疗。就纯度和抗原靶向而言，根据本发明制备的免疫共轭物优于单克隆抗体和来自哺乳动物中的免疫血清以及优于来自常规鸡的IgY制备物。如果有可能，人抗IgY抗体的产生将会被避免，免疫共轭物以公正地对待动物保护的方式大量经济的产生。根据本发明，通过来自SPF鸡，优选转基因SPF鸡的完整蛋黄抗体(IgY)的多克隆IgY共轭物，IgY片段，Fab结构或人源化的蛋黄抗体可以完成此目的。抗原或抗原片段将作为免疫有效成分和至少另外一种的成分结合在一起，另外一种成分可以是信号物质，和活性剂或加强分子。

