

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610100206.7

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 17 日

[11] 公开号 CN 1895670A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 1996.7.19

[21] 申请号 200610100206.7

分案原申请号 200410007059.X

[30] 优先权

[32] 1995.7.21 [33] US [31] 08/505,606

[71] 申请人 拜奥根 IDEC 马萨诸塞公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 J·L·布朗宁格 C·D·本扎明

P·S·霍克曼

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 程 泳

权利要求书 3 页 说明书 44 页 附图 6 页

[54] 发明名称

作为免疫疾病治疗剂的可溶性淋巴毒素 - β
受体和抗淋巴毒素受体及配体的抗体

[57] 摘要

本发明涉及包括“淋巴毒素 - β 受体阻滞剂”的组合物和方法,其阻碍淋巴毒素 - β 受体的信号传导。淋巴毒素 - β 受体的阻滞剂用于治疗淋巴细胞介导的免疫疾病,特别是阻碍 Th1 细胞介导的免疫应答。本发明涉及淋巴毒素 - β 受体胞外结构域的可溶形式,这一结构域可作为淋巴毒素 - β 受体的阻滞剂。本发明也涉及抗淋巴毒素 - β 受体或其配体表面淋巴毒素的抗体的应用,它可作为淋巴毒素 - β 受体的阻滞剂。本发明还提供了选择可溶性受体、抗体和其它阻碍 LT - β 受体信号传导的试剂的一种新的筛选方法。

1. 淋巴毒素- β 受体阻滞剂用于制备治疗 Th1 细胞介导的免疫应答的药物的用途, 其中所述淋巴毒素- β 受体阻滞剂选自: 与一个或多个异源蛋白结构域融合的可溶性淋巴毒素- β 受体、含有选自 SEQ.ID.NO.1 的氨基酸功能性序列的可溶性淋巴毒素- β 受体和针对淋巴毒素- β 受体的抗体。

2. 权利要求 1 的用途, 其中可溶性淋巴毒素- β 受体含有一个能选择性结合表面淋巴毒素配体的配体结合结构域, 所述配体含有至少一个淋巴毒素 β 亚基。

3. 权利要求 1 的用途, 其中可溶性淋巴毒素- β 受体包含淋巴毒素- β 受体的胞外结构域。

4. 权利要求 1 的用途, 其中异源蛋白结构域选自: 免疫球蛋白、血清白蛋白、脂蛋白、载脂蛋白和转铁蛋白。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项的用途, 其中可溶性淋巴毒素- β 受体是人淋巴毒素- β 受体。

6. 权利要求 1 的用途, 其中抗体是重组抗体。

7. 权利要求 1 的用途, 其中抗体是人源化抗体。

8. 权利要求 1 的用途, 其中抗体是单克隆抗体。

9. 根据权利要求 8 的用途, 其中单克隆抗体含有由杂交瘤细胞系 BD.A8.AB9, ATCC 保藏号 HB11798, 产生的抗人淋巴毒素- β 受体的单克隆抗体 BDA8。

10. 权利要求 1-9 中任一项的用途, 其中 Th1-细胞介导的免疫应答参与动物中 IV 型迟发型超敏反应。

11. 权利要求 13 的用途, 其中 IV 型迟发型超敏反应是结核菌素型超敏反应或肉芽肿反应。

12. 权利要求 1-9 中任一项的用途, 其中 Th1 细胞介导的免疫应答参与动物接受组织移植后体内组织的细胞排斥反应。

13. 权利要求 1-9 中任一项的用途, 其中 Th1 细胞介导的免疫应答参与动物接受器官移植后体内的组织的细胞排斥反应。

14. 权利要求 1-9 中任一项的用途，其中 Th1 细胞介导的免疫应答参与动物体内的自身免疫疾病。

15. 权利要求 14 的用途，其中自身免疫疾病选自牛皮癣、类风湿性关节炎、胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化、交感性眼炎和葡萄膜炎。

16. 权利要求 1-9 中任一项的用途，其中 Th1 细胞介导的免疫应答参与动物中的慢性炎症疾病。

17. 权利要求 16 的用途，其中慢性炎症性疾病选自炎症肠疾病、Crohn 氏病、和溃疡性结肠炎。

18. 权利要求 1-9 中任一项的用途，其中 Th1 细胞介导的免疫应答被抑制，而不抑制 Th2 细胞依赖性免疫应答。

19. 药物组合物用于制备设计用于口服给药或非胃肠道给药的药物的用途，所述药物用于治疗动物中 Th1 细胞介导的免疫应答，其中药物组合物含有有效量的与一个或多个异源蛋白结构域融合的可溶性淋巴毒素- β 受体以及药物有效的载体。

20. 权利要求 19 的用途，其中药物设计用于选自如下的非胃肠道给药：皮下给药、静脉内给药和病损内给药。

21. 权利要求 19 或 20 的用途，其中异源蛋白结构域含有人免疫球蛋白 Fc 结构域。

22. 权利要求 19-21 中任一项的用途，其中可溶性淋巴毒素- β -受体含有选自 SEQ ID NO: 1 的氨基酸之功能性氨基酸序列。

23. 权利要求 19-22 中任一项的用途，其中 Th1 细胞介导的免疫应答为类风湿性关节炎或多发性硬化。

24. 一种选择淋巴毒素- β 受体阻滞剂的方法，包括以下步骤：

a) 在存在有效数量的至少一种淋巴毒素- β 受体激活剂和一种推定的淋巴毒素- β 受体阻滞剂的情况下培养肿瘤细胞；

b) 确定推定的淋巴毒素- β 受体阻滞剂是否降低了淋巴毒素- β 受体激活剂的抗肿瘤活性。

25. 一种含有 IgFc 结构域的淋巴毒素- β 受体融合蛋白，所述 IgFc 结构式由 CHO 细胞系 ATCC 保藏号 CRL11965 或 CHO 细胞系 ATCC

保藏号 CRL11964 产生。

26. 一种由杂交瘤细胞系 BD.A8.AB9, ATCC 保藏号 HB11798, 产生的抗体。

作为免疫疾病治疗剂的可溶性淋巴毒素- β 受体
和抗淋巴毒素受体及配体的抗体

本发明涉及包括“淋巴毒素- β 受体阻滞剂”的组合物和方法，其阻碍淋巴毒素- β 受体的信号传导。淋巴毒素- β 受体的阻滞剂用于治疗淋巴细胞介导的免疫疾病，特别是阻碍 Th1 细胞介导的免疫应答。本发明涉及淋巴毒素- β 受体胞外结构域的可溶形式，这一结构域可作为淋巴毒素- β 受体的阻滞剂。本发明也涉及抗淋巴毒素- β 受体或其配体表面淋巴毒素的抗体的应用，它可作为淋巴毒素- β 受体的阻滞剂。本发明还提供了选择可溶性受体、抗体和其它阻碍 LT- β 受体信号传导的试剂的一种新的筛选方法。

当一个免疫攻击开始时所释放的细胞因子的类型可能影响接下来的选择活化哪些免疫效应途径。免疫效应细胞机制的选择由 CD4-阳性的辅助性 T 淋巴细胞（辅助性 T 细胞或 Th 细胞）来决定。Th 细胞与抗原呈递细胞（APC）相互作用，抗原呈递细胞在其表面展示与 MHC II 类分子结合的被加工的外源抗原的肽段。当 Th 细胞识别展现在适当的 APC 细胞表面的外源抗原的特殊表位时，它们就被活化，表达一种特异受体。接着活化的 Th 细胞分泌细胞因子（淋巴因子），这些因子激活相应的免疫效应机制。

Th 细胞能够活化各种各样的效应机制，包括杀伤性 T 细胞的活化、B 细胞抗体的产生和巨噬细胞的活化。效应机制的选择主要由活化了的 Th 细胞所产生的细胞因子决定。

根据 Th 细胞的细胞因子分泌类型可将其分为三个亚类（Fitch 等, Ann.Rev.Immunol., 11, pp.29-48(1993)），称为 Th0、Th1 和 Th2。在小鼠中，非激活的“天然”辅助性 T 细胞产生 IL-2。短期的刺激导致产生 Th0 前体细胞，它产生的细胞因子范围很广，包括 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5 和 IL-10。慢性刺激可使 Th0 细胞转变为 Th1

或 Th2 细胞类型, 此时细胞因子的表达类型也改变了。

一些细胞因子 Th1 和 Th2 细胞都释放 (例如, IL - 3、GM - CSF 和 TNF)。另一些细胞因子只由一种 Th 细胞亚类制造。辅助性 T 细胞亚类的专一性效应最初是在小鼠中被认识的。在人类中也存在辅助性 T 细胞的类似分类 (Romagnani 等, Ann.Rev.Immunol., 12,pp.227-57(1994))。

Th1 细胞产生 LT - α 、IL - 2 和 IFN - γ 。在人类中, 细胞因子分泌的 Th1 类型通常是与细胞免疫和抵抗感染相联系的。Th1 细胞因子倾向于激活巨噬细胞和某些炎症反应, 例如 IV 类“迟发型”超敏反应 (见下)。Th1 细胞因子在组织移植和器官移植的细胞排斥中起重要作用。

Th2 细胞产生细胞因子 IL - 4、IL - 5、IL - 6 和 IL - 10。Th2 细胞因子提高嗜酸性粒细胞和肥大细胞的产生和促进 B 细胞的完全扩张和成熟 (Howard 等, “T 细胞产生的细胞因子和它们的受体”, 基础免疫学(Fundamental Immunology), 第三版, Raven Press, 纽约 (1993))。Th2 细胞因子也可以加强抗体的产生, 包括与变态反应相关的 IgE 抗体和抗移植的抗体。Th2 细胞也可以参与对持续性抗原的免疫抑制和耐受。

Th1 和 Th2 相关的细胞因子在特定的超敏反应 - 接触以前遇到过的抗原而引发的不恰当的或不均衡的免疫应答 - 中起作用。有四种已识别的超敏反应类型 (Roitt 等, 免疫学(Immunology), pp.19.1-22.12(Mosby-Year Book Europe Ltd., 3d ed.1993))。

I 型“速发性超敏反应”包括变应原介导的 Th2 细胞活化和 Th2 细胞因子释放。Th2 细胞因子 IL - 4 刺激 B 细胞经过同种型转换产生 IgE, 激活肥大细胞产生急性炎症反应, 例如导致湿疹、哮喘和鼻炎。

II 和 III 型超敏反应是由抗细胞表面或特异性组织抗原 (II 型) 或可溶性血清抗原 (III 型) 的 IgG 和 IgM 抗体引发的。这些类型的超敏反应认为不是由 Th 细胞介导的。

IV 型“迟发型”超敏反应 (DTH) 是 Th1 细胞介导的。DTH 反应发展要花 12 个小时以上, 因为它在小鼠中的转移是通过转移 Th1 细胞

而不能只用血清，所以又被称为是“细胞介导的”。IV型DTH反应通常又被分为三类：接触型、结核菌素型和肉芽肿型超敏反应。

许多能引起疾病的细胞介导的反应是可以通过从染病的小鼠转移淋巴细胞到健康小鼠身上而诱发的（例如，胰岛素依赖性糖尿病和实验自身免疫脑炎）。这一特征将IV型DTH与其他三种类型的超敏反应区别开，其他三种类型是主要由抗体引起的体液免疫应答，可以经无细胞血清转移而得。

辅助性T细胞也参与新生免疫球蛋白同种型转换的调节。不同的Th亚类可以影响免疫攻击产生的给定的同种型免疫球蛋白的相对比例。例如，Th2细胞因子IL-4可以将活化的B细胞转变为IgG1同种型而抑制其他的同种型。正如上面所讨论的，在I型超敏反应中IL-4也激活IgE的过量产生。Th2细胞因子IL-5诱导IgA同种型。这些Th2细胞因子对同种型转换的影响由Th1细胞产生的IFN- γ 来抗衡。

Th1和Th2细胞分泌的不同类型的细胞因子介导不同免疫效应机制。激活细胞介导的或体液效应机制的转变通过Th1和Th2细胞之间的交叉抑制而致敏：Th1细胞产生的IFN- γ 阻碍Th2细胞的增殖，而Th2细胞分泌的IL-10减少Th1细胞分泌细胞因子。

基于细胞因子与其靶分子的相对亲和性，Th1和Th2的负调节循环可以扩增Th1和Th2细胞因子之间的很小的浓度差别造成的影响。一个被扩增了的Th1或Th2细胞因子信号可以在Th1和Th2细胞因子的相对浓度发生小变化的基础上开启细胞介导的或体液的效应机制之间的转变。这种通过调节Th1和Th2细胞因子的相对浓度而控制该转变的能力对于治疗各种导致免疫紊乱和疾病的Th1和Th2细胞依赖性的免疫反应中的不平衡将很有帮助。

病理性Th1反应与大量器官特异性的和系统的自身免疫情况、慢性炎症和迟发型超敏反应有关。正如上面讨论的，Th1反应也与细胞反应有关，导致被移植的组织 and 器官的排斥反应。

目前，对各种基于Th1细胞的免疫不良状态的治疗通常采用免疫调节剂和免疫抑制剂，以及各种机理不明的药物（例如，金或青霉胺）。现在常用的三种免疫抑制剂是类固醇、环孢菌素和硫唑嘌呤。

类固醇是多向性的抗炎剂试剂，它能抑制活化的巨噬细胞和在逆转 Th1 细胞因子 IFN - γ 许多效应的途径中抑制抗原呈递细胞的活性。环孢菌素 - 一种强免疫抑制剂 - 抑制细胞因子的产生和减少淋巴细胞在活化过程中 IL - 2 受体的表达。硫唑嘌呤是一种抗增殖剂，它抑制 DNA 的合成。这些非特异性的免疫抑制剂通常需要大剂量使用，这就提高了它们的毒性（例如，肾毒性和肝毒性）并引起有害的副作用，因此不适合用于长期的治疗。

为了决用非特异性免疫抑制剂进行传统治疗所引起的问题，目前许多治疗策略的目标是选择免疫系统的某些方面进行抑制或活化。一个特别具有吸引力的方向是控制 Th1 和 Th2 细胞因子之间的平衡，从而操纵细胞介导的和体液的效应机制之间的平衡。

为了完成细胞介导的和体液的效应机制之间的转移，能够调节可以改变 Th1 和 Th2 细胞亚类相对活性的分子的活性是很有帮助的。这样的分子的候选者包括细胞因子和它们的受体。最近的资料表明，LT - α 、IL - 12，IFN - α 和 IFN - γ 促进 Th1 反应的发展，而 IL - 1 和 IL - 4 极化朝向 Th2 效应机制的反应（Romagnani 等，*Ann.Rev.Immunol.*,12,pp.227-57(1994)）。

许多 Th 细胞因子是免疫发展和功能的多效性调节物，阻止它们的产生将对非 T 细胞介导的反应产生有害作用。选择性调节 Th1 和 Th2 效应机制之间的选择的合适而有效的目标还未确定。

本发明通过提供治疗免疫疾病的药物组合物和方法，用淋巴毒素 - β 受体的阻滞剂阻止淋巴毒素 - β 受体（LT - β - R）的信号传导，从而解决上面提出的问题。特别是这些包括 LT - β - R 阻滞剂的组合物和方法对于阻止 Th1 细胞介导的免疫疾病如炎性肠综合症很有帮助。

一种实施方案是提供淋巴毒素 - β 受体的胞外结构域的可溶形式作为 LT - β - R 阻滞剂。这一实施方案的优选组合物和方法包括重组的淋巴毒素 - β 受体的融合蛋白，它把 LT - β - R 胞外配体结合区域与免疫球蛋白的重链恒定区相融合。更优选的是将 LT - β - R 配体结合区域融合到人的 IgG Fc 区域上。

本发明的另一实施方案是提供抗体作为 LT - β - R 阻滞剂。这一

方案的优选组合物和方法包括抗淋巴毒素- β 受体的一种或多种抗体。更优选是单克隆抗体。这一方案其他的优选组合物和方法包括抗表面淋巴毒素的一种或多种抗体。该抗体更优选是抗淋巴毒素- β 的单克隆抗体。

本发明进一步提供一种选择 LT- β -R 阻滞剂-例如 LT- β -R 的可溶性形式、抗 LT 抗体和抗 LT- β -R 抗体-的新的筛选方法。这一筛选方法包括进行监测 LT- β -R 信号传导的肿瘤细胞毒性实验。在肿瘤细胞毒性实验中利用当一种 LT- β -R 激活剂(例如 LT- α 1/ β 2) 出现时, 人类腺癌细胞对配体或抗体诱导的 LT- β -R 信号传导的敏感性增强这一现象。

