(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102225200 A
(43)申请公布日 2011.10.26

(21)申请号 201110161052.3

(22)申请日 2006.03.02

(30)优先权数据
60/659,339 2005.03.07 US

(62)分案原申请数据
200680015597.0 2006.03.02

(71)申请人 健泰科生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 阿维.J.阿什克纳齐 希瑟.梅克尔

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 张红春

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 11/06(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 52 页
序列表 3 页 附图 20 页

(54)发明名称

用于调控TWEAK和FN14活性的方法和组合物

(57)摘要

提供了调控TWEAK和TWEAK受体活性的激动剂和拮抗剂。本发明的方法、组合物和试剂盒可用于治疗诸如癌症和免疫相关疾病等病症。

CN 102225200 A

1. 治疗癌症的方法，包括使哺乳动物癌细胞暴露于有效量的拮抗剂分子，其中所述拮抗剂选自：

(1) 抗 TWEAK 抗体；

(2) 抗 TWEAK 受体抗体；

(3)TWEAK 受体免疫粘附素；和

(4) 阻断或截断 TWEAK 受体的胞内信号传导的药剂或分子。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述 TWEAK 受体免疫粘附素包含与免疫球蛋白 Fc 区融合的 TWEAK 受体序列。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述 TWEAK 受体序列包含 FN14 受体的胞外结构域序列。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体结合包含图 11(SEQ ID NO:1) 氨基酸 94-249 的人 TWEAK 多肽。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO:2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

8. 权利要求 1 的方法，其中还使所述哺乳动物癌细胞暴露于化疗、辐射、前体药物、细胞毒剂或生长抑制剂。

9. 增强哺乳动物中 NK 细胞活性的方法，包括对所述哺乳动物施用有效量的拮抗剂分子，其中所述拮抗剂选自：

(1) 抗 TWEAK 抗体；

(2) 抗 TWEAK 受体抗体；

(3)TWEAK 受体免疫粘附素；和

(4) 阻断或截断 TWEAK 受体的胞内信号传导的药剂或分子。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述 TWEAK 受体免疫粘附素包含与免疫球蛋白 Fc 区融合的 TWEAK 受体序列。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述 TWEAK 受体序列包含 FN14 受体的胞外结构域序列。

12. 权利要求 9 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体结合包含图 11(SEQ ID NO:1) 氨基酸 94-249 的人 TWEAK 多肽。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

14. 权利要求 9 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO:2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

16. 增强哺乳动物中先天性 T_H1 应答或活性的方法，包括对所述哺乳动物施用有效量的拮抗剂分子，其中所述拮抗剂选自：

(1) 抗 TWEAK 抗体；

(2) 抗 TWEAK 受体抗体；

(3)TWEAK 受体免疫粘附素；和

(4) 阻断或截断 TWEAK 受体的胞内信号传导的药剂或分子。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述 TWEAK 受体免疫粘附素包含与免疫球蛋白 Fc 区融合

的 TWEAK 受体序列。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述 TWEAK 受体序列包含 FN14 受体的胞外结构域序列。

19. 权利要求 16 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体结合包含图 11(SEQ ID NO :1) 氨基酸 94-249 的人 TWEAK 多肽。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

21. 权利要求 16 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO :2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

23. 治疗哺乳动物中 TH2 介导的病症的方法，包括对所述哺乳动物施用有效量的拮抗剂分子，其中所述拮抗剂选自 ：

(1) 抗 TWEAK 抗体 ；

(2) 抗 TWEAK 受体抗体 ；

(3)TWEAK 受体免疫粘附素 ；和

(4) 阻断或截断 TWEAK 受体的胞内信号传导的药剂或分子。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述 TWEAK 受体免疫粘附素包含与免疫球蛋白 Fc 区融合的 TWEAK 受体序列。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述 TWEAK 受体序列包含 FN14 受体的胞外结构域序列。

26. 权利要求 23 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体结合包含图 11(SEQ ID NO :1) 氨基酸 94-249 的人 TWEAK 多肽。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

28. 权利要求 23 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO :2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

30. 权利要求 23 的方法，其中所述 T_H2 介导的病症是变态反应或哮喘。

31. 治疗免疫相关病症的方法，包括对哺乳动物施用有效量的激动剂分子，其中所述激动剂选自 ：

(1) 抗 TWEAK 受体抗体 ；

(2)TWEAK 多肽 ；和

(3)TWEAK 多肽变体。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO :2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

33. 权利要求 32 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

34. 权利要求 31 的方法，其中所述免疫相关病症是自身免疫病。

35. 权利要求 34 的方法，其中所述自身免疫病是克罗恩氏病、炎性肠病、多发性硬化或关节炎。

用于调控 TWEAK 和 FN14 活性的方法和组合物

[0001] 本申请是申请号为 200680015597.0，申请日为 2006 年 3 月 2 日，发明名称为“用于调控 TWEAK 和 FN14 活性的方法和组合物”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求 2005 年 3 月 7 日提交的美国临时申请 60/659,339 的优先权，在此收入其内容作为参考。

发明领域

[0004] 本发明提供了调控 TWEAK 和 TWEAK 受体活性的激动剂和拮抗剂。更具体的说，本发明提供了可用于调控 TWEAK 和 / 或 TWEAK 受体对免疫细胞的活性及用于治疗诸如癌症和免疫相关疾病等病症的方法、组合物和试剂盒。

[0005] 发明背景

[0006] 本领域已经鉴定了属于肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族的多种配体和受体。在这些配体中包括肿瘤坏死因子 - α (“TNF- α ”)、肿瘤坏死因子 - β (“TNF- β ”或“淋巴毒素 - α ”)、淋巴毒素 - β (“LT- β ”)、CD30 配体、CD27 配体、CD40 配体、OX-40 配体、4-1BB 配体、LIGHT、Apo-1 配体 (也称作 Fas 配体或 CD95 配体)、Apo-2 配体 (也称作 Apo2L 或 TRAIL)、TWEAK(也称作 Apo-3 配体)、APRIL、OPG 配体 (也称作 RANK 配体、ODF 或 TRANCE) 和 TALL-1(也称作 BlyS、BAFF 或 THANK)(参见例如 Ashkenazi, Nature Review2 :420-430(2002) ; Ashkenazi and Dixit, Science 281 :1305-1308(1998) ;Ashkenazi and Dixit, Curr. Opin. Cell Biol. 11 :255-260(2000) ;Golstein, Curr. Biol. 7 :750-753(1997) ;Wallach, Cytokine Reference, Academic Press,2000, pp. 377-411 ;Locksley et al., Cell 104 : 487-501(2001) ;Gruss and Dower, Blood85 :3378-3404(1995) ;Schmid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83 :1881(1986) ;Dealtry et al., Eur. J. Immunol. 17 :689(1987) ; Pitti et al., J. Biol. Chem. 271 :12687-12690(1996) ;Wiley et al., Immunity 3 : 673-682(1995) ;Browning et al., Cell 72 :847-856(1993) ;Armitage et al., Nature 357 :80-82(1992) ;WO97/01633, 公布于 1997 年 1 月 16 日 ;WO 97/25428, 公布于 1997 年 7 月 17 日 ;Marsters et al., Curr. Biol. 8 :525-528(1998) ;Chicheportiche et al., Biol. Chem. 272 :32401-32410(1997) ;Hahne et al., J. Exp. Med. 188 :1185-1190(1998) ; WO 98/28426, 公布于 1998 年 7 月 2 日 ;WO 98/46751, 公布于 1998 年 10 月 22 日 ; WO 98/18921, 公布于 1998 年 5 月 7 日 ;Moore et al., Science285 :260-263(1999) ; Shu et al., J. Leukocyte Biol. 65 :680(1999) ;Schneider et al., J. Exp. Med. 189 : 1747-1756(1999) ;Mukhopadhyay etal., J. Biol. Chem. 274 :15978-15981(1999))。

[0007] 由此类 TNF 家族配体介导的多种细胞应答的诱发通常是通过它们与特定细胞受体结合而启动的。在迄今为止已经鉴定的 TNF 受体超家族成员中包括 TNFR1、TNFR2、TACI、GITR、CD27、OX-40、CD30、CD40、HVEM、Fas(也称作 Apo-1 或 CD95)、DR4(也称作 TRAIL-R1)、DR5(也称作 Apo-2 或 TRAIL-R2)、DcR1、DcR2、护骨蛋白 (OPG)、RANK 和 Apo-3(也称作 DR3 或 TRAMP)(参见例如 Ashkenazi, Nature Reviews 2 :420-430(2002) ;Ashkenazi and

Dixit,Science 281 :1305-1308(1998) ;Ashkenazi and Dixit,Curr.Opin.Cell Biol.11 : 255-260(2000) ;Golstein,Curr.Biol.7 :750-753(1997) ;Wallach,Cytokine Reference, Academic Press,2000,pp.377-411 ;Locksley et al.,Cell 104 :487-501(2001) ; Gruss and Dower,Blood 85 :3378-3404(1995) ;Hohman et al.,J.Biol.Chem.264 : 14927-14934(1989) ;Brockhaus et al.,Proc.Natl.Acad. Sci.87 :3127-3131(1990) ; EP 417,563, 公 布 于 1991 年 3 月 20 日 ;Loetscher et al.,Cell 61 :351(1990) ; Schall et al.,Cell 61 :361(1990) ;Smith et al.,Science 248 :1019-1023(1990) ; Lewis et al.,Proc.Natl.Acad. Sci.88 :2830-2834(1991) ;Goodwin et al.,Mol. Cell.Biol.11 :3020-3026(1991) ;Stamenkovic et al.,EMBO J. 8 :1403-1410(1989) ; Mallett et al.,EMBO J.9 :1063-1068(1990) ;Anderson et al.,Nature 390 : 175-179(1997) ;Chicheportiche et al.,J.Biol.Chem.272 :32401-32410(1997) ;Pan et al.,Science 276 :111-113(1997) ;Pan et al.,Science 277 :815-818(1997) ;Sheridan et al.,Science277 :818-821(1997) ;Degli-Esposti et al.,J. Exp.Med. 186 : 1165-1170(1997) ;Marsters et al.,Curr.Biol.7 :1003-1006(1997) ;Tsuda et al.,BBRC 234 :137-142(1997) ;Nocentini et al.,Proc.Natl.Acad. Sci.94 :6216-6221(1997) ; vonBulow et al.,Science 278 :138-141(1997))。

[0008] 大多数这些 TNF 受体家族成员共享细胞表面受体的典型结构,包括胞外区、跨膜区和胞内区,而其它成员则天然发现是缺少跨膜和胞内结构域的可溶性蛋白质。典型 TNFR 的胞外部分包含从 NH_2- 末端起始的多个富含半胱氨酸结构域 (CRD) 的重复氨基酸序列样式。

[0009] 有些 TNF 配体家族成员与其各自受体的相互作用能影响免疫系统内的多种功能。此类配体 / 受体相互作用的例子包括 CD40 配体结合 CD40 受体,从而例如促进 B 细胞分化成抗体生成细胞 (Grewal et al.,Immunol.Res.16 :59-70(1997)) ;淋巴毒素 -β 配体结合淋巴毒素 -β 受体,从而例如通过调节滤泡树突细胞 (follicular dendritic cell) 的分化状态来影响体液免疫应答 (Mackay and Browning,Nature 395 :26-27(1998)) ;及 OX40 配体结合 OX40 受体,从而例如调节 B 细胞对 T 细胞信号的应答 (Flynn et al.,J. Exp. Med.188 :297-304(1998))。已经报道在免疫系统中发挥作用的其它配体 / 受体对包括 TNF-α /TNFR-1 和 Fas 配体 /Fas。

[0010] 称为“TWEAK”或“Apo-3 配体”的 TNF 家族配体文献中已有记载 (参见例如 WO 98/05783 ;WO 98/35061 ;WO 99/19490 ;US 2002/0015703)。TWEAK 配体在文献中报道为转化细胞系中相对较弱的凋亡诱导物 (Chicheportiche et al.,J. Biol.Chem.272 : 32401-32410(1997) ;Marsters et al.,Curr.Biol.8 :525-528(1998))。纯化的可溶性 TWEAK 蛋白质用于诱导有些肿瘤细胞系的分化和 / 或死亡,包括 HT29 腺癌细胞、HeLa 宫颈癌细胞和 A375 黑素瘤细胞。TWEAK 还诱导 HT29 和 A375 细胞系分泌趋化因子 IL-8 且对成纤维细胞细胞系 WI-38 具有相同效果 (Chicheportiche et al.,J. Biol.Chem..272 : 32401-32410(1997))。另外,通过诱导多种正常内皮细胞系增殖和大鼠角膜血管发生,TWEAK 已经与血管发生调节关联起来 (Lynch et al.,J.Interferon Cytokine Res.18 : A-46(1998)) ;Jakubowski et al.,J. Cell.Sci.115 :267-274(2002) ;Lynch et al.,J. Biol.Chem.274 :8455-8459(1999))。

[0011] 小鼠和人组织诸如心、脑、肺、肝及其它组织和次级淋巴器官诸如脾和淋巴结中TWEAK mRNA的表达已有记载。TWEAK还在人外周血单个核细胞上表达，而且它的表达增强随后的IFN-γ刺激(Nakayama et al.，J. Exp.Med.192:1373-1380(2000))。

[0012] TWEAK的推定受体先前在文献中有记载(Marsters et al.，Curr.Biol.8:525-528(1998))。此受体，称为TRAMP、Apo-3、WSL-1、DR3或LARD，是TNFR家族的成员。TRAMP的活化据报道通过发动胱天蛋白酶依赖性细胞死亡信号传导途径或经由NF-kB信号传导途径的细胞活化而诱导凋亡(Ashkenazi and Dixit,Science 281:1305-1308(1998))。目前，认为TRAMP/Apo-3/DR3可能确实不是TWEAK的生理学的、高亲和力受体。

[0013] 已经鉴定了结合TWEAK的另一种受体，称为Fn-14。Fn-14是成纤维细胞生长因子可诱导的14kDa蛋白质(Wiley et al.，Immunity 15:837-846(2001))，而且是较远相关的TNFR家族成员，其在胞外结构域中只包含一个富含半胱氨酸结构域及胞内结构域中的TRAF结合基序。经由此受体发挥作用的TWEAK诱导NF-KB2p100加工和持久的NF-KB活化(Saitoh et al.，J.Biol.Chem.278:36005-36012(2003))。

[0014] 发明概述

[0015] 认为TNF配体家族成员，TWEAK，充当促炎性细胞因子。如下文实施例所示，发现TWEAK在降低先天性炎性应答以及由先天性免疫向T_H1适应性免疫的转换中发挥重要作用。因此，通过以激动性或拮抗性方式调控此类活性，可治疗多种病症，诸如癌症或免疫相关疾患。

[0016] 本发明提供了结合TWEAK和/或TWEAK受体并以激动剂或拮抗剂方式调控TWEAK和/或TWEAK受体活性的组合物。例如，可采用TWEAK或TWEAK受体拮抗剂来阻断或中和TWEAK和/或TWEAK受体的活性。可采用此类组合物及使用所述组合物的方法来治疗多种病症，包括癌症和自身免疫性病症。举例而言，结合TWEAK并中和或阻断TWEAK对免疫细胞的活性的拮抗性抗体可用于增强/增加哺乳动物中天然杀伤(NK)细胞的作用和数目，从而抑制与过度的先天性和/或适应性免疫系统病症有关的病理状况。本发明的组合物包括结合TWEAK和/或TWEAK受体的单克隆抗体、可溶性TWEAK受体-Ig融合蛋白、或能拮抗TWEAK和/或TWEAK受体活性的其它分子。

[0017] 本发明提供了用于治疗诸如癌症或感染等病症的方法，包括施用含有治疗有效量的TWEAK拮抗剂和可接受载体的组合物。所述TWEAK拮抗剂可以是针对TWEAK配体的抗体；针对TWEAK受体的抗体；调节TWEAK配体与TWEAK受体结合的药剂；和能截断TWEAK受体的胞内信号传导的药剂。在一个优选的实施方案中，所述抗体是单克隆抗体。在一个更优选的实施方案中，所述单克隆抗体是针对TWEAK配体的抗体。TWEAK拮抗剂可以是具有能选择性结合TWEAK配体的配体结合结构域的可溶性TWEAK受体。在一个实施方案中，可溶性TWEAK受体可以包含人免疫球蛋白IgG结构域。

[0018] 本发明还包括用于增强哺乳动物中先天性T_H1应答或活性的方法，包括施用含有有效量的TWEAK拮抗剂和任选的制药学有效载体的组合物。

[0019] 本发明还包括用于增强哺乳动物中NK细胞活性的方法，包括施用含有有效量的TWEAK拮抗剂和任选的制药学有效载体的组合物。

[0020] 在其它实施方案中，例如，可采用TWEAK或TWEAK受体激动剂来激发或增强TWEAK和/或TWEAK受体的活性。本发明提供了结合TWEAK和/或TWEAK受体并激发或增强TWEAK

和 / 或 TWEAK 受体活性的组合物。可采用此类组合物及使用所述组合物的方法来治疗多种病症，包括免疫相关疾病，诸如自身免疫病。举例而言，结合 TWEAK 受体并激发或增强 TWEAK 受体活性的激动性抗体可用于改善 T_H1 驱动的自身免疫病，诸如克罗恩氏 (Crohn) 病、炎性肠病、多发性硬化和关节炎。

[0021] 本发明提供了用于治疗免疫相关疾患的方法，包括施用含有治疗有效量的 TWEAK 或 TWEAK 受体激动剂和可接受载体的组合物。所述 TWEAK 激动剂可以是针对 TWEAK 受体的抗体。在一个优选的实施方案中，所述抗体是单克隆抗体。在一个更优选的实施方案中，所述单克隆抗体是针对 TWEAK 受体的抗体。

[0022] 如下例示性权利要求例示了更多实施方案，但不限于此 ：

[0023] 1. 治疗癌症的方法，包括使哺乳动物癌细胞暴露于有效量的拮抗剂分子，其中所述拮抗剂选自 ：

[0024] (1) 抗 TWEAK 抗体 ；

[0025] (2) 抗 TWEAK 受体抗体 ；

[0026] (3)TWEAK 受体免疫粘附素 ；和

[0027] (4) 阻断或截断 TWEAK 受体的胞内信号传导的药剂或分子。

[0028] 2. 权利要求 1 的方法，其中所述 TWEAK 受体免疫粘附素包含与免疫球蛋白 Fc 区融合的 TWEAK 受体序列。

[0029] 3. 权利要求 2 的方法，其中所述 TWEAK 受体序列包含 FN14 受体的胞外结构域序列。

[0030] 4. 权利要求 1 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体结合包含图 11(SEQ ID NO ：1) 氨基酸 94-249 的人 TWEAK 多肽。

[0031] 5. 权利要求 4 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

[0032] 6. 权利要求 1 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO ：2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

[0033] 7. 权利要求 6 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

[0034] 8. 权利要求 1 的方法，其中还使所述哺乳动物癌细胞暴露于化疗、辐射、前体药物、细胞毒剂或生长抑制剂。

[0035] 9. 增强哺乳动物中 NK 细胞活性的方法，包括对所述哺乳动物施用有效量的拮抗剂分子，其中所述拮抗剂选自 ：

[0036] (1) 抗 TWEAK 抗体 ；

[0037] (2) 抗 TWEAK 受体抗体 ；

[0038] (3)TWEAK 受体免疫粘附素 ；和

[0039] (4) 阻断或截断 TWEAK 受体的胞内信号传导的药剂或分子。

[0040] 10. 权利要求 9 的方法，其中所述 TWEAK 受体免疫粘附素包含与免疫球蛋白 Fc 区融合的 TWEAK 受体序列。

[0041] 11. 权利要求 10 的方法，其中所述 TWEAK 受体序列包含 FN14 受体的胞外结构域序列。

[0042] 12. 权利要求 9 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体结合包含图 11(SEQ ID NO ：1) 氨

基酸 94-249 的人 TWEAK 多肽。

[0043] 13. 权利要求 12 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

[0044] 14. 权利要求 9 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO :2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

[0045] 15. 权利要求 14 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

[0046] 16. 增强哺乳动物中先天性 T_H1 应答或活性的方法，包括对所述哺乳动物施用有效量的拮抗剂分子，其中所述拮抗剂选自 :

[0047] (1) 抗 TWEAK 抗体 ;

[0048] (2) 抗 TWEAK 受体抗体 ;

[0049] (3)TWEAK 受体免疫粘附素 ;和

[0050] (4) 阻断或截断 TWEAK 受体的胞内信号传导的药剂或分子。

[0051] 17. 权利要求 16 的方法，其中所述 TWEAK 受体免疫粘附素包含与免疫球蛋白 Fc 区融合的 TWEAK 受体序列。

[0052] 18. 权利要求 17 的方法，其中所述 TWEAK 受体序列包含 FN14 受体的胞外结构域序列。

[0053] 19. 权利要求 16 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体结合包含图 11(SEQ ID NO :1) 氨基酸 94-249 的人 TWEAK 多肽。

[0054] 20. 权利要求 19 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

[0055] 21. 权利要求 16 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO : 2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

[0056] 22. 权利要求 21 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

[0057] 23. 治疗哺乳动物中 T_H2 介导的病症的方法，包括对所述哺乳动物施用有效量的拮抗剂分子，其中所述拮抗剂选自 :

[0058] (1) 抗 TWEAK 抗体 ;

[0059] (2) 抗 TWEAK 受体抗体 ;

[0060] (3)TWEAK 受体免疫粘附素 ;和

[0061] (4) 阻断或截断 TWEAK 受体的胞内信号传导的药剂或分子。

[0062] 24. 权利要求 23 的方法，其中所述 TWEAK 受体免疫粘附素包含与免疫球蛋白 Fc 区融合的 TWEAK 受体序列。

[0063] 25. 权利要求 24 的方法，其中所述 TWEAK 受体序列包含 FN14 受体的胞外结构域序列。

[0064] 26. 权利要求 23 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体结合包含图 11(SEQ ID NO :1) 氨基酸 94-249 的人 TWEAK 多肽。

[0065] 27. 权利要求 26 的方法，其中所述抗 TWEAK 抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

[0066] 28. 权利要求 23 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO : 2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

[0067] 29. 权利要求 28 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗

体。

[0068] 30. 权利要求 23 的方法，其中所述 T_H2 介导的病症是变态反应或哮喘。

[0069] 31. 治疗免疫相关病症的方法，包括对哺乳动物施用有效量的激动剂分子，其中所述激动剂选自：

[0070] (1) 抗 TWEAK 受体抗体；

[0071] (2)TWEAK 多肽；和

[0072] (3)TWEAK 多肽变体。

[0073] 32. 权利要求 31 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体结合包含图 12(SEQ ID NO：2) 氨基酸序列的人 FN14 受体多肽。

[0074] 33. 权利要求 32 的方法，其中所述抗 TWEAK 受体抗体是嵌合的、人源化的或人的抗体。

[0075] 34. 权利要求 31 的方法，其中所述免疫相关病症是自身免疫病。

[0076] 35. 权利要求 34 的方法，其中所述自身免疫病是克罗恩氏病、炎性肠病、多发性硬化或关节炎。

[0077] 附图简述

[0078] 图 1a-1b。TWEAK 及其受体 FN14 在先天免疫系统的细胞上表达。(1a) 人 PBMC，静息的 (“未刺激的”) 及用 IFN-γ 或 PMA 刺激了 12 小时的，用针对淋巴细胞谱系标志的抗体进行表面染色，透化，用 TWEAK 抗体进行染色，并通过 FACS 进行分析。(巨噬细胞 (“mac”)，树突细胞 (“DC”)，NK 细胞和 NKT 细胞)。(1b) 静息的及经过刺激的人 PBMC，对 TWEAK 受体 FN14 进行表面染色。

[0079] 图 2a-2d。TWEAK 敲除型 (KO) 小鼠在次级造血组织 (secondary hematopoietic tissue) 中具有更大 NK 细胞数。(2a，2b) 自两月龄 $TWEAK^{+/+}$ 小鼠 (黑色柱) 或 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠 (白色柱)(n ＝ 6 只 / 组) 分离脾、外周血、派伊尔氏斑 (Peyer’s patch) 和淋巴结，分离细胞，通过 FACS 分析对 NK 细胞 (a) 或 NKT 细胞 (b) 定量。(顶图：雄性；底图：雌性)。(2c) 自 $TWEAK^{+/+}$ 小鼠 (黑色柱) 或 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠 (白色柱)(n ＝ 6 只 / 组) 的右股骨吸取骨髓 (0.5mL)(左图：雄性；右图：雌性)，对 NK 细胞定量。(2d) 自全血分离人 PBMC，通过在存在各种浓度的 FN14Fc(实心方形)、抗 TWEAK mAb(空心方形)、EDAR Fc(实心圆形) 或抗 CD4mAb(空心圆形) 时用 TNF-α、LPS 或 IFN-γ 进行刺激来进行活化诱导的细胞死亡。然后分离 NK 细胞，对其 sub-G1 含量进行染色。

[0080] 图 3a-3c。TWEAK 消除或抑制提升对内毒素的先天炎性应答。(3a) 给 $TWEAK^{+/+}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠 (n ＝ 10 只 / 组) 腹膜内注射指定剂量的 LPS，持续 5 天监测存活力。(3b) 用 LPS(30mg/kg) 体内攻击后 24 小时自 $TWEAK^{+/+}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠的外周血和脾分离 NK 细胞和巨噬细胞，对 IFN-γ、IL-12 和 IL-10 的胞内水平进行染色。(3c) 来自 4 名人类供体的 PBMC 用 LPS 刺激 24 小时。随后，分别对 NK 细胞或巨噬细胞 (通过谱系标志来鉴定) 的 IFN-γ 和 IL-12 胞内水平进行染色。

[0081] 图 4a-4c。TWEAK 涉及 STAT-1 和 NF-κB1 调控。(4a) 对 STAT-1 活化的分析。人 NK 细胞和巨噬细胞在体外用 LPS(1μg/mL) 刺激 12 小时，对谱系标志进行表面染色，透化，对磷酸化 STAT-1 的胞内水平进行染色。顶图描绘了 NK 细胞，底图描绘了巨噬细胞 (FACS 柱状图总结成右边的条形图)。(4b) 对 NF-κB1 磷酸化的分析。人脾 NK 细胞和巨噬细胞用

TWEAK 或 TNF-α (100ng/mL) 刺激达 24 小时。在指定时间点制备细胞溶解物，通过免疫印迹对磷酸化 p65NF-κ B1 进行分析。(4c) 对 NF-κ B1 相互作用的分析。自 TWEAK 或 TNF-α 刺激过的细胞的细胞溶解物经 p65 免疫沉淀 NF-κ B1，通过免疫印迹对免疫沉淀物分析 p300 和 HDAC-1 的存在情况。

[0082] 图 5a-5e。年老 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠具有更大的脾及扩大的记忆和 T_H1 细胞隔室 (compartment)。$TWEAK^{+/+}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 雄性小鼠同胞仔饲养至 3 月龄、6 月龄或 12 月龄，检查它们的脾和淋巴结。(5a) 来自 $TWEAK^{+/+}$ 小鼠和 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠的脾的代表性图像。(5b) 平均脾重作为年龄的函数 (n = 6 只 / 组)。(5c) 来自 12 月龄 $TWEAK^{+/+}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠的脾切片用 CD3 抗体染色的代表性图像。(5d,5e) 通过 FACS 对来自 12 月龄野生型小鼠和 TWEAK 敲除型同胞仔的脾细胞进行分析以测定 CD3+、CD4+ 和 CD8+T 细胞 (5d) 及记忆和 T_H1T 细胞 (5e) 的数目。

[0083] 图 6a-6c。TWEAK 删除抑制 B16.F10 黑素瘤的形成和生长，促进适应性 CD8+T 细胞的扩增。给 $TWEAK^{+/+}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠皮下注射 100,000 个 B16.F10 细胞，监测肿瘤生长 (A) 或发生 (B) 达 6 周 (6a,6b)。在研究结束时，自接受注射的小鼠收集脾，对指定的淋巴细胞子集进行分析 (6c)。

[0084] 图 7a-7e。TWEAK 删除抑制 B16.BL6 肿瘤生长，促进先天性至适应性抗肿瘤免疫应答的激发。给 $TWEAK^{+/+}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠皮下注射 500,000 个 B16.BL6 细胞，在一个月时监测肿瘤重量 (7a) 或脾重量 (7b)。(7c) 来自携瘤小鼠的脾细胞对各种谱系群进行染色，通过 FACS 进行分析。(7d) 通过胞内染色和 FACS 对分离自携瘤小鼠的 NK 细胞和巨噬细胞分析细胞因子的生成。(7e) 对来自携瘤小鼠的 CD4+ 和 CD8+T 细胞类似分析 IFN-γ 生成。(*) 表示基础细胞因子统计学显著性 ($p < 0.01$)；(**) 表示肿瘤诱导的细胞因子统计学显著性 ($p < 0.01$)。

[0085] 图 8a-8g。$TWEAK^{-/-}$ 小鼠的表征。(8a) 小鼠 TWEAK 基因座的结构。各盒对应于包含 TWEAK(白色条形)、APRIL(黑色条形) 和 SMT3IP1(灰色条形) 基因的基因座区域。这三个基因的取向以箭头标示。(8b) 设计用来以 neo 盒替换 TWEAK 基因外显子 6 和 7 编码序列的寻靶构建物的示意图。(8c)TWEAK 基因中的突变区域的结构。用于 ES 细胞 Southern 印迹分析的 5' 和 3' 外部探针的位置以条形标示。用于小鼠尾部 DNA 基因型分析的引物组的位置以黑色 (外部) 和灰色 (内部) 箭头标示。(8d)TWEAK 基因的重组的 Southern 印迹分析。对衍生自数个 ES 细胞克隆的、经 BsmI(DI) 和 NarI(DII) 消化的 DNA 的分析。将 DNA 消化，在 0.7％琼脂糖凝胶上分级分离，印到尼龙膜上，与 5'(DI) 和 3'(DII) 探针进行杂交。(8E) 通过 PCR 对 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠的基因分型。尾部衍生基因组 DNA 用嵌套外部和内部引物组进行 PCR 扩增，野生型或删除突变型 TWEAK 基因分别显现为 4.3kB 或 5.3kB 片段。(8f) 使用抗小鼠 TWEAK 单克隆抗体 (黑色) 或同种型对照 (灰色线和填充区) 通过 FACS 测定的 TWEAK 在衍生自 $TWEAK^{+/+}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠的总脾细胞中的表达。(8g) 对 $TWEAK^{+/+}$、$TWEAK^{+/-}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠脾中 TWEAK(白色条)、APRIL(黑色条) 和 SMT3IP1(灰色条)mRNA 表达的定量实时 PCR 分析。所有数值对 RPL19RNA 内部对照进行标准化。标准偏差来自一式三份反应的计算。

[0086] 图 9。$TWEAK^{-/-}$ 小鼠具有更大的肿瘤淋巴细胞浸润。在 1 个月时自 $TWEAK^{+/+}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠收集 B16.BL6 肿瘤，解离，溶解 RBC。封闭 Fc 后，将解离的肿瘤细胞针对淋巴

细胞谱系标志进行染色，通过 FACS 进行分析。黑色条代表 $TWEAK^{+/+}$ 小鼠的指定肿瘤淋巴细胞浸润；白色条代表 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠的指定肿瘤淋巴细胞浸润。

[0087] 图 10。显示 2 月龄 $TWEAK^{+/+}$ 及 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠的体重 / 器官重量 (gm) 的表。

[0088] 图 11。人 TWEAK 配体的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1)。

[0089] 图 12。人 FN14 受体的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。

[0090] 发明详述

[0091] 本文中描述或提到的技术和流程普遍得到本领域技术人员的充分理解，而且通常利用常规方法得以采用，诸如例如广泛应用的分子克隆方法，记载于 Sambrook et al., Molecular Cloning :A Laboratory Manual，第 2 版，1989Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y。适当时，涉及使用商品化试剂盒和试剂的流程通常依照制造商规定的方案和 / 或参数进行，除非另有说明。

[0092] 在描述本发明的方法和测定法之前，应当理解本发明不限于所述具体的方法、方案、细胞系、动物种或属、构建物和试剂，因为它们当然可以有所变化。还应当理解本文中所使用的术语只是为了描述具体实施方案，并非意图限制本发明的范围，只有所附权利要求才对本发明范围进行了限制。

[0093] 必须注意的是，在用于本文及所附权利要求时，单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数所指物，除非另有明确规定。如此，例如，提到“一处遗传改变”包括多处此类改变，提到“一种探针”包括一种或多种探针及其本领域技术人员知道的等效物，诸如此类。

[0094] 在此收入本文中提到的所有出版物作为参考，以披露和描述与所引用出版物有关的方法和 / 或材料。引用本文中所引用的出版物是由于它们是在本申请的提交日之前公开的。凭借更早的优先权日或在先发明日，本文中的任何文字都不应解释为承认本发明的发明人没有资格早于所述出版物。此外，实际发表日可能与所显示的有所不同，需要独立查证。

