



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102137869 B

(45)授权公告日 2018.07.06

(21)申请号 200980133865.2

(22)申请日 2009.06.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102137869 A

(43)申请公布日 2011.07.27

(30)优先权数据
61/133,532 2008.06.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.02.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/003886 2009.06.30

(87)PCT国际申请的公布数据
W02010/005519 EN 2010.01.14

(73)专利权人 宾夕法尼亚大学
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 M·拉兹马拉 M·L·泰科辛斯基

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民 张全信

(51)Int.Cl.
C07K 14/705(2006.01)

(56)对比文件
WO 01/45730 A2, 2001.06.28,
杨瑜等.TNF相关凋亡诱导配基抑制肿瘤细胞的机制探索.《武警医学》.2003,第14卷(第7期),第419-421页.

Kaplan.MJ.TRAIL (Apo2 Ligand)and
TWEAK (Apo3 Ligand) Mediate CD4+ T Cell
Killing of Antigen-presenting
Macrophages.《The journal of Immunology》
.2000,第164卷(第6期),第2897-2904页.

审查员 夏颖

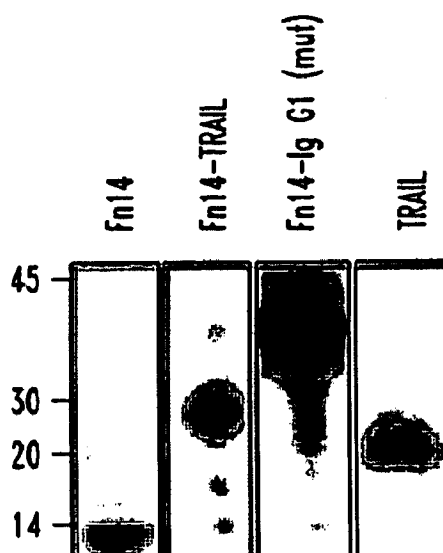
权利要求书1页 说明书30页 附图23页

(54)发明名称

Fn14/TRAIL融合蛋白

(57)摘要

提供作用于TWEAK和TRAIL信号轴的融合蛋白。该蛋白质在治疗或改善自身免疫病特别是多发性硬化症以及其它疾病诸如同种免疫性疾病和癌是有用的。



1. 由第一结构域和第二结构域组成的融合蛋白, 其中所述第一结构域是结合TWEAK的多肽, 而所述第二结构域是结合TRAIL受体的多肽, 其中所述第一结构域为人Fn14或Fn14的胞外域, 并且其中所述第二结构域为人TRAIL或TRAIL蛋白的胞外域。
2. 权利要求1所述的融合蛋白, 其中所述融合蛋白是SEQ. ID. NO. 1或SEQ. ID. NO. 2。
3. 由第一结构域和第二结构域组成的融合蛋白, 其中所述第一结构域为Fn14蛋白的胞外域, 所述第二结构域为TRAIL蛋白的胞外域。
4. 权利要求1所述的融合蛋白, 其中所述第一结构域是人Fn14, 而所述第二结构域是人TRAIL。
5. 药物组合物, 其包括权利要求1所述的融合蛋白。
6. 权利要求1-4任一项所述的融合蛋白, 其用于治疗或改善患有自身免疫病的患者中自身免疫病的方法, 所述方法包括施用所述融合蛋白。
7. 权利要求6所述的融合蛋白, 其中所述自身免疫病是多发性硬化症。
8. 权利要求6所述的融合蛋白, 其中施用是肠胃外的。
9. 权利要求1-4任一项所述的融合蛋白, 其用于治疗或改善患有自身免疫病的患者中同种免疫性疾病的方法, 所述方法包括施用所述融合蛋白。
10. 权利要求1-4任一项所述的融合蛋白, 其用于治疗或改善患有癌症的患者中癌症的方法, 所述方法包括施用所述融合蛋白。
11. 权利要求10所述的融合蛋白, 其中所述癌症是乳腺癌、结肠癌、肺癌、黑素瘤、恶性血液病、卵巢癌或肝癌。
12. 编码权利要求1-4任一项所述融合蛋白的基因序列在制备用于治疗或改善患者中的自身免疫病、同种免疫性疾病或癌症的药物中的应用。

Fn14/TRAIL融合蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及Fn14/TRAIL和相关的融合蛋白,以及用这些蛋白质治疗某些疾病诸如自身免疫病和癌症的方法。

背景技术

[0002] 正信号和负信号的复杂相互作用调节T细胞活化作用和T细胞效应子功能的维持。TNF配体/TNF受体超家族成员在桥连免疫系统细胞以及使用其它器官系统细胞的信号的这种基质中显得很重要。这样做,TNF超家族成员通过对细胞存活和死亡、细胞分化和炎症的作用,促进组织稳态和发病机理。从自身免疫发病机理的观点,令人感兴趣的TNF配体超家族成员是TNF-相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand)(TRAIL)和TWEAK(TNF-相关的凋亡弱诱导剂,TNF-related weak inducer of apoptosis)。

[0003] TRAIL与多种不同的TNF受体超家族的关联受体结合,一些导致触发细胞内信号传导通路和其它的简单地作为诱杀型受体。人类中的触发受体是TRAIL-R1、TRAIL-R2和护骨蛋白,而在小鼠中唯一的触发受体是DR5。事实上免疫系统的所有细胞(T淋巴细胞、B淋巴细胞、天然杀伤细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞)应答干扰素和其它活化信号而上调表面TRAIL和/或释放贮存于分泌小泡中的可溶性TRAIL。TRAIL抑制数种动物模型中的自身免疫。TRAIL抑制实验性自身免疫性脑炎(EAE)——MS的鼠模型——的能力的证据来自于产生下述的实验:TRAIL^{-/-}敲除小鼠、能够阻断TRAIL功能的可溶性TRAIL受体(sDR5)或中和抗-TRAILmAb、以及胚胎干细胞衍生的树枝状细胞共表达TRAIL和致病MOG(髓鞘少突胶质糖蛋白肽)。令人感兴趣的是,在MS患者中,可溶性TRAIL显示为IFN- β 治疗的应答标记,其中这些最可能对显示治疗后早期和持续的可溶性TRAIL诱导的治疗进行应答。然而,TRAIL对MS/EAE的影响可能更复杂,例如,表明TRAIL可以促进脑细胞凋亡。TRAIL和FasL都涉及T细胞的负调节。

[0004] TWEAK及其反受体Fn14(成纤维细胞生长因子-可诱导的14kDa蛋白质)是在一些免疫和非免疫细胞类型中表达的另一TNF家族配体-受体对,所述免疫和非免疫细胞类型包括NK细胞、巨噬细胞、树突细胞、小胶质细胞、神经胶质细胞和内皮细胞。TWEAK促进一些细胞类型(星形胶质细胞、内皮细胞和某些人肿瘤细胞系)的增殖并且抑制其它细胞(成红细胞、肾细胞、系膜细胞、神经元细胞、NK细胞、单核细胞)。TWEAK刺激各种炎症细胞因子、趋化因子和黏着分子的产生。然而,TWEAK:Fn14信号轴(signaling axis)具有超出细胞增殖和细胞因子产生的作用。令人感兴趣地是,多年来与TWEAK相关的较富有(多)组的功能包括涉入(瞄准,tie into)自身免疫的那些。TWEAK增加神经血管束单元的渗透性,并且其内源性表达在EAE和急性脑缺血期间在CNS中升高。而且,TWEAK具有促血管生成(pro-angiogenic)活性,其是血管发生和自身免疫发病机理之间的令人感兴趣的特定联系。TWEAK增加EAE的严重性和相关的神经变性。通过用TWEAK或Fn14的胞外域进行接种,诱导抑制性抗-TWEAK或Fn14Ab改善了大鼠和小鼠模型中的EAE现象。

[0005] 多发性硬化症(MS)是使人衰弱的神经性疾病(debilitating neurological

disease), 并且尽管扩展了治疗选择的组, 但是对更有效治疗剂仍然存在紧迫的需要。虽然 MS 的准确病因是未知的, 但是其发病机理和临床进展的关键特征正在显现。致病效应器 T 细胞被认为是引发疾病的关键, 并且因此多种治疗途径集中在这些细胞上, 目标是诸如阻止它们的活化作用和再活化、从较大的 T 细胞储存器中除去它们以及干扰它们转运到 CNS 内的发病部位。

[0006] TWEAK/Fn14 和 TRAIL/TRAILR 信号轴都涉及癌症。参见, 例如 "TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?", Cancer Treatment Reviews 35 (2009) 280-288; 和 "The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting", Nature 7 (2008) 411-425。

发明内容

[0007] 因此, 在一方面, 本发明提供包括第一结构域和第二结构域的融合蛋白, 其中所述第一结构域是与 TWEAK 配体结合的多肽, 而所述第二结构域是与 TRAIL 受体结合的多肽。

[0008] 在另外的方面, 本发明提供基本由第一结构域和第二结构域组成的融合蛋白, 其中所述第一结构域为 Fn14 蛋白的胞外域的至少一部分, 而所述第二结构域为 TRAIL 蛋白的胞外域的至少一部分。

[0009] 在另一方面, 本发明提供包括第一结构域和第二结构域的融合蛋白, 其中所述第一结构域是与 TWEAK 配体结合的多肽, 而所述第二结构域是具有抑制功能的多肽。

[0010] 也提供了包含所述融合蛋白的药物组合物, 以及用本发明的融合蛋白治疗各种疾病诸如自身免疫病和癌症的方法。

附图说明

[0011] 本发明通过以下附图进一步地图解, 其中:

[0012] 图 1. Fn14-TRAIL 的表达和功能分析

[0013] A) 对来自用 Fn14、Fn14-TRAIL、Fn14-IgG 1 (mut) 和 TRAIL 的表达构建物转染的 293 细胞的条件培养液进行蛋白质印迹分析。观察到的带分别与 8.7kD、27.5kD、34.1kD 和 19.0kD 的预期大小一致。

[0014] B) CHO 细胞用鼠 TWEAK cDNA 表达构建物瞬时转染, 并且在 48 小时后, 在 4℃ 下, 与纯化的 Fn14-TRAIL 或 rTRAIL 一起在包含叠氮钠的缓冲液中温育。分别使用抗-小鼠 TWEAK Ab (B.1) 和抗小鼠 TRAIL Ab (B.2-5) 作为检测 Ab, 通过流式细胞计量术验证转染子上的膜结合 TWEAK 的存在和 Fn14-TRAIL 与它们的结合。(B.1) TWEAK 在转染的 CHO 细胞上表达, 如使用抗-TWEAK Ab (黑色实线) 对同种型对照 (填满的直方图) 所检测的; (B.2) 当使用抗-TRAIL Ab (黑色实线) 对同种型对照 (填满的直方图) 进行分析时, TRAIL 在 CHO 细胞上不可检测。(B.3 和 B.4) 当将 Fn14-TRAIL 加入表达 TWEAK-的、与 TWEAK-阴性相对的 CHO 细胞时, TRAIL 表位被增强。抗-TRAIL Ab 和同种型对照分别通过黑色实线和填满的直方图表示。(B.5) TWEAK-转染的细胞在 rTRAIL 的存在下不结合抗-TRAIL Ab (黑色实线)。同种型对照显示为填满的直方图。

[0015] C) 将 L929 细胞以 2×10^4 个细胞/孔, 在圆底 96-孔板中在 100 μ l AIM-V 培养基中培养。在 16 小时后, 以 1mg/孔将放线菌素 D 加入培养物, 并且将细胞培养另外 2h。然后加入

Fn14-TRAIL或rTRAIL作为阳性对照,并且将培养物维持另外5h。通过MTT测定确定死亡细胞的百分比,如在材料和方法中描述。

[0016] 图2.双盒pSBC21载体的功能验证:

[0017] A) 如示意性描述的,pSBC21质粒串联地并入转座子盒(具有驱动反式信号重定向蛋白(trans signal redirecting protein-TSRP)的EF 1 α 启动子)和转座酶表达盒(由UBC启动子驱动)。

[0018] B) 仅用pSBC21载体(右面的图)或用指示浓度的pLuciferase-SBC21流体注射小鼠。在质粒注射后22天腹膜内施用D-虫萤光素后获得生物发光图像。彩色条表示以辐射率表示的生物发光信号(p/sec/cm²/sr)。

[0019] C) 在注射5 μ g、10 μ g或20 μ g的Fn14-TRAIL pSBC21质粒20天后,通过ELISA测定Fn14-TRAIL的血清水平。

[0020] 图3.Fn14-TRAIL抑制MOG-诱导的自身免疫性脑脊髓炎

[0021] A) 在流体注射50 μ g各自的pSBC21-基表达质粒后20天,通过ELISA测量Fn14、Fn14-TRAIL、Fn14-IgG1(mut)和TRAIL的血清水平。B-D) 如材料和方法中描述的,用补充有结核分枝杆菌的CFA中的MOG激发小鼠。在MOG激发48h小时后,用50 μ g的指示的基于pSBC21的表达构建物流体注射小鼠。根据在材料和方法中描述的临床分级对单个小鼠进行打分。评估的参数包括平均临床评分(B,上图)、发病率(B,下图)、累计平均临床评分(C)和在第35天的平均临床评分(D)。根据Mann-Whitney U检验,Fn14-TRAIL-处理组对只有载体对照组之间的差异是有统计学显著性的($p < 0.05$),其中在示出的其它组和只有载体组之间的差异没有显著性。

[0022] 图4.组合的Fn14和TRAIL没有取得Fn14-TRAIL的疗效

[0023] A-C) 在MOG-激发48h小时后,小鼠用单剂量的Fn14-TRAIL pSBC21质粒(25 μ g/小鼠)或者单剂量的Fn14pSBC21和TRAILpSBC21质粒(25 μ g每种/小鼠)的混合物进行流体注射。显示了在40天(A)内和在第16、23和40天(B)的指定组的平均临床分数。也显示了在第40天的指定组的累积MCS(C)。根据Mann-Whitney U检验,在Fn14-TRAIL-处理组和只有载体的对照组之间的差异有统计学显著性($p < 0.05$),其中在显示的其它组和只有载体组之间的差异没有显著性。

[0024] D) 在注射组合的Fn14pSBC21(25 μ g)+TRAIL pSBC21(25 μ g)或Fn14-TRAIL pSBC21(25 μ g)之后30天,通过ELISA测定Fn14-TRAIL的血清水平。

[0025] E) 在接受治疗剂后43天,杀死只用pSBC21载体或用Fn14-TRAIL pSBC21流体注射的MOG-激发的小鼠。在不同浓度的MOG₃₈₋₅₀肽存在或不存下培养每只小鼠的脾细胞,并且如在材料和方法中描述地评估增殖。结果显示为每个组总计9只小鼠的平均数 $\pm$ SD。

[0026] 图5.Fn14-TRAIL pSBC21抑制MOG-激发小鼠中的细胞因子产生。

[0027] 小鼠用补充有结核分枝杆菌的CFA中的MOG激发,并且用只有SBC21载体或Fn14-TRAIL pSBC21进行流体注射。动物在接受治疗剂43天后被杀死,每只小鼠的脾细胞在不同浓度的MOG₃₈₋₅₀肽存在或不存的情况下进行培养。培养的培养基在40h后收集,并且通过ELISA测定指定细胞因子的浓度。

[0028] 图6.Fn14-TRAIL pSBC21处理减少了MOG-激发小鼠脊髓中活化和细胞因子产生细胞。

[0029] 如在材料和方法中描述,分离和分析来自只有载体pSBC21和Fn14-TRAIL pSBC21处理小鼠的脊髓的浸润细胞。通过将活细胞总数乘以每种指示的细胞类型的%计算细胞的数量。细胞的百分比和数量表示由三只小鼠的组获得的指示细胞类型的百分比和数量。

[0030] A-B) 在MOG激发后第7天,活化的(CD69⁺)炎症细胞的百分比和绝对数量

[0031] C-D) 在MOG激发后第7天,CD4⁺和CD8⁺细胞的百分比和绝对数量,以及IFN γ 、IL-17和IL-10表达细胞的百分比和绝对数量(在活化的CD69⁺、细胞或总的细胞库当中)

[0032] D-E) 在MOG激发后第14天,CD8⁺细胞和IFN γ 、IL-17和IL-10表达细胞的百分比和绝对数量

[0033] 图7.Fn14-TRAIL pSBC21处理减少MOG激发小鼠中的脊髓炎症

[0034] 用只有SBC21载体或者Fn14-TRAIL pSBC21流体注射的MOG-激发小鼠用PBS和10%福尔马林磷酸盐经心脏(transcardially))灌注。除去脊髓,切割成六片并包埋在石蜡中,以5 μ m进行横向组织切片并用勒克索尔固蓝-甲基酚紫(luxol fast blue and cresyl violet)染色。

[0035] A) 上图显示只有载体处理小鼠的代表性脊髓切片,从左到右的最大疾病评分分别是2、3.5和1。下图显示Fn14-TRAIL-处理小鼠的代表性的脊髓切片,从左到右的最大疾病评分分别是0、1和3。

[0036] B) 对每只动物的六个脊髓片段的每一个的组织切片进行分析。基于以下标准,赋予单个切片炎症评分:0,没有炎症;1,<5%;2,5-20%;3,20-50%和4,>50%的白细胞浸润白质。对于每只小鼠,组织学评分是6个脊髓切片的评分的总和。根据Mann-Whitney U检验,Fn14-TRAIL-处理组对对照组之间的差异是统计学显著的($p < 0.05$)。

[0037] 图8.Fn14-TRAIL处理减少血脑屏障渗透性

[0038] 用只有SBC21载体或Fn14-TRAIL-pSBC21流体注射的MOG-激发小鼠在MOG激发后第6天(A)或第13(B)天用伊文思蓝染料注射。在指示的组织提取物中定量分析伊文思蓝,如在材料和方法中描述。结果表示伊文思蓝在630nm处的特定吸收,计算为ng/g组织。星号指示差异是统计学显著的($p < 0.05$),如通过学生t检验测定的。在(C)中,只有载体处理的小鼠对Fn14-TRAIL-处理的小鼠的脊髓中吸收染料的浓度匹配在MOG激发后第13天的平均临床分数(0或1)。

[0039] 图9.TWEAK:Fn14-TRAIL的结构模型;如在材料和方法中描述生成的DR5复合体三维模型,对于Fn14-TRAIL显示为单体单元(A,蓝色的Fn14和白色的TRAIL)、Fn14-TRAIL三聚体(B,作为带模型;C,作为空间填充模型),以及TWEAK:Fn14-TRAIL:DR5复合体(D,用Fn14-TRAIL作为空间填充模型,TWEAK三聚体作为在顶部的带模型,和DR5三聚体作为在下面的带模型)。

[0040] 图10是人Fn14-TRAIL融合蛋白的蛋白质印迹分析。

[0041] 图11是显示在Fn14-TRAIL纯化过程期间不同顺序步骤的产物的SDS-PAGE分析。

[0042] 图12是指示Fn-14-Trial减少自MOG免疫小鼠收获的脾细胞总数的数据的图。

[0043] 图13是显示体内Fn-14-Trial处理减少对从自淋巴结回收的淋巴细胞的先体外后体内抗原再刺激的先体外后体内回忆应答的数据的图。

[0044] 图14A-14B是显示在MOG激发小鼠中Fn14-Trial改善EAE疾病进程的数据的图。

[0045] 图15是指示Fn14-Trial抑制DBA1小鼠中胶原诱导的关节炎的数据的图。

[0046] 图16A-16D是在不同浓度的Fn14-TRAIL存在下培养24小时的SK-HEP1肝癌细胞系(A)、Raji恶性B细胞系(B)以及非恶性肝细胞系NKNT3(C)和FH-B(D)的数据的图。在温育后,收集细胞、用台盼蓝染色并且计数活的和死亡的细胞。示出的数据表示两个独立的实验。

[0047] 图17是在不同浓度(如示出的)的Fn14-TRAIL、sTrail、Fn14-Fc或者后两者的组合的存在下培养的SK-HEP1肝癌细胞系的数据的图。在24小时温育后,收集细胞、用台盼蓝染色并计数活的和死亡的细胞。示出的数据表示三个独立的试验。

[0048] 图18是在不同浓度的Fn14-TRAIL、sTRAIL、Fn14-Fc或者后两者的组合的存在下培养的SK-HEP1肝癌细胞系的数据的图。在24小时温育后,收集并清洗细胞、通过膜联蛋白V/PI染色和流式细胞计量术测试细胞凋亡。示出的数据表示两个独立的试验。

具体实施方式

[0049] 如本文在说明书和权利要求书中使用的,包括如在实施例中使用的,除非另外清楚地规定,所有的数字可以理解为好像单词“约”在之前一样,即使该术语没有清楚地显示。同样地,本文陈述的任何数字范围意欲包括其中包含的所有子范围。其中,任何氨基酸序列通过Swiss Prot.或NCBI登录号而被具体提及,序列通过引用并入本文。

[0050] 一方面,本发明提供作用于TWEAK和TRAIL信号轴的融合蛋白,例如,这样的融合蛋白:其具有包括结合TWEAK配体的多肽的第一结构域;和包括结合TRAIL受体的多肽的第二结构域。

[0051] 具体地,第一结构域是具有通过其Fn14受体干扰TWEAK触发能力的能力的多肽,和所述第二结构域是可以引导抑制信号到T细胞上或具有TRAIL受体的其它细胞上的关联受体的多肽。

[0052] 在TWEAK和TRAIL信号轴的情况中,合适的第一结构域包括例如Fn14蛋白、野生型Fn14蛋白的变体或衍生物、或特异地适于结合TWEAK并阻止这种配体发信号到其Fn14受体的其它多肽或蛋白质——诸如结合TWEAK的抗体、结合TWEAK的抗体部分,和被改造为结合TWEAK的脂笼蛋白衍生物。优选地,这种实施方式的融合蛋白的第一结构域为Fn14蛋白的胞外域的至少一部分,具体地,为对于结合TWEAK配体和干扰其结合和触发膜结合Fn14受体能力是必要的胞外域部分。胞外域的野生型形式的变体、或者负责TWEAK结合的胞外域部分也被包括在本发明中,只要变体提供与野生型蛋白质类似水平的生物学活性。

[0053] 因此,如本文使用的,术语“结合TWEAK配体的多肽”包括Fn14蛋白;Fn14蛋白的胞外域;作为Fn14蛋白的胞外域至少一部分、负责结合到TWEAK配体的部分的多肽;TWEAK抗体或抗体的部分;脂笼蛋白衍生物;和这些的任一种的变体和/或衍生物。术语“Fn14”被理解为包括对应于Fn14蛋白的完整氨基酸序列的多肽,其包括胞质、跨膜和胞外域,以及对应于该蛋白质的较小部分的多肽,诸如胞外域,或者一部分胞外域。在一个实施方式中,Fn14/TRAIL融合蛋白的第一结构域为人Fn14蛋白的胞外域的至少一部分。

[0054] 在TWEAK和TRAIL信号轴的情况下,合适的第二结构域包括例如TRAIL蛋白自身、TRAIL蛋白的变体或衍生物、或者被特异地设计为抑制T细胞或其它细胞的活化作用和/或通过TRAIL受体诱导细胞凋亡的其它多肽或蛋白质,诸如拮抗的抗-TRAILAb,以及任一这些的变体和/或衍生物。

[0055] 优选地,在该实施方式中的融合蛋白的第二结构域为TRAIL蛋白的胞外域的至少

一部分,具体而言,为对于结合TRAIL受体是必要的部分。结合TRAIL受体是必要的那部分。TRAIL蛋白胞外域的野生型形式的变体、或者负责TRAIL受体结合的胞外域的部分,也被包括在本发明中,只要变体提供与野生型蛋白质类似水平的生物学活性。