LT- β -R 阻滞剂阻止肿瘤细胞上的 LT- α / β 异聚体(或其他的 LT- β -R 激活剂)的细胞毒效应。用于测试推定的 LT- β -R 阻滞剂的方法以抗 LT- β -R 抗体(在有 LT- β -R 激活剂 LT- α 1/ β 2 存在的情况下)为例加以说明, 包括下面几个步骤:

1)肿瘤细胞(例如 HT29 人类腺癌细胞)在含有 IFN- γ 和纯化的 LT- α 1/ β 2 的培养基中在有或无待测的抗 LT- β -R 抗体存在下培养几天,

2)用染活细胞的染料处理细胞;

3)计数染上颜色的细胞以确定当 LT α 1/ β 2、IFN- γ 和试验抗-LT- β -R 抗体存在下每个样品中被杀死的肿瘤细胞所占的比例。另一种可选择的方法是, 用许多熟知的测定细胞存活力实验中的一种, 例如 ^3H -胸腺嘧啶掺入 DNA 的实验确定存活细胞的数目。在这个实验中若抗 LT- β -R 抗体(或抗体组合物)至少能使被杀死的肿瘤细胞的百分数下降 20%, 则它是一种本发明范围内的 LT- β -R 阻滞剂。

单独或联合使用 LT- α / β 异聚体和其他的 LT- β -R 激活剂可以进行细胞裂解实验。这一实验也可以按要求改造, 以鉴定新的 LT- β -R 阻滞剂。

图 1 编码配体结合区域的人类 LT- β 受体胞外部分的序列。

图 2 偶联到人类 IgG1 Fc 区域上的可溶性鼠 LT- β 受体 (m LT- β -R-Fc), 在小鼠 WEHI 164 细胞中阻止可溶性小鼠 LT- α /

β 配体诱导的 LT - β - R 信号传导。增大 LT 配体 (mLT - α/β) 浓度可以杀死 WEHI 164 细胞。可溶性 mLT - β - R - Fc (10 μ g/ml) 阻止这种 LT 配体诱导的细胞死亡。可溶性的鼠 TNF 受体融合蛋白 (p55 TNF-R-Fc) 对阻止 LT - α/β 激活的细胞死亡具有很小的作用。三天之后通过测定反应了的 MTT 的光密度 (OD 550) 值可测量生长状况, 该值与细胞数目成比例。

图 3 抗人 LT - β - R 的抗体 (BDA8 mAb) 阻止可溶性 LT 配体与人细胞表面的 LT - β - R 之间的相互作用。WiDr 肿瘤细胞的生长被 IFN - γ 和可溶性 LT - α 1/ β 2 配体联合抑制。抗 LT - β - R 抗体 BDA8 阻碍 LT - α 1/ β 2 配体抑制 WiDr 肿瘤细胞生长的能力。实心符号显示了 IgG1 对照 mAb(10 μ g/ml)存在下细胞的生长。空心符号显示了抗 LT - β - R mAb BDA8(10 μ g/ml)的效应。

图 4 抗人 LT - β (B9 mAb) 的抗体阻止细胞表面的 LT - α/β 配体与可溶性 LT - β 受体 (hLT - β - R - Fc; 2 μ g/ml) 之间的相互作用。用藻红蛋白标记的驴抗人 IgG 和 FACS 分析可测定表面结合的 LT - β - R - Fc。所得峰的平均荧光强度被绘制出来作为通道数。虚线显示了缺乏 B9 mAb 时与结合的受体数量相符的平均荧光强度。

图 5 LT - β - R 阻滞剂 (mLT - β - R - Fc) 在接触型迟发性超敏反应 (DTH) 的小鼠模型的耳肿大中的效应。这个图显示了 0.2 % DNFB 抗原攻击到致敏小鼠的耳上后 24 小时中耳朵厚度的增加。每种符号代表不同的实验。所有的实验除了用菱形划边界线的每点只用了四个动物外, 其余的每点都用了七到八个动物。用缓冲液 (PBS) 和 20mg/kg 的对照 IgG 融合蛋白 (LFA3 - Fc) 处理的小鼠作为阴性对照。用 8mg/kg 抗 VLA4 mAb (PS/2 mAb) 处理的小鼠作为阳性对照, 这种抗体阻止接触型 DTH 耳肿大。

图 6 用 mLT - β - R - Ig 和 hLFA3-Ig 融合蛋白处理后 14 天观察到的小鼠的重量变化图。

图 7 用 mLT - β - R - Ig 和 hLFA3 - Ig 融合蛋白处理后 14 天观察到的小鼠结肠长度的变化图。

图 8 注射了 CD4RB^{low}CD4 阳性 T 细胞、CD45RB^{high}CD4 阳性 T

细胞、CD45RB^{high}和LT β R-Ig及CD45RD^{high}和hLFA3-Ig后小鼠体重的时间曲线。

图9图示在图8-11的处理后观察到的体重平均值和标准偏差。

图10表示用阳性和阴性对照及mLT β R-Ig注射后小鼠脚垫厚度的增加。

为了很完整地理解所描述的发明，给出下面的详细说明。

术语“细胞因子”指介导细胞之间相互作用的分子。“淋巴因子”是淋巴细胞释放的细胞因子。

术语“辅助性T细胞”指T细胞的一个功能亚类，它帮助产生细胞毒性T细胞和与B细胞共同作用刺激抗体产生。辅助性T细胞识别与II类MHC分子结合的抗原。

术语“Th1”指辅助性T细胞的一个亚类，它产生LT- α 、干扰素- γ 和IL-2（及其他细胞因子），并引发与抗攻击的细胞应答（例如非免疫球蛋白的应答）相关的炎症反应。

术语“Th2”指辅助性T细胞的另一亚类，它产生的细胞因子包括IL-4、IL-5、IL-6和IL-10，与免疫攻击的免疫球蛋白（体液）应答相关。

术语“细胞介导的”指那些起因于T细胞和其产物的直接效应而产生应答的免疫事件。这种类型的应答通常（并非完全）与T细胞的Th1类相关。不包括在这一类中的是T细胞在B细胞分化和扩张上的辅助作用，这一作用通常与T细胞的Th2类有关。

术语“迟发型超敏反应（DTH）”指以对抗原的缓慢应答为特征，1-3天才表现出它完全的效应的免疫应答。这种慢速应答是与在免疫球蛋白介导的（体液的）变态反应中看到的相对快的应答相比而言的。有三种类型的DTH反应：接触型超敏反应、结核菌素型超敏反应和肉芽肿反应。

术语“免疫球蛋白应答”或“体液应答”指动物对外源抗原的免疫应答，产生外源抗原的抗体。辅助性T细胞的Th2类对于高亲和力抗体的有效生产是必需的。

术语抗体的“Fc区域”指抗体分子的一部分，包括绞链区、CH2

和 CH3 区域,但缺少抗原结合部位。这个术语意味着也包括 IgM 或其他抗体同种型的等价区域。

术语“抗 LT - β 受体抗体”指至少能特异性结合 LT - β 受体的一个表位的任何抗体。

术语“抗 LT 抗体”指至少能特异性结合 LT - α 、LT - β 或 LT - α/β 复合物的一个表位的任何抗体。

术语“LT - β - R 信号传导”指与 LT - β - R 途径相关的分子反应和从此导致的接下来的分子反应。

术语“LT - β - R 阻滞剂”指能减少配体结合 LT - β - R、细胞表面的 LT - β - R 聚簇或 LT - β - R 信号传导的试剂,或者指能影响 LT - β - R 信号在细胞内如何作用的试剂。

作用于配体 - 受体结合步骤的 LT - β - R 阻滞剂至少能抑制 LT 配体结合 LT - β - R 20%。作用于配体 - 受体结合步骤之后的 LT - β - R 阻滞剂至少能抑制 LT - β - R 在肿瘤细胞上活化的细胞毒作用 20%。LT - β - R 阻滞剂的例子包括可溶性 LT - β - R - Fc 分子和抗 LT - α 、抗 LT - β 、抗 LT - α/β 及抗 LT - β - R 的抗体。优选这些抗体与 LT - α 的分泌形式没有交叉反应。

术语“LT - β - R 生物活性”指: 1) LT - β - R 分子或衍生物与可溶性或表面 LT 配体结合竞争可溶性或表面 LT - β - R 分子的能力; 或 2) 与天然 LT - β - R 分子一样的刺激免疫应答或细胞毒活性的能力。

术语“LT - α/β 异聚体”和“LT 异聚体”指在至少一个 LT - α 和一个或多个 LT - β 亚单位之间的稳定结合,包括一个或多个亚单位的可溶性的、突变的、改变了的和嵌合的形式。这些亚基可以通过静电力、范德华力或共价相互作用结合。优选 LT - α/β 异聚体至少有两个邻近的 LT - β 亚单位并缺少邻近的 LT - α 亚单位。当 LT - α/β 异聚体在细胞生长测试中作为一个 LT - β - R 激活剂时优选是可溶的并具有化学计量关系的 LT - α 1/ β 2。可溶的 LT - α/β 异聚体缺少穿膜结构域,能被工程化表达 LT - α 和或 LT - β 亚单位的适当宿主细胞分泌 (Crowe 等, 免疫学方法杂志 (*J.Immunol.Methods*), 168, pp.79-

89(1994))。

术语“LT配体”指能特异性结合LT- β 受体的LT异聚体或其衍生物。

术语“LT- β -R配体结合区域”指涉及LT配体的特异性识别和与LT配体相互作用的LT- β -R的部分。

术语“表面LT- α/β 复合体”和“表面LT复合体”指由LT- α 和膜结合的LT- β 亚单位-包括一个或多个亚单位的突变体、改变了的和嵌合的形式-组成的复合体,它展示在细胞表面。“表面LT配体”指能特异性结合LT- β 受体的表面的LT复合体或其衍生物。

术语“受试者”指一个动物或一个或多个由动物而来的细胞。优选动物是哺乳动物。细胞可以任何形式存在,包括但不限于保留在组织中的细胞,细胞簇,无限增殖化的、转染的或转化的细胞,以及由发生了物理或表型改变的动物而来的细胞。

肿瘤坏死因子(TNF)相关的细胞因子是作为一个宿主防御和免疫调节的多效媒介的大家族而出现的。这一家族的成员以膜结合的形式存在,通过细胞与细胞的接触原位发挥作用,或者作为分泌蛋白作用于远距离的目标。TNF相关受体的一个平行家族与这些细胞因子反应,开启包括细胞死亡、细胞增殖、组织分化和促炎应答在内的各种途径。

TNF、淋巴毒素- α (LT- α ,也叫TNF- β)和淋巴毒素- β (LT- β)是TNF配体家族的成员,这一家族也包括Fas、CD27、CD30、CD40、DX-40和4-1BB受体的配体(Smith等,细胞(Cell),76,pp.959-62(1994))。TNF家族的若干成员-包括TNF、LT- α 、LT- β 和Fas-的信号传导能诱导肿瘤细胞经坏死或凋亡(程序性细胞死亡)而死亡。在非致瘤性细胞中,TNF和许多TNF家族配体-受体相互作用影响了免疫系统的发育和对各种免疫攻击的应答。

大多数TNF家族的配体是以膜结合的形式在细胞表面发现的。在人类中,发现TNF和LT- α 有分泌的和膜结合的表面形式。表面TN具有跨膜区域,可以被蛋白水解切断后产生分泌的形式。相比之下,表面LT- α 缺乏跨膜区域。膜相关的LT- α 作为异聚体与LT- β (一个相关的跨膜多肽)一起,以LT- α/β 复合体的形式连在细胞表面。

大多数膜结合的 LT - α/β 复合体 (“表面 LT”) 具有 LT - α 1/ β 2 的化学计量关系 (Browning 等, 细胞, 72,pp.847-56(1993); Browning 等, 免疫学杂志, 154, pp.33-46(1995))。表面 LT 配体不与 TNF - R 高亲和力结合, 不激活 TNF - R 信号传导。另一个 TNF 相关的受体被称为 LT - β 受体 (LT - β - R), 它与这些表面淋巴毒素复合体高亲和力结合 (Crowe 等, 科学 (Science), 264, pp.707-10(1994))。

LT - β - R 信号传导与 TNF - 信号传导一样, 具有抗增殖效应对肿瘤细胞有细胞毒作用。在本申请人的共同未决美国申请流水号 0/378,968 中, 用 LT - β - R 激活剂选择性刺激 LT - β - R 的组合物和方法被披露了。LT - β - R 激活剂对于不同时活化 TNF - R 诱导的促炎或免疫调节途径时抑制肿瘤细胞的生长是有帮助的。

在非肿瘤细胞中, TNF 或 TNF 相关的细胞因子在种种免疫应答中广泛发挥活性。TNF 和 LT - α 配体都与 TNF 受体 (p55 或 p60 和 p75 和 p80, 这里称为 TNF - R) 结合并活化之。TNF 和 LT - α 是巨噬细胞在对微生物感染的早期和快速应答中产生的, 这种应答可提高巨噬细胞和嗜中性白细胞的杀微生物活性。巨噬细胞或细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL 或 “杀伤性 T 细胞”) 产生的 TNF 和 LT - α 结合到靶细胞表面的 TNF 受体上并启动敏感细胞的死亡。

TNF 和 TNF 相关的细胞因子也能应答于感染或应激而启动炎症级联反应。TNF、LT - α 和 IFN - γ 的释放改变了血管内皮细胞与特定淋巴细胞类型之间的粘连性质。增强粘连促进吞噬细胞和白细胞从血流迁移到炎症部位周围的组织中。类似的炎症反应在组织移植和器官移植的细胞排斥以及某些免疫紊乱中扮演了主要角色。

细胞表面淋巴毒素 (LT) 复合体已经在 CD4⁺ T 细胞杂交瘤细胞 (II - 23.D7) 中鉴定了, 该细胞表达高水平的 LT (Browning 等, 免疫学杂志, 147, pp.1230-37(1991); Androlewicz 等, 生物学化学杂志 (J.Biol.Chem), 267, pp.2542-47(1992))。LT - β - R、LT 亚单位和表面 LT 复合体的表达和生物角色参见 C.F.Ware 等。 “淋巴毒素系统的配体和受体”, 刊于《细胞裂解途径, 微生物学免疫学当今话题》 (Pathways

for Cytolysis, Current Topics Microbiol. Immunol.) Springer-Verlag, pp.175-218(1995).