[0095] I. 定义

[0096] 术语“TWEAK”或“TWEAK 配体”在用于本文时指包含图 11 第 1-249 位、第 47-249 位或第 94-249 位氨基酸残基（含两端点）的多肽序列，以及上述序列的生物学活性片段、删除、插入或替代变体。在一个实施方案中，所述多肽序列包含图 11 第 47-249 位残基，任选由图 11 第 94-249 位残基组成。在其它实施方案中，所述片段或变体具有生物学活性，与任一上文所述序列具有至少约 80％的氨基酸序列同一性，更优选至少约 90％的序列同一性，甚至更优选至少 95％、96％、97％、98％或 99％的序列同一性。任选的是，TWEAK 多肽由在严格条件下与 TWEAK 编码多核苷酸序列发生杂交的核苷酸序列编码。此定义还涵盖自 TWEAK 来源分离的或者通过重组或合成方法制备的天然序列 TWEAK。TWEAK 序列中提到的所有氨基酸残基编号使用依照图 11 的编号方式，除非另有明确说明。

[0097] 术语“胞外结构域”或“ECD”指蛋白质诸如 TWEAK 基本上不含跨膜结构域和胞质结构域的形式。ECD 通常将具有少于 1％的所述跨膜结构域和 / 或胞质结构域，优选将具有少于 0.5％的所述结构域。可以理解，为本发明多肽鉴定的任何跨膜结构域是依照本领域常规用于鉴定该种类型疏水结构域的标准而鉴定的。跨膜结构域的精确边界可以变化，但最有可能的是最初鉴定的结构域任一末端不超过约 5 个氨基酸。在优选的实施方案中，ECD 将由多肽不含跨膜结构域和胞质或胞内结构域的（而且不是膜结合的）可溶性胞外

结构域序列组成。具体的 TWEAK 胞外结构域序列记载于 Marsters et al.，Curr.Biol.8：525-528(1998)；Chicheportiche et al.，JBC 272：32401-32410(1997)。

[0098] 术语“TWEAK 配体”或“TWEAK”指任何 TWEAK 单体、多聚体或异聚体复合物或其衍生物。

[0099] “TWEAK 受体”指能够结合上文所述 TWEAK 配体的一种或多种受体。“TWEAK 受体”在本文中包括本领域称为“Fn-14”或“FN14”的受体及其包含图 12 所示第 1-129 位氨基酸的多肽序列。Fn14 受体还记载于 Wiley et al.，Immunity 15：837-846(2001)。术语“TWEAK 受体”在用于本文时涵盖天然序列受体和受体变体。这些术语涵盖在多种哺乳动物包括人中表达的 TWEAK 受体。TWEAK 受体可以是内源表达的，如在多种人组织谱系中天然发生的，或者可以是通过重组或合成方法表达的。“天然序列 TWEAK 受体”包括与衍生自自然界的 TWEAK 受体具有相同氨基酸序列的多肽。如此，天然序列 TWEAK 受体可以具有来自任何哺乳动物的天然存在 TWEAK 受体的氨基酸序列。此类天然序列 TWEAK 受体可以从自然界分离，或者可以通过重组或合成手段生产。术语“天然序列 TWEAK 受体”明确涵盖天然存在的截短或分泌形式的受体（例如含有例如胞外结构域序列的可溶形式）、天然存在的变体形式（例如可变剪接形式）和天然存在的等位基因变体。受体变体可包括天然序列 TWEAK 受体的片段或缺失突变体。

[0100] 术语“抗 TWEAK 抗体”指结合 TWEAK 配体的至少一种表位的任何抗体。任选的是，TWEAK 抗体与异源序列或分子融合或连接。优选的是，异源序列允许或帮助抗体形成更高等级或寡聚复合物。任选的是，TWEAK 抗体结合 TWEAK 但不与任何其它 TNF 家族配体（例如 Fas 配体、Apo2L/TRAIL、TNF-α 等）结合或发生交叉反应。任选的是，所述抗体是 TWEAK 和 / 或 TWEAK 受体活性的激动剂或拮抗剂。

[0101] 任选的是，根据 BIAcore 结合测定法的测量，本发明的 TWEAK 抗体在约 0.1nM 到约 20mM 的浓度范围内结合 TWEAK 配体。任选的是，根据 BIAcore 结合测定法的测量，本发明的 TWEAK 抗体呈现出约 0.6nM 到约 18mM 的 Ic50 值。

[0102] 术语“抗 TWEAK 受体抗体”指结合 TWEAK 受体的至少一种表位的任何抗体。任选的是，TWEAK 受体抗体与异源序列或分子融合或连接。优选的是，异源序列允许或帮助抗体形成更高等级或寡聚复合物。任选的是，TWEAK 受体抗体结合 TWEAK 受体但不与任何其它 TNF 家族受体（例如 FAS、DR4、DR5、TNFRI、TNFRII 等）结合或发生交叉反应。任选的是，所述抗体是 TWEAK 受体活性的激动剂或拮抗剂。

[0103] 任选的是，根据 BIAcore 结合测定法的测量，本发明的 TWEAK 受体抗体在约 0.1nM 到约 20mM 的浓度范围内结合 TWEAK 受体。任选的是，根据 BIAcore 结合测定法的测量，本发明的 TWEAK 受体抗体呈现出约 0.6nM 到约 18mM 的 Ic50 值。

[0104] 术语“拮抗剂”以最广义使用，包括在体外、原位或在体内部分或完全阻断、抑制或中和 TWEAK 或 TWEAK 受体的一种或多种生物学活性的任何分子。TWEAK 或 TWEAK 受体的所述生物学活性的例子包括结合 TWEAK 或 TWEAK 受体、活化 NF-kB 磷酸化或抑制 STAT-1 磷酸化、IL-8 生成、抑制 IFN-γ 和 IL-12 分泌、促进 NK 细胞 AICD、促进血管发生或促进肿瘤生长。拮抗剂可以以直接或间接方式发挥功能。例如，拮抗剂可以在体外、原位或在体内由于 TWEAK 直接结合 TWEAK 受体的结果发挥功能而部分或完全阻断、抑制或中和 TWEAK 或 TWEAK 受体的一种或多种生物学活性。拮抗剂还可以在体外、原位或在体内由于例如阻断或抑制

另一种效应器分子的结果间接发挥功能而部分或完全阻断、抑制或中和 TWEAK 或 TWEAK 受体的一种或多种生物学活性。拮抗剂分子可包括“双重”拮抗剂活性，其中该分子能够部分或完全阻断、抑制或中和 TWEAK 和 TWEAK 受体二者的生物学活性。

[0105] 术语“TWEAK 拮抗剂”指部分或完全阻断、抑制或中和 TWEAK 和 TWEAK 受体其中之一或二者的生物学活性的任何分子，包括但不限于可溶形式的 TWEAK 受体诸如 TWEAK 受体的胞外结构域序列、TWEAK 受体免疫粘附素、TWEAK 受体融合蛋白，共价修饰形式的 TWEAK 受体、TWEAK 受体抗体和 TWEAK 抗体。为了测定某种 TWEAK 拮抗剂分子是否部分或完全阻断、抑制或中和 TWEAK 或 TWEAK 受体的生物学活性，可进行测定法来评估拮抗剂分子对例如 TWEAK 与 TWEAK 受体的结合、对 NF-kB 磷酸化的活化或对 STAT-1 磷酸化的抑制、对 IFN-γ 和 IL-12 生成的抑制、或对细胞死亡的活化的影响。此类测定法可以以已知的体外或体内测定法方式进行，例如在 NK 细胞、巨噬细胞和树突细胞中进行。在一个实施方案中，TWEAK 拮抗剂将包括单克隆抗体或可溶性 TWEAK 受体 ECD-Fc 融合蛋白。

[0106] 术语“激动剂”以最广义使用，包括在体外、原位或在体内部分或完全刺激、增强或诱导 TWEAK 或 TWEAK 受体的一种或多种生物学活性的任何分子。TWEAK 或 TWEAK 受体的所述生物学活性的例子包括结合 TWEAK 或 TWEAK 受体、活化 NF-kB 磷酸化或抑制 STAT-1 磷酸化、抑制 IFN-γ 或 IL-12 生成、或活化细胞死亡。激动剂可以以直接或间接方式发挥功能。激动剂分子可包括“双重”激动剂活性，其中该分子能够部分或完全刺激、增强或诱导 TWEAK 和 TWEAK 受体二者的生物学活性。

[0107] 术语“TWEAK 激动剂”指部分或完全刺激、增强或诱导 TWEAK 和 TWEAK 受体其中之一或二者的生物学活性的任何分子，包括但不限于 TWEAK 多肽及其变体、和 TWEAK 受体抗体。为了测定某种 TWEAK 激动剂分子是否部分或完全刺激、增强或诱导 TWEAK 或 TWEAK 受体的生物学活性，可进行测定法来评估激动剂分子对例如 IL-8 生成、NF-kB 磷酸化、或对 IFN-γ 或 IL-12 生成的抑制的影响。此类测定法可以以已知的体外或体内测定法方式进行，例如 ELISA、胞内细胞因子生成或受体测定法。在一个实施方案中，TWEAK 激动剂将包括重组蛋白。

[0108] 术语“哺乳动物”在用于本文时指归入哺乳类的任何哺乳动物，包括人、牛、马、犬和猫。在本发明的一个优选实施方案中，哺乳动物指人。

[0109] “核酸”意图包括任何 DNA 或 RNA，例如组织样品中存在的染色体、线粒体、病毒和 / 或细菌核酸。术语“核酸”涵盖双链核酸分子的两条链或其中之一，包括完整核酸分子的任何片段或部分。

[0110] “基因”意指在编码或转录蛋白质或调控其它基因表达方面具有功能性作用的任何核酸序列或其部分。所述基因可以完全由负责编码功能性蛋白质的核酸组成，或者只有部分核酸负责编码或表达蛋白质。核酸序列可以在基因的外显子、内含子、起始或终止区、启动子序列、其它调控序列或独特邻近区中包含遗传异常。

[0111] 术语“标记物”在用于本文时指与试剂诸如核酸探针或抗体直接或间接偶联或融合，以便于检测它所偶联或融合的试剂的化合物或组合物。标记物可以是自身可检测的（例如放射性同位素标记物或荧光标记物），或者在酶标记物的情况中，可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0112] 术语“抗体”在本文中以最广义使用，明确覆盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由

至少两种完整抗体形成的多特异性抗体（例如双特异性抗体）、及抗体片段，只要它们展现出期望的生物学活性。

[0113] “抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选包含抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab′、$F(ab')_2$ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子；及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0114] “天然抗体”指通常由两条相同的轻链 (L) 和两条相同的重链 (H) 构成的约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接，而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链间有变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫键。每条重链在一端具有一个可变域 (V_H)，接着是多个恒定域。每条轻链在一端具有一个可变域 (V_L)，而另一端是一个恒定域。轻链的恒定域与重链的第一恒定域排列在一起，而轻链的可变域与重链的可变域排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。

[0115] 术语“可变的”指可变域中的某些部分在抗体序列间差异广泛且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而，变异性并非均匀分布于抗体的整个可变域。它集中于轻链和重链可变域中称作高变区或互补决定区的三个区段。可变域中更加高度保守的部分称作框架区 (FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个 FR，它们大多采取 β-折叠片构象，通过形成环状连接且在有些情况中形成 β-折叠片结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过 FR 非常接近的保持在一起，并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成（参见 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD(1991)）。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应器功能，诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 中抗体的参与。

[0116] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称作“Fab”片段，各自具有一个抗原结合位点，和一个残余“Fc”片段，其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段，它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

[0117] “Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。此区由紧密、非共价结合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。正是在这种构造中，各可变域的三个高变区相互作用而在 V_H-V_L 二聚体表面上确定了抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而，即使是单个可变域（或是只包含对抗原特异的三个高变区的半个 Fv）也具有识别和结合抗原的能力，只是亲和力低于完整结合位点。

[0118] Fab 片段还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域 (CH1)。Fab′ 片段与 Fab 片段的不同之处在于重链 CH1 结构域的羧基末端增加了少数残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab′-SH 是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的 Fab′ 的称谓。$F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为在 Fab′ 片段之间有铰链半胱氨酸的成对 Fab′ 片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0119] 根据其恒定域氨基酸序列，来自任何脊椎动物物种的抗体（免疫球蛋白）“轻链”可归入两种截然不同类型中的一种，称作卡帕（κ）和拉姆达（λ）。

[0120] 根据其重链恒定域氨基酸序列，抗体可归入不同的类。完整抗体分成五大类：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中有些可进一步分为亚类（同种型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、

IgA1 和 IgA2。将与抗体的不同类对应的重链恒定域分别称作 α、δ、ε、γ 和 μ。不同类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

[0121] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域，其中这些结构域存在于一条多肽链上。优选的是，Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽接头，使得 scFv 能够形成结合抗原的期望结构。关于 scFv 的综述参见 Plückthun，in：The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，vol. 113，Rosenburg and Moore 编，Springer-Verlag，New York，pp. 269-315(1994)。

[0122] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段，该片段在同一条多肽链 (V_H-V_L) 中包含相连的重链可变域 (V_H) 和轻链可变域 (V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对，迫使各结构域与另一条链的互补结构域配对，产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的记载于例如 EP 404,097；WO 93/11161；Hollinger et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA90：6444-6448(1993)。

[0123] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变外。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原性位点。此外，与典型的包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的常规（多克隆）抗体制备物不同，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性以外，单克隆抗体的优势在于它们是由杂交瘤培养物合成的，未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”指示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征，不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如，将依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler et al.，Nature 256：495(1975) 记载的杂交瘤方法来制备，或者可通过重组 DNA 方法来制备（参见例如美国专利 No. 4,816,567）。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson et al.，Nature 352：624-628(1991) 和 Marks et al.，J. Mol. Biol. 222：581-597(1991) 中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

[0124] 单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体（免疫球蛋白），其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及此类抗体的片段，只要它们展现出期望的生物学活性（美国专利 No. 4,816,567；Morrison et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81：6851-6855(1984)）。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类（例如旧大陆猴类 (Old World Monkey)，诸如狒狒、恒河猴或猕猴）的可变域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体（美国专利 No. 5,693,780）。

[0125] 非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的框架区 (FR) 残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言，人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域，其中整个或基本上整个高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，且整个或基本上整个 FR 是人免疫球蛋白序列的 FR。人源化抗体任选还将包含至少部

分免疫球蛋白恒定区 (Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones et al.，Nature 321 :522-525(1986) ;Riechmann et al.，Nature 332 :323-329(1988) ;Presta，Curr.Op.Struct.Biol.2 :593-596(1992)。

[0126] 术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基（例如轻链可变域中的残基 24-34(L1)、50-56(L2) 和 89-97(L3) 及重链可变域中的残基 31-35(H1)、50-65(H2) 和 95-102(H3) ；Kabat et al.，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD(1991)) 和 / 或那些来自“高变环”的残基（例如轻链可变域中的残基 26-32(L1)、50-52(L2) 和 91-96(L3) 及重链可变域中的残基 26-32(H1)、53-55(H2) 和 96-101(H3) ；Chothia and Lesk，J. Mol.Biol.196 ：901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基指可变域中除本文中所定义的高变区残基外的那些残基。

[0127] 在用于本文时，术语“免疫粘附素”指将异源蛋白质（“粘附素”）的结合特异性与免疫球蛋白恒定域的效应器功能联合起来的抗体样分子。在结构上，免疫粘附素包括不同于抗体的抗原识别和结合位点（即是“异源”的）、具有期望结合特异性的氨基酸序列与免疫球蛋白恒定域序列的融合物。免疫粘附素分子的粘附素部分通常是至少包含受体或配体的结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定域序列可从任何免疫球蛋白获得，诸如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 亚型、IgA（包括 IgA-1 和 IgA-2）、IgE、IgD 或 IgM。

[0128] 术语抗体的“Fc 结构域”指分子中包含铰链、CH2 和 CH3 结构域但缺乏抗原结合位点的部分。该术语还意图包括 IgM 或其它抗体同种型的等效区。

[0129] “结合”目的抗原的抗体指能够以足够亲和力和 / 或亲合力结合该抗原，使得该抗体可作为治疗剂或诊断剂用于靶向表达该抗原的细胞的抗体。

[0130] 为了本文目的，“免疫疗法”指用抗体治疗哺乳动物（优选人类患者）的方法，其中抗体可以是未偶联的或“裸露的”抗体，或者抗体可以偶联或融合有异源分子或试剂，诸如一种或多种细胞毒剂，由此产生“免疫偶联物”。

[0131] “分离的”抗体指已经鉴定且与 / 由其天然环境的一种成分分开和 / 或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质，可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中，将抗体纯化至 (1) 根据 Lowry 法的测定，抗体重量超过 95％，最优选重量超过 99％，(2) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度，或 (3) 根据使用考马斯蓝或优选银染色的还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE，达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在，那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而，分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0132] 表述“有效量”指药剂（例如 TWEAK 抗体等）有效预防、改善或治疗所讨论疾病或疾患的量。

[0133] 术语“处理”、“治疗”和“疗法”在用于本文时指治疗性处理、预防性处理、和防范性处理。连续治疗或施用指以至少每天一次为基础、期间没有中断一天或多天的处理。间歇治疗或施用或者间歇方式的治疗或施用指本质上并非连续而是循环的处理。

[0134] 术语“细胞因子”是由一种细胞群释放，作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子中包括生长激素，诸如人生长激素、N- 甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素；甲状旁腺素；甲状腺素；胰岛素；胰岛素原；松弛素；松弛素原；糖蛋白激素类，诸如促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和促黄体激素 (LH)；肝生长因子；成纤维细胞生长因子；促乳素；胎盘催乳激素；肿瘤坏死因子 -α 和 -β；穆勒氏 (Mullerian) 抑制性物质；小鼠促性腺激素相关肽；抑制素；激活素；血管内皮生长因子；整联蛋白；血小板生成素 (TPO)；神经生长因子；血小板衍生生长因子；转化生长因子 (TGF)，诸如 TGF-α 和 TGF-β；胰岛素样生长因子 -I 和 -II；红细胞生成素 (EPO)；骨诱导因子；干扰素，诸如干扰素 -α、-β 和 -γ；集落刺激因子 (CSF)，诸如巨噬细胞 CSF(M-CSF)、粒细胞 - 巨噬细胞 CSF(GM-CSF) 和粒细胞 CSF(G-CSF)；白介素 (IL)，诸如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17；及其它多肽因子，包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。在用于本文时，术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

[0135] 术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞的功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素 (例如 I^{131}、I^{125}、Y^{90} 和 Re^{186})、化疗剂、和毒素诸如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素或其片段。

[0136] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类 (alkylating agents)，诸如塞替派 (thiotepa) 和环磷酰胺 (cyclophosphamide) (CYTOXAN™)；磺酸烷基酯类 (alkyl sulfonates)，诸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan)；氮丙啶类 (aziridines)，诸如苯佐替派 (benzodepa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedepa) 和乌瑞替派 (uredepa)；乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines)，包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramide)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramide) 和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine)；番荔枝内酯类 (acetogenins)(尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone))；喜树碱 (camptothecin)(包括合成类似物托泊替康 (topotecan))；苔藓抑素 (bryostatin)；callystatin；CC-1065(包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物)；隐藻素类 (cryptophycins)(特别是隐藻素 1 和隐藻素 8)；多拉司他汀 (dolastatin)；duocarmycin(包括合成类似物，KW-2189 和 CBI-TMI)；艾榴塞洛素 (eleutherobin)；pancratistatin；sarcodictyin；海绵抑素 (spongistatin)；氮芥类 (nitrogen mustards)，诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard)；亚硝脲类 (nitrosoureas)，诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine)；抗生素类，诸如烯二炔类抗生素 (enediyne)(例如加利车霉

素 (calicheamicin)，尤其是加利车霉素 γ1I 和加利车霉素 ΦI1，参见例如 Agnew, Chem.Intl.Ed.Engl.33:183-186(1994)；dynemicin 包括 dynemicin A；二膦酸盐类 (bisphosphonates)，诸如氯膦酸盐 (clodronate)；埃斯波霉素 (esperamicin)；以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C(cactinomycin)、carabicin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D(dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6- 二氮 -5- 氧 -L- 正亮氨酸、多柔比星 (doxorubicin)(AdriamycinTM)(包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2- 吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin) 和佐柔比星 (zorubicin)；抗代谢物，诸如甲氨喋呤 (methotrexate) 和 5- 氟尿嘧啶 (5-FU)；叶酸类似物，诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤 (methotrexate)、蝶罗呤 (pteropterin) 和三甲曲沙 (trimetrexate)；嘌呤类似物，诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6- 巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine) 和硫鸟嘌呤 (thioguanine)；嘧啶类似物，诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6- 氮尿苷 (azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine) 和氟尿苷 (floxuridine)；雄激素类，诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane) 和睾内酯 (testolactone)；抗肾上腺类，诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane) 和曲洛司坦 (trilostane)；叶酸补充剂，诸如亚叶酸 (folinic acid)；醋葡醛内酯 (aceglatone)；醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside)；氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶 (eniluracil)；安吖啶 (amsacrine)；bestrabucil；比生群 (bisantrene)；依达曲沙 (edatraxate)；地磷酰胺 (defosfamide)；地美可辛 (demecolcine)；地吖醌 (diaziquone)；elfornithine；依利醋铵 (elliptinium acetate)；埃坡霉素 (epothilone)；依托格鲁 (etoglucid)；硝酸镓；羟脲 (hydroxyurea)；香菇多糖 (lentinan)；氯尼达明 (lonidamine)；美登木素生物碱类 (maytansinoids)，诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin)；米托胍腙 (mitoguazone)；米托蒽醌 (mitoxantrone)；莫哌达醇 (mopidamol)；二胺硝吖啶 (nitracrine)；喷司他丁 (pentostatin)；蛋氨氮芥 (phenamet)；吡柔比星 (pirarubicin)；洛索蒽醌 (losoxantrone)；鬼臼酸 (podophyllinic acid)；2- 乙基酰肼 (ethylhydrazide)；丙卡巴肼 (procarbazine)；PSK®；雷佐生 (razoxane)；根霉素 (rhizoxin)；西佐喃 (sizofiran)；螺旋锗 (spirogermanium)；细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid)；三亚胺醌 (triaziquone)；2,2′,2″- 三氯三乙胺；单端孢菌素类 (trichothecenes)

(尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verrucarin)A、杆孢菌素(roridin)A和蛇行菌素(anguidin));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷(arabinoside)(“Ara-C”);环磷酰胺(cyclophosphamide);塞替派(thiotepa);类紫杉醇类(taxoids),例如紫杉醇(paclitaxel)(TAXOL®,Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)和多西他塞(docetaxel)(TAXOTERE®,Rhône-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥(chlorambucil);吉西他滨(gemcitabine)(GemzarTM);6-硫鸟嘌呤(thioguanine);巯基嘌呤(mercaptopurine);甲氨喋呤(methotrexate);铂类似物,诸如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine);铂(platinum);依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);长春瑞滨(vinorelbine)(NavelbineTM);能灭瘤(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素(daunomycin);氨基蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊本膦酸盐(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(difluoromethylornithine)(DMFO);类视黄酸(retinoid),诸如视黄酸(retinoic acid);卡培他滨(capecitabine);及任何上述物质的药剂学可接受盐、酸或衍生物。该定义还包括作用为调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂,诸如抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂类(SERM),包括例如他莫昔芬(tamoxifen)(包括Nolvadex™)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene)(Fareston™);抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂,诸如例如4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)(Megace™)、依西美坦(exemestane)、福美坦(formestane)、法倔唑(fadrozole)、伏氯唑(vorozole)(Rivisor™)、来曲唑(letrozole)(Femara™)和阿那曲唑(anastrozole)(Arimidex™);抗雄激素类,诸如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡米特(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin);及任何上述物质的药剂学可接受盐、酸或衍生物。

[0137] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞,尤其是过表达本文中所鉴定的任何基因的癌细胞生长的化合物或组合物。如此,生长抑制剂是显著降低处于S期的过表达所述基因的细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(处于S期以外的位置)的药剂,诸如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春药类(vincas)(长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine))、泰素(taxol)、和拓扑异构酶II抑制剂诸如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。那些阻滞G1的药剂也溢出进入S期停滞,例如DNA烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨喋呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和ara-C。更多信息可参见The Molecular Basis of Cancer,Mendelsohn and Israel编,第1章,题为“Cell cycle regulation,oncogenes,and antineoplastic drugs”,Murakami etal.,WB Saunders,

Philadelphia(1995)，尤其是第 13 页。

[0138] 术语“凋亡”和“凋亡活性”以广义使用，指哺乳动物中有序或受控形式的细胞死亡，通常伴随着一种或多种特征性细胞变化，包括细胞质浓缩、质膜微绒毛丧失、细胞核节段化、染色体 DNA 降解或线粒体功能丧失。例如可以通过本领域已知的细胞存活力测定法（例如 Alamar 蓝测定法或 MTT 测定法）、FACS 分析、胱天蛋白酶活化、DNA 片段化（参见例如Nicoletti et al.，J. Immunol.Methods 139 :271-279(1991)）、及多聚ADP核糖聚合酶、“PARP”、切割测定法来测定和测量这种活性。

[0139] 在用于本文时，术语“病症”一般指将会从使用本文中所描述的组合物进行的处理中获益的任何疾患。这包括慢性和急性病症，以及那些使哺乳动物趋向于所讨论病症的病理状况。待治疗病症的非限制性例子包括良性和恶性癌症；炎性、传染性、血管发生性和免疫学病症、自身免疫性病症、关节炎（包括类风湿性关节炎）、多发性硬化及 HIV/AIDS。

[0140] 术语“癌症”、“癌性”或“恶性肿瘤”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调控的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、白血病、母细胞瘤和肉瘤。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胶质瘤、胃肠（道）癌、肾的癌 (renal cancer)、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌 (kidney cancer)、前列腺癌、甲状腺癌、成神经细胞瘤、胰腺癌、多形成胶质细胞瘤 (glioblastoma multiforme)、宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝瘤 (hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、及头和颈癌。

[0141] 术语“体液应答”和“细胞应答”在用于本文时指哺乳动物对抗原的免疫学应答，哺乳动物由此生成针对抗原的抗体或产生针对抗原的细胞毒性应答，或者二者。Th1 类 T 辅助细胞在产生细胞应答方面发挥作用，Th2 类 T 辅助细胞在有效生成高亲和力抗体方面发挥作用。

[0142] 术语“T 辅助 (Th) 细胞”在用于本文时指 T 细胞中帮助生成细胞毒性 T 细胞及配合 B 细胞刺激抗体生成的功能性亚类。辅助 T 细胞识别与 II 型 MHC 分子相关的抗原，为效应细胞提供依赖和不依赖（细胞因子和趋化因子）接触的信号。

[0143] 术语“Th1”指 T 辅助细胞中生成 TNF、IFN-γ 和 IL-2（及其它细胞因子）及引发与针对攻击的细胞即非免疫球蛋白应答有关的炎性反应的亚类。

[0144] 术语“Th2”指 T 辅助细胞中生成 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和其它细胞因子及与针对免疫攻击的免疫球蛋白（体液）应答有关的的亚类。

[0145] 术语“免疫相关疾病”指哺乳动物中由哺乳动物免疫系统成分引起、介导、或以其它方式促成发病的疾病。还包括刺激或干预免疫应答对疾病发展具有改善作用的疾病。该术语包括自身免疫病、免疫介导的炎性疾病、非免疫介导的炎性疾病、传染病、和免疫缺陷病。可依照本发明治疗的免疫相关和炎性疾病的例子，其中有些是免疫或 T 细胞介导的，包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、幼年型慢性关节炎、脊椎关节病、系统性硬化（硬皮病）、特发性炎性肌病（皮肌炎、多肌炎）、斯耶格伦氏 (Sjogren) 综合征、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血（免疫性全血细胞减少症、阵发性夜间血红蛋白尿）、自身免疫性血小板减少症（特发性血小板减少性紫癜、免疫介导的血小板减少症）、甲状腺炎（格雷夫斯氏 (Graves) 病、桥本氏 (Hashimoto) 甲状腺炎、幼年型淋巴细胞性甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎）、糖尿病、免疫介导的肾病（肾小球肾炎、肾小管间质性肾炎）、中枢和周围神经

系统的脱髓鞘病诸如多发性硬化、特发性脱髓鞘多神经病或格－巴二氏 (Guillain-Barré) 综合征、和慢性炎性脱髓鞘多神经病、肝胆病诸如传染性肝炎（甲型、乙型、丙型、丁型、戊型和其它非嗜肝病毒肝炎）、自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎、和硬化性胆管炎、炎性和纤维化肺病诸如炎性肠病（溃疡性结肠炎、克罗恩氏 (Crohn) 病）、麸胶敏感性肠病、和惠普尔氏 (Whipple) 病、自身免疫或免疫介导的皮肤病包括大疱性皮肤病、多形红斑和接触性皮炎、银屑病、变应性疾病诸如哮喘、变应性鼻炎、特应性皮炎、食物超敏反应和荨麻疹、肺的免疫学疾病诸如嗜曙红细胞性肺炎、特发性肺纤维化和超敏反应性肺炎、移植相关疾病包括移植物排斥和移植物抗宿主病。传染病包括 AIDS(HIV 感染）、甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎、细菌感染、真菌感染、原虫感染和寄生虫感染。

[0146] “自身免疫病”在本文中以广义、一般意义使用，指哺乳动物中因哺乳动物个体对其自身组织组分的体液或细胞免疫应答而破坏正常或健康组织的病症或疾患。例子包括但不限于红斑狼疮、甲状腺炎、类风湿性关节炎、银屑病、多发性硬化、自身免疫性糖尿病和炎性肠病 (IBD)。

[0147] 术语“标记的”在用于本文时指包含抗体或多肽且其与“标签多肽”融合的嵌合分子。标签多肽具有足够残基以提供表位而可制备针对其的抗体或者提供一些其它功能诸如寡聚的能力（例如具有亮氨酸拉链结构域的肽所发生的），但又足够短使得其不干扰所述抗体或多肽的活性。标签多肽优选还是相当独特的，使得标签特异性抗体基本上不与其它表位发生交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少 6 个氨基酸残基，通常约 8 个到约 50 个氨基酸残基之间（优选约 10 个到约 20 个残基之间）。

[0148] “分离的”，在用于描述本文中所公开的各种肽或蛋白质时，意指已经鉴定且与 / 由其天然环境的一种成分分开和 / 或回收的肽或蛋白质。肽或蛋白质的天然环境的污染性成分指通常会干扰其诊断或治疗用途的物质，可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中，将肽或蛋白质纯化至 (1) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度，或 (2) 根据使用考马斯蓝或优选银染色的非还原性或还原性条件下的 SDS-PAGE，达到同质，或 (3) 根据质谱或肽作图技术，达到同质。既然肽或蛋白质的天然环境的至少一种成分不会存在，那么分离的物质包括重组细胞内的原位肽或蛋白质。然而，分离的肽或蛋白质通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0149] 关于本文中所鉴定的序列的“百分比（％）氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后，且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分，候选序列中与参考序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。可以以本领域技术范围内的多种方式进行序列对比以测定百分比氨基酸序列同一性。本领域技术人员可决定测量序列对比的适宜参数，包括指派对所比较的全长序列获得最大对比所需的算法。为了本发明，可使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 来获得百分比氨基酸序列同一性值，ALIGN-2 程序由 Genentech 公司编写，其源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局 (US Copyright Office, Washington, DC, 20559)，并以美国版权注册号 TXU510087 注册。公众可通过 Genentech 公司 (South San Francisco, California) 得到 ALIGN-2 程序。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不变。

[0150] 杂交反应的“严格性”可以由本领域普通技术人员容易的确定，而且通常根据探针

长度、洗涤温度和盐浓度凭经验计算。一般而言，较长的探针要求较高的温度以正确退火，而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于当互补链存在于低于其解链温度的环境中时变性 DNA 重新退火的能力。探针和可杂交序列之间的期望同一性程度越高，可使用的相对温度也越高。结果是，推断出较高相对温度将趋向于使反应条件更为严格，而较低温度也就较不严格。关于杂交反应严格性的其它细节和解释，参见 Ausubel et al.，Current Protocols in Molecular Biology，Wiley Interscience Publishers(1995)。

[0151] “高严格性条件”，如本文中所定义的，通过如下各项定义：(1) 采用低离子强度和高温进行清洗；0.015M 氯化钠 /0.0015M 柠檬酸钠 /0.1％十二烷基硫酸钠，于 50℃；(2) 在杂交过程中采用变性剂；50％ (v/v) 甲酰胺及 0.1％牛血清清蛋白 /0.1％ Ficoll/0.1％聚乙烯吡咯烷酮 /50mM 磷酸钠缓冲液 pH 6.5 及 750mM 氯化钠，75mM 柠檬酸钠，于 42℃；或 (3) 采用 50％甲酰胺，5x SSC(0.75M NaCl，0.075M 柠檬酸钠)，50mM 磷酸钠 (pH6.8)，0.1％焦磷酸钠，5x Denhardt 氏溶液，超声处理的鲑鱼精 DNA(50μg/ml)，0.1％ SDS，和 10％硫酸右旋糖苷，于 42℃，及于 42℃在 0.2x SSC(氯化钠 / 柠檬酸钠) 和 50％甲酰胺中清洗，接着于 55℃在含 EDTA 的 0.1x SSC 中进行高严格性清洗。