[0056] 因此,如本文使用的,术语“结合TRAIL受体的多肽”包括TRAL蛋白;TRAIL蛋白的胞外域;作为TRAIL蛋白的胞外域的至少一部分,负责结合TRAIL受体的部分的多肽;TRAIL受体的抗体(和抗体的部分);和任一这些的衍生物和/或变体。术语“TRAIL”被理解为包括对应于TRAIL蛋白的完整氨基酸序列的多肽,包括胞质、跨膜和胞外域,以及对应于该蛋白质的较小部分的多肽,诸如胞外域,或者胞外域的一部分。在一个实施方式中,Fn14-TRAIL融合蛋白的第二结构域为人TRAIL蛋白的胞外域的至少一部分。

[0057] 在一个实施方式中,本发明包括Fn14/TRAIL融合蛋白。在另一个实施方式中,术语“Fn14/TRAIL融合蛋白”指由SEQ.ID.NO.:1确定的特定融合蛋白:

[0058] SEQ.ID.NO.1人Fn 14-TRAIL

[0059] MARGSLRRLRLLLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSWSADLDKCMDCASCRARPHSDFCLGCAA
APPAPFRLLW

[0060] RGPQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIY
SQ

[0061] TYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRI
FV

[0062] SVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG

[0063] 在另一实施方式中,术语“Fn14/TRAIL融合蛋白”指由SEQ.ID.NO.:2确定的特定融合蛋白:

[0064] SEQ.ID.NO.2人Fn 14-TRAIL

[0065] MARGSLRRLRLLLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSWSADLDKCMDCASCRARPHSDFCLGCAA
APPAPFRLLW

[0066] ETISTVQEKQQNISPLVRERGPQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSN
LH

[0067] LRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEY
GL

[0068] YSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG

[0069] SEQ.ID.NO.1和SEQ.ID.NO.2都包括原信号肽;这些信号肽可以根据使用者的需要、表达系统和其它因素进行变化,如本领域技术人员所理解的。信号肽在本领域中是熟知的,并且可以使用任何期望的信号肽,包括由本领域技术人员已知的公开可用的信号肽识别软件识别/预测到的那些。

[0070] 在另外的实施方式中,Fn14/TRAIL融合蛋白是在SEQ.ID.NO.1或SEQ.ID.NO.:2中示出的氨基酸序列的变体和/或衍生物。

[0071] 在本发明的还另外方面,本文描述的任一融合蛋白的TRAIL组分可以用另一种抑制性蛋白替代,即,阻止免疫应答的活化作用和/或诱导T细胞或其它细胞类型的凋亡,所述其它细胞类型诸如B细胞、天然杀伤(NK)细胞、NKT细胞、淋巴祖细胞、树突细胞、单核细胞/巨噬细胞、具有抗原呈递能力的组织-基的巨噬细胞谱系细胞和多种非专职性(non-

professional) 抗原呈递细胞的任一种,例如,内皮细胞。抑制性蛋白的实例包括但不限于 FasL、TNF、PDL-1、PDL-2、B7x、B7-H3 和 CD31。

[0072] 例如,BTLA 是重要的抑制性受体,并且除了仍然待发现的其它配体之外,B7x 可以是配体。类似地,CTLA-4 是另一种重要的抑制性受体,并且引发(驱动,drive)这种抑制性 CTLA-4 受体的配体包括一些 B7 分子以及激动剂(agonist) Ab。在这种情况下,融合蛋白将分别是 Fn14/B7x 和 n14/B7 激动剂融合蛋白。

[0073] 对于 B 细胞也是引发自身免疫的关键的了解不断增加。引发 B 细胞抑制性受体的另外的抑制性配体(融合到 Fn14) 也被包括在本发明的范围内,所述抑制性配体诸如 CD 100 (结合到 CD72)、CD5 (也结合到 CD72)、CD72 (结合到 CD5)、Ep-CAM (结合到 LAIR-1)、FcγRIII 的激动剂、CD22、PDL-1、PDL-2、CD66a 和 PIR-B。

[0074] 文献富有另外的实例,诸如在以下文献中列出的:Sinclair,N."Why so Many Coinhibitory Receptors?,Scand.J.Immunol.50,10-13(1999);Melero,I.等人,"Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy",Nature Rev.Cancer 7:95-106(2007);和 Zang,X.等人,"The B7 Family and Cancer Therapy:Costimulation and Coinhibition",Clin.Cancer Res.13:5271-5279(2007),所有文献通过引用并入本文。本发明的融合蛋白和方法包括任一上述抑制性蛋白质,并且所述抑制性蛋白质在本文统称为"具有抑制功能的多肽"。

[0075] 因此,在另外的实施方式中,本发明提供 Fn14/抑制性蛋白融合对,诸如 Fn14/FasL、Fn14/PDL-1、Fn14/PDL-2、Fn14/TNF、Fn14/CD100、Fn14/CD5、Fn14/CD72、Fn14/Ep-CAM、Fn14/FcγRIII、Fn14/CD22、Fn14/CD66a、Fn14/PIR-B、Fn14/B7x、Fn14/B7-H3 和 Fn14/CD31。在 TWEAK/TRAIL 信号轴的情况下,以上描述的任一的第一结构域,例如结合 TWEAK 配体的多肽,将是这些实施方式中的合适的第一结构域。

[0076] 在一个实施方式中,本发明的融合蛋白通过阻止或减少髓鞘特异的 T 细胞的增殖和分化来抑制免疫系统的活化作用。在一些实施方式中,本发明的融合蛋白抑制促炎细胞因子和趋化因子诸如 IL-6、IL-8、RANTES、IP-10 和 MCP-1 的产生,或者抑制其它细胞因子/趋化因子诸如 TNF-α 和 IL-1β 的增强;或者抑制基质金属蛋白酶诸如 MMP-1 和 MMP-9 的诱导;或者抑制成纤维细胞和滑膜细胞的前列腺素 E2 分泌。本发明包括抑制/下调通过 TWEAK 配体促进或通过 TRAIL 配体下调的任何和所有细胞因子。

[0077] 在其它实施方式中,本发明的融合蛋白抑制自体反应的 T 细胞增殖、自体反应的抗体产生和炎症反应。

[0078] 在另外的实施方式中,本发明的融合蛋白减少炎症,如在测量促炎细胞因子和趋化因子产生的抑制和/或抗炎细胞因子产生的升高的体外和体内分析所测定的;在炎症的体内模型系统中测定的,诸如自身免疫病模型,例如,EAE 和胶原诱导的关节炎,和延迟型超敏性,以及其中促炎剂被局部或全身地引入动物中的其它模型。在这些体内模型中,炎症通过发炎组织的组织检查、疾病组织的炎症细胞的分离和患病动物中疾病表现的测量进行评估。在其它实施方式中,本发明的融合蛋白抑制致病性 T 细胞的增殖、分化和/或效应器功能,所述致病性 T 细胞如自身反应的 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞和其它致病性免疫细胞诸如 B 细胞、天然杀伤(NK)细胞、NKT 细胞、淋巴祖细胞、树突细胞、单核细胞/巨噬细胞;诱导致病性免疫细胞的凋亡;促进具有调节性能的免疫细胞(诸如 CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞、Tr1 细胞、CD8⁺、

NKKT和具有免疫抑制活性的树突细胞)的生成;减少血脑屏障的渗透性并且因此限制炎症细胞进入到CNS;减少炎症细胞进入到其它疾病部位;和减少与炎症相关的血管发生。

[0079] 如以上描述,TWEAK配体在包括NK细胞、巨噬细胞、树突细胞、小胶质细胞、神经胶质细胞和内皮细胞的多种免疫和非免疫细胞类型上表达。因此,通过干扰来自这些细胞的TWEAK信号,具有Fn14的融合蛋白阻断TWEAK介导的信号,所述信号由这些细胞类型的每一种引导至它们相互作用的具有Fn14的细胞。如同样上述提到的,TWEAK促进一些具有Fn14的细胞类型诸如星形胶质细胞、内皮细胞和某些人的肿瘤细胞系的增殖,并且抑制其它的细胞类型诸如成红血细胞、肾细胞、系膜细胞、神经元细胞、NK细胞、单核细胞,并且因此包含Fn14的融合蛋白可以逆转这些TWEAK引发的生物学作用。而且,由于Fn14/TRAIL融合蛋白正在行使交换和再引发细胞内信号的功能,所以其它细胞靶标是被有效抑制的具有TRAIL-受体的细胞诸如T细胞,和其它具有TRAIL-R的细胞,其包括多种肿瘤细胞类型,诸如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、骨髓瘤、成胶质母细胞瘤和白血病。

[0080] Fn14

[0081] Fn14是质膜锚定蛋白(plasma membrane-anchored protein)并且是长度为129个氨基酸的TNFR(TNF受体)超家族成员(Swiss Prot登录号Q9CR75(小鼠)和Q9NP84(人))。Fn14的两个变体是已知的,由Swiss Prot.Isoform ID号Q9NP84.1和Q9NP84.2(NCBI登录号分别是NP_057723和BAB 17850)鉴定。也在许多其它种中确定了Fn14序列,所述其它种包括非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) (NCBI登录号AAR21225)和大鼠(NCBI登录号NP_851600)。

[0082] 大多数TNFR超家族成员包括以一个至六个富半胱氨酸结构域(CRD)存在为结构特征的胞外域。典型的CRD为大约40个氨基酸长并且包含形成三个链内二硫桥的六个保守的半胱氨酸残基。CRD自身一般由两个不同的结构模块组成。

[0083] Fn14是I型跨膜蛋白,其包含53个氨基酸——氨基酸28-80——的胞外域与一个CRD。已经显示,在该CRD内的某些带电氨基酸残基对有效的TWEAK-Fn14相互作用是特别关键的。Brown,S.A.等人,Tweak binding the Fn14cysteine-rich domain depends on charged residues located in both the A1 and D2 modules,J.Biochem.397:297-304(2006),其通过引用并入本文。

[0084] 基于Brown等人的文章中提供的信息,例如,本领域技术人员可以确定Fn14蛋白的哪种变体将保留TWEAK结合活性以及哪种将不会保留TWEAK结合活性。例如,发现通过在不是进化上保守的位置处进行位置特异突变制备的数种特异的变体具有TWEAK结合活性。相反地,在CRD区域内的至少三个氨基酸对于TWEAK结合是至关重要的。通过比较各个种中的Fn14蛋白的氨基酸序列,可以确定哪个氨基酸位置不是高度保守的,并且将是替代/添加/缺失的良好候选者。在高度保守区域——特别是在TNFR同源性区域中——的替代/缺失/添加,将不被认为是用于制备根据本发明的变体的可能的候选者。

[0085] TRAIL

[0086] TRAIL是具有291个氨基酸的II型膜蛋白,并且已经在包括但不限于下述的多个种中进行了测序:小鼠:Swiss Prot.登录号P50592;人:Swiss Prot登录号P50591;褐家鼠(*Rattus norvegicus*):NCBI登录NP_663714;鳊(*Siniperca chuatsi*) (桂鱼(*Chinese Perch*)):NCBI登录AAX77404;原鸡(*Gallus Gallus*) (鸡):NCBI登录BAC79267;野猪(*Sus Scrofa*) (猪):NCBI登录NP_001019867;草鱼(*Ctenopharyngodon Idella*) (草鱼):NCBI登录

AAW22593;和黄牛(Bos Taurus)(牛):NCBI登录XP_001250249。

[0087] TRAIL的胞外域包括氨基酸39-281,并且,基于TNF同源性模型,负责受体结合的TNF结构域是氨基酸121-280。对于赋予活性特别重要的蛋白质的部分已经被鉴定。参见,例如,“Triggering cell death:The crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor”,Hymowitz SG,等人,Am.Mol.Cell.1999Oct;4(4):563-71),通过引用并入本文,其报道了对于TRAIL结合其受体和活性最重要的氨基酸是在锌区域周围的氨基酸诸如氨基酸(191-201-205-207-236-237)和氨基酸(150-216),通过引用并入本文。也参见:1)Krieg A等人,2003,Br.J of Cancer 88:918-927,其描述了没有凋亡活性的两个人TRAIL变体,TRAIL- γ 和TRAIL β ;2)“Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L”,D Berg等人,Cell death and differentiation(2007)14,2021-2034;和3)“Crystal Structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity”,S.Cha等人,J.Biol.Chem.275:31171-31177(2000),通过引用并入本文。

[0088] 已知TRAIL连接两种类型的受体:触发TRIL-诱导的凋亡的死亡受体和可能抑制该通路的诱杀型受体。TRAIL的四种人受体已经被鉴定,其包括TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3和TRAILR4。TRAIL也可以结合护骨蛋白(OPG)。与这些受体的每一种的结合已经被很好的表征。参见,例如,“The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset,progression and therapy”,Nature Reviews Cancer Volume 8(2008)782-798。

[0089] 另外的定义

[0090] 如本文使用的,术语“融合蛋白”指包括两种或更多种不同蛋白质的氨基酸序列的嵌合蛋白质。典型地,融合蛋白由本领域熟知的体外重组技术产生。

[0091] 如本文使用的,“生物学活性或者免疫学活性”指根据本发明的融合蛋白与为本发明融合蛋白的构成区段的单独野生型蛋白具有类似的结构功能(但是不必到相同的程度)和/或类似的调节功能(但是不必到相同程度)和/或生化功能(但是不必到相同程度)和/或免疫学活性(但是不必到相同程度)。

[0092] 如本文使用的,“缺失”被定义为与野生型蛋白质相比,其中一个或多个氨基酸残基不存在的氨基酸序列的变化。

[0093] 如本文使用的,“插入”或“添加”是与野生型蛋白质相比,导致一个或多个氨基酸残基的添加的氨基酸序列的变化。

[0094] 如本文使用的,与野生型蛋白质相比,“替代”产生于一个或多个氨基酸分别由不同氨基酸置换。

[0095] 如本文使用的,术语“变体”指与野生型蛋白质相比,具有来自或对序列的一个(或多个)氨基酸的替代、缺失或添加(或这些的任何组合)——包括等位变异——的任何多肽,只要与如在本发明中使用的野生型蛋白质相比,生成的变体融合蛋白保留至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多的生物学或免疫学活性。典型地,本发明包括的FN14/TRAIL融合蛋白的变体将与SEQ.ID.NO.1或SEQ.ID.NO.2具有至少80%或更大的序列同一性或同源性——如本领域中理解的这些术语,更优选地与SEQ.ID.NO.1或SEQ.ID.NO.2具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或甚至

99%的序列同一性。

[0096] 序列同一性或同源性可以使用本领域中已知的标准技术进行测定,诸如由Devereux等人,Nucl. Acid Res. 12:387-395 (1984) 描述的Best Fit序列程序或BLASTX程序(Altschul等人,J. Mol. Biol. 215, 403-410)。比对可以包括在待比对的序列中引入缺口。另外,对于包含比本文公开的蛋白质更多或更少的氨基酸的序列,应理解的是,同源性的百分比将基于同源氨基酸数相对于氨基酸的总数进行测定。

[0097] 另外,一般而言,虽然期望变体显示增强的与给定分子结合的能力,但是在一些实施方式中,变体可以被设计具有与本发明的其它融合相比稍微减小的活性,例如,在其中将有目的地想削弱活性例如以减小神经毒性的情况中。而且,可以生成将更具选择性地结合TRAIL受体变体(在人中有三种TRWIL受体)之一的变体或衍生物。此外,可以生成将改变多聚化性质的变体或衍生物。当改造变体时,这可以对整个TRAIL胞外域进行,或者对并入融合蛋白自身的胞外域的组分进行。

[0098] 优选地,本发明的融合蛋白的变体或衍生物保持氨基酸序列的疏水性/亲水性。可以进行保守氨基酸的替代,例如进行1、2或3至10、20或30个替代,条件是修饰的序列保留充当根据本发明的融合蛋白的能力。氨基酸替代可以包括使用例如非天然存在的类似物以增加血浆半衰期。

[0099] 保守的替代在本领域是已知的,例如根据下表。在第二栏相同单元中并且优选地在第三栏相同行中的氨基酸可以彼此替代:

[0100]	脂族的	非极性	GAPILV
		极性-未带电的	CSTM
			NQ
		极性-带电的	DE
			KR
	芳香族的		HFWY

[0101] 如本文使用的,相对于氨基酸序列,术语“衍生物”指化学修饰的本发明的融合蛋白。

[0102] 这种修饰的非限制性实例可以包括但不限于下述的脂族酯或酰胺:羧基末端或者包含羧基侧链的残基,包含羟基残基的O-酰基衍生物以及氨基末端氨基酸或者含氨基残基的N-酰基衍生物,例如赖氨酸或精氨酸。

[0103] 另外的修饰可以包括例如与聚乙二醇(PEG)结合生成融合蛋白、或者在本发明多肽的化学合成期间添加PEG。

[0104] 多肽或其部分的修饰也可以包括还原/烷基化;化学偶联到合适的载体或者温和的福尔马林处理。

[0105] 本发明的融合蛋白的其它衍生物包括非天然氨基酸残基、或者磷酸化氨基酸残基诸如磷酸酪氨酸、磷酸丝氨酸或者磷酸苏氨酸残基的并入。其它可能的修饰包括磺化、生物素化或其它部分的添加,特别是具有与磷酸基团相似的分子形状的那些。

[0106] 衍生物也包括通过糖基化修饰的多肽。这些可以通过改变合成期间的糖基化模式和在各种可选的真核宿主表达系统中加工,或者在进一步加工步骤期间生成。产生糖基化修饰的方法包括将融合蛋白暴露于衍生自通常进行糖基化加工的细胞的糖基化酶,诸如哺

乳动物糖基化酶。可选地,去糖基化酶可以用于除去在真核表达系统中生产期间连接的糖类。另外,也可以改变编码序列,使得糖基化位点(一个或多个)被添加或者糖基化位点被缺失或者失效。而且,如果不期望糖基化,可以在原核宿主表达系统中产生蛋白质。

[0107] 本发明的融合蛋白的变体和/或衍生物可以通过化学合成或者通过使用位点定向诱变[Gillman等人, *Gene* 8:81 (1979); Roberts等人, *Nature* 328:731 (1987) 或 Innis (Ed.), 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, N.Y.] 或聚合酶链反应方法[PCR; Saiki等人, *Science* 239:487 (1988)] 进行制备,如由 Daugherty等人, [*Nucleic Acids Res.* 19:2471 (1991)] 所示例的,以修饰编码完整受体的核酸。

[0108] 另外的修饰可以被引入,诸如进一步稳定TRAIL三聚体和/或增加结合TRAIL受体的亲和力的那些;间隔区/连接体可以被加入以改变融合蛋白的两个结构组分之间的距离,以及改变这个区域的柔性。

[0109] 在另外的实施方式中,本发明的融合蛋白可以进一步包括添加的用以有助于蛋白质纯化、增加重组蛋白的表达、或者增加重组蛋白的溶解性的一个或多个另外的多肽结构域。这种纯化/表达/溶解性促进结构域包括但不限于金属螯合肽,诸如允许在固定金属上纯化的组氨酸-色氨酸模块(Porath J (1992) *Protein Expr Purif* 3-.26328 1)、允许在固定的免疫球蛋白上纯化的蛋白质A结构域和在FLAGs延伸/亲和纯化系统(Immunex Corp, Seattle, Wash.) 中使用的结构域。在纯化结构域和Fn14/TRAIL之间包含可切割的连接体序列诸如因子Xa或胰凝乳蛋白酶(Invitrogen, San Diego, Calif.) 对于促进纯化是有用的。

[0110] 另外的融合表达载体包括pGEX (Pharmacia, Piscataway, N.J.)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 和pRITS (Pharmacia, Piscataway, N.J.), 其分别融合胱甘肽S转移酶(GST)、麦芽糖B结合蛋白或蛋白质A到靶重组蛋白。也可以使用EBV、BKV和其它游离型基因表达载体(Invitrogen)。另外,也可以使用逆转录病毒和慢病毒表达载体。而且,可以使用(invok) 设计用于在生物体内高水平表达重组蛋白的多个体内表达系统中的任一种以产生本文指定的融合蛋白。

[0111] 在另一实施方式中,本发明的融合蛋白可以在其N-末端包含异源信号序列。在某些宿主细胞(例如,哺乳动物宿主细胞)中,可以通过使用异源信号序列增加融合蛋白的表达和/或分泌。信号序列典型地以疏水氨基酸的核为特征,其一般在分泌期间以一个或多个切割事件(cleavage events) 从成熟蛋白切割。这种信号肽包含允许在它们通过分泌路径时从成熟蛋白切割信号序列的加工位点。因此,本发明涉及具有信号序列的描述的多肽、以及信号序列已经从其被蛋白酶切割的多肽(即,切割产物)。

[0112] 为了增强稳定性和/或反应性,本发明的融合蛋白也可以被修饰以在产生于天然等位基因变异的氨基酸序列中并入一个或多个多态性。另外,D-氨基酸、非天然氨基酸或非氨基酸类似物可以被替代或添加以产生本发明范围内的修饰的融合蛋白。

[0113] 本发明的氨基酸序列可以通过在合适的表达系统中表达编码它们的核苷酸序列产生。

[0114] 另外或可选地,融合蛋白自身可以使用化学方法产生,以全部地或部分地合成期望的氨基酸序列。例如,多肽可以通过固相技术合成、从树脂剪切和通过制备高效液相色谱进行纯化(例如,Creighton (1983) *Proteins Structures And Molecular Principles*, WH

Freeman and Co, New York N.Y.)。合成多肽的组成可以通过氨基酸分析或测序(例如, Edman降解方法)确定。另外,本发明融合蛋白的氨基酸序列或其任何部分可以在直接合成期间改变和/或使用化学方法与其它亚基的序列、或其任何部分合并,以产生变体多肽。

[0115] 测量本发明的任何融合蛋白的任何同源物、衍生物或变体的免疫学活性的试验在本领域是熟知的。

[0116] 例如,可以使用(invok)监测细胞因子产生的数种常规试验中的任一种,如免疫细胞活化作用和分化的测量。例如,为了跟踪T细胞活化,白介素-2可以用作标记,其可以如在Proc.Natl.Acad.Sci.USA.86:1333 (1989)中描述地进行测定,其相关的部分通过引用并入本文。测定干扰素产生的试剂盒也可从Genzyme Corporation (Cambridge, Mass.)获得。也可以应用免疫荧光和流式细胞计量术在细胞基础上监测细胞因子产生,和监测反映细胞活化作用和/或分化状态的细胞表面标记。这种标记的宿主是已知的,检测抗体是广泛地商业可得的,并且标记在本领域中是熟知的。

[0117] T细胞增殖的通常测定需要测量氙化的胸苷掺入。T细胞的增殖可以通过测定³H-标记的胸苷掺入培养细胞的复制DNA中的量来进行体外测量。因此,可以定量DNA的合成速度和相应的细胞分裂速度。

[0118] 监测T细胞增殖的另一个测定基于用CFSE染料装载T细胞,和随后通过流式细胞仪监测伴随连续细胞分裂的该染料的稀释。除了监测T细胞增殖的抑制之外,也可以通过评估融合蛋白在TRAIL受体阳性肿瘤细胞系——在该细胞系中TRAIL受体触发导致凋亡——中诱导细胞凋亡的能力监测融合蛋白的生物活性。通过将这些细胞和其表面上具有TWEAK的其它细胞合并,可以评价新的融合蛋白衍生物是否锚定到TWEAK,并且是否因此具有以这种方式增强的促凋亡TRAIL引发(driven)的活性。