LT - α 的表达是可被诱导的, 主要由活化的 T、B 淋巴细胞和自然杀伤 (NK) 细胞分泌。在辅助性 T 细胞亚类中, LT - α 由 Th1 而不是由 Th2 细胞产生。LT - α 在黑素细胞中也被检测到了。多发性硬化病人病灶中的小神经胶质细胞和 T 细胞也可以用抗 LT - α 的抗血清染色。

淋巴毒素 - β (也叫 p33) 已经在 T 淋巴细胞、T 细胞系、B 细胞系和淋巴因子激活的杀伤性细胞 (LAK) 的表面鉴定了。LT - β 是本申请人的共同未决国际申请 PCT/0591/04588 的主题, 1992 年 1 月 9 日以 WO92/00329 出版, 也是 PCT/US93/11669 的主题, 1994 年 6 月 23 日以 WO 94/13808 出版, 引入这里以供参考。

表面 LT 复合体主要由活化的 T、B 淋巴细胞和自然杀伤细胞 (NK) 表达, 正如 FACS 分析或者利用抗 LT - α 抗体或可溶性 LT - β - R - Fc 融合蛋白的免疫组织学确定的那样。关于下述细胞, 表面 LT 也已被描述了: 人类细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 克隆、活化的外周单核淋巴细胞 (PML)、IL - 2 活化的外周血淋巴细胞 (LAK 细胞)、美洲商陆促有丝分裂因子活化的或抗 CD40 活化的外周 B 淋巴细胞 (PBL) 和 T、B 细胞系的各种淋巴系统肿瘤。带有同种异体抗原的靶细胞的接触特异性地诱导 CD8⁺ 和 CD4⁺ CTL 克隆表达表面 LT。

LT - β 受体是 TNF 受体家族的一个成员, 它特异性地结合表面 LT 配体。LT - β - R 结合 LT 异聚体 (主要是 LT α 1/ β 2 和 LT - α 2/ β 1), 但不结合 TNF 或 LT - α (Crowe 等, 科学, 264, pp.707-10(1994))。LT - β - R 信号传导可以在外周淋巴系统器官的发育和体液免疫应答方面起作用。

关于 LT - β - R 表达的研究处于早期阶段。LT - β - R mRNA 在人脾、胸腺和其他主要器官中找到了。LT - β - R 的表达方式类似于报道的 p55-TNF-R 的方式, 但外周血 T 细胞和 T 细胞系缺少 LT - β - R。

可溶性 LT 复合体的产生

可溶性 LT - α / β 异聚体包括 LT - β 亚单位, 它已由膜结合的形式变为可溶形式。这些复合体在本申请人的共同未决国际申请 (PCT/US93/11669, 1994 年 6 月 23 日以 WO94/13808 出版) 中详细描述了。可溶性 LT - β 多肽用淋巴毒素 - β 的氨基酸序列确定, 根据 Browning 等的编号系统 (细胞, 72, pp.847-56(1993)), 该序列在跨膜区域的末端 (即在大约氨基酸 # 44) 和第一个 TNF 同源区 (即在氨基酸 # 88) 之间任一点被切断。

可溶性 LT - β 多肽可以通过截去 LT - β 的 N 末端而去除胞质尾和跨膜区而产生 (Crowe 等, 科学, 264, pp.707-710(1994))。另一选择是, 跨膜结构域可以经缺失而失活, 或者用亲水氨基酸取代组成跨膜结构域的正常的疏水性氨基酸残基而失活。在这两种情况下都创造了一个基本亲水的亲水性分布图, 降低了脂亲合力而提高了水溶性。缺失跨膜结构域比用亲水性氨基酸残基替代更好一些, 因为它避免了引入潜在的免疫原性表位。

已缺失或失活的跨膜结构域可以用 I 型前导序列取代或连上此序列 (例如 VCAM - 1 前导肽), 这样该蛋白从 Val 40 到 pro88 的任何一处开始被分泌出来。可溶性 LT - β 多肽可以在 N 末端包含任何数目的已知的前导序列。这样的序列应允许多肽表达并导向真核系统的分泌途径。参见, 例如 Ernst 等, 美国专利号 5,082,783(1992)。

可溶性 LT - α / β 异聚体可以通过用编码 LT - α 和可溶性 LT - β 的 DNA 共转染一个合适的宿主细胞而产生 (Crowe 等, 免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods), 168, pp.79-89(1994))。缺乏 LT - α 而分泌的可溶性 LT - β 是高度寡聚的。但是, 当与 LT - α 一起表达时形成一个包含二种蛋白的 70 KDa 的三聚体状结构。也可以用一个编码可溶性 LT - β 多肽的基因转染通常只表达 LT - α 的细胞系 (例如上面讨论的 RPMI 1788 细胞), 从而产生可溶性 LT - α 1/ β 2 异聚体。

LT - α 和 LT - β 多肽可以分别合成, 用温和的去污剂变性, 混和在一起再除去去污剂复性, 形成可被分离的混合的 LT 异聚体 (见下)。

LT - α 1/ β 2 复合体的纯化

用 TNF 和 LT - β 受体作为亲和纯化试剂层析将可溶性 LT - α 1/

β 2 异聚体从共表达的具有不同亚单位计量关系的复合体中分离出来。TNF 受体只结合在 LT 复合体的 α/α 裂隙中。LT - β 受体与 LT - α/β 异聚体的 β/β 裂隙高亲和力结合, 与 α/β 裂隙低亲和力结合。因此, LT - α 3 和 LT α 2/ β 1 将结合 TNF - R。LT - β - R 也结合 LT - α 2/ β 1 三聚体(在 α/β 裂隙中)但不能结合 LT - α 3。另外, LT - β - R (并非 TNF - R) 结合 LT α 1/ β 2 和 LT - β n (这样的制剂的确切组成未知, 但它们是很大的集合体)。

受体亲和试剂可以制备成可溶性的胞外结构域(例如见 Loetscher 等, 生物学化学杂志, 266, pp.18324-29(1991)) 或者为胞外配体结合区域偶联到一个免疫球蛋白 Fc 区域上的嵌合蛋白(Loetscher 等, 生物学化学杂志, 266, pp.18324-29(1991); Crowe 等, 科学, 264, pp.707-710(1994))。以常规的方法用化学交联将受体偶联到亲和基质上。

有二种方案利用受体和免疫亲和层析可以纯化 LT - α 1/ β 2 配体。第一种方案中, 来自共表达 LT - α 和截短 LT - β 形式的合适表达系统的上清液经过一个 TNF - R 柱。TNF - R 将结合 LT - α 3 和 LT - α 2/ β 1 三聚体。流出 TNF - R 柱的液体将包含 LT - β (n) 和 LT - α 1/ β 2。

第二种方案中, 所有的 LT - β 包含形式(LT - β (n)、LT - α 1/ β 2 和 LT - α 2/ β 1) 用经典的方法例如离液剂或 pH 变化结合于 LT - β - R 柱上并从中洗脱下来。(LT - α 3 流过这样的柱)。洗脱液被中和或除去离液剂, 然后通过一个 TNF - R 柱, 该柱只结合 LT - α 2/ β 1 三聚体。流过这个柱的溶液将含有 LT - β (n) 和 LT - α 1/ β 2 三聚体。

在二种情况下, 纯的 LT - α 1/ β 2 三聚体能够通过随后的本领域已知的凝胶过滤和/或离子交换层析与 LT - β 分离。

另一选择是, 不同形式的 LT - α/β 异聚体可以用各种传统的层析方法分离和纯化。结合一系列传统的纯化方案和上述的免疫亲和纯化步骤中的一种也可能是比较好的。

LT - β - R 阻滞剂的筛选

在本发明的一个实施方案中, LT - β - R 阻滞剂包括抗 LT - β

- R 的抗体, 它阻止 LT - β - R 信号传导。优选抗 LT - β - R 抗体是单克隆抗体 (mAb)。一个这样的抑制性的抗 LT - β - R mAb 是 BDA8 mAb。

抑制性的抗 LT - β - R 抗体和其他的 LT - β - R 阻滞剂能用检测一种或多种试剂结合 LT - β - R 或 LT 配体的能力, 或者阻止细胞上 LT - β - R 信号传导效应的能力的筛选方法确定。

一种筛选方法利用了 LT - β - R 信号传导在带有 LT - β - R 的肿瘤细胞上的细胞毒作用。肿瘤细胞被暴露给一种或多种诱导 LT - β - R 信号传导的 LT - β - R 激活剂。LT - β - R 激活剂包括 IFN - γ 存在下的 LT - α / β 异聚体 (最好是可溶性 LT - α 1/ β 2) 或激活性抗 LT - β - R 抗体 (见下; 在本申请人的共同未决美国申请流水号 08/378,968 中也描述了)。在下面的实验中, 能阻止 LT - β - R 信号传导的抗体和其他试剂基于他们阻止 LT - β - R 信号传导对肿瘤细胞的细胞毒作用的能力而被筛选出来:

- 1) 肿瘤细胞如 HT29 细胞在一系列含有培养基和至少一种 LT - β - R 激活剂的培养孔中培养 3 到 4 天, 培养基中含有或缺少被检测试剂的系列稀释液;
- 2) 将一种测试线粒体功能的活体染料如 MTT 加到肿瘤细胞混合物中反应几个小时;
- 3) 用 550nm 波长的光测量每个孔中混合物的光密度值 (OD 550)。OD550 与每个孔中存在 LT - β - R 激活剂和待测 LT - β - R 阻滞剂时仍存活的肿瘤细胞数成比例。在这个实验中能至少降低 LT - β - R 活化的肿瘤细胞细胞毒性 20 % 的试剂或试剂组合就是本发明范围内的 LT - β - R 阻滞剂。

任何能活化 LT - β - R 信号传导的试剂或试剂组合能用于上述实验以鉴定 LT - β - R 阻滞剂。诱导 LT - β - R 信号传导的 LT - β - R 激活剂 (例如激活性抗 LT - β - R mAb) 可以基于它们用上述肿瘤细胞实验单独或与其他试剂联合激发肿瘤细胞细胞毒性的能力而被筛选出来。

筛选 LT - β - R 阻滞剂的另一种方法是检测推定试剂直接干扰 LT

配体-受体结合的能力。能阻止配体-受体结合至少 20 % 的试剂或试剂组合是本发明范围内的 LT - β - R 阻滞剂。

许多能测量配体-受体结合力的实验的任何一种可用于与推定的 LT - β - R 阻滞剂一起进行竞争实验。受体与配体之间的结合力可用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 或放射性免疫实验 (RIA) 测量。特异性结合也可以用荧光标记的抗体-抗原复合物和进行荧光激活的细胞分类 (FACS) 分析测量, 或者实行其他的类似免疫检测方法测量, 所有的方法都是本领域中熟知的技术。

配体-受体结合反应也可以用 BIAcore 仪器 (Pharmacia Biosensor) 测量, 该仪器利用细胞质基因组共振检测 (Zhou 等, 生物化学, 32, pp.8193-98(1993); Faegerstram 和 O'Shannessy, “亲和技术中的表面细胞质基因组共振检测”, 《亲和层析手册》 Handbook of Affinity Chromatography, pp.229-52, Marcel Dekker, Inc., 纽约(1993))。

BIAcore 技术是先将受体结合到金表面, 然后上面流过配体。细胞质基因组共振检测直接定量在一定时间内结合到表面的质量。该技术得到结合和脱离的速率常数, 这样在出现和缺少推定的 LT - β - R 阻滞剂的情况下直接确定配体-受体的解离常数和亲和常数。

利用这样或那样的技术来测量受体-配体相互作用可以估计一种 LT - β - R 阻滞剂单独或与其他试剂联合阻止表面或可溶性 LT 配体结合表面或可溶性 LT - β - R 分子的能力。这样的实验也可以用于检测 LT - β - R 阻滞剂或其衍生物 (例如, 融合体、嵌合体、突变体和化学变化形式) - 单独或联合 - 以最优化改变了的试剂阻止 LT - β - R 活化的能力。

可溶性 LT - β - R 分子的产生

本发明的一个实施方案中的 LT - β - R 阻滞剂由可溶性 LT - β 受体分子组成。图 1 显示了人 LT - β - R 胞外部分的序列, 它编码配体结合区域。利用图 1 中的序列信息和本领域熟知的重组 DNA 技术, 编码 LT - β - R 配体结合区域的功能片段可被克隆到一个载体上并在合适的宿主中表达, 产生可溶性 LT - β - R 分子。根据这里描述的实验, 能与天然 LT - β 受体竞争性结合 LT 配体的可溶性 LT - β - R 分子被

选为 LT - β - R 阻滞剂。

含有选自图 1 所示的氨基酸序列的可溶性 LT - β 受体可以连上一个或多个异源的蛋白区域（“融合区域”）以增大受体融合蛋白在体内的稳定性，或者调节它的生物活性或定位。

优选稳定的血浆蛋白 - 通常在循环中的半寿期大于 20 小时 - 构建受体融合蛋白。这样的血浆蛋白包括，但不限于：免疫球蛋白、血清白蛋白、脂蛋白、载脂蛋白和转运蛋白。能将可溶性 LT - β - R 分子导向特异的细胞或组织类型的序列也可以连到 LT - β - R 配体结合区域，产生特殊定位的可溶性 LT - β - R 融合蛋白。

含有 LT - β - R 配体结合区的 LT - β - R 胞外区域（图 1）的全部或一个功能部分可以融合于一个免疫球蛋白的恒定区，比如人 IgG1 重链的 Fc 区域（Browning 等，免疫学杂志,154,pp.33-46(1995)）。可溶性受体 - IgG 融合蛋白是优选的，是常见的免疫试剂，它们的构建方法在本领域已知（参见例如，美国专利号 5,225,538）。

具功能的 LT - β - R 配体结合区域可融合于来自 IgG1 之外的免疫球蛋白类或亚类的免疫球蛋白（Ig）Fc 区域。属于不同 Ig 类或亚类的抗体的 Fc 区域能激活各种次级效应功能。当 Fc 区域结合于相应的 Fc 受体时就产生了激活作用。次级效应功能包括激活补体系统、穿过胎盘和结合各种微生物蛋白的能力。免疫球蛋白不同类和亚类的性质描述于 Roitt 等，免疫学(Immunology),p.4.8(Mosby-Year Book Europe Ltd.,3d ed.1993)。

补体系统的活化启动了介导炎症的酶级联反应。补体系统的产物具有各种不同的功能，包括结合细菌、胞吞作用、吞噬作用、细胞毒作用、自由基产生和免疫复合物溶解。

补体酶级联反应能被结合抗原的 IgG1、IgG3 和 IgM 抗体的 Fc 区域激活。IgG2 的 Fc 区域表现出较低的效力，IgG4、IgA、IgD 和 IgE 的 Fc 区域则不能激活补体。这样可以根据是否在特殊的免疫应答或用 LT - β - R - Fc 融合蛋白治疗疾病时需要相应的次级效应功能来选择 Fc 区域。

如果损伤或杀死带 LT 配体的靶细胞是有利的话，可以选择特别有

活性的 Fc 区域 (IgG1) 来制备 LT - β - R - Fc 融合蛋白。另一选择是, 如果想要把 LT - β - R - Fc 导向细胞而不启动补体系统, 可选择无活性的 IgG4 Fc 区域。

减少或除去结合 Fc 受体和补体活化功能的 Fc 区域的突变已被描述过 (S.Morrison, Annu.Rev.Immunol., 10, pp.239-65(1992))。可以单独或联合应用这些或其他的突变, 以最优化用于构建 LT - β - R - Fc 融合蛋白的 Fc 区域的活性。

含有配体结合序列和与其融合的人免疫球蛋白 Fc 区域的可溶性人 LT - β - R 融合蛋白 (hLT - β - R - Fc) 的产生在实施例 1 中描述。根据实施例 1 制备的分泌 hLT - β - R - Fc 的 CHO 细胞系称作 “hLT β ; R - hG1CHO # 14” 根据布达佩斯条约的规定, 该细胞系的样品于 1995 年 7 月 21 日已在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (Rockville, MD) 保藏, 指定的 ATCC 入藏号为 CRL11965。

可溶性鼠 LT - β - R 融合分子 (mLT - β - R - Fc) 的产生在实施例 2 中描述。根据实施例 2 制备的分泌 mLT - β - R - Fc 的 CHO 细胞系称作 “mLT β ; R - hG1CHO # 1.3.BB”。根据布达佩斯条约的规定, 该细胞系的样品于 1995 年 7 月 21 日已在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (Rockville, MD) 保藏, 指定的 ATCC 编号为 CRL11964。

对公众获得上述 ATCC 保藏物的所有限制将随着本申请被授予专利而取消。

形成受体 - Ig 融合蛋白连接点的不同的氨基酸残基可以改变可溶性 LT - β 受体融合蛋白的结构、稳定性和最终生物活性。可以在所选择的 LT - β - R 片段的 C 末端加上一个或多个氨基酸修饰与所选择的融合区域的连接点。

LT - β - R 融合蛋白的 N 末端也可以通过改变所选择的 LT - β - R DNA 片段为插入重组表达载体而在 5' 末端切断的位置而发生变化。每个 LT - β - R 融合蛋白的稳定性和活性可以被检测, 用这里描述的选择 LT - β - R 阻滞剂的常规实验和测定达到最优化。

利用图 1 所示的胞外区域中的 LT - β - R 配体结合区的序列也可

以构建氨基酸序列变异体以修饰可溶性 LT - β 受体或融合蛋白对 LT 配体的亲和性。本发明的可溶性 LT - β - R 分子能与内源的细胞表面 LT - β 受体竞争表面 LT 配体。可见,任何含有能与细胞表面 LT - β 受体竞争 LT 配体的 LT - β - R 配体结合区域的可溶性分子都是本发明范围内的 LT - β - R 阻滞剂。

作为 LT - β - R 阻滞剂的可溶性 LT - β - R 分子

可溶性人 LT - β 受体 - 免疫球蛋白融合蛋白 (h LT - β - R - Fc) 是根据实施例 1 的方法制备的,在人 HT29 肿瘤细胞中检查它阻止 LT - β - R 诱导的细胞毒性的能力。表 1 (实施例 3) 比较了可溶性 LT - β 受体 (h LT - β - R - Fc) 与 TNF 受体 (p55 - TNF - R - Fc) 融合蛋白阻止各种 TNF 和可溶性 LT 配体对 HT29 肿瘤细胞生长的抑制作用的能力。