[0152] “中等严格条件”可以如 Sambrook et al.，Molecular Cloning：ALaboratory Manual，New York，Cold Spring Harbor Press(1989) 中所述鉴定，包括于 37℃在含 20％甲酰胺，5x SSC(150mM NaCl，15mM 柠檬酸三钠)，50mM 磷酸钠 (pH 7.6)，5x Denhardt 氏溶液，10％硫酸右旋糖苷，和 20mg/ml 变性剪切的鲑鱼精 DNA 的溶液中温育过夜，接着于约 37-50℃在 1x SSC 中清洗滤膜。技术人员将认识到如何在必要时调整温度、离子强度等以适应诸如探针长度等因素。

[0153] 术语“引物”指与互补 RNA 或 DNA 靶多核苷酸杂交并充当通过核苷酸转移酶的作用从单核苷酸逐步合成多核苷酸的起点 (如例如聚合酶链反应中所发生的) 的寡核苷酸序列。

[0154] 术语“调控序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的 DNA 序列。例如，适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0155] 若一段核酸与另一段核酸序列处于功能性相互关系中，则它是“可操作连接”的。例如，若前序列 (presequence) 或分泌前导 (secretory leader) 的 DNA 表达成参与多肽分泌的前蛋白质 (preprotein)，则它与多肽的 DNA 可操作连接；若启动子或增强子影响编码序列的转录，则它与该序列可操作连接；或者，若核糖体结合位点的位置促进翻译，则它与编码序列可操作连接。通常，“可操作连接”意味着相连的 DNA 序列是相邻的，而且在分泌前导的情况中意味着相邻且处于阅读状态。然而，增强子不必相邻。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接反应来实现。如果没有此类位点，那么依照常规实践使用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0156] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指由细胞介导的反应，其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞 (例如天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体，随后引起靶细胞溶解。介导 ADCC 的主要细胞，NK 细胞，只表达 FcγRIII，而单核细胞表达 FcγRI、FcγRII 和 FcγRIII。Ravetch and Kinet，Annu. Rev. Immunol. 9：457-92(1991) 第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的

分子的 ADCC 活性，可进行体外 ADCC 测定法，诸如美国专利 No. 5,500,362 或 5,821,337 中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者 / 另外，可在体内评估目的分子的 ADCC 活性，例如在动物模型中，诸如 Clynes et al.，PNAS(USA)95 :652-656(1998) 中所披露的。

[0157] “人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行使效应器功能的白细胞。优选的是，该细胞至少表达 Fc γ RIII 并执行 ADCC 效应器功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞，优选 PBMC 和 NK 细胞。

[0158] 术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述结合抗体 Fc 区的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外，优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR(γ 受体)，包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体，包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA(“活化受体”) 和 Fc γ RIIB(“抑制受体”)，它们具有相似的氨基酸序列，区别主要在于其胞质结构域。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序 (ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序 (ITIM)(参见 Daëron，Annu. Rev. Immunol. 15 :203-234(1997))。FcR 的综述参见 Ravetch and Kinet，Annu. Rev. Immunol. 9 :457-492(1991) ;Capel et al.，Immunomethods4 :25-34(1994) ;de Haas et al.，J. Lab. Clin. Med. 126 :330-341(1995)。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR，包括未来将会鉴定的 FcR。该术语还包括新生儿受体，FcRn，它负责将母体的 IgG 转移给胎儿 (Guyer et al.，J. Immunol. 117 :587(1976) 和 Kim et al.，J. Immunol. 24 :249(1994))。FcR 在本文中包括多态性，诸如编码 Fc γ RIIIa 的基因中导致位于受体结合 IgG1 的区域中第 158 位氨基酸或为苯丙氨酸 (F) 或为缬氨酸 (V) 的遗传二态性。纯合缬氨酸 Fc γ RIIIa(Fc γ IIIa-158V) 已经在体外显示出相对于纯合苯丙氨酸 Fc γ RIIIa(Fc γ RIIIa-158F) 或杂合 (Fc γ IIIa-158F/V) 受体具有更高的对人 IgG1 的亲和力且介导提高的 ADCC。

[0159] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在存在补体时分子溶解靶物的能力。补体激活途径是由补体系统第一组分 (C1q) 结合与关联抗原复合的分子 (例如抗体) 起始的。为了评估补体激活，可进行 CDC 测定法，例如如 Gazzano-Santoro et al.，J. Immunol. Methods202 :163(1996) 中所记载的。

[0160] II. 本发明的各种方法和材料

[0161] 宿主针对感染的防御涉及哺乳动物中先天性与适应性免疫系统的协调功能。先天性免疫系统包括 NK 细胞、树突细胞、巨噬细胞和中性粒细胞，不仅在对感染的早期应答中，而且还在指导向基于 T 和 B 细胞的适应性免疫的转变中发挥重大作用 (Diefenbach and Raulet，Immunol. Rev.，188 :9-21(2002))。先天性免疫细胞介导受感染细胞的直接杀伤和消除 ;随后，它们通过与树突细胞的物理相互作用及后续特定细胞因子的分泌而积极支持适应性功能的形成 (Diefenbach and Raulet，Immunol. Rev.，181 :170-184(2001) ;Fernandez et al.，Eur. Cytokine Netw.，13 :17-27(2002) ;Ikeda et al.，Cytokine Growth Factor Rev.，13 :95-109(2002))。INF- γ 和 IL-12 使辅助 CD4+T 细胞的发育偏向 T_H1 亚型，它激活 CD8+ 效应 T 细胞应答，而 IL-4 诱导 T_H2 类，它刺激 B 细胞介导的抗体应答 (Diefenbach and Raulet，2002，supra ;Fernandez et al.，2002，supra ;Ikeda et al.，

2002, supra)。

[0162] 先天性免疫不仅作为针对感染的一线防御的是重要的，而且对于在形成适应性免疫所需时间段里保护宿主也是重要的。另外，先天性应答极大 (critically) 影响应答感染性攻击而形成的适应性机制的本质 (Castriconi et al.,C R Biol.,327 :533-537(2004) ; Lo et al., Immunol.Rev.,169 :225-239(1999) ;Palucka and Banchereau, J.Clin. Immunol.,19 :12-25(1999) ;Palucka and Banchereau, Nat.Med.,5 :868-870(1999))。NK 细胞与巨噬细胞和树突细胞的相互作用刺激支持特定 T 和 / 或 B 细胞应答形成的特定细胞因子的分泌 (Palucka and Banchereau, J.Clin.Immunol.,19 :12-25(1999) ; Palucka and Banchereau, Nat.Med.,5 :868-870(1999) ;Trinchieri, Semin.Immunol., 7 :83-88(1995))。NK 细胞的 IFN-γ 分泌及巨噬细胞和树突细胞的 IL-12 生成促进适应性 T_H1 应答的形成，导致细胞毒性 T 细胞效应器功能 (Coudert et al., J.Immunol., 169 :2979-2987(2002) ;Fujii et al., J.Exp.Med.,198 :267-279(2003) ;Gerosa et al., J.Exp.Med.,195 :327-333(2002) ;Pan et al., Immunol.Letters,94 :141-151(2004) ; Varma et al.,Clin.Diag.Lab Immunol.,9 :530-543(2002))。相反，NKT 细胞的 IL-4 生成促进适应性 T_H2 分化和 B 细胞活化 (Araujo et al., Int.Immunol.,12 :1613-1622(2000) ; Kaneko et al.,J.Exp.Med.,191 :105-114(2000) ;Leite-De-Moraes et al.,J.Immunol., 166 :945-951(2001))。

[0163] 本申请中公开的实验表明，TWEAK 是先天性系统及其与适应性免疫的介面的重要调控物。先天性免疫细胞，即 NK 细胞、巨噬细胞和树突细胞，表达 TWEAK 及其受体 FN14，并在受到刺激时上调这两种分子。相反，适应性系统的细胞，包括 T 和 B 细胞，不表达显著水平的 TWEAK 或 FN14。这种表达模式说明，先天性免疫细胞中的 TWEAK 信号传导可能调控先天性免疫功能，而且可能通过其对先天性活性的调控而间接影响适应性免疫应答。

[0164] 如下文实施例部分所述，所生成的 TWEAK 敲除小鼠是存活且健康的，证明 TWEAK 对于正常发育不是至关重要的。然而，$TWEAK^{-/-}$ 小鼠显示出与年龄相仿的野生型同胞相比 NK 细胞的显著积累，暗示 TWEAK 对 NK 细胞生成和 / 或死亡的调控。消除 TWEAK 基因不改变骨髓中 NK 细胞的量，说明 TWEAK 缺失时 NK 细胞形成不消除。相反，中和 TWEAK 保护人 NK 细胞免于 TNF-α、LPS 或 IFN-γ 的凋亡诱导。这些发现说明，AICD 削弱而非生成增加引起 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠中 NK 细胞积累。如此，TWEAK 的一项免疫调控作用可能是通过在免疫学消除 (immunological resolution) 时支持激活的 NK 细胞的消减来帮助预防过度先天性应答的潜在损害而进行的。

[0165] 在申请人的实验中，小鼠的 TWEAK 缺陷实质性提高小鼠对系统性 LPS 注射的敏感性，进一步暗示 TWEAK 对先天性应答的约束。考虑到 NK 细胞活性是对 LPS 的全身性炎症反应的重要成分 (Emoto et al., J.Immunol.,169 :1426-1432(2002) ;Heremans et al., Eur.J.Immunol.,24 :1155-1160(1994))，对 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠的超敏反应的一种解释可能是它们升高的 NK 细胞数。然而，申请人另外发现，在体内在暴露于 LPS 后，TWEAK 缺陷的 NK 细胞生成更多的 IFN-γ，而 $TWEAK^{-/-}$ 巨噬细胞生成更多的 IL-12 和更少的 IL-10。另外，TWEAK 中和增强 LPS 刺激的 NK 细胞和巨噬细胞的 IFN-γ 和 IL-12 生成。这些结果说明，$TWEAK^{-/-}$ 小鼠对 LPS 的提高的敏感性不仅源自它们升高的 NK 细胞数，而且还由于先天性免疫细胞更多生成 IFN-γ 和 IL-12。如此，在支持 NK AICD 以外，TWEAK 可能通过

抑制关键的促炎性细胞因子的分泌而削弱先天性应答。在这点上，TWEAK 显著不同于其亲戚 TNF-α，后者刺激 IL-12 和 IFN-γ 的分泌，由此提升先天性炎症应答 (D′ Andrea et al.，J.Exp.Med.，178：1041-1048(1993)；Oswald et al.，Eur.Cytokine Netw.，10：533-540(1999)；Wilhelm et al.，J.Immunol.，166：4012-4019(2001)；Zhan and Cheers，J.Immunol.，161：1447-1453(1998))。事实上，与 TWEAK 敲除对 LPS 的超敏感性相反，TNF-α 或 TNFR1 敲除小鼠对 LPS 诱导的致死性有抵抗力 (Pasparakis et al.，J.Exp.Med.，184：1397-1411(1996)；Rothe et al.，Circ.Shock，44：51-56(1994))。

[0166] STAT-1 是涉及应答感染而生成 IFN-γ 和 IL-12 的关键信号转导物 (Dupuis et al.，Immunol.Rev.，178：129-137(2000)；Feinberg et al.，Eur.J.Immunol.，34：3276-3284(2004))。比较来自 $TWEAK^{-/-}$ 与野生型小鼠的 NK 细胞和巨噬细胞中的磷酸 -STAT-1，揭示了基础活性的提升及应答 LPS 的刺激增强。这一结果说明 TWEAK 抑制 STAT-1 活性，与 TNF-α 相反，后者增强这种功能 (Chen et al.，Immunology，107：199-208(2002))。如此，可能有助于 TWEAK 抑制 IFN-γ 和 IL-12 生成的一种机制是抑制 STAT-1。与 STAT-1 一样，NF-κB1 在调控细胞因子基因转录中也发挥重要作用 (Feinberg et al.，Eur.J.Immunol.，34：3276-3284(2004)；Zhan and Cheers，J.Immunol.，161：1447-1453(1998))。在人 NK 细胞和巨噬细胞中，TWEAK 刺激延长的 NF-κB1 磷酸化，诱导该因子与转录阻抑蛋白 HDAC-1 的结合。相反，TNF-α 诱导短暂的 NF-κB1 磷酸化及与转录共激活蛋白 p300 的结合。如此，有助于 TWEAK 抑制 IFN-γ 和 IL-12 合成的第二种机制可能是诱导 NF-κB1 与 HDAC-1 之间的结合。TWEAK 与 TNF-α 在调控 NF-κB1 方面的差异可能是由于 NF-κB1 磷酸化的动力学，它影响该因子与其它转录调控物的结合，使得瞬时磷酸化有利于与 p300 的相互作用，而持续的修饰促进与 HDAC-1 的结合。这一观察结果与 TNF-α 对 c-Jun N- 末端激酶 (JNK) 途径的调控之间似乎存在平行关系，其中瞬时与持续 JNK 磷酸化之间，与促进细胞存活与细胞死亡之间，相互关联 (Varfolomeev and Ashkenazi，Mol.Cell Biol.，24：997-1006(2004))。

[0167] 申请人的发现说明，通过促进 NK AICD 及通过抑制 NK 细胞和巨噬细胞的 IFN-γ 和 IL-12 生成，NK 细胞和巨噬细胞应答感染的 TWEAK 表达有助于削弱先天性炎症应答。IFN-γ 和 IL-12 不仅增强先天性炎症应答，而且还促进向适应性免疫的转变，有利于细胞 T_H1 型应答。申请人的观察结果，即在缺乏 TWEAK 时，年老小鼠形成增大的脾，且不仅 NK 细胞（占脾细胞的很小部分）还有 T_H1 表型的 T 细胞数目都有增加。更多实验证据支持 TWEAK 对适应性转变的调控。在小鼠 B16 黑素瘤模型中，$TWEAK^{-/-}$ 小鼠抵制中等攻击性 B16.F10 亚克隆的生长，而野生型同胞未能抗击肿瘤生长。虽然 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠中 NK 细胞数增加能够解释它们抵制肿瘤的能力，但是这些小鼠中的抗肿瘤应答还与 CD8+T 细胞扩增有关，与 T_H1 应答提升一致。$TWEAK^{-/-}$ 小鼠还对更具攻击性的 B16.BL6 亚克隆的生长有抵抗力，比野生型对照表现更好，而且在回体用肿瘤细胞再次攻击时，与相应的对照相比，它们的 CD8+T 细胞和 NK 细胞生成显著更多的 IFN-γ，而它们的巨噬细胞生成更多的 IL-12。

[0168] 因此，这些发现说明 TWEAK 通过抑制 IFN-γ 和 IL-12 生成并由此保持检查后续 T_H1 介导的细胞应答的形成而调控先天性免疫至适应性免疫的接合 (interface)。申请人已经发现了 TWEAK 在免疫调控中的重要作用，它显著不同于其结构相关物 TNF-α 的功能。TNF-α 通过促进先天性细胞刺激和促炎性细胞因子分泌而在支持先天性炎症应答中

发挥重要作用。相反，TWEAK 似乎对于通过介导 NK AICD 以及抑制 NK 细胞和巨噬细胞的 IFN-γ 和 IL-12 生成而削弱先天性应答是至关重要的。尽管 TNF-α 通过促进 STAT-1 活化和 NF-κB1 结合 p300 而激活免疫调控基因的转录，但是 TWEAK 抑制 STAT-1 活性并诱导 NF-κB1 结合 HDAC-1，它抑制基因转录。重要的是，TWEAK 还在削弱先天性向适应性 T_H1 免疫应答的转变中具有至关重要的作用。如此，TWEAK 的功能可能有助于约束宿主哺乳动物的先天性和适应性应答，确保免于过度炎症和自身免疫的形成。这一发现说明 TWEAK 抑制可能在临床上可用于提升抗感染和抗肿瘤免疫力，而 TWEAK 受体活化可能可用于控制急性和慢性自身免疫病。

[0169] 依照本发明的方法，包含一种或多种调控 TWEAK 或 TWEAK 受体活性的分子的组合物可用于治疗多种病症。例如，TWEAK 拮抗剂可用于治疗癌症。此类 TWEAK 拮抗剂包括 TWEAK 抗体、TWEAK 变体、TWEAK 受体免疫粘附素、和 TWEAK 受体抗体。TWEAK 拮抗剂可在体内以及回体 (ex vivo) 使用。任选的是，以药用组合物的形式使用 TWEAK 拮抗剂，下文有更为详细的描述。

[0170] 在其它实施方案中，可以采用 TWEAK 激动剂来治疗各种免疫相关疾患。此类 TWEAK 激动剂包括 TWEAK 受体抗体和 TWEAK 多肽。TWEAK 激动剂可在体内以及回体 (ex vivo) 使用。任选的是，以药用组合物的形式使用 TWEAK 激动剂，下文有更为详细的描述。

[0171] 在下文描述中，描述了多种方法和技术。设想了这些方法和技术可类似地用于制备多种 TWEAK 激动剂和拮抗剂。

[0172] 例如，设想了可制备 TWEAK 多肽和 TWEAK 多肽变体。TWEAK 多肽变体可通过将适宜的核苷酸改变引入编码 DNA 和 / 或通过合成期望多肽来制备。本领域技术人员将领会，氨基酸改变可改变 TWEAK 多肽的翻译后加工，诸如改变糖基化位点的数目或位置或者改变膜锚定特征。

[0173] 可在本文所述 TWEAK 多肽中进行变异，例如使用例如美国专利 5,364,934 所述的保守和非保守突变的任何技术和指导方针。变异可以是编码多肽的一个或多个密码子的替代、删除或插入，其导致氨基酸序列相对于天然序列多肽的改变。任选的是，变异是通过 TWEAK 多肽的一个或多个结构域中至少一个氨基酸为任何其它氨基酸所替代而进行。通过比较 TWEAK 多肽的序列与同源已知蛋白质分子的序列，并将高同源区中进行的氨基酸序列改变的数目最小化，可发现确定哪些氨基酸残基可插入、替代或删除而不会对期望活性有不利影响的方针。氨基酸替代可以是将一种氨基酸用具有相似结构和 / 或化学特性的另一种氨基酸替代的结果，诸如用丝氨酸替代亮氨酸，即保守氨基酸替代。插入或删除可任选在约 1 个至 5 个氨基酸的范围内。可通过在序列中系统进行氨基酸插入、替代或删除，并对所得变体测试由全长或成熟天然序列展示的活性来确定可容许的变异。

[0174] 本文提供了 TWEAK 多肽的片段。例如，在与全长天然蛋白质比较时，此类片段可在 N- 末端或 C- 末端截短，或者可缺少内部残基。某些片段缺少对于 TWEAK 多肽的期望生物学活性不是至关重要的氨基酸残基。

[0175] TWEAK 多肽片段可通过多种常规技术中的任一种来制备。期望肽片段可化学合成。一种备选方法涉及通过酶促消化产生多肽片段，例如通过用已知在由特定氨基酸残基限定的位点处切割蛋白质的酶处理蛋白质，或者通过用合适的限制酶消化 DNA，并分离期望片段。还有一种合适的技术涉及分离并通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增编码期望多肽片段

的 DNA 片段。限定 DNA 片段期望末端的寡核苷酸在 PCR 中用作 5′ 和 3′ 引物。

[0176] 在具体实施方案中，感兴趣的保守替代见下表标题“优选替代”下所示。如果此类替代导致生物学活性的改变，那么可引入下表中称为“例示替代”的更实质性改变，或者如下文关于氨基酸类别进一步所述的，并筛选产物。

[0177] 表

[0178]

原始残基	例示替代	优选替代
Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn(N)	Gln ;His ;Lys ;Arg	Gln
Asp(D)	Glu	Glu
Cys(C)	Ser	Ser
Gln(Q)	Asn	Asn
Glu(E)	Asp	Asp
Gly(G)	Pro ;Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg
Ile(I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe ;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;Ile ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Ile
Lys(K)	Arg ;Gln ;Asn	Arg
Met(M)	Leu ;Phe ;Ile	Leu
Phe(F)	Leu ;Val ;Ile ;Ala ;Tyr	Leu
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr ;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp ;Phe ;Thr ;Ser	Phe

Val(V)	Ile ;Leu ;Met ;Phe ;Ala ;正亮氨酸	Leu

[0179] 对 TWEAK 多肽功能或免疫学身份的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来完成 :(a) 替代区域的多肽主链的结构,例如作为折叠片或螺旋构象,(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性,或 (c) 侧链的体积。基于共同的侧链特性,将天然存在残基如下分组 :

[0180] (1) 疏水性的 :正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile ;

[0181] (2) 中性、亲水性的 :Cys、Ser、Thr ;

[0182] (3) 酸性的 :Asp、Glu ;

[0183] (4) 碱性的 :Asn、Gln、His、Lys、Arg ;

[0184] (5) 影响链取向的残基 :Gly、Pro ;及

[0185] (6) 芳香族的 :Trp、Tyr、Phe。

[0186] 非保守替代将需要用这些类别之一的一个成员替换另一个类别的。还可以将此类替代残基引入保守替代位点,或者更优选的是,引入剩余的 (非保守) 位点。

[0187] 变异可使用本领域已知的方法来进行,诸如寡核苷酸介导的 (定点) 诱变、丙氨酸扫描、及 PCR 诱变。可对克隆的 DNA 进行定点诱变 (Carter et al., Nucl. Acids Res. 13 : 4331(1986) ;Zoller et al.,Nucl. Acids Res. 10 :6487(1987))、盒式诱变 (Wells et al., Gene 34 :315(1985))、限制性选择诱变 (restriction selection mutagenesis) (Wells et al.,Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317 :415(1986)) 或其它已知技术以产生 TWEAK 多肽变体 DNA。

[0188] 可采用扫描氨基酸分析沿着连续的序列鉴定一个或多个氨基酸。优选的用于扫描的氨基酸是相对较小的中性氨基酸。此类氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。丙氨酸通常是这一类中的优选的用于扫描的氨基酸,因为它消除了 β - 碳以外的侧链且不大可能改变变体的主链构象 (Cunningham and Wells,Science,244 :1081(1989))。丙氨酸通常还因为它是最常见的氨基酸而成为优选的。此外,在隐藏的和暴露的位置都经常可以找到它 (Creighton,《The Proteins》, W. H. Freeman&Co., NY ;Chothia, J. Mol. Biol., 150 : 1(1976))。如果丙氨酸替代不产生足够量的变体,那么可以使用等构 (isoteric) 氨基酸。

[0189] 任何不涉及保持 TWEAK 多肽正确构象的半胱氨酸残基也可替代,通常用丝氨酸,以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反,可向 TWEAK 多肽中添加半胱氨酸键以改善其稳定性。

[0190] 下面的描述主要涉及通过培养用包含 TWEAK 多肽编码核酸的载体转化或转染的细胞来生成 TWEAK 多肽。当然设想了可采用本领域公知的备选方法来制备本文中所设想的各种 TWEAK 激动剂和 TWEAK 拮抗剂。例如,可使用固相技术通过直接肽合成来生成适宜的氨基酸序列或其部分 (参见例如 Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA, 1969 ;Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 : 2149-2154(1963))。体外蛋白质合成可使用手工技术或通过自动化来进行。自动化合成可例如使用 Applied Biosystems Peptide Synthesizer(Foster City, CA) 依照制造商的说明书来完成。TWEAK 多肽的各个部分可分开化学合成,并使用化学或酶促方法组合以生成期望的 TWEAK 多肽。所述方法和技术类似地适用于生成 TWEAK 变体、经修饰形式的 TWEAK 和

TWEAK 抗体。

[0191] 1. 编码 TWEAK 多肽的 DNA 的分离

[0192] 编码 TWEAK 多肽的 DNA 可以从 cDNA 文库获得，所述 cDNA 文库从认为具有所述 TWEAK 多肽 mRNA 且以可检测水平表达它的组织制备。因此，人的 TWEAK 多肽 DNA 可以方便的从以人组织制备的 cDNA 文库获得。TWEAK 多肽编码基因也可从基因组文库或通过已知的合成流程（例如自动化核酸合成）获得。

[0193] 可以用设计用于鉴定目的基因或由其编码的蛋白质的探针（诸如至少约 20-80 个碱基的寡核苷酸）筛选文库。用选定探针筛选 cDNA 或基因组文库可使用标准流程进行，诸如 Sambrook et al.，Molecular Cloning：A Laboratory Manual，New York，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989 所述。分离编码 TWEAK 多肽的基因的一种备选方法是使用 PCR 方法学 (Sambrook et al.，见上文；Dieffenbach et al.，PCR Primer：A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1995)。

[0194] 用于筛选 cDNA 文库的技术是本领域众所周知的。选作探针的寡核苷酸序列应该足够长且足够明确 (unambiguous)，使得假阳性降到最低。寡核苷酸优选是标记的，使得它在与所筛选文库中的 DNA 杂交时可检测出。标记方法是本领域公知的，包括使用放射标记物，像 ^{32}P- 标记的 ATP、生物素化或酶标记。杂交条件，包括中等严格性和高度严格性，见 Sambrook et al，见上文。

[0195] 在此类文库筛选方法中鉴定的序列可以与保藏的和公共数据库诸如 GenBank 或其它私有序列数据库中可得到的其它已知序列比较和对比。分子限定区域内的或跨越全长序列的序列同一性（或是在氨基酸水平上或是在核苷酸水平上）可使用本领域知道的和本文描述的方法来测定。

[0196] 具有蛋白质编码序列的核酸可通过使用本文首次公开的推断的氨基酸序列筛选选定的 cDNA 或基因组文库来获得，并且必要时，使用 Sambrook et al.，见上文所述常规引物延伸流程来检测可能不会逆转录为 cDNA 的 mRNA 的前体和加工的中间产物。

[0197] 2. 宿主细胞的选择和转化

[0198] 将宿主细胞用本文所述用于 TWEAK 多肽生成的表达或克隆载体转染或转化，并在为了诱导启动子、选择转化子、或扩增编码期望序列的基因而作了恰当调整的常规营养培养基中培养。培养条件，诸如培养基、温度、pH 等等，可以由熟练技术人员无需过多实验即可选择。通常，用于使细胞培养物产量最大化的原理、方案和实用技术可参见 Mammalian Cell Biotechnology：a Practical Approach，M. Butler，ed.，IRL Press，1991 和 Sambrook et al.，见上文。

[0199] 真核细胞转染和原核细胞转化的方法是普通技术人员所知道的，例如 $CaCl_2$、$CaPO_4$、脂质体介导和电穿孔。根据所用宿主细胞，转化使用对此类细胞适宜的标准技术进行。采用氯化钙的钙处理，如 Sambrook et al.，见上文所述，或电穿孔通常用于原核细胞。用根瘤土壤杆菌 (Agrobacterium tumefaciens) 的感染用于某些植物细胞的转化，如 Shaw et al.，Gene 23：315(1983) 和 1989 年 6 月 29 日公开的 WO 89/05859 所述。对于没有此类细胞壁的哺乳动物细胞，可采用 Graham and van der Eb，Virology 52：456-457(1978) 的磷酸钙沉淀法。哺乳动物细胞宿主系统转染的一般情况参见美国专利 4,399,216。进入酵母的转化通常依照 Van Solingen et al.，J. Bact. 130：946(1977) 和 Hsiao et al.，Proc.

Natl. Acad. Sci. (USA)76 :3829(1979) 的方法来进行。然而，也可使用用于将 DNA 导入细胞的其它方法，诸如核显微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞的融合、或聚阳离子例如 polybrene、聚鸟氨酸。关于用于转化哺乳动物细胞的多种技术见 Keown et al.，Methods in Enzymology 185 :527-537(1990) 和 Mansour et al.，Nature 336 :348-352(1988)。

[0200] 适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞包括原核生物、酵母、或高等真核细胞。合适的原核生物包括但不限于真细菌，诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体，例如肠杆菌科，诸如大肠杆菌。多种大肠杆菌菌株是公众可获得的，诸如大肠杆菌 K12 菌株 MM294(ATCC 31,446) ；大肠杆菌 X1776(ATCC 31,537) ；大肠杆菌菌株 W3110(ATCC 27,325) 和 K5772(ATCC53,635)。其它合适的原核生物宿主细胞包括肠杆菌科，诸如埃希氏菌属 (Escherichia) 例如大肠埃希氏菌 (E. coli)、肠杆菌属 (Enterobacter)、欧文氏菌属 (Erwinia)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、变形菌属 (Proteus)、沙门氏菌属 (Salmonella) 例如鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium)、沙雷氏菌属 (Serratia) 例如粘质沙雷氏菌 (Serratia marcescans)、和志贺氏菌属 (Shigella)，以及芽孢杆菌属 (Bacilli) 诸如枯草芽孢杆菌 (B. subtilis) 和地衣芽孢杆菌 (B. licheniformis)(例如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD 266,710 中公开的地衣芽孢杆菌 41P)、假单胞菌属 (Pseudomonas) 诸如铜绿假单胞菌 (P. aeruginosa)、和链霉菌属 (Streptomyces)。这些例子是例示性的而非限制性的。菌株 W3110 是一个特别优选的宿主或亲本宿主，因为它是用于重组 DNA 产物发酵的常用宿主菌株。优选的是，宿主细胞分泌最小量的蛋白水解酶。例如，菌株 W3110 可以修饰，在编码对宿主而言内源的蛋白质的基因中产生遗传突变，此类宿主的例子包括大肠杆菌 W3110 菌株 1A2，其具有完整基因型 tonA ；大肠杆菌 W3110 菌株 9E4，其具有完整基因型 tonA ptr3 ；大肠杆菌 W3110 菌株 27C7(ATCC 55,244)，其具有完整基因型 tonA ptr3phoA E15(argF-lac)169 degP ompT kan^r ；大肠杆菌 W3110 菌株 37D6，其具有完整基因型 tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r ；大肠杆菌 W3110 菌株 40B4，它是具有非卡那霉素抗性 degP 删除突变的菌株 37D6 ；及具有 1990 年 8 月 7 日授权的美国专利 4,946,783 中公开的突变型周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。或者，体外克隆方法，例如 PCR 或其它核酸聚合酶反应也是合适的。

[0201] 除了原核生物以外，真核微生物，诸如丝状真菌或酵母也是 TWEAK 多肽编码载体的合适克隆或表达宿主。酿酒糖酵母 (Saccharomyces cerevisiae) 是常用的低等真核宿主微生物。其它的包括粟酒裂殖糖酵母 (Schizosaccharomyces pombe) (Beach and Nurse, Nature 290 :140(1981) ；EP139,383,1985 年 5 月 2 日 公 开) ；克鲁维酵母属 (Kluyveromyces) 宿主 (美国专利 4,943,529 ；Fleer et al., Bio/Technology 9 :968-975(1991)) 诸如例如乳酸克鲁维酵母 (K. lactis)(MW98-8C, CBS683, CBS4574 ；Louvencourt et al., J. Bacteriol. 154(2) :737-742(1983))、脆壁克鲁维酵母 (K. fragilis)(ATCC12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (K. bulgaricus)(ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母 (K. wickeramii)(ATCC 24,178)、K. waltii(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (K. drosophilarum)(ATCC 36,906 ；Van den Berg et al., Bio/Technology 8 :135(1990))、耐热克鲁维酵母 (K. thermotolerans)、和马克思克鲁维酵母 (K. marxianus) ；亚罗酵母属 (Yarrowia)(EP 402,226) ；巴斯德毕赤酵母 (Pichia pastoris)(EP 183,070 ；Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. 28 :265-278(1988)) ；假丝酵母属 (Candida) ；

瑞氏木霉 (Trichoderma reesia)(EP 244,234) ;粗糙脉孢菌 (Neurospora crassa)(Case et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 :5259-5263(1979)) ;许旺酵母属 (Schwanniomyces) 诸如许旺酵母 (Schwanniomyces occidentalis)(EP 394,538,1990 年 10 月 31 日公开) ;和丝状真菌诸如例如脉孢菌属 (Neurospora)、青霉属 (Penicillium)、弯颈霉属 (Tolypocladium)(WO 91/00357,1991 年 1 月 10 日公开)、和曲霉属 (Aspergillus) 宿主诸如构巢曲霉 (A.nidulans)(Balance et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.112 : 284-289(1983) ;Tilburn et al., Gene 26 :205-221(1983) ;Yelton et al., Proc.Natl. Acad.Sci.USA 81 :1470-1474(1984)) 和黑曲霉 (A.niger)(Kelly and Hynes, EMBO J.4 : 475-479(1985))。甲基营养型酵母 (Methylotropic yeast) 适于本发明,包括但不限于能够在甲醇上生长的、选自以下属的酵母 :汉逊氏酵母属 (Hansenula)、假丝酵母属 (Candida)、克勒克氏酵母属 (Kloeckera)、毕赤氏酵母属 (Pichia)、糖酵母属 (Saccharomyces)、球拟酵母属 (Torulopsis)、和红酵母属 (Rhodotorula)。作为这类酵母的例子的具体物种列表可参见 C.Anthony,The Biochemistry of Methylotrophs,269(1982)。

[0202] 适用于表达糖基化 TWEAK 多肽的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括昆虫细胞诸如果蝇 S2 和夜蛾 Sf9,以及植物细胞,诸如棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、和烟草的细胞培养物。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞,它们来自诸如草地夜蛾 Spodoptera frugiperda(毛虫)、埃及伊蚊 Aedes aegypti(蚊子)、白纹伊蚊 Aedes albopictus(蚊子)、黑腹果蝇 Drosophila melanogaster(果蝇) 和家蚕 Bombyx mori 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染,例如苜蓿尺蠖 Autographa californica NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株,而且此类病毒可依照本发明用作本文的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。