[0119] 药物组合物和给药方案。

[0120] 本发明的组合物的施用典型为肠胃外的、通过静脉内、皮下、肌肉内或者腹膜内的注射,或通过输注或通过通过任何其它可接受的全身的方法。通过静脉输注的施用是优选地,典型地在约1至5小时的时间段内。另外,存在多种施用治疗蛋白质的口服递送方法,并且这些方法可以应用于本发明的治疗性融合蛋白。

[0121] 通常,从低水平向上滴定治疗剂量以最优安全性和效力。一般而言,每天的剂量将落入每千克体重约0.01至20mg的范围内。典型地,剂量范围为每千克体重约0.1至5mg。

[0122] 可以制造各种融合蛋白的修饰或衍生物,诸如聚乙二醇链(PEG化)的加入,以影响它们的药物动力学和/或药效学性能。

[0123] 为了通过除了胃肠外施用的途径施用融合蛋白,用阻止其失活的材料包被蛋白质或者与阻止其失活的材料一起共同施用该蛋白质是必要的。例如,蛋白质可以在不完全佐剂中、与酶抑制剂共同施用或者在脂质体中施用。酶抑制剂包括胰腺的胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟磷酸盐(DEP)和抑肽酶(trasyolol)。脂质体包括水包油包水(water-in-oil-in-water) CGF乳剂以及常规的脂质体(Strejan等人(1984) J.Neuroimmunol.7:27)。

[0124] 本发明的组合物的“有效量”是将改善表征由自身免疫病诸如多发性硬化症引起的医疗状况的一个或多个熟知的参数的量。多个这样的参数和状况已经被描述。在多发性硬化症的情况下,有效量将是足以实现以下一种或多种的融合蛋白的量:降低症状的严重性;减少疾病加重的持续时间;增加疾病缓解/症状消失期的频率和持续时间;防止固定损

害和失能;和/或防止/减弱疾病的慢性进程。临床上,这将导致下述状况的改善:视觉症状(视觉丧失、复视)、步态障碍(虚弱、轴性不稳定、感觉丧失、痉挛状态、反射亢进、灵巧性丧失)、上肢功能障碍(虚弱、痉挛状态、感觉丧失)、膀胱功能障碍(紧急、失禁、踌躇、不完全排空)、压抑、情绪不稳定和认知缺损。病理上,用本发明的融合蛋白的治疗减少了以下一种或多种:诸如髓鞘质损失、血脑屏障的破坏、单核细胞的血管周围浸润、免疫异常、胶质疤痕形成(gliotic scar formation)和星形胶质细胞增殖、金属蛋白酶产生和损害的传导速度。

[0125] 虽然本发明的组合物可以以简单溶液施用,但是它们更典型地与其它材料诸如载体——优选地药物载体——组合使用。有用的药物载体可以是适于将本发明的组合物递送到患者的任何相容的非毒性物质。无菌水、乙醇、脂肪、蜡和惰性固体可以被包括在载体中。药学上可接受的佐剂(缓冲剂、分散剂)也可以掺入药物组合物中。一般而言,对于这种药物的肠胃外施用有用的组合物是熟知的;例如Remington's Pharmaceutical Science, 17th Ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990)。可选地,本发明的组合物可以通过可植入的药物递送系统引入患者身体[Urquhart等人, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24:199 (1984)]。

[0126] 治疗制剂可以以多种常规的剂量配方(dosage formulation)施用。制剂典型地包括至少一种活性成分和一种或多种药学上可接受的载体。制剂可以包括适合于口服、直肠、鼻腔或肠胃外(包括皮下、肌肉内、静脉内和皮内的给药)施用的那些。

[0127] 制剂可以方便地以单位剂型提供,并且可以通过药学领域中熟知的任何方法制备。参见例如, Gilman等人, (eds.) (1990), The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; 和Remington's Pharmaceutical Sciences, supra, Easton, Pa.; Avis等人, (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, N.Y.; Lieberman等人, (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, N.Y.; 和Lieberman等人, (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, N.Y.

[0128] 在另外的实施方式中,本发明考虑通过基因治疗方法施用融合蛋白,例如,施用编码感兴趣融合蛋白的分离的核酸。本发明的融合蛋白的蛋白构件(building block)(例如,第一和第二结构域)关于编码蛋白质的核酸序列和生成的蛋白质的氨基酸序列都已经被很好地表征。通过重组DNA方法改造这种分离的核酸完全在本领域技术人员的能力之内。为了最大化特定细胞背景下的重组蛋白质产量,密码子优化同样也完全在本领域技术人员的能力之内。编码融合蛋白的分离核酸的施用被表述“施用治疗有效量的本发明的融合蛋白”所包括。基因治疗方法在本领域中是熟知的。参见例如W096/07321,其公开了使用基因治疗方法生成细胞内抗体。基因治疗方法也已经成功地人类的患者中证明。参见例如Baumgartner等人, Circulation 97:12, 1114-1123 (1998), 和更近地, Fatham, CG. 'A gene therapy approach to treatment of autoimmune diseases', Immun. Res. 18:15-26 (2007); 和美国专利号7,378,089,两者通过引用并入本文。也参见Bainbridge JWB等人, "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital Amaurosis". N Engl J Med 358:2231-2239, 2008; 和Maguire AM等人, "Safety and efficacy of gene transfer for Leber's Congenital Amaurosis". N Engl J Med 358:2240-8, 2008。

[0129] 有两种主要途径用于将编码融合蛋白的核酸(任选地包含在载体中)引入患者的

细胞中;在体内和先体外后体内。对于体内递送,通常在需要融合蛋白的部位将核酸直接注射入患者中。对于先体外后体内治疗,移出患者的细胞,将核酸引入到这些分离的细胞中并且将被改变的细胞直接地施用给患者或者例如被封装在植入患者中的多孔膜内(参见,例如美国专利号4,892,538和5,283,187)。有多种可用于将核酸引入活细胞的技术。这些技术根据核酸是在体外转移到培养细胞中或者在体内转移到预期的宿主细胞中而变化。适合于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、微注射、细胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸钙沉淀方法等。先体外后体内递送基因的常用的载体是逆转录病毒和慢病毒载体。

[0130] 优选地体内核酸转移技术包括用如下进行的转染:病毒载体(例如,腺病毒、单纯疱疹I型病毒、腺相关病毒)、脂-基系统(例如,对于脂质介导的基因转移有用的脂质是DOTMA、DOPE和DC-Choi)、裸DNA和转座子-基表达系统。对于目前已知的基因标记和基因治疗方案的综述参见Anderson等人,Science 256:808-813 (1992)。也参见W093/25673和其中引用的文献。

[0131] “基因治疗”包括其中通过单次治疗获得持续作用的常规基因治疗和施用基因治疗剂,施用基因治疗剂包括一次或重复地施用治疗有效的DNA或mRNA。

[0132] 可以修饰寡核苷酸以增强它们的摄取,例如,通过用未带电的基团替代它们的带负电荷的磷酸二酯基团。本发明的Fn14/TRAIL融合蛋白可以使用基因治疗方法进行递送,例如在瘤床(tumor bed)中局部地递送、髓内地或全身地递送(例如,经由选择性地靶向特定组织类型的载体,例如组织特异的腺相关病毒载体)。在一些实施方式中,来自个体的初级细胞(诸如淋巴细胞或干细胞)可以用编码任一本发明融合蛋白的基因进行先体外后体内转染,并且随后转染的细胞返回到个体的身体。

[0133] 在一些实施方式中,本发明的融合蛋白适合于治疗免疫系统疾病或病症,包括但不限于:自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性新生儿血小板减少症、原发性血小板减少性紫癜、自身免疫性中性粒细胞减少症、自身免疫性细胞减少症、溶血性贫血、抗磷脂综合征、皮炎、谷蛋白敏感性肠道病、变应性脑脊髓炎、心肌炎、复发性多发软骨炎、风湿性心脏病、肾小球性肾炎(例如IgA肾病)、多发性硬化症、神经炎、眼色素层眼炎、多发内分泌腺病、紫癜(例如,Henloch-Scoenlein紫癜)、莱特尔氏病、僵人综合征(Stiff-Man syndrome)、自身免疫性肺炎、心肌炎、IgA肾小球性肾炎、致密物沉积病(dense deposit disease)、风湿性心脏病、格林-巴利综合征(Guillain-Barre Syndrome)、胰岛素依赖性糖尿病、和自身免疫性眼炎、自身免疫性甲状腺炎、甲状腺功能减退(即,桥本氏甲状腺炎)、系统性红斑狼疮、盘状狼疮、古德帕斯彻综合征、天疱疮,受体自身免疫性疾病例如(a)突眼性甲状腺肿,(b)重症肌无力和(c)胰岛素抗性、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎、具有抗胶原抗体的scleroderma、混合性结缔组织病、多发性肌炎/皮肌炎、恶性贫血、特发性阿狄森氏病、不孕症、肾小球肾炎如原发性肾小球肾炎和IgA肾病、大疱性类天疱疮、斯耶格伦综合征、糖尿病、和肾上腺素能药抗性(包括哮喘或纤维囊泡症的肾上腺素能药抗性)、慢性活动性肝炎、原发性胆汁肝硬化、其它内分泌腺病变、白斑病、血管炎、后-MI、心切术综合征、荨麻疹、特应性皮炎、哮喘、炎症性肌病,和其它炎性、肉芽肿性、变性和萎缩性病症)。在一个实施方式中,本发明的融合蛋白用于治疗多发性硬化症。

[0134] 在另外的实施方式中,本发明的融合蛋白可以用于治疗不同类型的癌。可溶性

TRAIL与某些类型的肿瘤细胞中凋亡的诱导相关。而且,对于某些肿瘤类型,炎症实际上可以是促肿瘤发生的。因此,TRAIL融合蛋白可以用于直接杀死肿瘤细胞、阻断促肿瘤生成的炎症,而且可以用于阻断血管发生。在这种情况下,Fn14组分(第一结构域)将使TRAIL局限于(localize)TWEAK-阳性细胞(例如,在肿瘤内皮上和/或肿瘤细胞自身上)。

[0135] 术语“癌症”和“癌的”指或描述典型地以上调的细胞生长为特征的哺乳动物中的生理状况。如本文使用,术语“患者”指哺乳动物,典型地但不排除人,其具有癌或其它自身免疫性疾病,并且因此需要通过本发明的方法进行治疗。术语“需要治疗的哺乳动物”与“患者”可交替地使用。

[0136] 癌症的实例包括但不限于:癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、白血病或恶性淋巴瘤。这些癌症更具体的例子包括肾癌(kidney cancer)或肾癌(renal cancer),乳腺癌,结肠癌,直肠癌,大肠癌,肺癌——包括小细胞肺癌,非小细胞肺癌,肺腺癌和肺鳞癌,鳞状细胞癌(如,上皮鳞状细胞癌),子宫颈癌,卵巢癌,前列腺癌,肝癌,膀胱癌,腹膜癌,肝癌,包括胃肠的胃或胃部癌、胃肠道间质瘤(GIST),胰癌,头颈部癌,成胶质母细胞瘤,视网膜母细胞瘤,星形细胞瘤,卵泡膜细胞瘤(thecomas),男性细胞瘤(arrhenoblastomas),肝癌,血液系统恶性疾病包括——非霍奇金淋巴瘤(NHL),多发性骨髓瘤和急性血液系统恶性疾病,子宫内膜或子宫癌,子宫内膜异位症,纤维肉瘤,绒毛膜癌,唾液腺肿瘤,外阴肿瘤,甲状腺胃癌,食管癌,肝癌,肛门癌,阴茎癌,鼻咽癌,喉头癌,卡波西氏肉瘤,黑色素瘤,皮肤癌,神经鞘瘤,少突胶质细胞瘤,神经母细胞瘤,横纹肌肉瘤,骨肉瘤,平滑肌肉瘤,泌尿道癌,甲状腺癌,肾母细胞的肿瘤,以及B-细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡型非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中级/滤泡NHL,中级弥漫性NHL,高级免疫母细胞瘤;高级淋巴细胞,高级淋巴细胞NH;高级小无裂细胞NHL,大块疾病NHL;套细胞淋巴瘤,艾滋病相关淋巴瘤;以及瓦尔登斯特的巨球蛋白血症),慢性淋巴细胞白血病(CLL),急性淋巴细胞白血病(ALL),毛细胞白血病,慢性髓细胞白血病和移植后淋巴增生症(PTLD),以及与癌症病相关的不正常的血管增生,水肿(诸如与脑肿瘤相关的水肿),和梅格斯氏综合征。如本文使用“肿瘤”指所有的赘生性细胞生长和增殖,不论是恶性或良性的,和癌前的和癌性细胞和组织。

[0137] “治疗(Treating)”或“治疗(treatment)”或“减轻”指治疗处理和预防或预防性措施,其中目的是防止或减慢(减轻)靶标的病理状况或病症。如果根据本发明的方法在接受治疗量的本发明的融合蛋白后,对象被成功地“治疗”,那么对象显示看得见的和/或可测量的特定疾病的一种或多种体征和症状的减少或者不存在。例如,对于癌症,癌细胞数量的减少或者癌细胞不存在;肿瘤大小的减小;肿瘤转移的抑制(即,减慢到一定程度和优选地停止);肿瘤生长抑制到一定程度;缓解持续时间的增加,和/或与特定癌相关的一种或多种症状减轻到一定程度;发病率和死亡率的减少,和生活质量的提高。疾病体征或症状的减少也可以由患者感觉到。治疗可以实现完全应答,其定义为癌症的所有体征的消失,或部分的应答,其中肿瘤的大小减小,优选减小多于50%,更优选减小75%。如果患者经历稳定(stable)的疾病,则患者也被认为被治疗。在优选的实施方式中,癌症患者的癌症在1年后,优选在15个月仍然是没有进展。评价疾病成功治疗和改善的这些参数通过本领域中合适技能的医生熟悉的常规步骤可容易地测量。本发明的融合蛋白以有效提供使用于测量癌症治疗成功的任一上述参数改善的量施用,并且其可以由本领域技术人员容易地确定。例如,有效量是在一些癌细胞、或大多数癌细胞或基本上所有的患者癌细胞中有效诱导凋亡的

量。有效量的其它实例包括有效减少肿瘤细胞增殖、或停止经由侵入其它组织进行的肿瘤进展、减少血管发生和减少炎症的量。

[0138] 在癌症治疗情况,本发明的融合蛋白可以任选地与其它化疗剂组合地施用给患者。合适的化疗剂包括,例如,烷化剂诸如塞替派和环磷酰胺(CYTOXAN(TM));磺酸烷基酯类,诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,诸如苯佐替派、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替派;氮丙烷和methyldiamines,包括六甲蜜胺、曲他胺、三乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫化磷酰和三羟甲蜜胺;氮芥类,诸如苯丁酸氮芥、荼氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、曲磷胺、乌拉莫司汀;亚硝基脲类,诸如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素,诸如阿克拉霉素、放线菌素、authramycin、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、刺孢酶素、carabycin、去甲柔红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地拖比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、伊索比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、麦考酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、potfiromycin、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物,诸如甲基蝶呤和5-氟嘧啶(5-FU);叶酸类似物诸如氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿胞糖苷、双脱氧尿苷、去氧尿苷、依诺他滨、氟苷、5-FU;雄激素,诸如卡普睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素药物,诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补药,诸如亚叶酸;醋葡萄糖内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙;地磷酰胺(defofamine);秋水酰胺;地吡醌;elformithine;醋酸羟吡唑;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK.RTM.;雷佐生;西佐喃;锗螺胺;细格孢氮杂酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类,例如紫杉醇(TAXOL.RTM.,Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)和多西紫杉醇(TAXOTERE.RTM.,Rhone-Poulenc Rorer,Antony,法国);苯丁酸芥;吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,诸如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维本;能灭瘤;替尼泊苷;柔红霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;CT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲酸;埃斯波霉素;卡培他滨;和任一上述的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0139] 在此定义中也包括起调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素药,诸如抗雌激素药,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制4(5)-咪唑类的芳香酶、4-羟基米芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY1 17018、奥那司酮和托瑞米芬(Fareston);和抗雄激素药,诸如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;和任一上述的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0140] 在此定义中也包括能够使肿瘤细胞对TRAIL敏感并且克服TRAIL抗性的化疗剂,诸如蛋白酶体抑制剂和组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂、放线酮、甲磺酸伊马替和其它蛋白酪氨酸激酶抑制剂、17-烯丙胺基-17-脱甲基格尔德霉素、三氧化二砷和细胞凋亡蛋白质小分子拮抗剂的X-连锁抑制剂;和任一这些的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0141] 关于癌症治疗的方法的另外信息在美国专利号7,285,522中提供,通过引用整体

并入。

[0142] 因此,在优选的实施方式中,本发明的融合蛋白可以用于治疗乳腺癌。在另一优选的实施方式中,本发明的融合蛋白可以用于治疗结肠癌。在另一实施方式中,本发明的融合蛋白可以用于治疗肝癌。在另一优选的实施方式中,本发明的融合蛋白可以用于治疗卵巢癌。在另一优选的实施方式中,本发明的融合蛋白可以用于治疗白血病。在另一实施方式中,本发明的融合蛋白可以用于治疗黑素瘤。

[0143] 在进一步的实施方式中,本发明的融合蛋白可以用于治疗同种免疫性疾病,例如移植物排斥、或移植物抗宿主或宿主抗移植物疾病。

[0144] 在进一步的实施方式中,本发明的融合蛋白可以通过施用有效量的融合蛋白用于调节血管发生,如以上描述。例如在美国专利号7,208,151中描述TWEAK和其它Fn14激动剂的应用,该专利通过引用整体并入本文。

[0145] 在本发明中,源于多种具有TWEKA的免疫和非免疫细胞类型的促炎TWEAK信号通过Fn14-TRAIL转化为抑制性TRAIL信号。有意义地,相反的(抗炎TRAIL)新信号(neo-signal)明显地(by definition)将具有TWEAK的细胞的注意信号(attention)从Fn14⁺TRAIL-R转向Fn14-TRAIL-R⁺活化的T细胞——有效地重新定向信号,引发自身免疫发病。TWEAK:Fn14和TRAIL:TRAIL-R信号轴的功能多效作用,尤其是前者的功能多效作用——其跨越一群免疫和非免疫细胞类型——在Fn14-TRAIL中具有影响和扩张细胞网络的广泛的功能可能性(Burkly LC,Michaelson JS,Hahm K,Jakubowski A,Zheng TS:TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine:role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease,Cytokine 2007,40:1-16;Winkles JA:The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis:discovery,biologyand therapeutic targeting,Nat Rev Drug Discov 2008;Zauli G,Secchiero P:The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology,Cytokine Growth Factor Rev 2006,17:245-257;Vince JE,Silke J:TWEAK shall inherit the earth,Cell Death Differ 2006,13:1842-1844;Cretney E,Shanker A,Yagita H,Smyth MJ,Sayers TJ:TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer,Immunol Cell Biol 2006,84:87-98)。

[0146] 不同于简单的TWEAK阻断剂(诸如Fn14-IgG1(mut)),Fn14-TRAIL融合蛋白用抗炎TRAIL新信号替代TWEAK促炎信号。因此,具有表面TWEAK的细胞本质上阻止促进TWEAK引发的炎症,而代替地改变方向朝向抑制其不可能以其它方式相互作用的、具有TRAIL-R的细胞(例如,活化的效应器T细胞)。TRAIL:TRAIL-R信号轴对于炎症事件的影响主要通过抑制多种免疫功能——T细胞细胞周期进程、自反应T细胞增殖、促炎细胞因子产生、Ab产生和炎症反应。Hilliard B,Wilmen A,Seidel C,Liu TS,Goke R,Chen Y:Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis,J Immunol 2001,166:1314-1319;Lamhamedi-Cherradi SE,Zheng S,Tisch RM,Chen YH:Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes,Diabetes 2003,52:2274-2278;Cretney E,McQualter JL,Kayagaki N,Yagita H,Bernard CC,Grewal IS,Ashkenazi A,Smyth MJ:TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)/Apo2L suppresses experimental autoimmune

encephalomyelitis in mice, *Immunol Cell Biol* 2005, 83:511-519; Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Uemura Y, Nishimura Y: Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand, *J Immunol* 2005, 174:1888-1897; Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH: Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice, *Nat Immunol* 2003, 4:255-260; Song K, Chen Y, Goke R, Wilmen A, Seidel C, Goke A, Hilliard B, Chen Y: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression, *J Exp Med* 2000, 191:1095-1104; Mi QS, Ly D, Lamhamedi-Cherradi SE, Salojin KV, Zhou L, Grattan M, Meagher C, Zucker P, Chen YH, Nagle J, Taub D, Delovitch TL: Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice, *Diabetes* 2003, 52:1967-1975。这种免疫抑制作用的范围明显超越CD4⁺T细胞自身, 包括CD8⁺T细胞、B细胞、单核细胞和DC。Zauli G, Secchiero P: The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology, *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, 17:245-257; Kayagaki N, Yamaguchi N, Abe M, Hirose S, Shirai T, Okumura K, Yagita H: Suppression of antibody production by TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), *Cell Immunol* 2002, 219:82-91; Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, Grandien A, Ljunggren HG, Smyth MJ, Chambers BJ: NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy, *J Immunol* 2004, 172:123-129; Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, Griffith TS, Green DR, Schoenberger SP: CD4⁺T-cell help controls CD8⁺T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death, *Nature* 2005, 434:88-93; You RI, Chang YC, Chen PM, Wang WS, Hsu TL, Yang CY, Lee CT, Hsieh SL: Apoptosis of dendritic cells induced by decoy receptor 3 (DcR3), *Blood* 2008, 111:1480-1488。虽然存在TRAIL在某些条件下可以在巨噬细胞和中性粒细胞中诱导凋亡性细胞死亡的证据, (Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H: Nature's TRAIL-on a path to cancer immunotherapy, *Immunity* 2003, 18:1-6; Kaplan MJ, Ray D, Mo RR, Yung RL, Richardson BC: TRAIL (Apo2 ligand) and TWEAK (Apo3 ligand) mediate CD4⁺T cell killing of antigen-presenting macrophages, *J Immunol* 2000, 164:2897-2904; Renshaw SA, Parmar JS, Singleton V, Rowe SJ, Dockrell DH, Dower SK, Bingle CD, Chilvers ER, Whyte MK: Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL, *J Immunol* 2003, 170:1027-1033), 但是对于T细胞来说, 它的促凋亡活性不太清楚。Lunemann JD, Waiczies S, Ehrlich S, Wendling U, Seeger B, Kamradt T, Zipp F: Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto) antigen-specific T cells, *J Immunol* 2002, 168:4881-4888; Zhang XR, Zhang LY, Devadas S, Li L, Keegan AD, Shi YF: Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T

helper subset differentiation, Cell Death Differ 2003, 10: 203-210。

[0147] 在单个融合蛋白内嵌合Fn14和TRAIL组分可以引起特别的并且有时互补的功能特性,其可以增加两种组分的功效、掩盖一种或另一种的负作用——其可能以其它方式限制它们的治疗应用,和赋予特定的优点。这些包括以下:

[0148] 1) 通过将Fn14——天然为单体的蛋白质连接至TRAIL(天然为三聚体),有效地生成Fn14的三聚体变体。如所证明的,结构建模表明这种Fn14新三聚体可以精确地与Fn14的天然三聚体TWEAK反受体对接(dock)(图9)。而且,Fn14-TRAIL融合蛋白的另一端,三聚体TRAIL与TRAIL的三聚体DR5对接。因此,这些结构互补性——通过将单体Fn14嵌合至三聚体TRAIL从头生成——实际上可以产生独特稳定的TWEAK-Fn14-TRAIL-DR5分子桥,其在使得阻断TWEAK和引发彼此面对的细胞上DR5方面的效力更大。而且,建模表明嵌合体是相当刚性的,因此像间隔区(约60Å)一样起作用,这限制了具有TWEAK的细胞和活化的效应器T细胞之间局部地细胞与细胞接触。可想象的是,60Å的局部分离可能干扰例如免疫突触内引发炎症反应的其他共刺激分子。