表 1 的数据指出了可溶性 LT - β 受体 (h LT - β - R - Fc) 阻止 LT - α 1/ β 2 配体和细胞表面 LT - β 受体相互作用而导致的肿瘤细胞死亡 50 % 的浓度。根据本发明,能阻止肿瘤细胞生长至少 20 % 可确定此可溶性 LT - β 受体为 LT - β - R 阻滞剂。正如所料,通过结合 TNF 和防止它与表面受体相互作用,可溶性 TNF - R 融合蛋白 (p55-TNF-R-Fc) 完全阻止了 TNF 诱导的生长抑制。

可溶性 TNF - R 融合蛋白不影响 LT 配体 (LT - α 1/ β 2) 介导的抗增殖效应。相比之下,LT - β - R 融合蛋白阻止 LT 配体效应而不阻止 TNF 或 LT - α 效应。因此,可溶性人 LT - β - R 融合蛋白不干扰 TNF 和 LT - α 配体活化 TNF - R。

为确定是否 LT - β - R 信号传导在小鼠中对肿瘤细胞也有细胞毒性,以及是否可溶性 LT - β - R 融合蛋白能阻止 LT - β - R 诱导的细胞毒作用,用小鼠的肿瘤细胞进行了类似实验。检测了一种可溶性鼠 LT - β - R - Fc 融合蛋白阻止用 LT 配体处理的鼠 WEHI 164 细胞死亡的能力 (实施例 4)

图 2 显示了可溶性鼠 LT - β - R (m LT - β - R - Fc) 在鼠 WEHI 164 细胞中对 LT 配体诱导的 LT - β - R 信号传导的作用。正如此实验所表明的,用可溶性 LT - α 1/ β 2 配体处理,WEHI 164 细胞

被杀死了。加入 m LT - β - R - Fc 阻止了 LT 配体激活的细胞死亡。对照的 TNF 受体融合蛋白 (p55 TNF-R-Fc) 在阻止细胞死亡上只有很小的作用。

这些数据显示, 可溶性 LT - β - R 融合蛋白能有效地与表面 LT - β - R 分子竞争结合 LT 配体。因此, 可溶性 m LT - β - R - Fc 融合蛋白可作为小鼠的 LT - β - R 阻滞剂。

抗人 LT - β - R 抗体的来源

在本发明的另一实施方案中, 抗人 LT - β 受体的抗体 (抗 LT - β - R Abs) 作为 LT - β - R 阻滞剂起作用。本发明的抗 LT - β - R 抗体可以是多克隆或单克隆的 (mAb), 能被修饰以最优化它们阻止 LT - β - R 信号传导的能力、体内的生物利用度、稳定性或其他的想获得的特性。

抗人 LT - β 受体的多克隆抗体血清用传统技术制备, 用人 LT - β 受体 - Fc 融合蛋白 (实施例 1) 在完全弗氏佐剂中皮下注射动物, 例如山羊、兔子、大鼠、仓鼠或小鼠, 接着在不完全弗氏佐剂中进行辅助的腹膜内或皮下注射。含有想要的抗 LT - β 受体抗体的多克隆抗血清用传统的免疫学方法筛选。

抗人 LT - β 受体 - Fc 融合蛋白的鼠单克隆抗体 (mAb) 如实施例 5 中所述进行制备。产生鼠抗人 LT - β - R mAb BDA48 的一个杂交瘤细胞系 (BD.A8.Ab9) 已根据布达佩斯条约的规定, 于 1995 年 1 月 12 日在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 保藏。对公众获得上述 ATCC 保藏物的所有限制将随着本申请被授予专利而取消。

抗 LT - β - R 抗体的不同形式也能用标准的重组 DNA 技术 (Winter 和 Milstein, 自然(Nature),349,pp.293-99(1991)) 制备。例如, “嵌合”抗体能通过把来自动物抗体的抗原结合区域连接到人的恒定区域上而构建成 (例如, Cabilly 等, US4,816,567; Morrison 等, 美国国家科学院院报 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.), 81, pp.6851-55(1984))。嵌合抗体减少了动物抗体用于人临床治疗时引发的免疫原应答。

另外, 识别 LT - β - R 的重组 “人源化抗体” 能合成出来。人源化抗体是包含插入了负责特异性抗原结合区域的大部分人 IgG 序列的嵌

合体（例如，WO94/04679）。用适当的抗原免疫动物，分离相应的抗体，移出负责特异性抗原结合的可变区序列部分。然后把来源动物的抗原结合区域克隆到删除了抗原结合区域的人抗体基因的适当位置。人源化抗体在人抗体中最少地应用了异源（种间）序列，在被治疗的受试者中很少引发免疫反应。

不同类重组抗LT- β -R抗体的构建也可以通过制备嵌合的或人源化抗体来完成，它含有抗LT- β -R可变区和从不同类免疫球蛋白中分离出的人恒定区（CH1，CH2，CH3）。例如，具有增加的抗原结合位价的IgM抗体能通过克隆抗原结合位点到带有人 μ 链恒定区的载体中而重组产生（Arulanandam等，实验医学杂志（J.Exp.Med.）177,pp.1439-50(1993);Lane等，欧洲免疫学杂志（Eur.J.Immunol.）22,pp.2573-78(1993);Traunecker等，自然，339,pp.68-70(1989)）。

另外，标准的重组DNA技术能用于改变重组抗体结合抗原的亲合力，通过改变抗原结合位点附近的氨基酸残基而实现。人源化抗体的抗原结合力能用基于分子模拟的突变提高（Queen等，美国国家科学院院报，86,pp.10029-33(1989);WO94/04679）。

根据靶组织的类型或设想的特殊治疗安排来增大或减小抗LT- β -R抗体对LT- β -R的亲合力可能是需要的。例如，用稳定水平的降低了通过LT- β 途径进行信号传导的能力的抗LT- β -R抗体治疗病人对于半预防性治疗是有利的。同样地，增大了对LT- β -R的亲合力的抑制性抗LT- β -R抗体对于短期治疗有利。

作为LT- β -R阻滞剂的抗LT- β -R抗体

作为LT- β -R阻滞剂的抗LT- β -R抗体可以通过检测它们在肿瘤细胞中抑制LT- β -R诱导的细胞毒作用的能力而选择出来（实施例5）。

在本发明的一个优选的实施方案中，组合物和方法包括鼠抗人LT- β -R mAb BDA8。图3显示mAb BDA8充当了本发明定义的LT- β -R阻滞剂。有IFN- γ 和可溶性LT α 1/ β 2配体时WiDr肿瘤细胞停止生长。对照抗体（IgG1）在生长抑制上没有作用。相比之下，抗

LT - β - R mAb BDA8 阻止了可溶性 LT - α 1/ β 2 配体抑制 WiDr 细胞生长的能力。因此, 抗人 LT - β - R 的抗体可作为本发明定义的 LT - β - R 阻滞剂起作用。

通过检测其他抗人 LT - β 受体的抗体, 预计能用这里描述的实验和测试鉴定出另外的可作为人 LT - β - R 阻滞剂的抗 LT - β - R 抗体。

抗表面 LT 配体的抗体来源

本发明另一个优选的实施方案涉及的组合物和方法含有作为 LT - β - R 阻滞剂的抗 LT 配体的抗体。与上面描述抗 LT - β - R 抗体一样, 抗 LT 配体的抗体作为 LT - β - R 阻滞剂可以是多克隆或单克隆的, 能根据常规方法进行修饰, 调节它们的抗原结合性质和免疫原性。

本发明的抗 LT 抗体可以分别抗二种 LT 亚单位中的任何一种, 包括可溶的、突变的、改变的和嵌合形式的 LT 亚单位。如果把 LT 亚单位用作抗原, 则优选 LT - β 亚单位。如果用 LT - α 亚单位, 优选使得到的抗 LT - α 抗体结合表面 LT 配体而不会与分泌的 LT - α 发生交叉反应或调节 TNF - R 的活性 (根据实施例 3 描述的实验)。

另一选择是, 可产生抗含有一个或多个 LT 亚单位的均聚 (LT - β) 或异聚 (LT - α / β) 复合体的抗体并筛选作为 LT - β - R 阻滞剂的活性。优选用 LT - α 1/ β 2 复合体作抗原。正如上面讨论的, 获得的抗 LT - α 1/ β 2 抗体优选结合表面 LT 配体而不结合分泌的 LT - α 也不影响 TNF - R 活性。

多克隆抗人 LT - α 抗体的产生在申请人的共同未决申请 (WO 94/13808) 中描述了。单克隆抗 LT - α 和抗 LT - β 抗体也被描述了 (Browning 等, 免疫学杂志, 154, pp.33-46(1995))。

小鼠抗人 LT - β mAb 按实施例 6 中所述进行制备。产生小鼠抗人 LT - β - R mAb B9 的一个杂交瘤细胞系 (B9. C9.1) 已根据布达佩斯条约的规定于 1995 年 7 月 21 日在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (Rockville, MD) 保藏, 指定的 ATCC 编号为 HB11962。

单克隆仓鼠抗小鼠 LT - α / β 抗体按实施例 7 中所述进行制备。产生仓鼠抗小鼠 LT - α / β mAb BB.F6 的一个杂交瘤细胞系

(BB.F6.1) 已按照布达佩斯条约的规定于 1995 年 7 月 21 日在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (Rockville, MD) 保藏, 指定的 ATCC 编号为 HB 11963。

对公众获得上述 ATCC 保藏物的所有限制将随着本申请被授予专利权而取消。

作为 LT - β - R 阻滞剂的抗 LT 配体的抗体

发展了一种荧光活化细胞分类实验 (FACS) 去筛选能作为 LT - β - R 阻滞剂的直接抗 LT 亚单位和 LT 复合体的抗体(实施例 6 和 7)。在这个实验中, 可溶性人 LT - β - R - Fc 融合蛋白在递增量实验抗体存在的情况下被加给 PMA - 活化的 II - 23 细胞 - 该细胞表达表面 LT 复合体 (Browning 等, 免疫学杂志, 154, pp.33-46(1995))。能抑制 LT - β 受体 - 配体相互作用至少 20 % 的抗体被选为 LT - β - R 阻滞剂。

图 4 显示了该实验检测小鼠抗人 LT - β mAbB9 的结果。图 4 表明抗 LT - β mAb B9 能选择性地阻止可溶性 LT - β - R - Fc 融合蛋白结合到活化细胞上诱导的表面 LT 配体。这些结果证明直接抗 LT 配体亚单位的抗体可作为 LT - β - R 阻滞剂。

上述的 FACS 实验也用于检测提自仓鼠的抗可溶性小鼠 LT - α / β 复合体的 mAb (实施例 7)。检测仓鼠抗小鼠 LT - α / β mAb BB.F6 的实验结果见表 2 (实施例 7)。表 2 显示抗 LT - α / β mAb BB.F6 能有效地阻止可溶性 m LT - β - R - Fc 融合蛋白 (实施例 2) 结合到小鼠 T 细胞杂交瘤上表达的表面 LT 配体, 因此它是本发明的一种 LT - β - R 阻滞剂。

用 LT - α / β 复合体而不是 LT 亚单位作为抗原去免疫动物可以导致更有效的免疫, 或者致使抗体对表面 LT 配体有更高的亲和力。可以想象用 LT - α / β 复合体免疫后, 能识别 LT - α 和 LT - β 亚单位上的氨基酸残基 (例如形成 LT - α / β 裂隙的残基) 的抗体可以被分离出来。通过检测直接抗人 LT - α / β 异聚体的抗体, 可以预计能用这里描述的实验和测试鉴定出另外的作为 LT - β - R 阻滞剂的抗 LT 抗体。

抑制小鼠中 Th1 细胞介导的接触型超敏反应的 LT - β - R 阻滞剂

本发明的 LT - β - R 阻滞剂能抑制 Th1 细胞介导的免疫应答。Th1 介导的一种应答是迟发性超敏反应 (DTH; Cher 和 Mosmann, 免疫学杂志, 138, pp.3688-94(1987); 普遍讨论又见 I.Roitt 等, 免疫学, pp.22.1-22.12, Mosby-Year Book Europe Ltd., 第 3 版(1993))。DTH 是当抗原致敏的 Th1 细胞再次接触相同抗原而分泌细胞因子时引发的。Th1 细胞因子吸引和活化巨噬细胞释放其他的效应分子, 引发炎症反应。

DTH 反应被分为三种不同类型: 接触型超敏反应、结核菌素型超敏反应和肉芽肿型超敏反应。当外源抗原直接应用或注射到致敏的受试者皮下后, 根据对外源抗原应答的速度和性质可以区分三种类型的超敏反应 (HS)。测量皮肤变厚的速度和程度可监测 DTH 反应。

结核菌素型 HS 反应是皮肤反应, 它发生在来自微生物的外源抗原的注射处, 受试者过去曾接触过该微生物 (例如结核分支杆菌或麻疯分支杆菌)。这种皮肤反应最长达 48 到 72 小时, 常被用作诊断过去遇到过的微生物的敏感性测试的基础 (例如结核菌素皮试)。当一个结核菌素型病灶发展时, 如果抗原还在组织中它能变为一个肉芽肿型反应。

肉芽肿型反应是临床上最严重的 DTH 反应, 因为它们将导致许多与 Th1 细胞介导的疾病相关的病理学效应。当抗原或免疫复合物不能从巨噬细胞清除并继续刺激 Th1 细胞因子分泌时肉芽肿型反应便发生了。刺激部位的慢性炎症和活化的巨噬细胞聚集是肉芽肿型反应的特征。

上皮细胞和巨噬细胞为核心, 也可能围绕着淋巴细胞和纤维状沉积, 形成一个坚硬的结构叫做肉芽肿。有时在肉芽肿的核心大量细胞死亡 (例如在染结核病的肺组织中)。大约 4 个星期肉芽肿型反应的靶组织发生硬化。

影响肉芽肿形成频率的试剂能用血吸虫感染的小鼠鉴定 (Amiri 等, 自然, 356, pp.604-607(1992))。血吸虫 (血蛭) 能引起寄生虫病, 致使在被感染的肝的门静脉中围绕着血吸虫卵形成肉芽肿。抑制这种 Th1 细胞介导的 DTH 反应的试剂可以减小肉芽肿的大小, 或者在血吸虫感染的小鼠肺中的肉芽肿形成频率和速率。用随时间递增的 LT - β - R 阻滞剂的浓度来处理小鼠, 测量小鼠中形成的肉芽肿的数目和大小, 从而估计细胞对血吸虫卵的反应。

接触型超敏反应 (CHS) 是 DTH 的一类, 它的靶器官是皮肤。在 CHS 中, 炎症反应起因于皮肤上局部使用有反应性的半抗原。变应原通常含有至少一个半抗原分子, 半抗原分子一般太小而不能单独具有抗原性。半抗原透过表皮与皮肤下的正常蛋白反应产生一个新的抗原复合体。

致敏的受试者再次遇到半抗原时引发 DTH 反应。半抗原载体蛋白偶联物与抗原呈递细胞联合活化启动释放细胞因子 (包括 IL - 2, IL - 3、IFN - γ 和 GM - CSF) 的效应机制。释放的细胞因子的级联反应使 CD4 + T 细胞增殖, 各种细胞表面粘连分子的表达类型改变, 以及吸引 T 细胞和巨噬细胞到皮肤的发炎部位。细胞因子级联反应和所导致的血管舒张、细胞浸润和真皮、表皮水肿促使靶组织肿大和发炎, 这可以说明为什么在对 DTH 反应的应答中皮肤有可测量的变厚。

特殊的半抗原致敏个体的程度依赖于各种因素。这些因素包括半抗原穿透皮肤的效果和与宿主载体蛋白形成偶联物的情况。一种几乎能致敏所有个体的半抗原是 2, 4 - 二硝基氟苯 (DNFB)。

对于如 DNFB 的半抗原的皮肤 CHS 反应是细胞介导免疫的典型动物模型。将这种 CHS 反应定位到致敏小鼠的耳朵上可以通过测量耳朵厚度容易、准确和可重复性地定量体内的这种细胞介导的免疫反应。鼠 CHS 反应的细节和 DNFB 介导的炎症反应的组织病理学已被报道 (Chisholm 等, 欧洲免疫学杂志 23,pp.682-688(1993))。

DNFB 的这种在大多数个体中诱导接触型超敏反应的能力可以用于鉴定减小或消除与 Th1 细胞介导的 DTH 反应相关的炎症反应的试剂。可溶性鼠 LT - β - R - Fc 融合蛋白有效地抑制小鼠中 DNFB 诱导的接触型超敏反应 (实施例 8)。初级致敏小鼠是连续二天把 DNFB 涂在每只后脚的底部。五天之后, 将亚刺激剂量的含于载体溶液中的 DNFB 涂到左耳的表面。单独载体溶液涂到右耳上作为对照。