[0203] 然而,最受关注的是脊椎动物细胞,而且培养 (组织培养) 中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651) ;人胚肾系 (293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham et al., J.Gen Virol.36 :59(1977)) ;幼仓鼠肾细胞 (BHK,ATCC CCL 10) ;中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR(CHO, Urlaub et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 :4216(1980)) ;小鼠塞托利 (sertoli) 细胞 (TM4,Mather,Biol.Reprod.23 :243-251(1980)) ;猴肾细胞 (CV1,ATCC CCL 70) ;非洲绿猴肾细胞 (VERO-76,ATCC CRL-1587) ;人宫颈癌细胞 (HELA,ATCC CCL 2) ;犬肾细胞 (MDCK,ATCC CCL 34) ;牛鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL 3A,ATCC CRL 1442) ;人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75) ;人肝细胞 (Hep G2, HB 8065) ;小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51) ;TRI 细胞 (Mather et al., Annals N.Y. Acad.Sci.383 :44-68(1982)) ;MRC5 细胞 ;FS4 细胞 ;和人肝瘤系 (Hep G2)。

[0204] 将宿主细胞用上述用于 TWEAK 多肽生成的表达或克隆载体转化,并在为了诱导启动子、选择转化子、或扩增编码期望序列的基因而恰当改良的常规营养培养基中培养。

[0205] 3. 复制型载体的选择和使用

[0206] 可以将编码 TWEAK 多肽的核酸 (例如 cDNA 或基因组 DNA) 插入复制型载体用于克隆 (DNA 扩增) 或表达。多种载体是公众可得到的。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可以通过多种方法将适宜的核酸序列插入载体。通常,使用本领域已知的技术将 DNA 插入适宜的限制性内切酶位点。载体构件通常包括但不限于下列一种或多种 :

信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。包含一种或多种这些构件的合适载体的构建采用技术人员已知的标准连接技术。

[0207] TWEAK 多肽不仅可以直接重组生产，而且可以作为与异源多肽的融合多肽来生产，所述异源多肽可以是在成熟蛋白质或多肽的 N- 末端具有特定切割位点的信号序列或其它多肽。通常，信号序列可以是载体的构件，或者它可以是插入载体的 TWEAK 多肽编码 DNA 的一部分。信号序列可以是原核信号序列，选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp、或热稳定的肠毒素 II 前导序列。为了酵母分泌，信号序列可以是例如酵母转化酶前导序列、α 因子前导序列（包括糖酵母和克鲁维酵母的 α - 因子前导序列，后者见美国专利 5,010,182）、或酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母葡糖淀粉酶前导序列（1990 年 4 月 4 日公开的 EP 362,179）、或 1990 年 11 月 15 日公开的 WO90/13646 中描述的信号。在哺乳动物细胞表达中，可以使用哺乳动物信号序列来指导蛋白质的分泌，诸如来自相同或相关物种的分泌型多肽的信号序列，以及病毒分泌前导序列。

[0208] 表达和克隆载体都包含能够使载体在一种或多种选择的宿主细胞中复制的核酸序列。众所周知多种细菌、酵母、和病毒的此类序列。来自质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌，2μ 质粒起点适合于酵母，而各种病毒起点（SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV、或 BPV）可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。

[0209] 表达和克隆载体通常将包含选择基因，也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质：(a) 赋予抗生素或其它毒素抗性，例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤、或四环素；(b) 补足营养缺陷；或 (c) 提供不能由复合培养基获得的关键营养物，例如编码芽孢杆菌 D- 丙氨酸消旋酶的基因。

[0210] 适于哺乳动物细胞的选择标志的例子是能够鉴定有能力摄取 TWEAK 多肽编码核酸的细胞的选择标志，诸如 DHFR 或胸苷激酶。在采用野生型 DHFR 时，适宜的宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的 CHO 细胞系，其制备和扩增如 Urlaub et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77：4216(1980) 所述。适用于酵母的选择基因为存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因 (Stinchcomb et al.，1979，Nature 282：39；Kingsman et al.，1979，Gene7：141；Tschemper et al.，1980，Gene 10：157)。trp1 基因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株，例如 ATCC No.44076 或 PEP4-1 提供了选择标志 (Jones，1977，Genetics 85：12)。

[0211] 表达和克隆载体通常包含与 TWEAK 多肽编码核酸序列可操作连接的启动子以指导 mRNA 合成。受到多种潜在宿主细胞识别的启动子是众所周知的。适用于原核宿主的启动子包括 β - 内酰胺酶和乳糖启动子系统 (Chang et al.，Nature 275：615(1978)；Goeddel et al.，Nature 281：544(1979))、碱性磷酸酶、色氨酸 (trp) 启动子系统 (Goeddel，Nucleic acids Res.8：4057(1980)；EP36,776)、和杂合启动子诸如 tac 启动子 (deBoer et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA80：21-25(1983))。用于细菌系统的启动子还将包含与编码 TWEAK 多肽的 DNA 可操作连接的 Shine-Dalgarno(S.D.) 序列。

[0212] 适用于酵母宿主的启动子序列的例子包括 3- 磷酸甘油酸激酶 (Hitzeman et al.，J.Biol.Chem.255：2073(1980)) 或其它糖酵解酶 (Hess et al.，J.Adv.Enzyme Reg.7：149(1968)；Holland，Biochemistry 17：4900(1978)) 的启动子，诸如烯醇酶、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖 -6- 磷酸异构酶、3- 磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶、和葡糖激酶。

[0213] 作为具有由生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步描述于 EP 73,657。

[0214] 在哺乳动物宿主细胞中由载体转录 TWEAK 多肽受到例如由病毒诸如多瘤病毒 (polyoma virus)、禽痘病毒 (fowlpox virus)(1989 年 7 月 5 日公开的 UK 2,211,504)、腺病毒 (诸如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒 (avian sarcoma virus)、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和猿猴病毒 40(SV40) 基因组、由异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子、及由热休克启动子获得的启动子的控制,倘若此类启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0215] 可通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码 TWEAK 多肽的 DNA 的转录。增强子是 DNA 的顺式作用元件,通常大约 10 至 300bp,作用于启动子以增加转录。现在知道来自哺乳动物基因 (球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、α - 胎蛋白和胰岛素) 的许多增强子序列。然而,通常使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括 SV40 复制起点晚期一侧 (late side) 的增强子 (bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。增强子可以剪接到载体中,位于 TWEAK 多肽编码序列的 5′ 或 3′ 位置,但是优选位于启动子的 5′ 位点。

[0216] 用于真核宿主细胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人、或来自其它多细胞生物体的有核细胞) 的表达载体还将包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。此类序列通常可以由真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5′ 端和偶尔的 3′ 端获得。这些区域包含在编码 TWEAK 多肽的 mRNA 的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。

[0217] 适合在改动后在重组脊椎动物细胞培养物中合成 TWEAK 多肽的其它方法、载体和宿主细胞见 Gething et al., Nature 293 :620-625(1981) ;Mantei et al., Nature 281 : 40-46(1979) ;EP 117,060 ;和 EP 117,058。

[0218] 4. 培养宿主细胞

[0219] 可以在多种培养基中培养用于生成本发明 TWEAK 多肽的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10(Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、和 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外,可以使用下列文献中描述的任何培养基作为宿主细胞的培养基 :Ham et al.,1979, Meth.Enz.58 :44 ;Barnes et al.,1980, Anal.Biochem.102 :255 ; 美 国 专 利 4,767,704 ;4,657,866 ;4,927,762 ; 4,560,655 ;或 5,122,469 ;WO 90/03430 ;WO 87/00195 ;或美国再版专利 30,985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和 / 或其它生长因子 (诸如胰岛素、运铁蛋白、或表皮生长因子)、盐 (诸如氯化钠、钙、镁、和磷酸盐)、缓冲剂 (诸如 HEPES)、核苷酸 (诸如腺苷和胸苷)、抗生素 (诸如 GENTAMYCIN™ 药物)、痕量元素 (定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适当浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件诸如温度、pH 等即先前为表达而选择用于宿主细胞的,这对于普通技术人员而言是显然的。

[0220] 5. 检测基因扩增 / 表达

[0221] 基因的扩增和 / 或表达可以在样品中直接测量,例如根据本文提供的序列,使用

适宜的标记探针，通过常规的 Southern 印迹、对 mRNA 转录定量的 Northern 印迹 (Thomas，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :5201-5205(1980))、点印迹 (DNA 分析)、半定量 PCR、DNA 阵列基因表达分析或原位杂交。或者，可采用能识别特定双链体的抗体，所述双链体包括 DNA 双链体、RNA 双链体、及 DNA-RNA 杂合双链体或 DNA- 蛋白质双链体。继而可标记抗体，并可进行测定法，其中所述双链体结合到表面上，从而在双链体在表面上形成时，可检测与双链体结合的抗体的存在。

[0222] 或者，为了直接对基因产物的表达定量，可通过免疫学方法测量基因表达，诸如细胞或组织切片的免疫组化染色和细胞培养物或体液的测定法。可用于免疫组化染色和 / 或样品液体测定法的抗体可以是单克隆的或多克隆的，而且可以在任何哺乳动物中制备。方便的是，可针对天然序列 TWEAK 多肽或针对基于本文提供的 DNA 序列的合成肽或针对与 TWEAK DNA 融合且编码特定抗体表位的外源序列来制备抗体。

[0223] 6. TWEAK 多肽的纯化

[0224] 可以从培养液或从宿主细胞裂解物中回收各种形式的 TWEAK 多肽。如果是膜结合的，那么可使用合适的去污剂溶液 (例如 Triton-X 100) 或通过酶促裂解使其从膜释放。TWEAK 多肽表达中所采用的细胞可通过多种物理或化学手段破裂，诸如冻融循环、超声处理、机械破裂、或细胞溶解剂。

[0225] 可能期望从重组细胞蛋白质或多肽纯化 TWEAK 多肽。下面的流程是合适纯化流程的例示 :在离子交换柱上的分级分离 ;乙醇沉淀 ;反相 HPLC ;在硅土或阳离子交换树脂诸如 DEAE 上的层析 ;层析聚焦 ;SDS-PAGE ;硫酸铵沉淀 ;使用例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤 ;蛋白 A Sepharose 柱以除去污染物诸如 IgG ;及结合 TWEAK 多肽的表位标记形式的金属螯合柱。可采用多种蛋白质纯化方法，此类方法是本领域已知的，并描述于例如 Deutscher，Methods in Enzymology，182(1990) ;Scopes，Protein Purification :Principles and Practice，Springer-Verlag，New York(1982)。纯化步骤的选择将取决于例如所用制备方法的性质和所制备的具体 TWEAK 多肽。

[0226] 本发明的方法中可以采用可溶形式的 TWEAK。此类可溶形式的 TWEAK 可以包含修饰，如下文所述 (诸如通过与免疫球蛋白、标签标签或亮氨酸拉链融和)。进一步设想了将免疫粘附素分子用于本文中的方法。TWEAK 受体免疫粘附素可包含各种形式的 TWEAK 受体，诸如全长肽以及可溶形式的 TWEAK 受体或其片段。在具体的实施方案中，所述分子可包含 TWEAK 受体多肽与免疫球蛋白或其特定区域的融合物。对于二价形式的免疫粘附素，此类融合物可以是与 IgG 分子 Fc 区的融合物。Ig 融合物优选包含用可溶 (跨膜结构域删除或灭活的) 形式的多肽代替 Ig 分子内至少一个可变区的替代。在一个特别优选的实施方案中，免疫球蛋白融合物包含 IgG1 分子的铰链、CH2 和 CH3，或者铰链、CH1、CH2 和 CH3 区。关于免疫球蛋白融合物的生成还可参见美国专利第 5,428,130 号，1995 年 6 月 27 日公告及 Chamow et al.，TIBTECH，14 :52-60(1996)。

[0227] 最简单且最直接的免疫粘附素设计将粘附素 (例如 TWEAK 或 TWEAK 受体) 的结合结构域与免疫球蛋白重链的 Fc 区进行组合。通常，在制备本发明的免疫粘附素时，将编码粘附素结合结构域的核酸融合到编码免疫球蛋白恒定区序列 N- 末端的核酸的 C- 末端，然而 N- 末端的融合物也是可能的。

[0228] 通常，在此类融合物中，所编码的嵌合多肽将至少保留有功能活性的免疫球蛋白

重链恒定区铰链、CH2 和 CH3 结构域。还可以对恒定区 Fc 部分的 C- 末端进行融合，或者紧挨着重链 CH1 或轻链对应区的 N- 末端进行。进行融合的精确位点不是至关重要的；具体位点是众所周知的，而且可以进行选择以优化免疫粘附素的生物学活性、分泌或结合特征。

[0229] 在一个优选的实施方案中，将粘附素序列融合在免疫球蛋白 G1(IgG1)Fc 区的 N- 末端。有可能将整个重链恒定区与粘附素序列融合。然而，更优选的是，在融合中使用在铰链区中紧挨着在化学上定义 IgG Fc 的木瓜蛋白酶切割位点（即残基 216，以重链恒定区的第一个残基为 114）或其它免疫球蛋白的类似位点上游开始的序列。在一个特别优选的实施方案中，将粘附素氨基酸序列与 IgG 重链的 (a) 铰链区、CH2 和 CH3，或者 (b)CH1、铰链、CH2 和 CH3 结构域融合。

[0230] 对于双特异性免疫粘附素，将免疫粘附素装配成多聚体，特别是异二聚体或异四聚体。通常，这些装配好的免疫球蛋白将具有已知的单元结构。基本的四链结构单元就是 IgG、IgD 和 IgE 存在的形式。四链单元在更高分子量的免疫球蛋白中重复；IgM 通常作为通过二硫键保持在一起的四链基本单元的五聚体存在。IgA 球蛋白及偶尔的 IgG 球蛋白也可以以多聚体的形式存在于血清中。在多聚体的情况中，各个四链单元可以是相同的或不同的。

[0231] 下面示意性的列举了在本文范围内的各种例示性的装配好的免疫粘附素：

[0232] (a)AC_L-AC_L；

[0233] (b)AC_H-(AC_H，AC_L-AC_H，AC_L-V_HC_H，或 V_LC_L-AC_H)；

[0234] (c)AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H，AC_L-V_HC_H，V_LC_L-AC_H，或 V_LC_L-V_HC_H)

[0235] (d)AC_L-V_HC_H-(AC_H，AC_L-V_HC_H，或 V_LC_L-AC_H)；

[0236] (e)V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H，或 V_LC_L-AC_H)；及

[0237] (f)(A-Y)n-$(V_LC_L$-$V_HC_H)_2$，

[0238] 其中各个 A 代表相同或不同的粘附素氨基酸序列；

[0239] VL 是免疫球蛋白轻链可变区；

[0240] VH 是免疫球蛋白重链可变区；

[0241] CL 是免疫球蛋白轻链恒定区；

[0242] CH 是免疫球蛋白重链恒定区；

[0243] n 是大于 1 的整数；

[0244] Y 代表共价交联剂的残基。

[0245] 为简短起见，上述结构只显示了关键特征；它们没有标明免疫球蛋白的连接 (J) 或其它结构域，也没有显示二硫键。然而，若结合活性需要此类结构域，则构建时它们应当存在于它们在免疫球蛋白分子中所占据的通常位置。

[0246] 或者，可以将粘附素序列插入免疫球蛋白重链与轻链序列之间，从而得到包含嵌合重链的免疫球蛋白。在这个实施方案中，将粘附素序列融合在免疫球蛋白每个臂中的免疫球蛋白重链的 3' 端，或是在铰链与 CH2 结构域之间，或是在 CH2 与 CH3 结构域之间。类似的构建物已报道于 Hoogenboom et al.，Mol.Immunol.，28：1027-1037(1991)。

[0247] 尽管本发明的免疫粘附素中不需要存在免疫球蛋白轻链，然而也可以存在免疫球蛋白轻链，或是与粘附素 - 免疫球蛋白重链融合多肽共价结合，或是直接与粘附素融合。在前一种情况中，通常将编码免疫球蛋白轻链的 DNA 与编码粘附素 - 免疫球蛋白重链融合蛋

白的 DNA 共表达。在分泌后，杂合重链与轻链将共价结合以提供包含二个二硫键相连的免疫球蛋白重链－轻链对的免疫球蛋白样结构。适于制备此类结构的方法披露于例如美国专利 4,816,567，公告于 1989 年 3 月 28 日。

[0248] 最方便的是通过将编码粘附素部分的 cDNA 序列与免疫球蛋白 cDNA 序列以符合读码框的形式融合来构建免疫粘附素。然而，也可以使用与基因组免疫球蛋白片段的融合（参见例如 Aruffo et al.，Cell,61 :1303-1313(1990) ;Stamenkovic et al.，Cell,66 :1133-1144(1991)）。后一种类型的融合要求存在 Ig 调控序列以供表达。编码 IgG 重链恒定区的 cDNA 可以根据已发表的序列自衍生自脾或外周血淋巴细胞的 cDNA 文库分离，通过杂交或者通过聚合酶链式反应 (PCR) 技术。将编码免疫粘附素的“粘附素”和免疫球蛋白部分的 cDNA 串联插入在所选宿主细胞中指导高效表达的质粒载体中。

[0249] 在其它实施方案中，TWEAK 激动剂或 TWEAK 拮抗剂可以通过以美国专利 Nos. 4,640,835 ;4,496,689 ;4,301,144 ;4,670,417 ;4,791,192 或 4,179,337 中所列方式将该分子与多种非蛋白聚合物之一，例如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯，或者其它类似分子诸如聚谷氨酸酯 / 盐连接而共价修饰。此类 PEG 化形式可使用本领域已知技术来制备。

[0250] 本发明还设想了亮氨酸拉链形式的这些分子。“亮氨酸拉链”是本领域中用于指增强、促进或驱动其融合配偶体（例如亮氨酸拉链与之融合或连接的序列或分子）二聚化或三聚化的富含亮氨酸的序列的术语。本领域已经记载了多种亮氨酸拉链多肽。参见例如 Landschulz et al.，Science,240 :1759(1988) ;美国专利 5,716,805 ;WO 94/10308 ;Hoppe et al.，FEBS Letters,344 :1991(1994) ;Maniatis et al.，Nature,341 :24(1989)。本领域技术人员将领会，亮氨酸拉链序列可以融合在分子的 5′ 或 3′ 端。

[0251] 本发明的 TWEAK 激动剂和 TWEAK 拮抗剂还可以以如下方式修饰，即通过将多肽与另一种异源多肽或氨基酸序列融合而形成嵌合分子。优选的是，所述异源多肽或氨基酸序列的作用是使嵌合分子寡聚化。在一个实施方案中，此类嵌合分子包括具有标签的多肽的融合物，所述标签提供了抗标签抗体可选择性结合的表位。通常将表位标签置于多肽的氨基或羧基末端。此类表位标记形式的多肽的存在情况可使用针对标签多肽的抗体来检测。还有，表位标签的提供使得多肽易于使用抗标签抗体或结合表位标签的其它类型亲和基质通过亲和纯化进行纯化。多种标签多肽及其相应的抗体是本领域众所周知的。例子包括聚组氨酸 (poly-his) 或聚组氨酸－甘氨酸 (poly-his-gly) 标签 ;流感 HA 标签多肽及其抗体 12CA5(Field et al.，Mol.Cell.Biol.,8 :2159-2165(1988)) ;c-myc 标签及其抗体 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10(Evan et al.，Molecular and Cellular Biology,5 :3610-3616(1985)) ;及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标签及其抗体 (Paborsky et al.，Protein Engineering,3(6) :547-553(1990))。其它标签多肽包括 Flag 肽 (Hopp et al.，BioTechnology,6 :1204-1210(1988)) ;KT3 表位肽 (Martin et al.，Science,255 :192-194(1992)) ;α－微管蛋白表位肽 (Skinner et al.，J.Biol.Chem.,266 :15163-15166(1991)) ;及 T7 基因 10 蛋白肽标签 (Lutz-Freyermuth et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87 :6393-6397(1990))。

[0252] 设想了抗 TWEAK 或抗 TWEAK 受体抗体也可用于当前公开的方法。这些抗体可以是单克隆抗体。本领域技术人员可利用本领域已知及本文中描述的方法来鉴定起 TWEAK 或

TWEAK 受体活性的激动剂或拮抗剂作用的 TWEAK 抗体或 TWEAK 受体抗体。

[0253] 单克隆抗体可使用杂交瘤法制备，诸如 Kohler and Milstein, Nature 256：495(1975) 所述。在杂交瘤法中，小鼠、仓鼠或其它适宜的宿主动物通常用免疫剂免疫以引发生成或能够生成将特异性结合免疫剂的抗体的淋巴细胞。或者，可以在体外免疫淋巴细胞。

[0254] 免疫剂将通常包括 TWEAK 多肽或 TWEAK 受体或其融合蛋白，诸如 TWEAK-IgG 融合蛋白。通常，或是使用外周血淋巴细胞（“PBL”），若希望人起源的细胞，或是使用脾细胞或淋巴节细胞，若希望非人哺乳动物来源。然后，使用合适的融合剂，诸如聚乙二醇，将淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, Academic Press(1986), pp.59-103)。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞，特别是啮齿类、牛和人起源的骨髓瘤细胞。通常，采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可在合适的培养基中培养，所述培养基优选含有抑制未融合的永生化细胞生长或存活的一种或多种物质。例如，如果亲本细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT)，那么用于杂交瘤的培养基通常将含有次黄嘌呤、氨基喋呤和胸苷（“HAT 培养基”），这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。

[0255] 优选的永生化细胞系是那些高效融合、支持选定的抗体生成细胞稳定的高水平的表达抗体、并对诸如 HAT 培养基等培养基敏感的细胞系。更优选的永生化细胞系是鼠源骨髓瘤系，可从例如索尔克研究所细胞分配中心 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diege, California, USA) 和美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) 获得。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠 - 人异源骨髓瘤细胞系也已有描述 (Kozbor, J. Immunol. 133 :3001(1984) ;Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York(1987) pp.51-63)。

[0256] 然后可对杂交瘤细胞在其中培养的培养基测定针对 TWEAK 或 TWEAK 受体的单克隆抗体的存在。任选的是，通过免疫沉淀或通过体外结合测定法，诸如放射免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA)，优选通过 BIAcore 测定法，测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。此类技术和测定法是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson and Pollard, Anal. Biochem. 107 :220(1980) 的 Scatchard 分析来测定。

[0257] 在鉴定得到期望的杂交瘤细胞后，该克隆可通过有限稀释流程进行亚克隆，并通过标准方法进行培养 (Goding，见上文）。适于这一目的的培养基包括例如 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基或 RPMI-1640 培养基。或者，杂交瘤细胞可在哺乳动物中作为腹水进行体内培养。

[0258] 可通过常规免疫球蛋白纯化流程，诸如例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析，将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基或腹水分开或纯化。

[0259] 单克隆抗体还可通过重组 DNA 技术来生成，诸如美国专利 4,816,567 中所述。编码单克隆抗体的 DNA 易于使用常规流程分离和测序（例如使用能够特异性结合编码单克隆抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针）。杂交瘤细胞是此类 DNA 的优选来源。一旦分离，可将 DNA 置于表达载体中，然后将该表达载体转染到不另外产生免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中，诸如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞，

以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。还可以修饰 DNA，例如通过替代，即用人重链和轻链恒定区的编码序列代替同源鼠源序列 (Morrison et al.，Proc.Nat.Acad.Sci.81：6851(1984))，或者通过共价接合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列。

[0260] 通常用此类非免疫球蛋白多肽替代本发明抗体的恒定区，或者用它们替代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变区以产生嵌合二价抗体，其包含对 TWEAK 或 TWEAK 受体具有特异性的一个抗原结合位点和对不同抗原具有特异性的另一抗原结合位点。

[0261] 嵌合或杂合抗体也可在体外使用合成蛋白质化学的已知方法来制备，包括那些涉及交联剂的方法。例如，可使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。适于此目的的试剂的例子包括亚氨基硫醇酯 / 盐 (iminothiolate) 和 4- 巯基丁酰亚胺酸甲酯 (methyl-4-mercaptobutyrimidate)。

[0262] 也可以生成单链 Fv 片段，诸如 Iliades et al.，FEBS Letters，409：437-441(1997) 中所述。此类单链片段使用各种接头的偶联记载于 Kortt et al.，Protein Engineering，10：423-433(1997)。本领域知道用于重组生产和操作抗体的多种技术。下文更为详细地描述了熟练技术人员通常使用的此类技术的例示性例子。

[0263] (i) 人源化抗体

[0264] 通常，人源化抗体中引入了一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基，它们通常取自“输入”可变区。人源化可基本上遵循 Winter 及其同事的方法进行 (Jones et al.，Nature 321：522-525(1986)；Riechmann et al.，Nature 332：323-327(1988)；Verhoeyen et al.，Science 239：1534-1536(1988))，即用啮齿类 CDR 或 CDR 序列替代人抗体的相应序列。

[0265] 因此，此类“人源化”抗体是嵌合抗体，其中基本上少于整个人可变区用来自非人物种的相应序列替代。在实践中，人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

[0266] 重要的是，抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力及其它有利的生物学特性。为了实现这一目标，依照一种优选的方法，通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的，且为本领域技术人员所熟悉。可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像容许分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用，即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样，可从共有和输入序列中选出 FR 残基并进行组合，从而获得期望抗体特征，诸如对靶抗原的亲和力提高。一般而言，CDR 残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

[0267] (ii) 人抗体

[0268] 人单克隆抗体可通过杂交瘤方法生成。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠 - 人异源骨髓瘤细胞系已有描述，例如 Kozbor，J.Immunol.133：3001(1984)；Brodeur et al.，Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications，pp.51-63，Marcel Dekker，Inc.，New York(1987)。

[0269] 现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫时生成人抗体完整全集的转基因动物 (例如小鼠)。例如，已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链

连接区 (J_H) 基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击时生成人抗体。参见例如 Jakobovits et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551-255(1993)；Jakobovits et al.，Nature 362:255-258(1993)。

[0270] Mendez 等人 (Nature Genetics 15:146-156(1997)) 进一步改进了技术，生成了称为“Xenomouse II”（异种移植小鼠）的转基因小鼠品系，它在受到抗原攻击时生成高亲和力的完全人的抗体。这是如上所述通过将数百万碱基的人重链和轻链基因座种系整合到内源 J_H 区段有删除的小鼠中而实现的。Xenomouse II 携带 1,020kb 人重链基因座，包含大约 66 种 V_H 基因、完整的 D_H 和 J_H 区、及三种不同的恒定区（μ、δ 和 χ），还携带 800kb 人 κ 基因座，包含 32 种 Vκ 基因、Jκ 区段和 Cκ 基因。这些小鼠中生成的抗体在所有方面与在人体中看到的极其相似，包括基因重排、装配和全集（所有成员）。由于内源 J_H 区段的删除防止了鼠基因座的基因重排，因此人抗体较之内源抗体优先表达。

[0271] 或者，噬菌体展示技术 (McCafferty et al.，Nature 348:552-553(1990)) 可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变区 (V) 基因全集生成人抗体和抗体片段。依照这种技术，将抗体 V 结构域基因以符合读码框的方式克隆到丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因中，并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状噬菌体颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝，以抗体的功能特性为基础进行的选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因的选择。如此，噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行；有关综述参见例如 Johnson，Kevin S. and Chiswell，David J.，Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。V 基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson et al.，Nature 352:624-628(1991) 从衍生自经免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库中分离得到大量不同的抗噁唑酮抗体。可本质上遵循 Marks etal.，J. Mol. Biol.222:581-597(1991) 或 Griffith et al.，EMBO J. 12:725-734(1993) 所述技术，由未免疫人供体构建 V 基因全集和分离针对大量不同抗原（包括自身抗原）的抗体。在天然免疫应答中，抗体基因以高比率积累突变（体细胞高变）。导入的有些变化将赋予更高亲和力，展示高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞在随后的抗原攻击过程中优先复制和分化。这种天然过程可通过采用称为“链改组”的技术来模拟 (Marks et al.，Bio/Technol.10:779-783(1992))。在这种方法中，通过噬菌体展示得到的“初始”人抗体的亲和力可通过用从未免疫供体得到的 V 结构域基因天然存在变体（全集）的全集相继替换重链和轻链 V 区基因而提高。此技术得以生成亲和力在 nM 范围中的抗体和抗体片段。Waterhouse et al.，Nucl.Acids Res.21:2265-2266(1993) 记载了用于构建非常大的噬菌体全集（也称为“所有文库的母库”(the mother-of-all libraries)）的策略。基因改组也可用于从啮齿类抗体衍生人抗体，其中人抗体具有与起始啮齿类抗体相似的亲和力和特异性。依照此方法，它也称为“表位印记”(epitope imprinting)，通过噬菌体展示技术得到的啮齿类抗体的重链或轻链 V 结构域基因用人 V 结构域基因全集替换，产生啮齿类 - 人嵌合物。在抗原上进行的选择导致能够恢复功能性抗原结合位点的人可变区的分离，即表位决定（印迹 (imprints)）配偶体的选择。在重复该过程以替换剩余啮齿类 V 结构域时，得到人抗体（参见 PCT 专利申请 WO 93/06213，公开于 1993 年 4 月 1 日）。与传统的通过 CDR 移植进行的啮齿类抗体的人源化不同，此技术提供完全人的抗体，它们不含啮齿类起源的框架或 CDR 残

基。

[0272] 正如下文所讨论的，本发明的抗体可任选包括抗体单体、抗体二聚体、以及抗体的多价形式。本领域技术人员可通过本领域已知技术来构建此类二聚体或多价形式。用于制备单价抗体的方法也是本领域众所周知的。例如，一种方法涉及免疫球蛋白轻链和经修饰重链的重组表达。重链通常在 Fc 区中的任意点截短以防止重链交联。或者，相关半胱氨酸残基用另一种氨基酸残基替代或删除以防止交联。

[0273] (iii) 双特异性抗体

[0274] 双特异性抗体指对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆，优选人或人源化抗体。在本案中，一种结合特异性是针对 TWEAK 或 TWEAK 受体。

[0275] 用于生成双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上，双特异性抗体的重组生成基于两个免疫球蛋白重链 - 轻链对的共表达，其中两种重链具有不同的特异性 (Millstein and Cuello, Nature 305 :537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤 (四源杂交瘤 (quadroma)) 生成十种不同抗体分子的潜在混合物，其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦且产物产率低。1993 年 5 月 13 日公开的 WO 93/08829 及 Traunecker et al., EMBO 10 : 3655-3659(1991) 中披露了类似的流程。

[0276] 依照一种不同的且更优选的方法，将具有期望结合特异性 (抗体 - 抗原结合位点) 的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合优选使用包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区。优选在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区 (CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物及，如果需要，免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体，并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中，这为调整三种多肽片段的相互比例提供了极大的灵活性。然而，在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率没有特别意义时，有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个表达载体。在该方法的一个优选实施方案中，双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链，和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链 - 轻链对 (提供第二结合特异性) 构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半个双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径，因此发现这种不对称结构便于将期望的双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链的组合分开。该方法披露于 1994 年 3 月 3 日公开的 PCR 申请 WO 94/04690。

[0277] 关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如 Suresh et al., Methods in Enzymology 121 :210(1986)。

[0278] (iv) 异源偶联抗体

[0279] 异源偶联抗体也在本发明的范围之内。异源偶联抗体由两种共价连接的抗体构成。此类抗体建议例如用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞 (美国专利 4,676,980) 及用于治疗 HIV 感染 (PCT 申请 WO 91/00360 和 WO92/200373 ;EP 03089)。异源偶联抗体可使用任何方便的交联方法来生成。合适的交联剂是本领域众所周知的，连同许多交联技术一起披露于美国专利 4,676,980。

[0280] (v) 抗体片段

[0281] 在某些实施方案中，抗 TWEAK 或抗 TWEAK 受体抗体 (包括鼠的、人的和人源化的抗

体，及抗体变体）是抗体片段。已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上，通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段（参见例如 Morimoto et al.，J. Biochem.Biophys. Methods 24：107-117(1992)；Brennan et al.，Science 229：81(1985)）。然而，现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如，可直接从大肠杆菌回收 Fab′ -SH 片段并化学偶联以形成 $F(ab')_2$ 片段 (Carter et al.，Bio/Technology 10：163-167(1992))。在另一个实施方案中，$F(ab')_2$ 片段是使用亮氨酸拉链 GCN4 形成的，以促进 $F(ab')_2$ 分子的装配。依照另一种方法，可直接从重组宿主细胞培养物分离 Fv、Fab 或 $F(ab')_2$ 片段。用于生成抗体片段的多种技术对熟练从业人员将是显而易见的。例如，可使用木瓜蛋白酶进行消化。木瓜蛋白酶消化的例子记载于 94 年 12 月 22 日公开的 WO 94/29348 和美国专利 4,342,566。用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称作 Fab 片段，各自具有一个抗原结合位点，及一个残余 Fc 片段。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段，它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