[0149] 2) TRAIL配体经由Fn14‘桥’有效地锚定到细胞表面,这有效增加其效价。在某种意义上,这正在重复具有DC新表达表面TRAIL的状况,其已显示出在抑制EAE中是有效的。Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Uemura Y, Nishimura Y: Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand, J Immunol 2005, 174: 1888-1897。

[0150] 3) TRAIL-介导的抑制可以主要在EAE启动阶段(在T细胞触发和扩张期间)起作用(Cretney E, McQualter JL, Kayagaki N, Yagita H, Bernard CC, Grewal IS, Ashkenazi A, Smyth MJ: TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice, Immunol Cell Biol 2005, 83: 511-519), 而TWEAK-阻断的益处可以更集中于下游促炎事件(包括阻止血脑屏障的破坏)。Desplat-Jego S, Creidy R, Varriale S, Allaire N, Luo Y, Bernard D, Hahm K, Burkly L, Boucraut J: Anti-TWEAK monoclonal antibodies reduce immune cell infiltration in the central nervous system and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, Clin Immunol 2005, 117: 15-23。因此,通过组合两者,可以具有能够原则上影响疾病的启动和随后阶段的单一药剂。

[0151] 4) 在启动阶段后,TRAIL可以促进神经元的死亡(Nitsch R, Pohl EE, Smorodchenko A, Infante-Duarte C, Aktas O, Zipp F: Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue, J Neurosci 2004, 24: 2458-2464; Aktas O, Smorodchenko A, Brocke S, Infante-Duarte C, Topphoff US, Vogt J, Prozorovski T, Meier S, Osmanova V, Pohl E, Bechmann I, Nitsch R, Zipp F: Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL, Neuron 2005, 46: 421-432), 这与显示初级人神经元(Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, Zipp F: Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), Lancet 2000,

356:827-828) 和少突胶质细胞 (Matysiak M, Jurewicz A, Jaskolski D, Selmaj K: TRAIL induces death of human oligodendrocytes isolated from adult brain, *Brain* 2002, 125:2469-2480) 易于 TRAIL-诱导的细胞死亡的先前研究一致。通过将 Fn14 连接至 TRAIL, 提供一种维持血脑屏障完整性的药剂 (通过 TWEAK 阻断), 并且因此减少 TRAIL 进入到 CNS。而且, 由于已经报道 TWEAK 触发神经元细胞死亡 (Petrovita I, Zhang W, Burkly L, Hahm K, Lincecum J, Wang MZ, Maurer MH, Rossner M, Schneider A, Schwaninger M: Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-induced neurodegeneration, *J Neurosci* 2004, 24:8237-8244), 所以预期 Fn14-TRAIL 也将通过阻断这种 TWEAK 活性保护神经元。

[0152] 5) 在 EAE 期间, 血管的数量与疾病评分和炎症、白细胞浸润和脱髓鞘的病理测量相关。Kirk SL, Karlik SJ: VEGF and vascular changes in chronic neuroinflammation, *J Autoimmun* 2003, 21:353-363。由于 TWEAK 促进血管发生 (Jakubowski A, Browning B, Lukashev M, Sizing I, Thompson JS, Benjamin CD, Hsu YM, Ambrose C, Zheng TS, Burkly LC: Dual role for TWEAK in angiogenic regulation, *J Cell Sci* 2002, 115:267-274), 而 TRAIL 抑制它 (Cantarella G, Risuglia N, Dell'eva R, Lempereur L, Albini A, Pennisi G, Scoto GM, Noonan DN, Bernardini R: TRAIL inhibits angiogenesis stimulated by VEGF expression in human glioblastoma cells, *Br J Cancer* 2006, 94:1428-1435), 因此 Fn14-TRAIL 可以通过双重机理在炎症部位抑制血管发生, 即, 通过拮抗 TWEAK 的促血管生成活性和通过 TRAIL 的抗血管生成活性协同地加强这种作用。

[0153] 6) 然而, 另一种协同作用可以发生于内皮细胞功能和趋化因子表达的调节。如以上陈述的, TWEAK 的阻断可以通过内皮细胞干扰趋化因子表达并且干扰白细胞粘附于内皮细胞。TRAIL 也与这些过程有联系。TRAIL 通过下调 CCL8 和 CXCL10 趋化因子表达和释放对抗 TNF- α -诱导的白细胞粘附于内皮细胞。Secchiero P, Corallini F, di Iasio MG, Gondii A, Barbarotto E, Zauli G: TRAIL counteracts the proadhesive activity of inflammatory cytokines in endothelial cells by down-modulating CCL8 and CXCL10 chemokine expression and release, *Blood* 2005, 105:3413-3419。因此, Fn14-TRAIL 可以通过其 Fn14 和 TRAIL 端影响白细胞吸引和粘附。

[0154] 实施例

[0155] 以下实施例意图欲说明本发明, 而不应该解释为以任何方式限制本发明。

[0156] 材料和方法

[0157] 小鼠

[0158] 4-6 周龄 C57BL/6 雌性小鼠购自 Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine), 并且在宾夕法尼亚大学动物设施被保持在无病原体条件下。所有动物实验都得到在宾夕法尼亚大学动物照顾与使用委员会批准。

[0159] 试剂

[0160] 质粒 pT2/BH 和 pNEB193 UbC-SB 11 由 Dr. Perry Hacket (University of Minnesota, Minneapolis) 提供, 鼠 TRAIL 和 TWEAK cDNAs 从 Dr. Hideo Yagita (Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan) 获得。质粒 pMFneo 从 Dr. Herman Waldmann (University of Oxford, Oxford, UK) 获得。小鼠 MOG38-50 肽 (GWYRSPFSRWHL) 使用 F-moc 固相

方法合成并且通过Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) 的HPLC进行纯化。百日咳毒素从EMD Biosciences (San Diego, CA) 购买。以下试剂从BD Pharmingen (San Diego, CA) 购买: 小鼠IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 和重组小鼠IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 的ELISA Ab对。IL-17ELISA Ab对购自Southern Biotech (Alabama, USA), 重组小鼠IL-17购自Biosource (Camarillo, CA)。PE-抗-小鼠TRAIL和PE-抗-小鼠TWEAK从eBioscience (San Diego, CA) 购买。重组的TRAIL (Super Killer TRAILTM) 购自Axxora Platform (San Diego, CA)。

[0161] 质粒构建

[0162] 使用部分重叠的合成寡核苷酸, 通过PCR构建嵌合的Fn14-TRAIL和Fn14-IgG1 (mut) 编码盒。编码小鼠Fn14氨基酸(aa) 1-79 (Swiss-prot登录号Q9CR75) 的cDNA分别连接到编码小鼠TRAIL的aa118-291 (Swiss-prot登录号P50592) 或编码突变人IgG1Fc (Fc γ 1) 片段的cDNA。对于后者, 使用配置为突变以下的寡核苷酸: C220 $\rightarrow$ S、C226 $\rightarrow$ S、C229 $\rightarrow$ S、N297 $\rightarrow$ A、E233 $\rightarrow$ P、L234 $\rightarrow$ V和L235 $\rightarrow$ A, 通过基于PCR的定点突变, 修饰编码人Fc γ 1 (Brunschwig EB, Levine E, Trefzer U, Tykocinski ML: Glycosylphosphatidylinositol-modified murine B7-1 and B7-2 retain costimulator function, J Immunol 1995, 155:5498-5505) 的cDNA。为了表达可溶的TRAIL, 使用编码鼠TRAIL aa 118-291的cDNA。所有这些cDNA片段亚克隆入pMFneo真核表达载体下游的EF1 α 启动子区域。荧光素酶的编码序列用来自pTAL-Luc (BD Biosciences; San Jose, CA) 的Hind3-and BamH1固定, 并亚克隆入pMFneo的各个位点。编码全长鼠TWEAK的cDNA通过PCR生成并亚克隆入pcDNA3真核表达载体 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)。

[0163] 为了生成并入相同质粒的转座子和转座酶盒内的衍生的睡美人表达载体 (derivative Sleeping Beauty expression vector), 通过PCR从pNEB193 UbC-SB 11 (b.p. 432-2958) 生成由泛素C启动子侧翼上游的转座酶编码序列, 然后在pT2/BH载体的Apa1和Xho1位点之间连接, 所述pT2/BH载体包含转座子盒。这种新的表达载体——并入转座酶和转座子表达盒——命名为pSBC21。接着, 对应于Fn14-TRAIL、可溶性Fn14、Fn14-IgG1 (mut)、可溶的TRAIL或荧光素酶——每一都个连接至EF1 α 启动子——的cDNA从它们各自的pMFneo表达构建物亚克隆入pSBC21的转座子盒——转座酶表达组件的下游。所有亚克隆的cDNA以与转座酶相同的方向定位。

[0164] 细胞培养和转染

[0165] 人293肾细胞和CHO细胞分别在补充有100 μ g/ml青霉素、100U/ml链霉素、2%和10%热灭活小牛血清的DMEM和HAM'S F-12中培养。使用LipofectAMINETM试剂 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), 用Fn14-TRAIL、可溶性Fn14、Fn14-IgG1 (mut) 和可溶性TRAIL pMFneo表达载体瞬时转染293细胞。条件培养基中的蛋白质通过SDS-PAGE进行解离并通过蛋白质印迹分析进行检测。用于检测Fn14和TRAIL的抗小鼠-Ab分别从eBioscience和R&D (Minneapolis, MN) 购买。CHO细胞用pcDNA3-基的鼠TWEAK表达构建物瞬时转染。在转染子上的TWEAK表达通过免疫荧光和流式细胞仪进行验证。

[0166] EAE的诱导和疾病评估

[0167] 根据标准诱导方案诱导EAE。Stromnes IM, Goverman JM: Active induction of experimental allergic encephalomyelitis, Nat Protoc 2006, 1:1810-1819。简单地说, 雌性C57BL/6小鼠用0.1ml PBS中总计300 μ g的MOG₃₈₋₅₀肽 (分成两个皮下注射, 一个在每个背

侧上)激发,在等体积的包含4mg/ml结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) H37RA (Difco, Detroit, MI) 的CFA中乳化。这些小鼠以0.2ml PBS中的100ng百日咳毒素同时进行静脉内注射。在48h后施用百日咳毒素 (100ng/小鼠) 的第二次静脉注射。每天检查小鼠的EAE信号并如下进行评分:0,没有疾病;1,尾巴瘫痪;2,后肢无力;3,后肢瘫痪;4,后肢加前肢瘫痪;5,垂死或死亡。

[0168] 细胞因子和增殖测定

[0169] 对于细胞因子测定,在存在或者不存在不同浓度的MOG₃₈₋₅₀肽或1μg/ml Con A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的情况下,脾细胞在具有10%FBS的0.2ml的DMEM中以每孔 1.5×10^6 个细胞进行培养。条件培养基在40h后收集,并且根据制造商的推荐 (BD Pharmingen, San Diego, CA),使用对相应细胞因子特异的成对mAb,通过定量ELISA测定细胞因子浓度。增殖测定在96孔板中使用 0.5×10^6 个细胞/孔进行。^[3H] 胸苷在第48小时被加入培养物,并且在16h后收获细胞。使用平板β-计数器 (Wallac) 测定放射性。

[0170] 流体注入 (Hydrodynamic injection)

[0171] 单独地用pSBC21载体或者用并入Fn14-TRAIL、可溶性Fn14、Fn14-IgG1 (mut)、可溶性TRAIL或荧光素酶编码序列的基于pSBC21的表达构建物注射小鼠。表达质粒在体积 (以ml) 等于10%体重 (以gm) 的盐水中溶解。根据公开的方案,每只动物的全部体积在5秒内经由尾静脉注射。Liu F, Song Y, Liu D: Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA, *Gene Ther* 1999, 6:1258-1266。使用肝素化的毛细管收集眶后 (retro-orbital) 的血液样品。离心后,回收血浆并在-20℃下保存,直到进行ELISA测定。

[0172] 血清中重组蛋白的测量

[0173] ELISA测定在96-孔微量滴定板中进行。对于Fn14-TRAIL、可溶性Fn14和Fn14-IgG1 (mut), 来自eBioscience (San Diego, CA) 的纯化的抗-人/小鼠Fn14/TWEAK受体Ab用作捕获Ab;对于可溶性TRAIL, 来自R&D Systems (Minneapolis, MN) 的抗-小鼠TRAIL Ab用作捕获Ab。检测Ab是:对于Fn14是来自eBioscience的生物素-抗-小鼠TWEAK受体Ab;对于Fn14-TRAIL和可溶性TRAIL是来自eBioscience的生物素-抗-小鼠TRAILAb;对于Fn14-IgG1 (mut) 是来自Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) 的抗-人IgG, Fcγ 片段-特异的Ab。

[0174] 在包被缓冲液 (0.1M碳酸盐, pH 8.2) 中稀释的捕获Ab分配在微量滴定板中并在4℃温育过夜。在用PBS中0.05%吐温-20洗涤两次后,孔用PBS-3%白蛋白在RT下温育另外2h以封闭非特异的结合位点。再次洗涤两次后,加入100μl的血清样品并在4℃温育过夜。在温育后,孔冲洗4次并与生物素化检测Ab温育1h。对于酶反应,顺序地进行施加亲和素过氧化酶和TMB微孔过氧化酶底物 (KPL, Gaithersburg, Maryland)。

[0175] 体内生物荧光成像

[0176] 所有的成像工作都是在宾夕法尼亚大学放射学系的小动物成像设施 (SAIF) 中进行。在注射荧光素酶表达质粒后,在5h、24h、5天、22天、34天、51天和1年获得图像。在成像时,小鼠用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉。D-虫荧光素 (Biotium, Hayward, CA) 溶于盐水中并在成像之前经由腹膜内注射进行递送。然后将小鼠放置在成像室中,成像室中的温度维持在33℃。使用Xenogen体内成像系统 (IVIS; Xenogen Corp, Alameda, CA) 获取生物荧光图像。成像参

数是8或10cm的视野、4分钟的曝光时间、16二进制的数字和1的f1/停止。对于显示,荧光图像(伪彩色)被覆盖在摄影图像上,其划定解剖标志。

[0177] 血脑屏障(BBB)渗透性的测量

[0178] 除了一些修改,基本上如描述的(Prasad R,Giri S,Nath N,Singh I,Singh AK: 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of endothelial-monocyte interaction,J Neurosci Res 2006,84:614-625)评估BBB渗透性。简单地说,在MOG激发后6和13天,将4%伊文思蓝染料(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)注射入C57BL/6小鼠的尾静脉中。1小时后,麻醉动物并且用盐水灌注心脏以去除血管内染料。在安乐死后,收集脊髓、小脑/脑干和大脑。对于定量测量,脊髓在1ml PBS中均质化。样品在15,800g离心30min一次。然后收集600μl等分试样的上清液并加至600ul的100%TCA(Sigma Aldrich St.Louis,MO)。这种溶液温育过夜,在15,800g下离心30分钟。在上清液中的伊文思蓝外渗物进行分光光度计定量(激发630nm和发射680nm)。

[0179] 脊髓浸润细胞的制备和分析

[0180] 如先前描述制备脊髓的单细胞悬浮液。Hilliard B,Samoilova EB,Liu TS,Rostami A,Chen Y:Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice:roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells,J Immunol 1999,163:2937-2943。简单地说,杀死小鼠并移出脊髓,放置在冰冷的包含27%Percoll的RPMI培养基中,并受压通过70-μm Falcon细胞滤器。用另外的27%Percoll使得到的细胞悬浮液的体积为50ml,混合,并在300×g离心15分钟。小球(沉淀)被保持在冰上,而髓鞘层和上清液转移至新的50-ml试管,通过摇动进行均质化,并再次以300×g离心15分钟。细胞小球然后合并,并在4℃以RPMI培养液洗涤三次。对于流式细胞仪分析,回收细胞的单细胞悬浮液与以下Ab一起温育45分钟:FITC-抗-小鼠-IFN γ、PE-抗-小鼠IL-10、APC-抗-小鼠IL-17、APC-Alexa flour 750-抗-小鼠CD4、Percp-cy5.5-抗-小鼠CD8和PE-cy7-抗-小鼠CD69,所有都购自eBioscience。

[0181] 嵌合Fn14-TRAIL蛋白的分子建模

[0182] 使用TRAIL的晶体结构(pdb码:IDOG)(Hymowitz SG,Christinger HW,Fuh G,Ultsch M,O'Connell M,Kelley RF,Ashkenazi A,de Vos AM:Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5,Mol Cell 1999,4:563-571)和模建的Fn14分子,生成Fn14-TRAIL蛋白的三维模型。Fn14的配体结合结构域(LBD)的三维模型使用MODELLER生成。Marti-Renom MA,Stuart AC,Fiser A,Sanchez R,MeIo F,Sali A:Comparative protein structure modeling of genes and genomes,Annu Rev Biophys Biomol Struct 2000,29:291-325。简单地说,基于人TACI(1XU1)和BCMA(1XU2)的模板结构获得Fn14的LBD的起始模型。Hymowitz SG,Patel DR,Wallweber HJ,Runyon S,Yan M,Yin J,Shriver SK,Gordon NC,Pan B,Skelton NJ,Kelley RF,Starovasnik MA:Structures of APRIL-receptor complexes:like BCMA,TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding,J Biol Chem 2005,280:7218-7227。Fn14的延伸区域作为Fn14和TRAIL之间的连接体进行处理。为了获得立体化学和能量有利的模型,连接体构象通过使用InsightII

(Accelrys, Inc. San Diego, CA) 的短分子模拟研究 (short molecular simulation study) 进行优化, 如以前描述。Swaminathan P, Hariharan M, Murali R, Singh CU: Molecular structure, conformational analysis, and structure-activity studies of Dendrotoxin and its homologues using molecular mechanics and molecular dynamics techniques, *J Med Chem* 1996, 39: 2141-2155。

[0183] 流式细胞计量分析和MTT测定

[0184] 在4℃, 用悬浮在包含0.5% BSA和0.05%叠氮钠 (NaN₃) 的PBS中的特异Ab进行免疫染色。所有流式细胞仪分析都是在FACS Calibur装置上用Cell Quest软件和双激光 (488和633nm) 激发 (BD Biosciences) 进行。MTT测定根据制造商的方案进行 (ATCC, Manassas, VA)。

[0185] 统计分析

[0186] 学生t检验或Mann-Whitney U检验用于确定差异的统计学显著性。<0.05的p值被认为是统计学显著性。

[0187] 结果

[0188] 功能Fn14-TRAIL蛋白质的产生

[0189] 使用pMFneo真核表达系统, 产生重组的Fn14-TRAIL和相关的对照蛋白质 (可溶性Fn14、Fn14-IgG1 (mut)、可溶性TRAIL)。嵌合Fn14-TRAIL编码序列连接Fn14 I型和TRAIL II型膜蛋白的全部胞外域, 由此产生杂交的可溶性I型、II型融合蛋白。为了生成Fn14-IgG1 (mut) 编码序列, 在人IgG1组分内的数个氨基酸进行突变 (参见材料和方法), 以阻断Fc γ R结合 (和随后的淋巴细胞的非特异性耗尽) 并干扰N-糖基化 (其对于人IgG1的体内效应器功能是重要的)。Isaacs JD, Greenwood J, Waldmann H: Therapy with monoclonal antibodies. II. The contribution of Fc gamma receptor binding and the influence of C(H)1 and C(H)3 domains on in vivo effector function, *J Immunol* 1998, 161: 3862-3869。各种pMFneo-基的表达构建物被瞬时转染入293细胞中, 通过条件培养基的蛋白质印迹分析证明各自的蛋白质的表达和分泌 (图1A)。

[0190] 为了确证表达的Fn14-TRAIL的同源性, 评估了其结合Fn14的配体TWEAK的能力。为了这个目的, 用鼠TWEAK cDNA表达构建物 (在pcDNA3载体中) 瞬时转染CHO细胞, 在48h后, 使转染体在4℃与纯化的Fn14-TRAIL或可溶性TRAIL一起温育。使用抗-小鼠TWEAK和抗-小鼠TRAIL作为检测Ab, 这些细胞的免疫荧光和流式细胞仪分析显示Fn14-TRAIL而不是可溶性TRAIL显著结合到转染体上的细胞表面TWEAK (图1B)。

[0191] 使用MTT测定, 通过评估其诱导L929细胞凋亡的能力确定Fn14-TRAIL的TRAIL组分的功能。如在图1C中示出的, Fn14-TRAIL在放线菌素D存在下以剂量依赖方式诱导L929细胞的凋亡。在此实验中, 重组TRAIL (Super Killer TRAIL™) 被用作阳性对照。需要说明的是, 通过对这些L929细胞的免疫荧光和流式细胞仪没有检测到TWEAK (没有示出), 反驳了Fn14-TRAIL的Fn14组分通过一些类型的回信号 (back-signaling)、通过表面TWEAK引发细胞凋亡的可能性。

[0192] 用于Fn14-TRAIL的持续体内表达的转座子基表达系统的开发

[0193] 为了使Fn14-TRAIL (和对照蛋白质) 能够持续在体内表达, 使用转座子基 ‘睡美人 (SB)’ 表达系统。这个系统结合质粒介导的基因递送的优点和整合进入染色体的能力并且提供持续的转基因表达。为了优化这个表达系统的效率, 生成衍生的表达载体, 命名为

pSBC21,其在单个质粒内合并转座子(容纳感兴趣的转基因)和转座酶表达盒(图2A)。由于两个盒的相对表达水平是重要的,所以筛选了多个启动子组合,并且确定以串联排列的UBC启动子(驱动转座酶)和EF1 α 启动子(驱动转座子盒)的组合提供强的转基因表达(没有示出)。

[0194] 使用荧光素酶报道分子,验证这种独特的双盒转座子/转座酶载体衍生物(具有UBC/EF1 α 启动子组合)的功能。不同浓度的pLuciferase-SBC21质粒通过流体注射施用到C57BL/6小鼠。转座子基表达构建物的流体注射提供在小鼠体内肝细胞中的持续基因表达。Liu F,Song Y,Liu D:Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA,Gene Ther 1999,6:1258-1266。在施用荧光素酶的底物D-虫荧光素后获得的生物荧光图像揭示在22天荧光素酶表达(图2B),在六个月后仍然检测到显著的水平(没有示出)。

[0195] 使用荧光素酶报道分子已经证明衍生的表达载体的功能,使用这种载体用于表达Fn14-TRAIL,具体地说,询问血清中的Fn14-TRAIL的水平是否与注射的pFn14-TRAIL SBC21质粒的剂量相关。C57BL/6小鼠(在四只的试验组中)每只用pFn14-TRAIL SBC21质粒的单一流体注射、以增加的剂量(5、10或20 μ g的质粒)进行处理。在质粒施加20天后,Fn14-TRAIL的血清水平通过ELISA进行测量,观察到血清中始于10 μ g质粒剂量(图2C)的Fn14-TRAIL水平的剂量依赖性增加。