然后将递增浓度的 LT - β - R 阻滞剂 m LT - β - R - Fc (实施例 2) 静脉注射到小鼠中 (实施例 8)。只注射 PBS 缓冲液或者人 IgG 融合蛋白 (LFA3 - Fc) 作为阴性对照。注射已知能抑制 CHS 的抗 VLA4 特异性 mAb (PS/2 mAb) 作为阳性对照。24 小时后, 测量每只耳朵

(DNFB 攻击的和未攻击的)的厚度。对比治疗组和阴性对照组,判断 LT- β -R 阻滞剂对耳肿大反应的抑制。

图 5 显示,与不被抑制的 DNFB 处理的对照动物(PBS 和 LFA3-FC)相比,mLT- β -R-Fc 明显减小了 DNFB 处理小鼠的耳肿大反应。可溶性 LT- β -R 能与抑制剂抗 VLA4 特异性 mAb(PS/2 mAb)一样有效地阻止这种 CHS 反应,后者靠阻止 T 细胞流到攻击部位而起作用(Chisholm 等, 欧洲免疫学杂志,23,pp.682-88(1993))。

这些资料显示给动物服用时,在体外作为 LT- β -R 阻滞剂的可溶性 LT- β -R 融合蛋白也能有效地阻止 Th1 细胞介导的免疫反应。本发明体外鉴定的 LT- β -R 阻滞剂能用这个耳肿大实验或者诸如上面描述的那些其他的 DTH 实验检测,以选择出其他的能在体内有效降低 Th1 细胞相关的免疫反应程度的 LT- β -R 阻滞剂。

LT- β -R 阻滞剂不抑制 Th2 细胞介导的(体液的)免疫应答

如上所示,本发明的 LT- β -R 阻滞剂能阻止 Th1 细胞介导的效应机制,例如接触型迟发性超敏反应(图 5)。这种 Th1 细胞介导的反应被抑制了而不明显影响 Th2 细胞依赖性的反应。LT- β -R 阻滞剂在 Th1 细胞介导的免疫应答上的差别效应通过在 LT- β -R 阻滞剂存在的情况下监测 Th2 细胞依赖性的免疫应答—例如初次抗体应答和同种型转换—显示出来。

十天内用可溶性 LT- β -R 融合蛋白(mLT- β -R-Fc; 实施例 2)或者对照的 IgG 融合蛋白(LFA3-Fc)注射小鼠五次,同时另一些小鼠不处理。第二次注射后,所有小鼠都在尾巴基部注射含有 100 μ g 卵清蛋白的完全佛氏佐剂 100 μ l。11 天之后,用 ELISA 特异性地针对 IgG1、IgG2a 和 IgM 同种型分析初次的血清中抗卵清蛋白的特异性抗体的效价。

图 6 显示了在卵清蛋白免疫过的小鼠中,小鼠 LT- β -R 阻滞剂 mLT- β -R-Fc 对产生血清抗卵清蛋白抗体的影响(实施例 6)。施用 LT- β -R 阻滞剂不能明显影响卵清蛋白免疫后初次抗体的效价。相比之下,用 CD40 配体诱导的 CD40 受体信号传导干扰,完全阻止了小鼠中抗原特异性的 IgG 应答(Renshaw 等, 实验医学杂

志,180,pp.1889-1990(1994)。CD40 是 TNF 家族的另一个配体/受体对。

全部免疫球蛋白的产生和成熟都明显依赖于 Th2 细胞。然而,也有证据表明 Th1 细胞因子 IFN - γ 参与了 IgG2a 亚类转换,但不是绝对必需的 (Huang 等, 科学,259,pp.1742-45(1993))。LT - β - R 阻滞剂 m LT - β - R - Fc 在这些实验中不抑制 IgG2a 转换。有可能本发明的 LT - β - R 阻滞剂不阻止 Th1 细胞介导反应的这一体液方面。另外,来自 m LT - β - R - Fc 处理的小鼠的淋巴细胞的增殖应答没有降低 (实施例 10; 图 7)。

这些实验表明,以施用本发明的 LT - β - R 阻滞剂为基础的方法对于免疫应答中 Th2 依赖的抗体生产功能没有不利影响。图 6 中所示的抗体应答的正常方式也意味着用可溶性 m LT - β - R - Fc 进行密集治疗对小鼠是无毒的,进一步表明了本发明前面所列的组合物和方法的有用治疗性质。

辅助性 T 细胞介导的疾病

许多器官特异性的自身免疫情况涉及病理学的 Th1 应答。对这样的资料已做过综述 (Modlin 和 Nutman,免疫学中的流行观点(Current Opinion in Immunol),5,pp.511-17(1993);Romagnani 等, Ann.Rev. Immunol,12,pp.227-57(1994))。这些器官特异性的自身免疫情况包括;多发性硬化、胰岛依赖性糖尿病、交感性眼炎、葡萄膜炎和牛皮癣。

胰岛素依赖性糖尿病是一种自身免疫疾病,它是由于白细胞侵入朗氏小岛而破坏了产生胰岛素的 β 胰腺细胞。转移活化的前糖尿病脾细胞能在新生的非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠中快速诱发糖尿病。最近, Th1 或 Th2 类似细胞, 否则是遗传相似的细胞被转移到新生的 NOD 小鼠中。在几乎所有受试者中只有 Th1 细胞快速诱导了糖尿病 (Katz 等, 科学,268,pp.1185-88(1995))。这表明本发明的 LT - β - R 阻滞剂 - 它能在体内抑制 Th1 细胞介导的免疫应答效应 - 对于治疗或预防胰岛素依赖性的糖尿病有用。

几种全身性自身免疫疾病 (包括各种关节炎) 是 Th1 细胞相关的。类风湿性关节炎和斯耶格伦氏综合症都涉及 Th0 和 Th1 细胞。相比之下, 全身性红斑狼疮 (SLE) 表现一种非常规的 Th0/Th2 主导的应答。

一些慢性炎症疾病也表现有非常规的 Th1 类型的应答, 包括炎性肠疾病、肺结节病和同种异体移植排斥。人类性肠疾病 (IBD) 至少包括二种: 溃疡性结肠炎和 Grohn 氏病。两种疾病都被认为起因于免疫病理学的自身免疫类紊乱。在一些 IBD 小鼠模型中, 清楚地看到一些阻止 Th1 应答的试剂能阻止该病的发展或进程 (F.Powrie 等, 免疫 (Immunity)1:553,1994)。可能免疫应答的 Th1 成分的抑制在人 IBD 中有有益的效应。许多 IBD 模型已被描述和回顾 (C.Elson 等, 胃肠病学 (Gastroenterology)109:1344 1995)。至少有三组模型: 化学诱导的、聚合物/微生物诱导的和使用突变小鼠的免疫类型。

在一个常用的聚合物/微生物诱导的模型中, 引入硫酸葡聚糖溶液到小鼠的饮水中, 吸收时肠的上皮细胞防线被刺激, 导致对伤害的深度免疫应答。动物发生结肠炎, 其症状为腹泻、粪便中有血、体重减轻和由于结肠壁膨胀而造成结肠缩短。该模型诱发了左侧结肠炎和上皮细胞发育异常。后者会导致癌症, 这是溃疡性结肠炎的特征。

另一个模型是把选择的一组 CD4 T 细胞移植到 Scid 小鼠中, 例如缺乏 T、B 细胞的小鼠 (F.Powrie 等, 国际免疫学 (International Immunology)5:1461-1471,1993, Morrissey 等, 实验医学杂志.178:237 1993)。当被选择的细胞 - 称为 CD45RB^{hi} 细胞 - 扩展成为 Scid 小鼠的成分时, 防止出现自身反应性 T 细胞的正常机制发生功能障碍, 自身反应性细胞就出现了。在大鼠中观察到与许多器官反应的细胞, 而在小鼠中反应性主要发生在肠。改变自身反应性细胞扩展和生长方式的试剂或能阻止细胞攻击肠的能力的试剂在这个模型中将是有效的。另外, 因为此模型至少部分地模拟了自身反应性免疫系统细胞的病理发展, 能抑制该模型的疗法实际上可能在人体中具有疾病缓和作用。在这个模型中, TNF 的抗体能阻止疾病 (F.Powrie 等, 免疫 1,552 1994), 发现它们在人类疾病治疗中是有效的 (H.M.Van Dullemen 等, 胃肠病学 109: 109 1995)。因此, 该模型能预言哪种试剂可能在治疗 IBD 中有用。此外, 因为 CD45RB 模型是一个 Th1 介导的疾病过程的例子, 而且在大鼠中该模型确实在许多器官中导致了疾病, 该系统中 LT β R - Ig 的效能意味着 LT β R Ig 或其他的阻断 LT β R 与其配体相互作用的方

法可以对很大范围的相关免疫疾病有益。

一般情况下，对抗特殊 T 细胞的自身抗体的精确作用还未在这些自身免疫疾病中描述出。细胞应答可能在那些目前被认为主要由抗体驱动的全身性自身免疫疾病（例如各种关节炎）的致病性上有主要作用。

对一些致病性感染剂的正常免疫应答也引发 Th1 应答，它可能过度而使自己成为医学问题。导致严重的医学问题的肉芽肿型反应（上面描述的一类 DTH 应答）的例子包括麻风病、结核病病人肺中的肉芽肿形成、结节病和血吸虫病（Roitt 等，免疫学，pp.22.5-6(Mosby-Year Book Europe Ltd.3d ed.1993)）。牛皮癣也可能是 Th1 细胞介导的。

溶细胞的 T 细胞即 CTL（CD8 阳性 T 细胞）也可再细分为 Th1 和 Th2 类群。所以可能许多已知的有关 Th1 群的东西也适用于 CD8 + 细胞，CD8 + 细胞主要涉及抗病毒和移植组织排斥反应。

用 LT - β - R 阻滞剂治疗

本发明的组合物将以有效剂量使用，治疗所述的特殊临床状态。对于给定的应用，优选的药剂和治疗有效的剂量方案的确定在本领域的技术范围内，考虑例如病人的状况和体重、希望治疗的程度和病人对治疗的耐受性来决定。大约 1mg/kg 可溶性 LT - β - R 的剂量认为是优化治疗剂量的合适起始点。

治疗有效剂量的确定也能通过进行体外实验来估计，测量 1 到 14 天覆盖靶细胞（根据所用阻滞剂，为 LT - β - R 或 LT 配体 - 阳性细胞）所需求的 LT - β - R 阻滞剂的浓度。上述的受体 - 配体结合实验也可用于监测细胞覆盖反应。用 FACS 能把 LT - β - R 或 LT 配体 - 阳性细胞从活化的淋巴细胞群中分离出来，基于这些体外结合实验的结果，可选择出合适的 LT - β - R 阻滞剂的浓度范围，根据上述实验在动物中测试。

本发明的可溶性 LT - β - R 分子、抗 LT 配体和抗 LT - β - R 的抗体（单独的或组合的形式，包括抗体或复合体的分离和纯化的形式，它们的盐或药物上可接受的衍生物）的施用可以用传统接受的显示免疫抑制活性的试剂的给药方式来完成。

这些治疗中所用的药物组合物也可以是各种各样的形式。例如包括

固体、半固体和液体制剂形式，诸如片剂、丸剂、粉剂、溶液或悬浮液、栓剂和可注射和可输液的溶液。优选的形式依赖于所企望的给药方法和治疗应用而定。给药方式可包括口服、肠胃外、皮下、静脉、病灶内的或表皮给药。

本发明的可溶性 LT - β - R 分子、抗 LT 配体和抗 LT - β - R 的抗体可以例如配制成无菌的等渗的形式，带有或没有刺激吸收或稳定性的辅助因子。优选液体形式，或者是冻干粉。例如，本发明的可溶性 LT - β - R 分子、抗 LT 配体和抗 LT - β - R 的抗体可以用含有 5.0mg/ml 单水合柠檬酸、2.7mg/ml 柠檬酸三钠、41mg/ml 甘露糖醇、1mg/ml 甘氨酸和 1mg/ml 多乙氧基醚 20 的配制缓冲液稀释。该溶液可被冻干，冰箱保存，使用前用无菌的注射用水（USP）再配制。

该组合物还优选含有传统的医药上可接受的本领域熟知的载体（参见，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, 1980, Mac Publishing company）。这样的药物上可接受的载体可包括其他的药用试剂、载体、遗传载体、佐剂、赋形剂等，诸如人血清白蛋白或血浆制备物。该组合物优选以单位剂量的形式通常每天用一次或多次。

本发明药物组合物也可以用微球、脂质体、其他的微粒转运系统给药或者以持续释放形式置于被感染组织或血流中、近旁、或以其他形式与之相联系。持续释放载体的适当例子包括半渗透的颗粒状聚合物基质，诸如栓剂或微囊。可植入的或微囊性持续释放基质包括聚乳酸（美国专利号 3,773,319; EP 58,481）、L - 谷氨酸和 L - 谷氨酸乙酯的共聚物（Sidman 等，生物聚合物(Biopolymers), 22, pp.547-56(1985)。多聚（2 - 羟乙基 - 甲基丙烯酸）或乙烯乙酸乙烯酯共聚物（Langer 等，J.Biomed.Mater.Res, 15, pp.167-277(1981); Langer, Chem.Tech, 12, pp.98-105(1982)）。

含有单一或组合形式的本发明可溶性 LT - β - R 分子、抗 LT 配体和抗 LT - β - R 抗体的脂质体可以用已熟知的方法制备（参见，例如 DE 3,218,121, Epstein 等，美国国家科学院院报, 82, pp.3688-92(1985); Hwang 等，美国国家科学院院报 77, pp.4030-34(1980); 美国专利号 4,485,045 和 4,544,545）。通常脂质体是小的（大约 200 - 800Å）

单层类型，其中脂含量大于大约 30mol % 胆固醇。选择胆固醇的比例以控制可溶性 LT - β - R 分子、抗 LT 配体和抗 LT - β - R 的抗体释放的最佳速率。

本发明的可溶性 LT - β - R 分子、抗 LT 配体和抗 LT - β - R 的抗体也可连到含有其他 LT - β - R 阻滞剂免疫抑制剂或调节该 LT - β - R 阻止活性的细胞因子的脂质体上。LT - β - R 分子、抗 LT 配体和抗 LT - β - R 的抗体与脂质体的连接可用任何已知的交联剂来实现，例如已广泛用于偶联毒素或化学治疗剂到抗体上以进行靶向转运的异双功能交联剂。与脂质体的偶联也可以使用糖指导的交联剂 4（4 - 马来酰亚胺苯基）丁酸酰肼（MPBH）（Duzgunes 等, 细胞生物化学杂志(J.Cell Biochem.)Abst.Suppl.16E 77(1992)）。

含有 LT - β - R 阻滞剂的治疗用组合物的优点

本发明的 LT - β - R 阻滞剂能选择性地抑制 Th1 而非 Th2 细胞依赖性的免疫效应机制。LT - β - R 阻滞剂将对治疗由 Th1 型细胞因子（例如 IL - 2 和 IFN - γ ）的活性恶化的疾病有用。因为 Th1 细胞因子能抑制 Th2 细胞依赖性应答，LT - β - R 阻滞剂也可以间接刺激通常被 Th1 诱导的细胞因子级联系统抑制的某些 Th2 细胞依赖性应答。

选择性抑制 Th1（或间接刺激 Th2）细胞应答的能力对治疗各种细胞介导的免疫应答失常有用，包括各种自身免疫和慢性炎症情况、抗原耐受、以及组织和器官移植的细胞排斥。

正如上面所讨论的，Th1 细胞为基础的免疫病的治疗采用对多种细胞类型和免疫应答具有多向效应的免疫调节剂和免疫抑制剂。这些非特异性的免疫抑制剂通常需要用很高的经常为细胞毒性的剂量，引起各种副作用。

上面讨论的对小鼠糖尿病的最新研究（Katz 等, 科学,268,pp.1185-88(1995)）和一个同种异体移植模型（Sayegh 等, 实验医学杂志,181,pp.1869-74(1995)）支持这一转变免疫应答性质的能力。在后期的研究中，一个阻止 CD28 - B7T 细胞共刺激途径的融合蛋白表现出诱导肾移植耐受性。此耐受性与体内 Th1 细胞因子减少和 Th2 细胞因子增多有关。这些资料表明本发明的 LT - β - R 阻滞剂将在通过抑制 Th1