[0282] 抗体消化中产生的 Fab 片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区 (CH_1)。Fab′ 片段与 Fab 片段的不同之处在于重链 CH_1 结构域的羧基末端增加了少数残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab′ -SH 是本文中对其中恒定区半胱氨酸残基携带游离硫醇基的 Fab′ 的称谓。$F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为在 Fab′ 片段之间有铰链半胱氨酸的成对 Fab′ 片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0283] 抗体在其恒定区中的保守位置发生糖基化 (Jefferis and Lund，Chem. Immunol.65：111-128(1997)；Wright and Morrison，TibTECH 15：26-32(1997))。免疫球蛋白的寡糖侧链影响蛋白质的功能 (Boyd et al.，Mol.Immunol.32：1311-1318(1996)；Wittwe and Howard，Biochem.29：4175-4180(1990))，及糖蛋白各部分间的分子内相互作用，它可影响糖蛋白的构象和所呈现的三维表面 (Hefferis and Lund，supra；Wyss and Wagner，Current Opin.Biotech.7：409-416(1996))。寡糖还可用来使给定糖蛋白靶向基于特定识别结构的某些分子。例如，已有报道，在半乳糖基化 IgG 中，寡糖模块从 CH2 间空间伸出，末端 N- 乙酰葡糖胺残基得以结合甘露糖结合蛋白 (Malhotra et al.，Nature Med.1：237-243(1995))。用糖肽酶除去中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中所生成的 CAMPATH-1H（一种识别人淋巴细胞 CDw52 抗原的重组人源化鼠单克隆 IgG1 抗体）上的寡糖导致补体介导的裂解作用 (CMCL) 完全降低 (Boyd et al.，Mol.Immunol.32：1311-1318(1996))，而用神经氨酸酶选择性消除唾液酸残基不导致 DMCL 的丧失。还有报道，抗体的糖基化影响抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。具体而言，有报道说，其中 β(1,4)-N- 乙酰葡糖胺转移酶 III(GnTIII)（催化等分 GlcNAc 形成的糖基转移酶）的表达受四环素调控的 CHO 细胞具有改良的 ADCC 活性 (Umana et al.，Mature Biotech.17：176-180(1999))。

[0284] 抗体的糖基化变体指其中抗体的糖基化样式发生改变的变体。改变意味着删除抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块，向抗体中添加一个或多个碳水化合物模块，改变糖基化（糖基化样式）的组成、糖基化的程度、等。糖基化变体可以通过例如在编码抗体的核酸序列中消除、改变和 / 或添加一个或多个糖基化位点来制备。

[0285] 抗体的糖基化典型的或是 N- 连接的或是 O- 连接的。N- 连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸（其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸）是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序

列。如此，多肽中这两种三肽序列任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O- 连接的糖基化指将糖类 N- 乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸，最常见的是丝氨酸或苏氨酸，但也可使用 5- 羟脯氨酸或 5- 羟赖氨酸。

[0286] 向抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利的完成（用于 N- 连接的糖基化位点）。所述改变还可通过向初始抗体的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行（用于 O- 连接的糖基化位点）。

[0287] 还可以在不改变潜在核苷酸序列的前提下改变抗体的糖基化（包括糖基化样式）。糖基化很大程度上取决于用于表达抗体的宿主细胞。由于用于表达作为潜在治疗剂的重组糖蛋白例如抗体的细胞类型很少是天然细胞，因此可预期抗体的糖基化样式将有显著变异（参见例如 Hse et al., J.Biol.Chem.272 :9062-9070(1997)）。在宿主细胞的选择之外，在抗体的重组生成过程中影响糖基化的因素包括生长模式、培养基配方、培养密度、氧合作用 (oxygenation)、pH、纯化方案、诸如此类。已经提出多种方法用于改变在特定宿主生物体中实现的糖基化样式，包括导入或过表达涉及寡糖生成的某些酶（美国专利 5,047,335 ;5,510,261 和 5.278,299）。糖基化或某些类型的糖基化可从糖蛋白中酶促清除，例如使用内切糖苷酶 H(Endo H)。另外，可对重组宿主细胞进行遗传工程改组，例如使其在加工某些类型的多糖方面缺陷。这些和类似的技术是本领域众所周知的。

[0288] 抗体的糖基化结构可通过碳水化合物分析的常规技术容易的分析，包括凝集素层析、NMR、质谱、HPLC、GPC、单糖成分分析、序贯酶促消化和 HPAEC-PAD，它利用高 pH 阴离子交换层析根据电荷来分离寡糖。为分析目的释放寡糖的方法也是知道的，包括但不限于酶促处理（常常使用肽 -N- 糖苷酶 F/ 内切 - β - 半乳糖苷酶进行）、使用强碱环境的消除以释放主要是 O- 连接结构、及使用无水肼的化学方法以释放 N- 和 O- 连接寡糖二者。

[0289] 三链抗体 (triabody) 也在本发明的范围内。此类抗体记载于例如 Iliades et al., supra 和 Kortt et al., supra。

[0290] 可以通过将抗体与细胞毒剂（像毒素分子）或前体药物活化酶偶联来修饰本发明的抗体，所述前体药物活化酶将前体药物（例如肽基化疗剂，参见 WO 81/01145）转变为活性抗癌药。参见例如 WO 88/07378 和美国专利第 4,975,278 号。这种技术也称为“抗体依赖性酶介导的前体药物疗法”(Antibody Dependent Enzyme Mediated Prodrug Therapy, ADEPT)。

[0291] 可用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶组分包括能够以这样一种方式作用于前体药物从而将其转变为更有活性的细胞毒性形式的任何酶。可用于本发明方法的酶包括但不限于可将含磷酸盐 / 酯的前体药物转变为游离药物的碱性磷酸酶 ;可将含硫酸盐 / 酯的前体药物转变为游离药物的芳基硫酸酯酶 ;可将无毒 5- 氟胞嘧啶转变为抗癌药 5- 氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶 ;可将含肽的前体药物转变为游离药物的蛋白酶，诸如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶（诸如组织蛋白酶 B 和 L）;胱天蛋白酶，诸如胱天蛋白酶 3 ;可转化含 D- 氨基酸替代的前体药物的 D- 丙氨酰羧肽酶 ;可将糖基化前体药物转变为游离药物的碳水化合物切割酶，诸如 β - 半乳糖苷酶和神经氨酸酶 ;可将用 β - 内酰胺衍生的药物转变为游离药物的 β - 内酰胺酶 ;及可将在其氨基氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转变成游离药物的青霉素酰胺酶，诸如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者，可使用具有酶活性的抗体，本领域也称作“抗体酶”，将本发明的前体

药物转变为游离活性药物（参见例如 Massey，Nature 328：457-458(1987)）。可如本文所述制备抗体－抗体酶偶联物，用于将抗体酶投递至肿瘤细胞群。

[0292] 可通过本领域众所周知的技术将酶与抗体共价结合，诸如使用异双功能交联剂。或者，可使用本领域众所周知的重组 DNA 技术构建包含与本发明酶的至少功能活性部分连接的本发明抗体的至少抗原结合区的融合蛋白（参见例如 Neuberger et al.，Nature 312：604-608(1984)）。

[0293] 还设想了其它抗体修饰。例如，可将抗体与多种非蛋白质性质聚合物中的一种连接，例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物、或其它分子诸如聚谷氨酸酯／盐。还可将抗体包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中（例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊）、在胶状药物传递系统中（例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于《Remington′ s Pharmaceutical Sciences》，第 16 版，Osol，A. 编，1980。为了延长抗体的血清半衰期，可如例如美国专利第 5,739,277 号中所述将补救受体结合表位掺入抗体（尤其是抗体片段）。在用于本文时，术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子（例如 IgG_1、IgG_2、IgG_3 或 IgG_4）的 Fc 区中负责延长 IgG 分子体内血清半衰期的表位。

[0294] 或者／另外，可以通过改变抗体 Fc 区的氨基酸序列以生成具有改变的 FcRn 结合的变体，从而延长或缩短血清半衰期。具有改变的 FcRn 结合和／或血清半衰期的抗体记载于 WO00/42072(Presta，L.)。

[0295] 本发明的抗体可以通过聚合来稳定。这可以通过用多功能交联剂使单体链交联来实现，或是直接的或是间接的，通过多功能聚合物。通常，两个基本上相同的多肽使用双功能交联剂在其 C- 或 N- 末端交联。使用试剂来交联末端氨基和／或羧基。通常，将两个末端羧基或两个末端氨基彼此交联，尽管通过选择适宜的交联剂，将一个多肽的 α 氨基与另一多肽的末端羧基交联。优选的是，用半胱氨酸替代多肽的 C- 末端。在本领域众所周知的条件下，可以在末端半胱氨酸之间形成二硫键，由此将多肽链交联。例如，通过金属催化的游离半胱氨酸的氧化或通过适当修饰的半胱氨酸残基的亲核替代可方便的形成二硫桥。交联剂的选择将取决于多肽中存在的氨基酸反应性侧链的身份。例如，如果半胱氨酸存在于多肽中 C- 末端以外的其它位置，那么二硫键交联将不是优选的。用亚甲基桥交联的肽也在本发明的范围内。

[0296] 抗体上 N- 末端氨基和 C- 末端羧基以外的合适交联位点包括赖氨酸残基上的 ε 氨基，以及位于肽的内部残基或引入侧翼序列的残基的侧链上的氨基、亚氨基、羧基、巯基和羟基。经由外部添加交联剂的交联可例如适当使用本领域技术人员熟悉的多种试剂来实现，例如经由多肽的碳二亚胺处理。合适的多功能（通常是双功能）交联剂的其它例子可以在文献中找到。

[0297] 在制备本文中的典型配制剂时，注意到所采用成分的推荐品质或“等级”将取决于配制剂的最终用途。对于治疗用途，各种成分优选是容许作为药用产品添加剂的等级的（诸如“GRAS”）。

[0298] 在某些实施方案中，提供了包含拮抗剂或激动剂及一种或多种赋形剂的组合物，所述赋形剂提供足够离子强度以提高溶解性和／或稳定性，其中该组合物的 pH 为 6（或大约 6）至 9（或大约 9）。拮抗剂或激动剂可以通过任何合适方法来制备以实现期望的纯度，

例如依照上文方法。在某些实施方案中，拮抗剂或激动剂在宿主细胞中重组表达或通过化学合成来制备。拮抗剂或激动剂在配制剂中的浓度可以根据例如配制剂的计划用途而变化。本领域技术人员无需过多实验就可以决定拮抗剂或激动剂的期望浓度。

[0299] 配制剂中提供足够离子强度以提高拮抗剂或激动剂的溶解性和 / 或稳定性的一种或多种赋形剂任选是聚离子 (polyionic) 有机或无机酸、天冬氨酸 (盐)/(酯)、硫酸钠、琥珀酸钠、醋酸钠、氯化钠、Captisol™、Tris、精氨酸盐或其它氨基酸、糖和多元醇诸如海藻糖和蔗糖。优选的是，配制剂中提供足够离子强度的一种或多种赋形剂是盐。可采用的盐包括但不限于钠盐和精氨酸盐。所采用盐的类型和盐的浓度优选使得配制剂具有相对较高的离子强度，使得配制剂中的拮抗剂或激动剂是稳定的。任选的是，盐在配制剂中存在的浓度为约 20mM 至约 0.5M。

[0300] 组合物的 pH 优选为 6(或大约 6) 至 9(或大约 9)，更优选大约 6.5 至大约 8.5，甚至更优选大约 7 至大约 7.5。在此实施方案的一个优选方面，组合物还将包含缓冲剂以至少维持组合物的 pH 为大约 6 至大约 8。可采用的缓冲剂的例子包括但不限于 Tris、HEPES 和组氨酸。在采用 Tris 时，任选将 pH 调至大约 7 至 8.5。在采用 Hepes 或组氨酸时，任选将 pH 调至大约 6.5 至 7。任选的是，缓冲剂在配制剂中的使用浓度为大约 5mM 至大约 50mM。

[0301] 特别是对于液体配制剂 (或重建的冻干配制剂)，可能希望在组合物中包含一种或多种表面活性剂。此类表面活性剂可以包括例如非离子表面活性剂，像 TWEEN™ 或 PLURONICS™(例如聚山梨醇酯或 poloxamer)。优选的是，表面活性剂包括聚山梨醇酯 20(“TWEEN 20”)。表面活性剂的使用浓度任选为大约 0.005％至大约 0.2％。

[0302] 本发明的配制剂可以在拮抗剂或激动剂及上文所述那些成分之外进一步包含各种其它赋形剂或成分。任选的是，供肠胃外施用的配制剂可以包含药剂学或肠胃外可接受的载体，即在所采用的剂量和浓度对接受者无毒且与配制剂的其它组分相容的载体。任选的是，载体是肠胃外载体，诸如与接受者的血液等渗的溶液。此类载体媒介的例子包括水、盐水或缓冲液，诸如磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、林格氏 (Ringer) 溶液和右旋糖溶液。各种任选的药剂学可接受的载体、赋形剂或稳定剂进一步记载于 Remington′ s Pharmaceutical Sciences，16th edition，Osol，A. ed. 1980。

[0303] 本文中的配制剂还可含有一种或多种防腐剂。例子包括氯化十八烷基二甲基苄基铵、氯化己烷双胺、苯扎氯铵 (氯化烷苄基二甲基铵的混合物，其中烷基为长链化合物) 和苯索氯铵。其它类型的防腐剂包括芳香醇、对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、和间甲酚。抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂 (诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵；氯化己烷双胺；苯扎氯铵、苯索氯铵；丁醇；对羟基苯甲酸烷基酯，诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3- 戊醇；和间甲酚)；低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；糖类，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；或聚乙二醇 (PEG)。

[0304] 此类载体的其它例子包括卵磷脂、血清蛋白质诸如人血清清蛋白、缓冲物质诸如甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质诸如硫酸鱼精蛋白、氯化钠、聚乙烯吡咯烷酮和基于纤维素的物质。基于凝胶形式的载体包括多糖，

诸如羧甲基纤维素或甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、聚氧乙烯 - 聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和木蜡醇 (wood wax alcohol)。常规的存储 (depot) 形式包括例如微胶囊、纳米胶囊、脂质体、硬膏剂、吸入形式、鼻喷雾和持续释放制剂。

[0305] 本发明的组合物可包括液体配制剂 (液体溶液或液体悬浮液) 和冻干配制剂，以及其中 TWEAK 拮抗剂或 TWEAK 激动剂为晶体或无定形沉淀物形式的悬浮液配制剂。

[0306] 如果是液体，最终配制剂优选冷冻贮存于≤ 20℃。或者，可冻干该配制剂并作为与注射用水重建的粉剂提供，该粉剂任选可贮存于 2-30℃。

[0307] 用于治疗性施用的配制剂必须是无菌的。通过无菌滤膜 (例如 0.2 微米滤膜) 过滤可轻易实现灭菌。通常将治疗用组合物置于具有灭菌存取口的容器中，例如具有可用皮下注射针头刺穿的塞子的静脉内溶液袋或药瓶。

[0308] 作为水溶液或用于重建的冻干配制剂，通常将组合物存储在单个单位或多剂量容器中，例如密封的安瓿或药瓶。该容器可以是本领域可获得的任何容器，并用常规方法填充。任选的是，该配制剂可装入注射笔装置 (或装入笔装置的药筒)，诸如那些本领域可获得的装置 (参见例如美国专利 5,370,629)，它们适合配制剂的治疗性投递。例如，可使用注射用水重建冻干的拮抗剂或激动剂配制剂来制备注射液。

[0309] 本文中所描述调控 TWEAK 或 TWEAK 受体活性的组合物可用于多种治疗应用。TWEAK 拮抗剂可用于例如治疗癌症的方法，而 TWEAK 激动剂可用于治疗多种免疫相关疾患的方法。

[0310] 在用于治疗此类病症的本发明方法中，可通过任何合适技术，包括输注或注射，将拮抗剂或激动剂配制剂直接施用于哺乳动物。具体的施用路径将取决于例如患者的病史，包括任何使用拮抗剂或激动剂察觉的或预料的副作用以及待矫正的具体病症。肠胃外施用的例子包括皮下、肌肉内、静脉内、动脉内和腹膜内施用组合物。配制剂优选作为重复的静脉内 (i.v)、皮下 (s.c)、肌肉内 (i.m.) 注射或输注、颅内输注，或者作为适于鼻内或肺内投递的气雾剂配制剂施用 (关于肺内投递参见例如 EP 257,956)。

[0311] 应当注意，在皮下和肌肉内注射中，注射剂的渗透压可能是重要的。当注射溶液为低渗或高渗时，在灌注时会使患者感觉到疼痛。通常，对于本文的治疗用可注射配制剂而言，优选注射液的相对渗透压为约 300mosm 到约 600mosm。

[0312] 还可以口服或持续释放制剂的形式来施用配制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有蛋白质的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质以定型产品的形式存在，例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括纤维素衍生物 (例如羧甲基纤维素)、溶于非水性介质中的蔗糖 - 醋酸异丁酸酯 (SABER™)、聚酯、水凝胶 (例如聚 (2- 羟乙基 - 甲基丙烯酸酯)(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res.1981,15 :167-277 ;Langer, Chem.Tech.1982, 12 :98-105) 或聚 (乙烯醇))、聚交酯 (美国专利 3,773,919、EP 58,481)、L- 谷氨酸和 L- 谷氨酸 γ - 乙酯的共聚物 (Sidman et al., Biopolymers 1983,22 :547-556)、不可降解的乙烯 - 乙酸乙烯 (Langer et al., supra)、可降解的乳酸 - 乙醇酸共聚物诸如 Lupron Depot(由乳酸 - 乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球体) 及聚 -D-(-)-3- 羟基丁酸 (EP 133,988)。用于投递全身起作用的药物的一种可选方法包括通过连续灌注 (采用例如缓慢释放装置或微型泵诸如渗透泵或皮肤贴片) 或者通过注射 (采用例如静脉内或皮下方式，包括单次推注 (single-bolus) 施用) 进行施用。

[0313] 将以与良好医疗实践一致的方式，考虑个体患者的临床状况、投递组合物的部位、施用的方法、施药的时程表和医务人员所知道的其它因素，配制和施用将用于治疗中的组合物。

[0314] 设想了在该方法中还可以采用其它别的疗法。一种或多种其它疗法可包括但不限于施用放疗、细胞因子、生长抑制剂、化疗剂、细胞毒剂、酪氨酸激酶抑制剂、ras 法尼基转移酶抑制剂、血管发生抑制剂、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂、和染色质重建剂诸如组蛋白乙酰基转移酶抑制剂和 / 或甲基化抑制剂，这些都是本领域已知的且进一步定义的特性如上，它们可以与 TWEAK 拮抗剂或 TWEAK 激动剂联合施用（例如同时的或序贯地施用）。另外，疗法基于靶向肿瘤或其它细胞抗原的治疗用抗体诸如 CD20 抗体（包括 Rituxan™）或 Her 受体抗体（包括 Herceptin™）以及抗血管发生抗体诸如抗 VEGF 或靶向其它受体诸如 EGFR 的抗体（诸如 Tarceva™），或者与肿瘤疫苗联合使用。

[0315] 在治疗诸如癌症等疾患的方法中，可按照制造商的说明书或由熟练技术人员凭经验确定化疗剂的制剂和服药时程安排。此类化疗的制剂和服药时程安排还记载于 Chemotherapy Service，Ed.，M.C.Perry，Williams & Wilkins，Baltimore，MD，1992。在有些情形中，在施用例如 TWEAK 拮抗剂之前，使细胞暴露于一种或多种化疗剂可能是有益的。

[0316] 可能期望还施用针对其它抗原的抗体，诸如结合 CD20、CD11a、CD18、CD40、ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4、血管内皮因子 (VEGF) 或其它 TNFR 家族成员（诸如 OPG、DR4、TNFR1、TNFR2）的抗体。或者 / 另外，可将本文中公开的结合相同或两种或多种不同抗原的两种或多种抗体共施用于患者。有时，还对患者施用一种或多种细胞因子可能是有益的。

[0317] 在本申请描述的任何治疗方法中，拮抗剂或激动剂配制剂可例如同时或序贯与例如本申请上文定义部分明确提供的其它药剂、细胞因子、化疗剂、抗体等联合施用。例如，TWEAK 拮抗剂配制剂可作为预处理施用（在施用任何这类其它药剂之前），诸如预处理在其它情况下对其它化疗剂的凋亡作用可能有抗性的细胞。

[0318] 如上指出，本发明的拮抗剂和激动剂具有多种用途。例如，TWEAK 拮抗剂可用于治疗哺乳动物中诸如肿瘤等病理疾患的方法。TWEAK 激动剂可用于治疗哺乳动物中免疫相关疾病的方法。熟练技术人员可以在哺乳动物中诊断在此描述的各种病理疾患。诊断技术在本领域是可获得的，这使得可以例如在哺乳动物中诊断或检测癌症或免疫相关疾病。例如，可通过多种技术鉴定癌症，包括但不限于触诊、血液分析、x- 射线、NMR 等等。免疫相关疾病也能容易的鉴定。在系统性红斑狼疮中，疾病的主要介质是生成对自身蛋白质 / 组织的自身反应性抗体及随后生成免疫介导的炎症。多个器官和系统在临床上受到影响，包括肾、肺、肌肉骨骼系统、粘膜皮肤、眼、中枢神经系统、心血管系统、胃肠道、骨髓和血液。

[0319] 医学从业人员熟悉其中干预免疫和 / 或炎性应答有好处的许多疾病。例如，类风湿性关节炎 (RA) 是一种慢性系统性自身免疫性炎性疾病，主要涉及多个关节的滑膜，由此导致对关节软骨的损伤。发病机制依赖 T 淋巴细胞，而且与类风湿因子，针对自身 IgG 的自身抗体的生成有关，由此导致免疫复合物的形成，它在关节液和血液中达到高水平。关节中的这些复合物可诱发显著的淋巴细胞和单核细胞浸润到滑膜中及随后显著的滑膜变化；关节腔 / 液受到类似细胞的浸润及许多嗜中性粒细胞的加入。受影响的组织主要是关节，常常是对称形式。然而，关节外疾病也存在两种主要形式。一种形式是形成关节外损伤，伴有正在进行的渐进性关节病和肺纤维化、血管炎和皮肤溃疡的典型损伤。关节外疾病的第二

种形式是所谓的费尔提氏 (Felty) 综合征，它发生在 RA 病程晚期，有时在关节病已经沉寂后，且涉及出现嗜中性粒细胞减少症、血小板减少症和脾肿大。这可伴随着多个器官中的血管炎及梗塞、皮肤溃疡和坏疽的形成。患者还常常在受影响关节上面的皮下组织中形成类风湿性结节；晚期的结节具有由混合的炎性细胞浸润物包围的坏死中心。可在 RA 中出现的其它表现包括：心包炎、胸膜炎、冠状动脉炎、伴有肺纤维化的间质性肺炎、干燥性角膜结膜炎和类风湿性结节。

[0320] 幼发型慢性关节炎是一种慢性特发性炎性疾病，常常开始于 16 岁之前。其表型与 RA 有些相似；类风湿因子阳性的一些患者归入幼发型类风湿性关节炎。疾病细分为三种主要类别：少数关节的、多关节的和系统性的。关节炎可以是严重的，通常是破坏性的，并导致关节僵硬和生长迟缓。其它表现可包括慢性前葡萄膜炎和系统性淀粉样变。

[0321] 脊椎关节病是具有一些普遍临床特征且普遍与 HLA-B27 基因产物表达有关的一组紊乱。这些紊乱包括：强直性脊柱炎、莱特尔氏 (Reiter) 综合征（反应性关节炎）、与炎性肠病有关的关节炎、与银屑病相关的脊椎炎、幼发型脊椎关节病及无差别 (undifferentiated) 脊椎关节病。区别性特征包括具有或没有脊椎炎的骶髂关节炎；炎性不对称关节炎；与 HLA-B27 有关（血清学上定义的 MHC I 型 HLA-B 基因座的等位基因）；眼炎症；及与其它类风湿性疾病有关的自身抗体的缺乏。对于诱发疾病来说关键的最相关细胞是 CD8+T 淋巴细胞，靶向由 MHC I 型分子呈递的所在抗原的细胞。CD8+T 细胞可与 MHC I 型等位基因 HLA-B27 反应，就像它是由 MHC I 型分子表达的外源肽。已有假设，HLA-B27 的表位可能模拟细菌或其它微生物的抗原性表位，因此诱导 CD8+T 细胞应答。

[0322] 系统性硬化（硬皮病）的病因学未知。疾病的特点是皮肤硬化；这可能是由活动性炎性过程诱导的。硬皮病可以是局部的或系统性的；血管损伤是普遍的，而且微血管系统中的内皮细胞损伤是系统性硬化发展中的早期且重要的事件；血管损伤可能由免疫介导。皮肤损伤中存在单核细胞浸润物及在许多患者中存在抗核抗体暗示免疫学基础。ICAM-1 常常在皮肤损伤中成纤维细胞的细胞表面上调，说明 T 细胞与这些细胞相互作用可能在疾病的发病机理中起作用。涉及的其它器官包括：胃肠道：平滑肌萎缩和纤维化，导致异常蠕动 / 运动；肾：同中心内皮下内膜增生，影响小弓形和叶间动脉，从而降低肾皮质血流，导致蛋白尿、氮血症和高血压；骨骼肌：萎缩、间质性纤维化、炎症；肺：间质性肺炎和间质性纤维化；及心：收缩带坏死、疤痕化 / 纤维化。

[0323] 特发性炎性肌病，包括皮肌炎、多肌炎和其它，是导致肌肉软弱的未知病因的慢性肌肉炎性紊乱。肌肉损伤 / 发炎常常是对称的和渐进的。自身抗体与大多数形式有关。这些肌炎特异性自身抗体针对并抑制涉及蛋白质合成的成分、蛋白质和 RNA 的功能。

[0324] 斯耶格伦氏(Sjögren)综合征是由免疫介导的炎症及随后泪腺和唾液腺功能破坏引起的。该病可能与炎性结缔组织疾病有关或伴随着炎性结缔组织疾病。该病与针对 Ro 和 La 抗原的自身抗体生成有关，这两种抗原都是小 RNA- 蛋白质复合物。损害导致干燥性角膜结膜炎、口干燥 (xerostomia)、及其它表现或关联，包括胆汁性肝硬化、外周或感觉神经病、和可触知的紫癜。

[0325] 系统性血管炎是这样的疾病，其中原发性损伤是炎症，后续对血管的损伤导致由受影响血管供应的组织缺血 / 坏死 / 变性，且在有些情况中最终导致终端器官功能障碍。血管炎病还可作为其它免疫 - 炎症介导疾病诸如类风湿性关节炎、系统性硬化等的继发损伤

或后遗症发生，特别是在还与免疫复合物形成有关的疾病中。原发性系统性血管炎组中的疾病包括：系统性坏死性血管炎：结节性多动脉炎、过敏性血管炎和肉芽肿病、多脉管炎；韦格纳氏（Wegener）肉芽肿病；淋巴瘤样肉芽肿病；和巨细胞性动脉炎。各种各样的血管炎病包括：粘膜与皮肤淋巴结综合征（MLNS 或川崎氏（Kawasaki）病）、分离的 CNS 血管炎、贝切特氏（Behet）病、血栓闭塞性血管炎（伯格氏（Buerger）病）和皮肤坏死性小静脉炎。所列大多数类型的血管炎的发病机理认为主要是由于免疫球蛋白复合物在血管壁中沉积及随后经 ADCC、补体活化或者两者诱导的炎性应答。

[0326] 结节病是病因学未知，特征在于几乎机体任何组织中都存在上皮样肉芽肿的状况；最常见的是累及肺。发病机理涉及患病部位持续存在活化的巨噬细胞和淋巴样细胞及随后由这些细胞类型释放局部和系统性活性产物而导致的慢性后遗症。

[0327] 自身免疫性溶血性贫血，包括自身免疫性溶血性贫血、免疫性全血细胞减少症和阵发性夜间血红蛋白尿，是由于生成与红细胞（和在有些情况中以及其它血细胞，包括血小板）表面表达的抗原反应的抗体的结果，是经补体介导的溶解和 / 或 ADCC/Fc 受体介导的机制去除那些抗体包被细胞的反映。

[0328] 在自身免疫性血小板减少症，包括血小板减少性紫癜，和其它临床背景中免疫介导的血小板减少症中，由于抗体或补体附着于血小板及随后经补体溶解、ADCC 或 Fc 受体介导的机制去除而发生血小板破坏 / 去除。

[0329] 甲状腺炎，包括格雷夫斯氏（Graves）病、桥本氏（Hashimoto）甲状腺炎、幼发型淋巴细胞性甲状腺炎和萎缩性甲状腺炎，是由于针对甲状腺抗原的自身免疫应答及产生与存在于甲状腺中且通常对甲状腺特异的蛋白质反应的抗体。现有的实验模型包括自发性模型：大鼠（BUF 和 BB 大鼠）和鸡（肥胖鸡品系）；可诱导模型：用甲状腺球蛋白、甲状腺微粒体抗原（甲状腺过氧化物酶）免疫动物。

[0330] I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病是胰岛 β 细胞的自身免疫性破坏；该破坏由自身抗体和自身反应性 T 细胞介导。胰岛素或胰岛素受体的抗体也可产生胰岛素不响应的表型。

[0331] 免疫介导的肾病，包括肾小球肾炎和肾小管间质性肾炎，是由于抗体或 T 淋巴细胞介导的对肾组织的损伤，或是直接由于生成针对肾抗原的自身反应性抗体或 T 细胞，或是间接由于针对其它非肾抗原有反应性的抗体和 / 或免疫复合物在肾中沉积。因此，导致免疫复合物形成的其它免疫介导的疾病也可作为间接后遗症诱导免疫介导的肾病。直接和间接的免疫机制都导致炎性应答，它在肾组织中产生 / 诱导损伤形成，导致器官功能受损，在有些情况中发展成肾衰竭。体液和细胞两种免疫机制都可涉及损伤的发病机理。

[0332] 中枢和周围神经系统的脱髓鞘病，包括多发性硬化；特发性脱髓鞘多神经病或格 - 巴二氏（Guillain-Barré）综合征；和慢性炎性脱髓鞘多神经病，认为具有自身免疫基础，而且由于对少突胶质细胞或对髓鳞脂直接造成损害而导致神经脱髓鞘。在 MS 中，有证据表明该病的诱导和发展依赖 T 淋巴细胞。多发性硬化是依赖 T 淋巴细胞的脱髓鞘病，而且具有复发 - 缓和过程或漫长的渐进过程。病因未知；然而，病毒感染、遗传恶病质、环境和自身免疫性都会起作用。损伤含有主要由 T 淋巴细胞介导的浸润物、小胶质细胞和浸润的巨噬细胞；CD4+T 淋巴细胞是损伤处的主要细胞类型。少突胶质细胞死亡和随后脱髓鞘的机理未知，但是可能是由 T 淋巴细胞驱动的。

[0333] 炎性和纤维化肺病，包括嗜曙红细胞性肺炎；特发性肺纤维化和超敏性肺炎，可能涉及不受调控的免疫 - 炎症应答。抑制该应答将具有治疗益处。

[0334] 自身免疫或免疫介导的皮肤病，包括大疱性皮肤病、多形性红斑和接触性皮炎，由自身抗体介导，其发生依赖 T 淋巴细胞。

[0335] 银屑病是 T 淋巴细胞介导的炎性疾病。损伤含有 T 淋巴细胞、巨噬细胞和抗原加工细胞，及一些嗜中性粒细胞的浸润物。

[0336] 变应性疾病，包括哮喘；变应性鼻炎；特应性皮炎；食物过敏；和荨麻疹，它们是 T 淋巴细胞依赖的。这些疾病主要由 T 淋巴细胞诱导的炎症、IgE 介导的炎症或二者组合介导。

[0337] 移植相关疾病，包括移植排斥和移植物抗宿主病 (GVHD)，依赖 T 淋巴细胞；抑制 T 淋巴细胞功能具有改善作用。

[0338] 其中干预免疫和 / 或炎性应答有益的其它疾病有感染性疾病，包括但不限于病毒感染（包括但不限于 AIDS、甲型、乙型、丙型、丁型、戊型肝炎）、细菌感染、真菌感染、及原虫和寄生虫感染（刺激 MLR 的分子（或衍生物 / 激动剂）可在治疗上用于增强对感染因子的免疫应答）；免疫缺陷病（刺激 MLR 的分子 / 衍生物 / 激动剂可在治疗上用于增强对遗传性、获得性、感染诱发的（如在 HIV 感染中）或医源性（即如源自化疗）免疫缺陷的状况的免疫应答）；和瘤形成。

[0339] 本发明还提供了包含本文所述拮抗剂或激动剂的试剂盒。典型的试剂盒将包括用于盛放如上所述一种或多种赋形剂中的拮抗剂或激动剂的容器，优选小管，及指导用户如何使用所述拮抗剂或激动剂配制剂的说明书，诸如产品插页或标签。这将优选提供药学配制剂。优选的是，所述药学配制剂用于治疗癌症或免疫相关疾患。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器和试管。容器可以由多种材料制成，诸如玻璃或塑料。容器中装有有效诊断或治疗病症的拮抗剂或激动剂配制剂，而且可具有无菌存取口（例如容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小管）。容器上或与容器相连的标签指明该配制剂用于诊断或治疗所选择的病症。该制品还可包括第二容器，其中装有注射用水、药学可接受的溶液、盐水、林格氏 (Ringer) 溶液、或右旋糖溶液。该制品还可包括商业和使用者立场上所需的其它物质，包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头、注射器、和附有使用说明书的包装插页。