[0196] Fn14-TRAIL抑制MOG-诱导的自身免疫脑脊髓炎

[0197] 接着研究了Fn14-TRAIL在鼠EAE疾病模型中的治疗潜力。为此,单剂量的致脑炎MOG38-50肽施用给C57BL/6小鼠。在肽注射后两天,通过流体注射施用单剂量的pFn14-TRAIL SBC21质粒(50 μ g/小鼠)、或四种对照质粒(pFn14 SBC21、pFn14-IgG1(mut) SBC21、pTRAIL SBC21和pSBC21)中的一种。通过ELISA,检测用每种各自的质粒(图3A)流体注射的动物中的表达蛋白质的可比较的血清水平。在治疗小鼠中的疾病进程通过身体检查和对回收脊髓的组织学分析进行监测。Fn14-TRAIL表达显著地减弱EAE表现,减少了平均临床评分(在MOG施用后的43-天期间内计算;图3B,上图)和累计平均临床评分(在MOG施用后的40-天期间内计算;表1和图3C)的。与各个对照相比,平均最大疾病分数在Fn14-TRAIL-治疗组中也显著较低(表1)。类似地,在第35天的疾病评分对于Fn14-TRAIL组也是显著较低的(表1;图3D)。

[0198] 从疾病发作和疾病发生率的日期(day)的分析来看,Fn14-TRAIL的治疗益处也是明显的。与用空载体处理的对照小鼠相比(12.8 ± 4 天),Fn14-TRAIL延长了疾病发作的平均日(day)(14.8 ± 4.7 天),并且典型地后面的小鼠发展EAE始于MOG肽施用后大约10天(表1)。接受pFn14SBC21、pFn14-IgG1(mut) SBC21、pTRAIL pSBC21质粒的小鼠的疾病发作的平均日分别是 13.63 ± 2.72 、 11.66 ± 1.2 和 13.42 ± 2.2 天。虽然所有的表达蛋白在一定程度上减少疾病发生率,但是只有50%的Fn14-TRAIL-处理动物在此试验期间显示疾病的体征(图3B,下图)。

[0199] Fn14-TRAIL比其组合的组成部分更有效

[0200] 已经显示当作为可溶性药剂一次一种(one at a time)施用时,Fn14-TRAIL的两个组分都不与Fn14-TRAIL一样在抑制EAE中有效,使用同样的EAE模型,评估了Fn14-TRAIL融合蛋白的治疗效力是否可以通过同时施用可溶性Fn14和TRAIL蛋白重演的问题。在向

C57BL/6小鼠施用单一的MOG38-50肽致脑炎激发后两天,单剂量的pFn14-TRAIL SBC21质粒(25 μ g/小鼠)或pFn14SBC21和pTRAIL SBC21质粒(25 μ g每一种/小鼠)的混物流体注入动物中。虽然Fn14-TRAIL如之前显著地抑制EAE,减少平均临床评分(图4A和4B)和累计平均临床评分(图4C),但是可溶性Fn14和可溶性TRAIL的组合没有显示显著的治疗效果。这些不同蛋白质——其由流体注射各个转座子基的表达质粒表达——的血清水平是可比较的,如通过ELISA测量的(图4D)。一并考虑,这些数据证实Fn14-TRAIL在阻止EAE诱导中具有重要的治疗益处,并且这种作用不能通过简单地施用这种融合蛋白的两个组成要素如组合的可溶性药剂来重复。

[0201] Fn14-TRAIL阻断自反应T细胞的增殖和分化

[0202] 评估了Fn14-TRAIL对从处理动物回收的髓鞘特异的T细胞的增殖和分化的作用。为此,在Fn14-TRAIL-处理和只接受载体的对照小鼠的MOG激发后43天,回收脾细胞。在体外评估这些脾细胞应答MOG₃₈₋₅₀肽的增殖和细胞因子产生。对照动物脾细胞应答MOG肽而强烈地增殖(图4E)并且产生显著量的Th1(IL-2和IFN- γ)、Th2(IL-10、IL-4和IL-6)和Th 17(IL-17)细胞因子(图5)。相反地,Fn14-TRAIL-处理动物的脾细胞应答MOG刺激而增殖的程度较小(图4E)并且产生的这些各种细胞因子显著较少(图5)。一起考虑,这些结果表明T细胞增殖和一系列T细胞细胞因子的表达被用Fn14-TRAIL体内处理所减弱。

[0203] Fn14-TRAIL减小炎症细胞进入CNS的浸润

[0204] EAE的关键病理特征是炎症细胞浸润进入CNS。评估了Fn14-TRAIL对这种浸润过程的作用。为此,对MOG激发后7和14天的Fn14-TRAIL-处理EAE小鼠和载体处理EAE小鼠脊髓中炎症细胞的绝对数量,连同早期活化CD4⁺和CD8⁺细胞和IFN γ -、IL-17-和IL-10-表达细胞的百分比进行了比较。在第7天,在Fn14-TRAIL-处理组中,所有这些参数都显著地减少(图6A-D)。在第14天(疾病的峰),仍然显示细胞因子表达的细胞的绝对数量为Fn14-TRAIL-相关的减少(图6E-F)。

[0205] 从脊髓回收的炎症细胞的这些发现与MOG激活后43回收的脊髓组织的组织病理学检查一致。而只用载体处理的对照一律显示它们脊髓内具有多种炎症病灶,Fn14-TRAIL-处理小鼠显示在它们脊髓中的炎症细胞浸润显著地减少(图7A-B)。

[0206] Fn14-TRAIL减小血脑屏障渗透性

[0207] 已知TWEAK通过诱导MMP-9(金属蛋白酶-9)表达来增加神经血管膜单元的渗透性。Polavarapu R,Gongora MC,Winkles JA,Yepes M:Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis increases the permeability of the neurovascular unit through nuclear factor-kappa B pathway activation,J Neurosci 2005,25:10094-10100。在Fn14-TRAIL-处理小鼠中见到的炎症细胞浸润入CNS中的减少可能至少部分地是TWEAK依赖的血脑屏障(BBB)渗透性增强的减少的结果。BBB完整性通过常规方法进行评估,根据该常规方法,监测了静脉内引入伊文思蓝染料的CNS渗透。Prasad R,Giri S,Nath N,Singh I,Singh AK:5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of endothelial-monocyte interaction,J Neurosci Res 2006,84:614-625。在疾病的峰之前(在MOG施用后6天)或疾病的峰期间(在MOG施用后的13天)测量EAE小鼠CNS中的伊文思蓝。对各个切开的CNS结构匀浆中的染料进行定量。而在任一时间点上,在只有对照载体动

物的脑和Fn14-TRAIL-处理动物的脑之间的可检测染料没有显著差异(图8A和8B),在第6(图8A)和13(图8B)天,只有载体处理动物的其它CNS结构中(脊髓/小脑/脑干)检测到显著更多的染料。

[0208] 渗透进入脊髓的染料的浓度与在染料施加日的各自的EAE平均临床评分相关。显著地,即使对于在13天具有相同的EAE临床评分(0或1)的小鼠,与Fn14-TRAIL-处理小鼠相比,只用载体处理的对照小鼠显示它们脊髓中具有较高的染料浓度(图8C)。这个发现——结合Fn14-TRAIL-处理的脊髓中的减少的炎症细胞浸润的发现——提供了Fn14-TRAIL通过抑制伴随脑脊髓炎的BBB渗透性的逐步增加来减少炎症细胞穿过内皮BBB的浸润的证据。

[0209] 嵌合Fn14-TRAIL蛋白的分子模型

[0210] 评估了Fn14-TRAIL的显著治疗疗效是否可能至少部分地来源于其中它结合(engage)和桥连TWEAK配体和TRAIL受体(DR5)分子的方式的问题。为此,建模作为单体(图9A)和作为三聚体(图9B-C)的Fn14-TRAIL蛋白。三聚体Fn14-TRAIL在其相对的末端分别与TWEAK和DR5的推定相互作用也进行可视化(图9D)。显著地,建模的TWEAK:Fn14-TRAIL:DR5复合体显示:(1)当通过嵌合的、天然三聚TRAIL组分使其进入人工的“三聚”结构时,Fn14的TWEAK-结合结构域有利地定位以与它们在三聚TWEAK内的关联伴侣相互作用;(2)三聚TRAIL的DR5-结合结构域有利地定位以与它们在三聚DR5内的关联伴侣相互作用;和(3)融合蛋白内Fn14组分的羧基-末端充当替代‘连接体’,其足够刚性以使Fn14和TRAIL结构域保持分开,没有压扁的倾向。令人感兴趣地是,Fn14和TRAIL的配体结合结构域分开约60Å,这产生了这样的可能性:这种融合蛋白可能像相互作用的细胞之间的间隔区一样作用并且限制局部的细胞与细胞接触。一并考虑,建模分析证实Fn14-TRAIL嵌合体实际上可以同时结合相对细胞上的TWEAK和DR5。而且,加强的Fn14‘新三聚体’表现为允许结合到天然TWEAK三聚体的结构,这可能生成特别稳定的更高等级结构。

[0211] 表1EAE的临床特征。

[0212]

治疗组	发作日(平均值 ±SD)*	最大临床评分 (平均值±SD)	在第35天评分 (平均值±SD)	累计评分(平 均值±SD)**
载体(n=8)	12.80±4.18	2.44±0.359	1.933±0.29	48.00±9.78
Fn14(n=8)	13.62±2.72	2.22±0.383	1.750±0.54	44.0±12.52
Fn14-TRAIL(n=9)	14.80±4.7	1.22±0.465	0.611±0.261	18.60±7.45
Fn14-IgG(mut)(n=9)	11.66±1.2	2.80±0.286	1.944±0.306	60.05±7.44
TRAIL(n=8)	13.42±2.2	1.81±0.472	1.438±0.448	42.06±11.08

[0213] *发作日是在免疫作用后当小鼠显示EAE的体征(只有生成EAE的小鼠被包括)时的第一天。**累计评分是每只小鼠的临床评分的总和。

[0214] 人Fn14-TRAIL蛋白的产生和纯化

[0215] 克隆构建

[0216] 用于产生人Fn14-TRAIL的表达盒由人尿激酶信号肽的编码序列、接着人Fn14-TRAIL的编码序列组成。编码序列是密码子优化的,用于在中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary)(CHO)细胞系中增强表达。合成DNA编码序列并且然后亚克隆入哺乳动物表达载体,所述表达载体被设计用于染色体整合并被优化用于在CHO细胞中高水平表达。

[0217] Fn14-TRAIL表达载体转染进入CHO-S细胞中,并且分离克隆库用于初始表达分析。

在这个克隆库之外,单个高产克隆被分离,并且通过各种方法诸如ELISA、SDS-PAGE和蛋白印迹分析Fn14-TRAIL蛋白的表达(参见图10)。生产水平被最优化以达到每升发酵培养基大约100mg Fn14-TRAIL的表达。

[0218] 对于生长在各种培养基配方中的Fn14-TRAIL克隆获得的摇瓶培养物培养基样品进行蛋白印迹分析(在不同泳道中示出)。使用商业的抗-人TRAIL/TNFSF10Ab作为初级检测抗体探测蛋白印迹。Fn14-TRAIL的计算分子量是24.6kD。

[0219] 发展了高收率、多步骤色谱纯化方法,其包括有效的捕获步骤、阴离子交换色谱步骤以及然后最后的缓冲液交换步骤,后者携带产物进入制剂缓冲液中。这种纯化方法允许高度纯化的Fn14-TRAIL蛋白的分离。取自纯化最后阶段样品的蛋白质印迹分析(对应于图11,最右边泳道)显示纯化的蛋白质主要是单体和部分的同型二聚体(没有示出)。在SDE-PAGE凝胶上看见的小量降解产物没有被Fn14-特异的Ab检测到,但是被TRAIL-特异的Ab检测到。

[0220] 在上述纯化过程之后,7升生产发酵物产生大约300mg纯化的Fn14-TRAIL,其用于一系列的以下显示的体外和体内试验。

[0221] EAE试验,用人Fn14-Trail——试验步骤

[0222] 通过将125 μ g在包含5mg/ml热灭活结核分枝杆菌的完全弗氏佐剂中乳化的髓鞘少突胶质细胞糖蛋白35-55(MOG 35-55)肽(通过Sigma Laboratories合成,以色列)皮下注入左腰旁的区域,在8-周龄雌性C57BL/6小鼠中,诱导EAE。紧随其后,并且再次,在48小时,用300ng的百日咳毒素接种小鼠。7天以后,另外的CFA中的MOG 35-55肽的注射剂被递送进入右腰旁的区域。从0天至第8天,以两个相等的剂量(每组中n=4),小鼠一天皮下注射50、100或200微克的Fn14-Trail或载体。在第9天,小鼠进行最后一次处理和在一小时后被处死。收获脾并称重。从用或不用Fn14-TRAIL处理的9天前接种CFA中MOG₃₅₋₅₅肽的小鼠的腹股沟、腋窝、肠系膜淋巴结或者脾制备汇集的淋巴结细胞(LNCs)。在96孔平板板的三个重复孔中测定淋巴细胞的先体外后体内应答。将悬浮于0.2ml补充有1%青霉素链霉素、1%谷氨酰胺和5%胎牛血清(FCS)以及 β -巯基乙醇的RPMI中、总计为 2×10^5 个细胞加入每个孔。在48小时后,将1 μ Ci³(H) 胸苷(Amersham,UK)加入每个孔并且将板温育另外18小时。然后用半自动收获机将板收集到玻璃纤维过滤器上,并且通过液体闪烁测定放射性。结果表述为根据以下等式的刺激指数(SI):SI=刺激细胞的平均cpm/未刺激细胞的平均cpm。

[0223] 使用Ficoll-Hipaque梯度,在第9天从用Fn14-Trail处理的MOG-免疫小鼠(每组中n=4个动物)中分离汇集的脾淋巴细胞。回收细胞用亚甲蓝染色并且计数。示出了每组中每个脾的淋巴细胞的平均数量。

[0224] 两个重复试验的数据(图12A和12B)显示在50 μ g至200 μ g的范围内,脾细胞数量的减少为显著的剂量依赖性的。

[0225] 从Fn14-Trail处理MOG-免疫小鼠(每组中n=4)的第9天回收的淋巴结中分离汇集的淋巴细胞用MOG肽刺激72小时。培养物在温育结束之前18小时用[³H]-胸苷进行脉冲。增殖通过[³H]胸苷掺入估计并表示为刺激指数(刺激细胞的平均cpm/未刺激细胞的平均cpm; SI>2表示显著的刺激)。

[0226] 数据(图13中显示)显示对于MOG肽再激发的回忆应答的显著的Fn14-Trail-介导的抑制,其中用100 μ g/天/小鼠处理的小鼠获得最大作用。

[0227] EAE通过MOG激发进行诱导,如以上描述。在MOG施用后第10天,以两个分开的剂量,对小鼠(每组10只)用载体或者用Fn14-Trail以25、50和100 μ g/天进行处理。接着每天评估小鼠的临床疾病评分。小鼠的临床状况分级如下:0,没有疾病体征;1,尾巴无力;2,后肢无力,足以损害右侧;3,后肢麻痹(轻瘫, paresis);4,截瘫与前肢瘫痪;5,四肢麻痹;6,死亡。处理在疾病诱导后第26天停止(Fn14-Trail处理的16天)。A:所有试验组的平均临床评分;B:对照组和100 μ g/d组的平均临床评分,在这种情况下显示S.D。

[0228] 数据(在图14A-14B中显示)显示Fn14-Trail在减少EAE疾病的进程中的显著治疗效果,其中具有清楚的阈值剂量效应。

[0229] 胶原诱导的关节炎,用Fn14-Trail——试验步骤

[0230] 在尾巴底部,经由皮内注射,用200 μ g的II型胶原激发DBA1雄性小鼠两次(分开3周),所述胶原纯化自牛关节软骨并且在完全弗氏佐剂(CFA; Difco Labs)中乳化。每天观察并监测小鼠一个或多个肢中的肿胀和/或红斑。在疾病发作的当天,小鼠被随机分成对照组(只用载体处理)和治疗组(每天一剂量的100或200 μ g/小鼠/d的Fn14-Trail)。载体和Fn14-Trail都皮下施用。对于对照组和100 μ g组,每天给予注射持续14天,对于200 μ g组,持续7天。从疾病发作起,每天观察小鼠持续14天,然后每隔3天进行观察。使用测微计(microcaliper)测量所有4肢中的肿胀,并与健康、年龄匹配的小鼠进行比较。计算每肢中的肿胀的增值(delta),这些增值总结成评分(疾病指数)。

[0231] 数据(图15中示出)显示以200 μ g/天剂量的Fn14-Trail处理的治疗效果显著。需要特别说明的是,疾病指数的减少在Fn14-Trail处理停止后持续至少7天。

[0232] 人Fn14-TRAIL蛋白通过凋亡诱导癌细胞死亡

[0233] Fn14-TRAIL引发的针对癌细胞的细胞毒性是高效和特异的

[0234] 用数种人肿瘤细胞类型研究由纯化未标记的人Fn14-TRAIL蛋白介导的肿瘤细胞细胞毒性。人肝细胞瘤细胞系SK-Hep1——其已知是TWEAK-依赖的并表达TRAIL受体(DR5)——显示对于Fn14-TRAIL是高度敏感,对于该肿瘤细胞系的杀死作用非常高($EC_{50}=0.04$ nM)(图16A)。证明了对于两种另外肝肿瘤细胞系Huh 7和Hep-G 2的类似的效果(数据没有显示)。与对这些肝肿瘤系的作用相反,在完全相同浓度下的Fn14-TRAIL与非癌或非肝细胞系一起温育没有显示杀死作用。例如,Fn14-TRAIL对于缺乏表面TRAIL受体的人恶性B细胞系Raji没有显示杀死作用(图16B),在表达TRAIL受体DR5的非恶性人肝细胞系NKNT3(图16C)和人胎肝细胞系FH-B(图16D)上也没有显示杀死作用。这些结果证实Fn14-TRAIL有效和特异地杀死癌细胞。

[0235] 通过简单地递送其组合的组分部分不能实现Fn14-TRAIL的杀肿瘤(tumoricidal)活性

[0236] 将Fn14-TRAIL融合蛋白的杀肿瘤作用与以组合加入的其组分部分的作用进行比较。为此,在与纯化的Fn14-TRAIL、单独的TRAIL(sTRAIL)的可溶的胞外域、与IgG1的Fc结构域融合的可溶的Fn14(Fn14-Fc)、或者(Fn14-Fc+sTRAIL)的组合以类似摩尔浓度温育后,测量肝细胞瘤细胞系SK-Hep1的细胞活力。Fn14-Fc对于该癌细胞系没有显示杀肿瘤活性,而sTRAIL显示一些杀死作用。然而,即使Fn14-Fc和sTRAIL的组合也没有取得融合蛋白的杀肿瘤作用(图17)。

[0237] Fn14-TRAIL通过诱导凋亡杀死癌细胞

[0238] 为了在机理上探究Fn14-TRAIL的杀死作用,人的肝癌肿瘤细胞系SK-Hep1的细胞与增加浓度的纯化Fn14-TRAIL、单独的与IgG的Fc结构域融合的可溶的Fn14 (Fn14-Fc)、单独的TRAIL (sTRAIL) 的可溶的胞外域或者 (Fn14-Fc+sTRAIL) 的组合一起温育。在与各种蛋白质温育后,通过FACS分析处理的细胞以测定进行凋亡的细胞的百分比(图18),如通过膜联蛋白V/PI染色评估。这种分析表明Fn14-TRAIL的杀死作用是基于凋亡的。需要说明的是,单独可溶的TRAIL (sTRAIL) 显示促凋亡活性,但是只在最高的浓度,浓度为30ng/ml的融合蛋白对于单独的组分或组合的组分具有显著的优势。

[0239] 虽然为了说明的目的以上描述了本发明的具体实施方式,但是对于本领域技术人员明显的是可以对本发明的细节进行多种变化而不偏离本发明,如所附权利要求中定义的。