细胞介导的细胞因子释放而抑制组织和器官移植的细胞排斥反应。

本发明的组合物和方法的 LT - β - R 阻滞剂可经修饰后依待治疗的不良情况、紊乱或疾病而获得所希望的 LT - β - R 信号传导水平。可见, LT - β - R 信号传导的真实水平可以通过控制 LT - β - R 阻滞剂的浓度和对各个靶分子的亲和力来进行微调。

例如在本发明的一个实施方案中, 含有可溶性 LT - β - R 分子的组合物给予受试者。这个可溶性 LT - β 受体能有效地与细胞表面 LT - β 受体竞争结合表面 LT 配体。竞争表面 LT - 配体的能力依赖于可溶性的和细胞表面 LT - β - R 分子的相对浓度和它们与配体结合的相对亲和力。

具有突变的可溶性 LT - β - R 分子 - 该突变能增大或减小突变的可溶性 LT - β - R 与表面 LT 配体结合的亲和力 - 能用本领域技术人员熟知的标准的重组 DNA 技术制备。带有位点特异突变或随机突变的大量分子能用常规实验和这里所描述的技术检验它们作为 LT - β - R 阻滞剂的能力。

同样, 在本发明的另一实施方案中, 抗 LT - β 受体或者一个或多个 LT 配体亚单位的抗体作为 LT - β - R 阻滞剂起作用。对于这些抗体, 阻止 LT - β 受体信号传导的能力可以经突变、化学修饰或其他的能改变予以受试者的抗体的有效浓度或活性的方法进行修饰。

减少而不完全抑制 LT - β - R 信号传导的性能可能对在抑制 Th1 - 细胞介导的被夸大的或反常的反应同时建立或保持维持正常免疫功能的低水平的 LT - β - R 信号传导是很重要的。

小鼠 LT - α 基因断裂导致异常的外周淋巴器官发育 (De Togni 等, 科学, 264, pp.703-7(1994))。这样的小鼠缺少淋巴结, 它们的脾在滤泡中 T、B 细胞丰富区之间缺少通常很清晰的界线。我们认为这种表型与表面 LT 诱导的 LT - β - R 信号传导缺失有关, 因为经调节 TNF - R 活性没有观察到类似的表型。因此, 选择性地或部分阻止 LT - β - R 信号传导的能力可以用于治疗与错误或过量表达 LT - β - R 途径信号传导相关的异常淋巴器官发育。

一些 Th1 相关反应是许多细胞介导的免疫应答的关键成分

(Romagnani,S.,Ann.Rev.Immunol,12,pp.227-57(1994)) , 在某些情况下并不希望完全抑制 Th1 细胞活性. 例如, 当能建立很好的 Th1 应答时, 小鼠便可以有效地抑制寄生虫感染. 感染物诸如李斯特菌和弓形虫也引发强烈的 Th1 型应答. 在人类中结核分枝杆菌应答表现为 Th1 为基础. 利什曼病致病性在小鼠中与类似于 Th1 应答的应答相关 (Reed 和 Scott , 免疫学流行观点,5,pp.524-31(1993)) .

通过阻止 LT - β - R 信号传导而影响 Th1 抑制水平的能力可能在最大化用本发明的 LT - β - R 阻滞剂治疗所能获得的有利效果中很重要.

下面是说明本发明的可溶性 LT - β 受体、抗 LT 配体和抗 LT - β - R 的抗体以及其特征方法的实施例. 这些实施例不应被解释为限制: 包含这些实施例是为了说明的需要, 本发明只受限于权利要求书.

实施例 1

作为免疫球蛋白 Fc 融合蛋白的可溶性人 LT - β 受体的制备

从一个来自体细胞杂种的人 12p 转录序列库中分离出的人 cDNA 克隆序列 (Baens 等, 基因组(Genomics),16,pp.214-18(1993)) 进入了 GenBank, 后来被确定为编码人 LT - β - R 的序列. 这个全长的人 LT - β - R cDNA 克隆序列自 1992 年以来可作为 GenBank 条目 L04270 而获得.

直至 LT - β - R 跨膜区域的胞外结构域 (图 1) 从一个 cDNA 克隆中用 PCR 扩增出来, 所用引物在 5' 和 3' 端分别掺入了 Not I 和 Sal I 限制酶切位点 (Browning 等, 免疫学杂志,154,pp.33-46(1995)) . 扩增产物用 Not I 和 SalI 酶切, 纯化, 与编码人 IgG1 Fc 区域的 SalI-NotI 片段一起连到 Not I-线性化的载体 pMDR901 中. 所得到的载体包括各自启动子起动的二氢叶酸还原酶基因和 LT - β - R - Fc 融合蛋白.

载体用电穿孔进入 CHO dhfr⁻细胞, 每一个标准程序中分离出氨甲蝶呤抗性克隆. LT - β - R - Fc 被分泌到培养基中, 用 ELISA 实验选择产生最高水平的受体融合蛋白的细胞系. 高产量的细胞系大量生长后收集条件培养基. 用 A 蛋白琼脂糖快速流动亲和层析 (Pharmacia) 分离出纯的 LT - β 受体融合蛋白.

实施例 2

作为免疫球蛋白 Fc 融合蛋白的可溶性鼠 LT - β 受体的制备

把来自两个部分 cDNA 分离物的 5' Not I/ApaLI 和 3' ApaLI/Not I 片段连到 pCDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) 的 Not I 位点处, 制备出完整的 m LT - β - R cDNA 克隆。这个 cDNA 克隆的序列可从 GenBank 条目 U29173 获得。与在 GenBank 条目 L38423 的 m LT - β - R 序列作比较未发现编码序列有差别。

可溶性 m LT - β - R (hIgG1) 融合蛋白用 PCR 扩增制备, 全长的 m LT - β - R cDNA 克隆作模板, 引物为 5' AACTGCAGCGGCCGCCATGCGCCTGCCC 3' 和 5' GACTTTGTC GACCATTGCTCCTGGCTCTGGGGG 3'。纯化扩增产物, 用 Not I 和 Sal I 酶切, 与一个 Sal I/Not I 人 IgG1 Fc 片段一起连到 Not I 线性化和磷酸酶处理的 SAB132 中, 形成 JLB122。为了能稳定表达, 含有 m LT - β - R - Fc 片段的 Not I 序列组件转移到 pMDR901 的 Not I 位点上, 形成 PSH001, 再转染上述的 CHO 细胞 (Browning 等, 免疫学杂志, 154, pp.33-46(1995))。分泌 m LT - β - R - Fc 的细胞克隆用 ELISA 分析鉴定了。纯化的受体融合蛋白从 CHO 细胞上清液中用 A 蛋白琼脂糖快速流动层析 (Pharmacia) 分离出。

实施例 3

用可溶性人 LT - β - R - Fc 阻止 LT - β 受体 - 配体相互作用

在上述肿瘤细胞细胞毒性实验中检测了可溶性 h LT - β - R - Fc 阻止 LT 配体结合到 LT - β 受体上的能力。这个实验中, LT 配体的一种可溶性形式 (hLT - α 1/ β 2) - 它激活 LT - β - R 信号传导 - 用于杀死人肿瘤细胞。LT - β - R 信号传导的抑制剂能降低 LT - β - R 诱导的肿瘤细胞细胞毒性。

可溶性 LT - α 1/ β 2 配体包括截短的或修饰的缺乏功能性跨膜结构域的 LT - β 亚单位。可溶性 LT - α 1/ β 2 配体与表面形式的 LT 配体一样结合并刺激 LT - β - R 信号传导 (Browning 等, 免疫学杂志, 154, pp.33-46(1995))。

制备 hLT - α 1/ β 2、hTNF 或 hLT - α 的系列稀释液 0.05ml 放

到 96 孔板中, 加入放于 0.05ml 含有 80U/ml (活性单位) hu-IFN- γ 的培养基中的 5000 个胰蛋白消化的 HT29 细胞 (ATCC)。四天之后, 如下测量染料 MTT 的线粒体还原: 加入 10 μ l 的 MTT, 3 小时后用 0.09ml 含 10mM HCl 的异丙醇溶解被还原的染料, 在 550nm 测量 O.D. 值。加细胞之前先加入 10 μ l 可溶性受体形式或纯的人 IgG, 使其终浓度为 5 μ g/ml。

表 1 比较了 hLT- β -R-Fc 和 p55-TNF-R-Fc 嵌合体 (人 IgG 作为对照) 阻止各种可溶性 TNF 和 LT 配体对 HT29 肿瘤细胞生长抑制效应的能力。

表 1: LT- β -R 和 p55-TNF-R 免疫球蛋白融合蛋白阻止各种 TNF 和 LT 配体对 HT29 生长抑制效应的能力。

导致 50 % 生长抑制的细胞毒试剂的浓度 (ng/ml)

具有^a

<u>细胞毒试剂</u>	<u>hu-IgG 对照</u>	<u>p55-TNF-R-Fc</u>	<u>LT-β-R-Fc</u>
TNF	0.08	>10 ^b	0.08
LT- α	3	>1000	3
LT- α 1/ β 2	5	5	>200

^a 每种细胞毒试剂在加入细胞之前先与 Ig 融合蛋白混合 10 分钟。融合蛋白的终浓度为 5 μ g/ml。

^b 没有测试更高的浓度。

表 1 的数据表明可溶性 LT- β -R 融合蛋白 (hLT- β -R-Fc) 能有效地阻止 LT 配体 (LT- α 1/ β 2) 与细胞表面 LT- β 受体的相互作用, 因此是一种本发明的 LT- β -R 阻滞剂。

正如所预料的, 可溶性 TNF-R 融合蛋白 (p55-TNF-R-Fc) 完全阻止了 TNF 诱导的生长抑制, 它结合 TNF 并防止其与表面 TNF 受体相互作用。这种可溶性 TNF 受体不影响 LT 配体介导的抗增殖效应。相比之下, LT- β -R-Fc 阻止 LT 配体而非 TNF 或 LT- α 诱导的细胞毒效应。因此, 可溶性人 LT- β -R 融合蛋白不干扰 TNF 和 LT- α 配体活化 TNF-R。

实施例 4

用可溶性鼠 LT - β - R - Fc 阻止小鼠 LT - β 受体 - 配体相互作用

用对小鼠细胞的细胞毒性实验测试了偶联到人 IgG1 Fc 区域的可溶性小鼠 LT - β 受体 (m LT - β - R - Fc, 见实施例 2) 阻止小鼠中 LT - β 受体 - 配体相互作用的能力 (图 2). 这个细胞毒性实验在 WEHI 164 细胞上进行, 所用方法与实施例 3 所述的用于 HT29 细胞实验的基本相同 (也可参见 Browning 和 Ribolini 免疫学杂志, 143, pp.1859-67(1989)).

图 2 显示了 m LT - β - R - Fc 在小鼠 WEHI 164 细胞中对配体诱导的 LT - β - R 信号传导的效应. 正如该实验所表明的, 用大约 1 到 100ng/ml 浓度的 LT - α / β 配体处理, WEHI 164 细胞被杀死了. 可溶性 m LT - β - R - Fc (10 μ /ml) 阻止了 LT 配体激活的细胞死亡. 加入可溶性小鼠 p55-TNF-R-Fc 融合蛋白或 IgG 对照抗体 (每种 10 μ /ml) 对阻止细胞死亡有很小的或没有作用. 这些数据显示 m LT - β - R - Fc 融合蛋白能有效地与表面 LT - β - R 分子竞争结合 LT 配体. 这些数据也显示了 LT - α / β 诱导的细胞毒作用是 LT - β - R 介导的并能被可溶性 m LT - β - R - Fc 抑制, 根据本发明它可作为 LT - β - R 阻滞剂.

实施例 5

用抗人 LT - β - R 抗体阻止 LT - β 受体 - 配体相互作用

抗人 LT - β 受体的小鼠单克隆抗体 (mAb) 的制备是把来自 CHO 细胞的 h LT - β - R - Fc 融合蛋白连到 A 蛋白琼脂糖珠上, 在不存在佐剂的情况下反复腹膜内免疫 RBF 小鼠. 最后用可溶性 h LT - β - R - Fc 腹膜内和静脉内加强注射动物, 经经典方法融合脾细胞, 用 ELISA 筛选杂交瘤上清液 (Ling 等, 干扰素和细胞因子研究 (J.Interferon and Cytokine Res), 15, pp.53-59(1995)). 在细胞淘选实验中进一步筛选能阻止活化的 II - 23 杂交瘤细胞 - 它表达表面 LT - α 1/ β 2 - 结合覆盖在板上的 LT - β - R - Fc 的杂交瘤上清液. 用蛋白 A 琼脂糖凝胶 (Pharmacia) 纯化来自培养上清的 IgG, 制备纯的 mAb.

为了确定是否抗 LT - β 受体的 mAb 能阻止始于结合可溶性 LT 的

LT - β - R 信号传导, 用 WiDr 人癌细胞进行了肿瘤细胞细胞毒性实验。在这个实验中, 在 96 孔板上制备 0.05ml 的 LT - α 1/ β 2 系列稀释液, 加入 10 μ l 100 μ g/ml 的含有对照的小鼠 IgG1 mAb 或抗 LT - β 受体 mAb 的溶液。然后每个孔加 5000 个胰蛋白酶消化的 WiDr 细胞 (ATCC), 其 0.05ml 的培养基中含有 50U/ml (活性单位) 的 hu-IFN- γ 。四天之后, 如下测量染料 MTT 的线粒体还原: 加入 10 μ l MTT, 3 小时后用 0.09ml 含 10mM HCl 的异丙醇稀释, 在 550nm 测 O.D. 值。紫色的量与细胞生长量成比例。

图 3 显示抗 LT - β - R mAb BDA8 可作为一种本发明的 LT - β - R 阻滞剂。当 IFN - γ 和可溶性 LT - α 1/ β 2 配体 (大约 0.05 到 50ng/ml) 存在时人 WiDr 癌细胞停止生长。IgG1 对照抗体 (10 μ g/ml) 对这种生长抑制没有影响。相比之下, 抗 LT - β - R mAb BDA8 (10 μ g/ml) 使 WiDr 细胞在存在可溶性 LT - α 1/ β 2 配体的情况下恢复生长能力。

实施例 6

用抗人 LT - β 抗体阻止受体 - 配体相互作用

抗人 LT β mAb 的制备是先用 CFA 中的含有大约 1 - 2 μ g 人重组 LT - β 的 A 蛋白琼脂糖凝胶 - 9E 110 - rLT- β 珠免疫 RBF 小鼠, 然后用 IFA 中的同样材料加强注射一次。最后一次加强注射 8 周之后, 静脉内给小鼠 30 μ g 纯化的可溶性 rLT - β (用酸从 9E10 树脂上洗脱下来), 2 天后又给予 20 μ g 同样的可溶性物质。第二次静脉内加强注射后一天, 用经典方法融合脾细胞, 产生 mAb。直接用 ELISA 或 PMA 活化的 II - 23 细胞的 FACS 染色筛选杂交瘤上清液。通过 A 蛋白琼脂糖凝胶快速流动纯化来自培养上清的 IgG, 制备纯的 mAb (Pharmacia)。

FACS 实验用来选择能有效阻止可溶性 LT - α / β 配体结合细胞表面的 LT - β 受体 - 这样模拟体内两个细胞的相互作用 - 的抗 LT - β 抗体。在这个实验中, 让可溶性人 LT - β - R - Fc (2 μ g/ml) 在递增浓度的试验抗 LT - β mAb 存在下 (0.02-20 μ g/ml) 结合 PMA - 活化的 II - 23 细胞上的表面 LT 配体 (Browning 等, 免疫学杂

志,154,pp.33-46(1995)). 洗细胞. 通过与藻红蛋白标记的驴抗人 IgG 反应检测结合的 LT - β - R - Fc. 用 FACS 分析确定所结合的荧光标记量, 计算出平均荧光强度.

图 4 显示了测量抗 LT - β mAb B9 阻止 LT - β 受体 - 配体相互作用能力的 FACS 实验结果, 如上所述. 这个实验表明抗 LT - β mAb B9(0.02-5 μ g/ml)能特异地、有效地与可溶性 LT - β - R 融合蛋白 (2 μ g/ml) 竞争结合细胞表面 LT 配体, 因此能作为本发明的一种 LT - β - R 阻滞剂.