[0340] 将本申请中所引用的所有专利、专利申请、出版物、产品描述、和方案的公开内容完整收入本文作为参考。本文所用各章节标题仅用于组织目的，不应解释为限制所描述的主题。

实施例

[0341] 通过下面的实施例来进一步描述和阐述本发明的各个方面，它们并非意图限制本发明的范围。

[0342] 除非另有说明，实施例中提及的商品化试剂依照制造商的说明书使用。下文实施例和整篇说明书中以 ATCC 编号所鉴别的那些细胞的来源是美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection，Manassas，VA)。除非另有说明，本发明使用重组 DNA 技术的标准流程，诸如上文及以下教科书中所记载的那些：Sambrook et al.，Molecular

Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1989; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innis et al., PCR Protocols:AGuide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; Freshney, R.I., AnimalCell Culture, 1987; Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991。

[0343] 材料和技术：

[0344] TWEAK 和 Fn14 在人 PBMC 中的表达分析。用淋巴细胞分离介质 (ICN) 依照制造商的说明书自 50ml 人供体外周血分离人外周血单个核细胞 (PBMC)。将细胞在含布雷菲德菌素 (Brefeldin)A(5μg/mL) 的完全 Iscoves 氏培养基中重悬浮 24 小时，其中存在和不存在炎症刺激物。刺激后，用 2μg/mLFc 封闭剂 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 将 Fc 受体于室温封闭 20 分钟。然后将细胞用偶联有荧光的针对 CD3、CD4、CD8、CD11b、CD11c、CD14、CD20、CD45、CD56、HLA-DR、Lin1 FITC(BD Biosciences, San Jose, CA) 和 FN14(e-Biosciences) 的单克隆抗体于室温表面染色 30 分钟，再然后用 BD FACS 溶胞液依照制造商的说明书进行处理，并于 -70℃保存过夜。

[0345] 将细胞透化 (permeabilized)，然后对 TWEAK(e-Biosciences) 于室温染色 30 分钟。清洗后，在 FACS Calibur(BD Biosciences) 上分析细胞。

[0346] TWEAK 缺陷小鼠的生成。在 TNLOX1-3 载体 (Gerber et al., Development, 126: 1149-1159(1999)) 的基础上构建 TWEAK 寻靶载体，即用 PGK-neo 盒替换 2.5kb TWEAK 基因，包括第一个和所有五个下游外显子。该构建物包含两段衍生自小鼠基因组的 DNA：位于 PGK-neo 盒 5'端的 3.1kb 片段包含 TWEAK 的第 6 个和第 7 个外显子及 TWEAK 外显子 1 的一部分，而位于 PGK-neo 盒 3' 端的 4.1kb 片段包含 SMT3IP1 的第 1 个和第 2 个外显子。

[0347] 通过电穿孔用线性化载体转染 R1 胚胎干细胞 (Nagy et al., Gene Targeting: A Practical Approach, A.L.Joyner, ed., Oxford University Press, Oxford, England, pp.147-179(1993))，并通过 Southern 印迹分析用 5′ 和 3′ 特异性 DNA 探针（如图 8 所示）对 G418 抗性克隆筛选预期重组事件的存在。将两个独立的 TWEAK-/- 细胞系显微注射入 C57BL/6 胚细胞 (blastocyte)。通过皮毛颜色检测到将嵌合雄鼠与 C57BL/6 雌鼠杂交而生成的小鼠中的种系传递 (germ line transmission)，并通过两步基因组 PCR(图 8) 使用以下外部 (E) 和内部 (I) 引物组得到证实：E 正向，TGCCCTAAGCCAGTCTACACCCAGTATTCCTTC(SEQ ID NO:3)；E 反向，TGGCCTGAAAGAAATGCTCACACTATCACCAAC(SEQ ID NO:4)；I 正向，CTTAGAACCAGCCGTAGGAAGGATT(SEQ ID NO:5)；I 反向，GTGCCAGGGCGTCCAGTACATACAA(SEQ ID NO:6)。

[0348] 将 TWEAK 敲除动物最少 6 次回交到 C57BL/6 背景上。

[0349] APRIL、TWEAK 和 SMT3IP1 mRNA 表达的检验。通过定量 RT-PCR 对若干组织的分析证明 TWEAK-/- 小鼠不表达 TWEAK 转录物，而敲除动物中两种邻近基因，APRIL 和 SMT31P1 的 mRNA 表达没有改变 (Varfolomeev et al., Mol.Cell.Biol., 24:997-1006(2004))；图 9。

[0350] 流式细胞术分析。通过用金属筛网和注射器的橡胶塞解离分离的组织，自 8 周龄小鼠得到造血器官的单细胞悬浮液。将单细胞悬浮液与 Fc 阻断性抗体 (2μg/mL, BD

Biosciences) 一起温育，随后用谱系特异的针对 B220、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD11c、CD19、CD45、DX5、Lin1FITC(BD Biosciences，San Jose，CA)、CD161 和 F4/80(e-Biosciences) 的偶联的单克隆抗体于室温染色 30 分钟。表面染色后，将 RBC 用 ACK 溶胞缓冲液 (Biosource International) 依照制造商的说明书溶胞，并将剩余细胞固定。将 TRUCount 珠 (BD Biosciences) 加到管中以用于定量。用 FACS Calibur 设备及相关 Cell Quest 软件 (BD Biosciences) 分析细胞结合荧光。

[0351] NK 细胞 AICD 测定法。自 100mL 人供体全血分离人 PBMC，并用 TNF-α (500ng/mL)、LPS(5μg/L) 或 IFN-γ (500ng/mL) 刺激 24 小时，不存在或存在抗 TWEAK mAb(CARL-1，e-Biosciences) 或 FN14-Fc(包含图 12 氨基酸 1-129 的融合蛋白)(Genentech)。刺激后，用 Miltenyi CD56+ 珠分离 NK 细胞，并对 sub-G1DNA 内含物染色，如 Maecker 等人所述 (Maecker et al.，Cancer Cell，2 :139-148(2002))。

[0352] LPS 实验。给每组 10 只 TWEAK-/- 和 TWEAK+/+ 小鼠腹膜内 (i.p.) 注射 LPS(大肠杆菌 055:B5 ;Sigma)。将剂量范围 100mg/kg 至 10mg/kg 的 LPS 溶于无菌盐水。在 5 天期间每个小时监测小鼠的存活力。通过给每组 10 只小鼠腹膜内注射 30mg/kg LPS 并在 24 小时后分离血液和脾脏，进行鼠细胞因子分析。将单细胞悬浮液在存在布雷菲德菌素 A(5μg/mL) 的条件下温育 6 小时。在此温育的最后 20 分钟对细胞进行 Fc 封闭 (2μg/mL，BD Biosciences)，随后用谱系特异的针对 DX5(用于鉴定 NK 细胞)、CD11b 和 F4/80(用于鉴定巨噬细胞)、及 CD45(共同的白细胞抗原) 的偶联单克隆抗体于室温染色 30 分钟。表面染色后，将 RBC 如上所述溶胞。将细胞透化，然后用针对 IFN-γ、IL-12 或 IL-10 的抗体染色，并在 FACS Calibur(BD Biosciences) 上进行分析。通过自 4 名人供体分离 PBMC，进行人细胞因子分析。将供体的 PBMC 在存在 / 不存在 1μg/mL LPS 的情况下体外温育 16 小时。在刺激的最后 6 小时，向细胞中加入布雷菲德菌素 A 至终浓度 5μg/mL。将人 PBMC 于室温 Fc 封闭 (Miltneyi)20 分钟，然后于室温表面染色 (CD3、CD56、CD14、CD45 ;BD Biosciences)30 分钟。表面染色后，将 RBC 依照制造商的说明书溶胞供胞内染色。将细胞固定和透化，用 IFN-γ 或 IL-12 抗体染色，并在 FACSCalibur 上进行分析。

[0353] STAT-1 活性测定法。分别使用 Miltenyi CD56+ 和 CD11b+ 珠，自人供体的脾脏分离 NK 细胞和巨噬细胞。将 $1.0x10^6$ 个 NK 细胞 /0.5mL 与 $1.0x10^6$ 个巨噬细胞 /0.5mL 巨噬细胞 -SFM 培养基 (Invitrogen) 共温育。让细胞在无血清培养基中静息 (rest)12 小时，然后用 1μg/mL LPS 进行刺激。12 小时后，将细胞对 CD56 和 CD11b 进行表面染色，随后针对磷酸化 STAT-1 进行胞内染色，如 Perez 和 Nolan 所述 (Krutzik et al.，Clin.Immunol.，110 :206-221(2004) ;Perez et al.，Meth.Mol.Biol.，263 :67-94(2004) ;Perez and Nolan，Nat.Biotechnol.，20 :155-162(2002))。

[0354] NF-κB 分析。分别使用 Miltenyi CD56+ 和 CD11b+ 珠，自人供体的脾脏分离 NK 细胞和巨噬细胞。在每个时间点将 $5.0x10^6$ 个 NK 细胞与 $5.0x10^6$ 个巨噬细胞在 5mL 巨噬细胞 -SFM 培养基中共温育。让细胞静息 (rest)12 小时，然后用 TWEAK(100ng/mL) 或 TNF-α (100ng/mL) 进行刺激。依照制造商的说明书 (Cell Signaling，Beverly，MA) 制备溶胞液 (20μg 总蛋白质) 和免疫沉淀物 (50μg 总蛋白质)。用于后续免疫印迹和免疫沉淀的所有抗体购自 Cell Signaling，而且实验依照他们的方案进行。

[0355] 组织学和免疫组织化学。将 3、6 和 12 月龄雄性 TWEAK-/- 和 TWEAK+/+ 小鼠的组

织称重，固定，切片，并分析病理状态。对苏木精和曙红染色切片分析总的组织学异常。对花生凝集素 (peanut agglutinin)(Vector Research，Burlingame，CA) 染色的冷冻切片分析生发中心的结构。将来自 12 月龄雄性小鼠的 5 只 TWEAK-/- 和 TWEAK+/+ 脾脏解离，染色，并使用 TruCount 珠 (BD Biosciences) 依照制造商的说明书对淋巴细胞的细胞性 (cellularity) 定量。

[0356] B16 黑素瘤实验。给 10 只 TWEAK-/- 和 TWEAK+/+ 小鼠在右后侧皮下 (s.c) 注射 0.1-0.5x 10^6 个细胞 /0.1mL 无菌盐水。每天监测小鼠，隔天测量肿瘤，持续 4 周 (B16.BL6 研究）或 6 周 (B16.F10 研究）。研究结束时，取出肿瘤，称重，并解离，首先通过金属筛网，随后用非酶性细胞解离缓冲液 (Sigma) 处理 5 分钟以产生单细胞悬浮液。将自注射肿瘤的小鼠分离的脾细胞与无菌盐水或肿瘤细胞悬浮液在存在布雷菲德菌素 A 的条件下共温育 12 小时以测量胞内细胞因子生成。

[0357] 实验结果：

[0358] TWEAK 在各种造血组织中的表达先前已有报道 (Chicheportiche et al.，supra；Marsters et al.，supra)，但是先前已有报道说表达 TWEAK 的唯一淋巴样细胞是单核细胞 (Nakayama et al.，J.Exp.Med.，192：1373-1380(2000))。为了进一步阐明 TWEAK 的免疫学靶物，对众多淋巴样群体分析了 TWEAK 及其受体 FN14 在各种炎症刺激后的的表达（图 1a 和 1b)。

[0359] TWEAK 及其受体 FN14 显示出由先天性免疫系统的细胞表达（见图 1)。只发现 NK 细胞、巨噬细胞和树突细胞表达 TWEAK（图 1A) 及其受体 FN14（图 1b)。此外，受体和配体二者的表面表达在用 IFN-γ 或 PMA 刺激后上调。NKT 细胞表达 TWEAK，但不表达 FN14，而且二者都不受 IFN-γ 或 PMA 上调。其它淋巴样细胞类型，包括 T 和 B 细胞，不表达显著水平的 TWEAK 或 FN14（数据未显示）。

[0360] 为了检验 TWEAK 在体内的生物学作用，构建了 TWEAK 基因敲除小鼠（图 8)。详细的解剖学和组织学分析没有揭示 TWEAK-/- 小鼠的非淋巴样组织有任何显著异常（图 10)。然而，造血组织分析揭示了 TWEAK-/- 小鼠具有与年龄相仿的野生型同胞相比显著更多的 NK 细胞（图 2a)。这种增多在次级淋巴样器官中是明显的，包括脾脏、派伊尔氏斑 (Peyer's patches)、淋巴结和外周血（图 2a)，而且在雄鼠中（图 2a，顶图）大于在雌鼠中（图 2a，底图）。与 NK 细胞数增多相反，TWEAK-/- 小鼠展现出正常的 NKT 细胞（图 2b) 以及 CD4+ 或 CD8+T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、树突细胞、粒细胞和血小板水平（数据未显示)。TWEAK-/- 和野生型小鼠骨髓中的 NK 细胞数是相似的（图 2c)，说明 NK 计数升高可能不是由 NK 细胞发育 (development) 变化引起的 (Kim et al.，Nat.Immunol.，3：523-528(2002))。或者，激活诱导的细胞死亡 (activation-induced cell death，AICD) 对 NK 细胞消除的减弱可能导致 NK 在不存在 TWEAK 的情况下积累。自人外周血分离 NK 细胞，并检验 TWEAK 中和对其 AICD 敏感性的影响（图 2d)。可溶性 FN14-Fc 诱饵受体 (decoy receptor) 或 TWEAK 中和性抗体对 TWEAK 的抑制显著保护 NK 细胞免于 TNF-α、LPS 或 IFN-γ 刺激所致的 AICD，说明 NK 细胞可能因为通过 AICD 的 NK 消除不足而在 TWEAK-/- 小鼠中积累。

[0361] 为了测定 TWEAK 在体内对先天性免疫应答的重要性，用致死剂量的革兰氏阴性细菌内毒素脂多糖 (LPS) 检验已建立的系统攻击模型（图 3a)。TWEAK-/- 小鼠在较宽的 LPS 剂量范围内与野生型对照相比对 LPS 诱导的死亡更加易感，说明在不存在 TWEAK 时形成了

更强烈的先天性炎性应答。在注射 LPS 的小鼠的外周血和脾脏分离的 TWEAK-/-NK 细胞和巨噬细胞生成与野生型细胞相比更多的 INF-γ 和 IL-12 但更少的 IL-10（图 3b）。类似地，用抗体中和 TWEAK 提升人外周血 NK 细胞和巨噬细胞在 LPS 刺激后的 IFN-γ 和 IL-12 生成（图 3c）。如此，认为 TWEAK-/- 小鼠对 LPS 过度敏感，不仅因为它们具有升高的 NK 细胞数，而且还因为它们的 NK 细胞和巨噬细胞生成更多的 IFN-γ 和 IL-12，它们进一步促进炎性应答 (D′ Andrea et al., J.Exp.Med.,178 :1041-1048(1993) ;Emoto et al., J.Immunol., 169 :1426-1432(2002) ;Heremans et al., Eur.J.Immunol.,24 :1155-1160(1994))。这些结果说明 TWEAK 发挥削弱先天性炎症应答的功能。

[0362] 为了调查 TWEAK 的缺失如何促进先天性免疫细胞生成 IFN-γ 和 IL-12，检验了信号转导物和转录激活物 (STAT-1) 的活性，它对于应答病原体而在 NK 细胞诱导 IFN-γ 表达、在巨噬细胞中诱导 IL-12 表达是重要的 (Marodi et al., Clin.Exp.Immunol.,126 : 456-460(2001) ;Morrison et al., J.Immunol.,172 :1825-1832(2004) ;Nelson et al., J.Immunol.,156 :3711-3720(1996) ;Varma et al., Clin.Diag.Lab Immunol.,9 : 530-543(2002))。中和 TWEAK 提高了 Nk 细胞和巨噬细胞中的基础 STAT-1 磷酸化，并且进一步增强了这些细胞中 LPS 对 STAT-1 的刺激（图 4a）。如此，促使 TWEAK 抑制 IFN-γ 和 IL-12 生成的一种机制可能是削弱 STAT-1 的激活。

[0363] TNF-α，在提升先天性炎症应答中发挥关键作用的细胞因子，通过激活典范 NF-κB1 途径而诱导 IFN-γ 和 IL-12（以及其它免疫调控基因）的表达 (Bonizzi and Karin, Trends Immunol.,25 :280-288(2004) ;Chen and Greene, Nat.Rev.Mol.Cell Biol.,5 :392-401(2004) ;Chen et al., J.Immunol.,166 :270-276(2001) ;D′ Andrea et al., J.Exp.Med.,178 :1041-1048(1993) ;Zhong et al., Mol.Cell,9 :625-636(2002))。TNF-α 诱导 p65/RelA NF-κB1 亚基的瞬时磷酸化，导致其与 p50 亚基结合及所得异聚复合物的核易位。在核中，p65/p50 易二聚体通过结合 p300/CBP 转录辅激活物 (co-activator) 而反式激活下游靶基因，诸如 IFN-γ 和 IL-12(Chen and Greene, supra ;Chen et al., J.Immunol.,166 :270-276(2001) ;Chen et al., Immunology,107 :199-208(2002) ; Kiernan et al., J.Biol.Chem.,278 :2758-2766(2003) ;Zhong et al., supra)。 或者，NF-κB1 可以与组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC)-1，-2 或 -3 相互作用，造成靶基因的转录抑制 (Ashburner et al., Mol.Cell Biol.,21 :7065-7077(2001) ;Kiernan et al., J.Biol.Chem.,278 :2758-2766(2003) ;Quivy and Van Lint, Biochem.Pharmacol.,68 : 2507-2515(2004) ;Rahman et al., Biochem.Pharmacol.,68 :1255-1267(2004) ;Zhong et al., supra)。鉴于 TNF-α 选择性激活典范 NF-κB1 途径，TWEAK 表现出能够促进典范 NF-κB 1(Chicheportiche et al., supra ;Marsters et al., supra ;Saitoh et al., supra) 和非典范 NF-κB2 亚基 (Saitoh et al., supra) 二者的核易位。

[0364] 为了检验 TWEAK 是否还可能通过调控 NF-κB1 的转录相互作用而影响基因表达，比较了 TWEAK 和 TNF-α 在人脾 NK 细胞和巨噬细胞中对 p65NF-κB1 磷酸化的影响（图 4b）。与引起在 0.5 小时可检测的 p65 瞬时改变 (modification) 的 TNF-α 不同，TWEAK 诱导延长的 p65 磷酸化，自 0.25 小时开始，持续至 8 小时。接着，将来自受刺激细胞的 p65NF-κB1 免疫沉淀，并通过免疫印迹分析探查与 p300 或 HDAC-1 的结合（图 4c）。尽管 TNF-α 诱导 p65 与 p300 但非与 HDAC-1 的强相互作用，然而 TWEAK 诱导 p65 与 HDAC-1 但非 p300 的强结

合。如此，在抑制 STAT-1 激活以外，TWEAK 可通过促进 NF-κB1 与 HDAC-1 的相互作用而抑制 IFN-γ 和 IL-12 的转录。TWEAK 对 NK 细胞的 IFN-γ 生成和巨噬细胞的 IL-12 生成的抑制效果得到 HDAC 抑制剂曲古抑菌素 (Trichostatin)A 的逆转（数据未显示）。

[0365] 为了调查 TWEAK 缺陷是否改变免疫系统发育，比较了 3、6 和 12 月龄时 TWEAK-/- 小鼠和野生型同胞的淋巴样组织（图 5）。到 6 个月时，TWEAK-/- 小鼠显示出与对照相比显著的脾脏和淋巴结增大（图 5a、5b），而胸腺和肝脏没有不同（数据未显示）。组织学评估表明 TWEAK-/- 脾脏具有正常的生发中心形成，而且没有恶性肿瘤，正如淋巴结一样（图 5c）。然而，脾脏的免疫组织化学染色显示出 12 月龄 TWEAK-/- 小鼠中与年龄相仿的同胞相比更强的抗 CD3 抗体信号（图 5c），说明 T 细胞隔室 (compartment) 有扩大。FACS 分析证实了 CD4+ 和 CD8+ 两种 T 细胞在年老的 TWEAK-/- 小鼠中都显著地更加丰富（图 5d）。脾 NK 细胞数也增加，而 B 细胞、巨噬细胞、粒细胞或血小板的数目是相似的（数据未显示）。考虑到 NK 细胞只占到脾脏细胞的较小百分比，有可能的是脾脏大小增大主要是由 TWEAK 缺失下 T 细胞隔室扩大引起的。进一步的分析证明了 TWEAK-/- 小鼠中记忆 T 细胞和 T_H1 特异性转录因子 T-bet 表达为阳性的 T 细胞有显著增加（图 5e）。这些结果说明 TWEAK 发挥抑制适应性 T_H1 免疫 (immune profile) 发育的功能。

[0366] 为了进一步评估 TWEAK 在调控转变成适应性免疫中的参与情况，检验了已建立的基于同基因小鼠 C57Black 6B16 黑素瘤细胞的抗肿瘤免疫力模型 (Yang et al., Int. J. Cancer, 105 :512-519(2003) ;Yang et al., Cell. Immunology, 179 :84-95(1997) ;Yei et al., Gene Ther., 9 :1302-1311(2002))。在此模型中，NK 细胞和效应 T 细胞二者对于肿瘤排斥都是重要的 (Prevost-Blondel et al., Eur. J. Immunol., 30 :2507-2515(2000) ; Turk et al., J. Exp. Med., 200 :771-782(2004) ;Yang et al., Int. J. Cancer, 105 : 512-519(2003) ;Yang et al., Cell. Immunol., 179 :84-95(1997) ;Yei et al., Gene Ther., 9 :1302-1311(2002))。首先，用中等攻击性的 B16 细胞系 B16.F10 亚克隆攻击小鼠（图 6）。TWEAK-/- 小鼠完全抵抗 B16.F10 肿瘤的建立和生长，而野生型动物以与先前报道的数据相当的速率屈从肿瘤生长（图 6a 和 6b)(Yei et al., supra)。为了确定是哪些免疫学差异引起了肿瘤排斥方面的这种显著不同，分析了注射 B16.F10 的小鼠的脾淋巴细胞群（图 6c)。与其它发现一致的是，TWEAK 缺陷动物具有与野生型对照相比更多的脾 NK 细胞。令人惊讶的是，尽管它们缺乏可检测的肿瘤及因此缺乏丰富的肿瘤相关抗原，TWEAK-/- 小鼠展现出 CD8+T 细胞相对于对照的显著增多。将此发现与年老的 TWEAK-/- 小鼠中记忆 T 细胞数增加的观察结果结合起来，认为 TWEAK 的缺失可促进肿瘤诱导的记忆应答增强，可能是通过存在更高水平 IFN-γ 和 IL-12 从而更强地激发了 T 细胞。

[0367] 还用更具攻击性的 B16 黑素瘤亚克隆 B16.BL6 攻击小鼠 ;这确保了肿瘤植入，尽管 1 个月时的平均肿瘤重量表明在 TWEAK-/- 小鼠中肿瘤生长与野生型对照相比受到显著削弱（图 7a)。自 TWEAK-/- 小鼠分离的肿瘤展现出极大增加的淋巴细胞浸润，T 和 NK 细胞比对照多 2-8 倍（图 9)。携瘤 TWEAK-/- 小鼠还具有比对照更大的脾脏（图 7b)，其中 NK 和 T 细胞群扩增（图 7c)。为了验证扩增的淋巴细胞群是否具有特定的抗肿瘤活性，自携瘤小鼠分离脾细胞，离体 (ex vivo) 用 B16.BL6 肿瘤细胞再次攻击，并测定它们生成特定细胞因子的能力。在用肿瘤再次攻击后，与相应的野生型对照相比，TWEAK 缺陷的 CD8+T 细胞和 NK 细胞生成显著更多的 IFN-γ，而 TWEAK-/- 巨噬细胞生成更多的 IL-12(图 7d、7e)。总之，

这些研究证明了 TWEAK 的缺失提升先天性及适应性抗肿瘤免疫力，说明 TWEAK 在生理学上的作用是抑制这两种应答。另外，TWEAK-/- 小鼠中 T 细胞扩增和抗肿瘤细胞因子生成增强的证据说明 TWEAK 调控先天性 - 适应性免疫的接合 (interface)。

[0001]

序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (GENENTECH, INC.)
ASHKENAZI, Avi J.
MAECKER, Heather

<120> 用于调控 TWEAK 和 FN14 活性的方法和组合物

<130> P2223R1 PCT

<140> PCT/US2006/007547
<141> 2006-03-02

<150> US 60/659,339
<151> 2005-03-07

<160> 6

<210> 1
<211> 249
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 1

Met	Ala	Ala	Arg	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Arg	Gly	Glu	
1				5				10						15	
Pro	Gly	Thr	Ala	Leu	Leu	Val	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	
				20				25						30	
Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Gly	
				35				40						45	
Ser	Arg	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Glu	Pro	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	
				50				55						60	
Val	Ala	Glu	Glu	Asp	Gln	Asp	Pro	Ser	Glu	Leu	Asn	Pro	Gln	Thr	
				65				70						75	
Glu	Glu	Ser	Gln	Asp	Pro	Ala	Pro	Phe	Leu	Asn	Arg	Leu	Val	Arg	
				80				85						90	
Pro	Arg	Arg	Ser	Ala	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Thr	Arg	Ala	Arg	Arg	
				95				100						105	
Ala	Ile	Ala	Ala	His	Tyr	Glu	Val	His	Pro	Arg	Pro	Gly	Gln	Asp	
				110				115						120	
Gly	Ala	Gln	Ala	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Val	Ser	Gly	Trp	Glu	Glu	
				125				130						135	
Ala	Arg	Ile	Asn	Ser	Ser	Ser	Pro	Leu	Arg	Tyr	Asn	Arg	Gln	Ile	
				140				145						150	
Gly	Glu	Phe	Ile	Val	Thr	Arg	Ala	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Cys	
				155				160						165	
Gln	Val	His	Phe	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Val	Tyr	Leu	Lys	Leu	Asp	
				170				175						180	

[0002]

Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe
185 190 195

Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys
200 205 210

Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg
215 220 225

Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu
230 235 240

Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
245

<210> 2
<211> 127
<212> PRT
<213> 人类

<400> 2
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Gly Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
35 40 45

Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His
50 55 60

Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe
65 70 75

Arg Leu Leu Trp Pro Ile Leu Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe
80 85 90

Val Leu Gly Leu Leu Ser Gly Phe Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg
95 100 105

Arg Glu Lys Phe Thr Thr Pro Ile Glu Glu Thr Gly Gly Gly Cys
110 115 120

Pro Ala Val Ala Leu Ile Gln
125

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 3
tgccctaagc cagtctacac ccagtattcc ttc 33

<210> 4

[0003]

<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 4
tggcctgaaa gaaatgctca cactatcacc aac 33

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 5
cttagaacca gccgtaggaa ggatt 25

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 6
gtgccagggc gtccagtaca tacaa 25

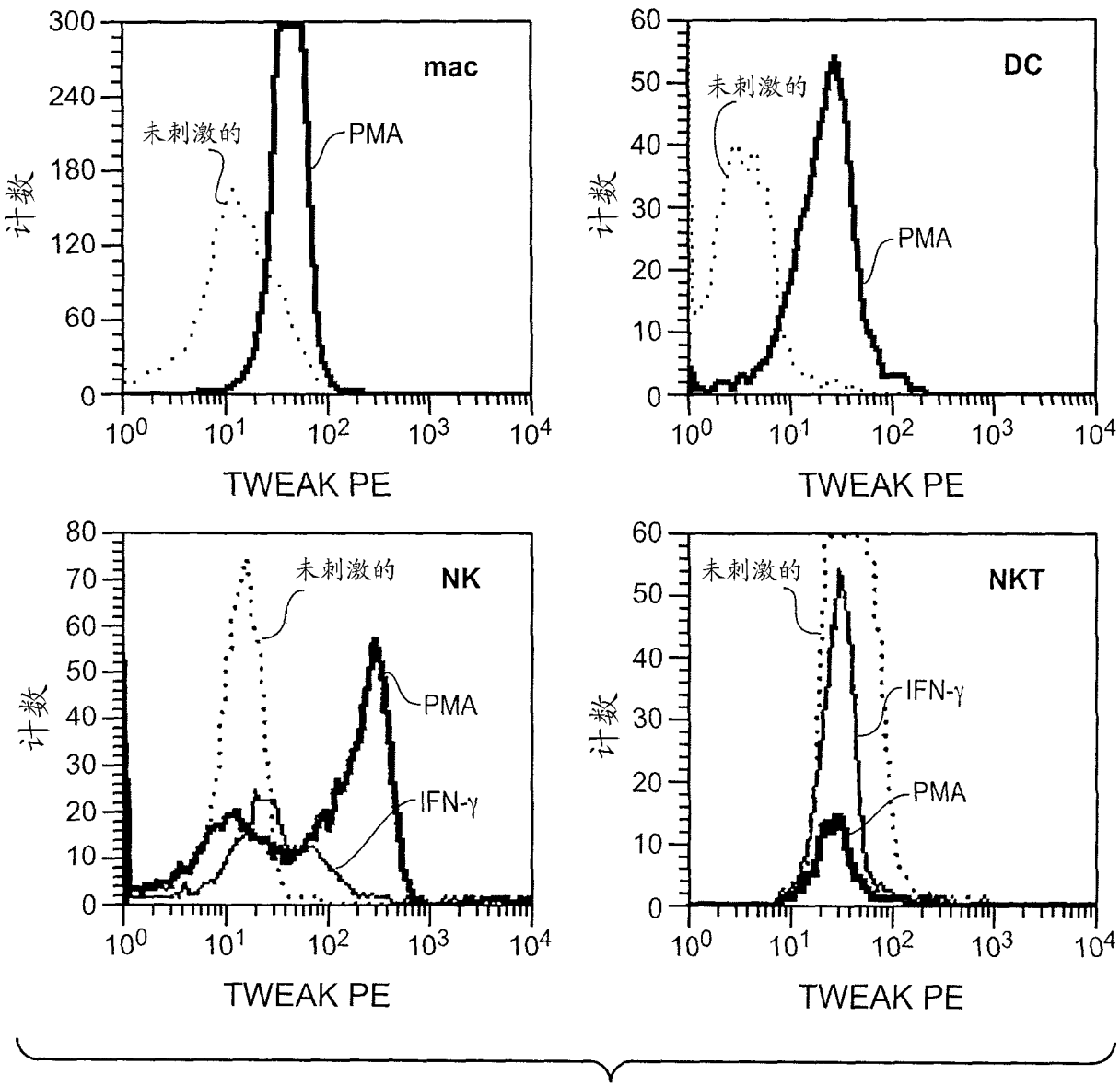

mac
未刺激的
PMA
计数
TWEAK PE
DC
未刺激的
PMA
计数
TWEAK PE
NK
未刺激的
PMA
IFN-γ
计数
TWEAK PE
NKT
未刺激的
IFN-γ
PMA
计数
TWEAK PE