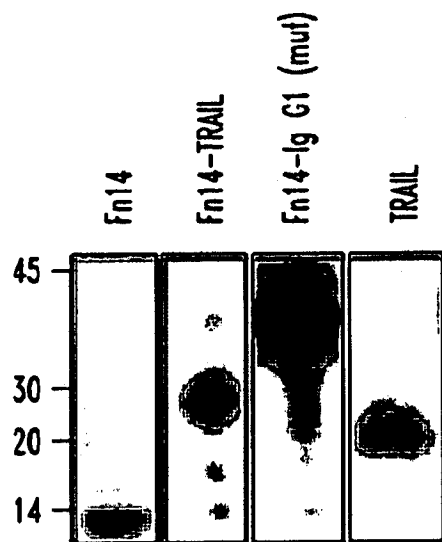


图1A

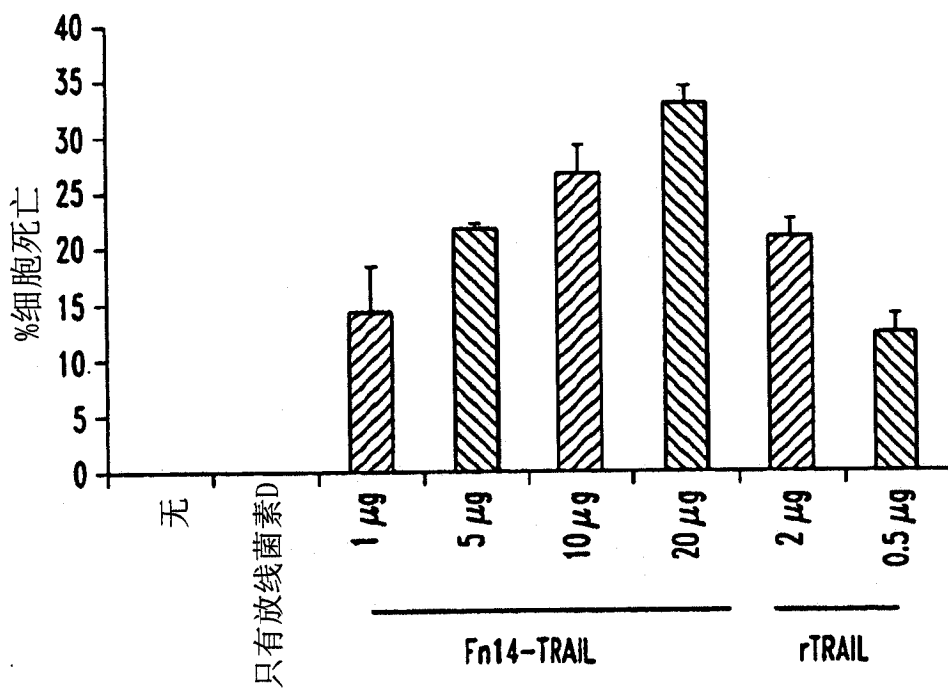


图1C

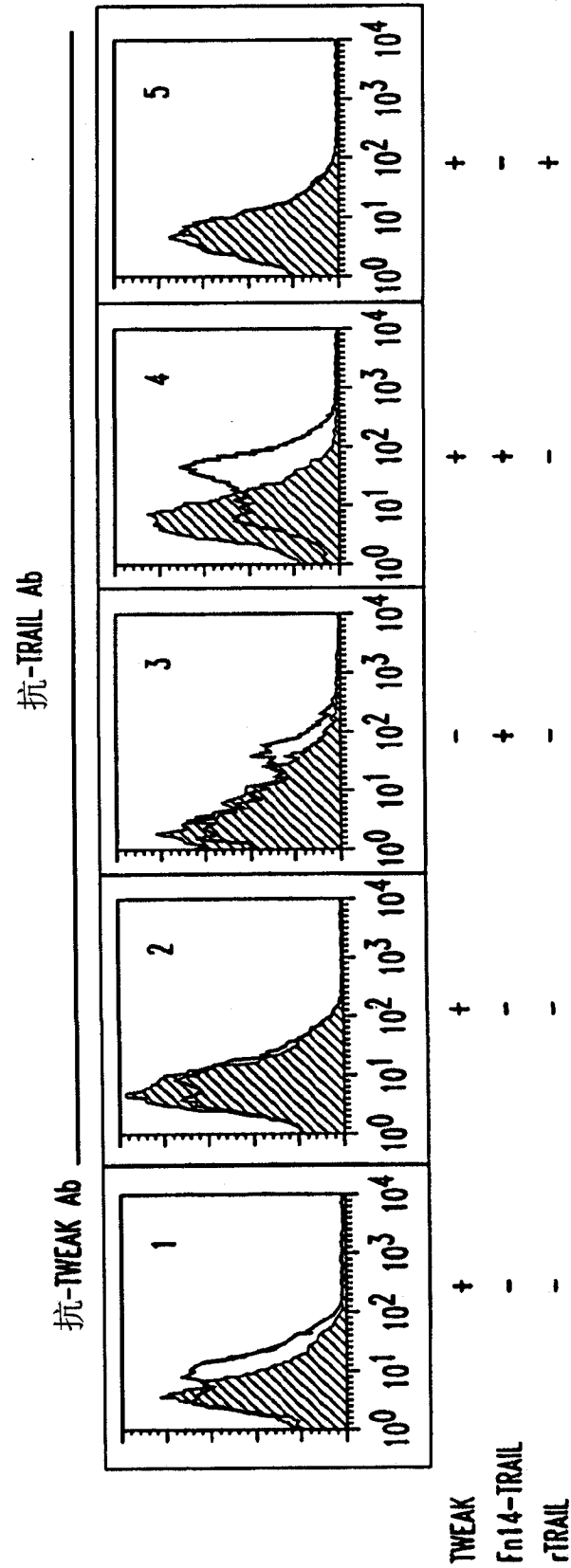


图1B

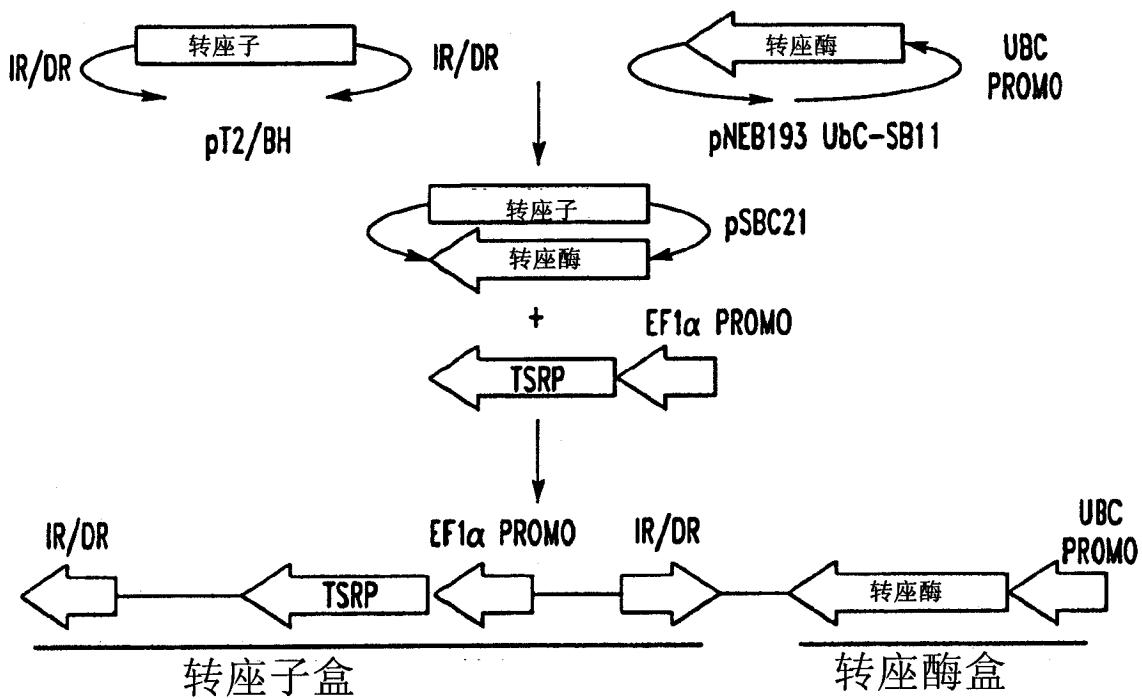


图2A

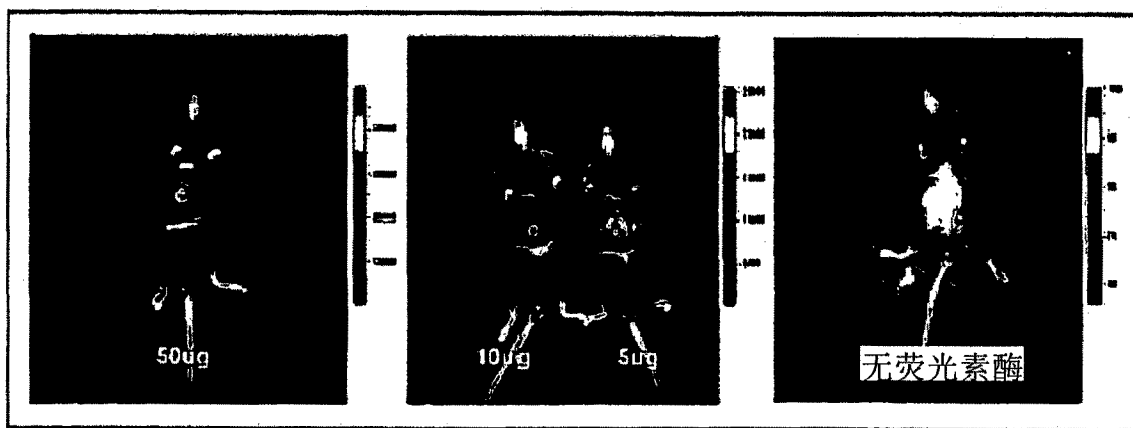


图2B

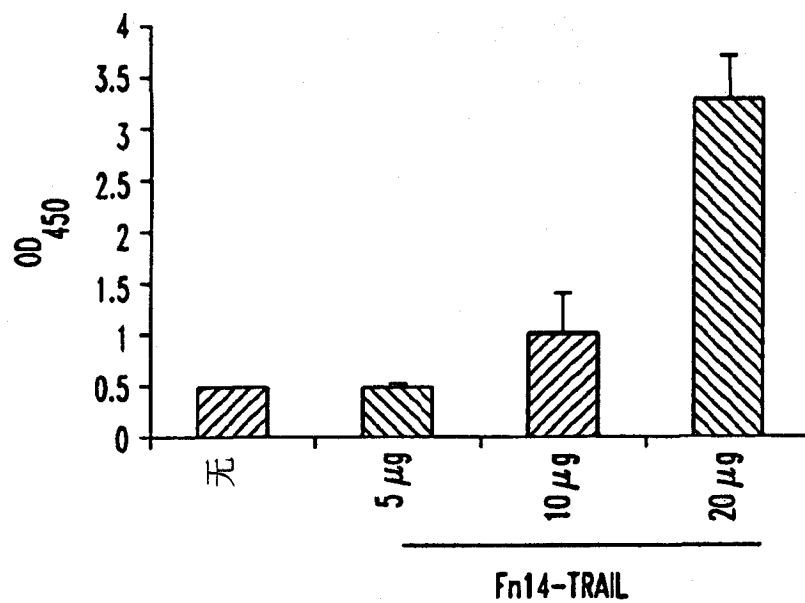


图2C

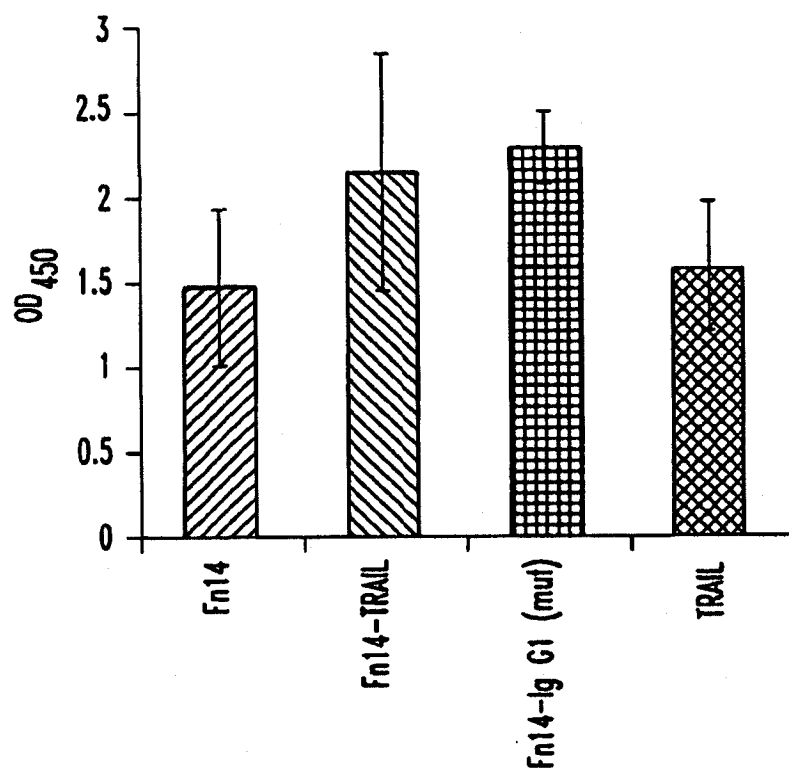


图3A

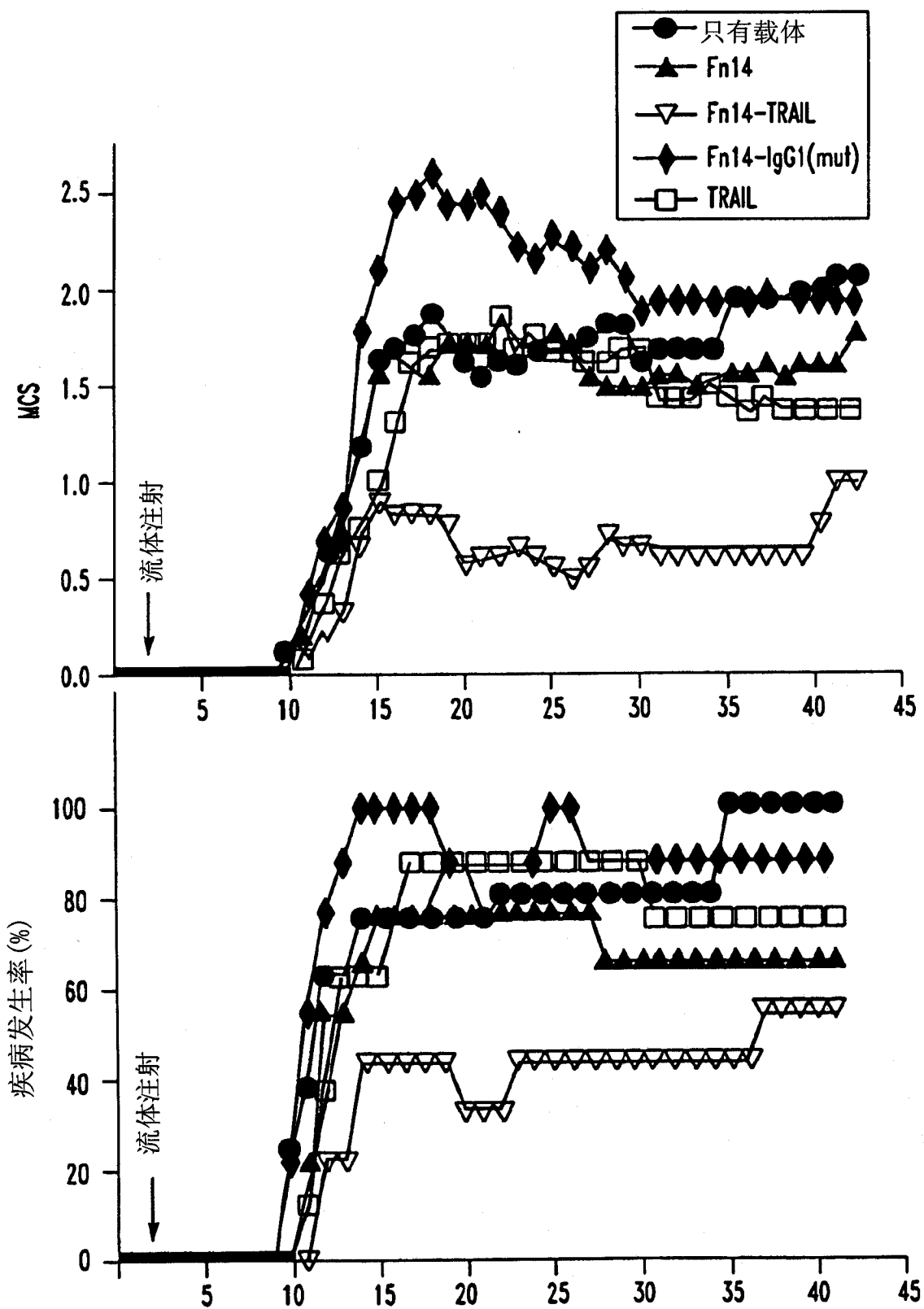


图3B

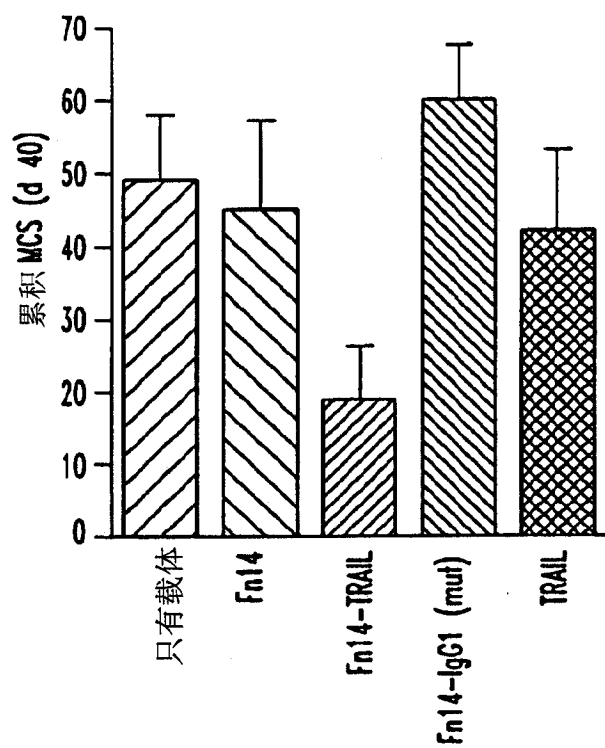


图3C

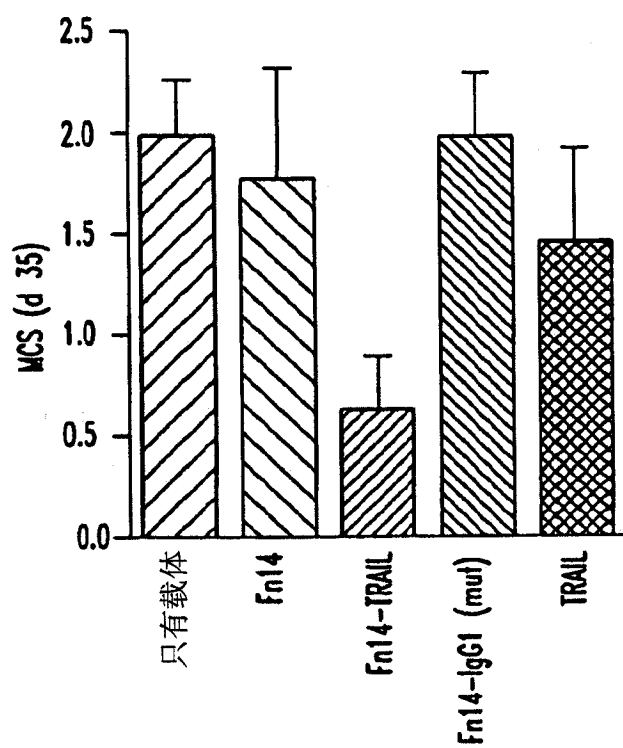


图3D

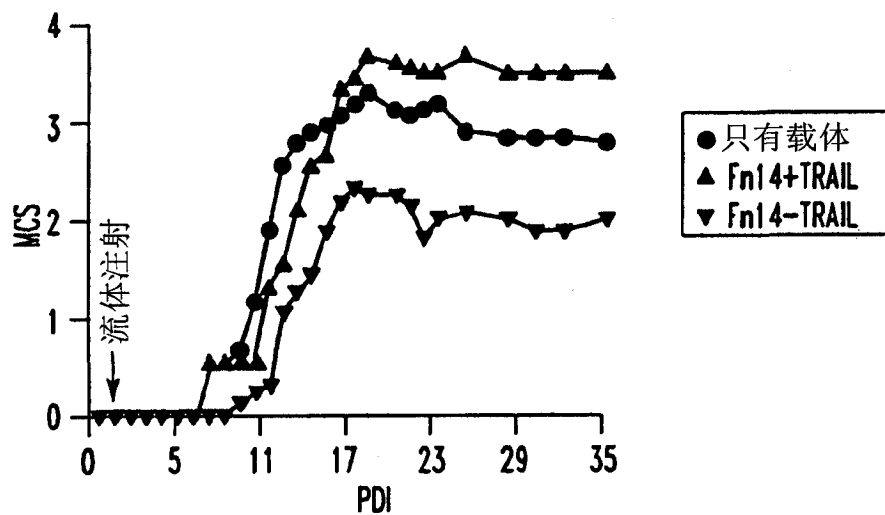


图4A

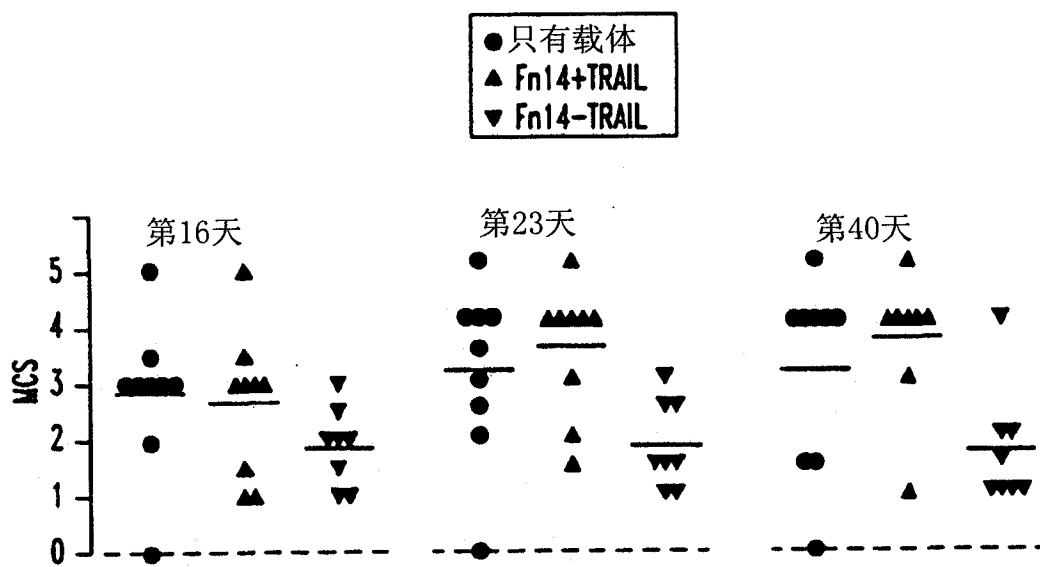


图4B

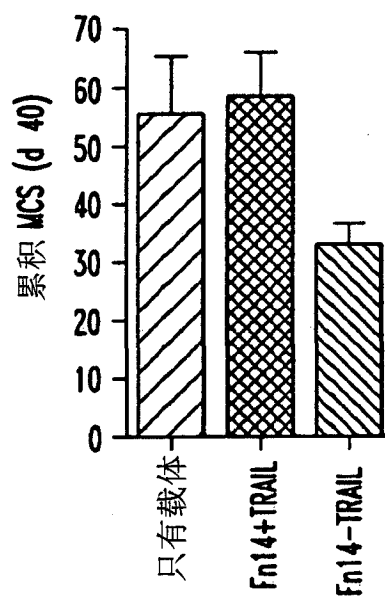


图4C

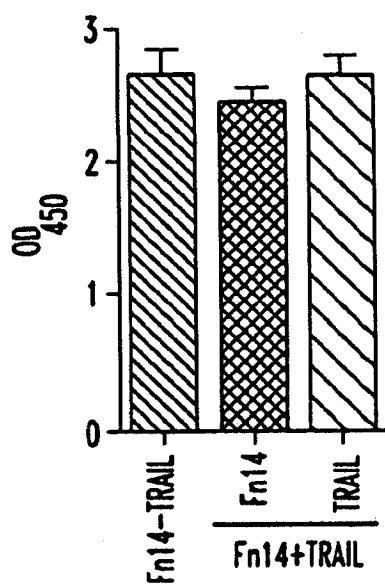


图4D