实施例 7

用抗小鼠 LT - α / β 抗体阻止受体 - 配体相互作用

可溶性小鼠 LT - α / β 复合体的制备同上述的人可溶性 LT - α / β 复合体. 可溶性小鼠 LT - β 亚单位的制备建立在原先描述的序列信息基础上 (Lawton 等, 免疫学杂志,134,pp.239-46(1995)). 可溶性小鼠 LT - α / β 复合体用杆状病毒/昆虫细胞表达体系表达, 用亲和层析分离出来, 所用的人 p55 TNF - R 和 LT - β - R 柱基本上与上述用于表达、纯化人 LT - α / β 复合体的一样. Armenian 仓鼠用纯化的可溶性小鼠 LT - α / β 复合体免疫, 与实施例 6 所描述的基本一样. 仓鼠的脾细胞与小鼠 P3X 杂交瘤细胞系融合, 如已有方法 (Sanchez-Madrid 等.,酶学方法(Methods of Enzymology),121,pp.239-44(1986)). 根据杂交瘤结合 LT - α / β 复合体或只结合 LT - α 的特性分类, 分别为抗 mLT - β 或抗 mLT - α . 杂交瘤细胞被扩增, 抗体用 A 蛋白亲和层析 (Pharmacia) 从培养上清中纯化出来.

为了估计仓鼠抗小鼠 LT - α 和 LT - β mAb 是否能阻止 LT 配体结合 m LT - β - R, 我们用 TIMI - 4 细胞 (ATCC) - 一个 PMA 活化 7 小时后能表达表面 LT 配体的小鼠 T 细胞系. 仓鼠抗 mLT - α 或抗 mLT - β mAb 与这种细胞在 4 $^{\circ}$ C 预温育 30 分钟, 然后洗两次. 洗过的细胞与 1 μ g/ml m LT - β - R - Fc 在 4 $^{\circ}$ C 温育. 30 分钟后, 洗去未结合的 m LT - β - R - Fc, 然后细胞与 10 μ g/ml 藻红蛋白标记的驴抗人 IgG 一起温育 30 分钟, 检测结合的 m LT - β - R - Fc. 用 FACS 分析确定结合的荧光标记的量, 计算出平均荧光强度.

用这种分析发现仓鼠抗 mLT - β mAb 可以有效地阻止可溶性 LT - β 受体结合 T 细胞表面的 LT 配体。结果显示在表 2 中。

表 2: 抗小鼠 LT - β 单克隆抗体抑制 mLT - β - R - Fc 结合小鼠表面 LT 配体的能力

mAb 浓度 (μ g/ml)	抗 mLT - β (BB.F6)		抗 mLT - α (AF.B3)	
	MFCI ^b	%Inh ^c	MFCI ^b	%Inh ^c
0 ^a	6	-	6	-
0	85	0	85	0
0.01	71	18	84	2
0.03	67	23	86	0
0.1	51	44	86	0
0.3	36	62	84	2
1.0	29	71	89	0
3.0	17	86	88	0
10.0	11	94	95	0
30.0	10	95	94	0
100.0	8	98	92	0

^a. 不加受体

^b. 平均荧光通道数目

^c. 抑制百分数

实施例 8

LT - β - R 阻滞剂在小鼠中抑制 Th1 介导的接触型超敏反应

20g 雌 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 初次致敏是用 25 μ l 在 4:1v/v 丙酮: 橄榄油中的 0.5 % 2, 4 - 二硝基氟苯 (DNFB) 涂在每只后脚的底部。初次致敏 24 小时后, 我们再次用 25 μ l 的同样溶液致敏每只小鼠。管制住未麻醉的小鼠进行致敏。第五天 (初次致敏后 120 小时), 我们用 90: 10mg/kg 氯胺酮: 甲苯噻嗪 (腹内) 麻醉小鼠, 用亚刺激剂量的 10 μ l 0.2 % DNFB 涂到左耳的背面和腹面。

右耳类似地涂上 4:1 v/v 丙酮: 橄榄油载体。

攻击免疫应答 4 小时后, 我们给小鼠静脉注射含于 0.1ml 磷酸缓冲盐水 (PBS) 中的浓度递增的 mLT- β -R-Fc (0.08-5.0mg/kg; 实施例 2)。单独注射 PBS 缓冲液或 20mg/kg 的人 IgG 融合蛋白 (LFA3-Fc) (Miller 等, 实验医学杂志 178,pp.211-22(1993)) 作为阴性对照。注射 8mg/kg 的一种抗 VLA4 特异性 mAb (PS/2 mAb; Chisolm 等, 欧洲免疫学杂志,23,pp.682-88(1993)) - 已知它能阻止 T 细胞流入攻击部位而抑制 CHS - 作为阳性对照。每种浓度的抗体实验了 4 到 8 只小鼠。

攻击后 24 小时, 再次用氯胺酮: 甲苯噻嗪麻醉小鼠, 用工程用测微器测量两只耳的厚度, 精确到 10^{-4} 英寸。每只小鼠的耳肿大反应是在对照和 DNFB 攻击的耳厚度之差。典型的未抑制的耳肿大反应是 $95 - 110 \times 10^{-4}$ 英寸。通过比较处理组与阴性对照组判断耳肿大反应。处理组中差异的统计学显著性用方差的单向分析、接着用 $p < 0.05$ 计算 Tukey-Kramer Honestly 显著性差异而求出 (JMP, SAS Institute)。

图 5 显示给予递增浓度的 mLT- β -R-Fc 与未抑制的 DNFB 处理的对照动物 (PBS 和 LFA-Fc) 相比, DNFB 处理小鼠的耳肿大反应明显降低了。可溶性 LT- β -R (大约 1 - 5mg/kg) 能与抑制剂抗-VLA4 特异性 mAb 一样有效地阻止这种接触型 DTH 反应。耳肿大实验中不被抑制的部分可能产生于“非特异性”粒细胞浸润。

实施例 9

硫酸葡聚糖溶液 (DSS) IBD 模型

如图例说明中所表明的那样, 用 hLFA3-Ig 处理小鼠, 即腹膜内注射对照 Ig 融合蛋白或 mLT β R-Ig。当天, 饮用水变为 5% 硫酸葡聚糖溶液, 持续一周。一周后, 即开始 DSS 服用两周后, 杀死小鼠, 测量体重变化和大肠长度 (从肛门到盲肠)。图显示了各种处理后的体重变化和肠长度。肠缩短和体重减少是 IBD 的指示。可见, mLT β R-Ig 处理戏剧性地防止了结肠变短和体重减轻, 说明有效。

图 6: 饮用水中开始加 DSS 14 天后, 接着进行各种处理所观察到的体重变化。Veh = 载体, LTBr 和 LFA3 指 mLT β R-Ig 和 hLFA3-Ig 融

合蛋白，它们的使用方式是在加 PSS 一周前、服用 DSS 时和一周后腹膜内注射 $100 \mu\text{g}$ （即三次注射分别在 - 1、0 和 1 周）。每组 10 个动物。
图 7：服用 DSS14 天后，接着进行 6 中所述的各种处理的结肠长度。

实施例 10

IBD 的 CD 45RB^{hi}/Scid 模型

用过去描述的磁性珠技术从 C.B - 17 雌小鼠中分离出 CD4 阳性 T 细胞（F.Powrie 等，国际免疫学 5:1461-1471,1993）。除去 CD8 阳性 T 细胞、B 细胞和单核细胞的 CD4 细胞用荧光活化的细胞分类法分为 CD45RB^{high} 和 CD45RB^{low} 群，也如上所述。 5×10^5 CD45RB 细胞静脉注射到雌 C.B - 17Scid 小鼠中，接着测量小鼠体重。可以看出，接受 CD45RB^{low} 细胞的动物体重增长正常。与之相比，接受 CD45RB^{high} 细胞的动物结果重量减轻，10 周后死亡。当对照小鼠失去了大约 20 % 的初始体重时，处死这些小鼠，对器官进行组织学分析。典型的生病小鼠看上去是恶病质的、有腹泻现象，具有变得很大的结肠和盲肠。如图所示用 hLFA3-Ig 处理的动物类似于未被处理的动物，然而用 mLT β R - Ig 处理的动物未丢失体重，具有相对正常大小的结肠，缺少通常在结肠中观察到的大量炎性渗透液。图 8 显示了用各种方法处理的注射了 CD45RB^{high} 的动物体重减轻的时间过程。图 9 显示了注射 8 周后的体重。mLT β R - Ig 在两个不同 IBD 模型即 CD45RB 和 DSS 模型中的效能为这种治疗对免疫系统的深远作用提供了有力证据。

图 8：注射 CD45RB CD4 阳性 T 细胞给小鼠后体重的时间变化过程。每条曲线代表一个动物，方框中的题字指注射了哪种细胞即 CD45RB^{high} 或 CD45RB^{low} 及处理的性质。每周用 $100 \mu\text{g}$ 蛋白腹膜内注射处理动物。处理开始于注射细胞前二周，实验过程中继续进行。

图 9：移植 10 周后各种处理所观察到的体重的均值和标准偏差（每组 5 - 6 个动物）。

实施例 11

迟发型超敏反应的 SRBC 模型

皮下注射 2×10^7 个 PBS 中的洗过的绵羊红血球（SRBC）以致敏雌 balb/c 小鼠。5 天之后，注射 1×10^8 个 PBS 中的 SRBC 至小鼠的右

脚垫（亚植入注射）来攻击小鼠。注射脚垫后的不同时间用测径器测量脚垫厚度。图 10 显示了用 mLT β R - Ig 腹膜内注射处理的小鼠的脚垫肿大反应。在致敏时或在致敏与攻击两个阶段用 mLT β R - Ig 处理抑制了 SRBC 诱导的 DTH 反应。

图 10：显示了用 SRBC 注射攻击后 18 小时所测得的脚垫厚度的增加。处理是：阴性对照注射 PBS；阳性对照是抗体 PS/2，它能阻止 VLA4 相互作用及所引起的细胞运输；mLT β R - Ig 100 μ g 皮下注射，在皮下注射 SRBC 致敏前即刻、攻击时或两个时刻都进行。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人: **BROWNING, Jeffrey L.**

BENJAMIN, Christopher D.

HOCHMAN, Paula S.

(ii) 发明题目: 作为免疫疾病治疗剂的可溶性淋巴毒素- β 受体和抗淋巴毒素受体及配体的抗体

(iii) 序列数目: 1

(iv) 通讯地址:

(A) 收件人: **James F. Haley, Jr.**

(B) 街道: **1251 Avenue of the Americas**

(C) 城市: 纽约

(D) 州: 纽约

(E) 国家: 美国

(F) 邮政编码: 10020

(v) 计算机可读形式:

(A) 媒介类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容的

(C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS

(D) 软件: **PatentIn Release #1.0, Version #1.30**

(vi) 当前申请资料:

(A) 申请号

(B) 申请日:

(C) 分类

(vii) 在先申请资料

(A) 申请号: **US 08/505,606**

(B) 申请日: **1995年7月21日**

(viii) 律师/代理人信息:

(A) 姓名: **HALEY, Jr., James F.**

(B) 注册号: **27,794**

(C) 案卷号: B191CIP PCT

(ix) 电讯信息:

(A) 电话: (212) 596 - 9000

(B) 传真: (212) 596 - 9090

(C) 电传: 14 - 8367

(2) SEQ IN NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 197 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1

```

Ser Gln Pro Gln Ala Val Pro Pro Tyr Ala Ser Glu Asn Gln Thr Cys
1          5          10          15

Arg Asp Gln Glu Lys Glu Tyr Tyr Glu Pro Gln His Arg Ile Cys Cys
          20          25          30

Ser Arg Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Val Ser Ala Lys Cys Ser Arg Ile
          35          40          45

Arg Asp Thr Val Cys Ala Thr Cys Ala Glu Asn Ser Tyr Asn Glu His
          50          55          60

Trp Asn Tyr Leu Thr Ile Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp Pro Val
65          70          75          80

Met Gly Leu Glu Glu Ile Ala Pro Cys Thr Ser Lys Arg Lys Thr Gln
          85          90          95

Cys Arg Cys Gln Pro Gly Met Phe Cys Ala Ala Trp Ala Leu Glu Cys
          100          105          110

Thr His Cys Glu Leu Leu Ser Asp Cys Pro Pro Gly Thr Glu Ala Glu
          115          120          125

```

Leu Lys Asp Glu Val Gly Lys Gly Asn Asn His Cys Val Pro Cys Lys
130 135 140

Ala Gly His Phe Gln Asn Thr Ser Ser Pro Ser Ala Arg Cys Gln Pro
145 150 155 160

His Thr Arg Cys Glu Asn Gln Gly Leu Val Glu Ala Ala Pro Gly Thr
165 170 175

Ala Gln Ser Asp Thr Thr Cys Lys Asn Pro Leu Glu Pro Leu Pro Pro
180 185 190

Glu Met Ser Gly Thr
195

1 SQPQAVPPYA SENQTCRDQE KEYYEPQHRI CCSRCPPGTY VSAKCSIRRD 50
 51 TVCATCAENS YNEHWNYLTI CQLCRPCDPV MGLEEIAPCT SKRKTQCRCQ 100
 101 PGMFCAAWAL ECTHCELLSD CPPGTEAELK DEVGKGNNHC VPCKAGHFQN 150
 151 TSSPSARCQP HTRCENQGLV EAAPGTAQSD TTCKNPLEPL PPEMSGT 197