图 1a

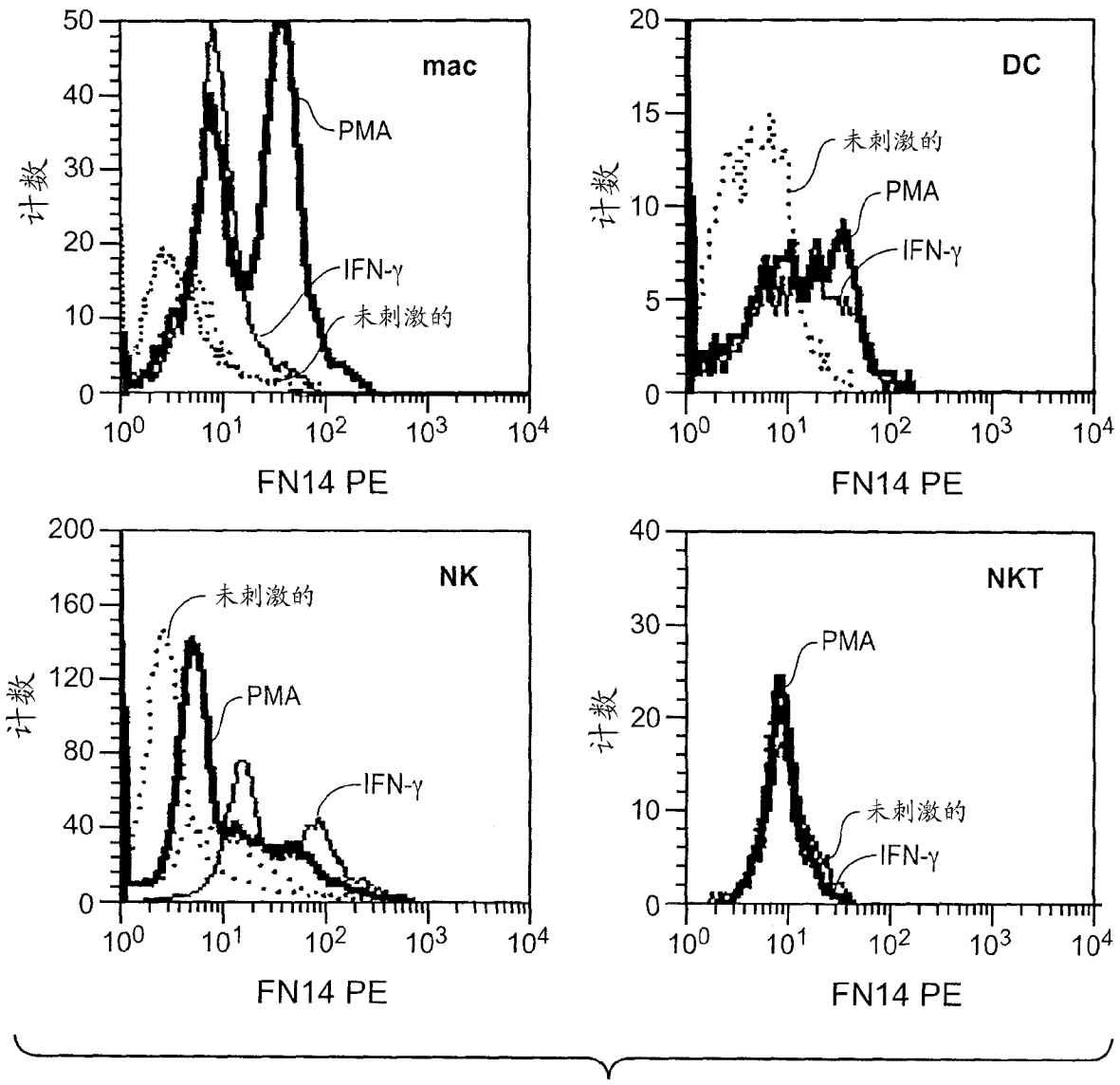

mac
PMA
IFN-γ
未刺激的
计数
FN14 PE
DC
未刺激的
PMA
IFN-γ
计数
FN14 PE
NK
未刺激的
PMA
IFN-γ
计数
FN14 PE
NKT
PMA
未刺激的
IFN-γ
计数
FN14 PE

图 1b

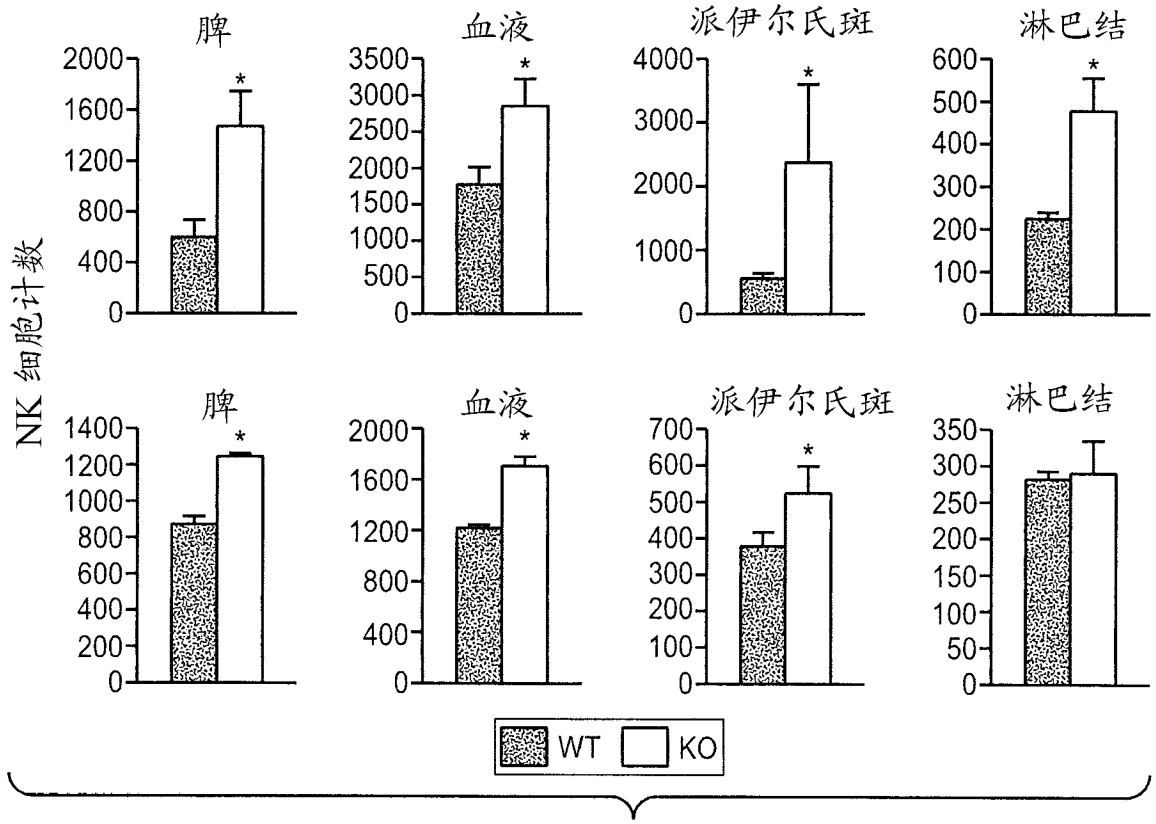

脾
血液
派伊尔氏斑
淋巴结
NK 细胞计数
2000
1600
1200
800
400
0
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
4000
3000
2000
1000
600
500
400
300
200
100
1400
1200
1000
800
600
400
200
700
600
500
400
300
200
100
350
300
250
200
150
100
50
*
WT
KO

图 2a

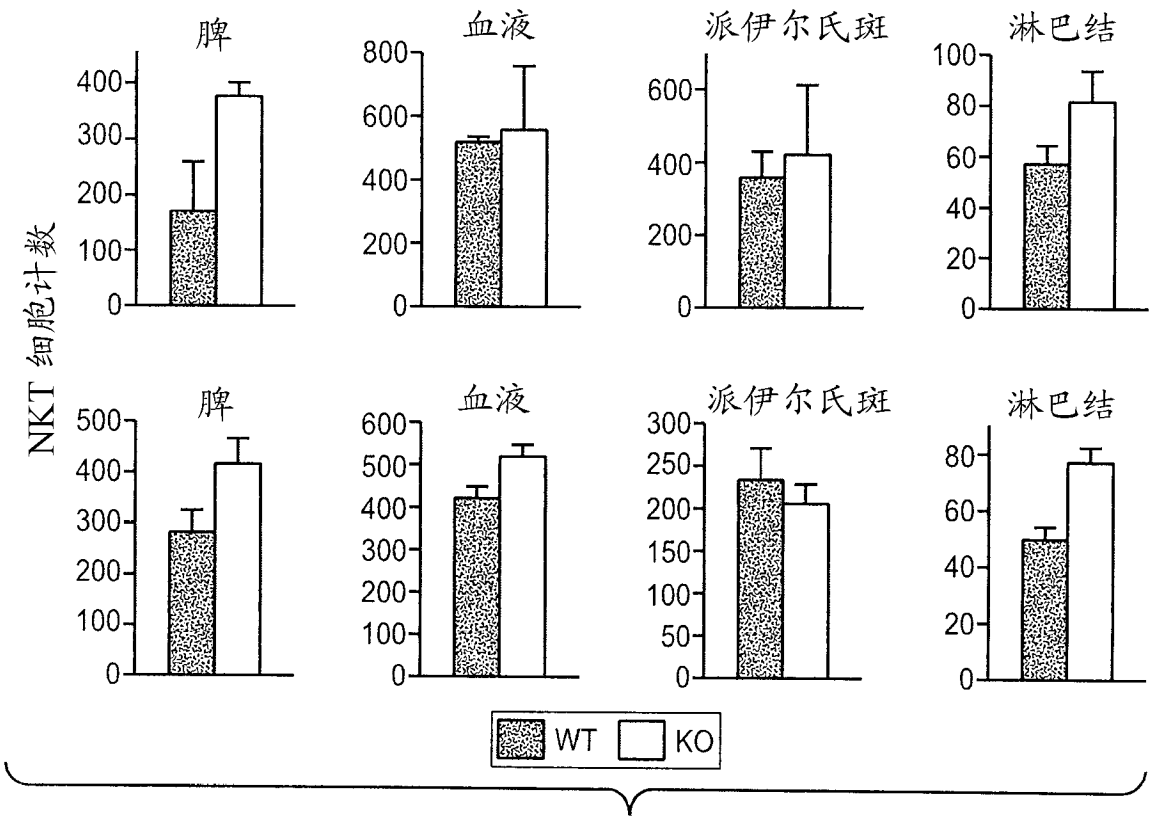

脾
血液
派伊尔氏斑
淋巴结
NKT 细胞计数
400
300
200
100
0
800
600
400
200
0
600
400
200
0
100
80
60
40
20
0
脾
血液
派伊尔氏斑
淋巴结
500
400
300
200
100
0
600
500
400
300
200
100
0
300
250
200
150
100
50
0
80
60
40
20
0
WT
KO

图 2b

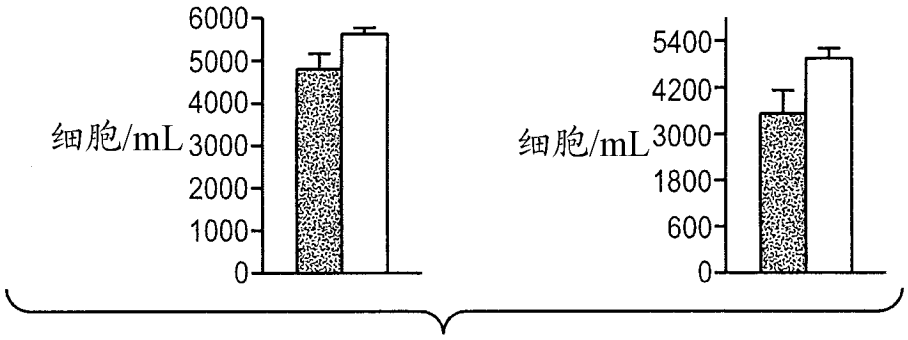

细胞/mL
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
细胞/mL
5400
4200
3000
1800
600
0

图 2c

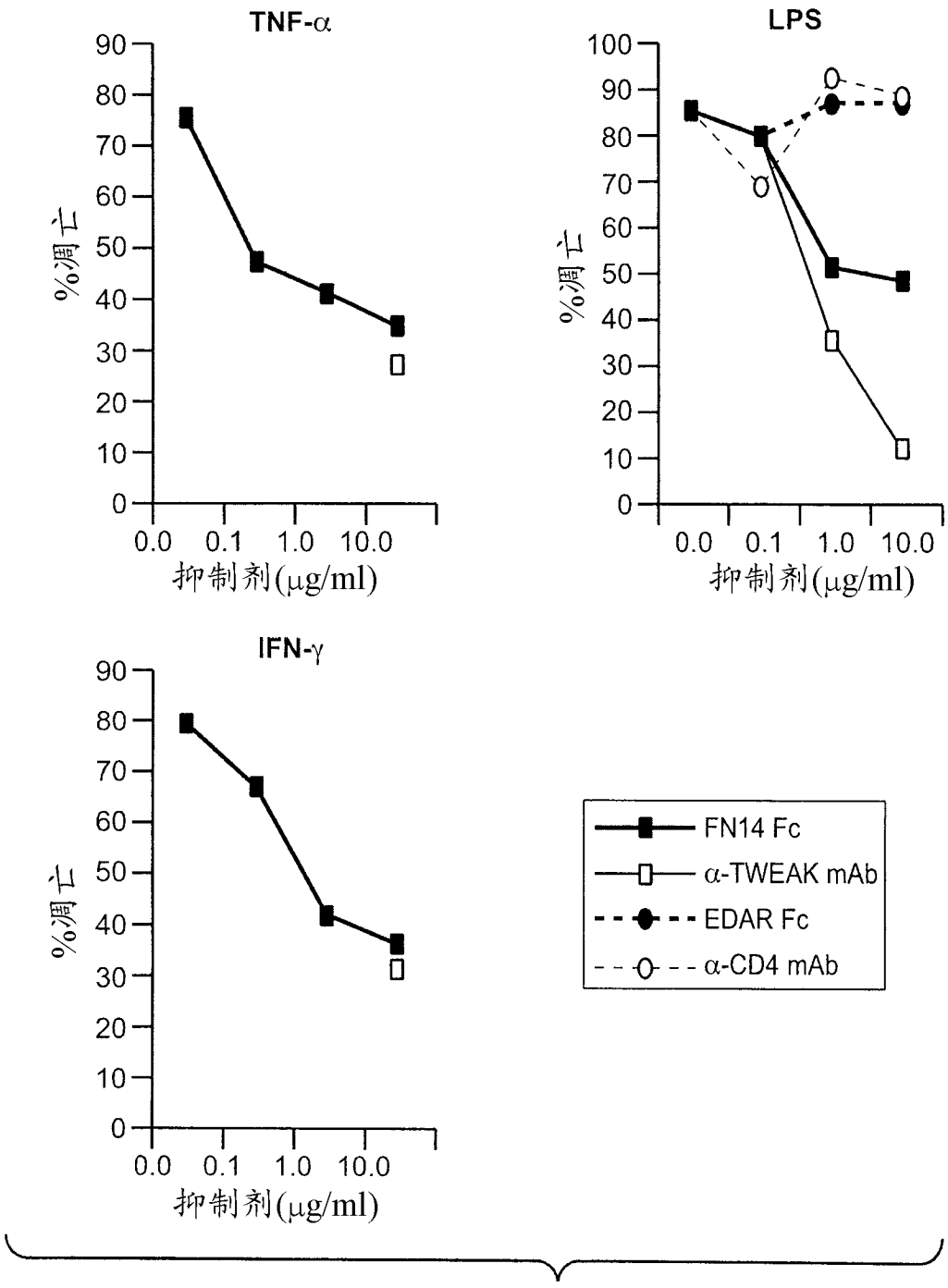

TNF-α
%凋亡
抑制剂(μg/ml)
LPS
%凋亡
抑制剂(μg/ml)
IFN-γ
%凋亡
抑制剂(μg/ml)
FN14 Fc
α-TWEAK mAb
EDAR Fc
α-CD4 mAb

图 2d

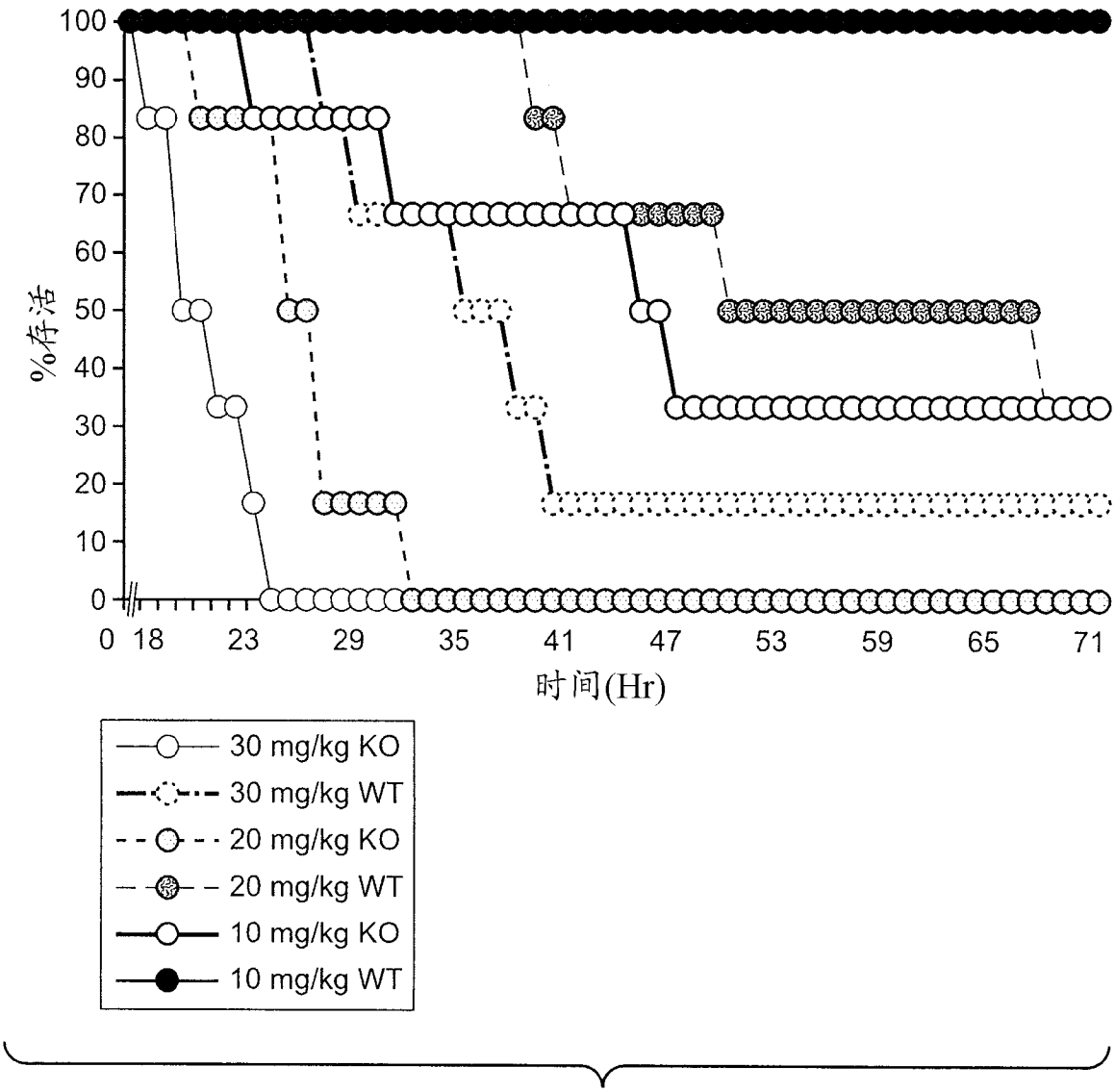

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%存活
0 18 23 29 35 41 47 53 59 65 71
时间(Hr)
30 mg/kg KO
30 mg/kg WT
20 mg/kg KO
20 mg/kg WT
10 mg/kg KO
10 mg/kg WT

图 3a

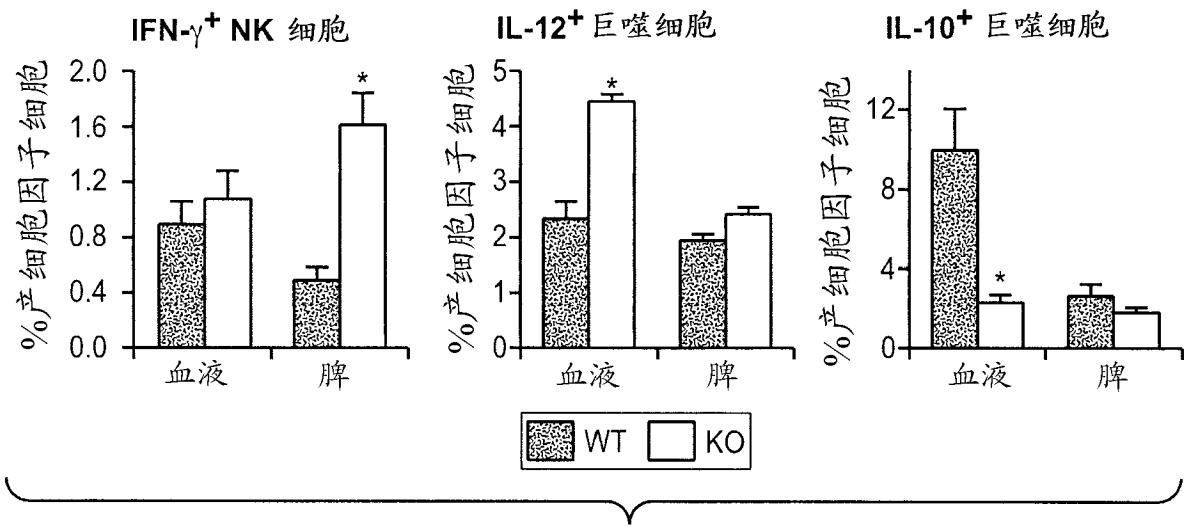

IFN-γ+ NK 细胞
IL-12+ 巨噬细胞
IL-10+ 巨噬细胞
%产细胞因子细胞
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
5
4
3
2
1
0
12
8
4
0
*
血液
脾
WT
KO

图 3b

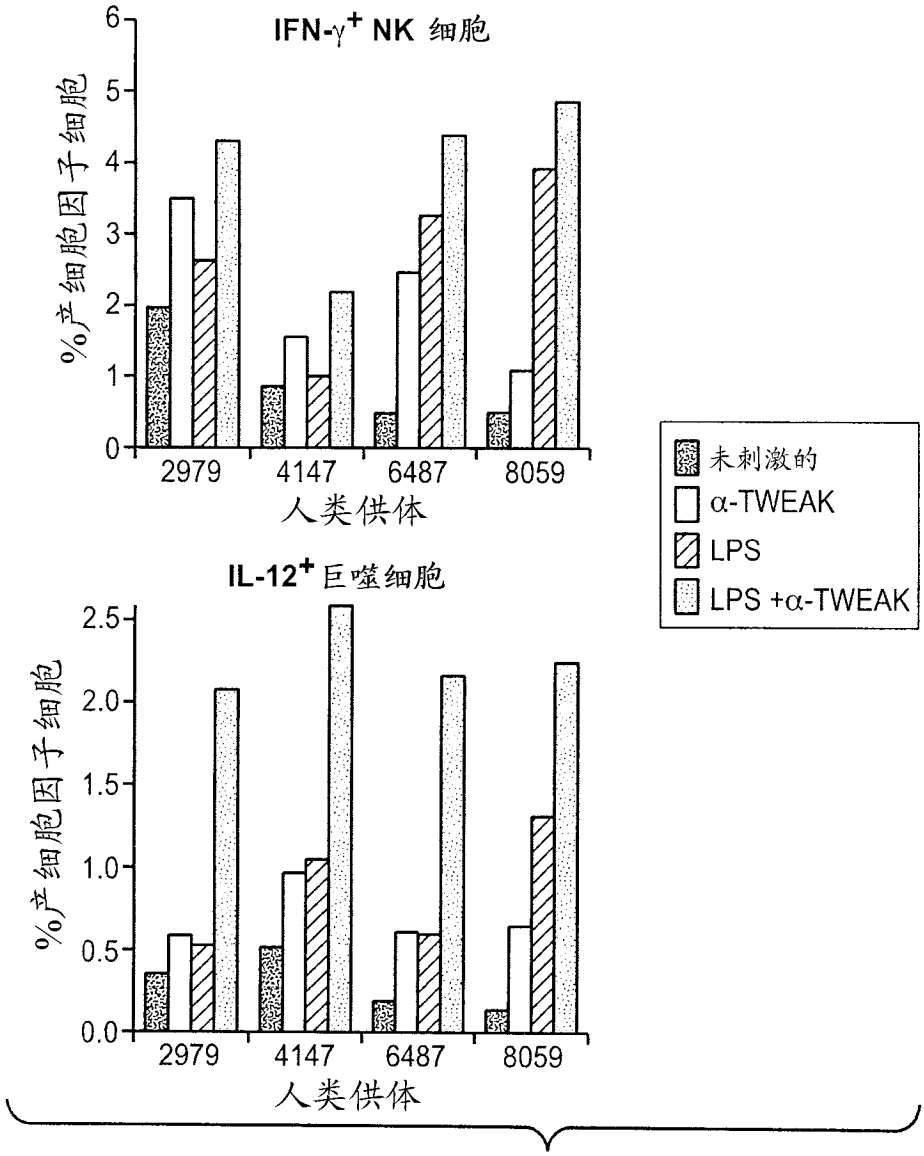

IFN-γ+ NK 细胞
%产细胞因子细胞
6
5
4
3
2
1
0
2979
4147
6487
8059
人类供体
未刺激的
α-TWEAK
LPS
LPS +α-TWEAK
IL-12+ 巨噬细胞
%产细胞因子细胞
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
2979
4147
6487
8059
人类供体

图 3c

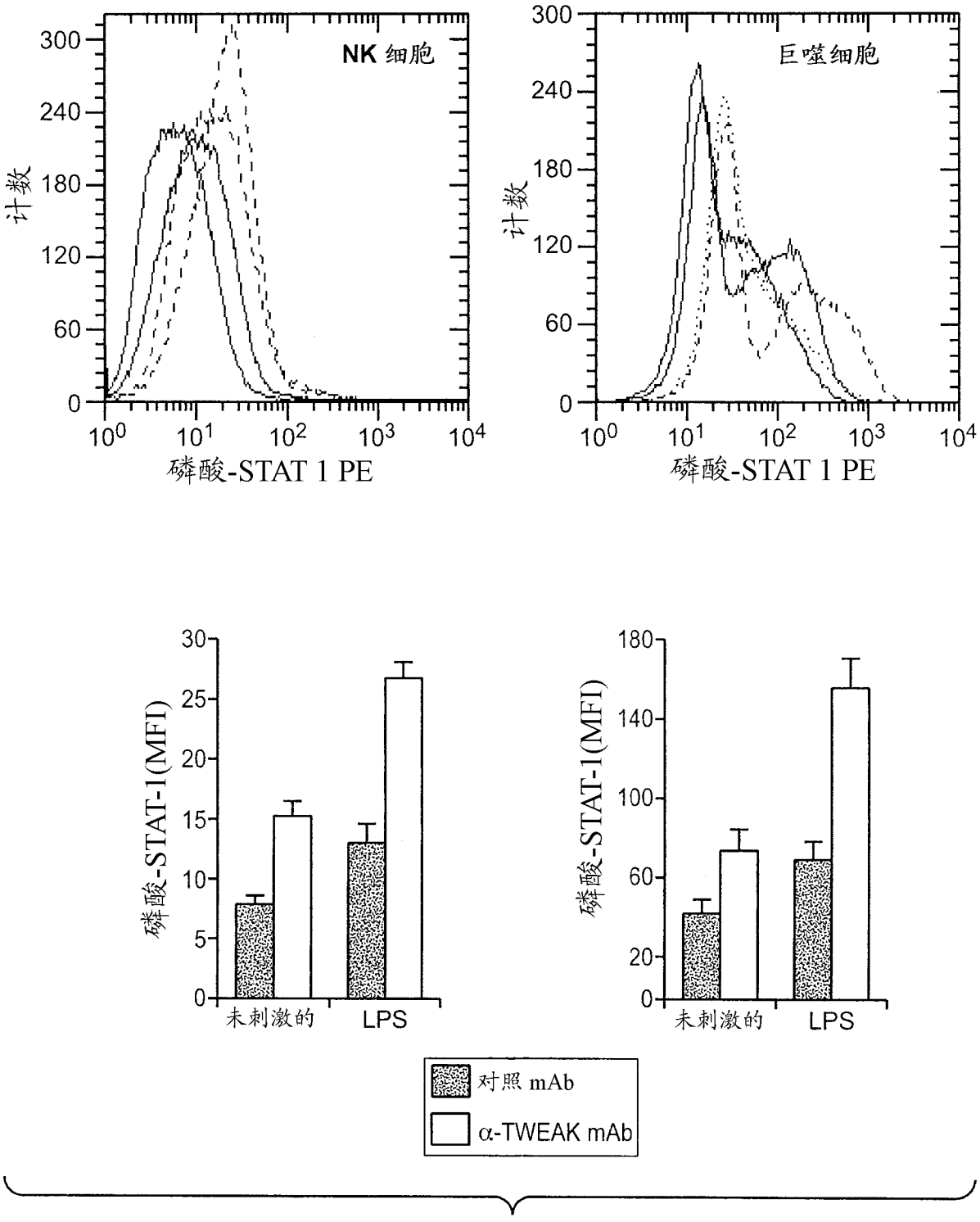

NK 细胞
巨噬细胞
计数
300
240
180
120
60
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
磷酸-STAT 1 PE
磷酸-STAT-1(MFI)
30
25
20
15
10
5
0
180
140
100
60
20
未刺激的
LPS
对照 mAb
α-TWEAK mAb

图 4a

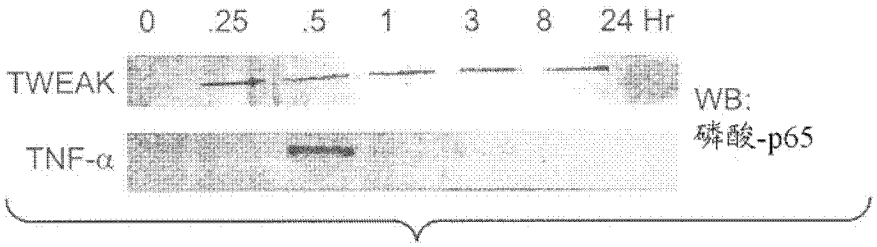


图 4b

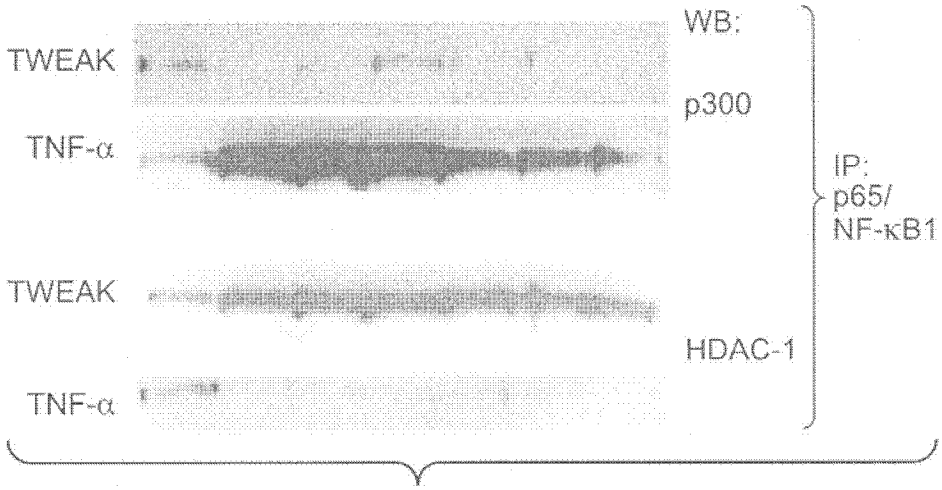


图 4c



图 5a

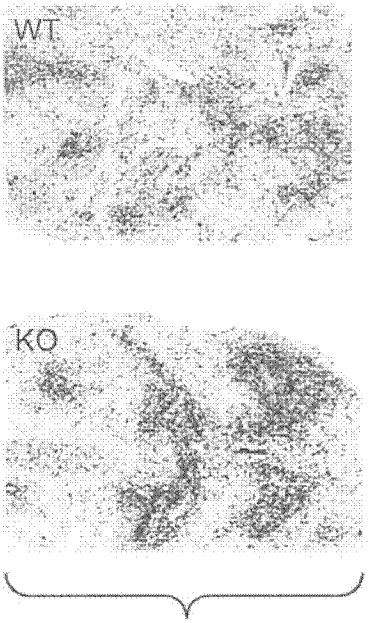


图 5c

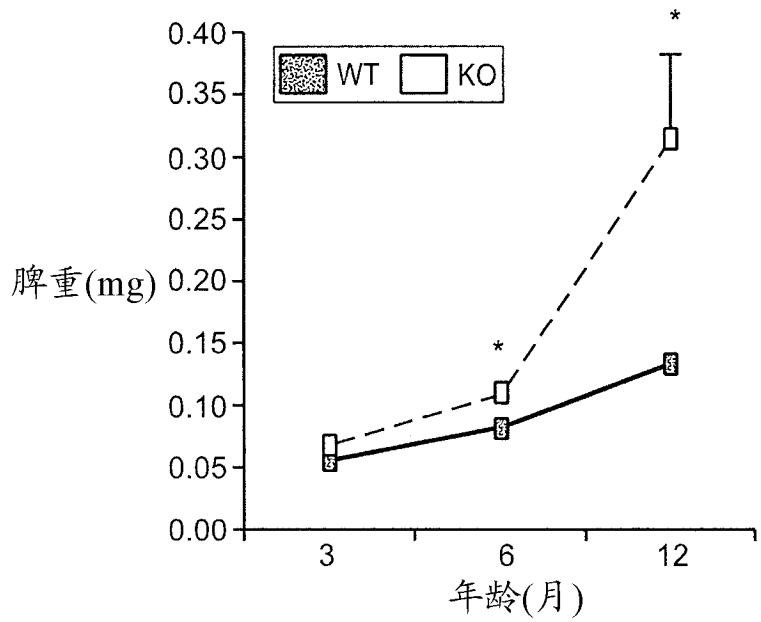

0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
脾重(mg)
WT
KO
*
*
3
6
12
年龄(月)