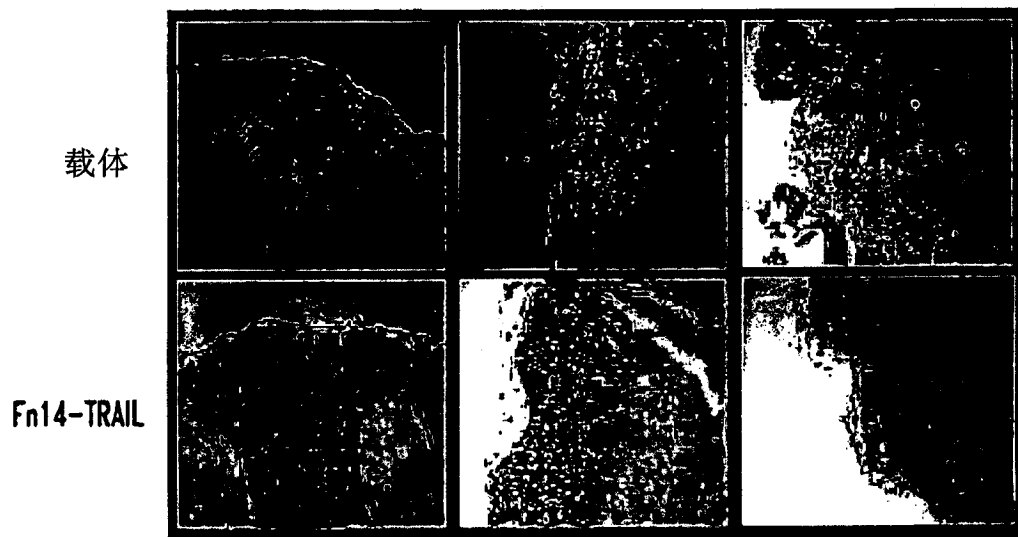


图5A

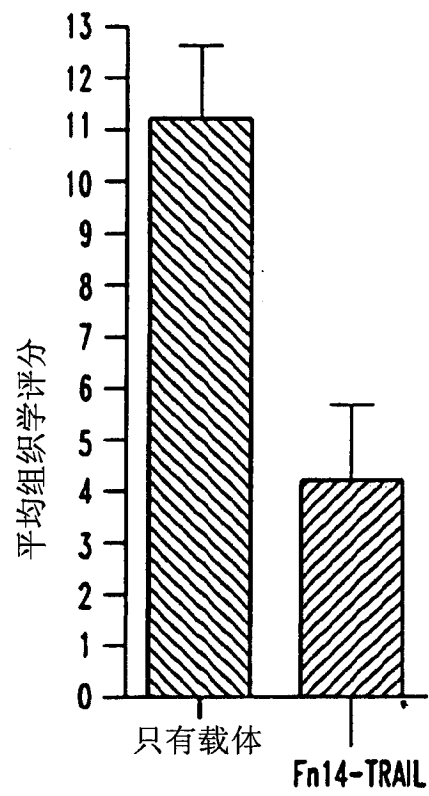


图5B

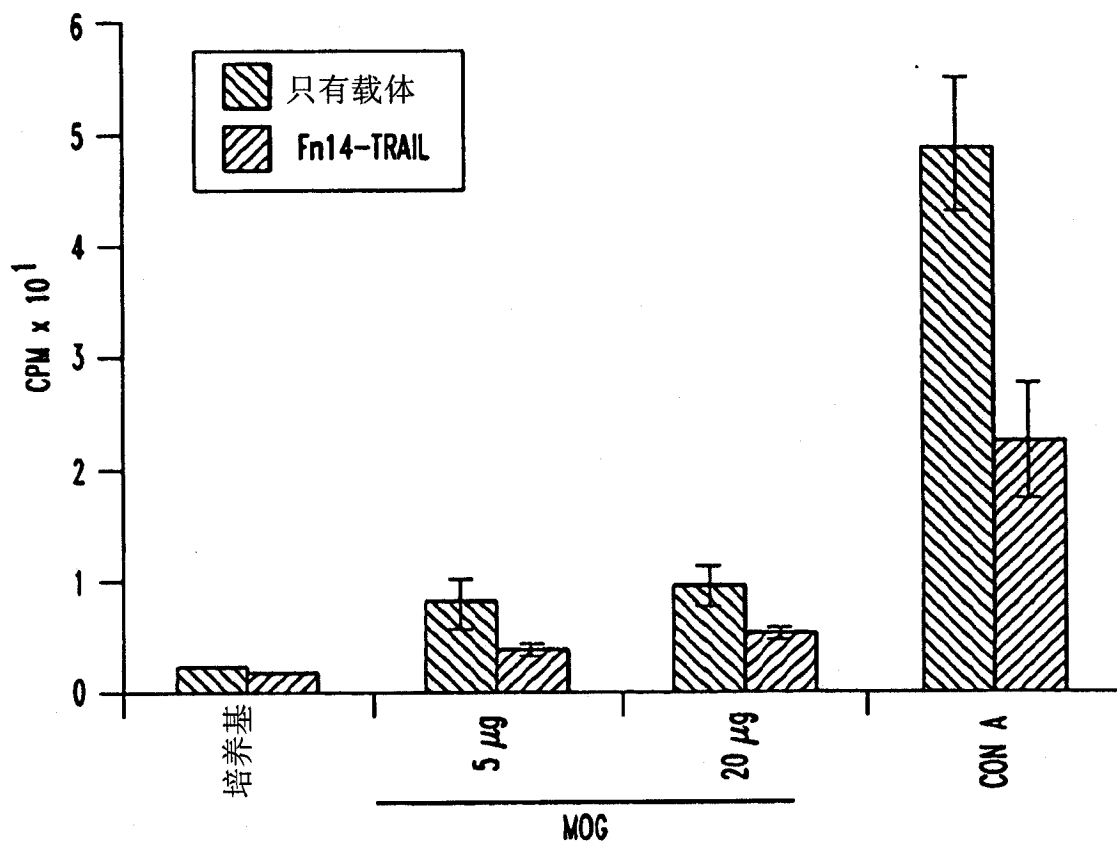


图5C

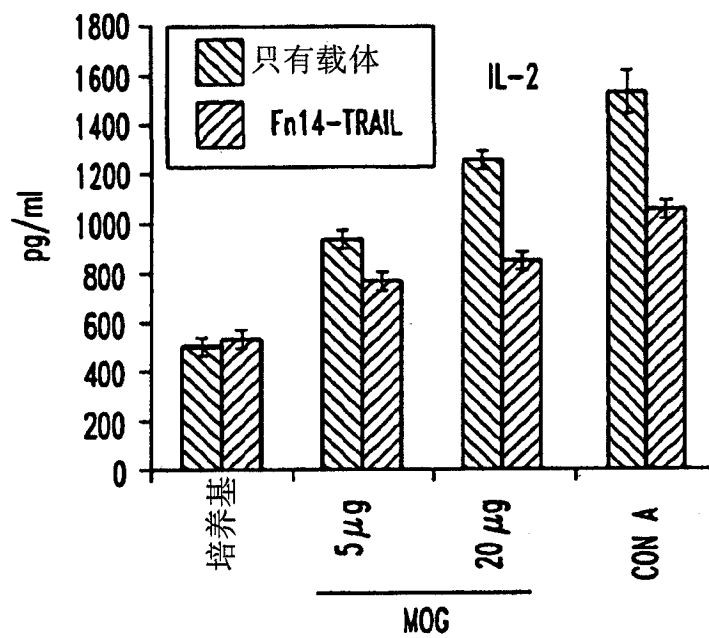


图6A

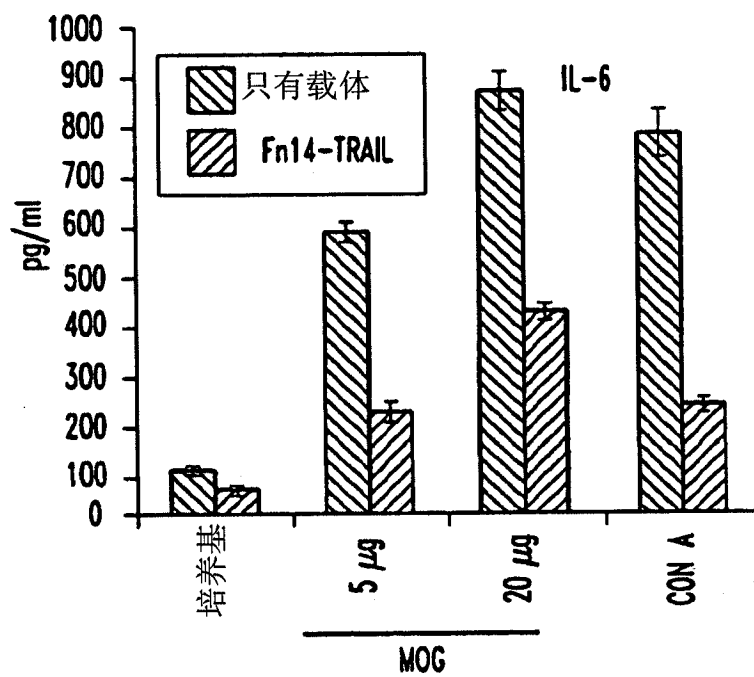


图6B

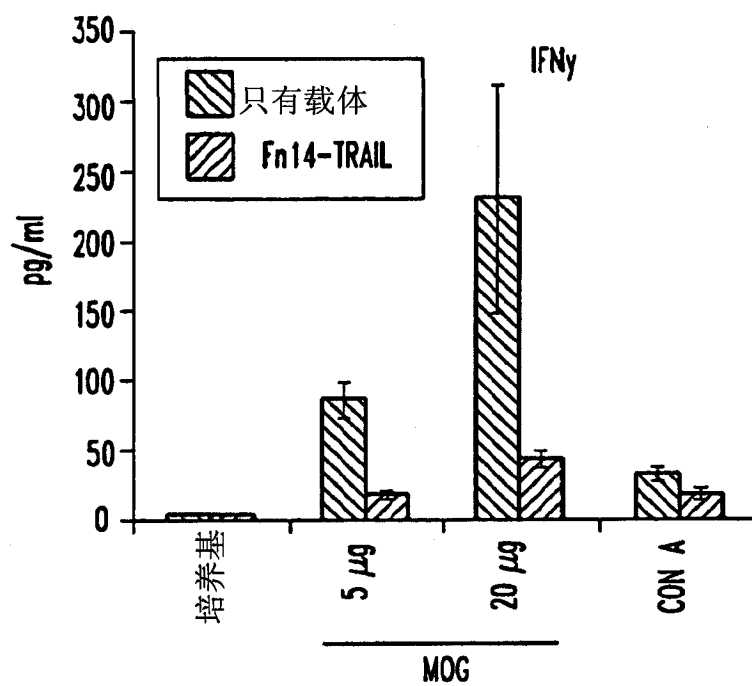


图6C

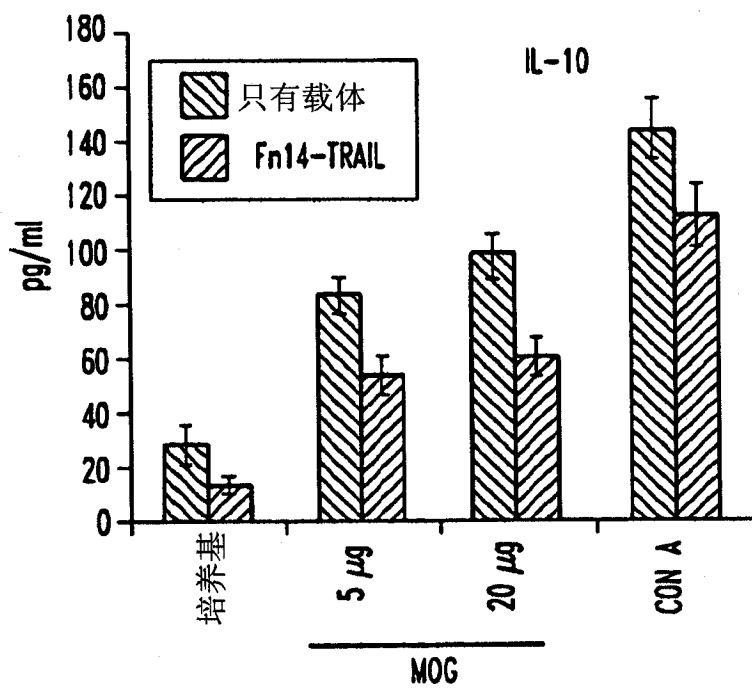


图6D

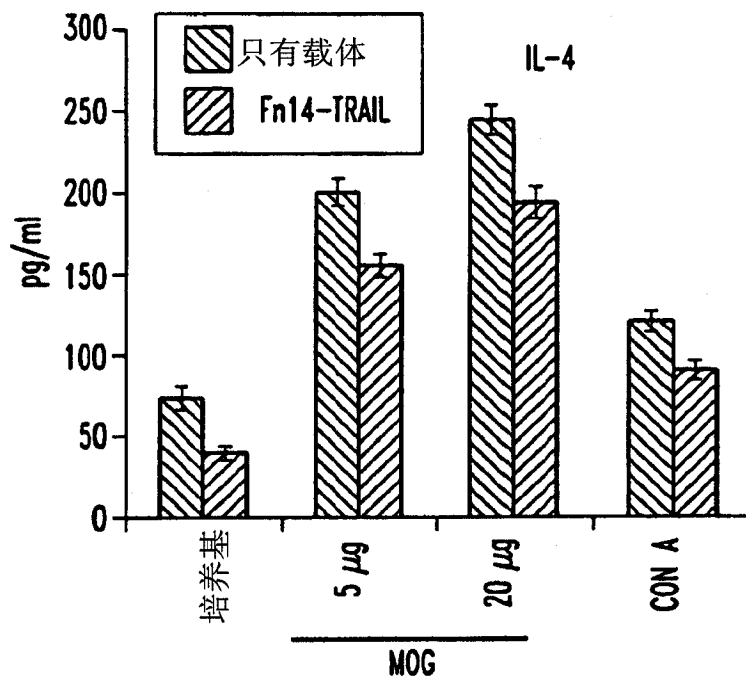


图6E

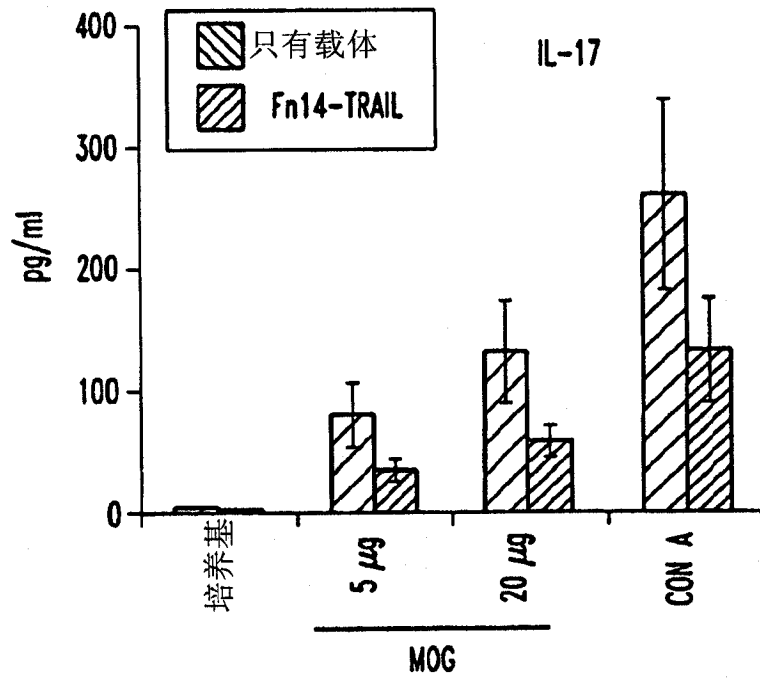


图6F



图7A

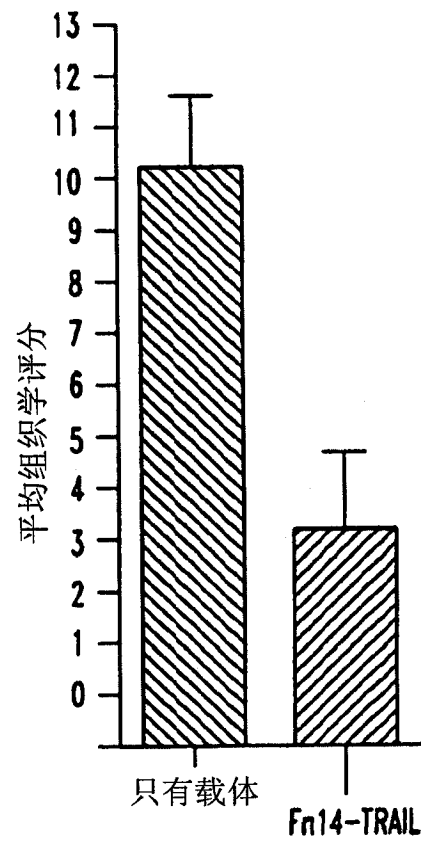


图7B

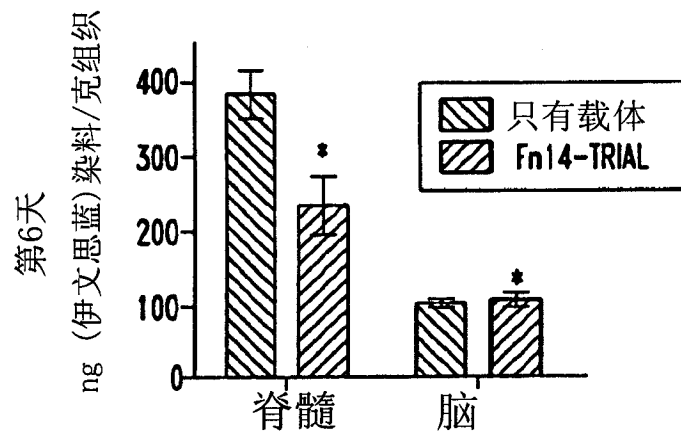


图8A

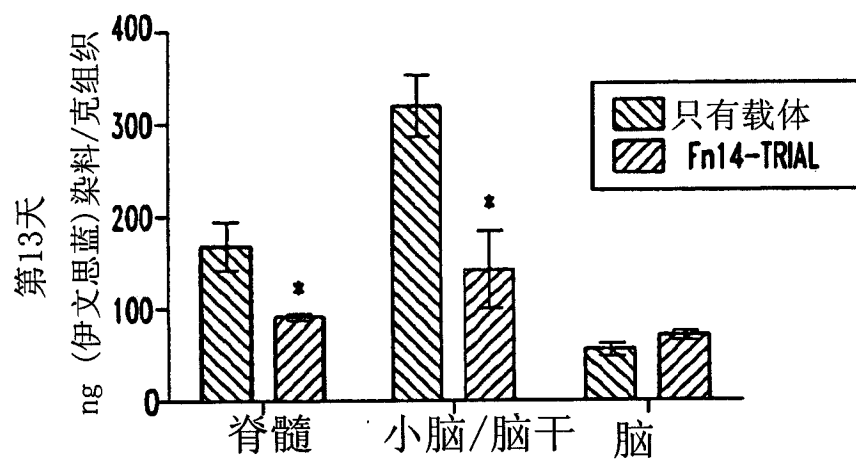


图8B

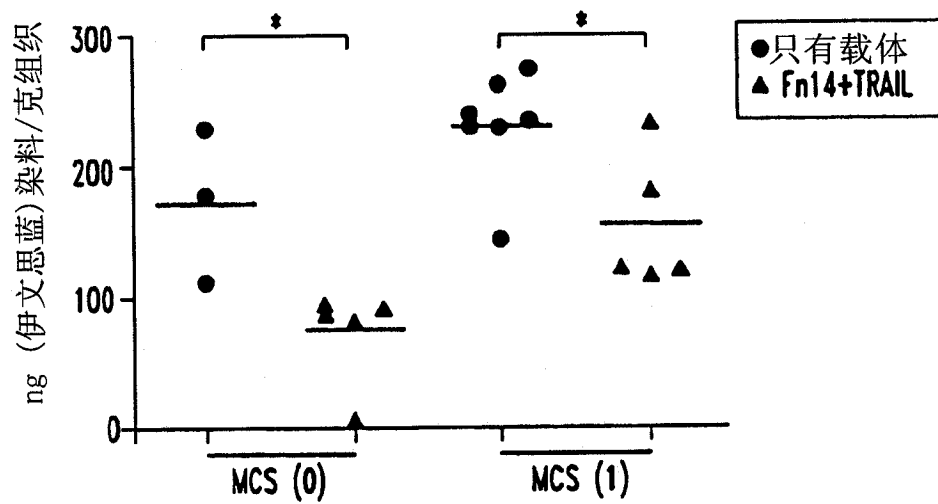


图8C

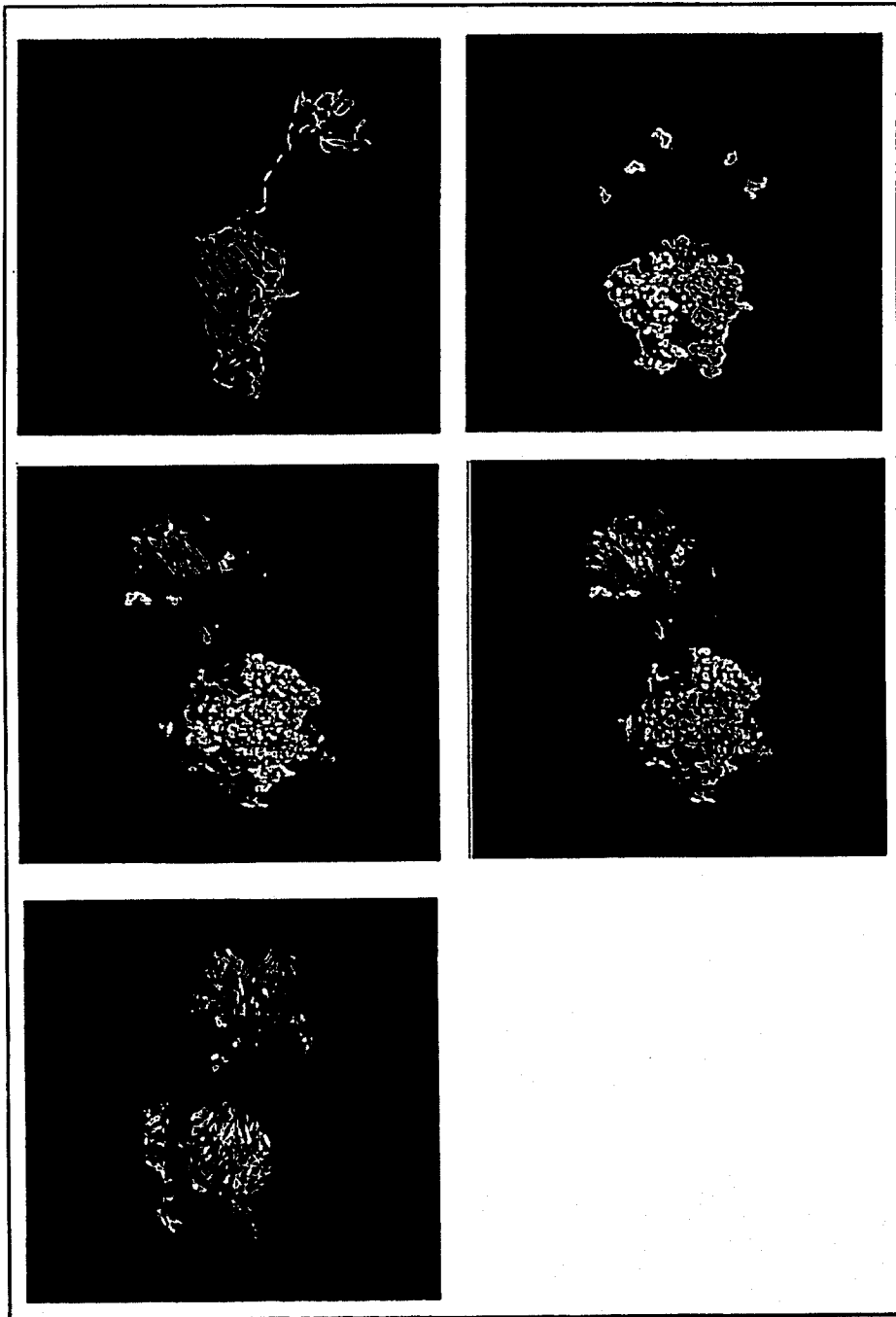


图9