图 1

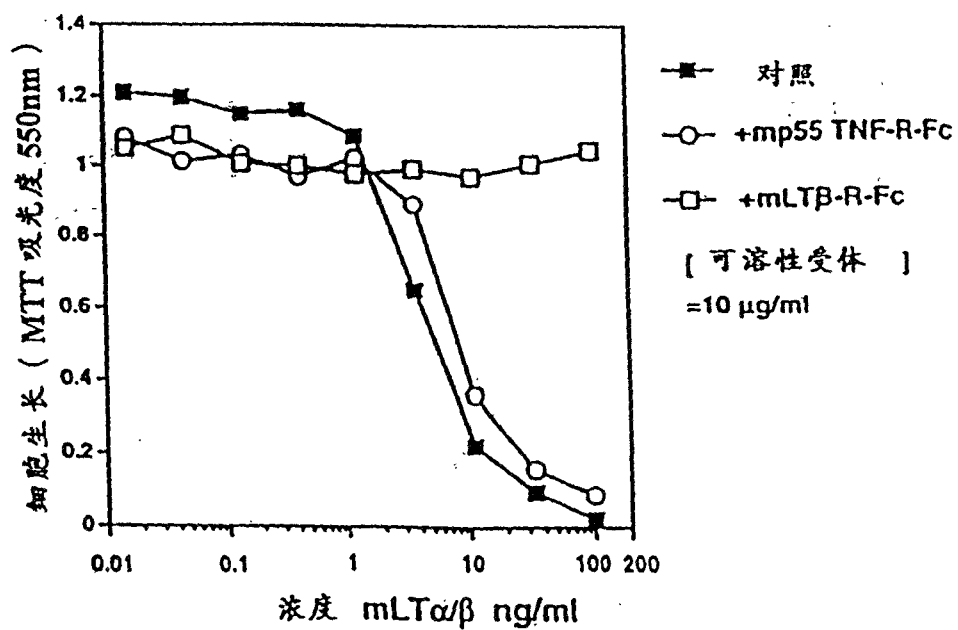


图 2

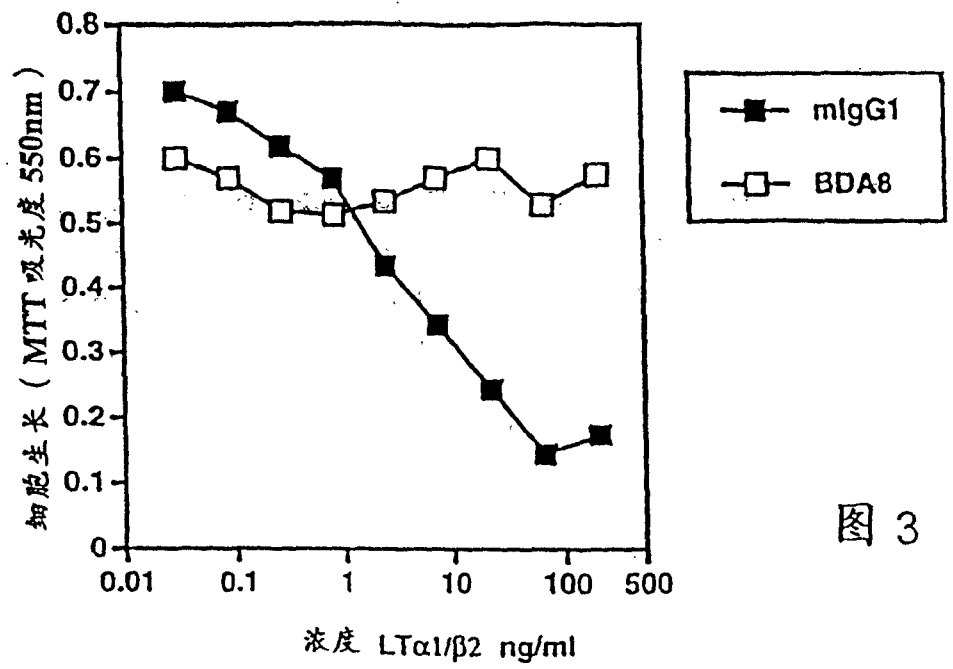


图 3

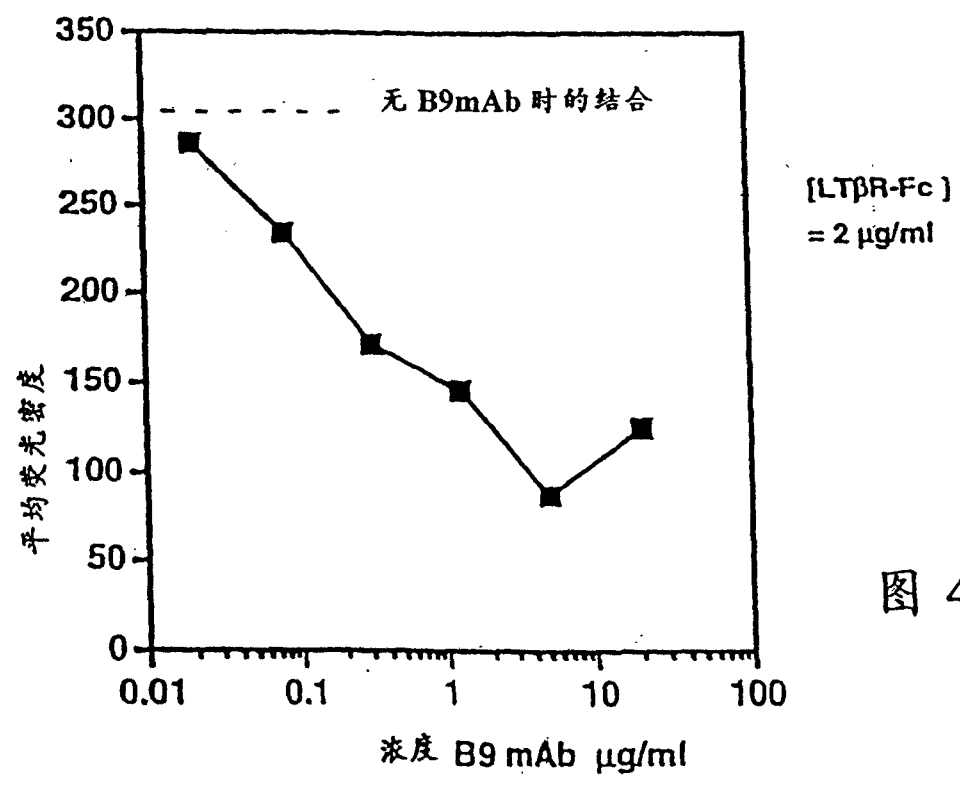


图 4

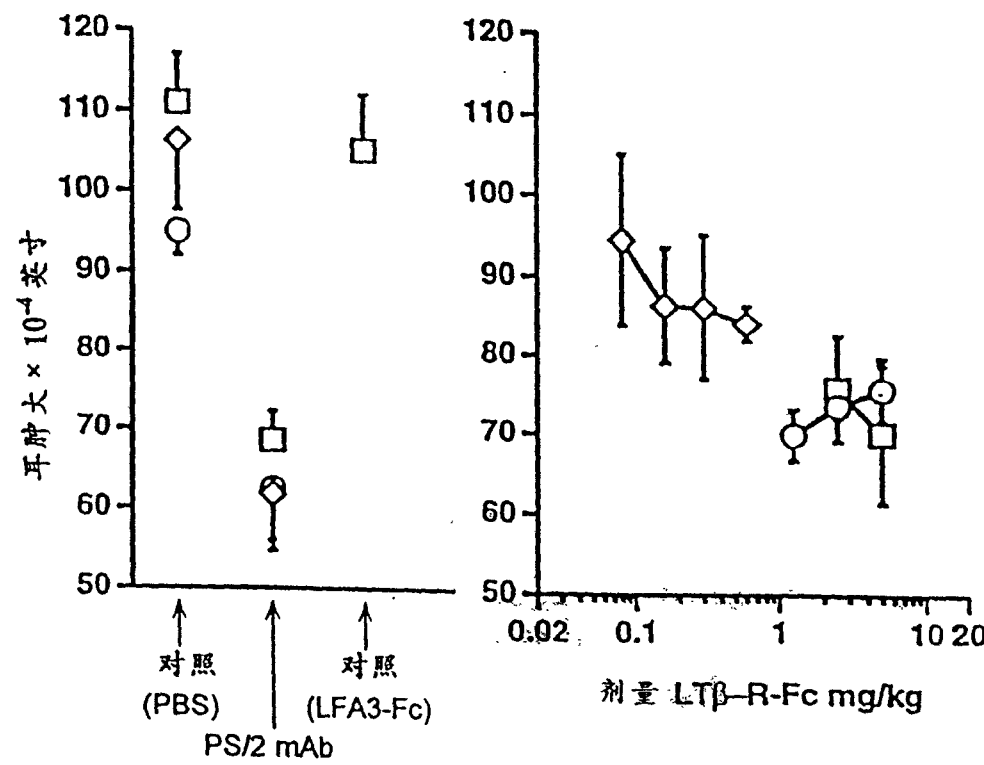


图 5

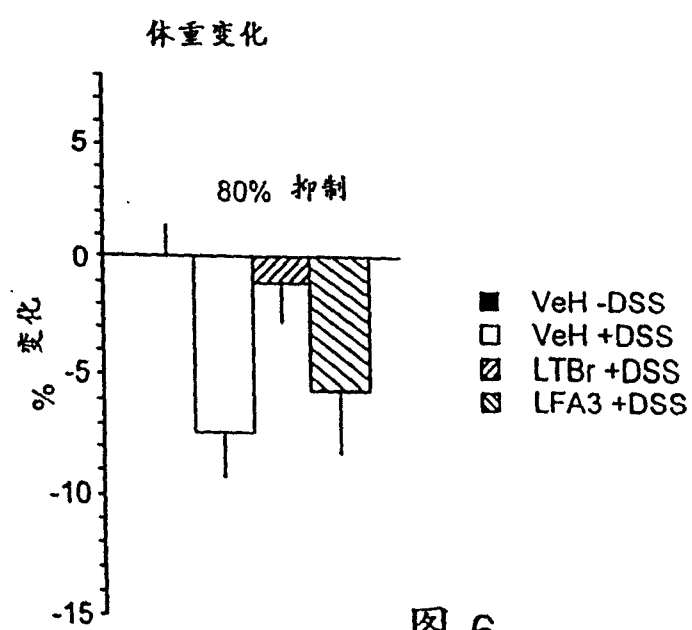


图 6

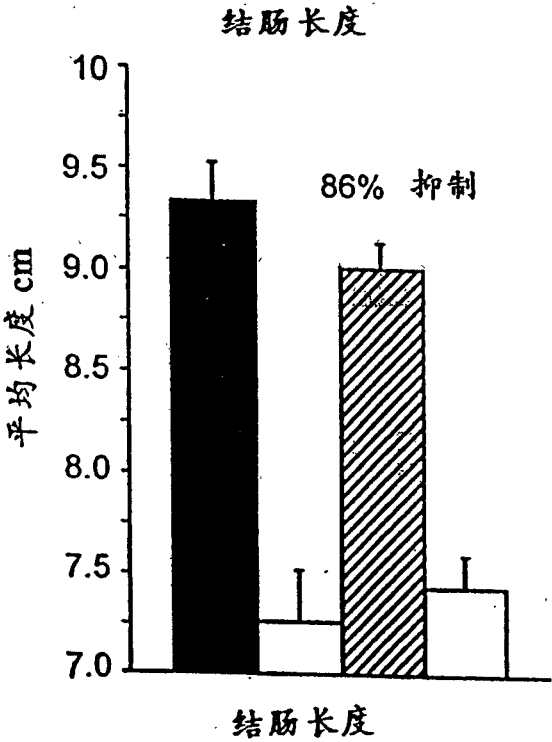


图 7

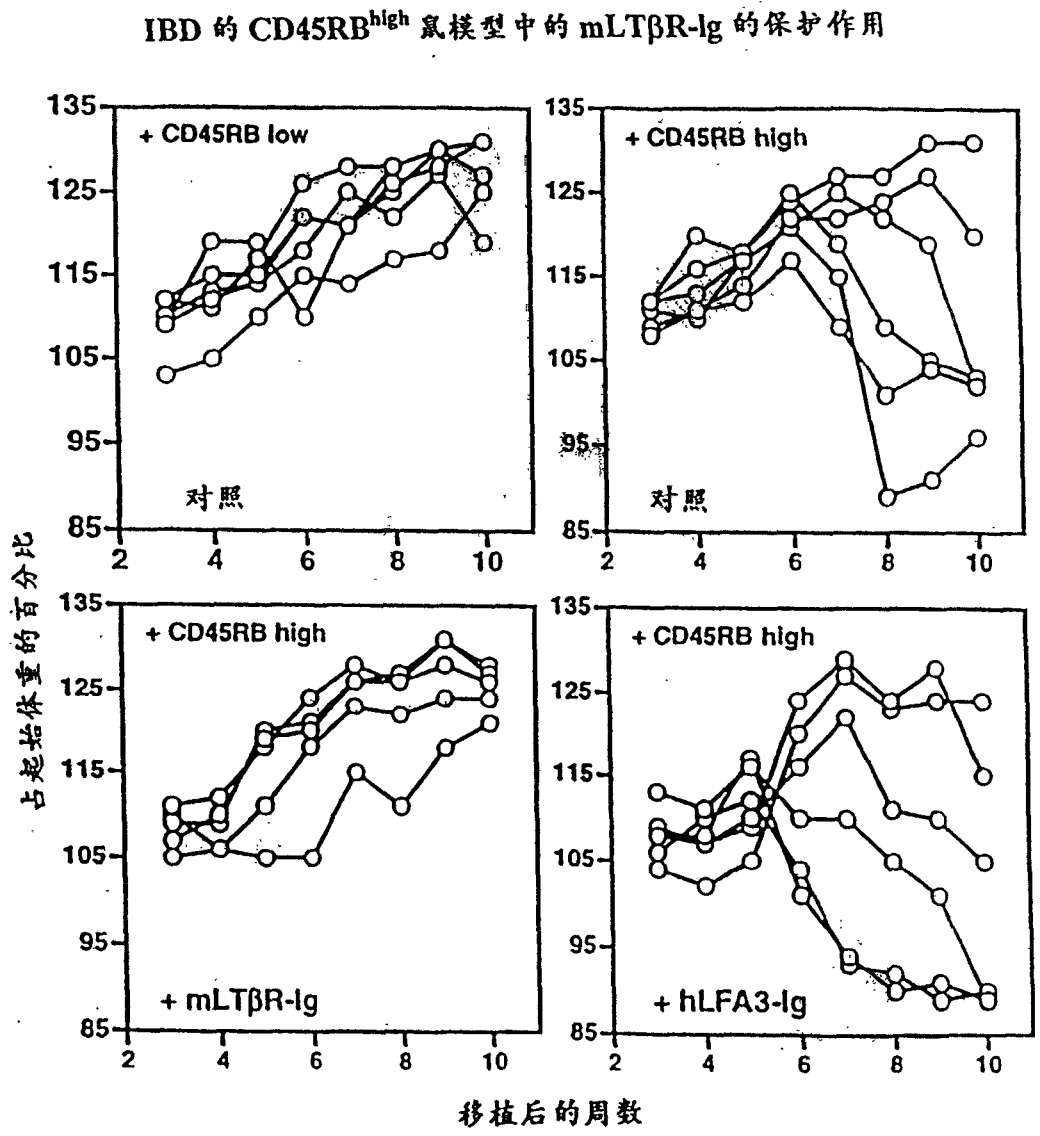


图 8

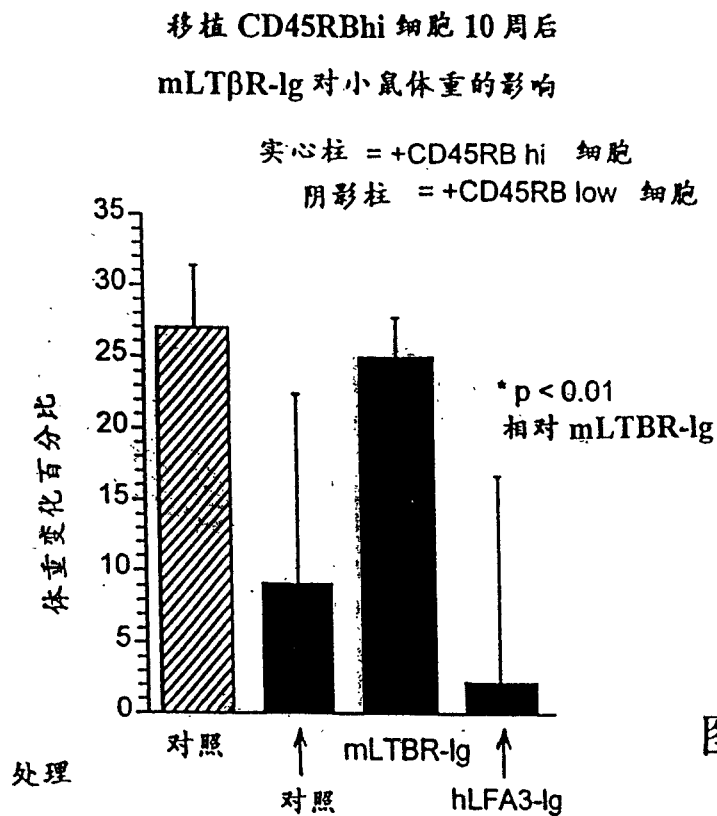


图 9

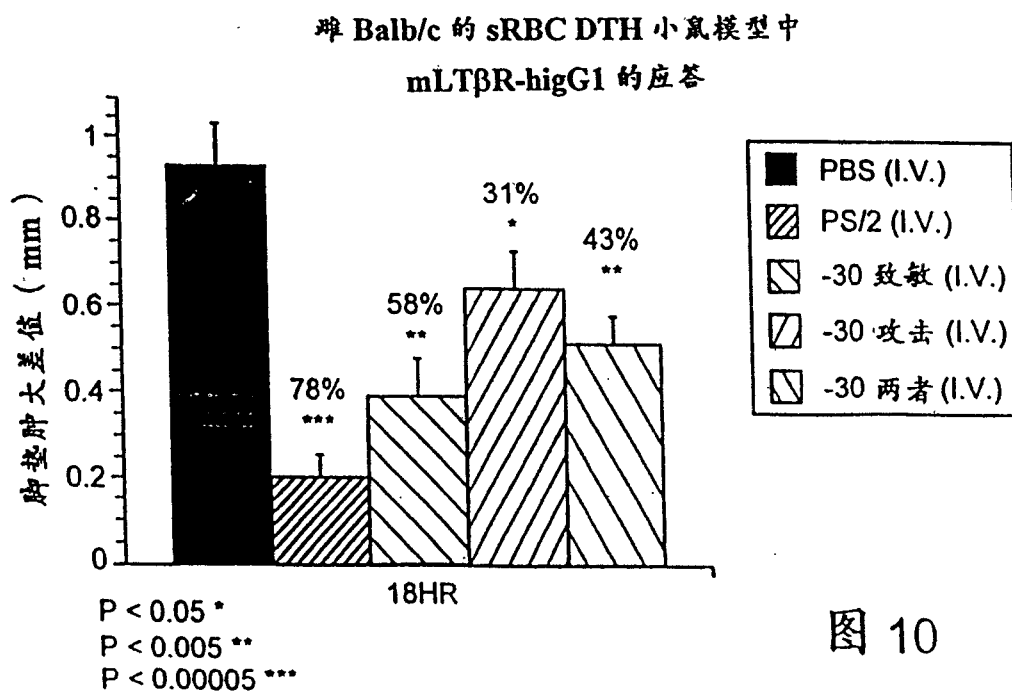


图 10