图 5b

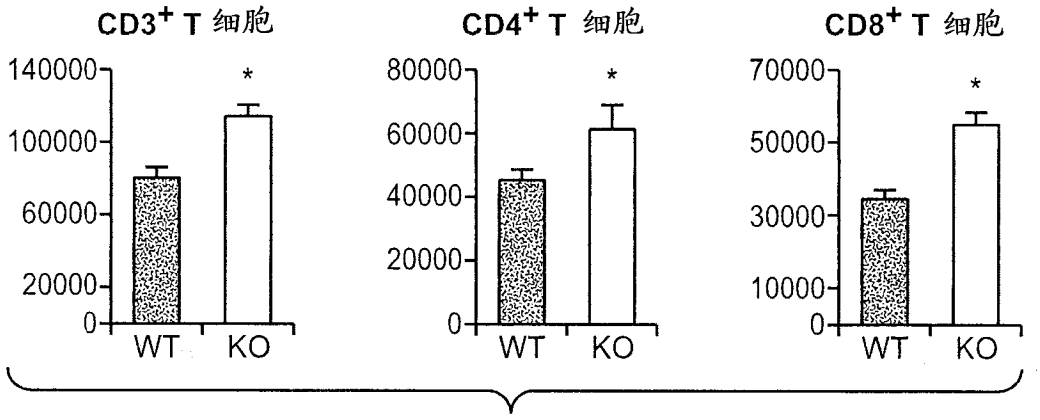

CD3+ T 细胞
CD4+ T 细胞
CD8+ T 细胞
140000
100000
60000
20000
0
80000
60000
40000
20000
0
70000
50000
30000
10000
0
*
*
*
WT
KO
WT
KO
WT
KO

图 5d

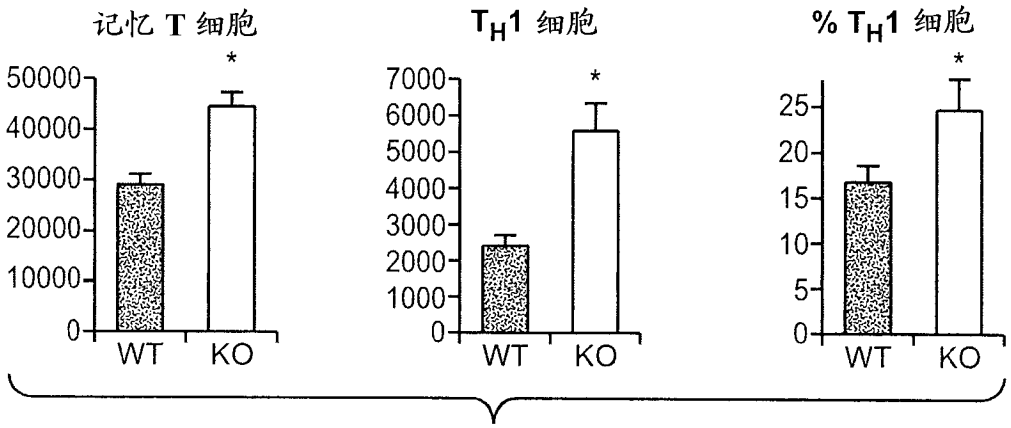

记忆 T 细胞
T_H1 细胞
% T_H1 细胞
50000
40000
30000
20000
10000
0
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
25
20
15
10
5
WT
KO
*

图 5e

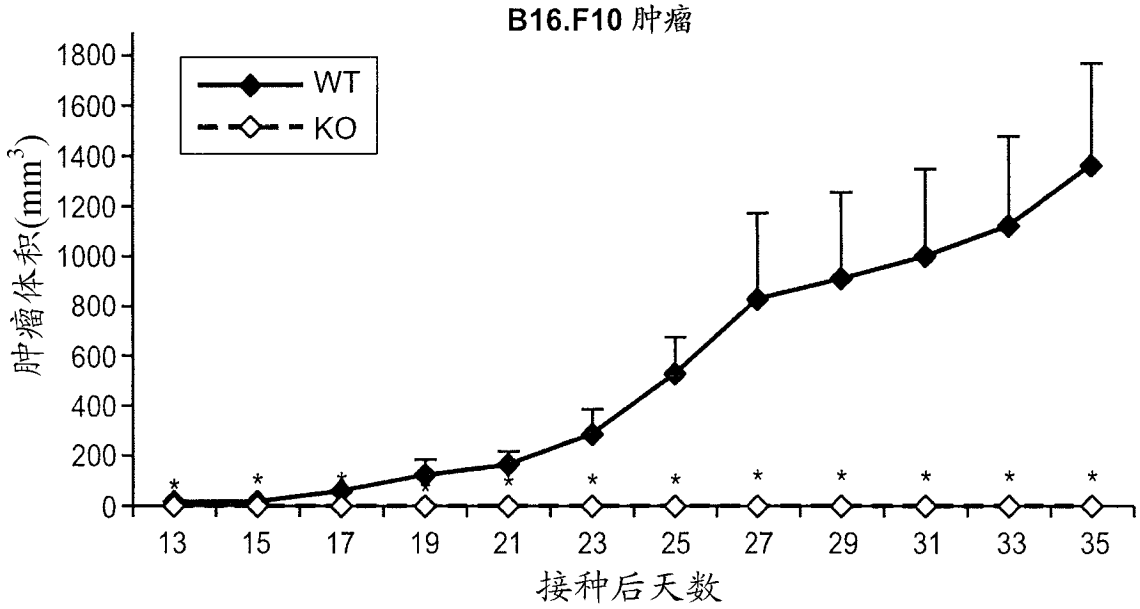

B16.F10 肿瘤
WT
KO
肿瘤体积(mm^3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35
接种后天数
*

图 6a

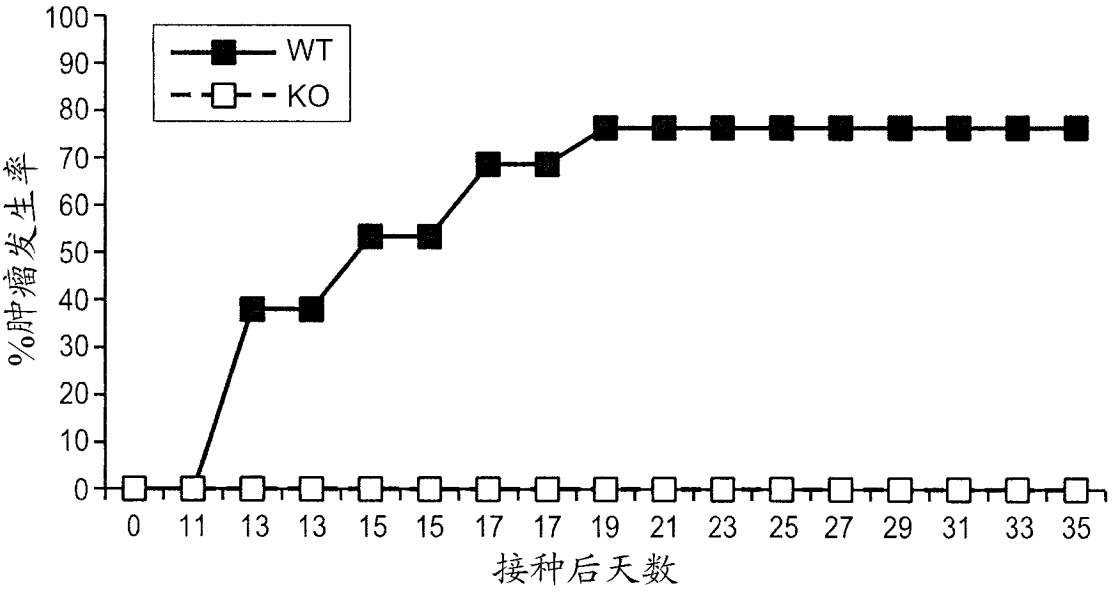


图 6b

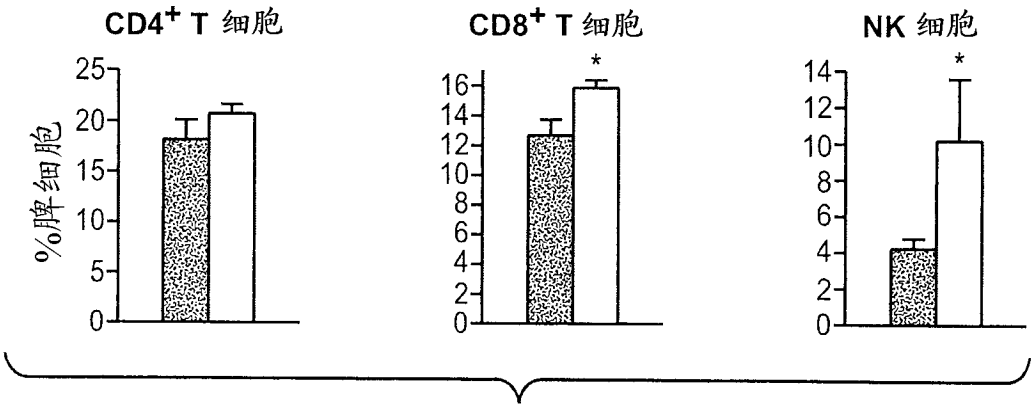


图 6c

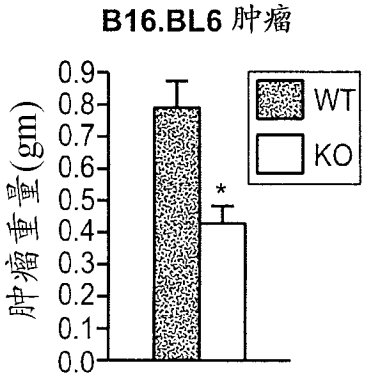


图 7a

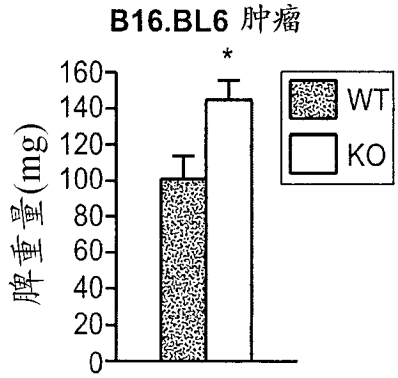


图 7b

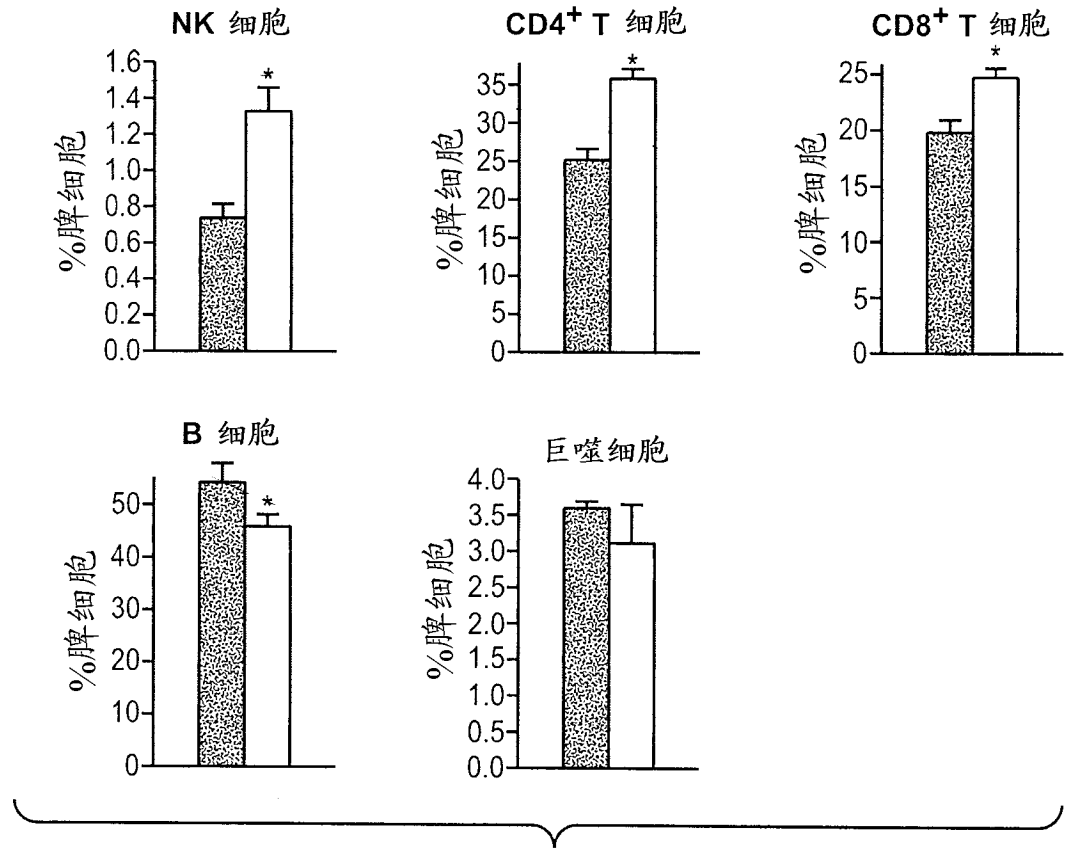

NK 细胞
CD4+ T 细胞
CD8+ T 细胞
B 细胞
巨噬细胞
%脾细胞
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
35
30
25
20
15
10
5
0
50
40
30
20
10
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
*

图 7c

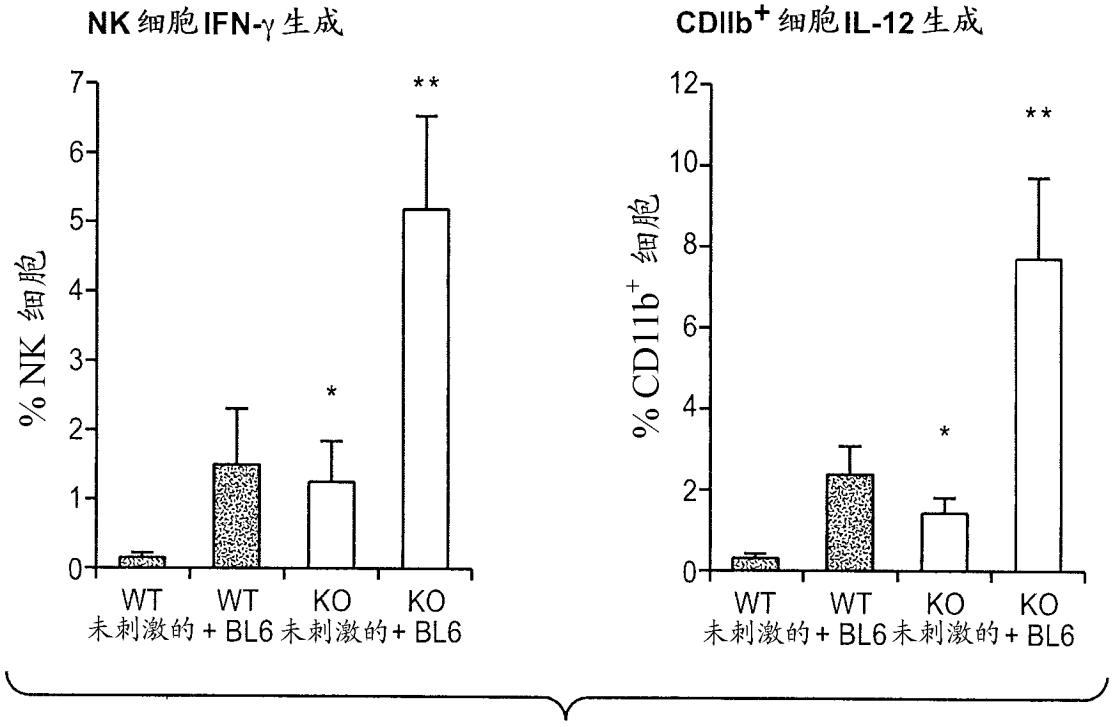

NK 细胞 IFN-γ 生成
CDIIb+ 细胞 IL-12 生成
% NK 细胞
% CD11b+ 细胞
7
6
5
4
3
2
1
0
12
10
8
6
4
2
*
**
WT
KO
未刺激的
BL6

图 7d

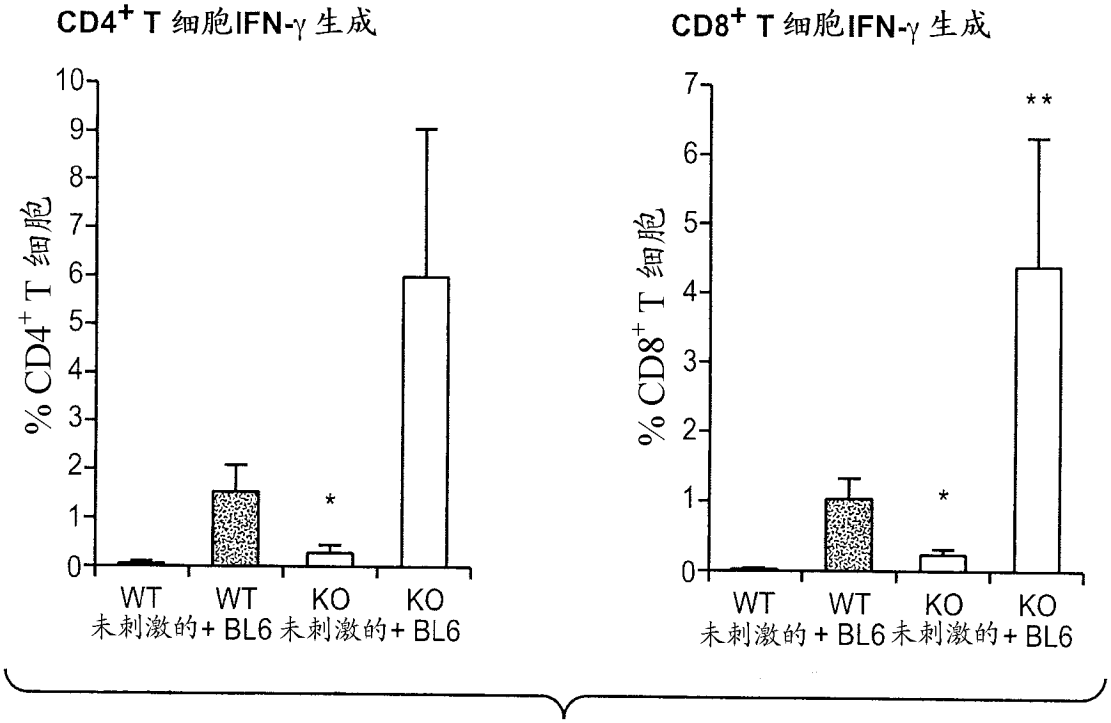

CD4+ T 细胞IFN-γ 生成
% CD4+ T 细胞
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
WT
WT
KO
KO
未刺激的
+ BL6
未刺激的
+ BL6
CD8+ T 细胞IFN-γ 生成
% CD8+ T 细胞
7
6
5
4
3
2
1
0
**
*
WT
WT
KO
KO
未刺激的
+ BL6
未刺激的
+ BL6

图 7e

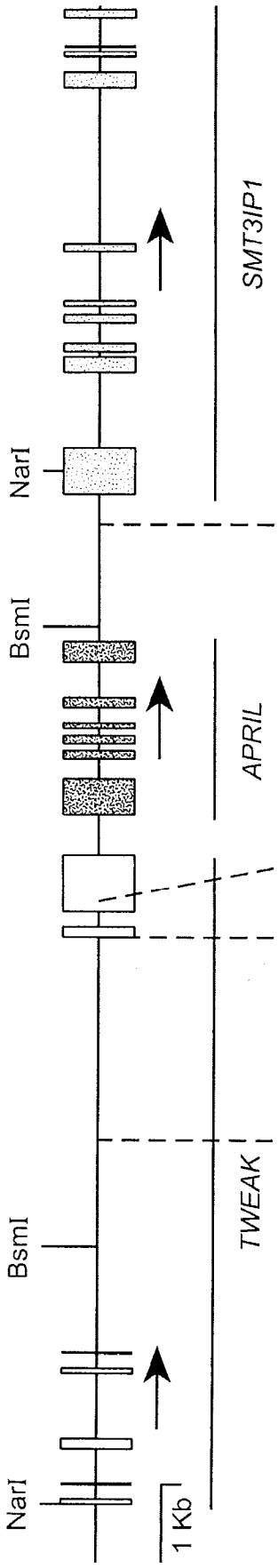


图 8a

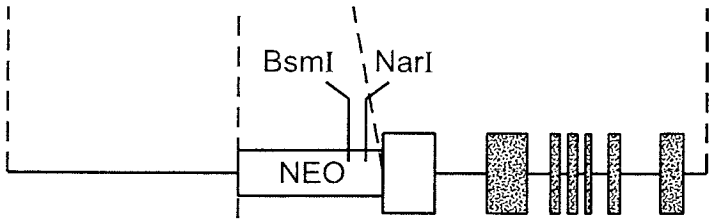


图 8b

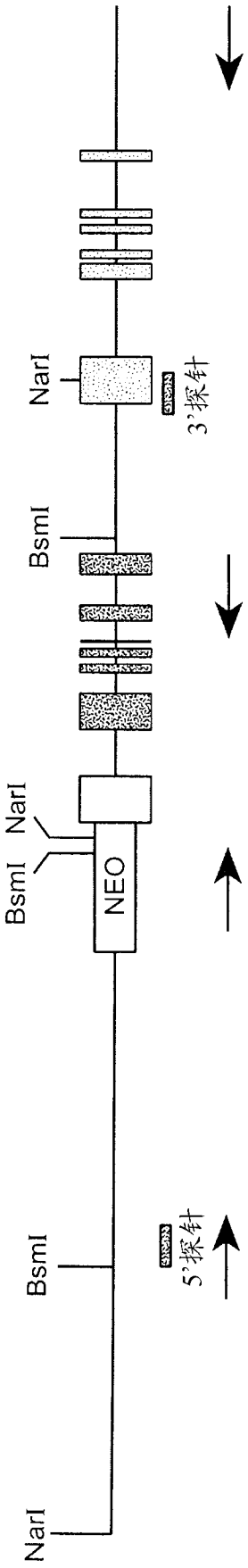


图 8c

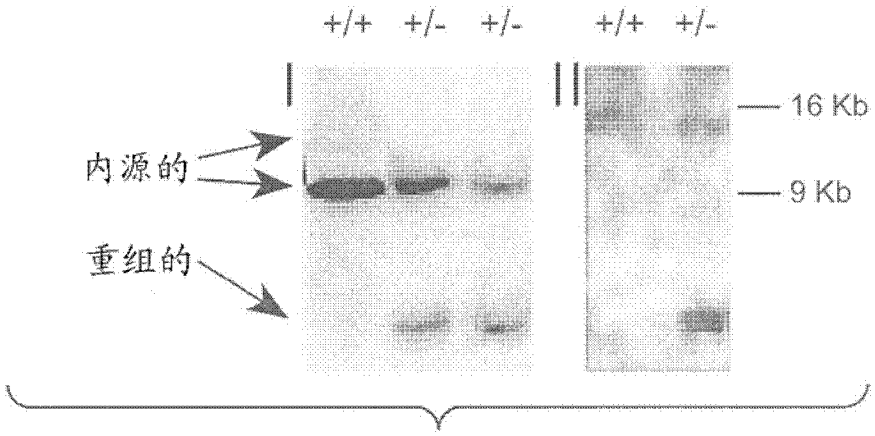


图 8d

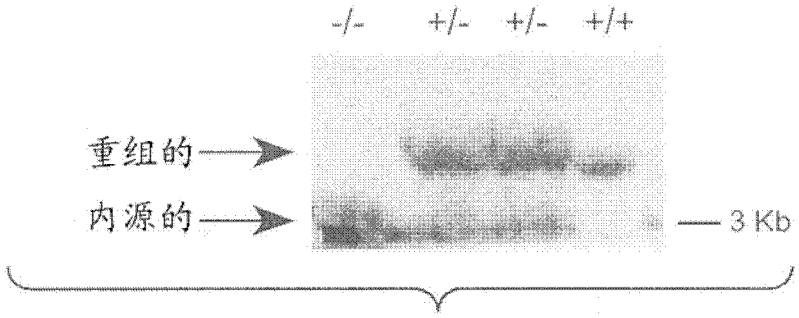


图 8e

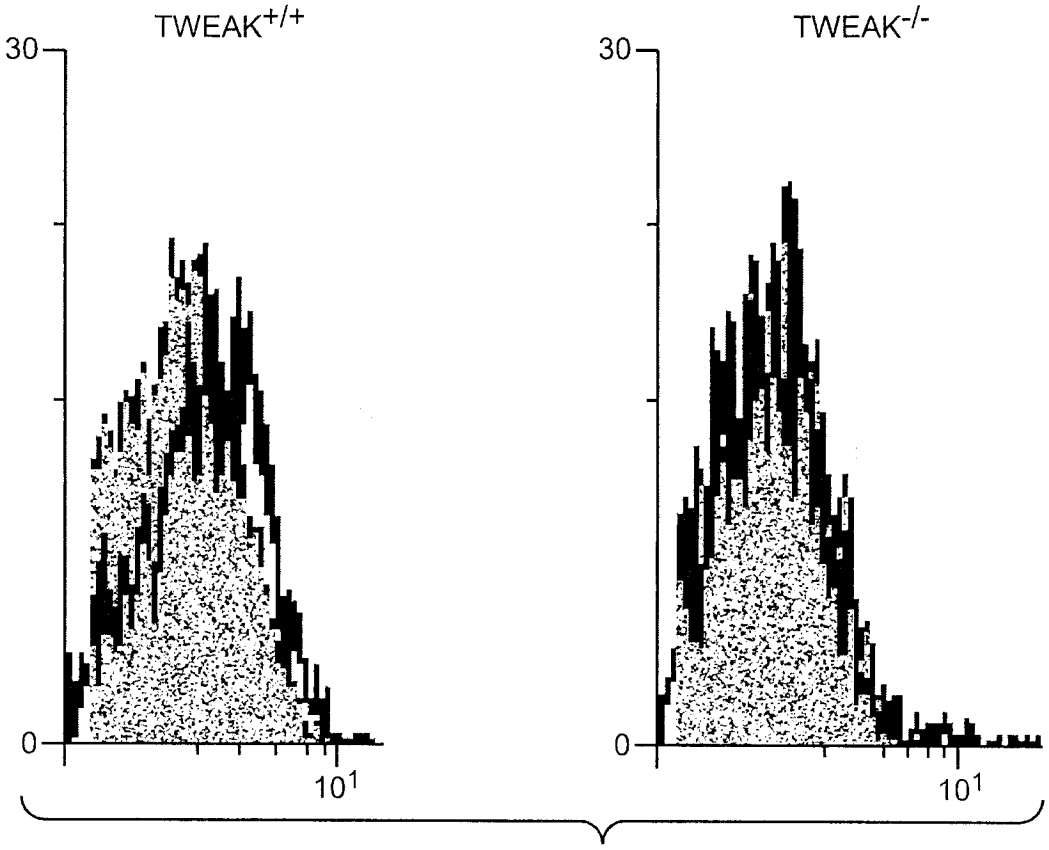


图 8f

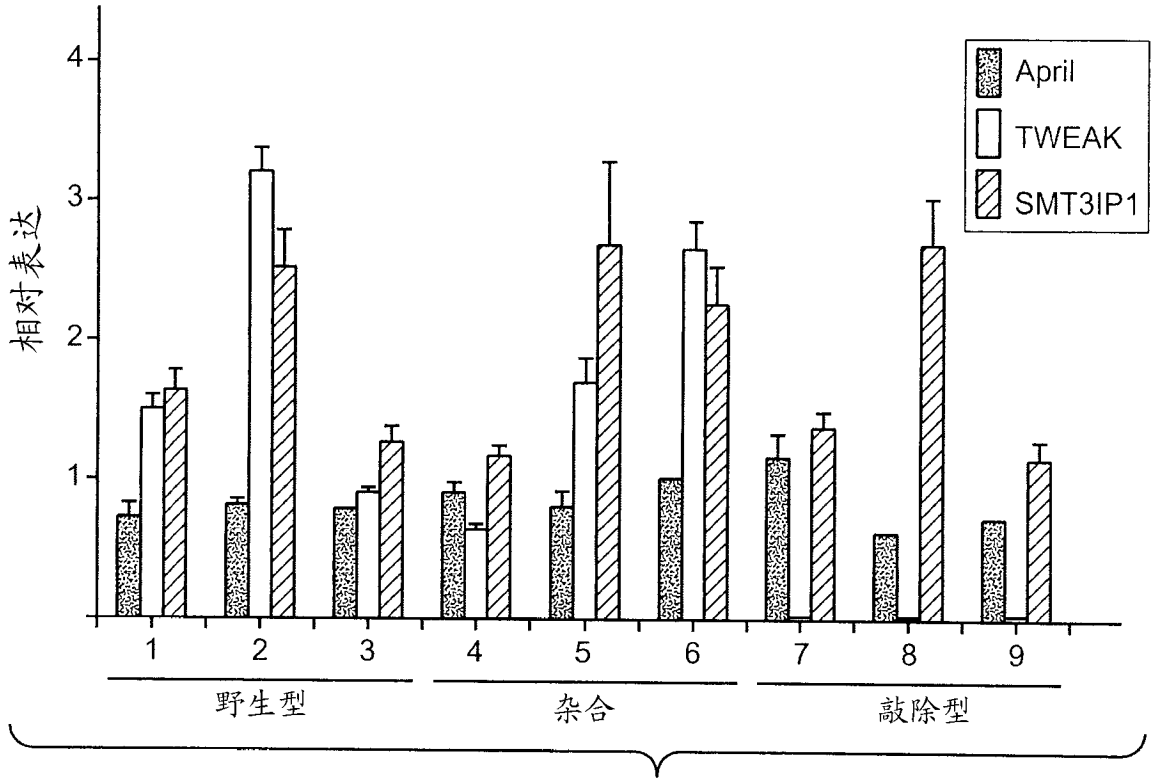

相对表达
4
3
2
1
April
TWEAK
SMT3IP1
1
2
3
4
5
6
7
8
9
野生型
杂合
敲除型

图 8g

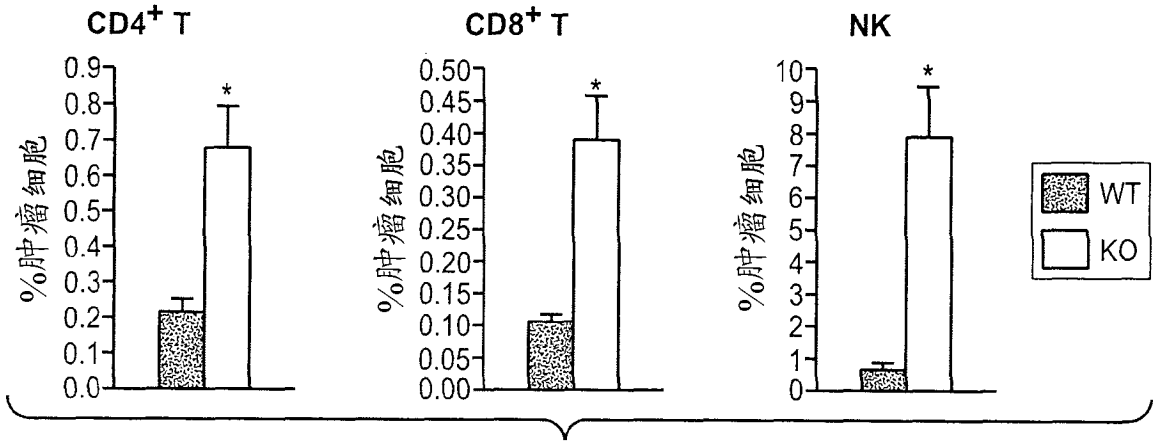

CD4+ T
CD8+ T
NK
%肿瘤细胞
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
WT
KO

图 9

2 月龄 $TWEAK^{+/+}$ 和 $TWEAK^{-/-}$ 小鼠的体重/器官重量(gm)

基因型	身体	脑	心	肾
KO	22.794+/-.736	0.442+/-.004	0.179+/-.01	0.354+/-.014
WT	21.854+/-1.045	0.438+/-.009	0.171+/-.008	0.347+/-.012
p	0.506	0.554	0.601	0.772
基因型	肝	肺	胸腺	脾
KO	1.575+/-.104	0.367+/-.06	0.054+/-.003	0.078+/-.003
WT	1.352+/-.072	0.399+/-.01	0.049+/-.004	0.071+/-0.01
p	0.224	0.71	0.396	0.1

*通过指定器官的 IHC 分析没有观察到组织学或病理学差异.

图 10

人 TWEAK 氨基酸序列:

```
  1 MAARRSQRRR GRRGEPGTAL LVPLALGLGL ALACLGLLLA
 41 VVSLGSRASL SAQEPAQEEL VAEEDQDPSE LNPQTEESQD
 81 PAPFLNRLVR PRRSAPKGRK TRARRAIAAH YEVHPRPGQD
121 GAQAGVDGTV SGWEEARINS SSPLRYNRQI GEFIVTRAGL
161 YYLYCQVHFD EGKAVYLKLD LLVDGVLALR CLEEFSATAA
201 SSLGPQLRLC QVSGLLALRP GSSLRIRTLP WAHLKAAPFL
241 TYFGLFQVH
```

图 11

人 FN14 氨基酸序列:

```
1MARGSLRRLLRLLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSSWSADLDKCMDCASCRARPHSDF
CLGCAAAPPAPFRLLWPILGGALSLTFVLGLLSGFLVWRRCRREKFTTPIEETGGGCPAVALIQ
```

图 12