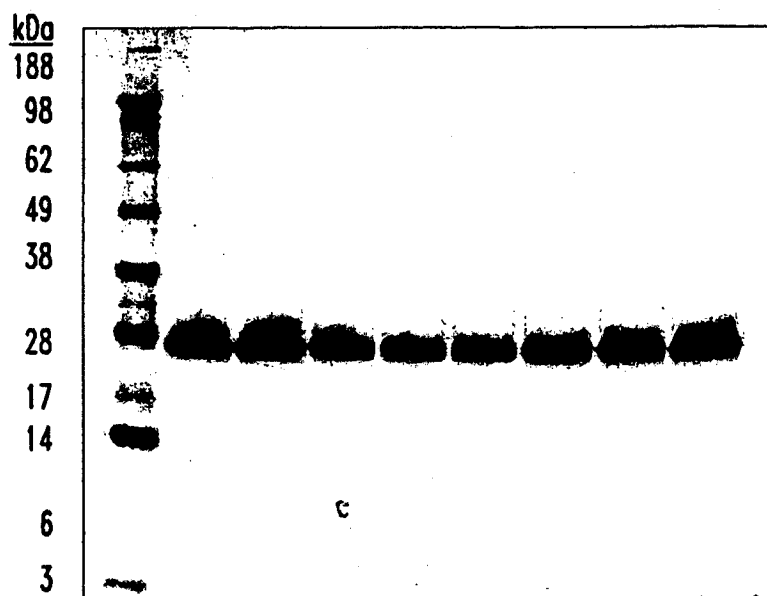


图10

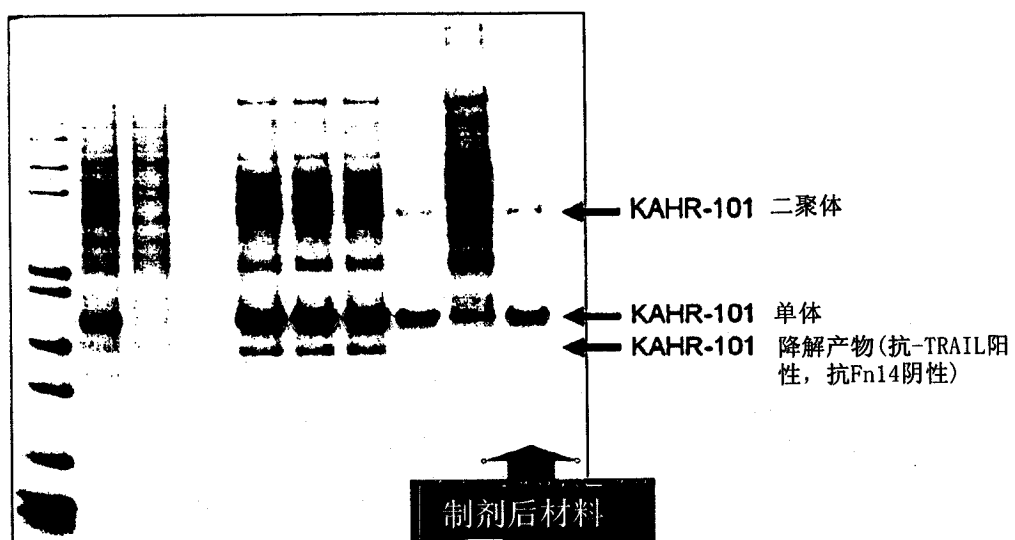


图11

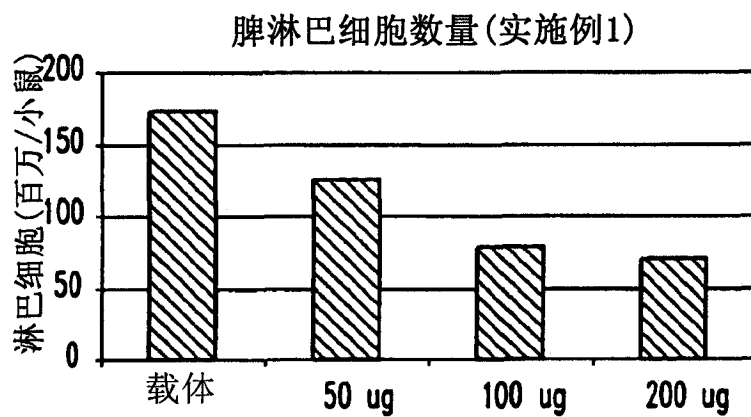


图12A

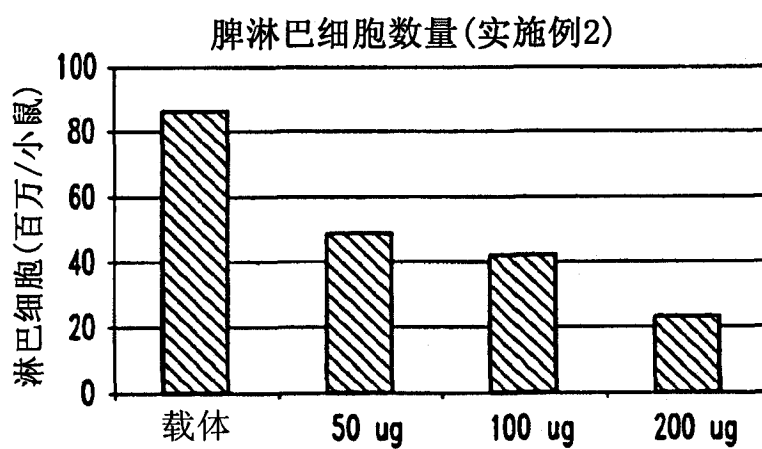


图12B

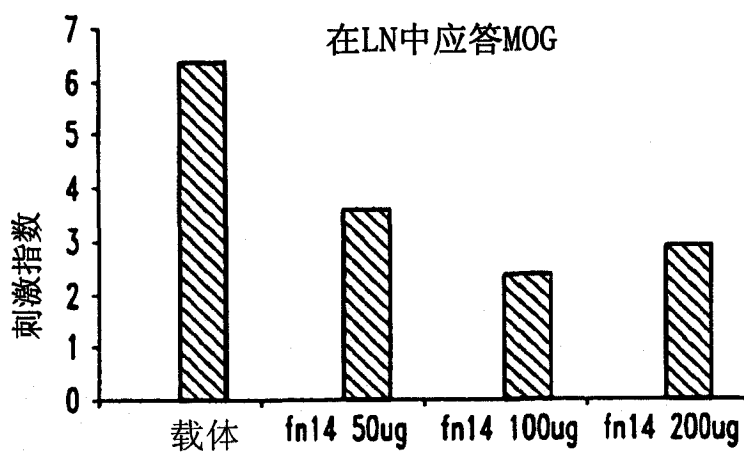


图13

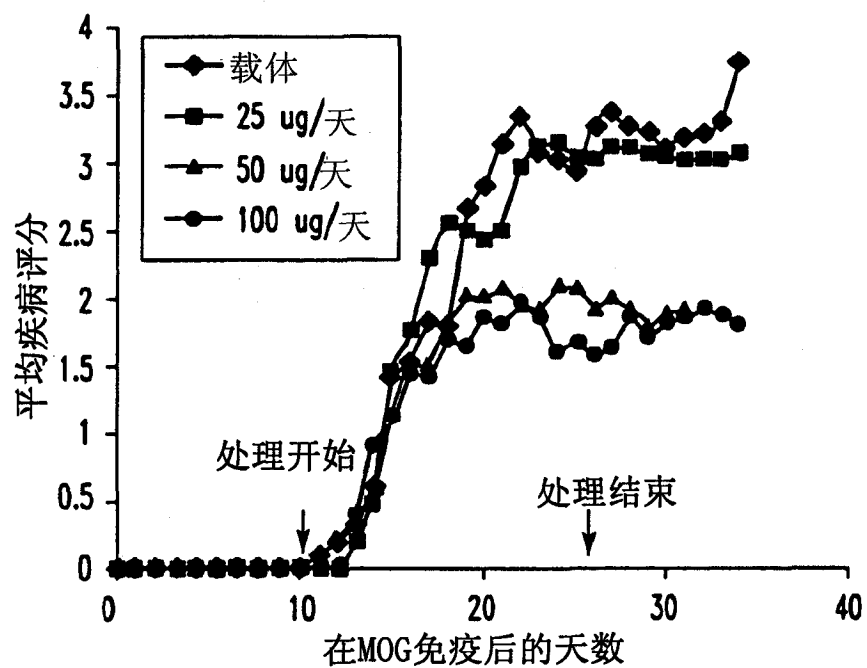


图14A

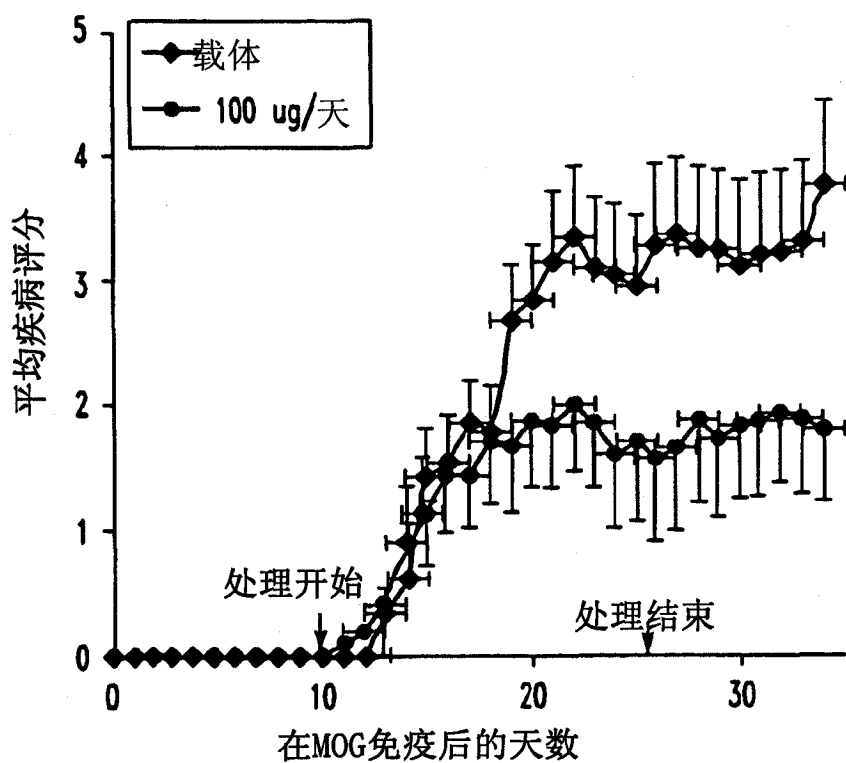


图14B

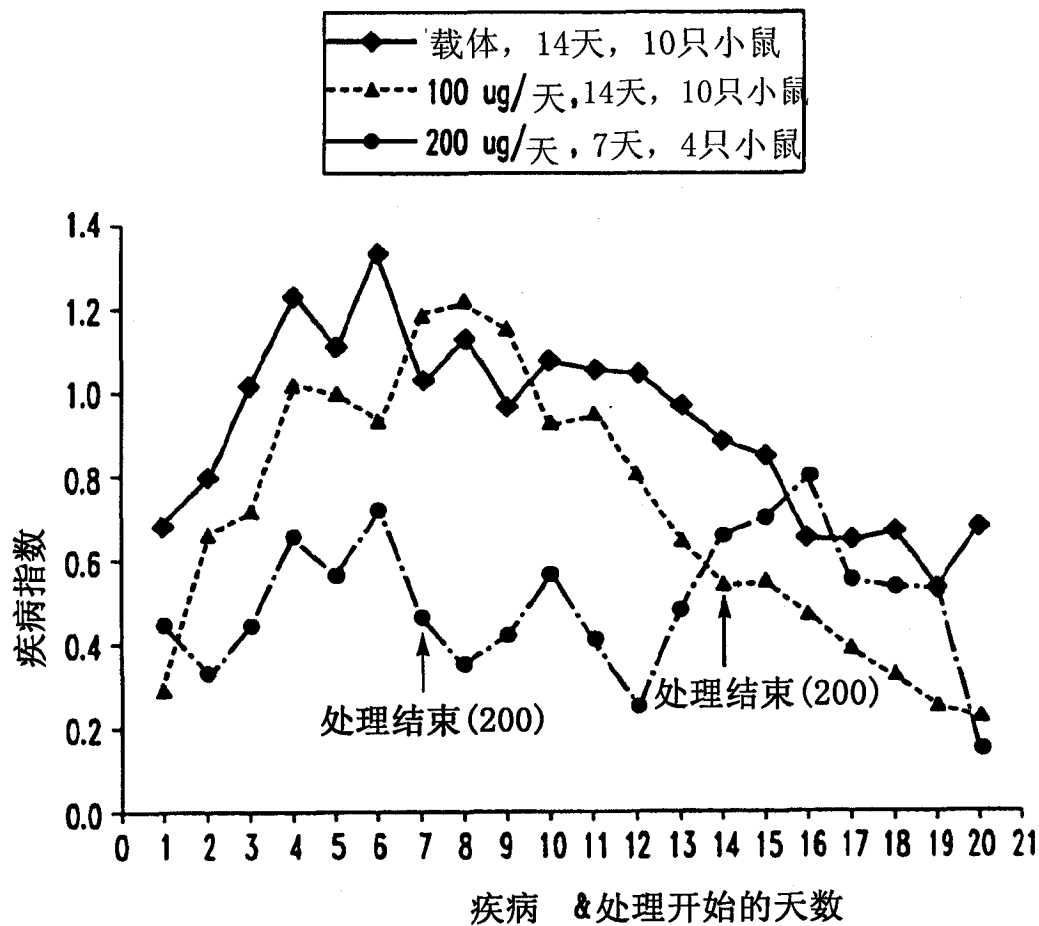


图15

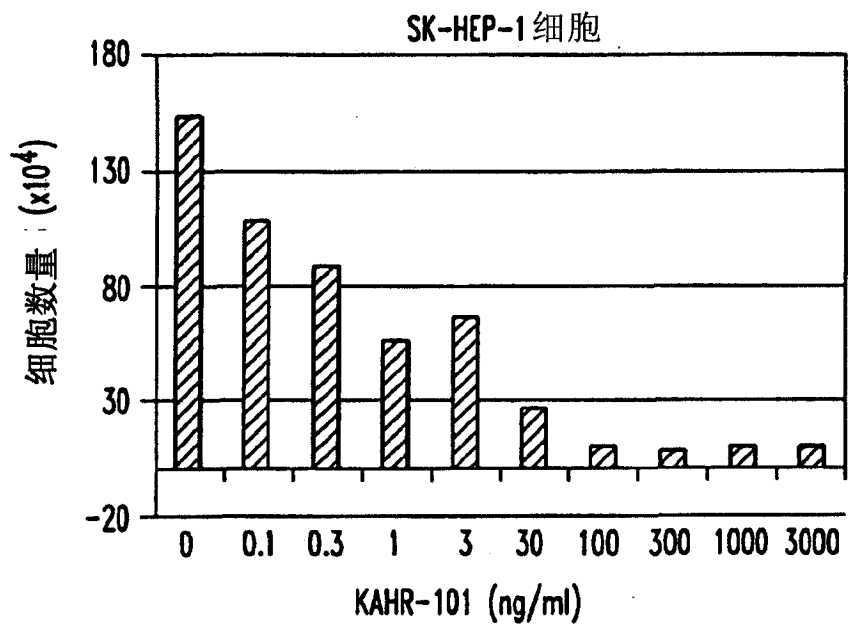


图16A

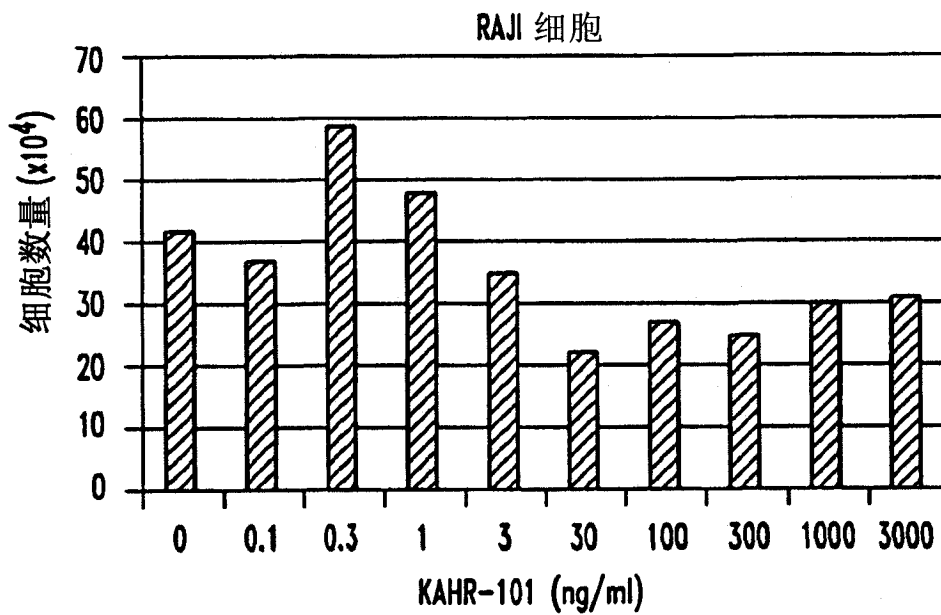


图16B

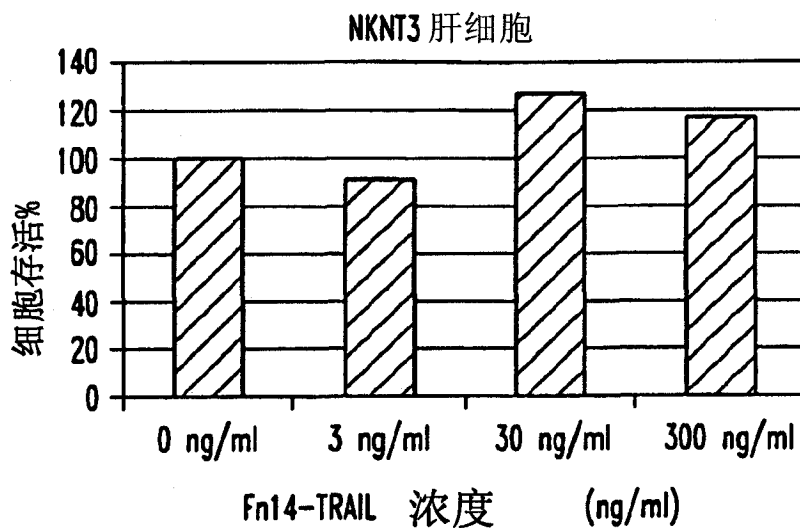


图16C

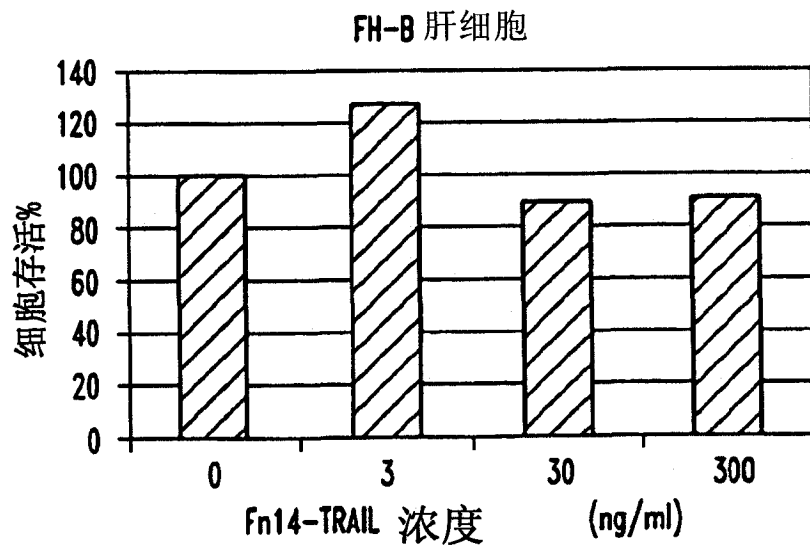


图16D

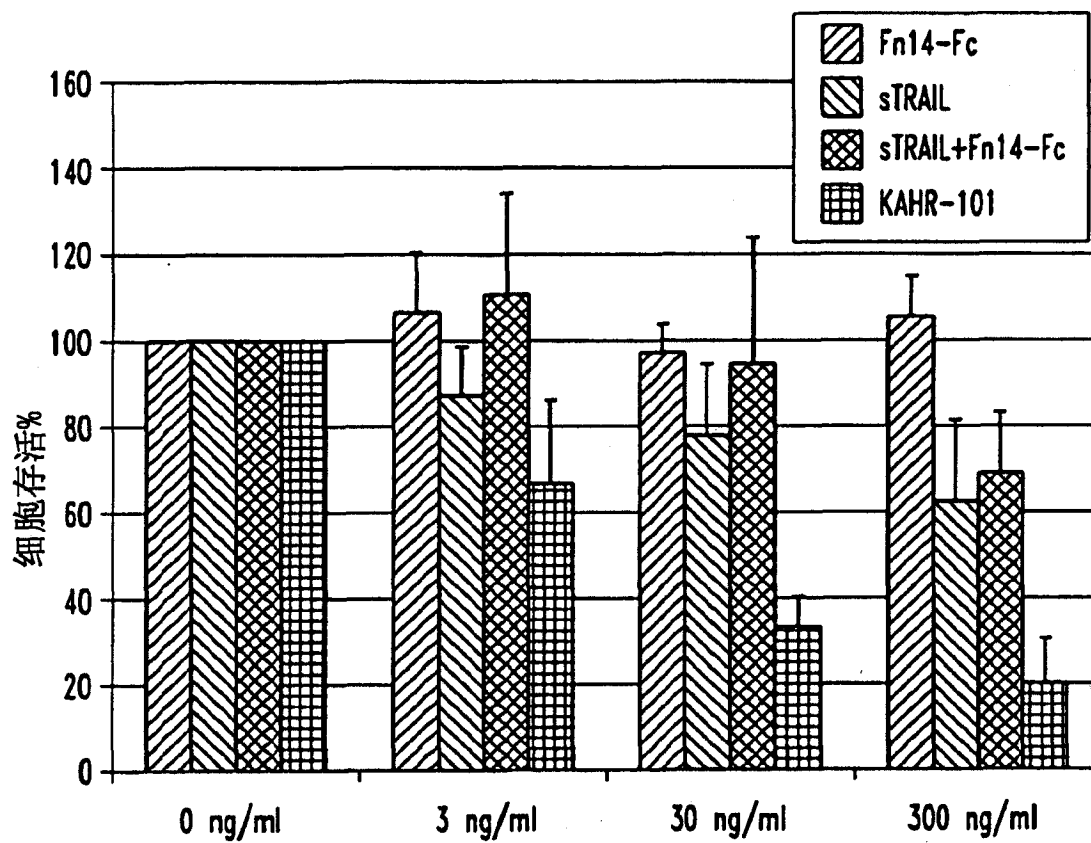


图17

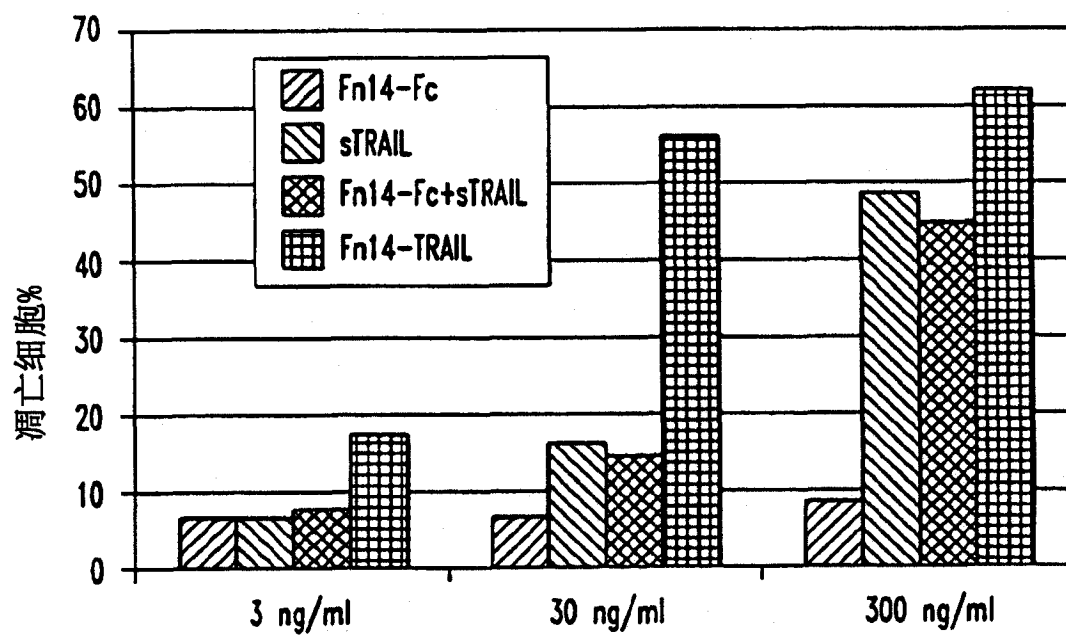


图18