



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101253199 B

(45)授权公告日 2019.06.14

(21)申请号 200680031977.3

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

(22)申请日 2006.08.30

有限责任公司 11204

(65)同一申请的已公布的文献号

代理人 王达佐 张黎华

申请公布号 CN 101253199 A

(51)Int.Cl.

(43)申请公布日 2008.08.27

C07K 16/28(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 39/395(2006.01)

60/712,084 2005.08.30 US

A61P 37/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/00(2006.01)

2008.02.29

A61P 29/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 38/17(2006.01)

PCT/US2006/033828 2006.08.30

C07K 16/46(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

(56)对比文件

W02007/027751 EN 2007.03.08

WO 0135995 ,2001.05.25,

(73)专利权人 迈阿密大学

WO 2005018571 ,2005.03.03,

地址 美国佛罗里达州

Prehn john l,et al.potential role for  
TLiX the new TNF-family member and potent  
costimulateor of IFN-gamma,in mucosal  
inflammation.《clinical immunology》.2004,  
66-77.

(72)发明人 埃克哈德·泊达克

审查员 丁海

瓦迪姆·德耶梧 罗伯特·拉维

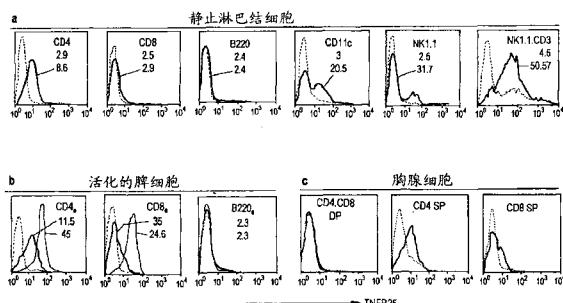
权利要求书1页 说明书30页 附图16页

## (54)发明名称

防御和癌细胞之间的相互作用以加强、指导或者  
修复机体抵抗癌症的能力。本文公开的TNFR25特  
异性免疫毒素还能够通过去除癌症患者天然存  
在的免疫抑制细胞,增强化疗方案的效果。免疫调节肿瘤坏死因子受体25(TNFR25)的  
激动剂、拮抗剂和免疫毒素

## (57)摘要

本发明的目的是提供利用免疫调节剂的新  
的组合物和方法,所述免疫调节剂能够刺激或者  
间接增强免疫系统或者在其它情况下具有免疫  
抑制作用。本文公开的TNFR25激动剂具有抗炎和  
愈合作用。在其他情况下,它们可以用于治疗哮  
喘和慢性炎症引起的疾病,例如炎性肠疾病,包  
括溃疡性结肠炎和克罗恩氏病(Crohn's  
Disease)。本文公开的TNFR25拮抗剂能够抑制  
CD8T细胞介导的细胞免疫应答,例如能够减轻组  
织移植后的器官或者组织排斥。本文公开的  
TNFR25激动剂代表生物效应调节剂,当给予肿瘤  
疫苗时,所述生物效应调节剂改变机体细胞免疫



1. 结合肿瘤坏死因子受体25 (TNFR25) 的分离的激动型抗体在制备用于增加个体中的抗原特异性CD8T淋巴细胞的药物中的用途, 其中所述CD8T淋巴细胞利用gp96-Ig交叉初免。
2. 如权利要求1所述的用途, 其中所述抗体是单克隆抗体。
3. 如权利要求1所述的用途, 其中所述抗体是IgG。

## 免疫调节肿瘤坏死因子受体25 (TNFR25) 的激动剂、拮抗剂和 免疫毒素

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求享有2005年8月30号提交的美国申请号60/712,084的优先权,在此以参考的方式将其完整引入。

[0003] 发明背景

[0004] 1. 发明领域

[0005] 本发明分别涉及肿瘤坏死因子受体超家族25 (TNFR25) 的激动剂、免疫毒素、拮抗剂和它们在治疗癌症、炎症和影响免疫抑制中的用途。

### 2. 背景技术

[0006] 人免疫系统的许多病症属于两个大类: :那些以衰弱的免疫应答为特征的病症和那些以过度免疫应答为特征的病症。免疫缺陷以衰弱的应答为表征。存在先天(生来的) 和后天形式的免疫缺陷。慢性肉芽肿病,其中吞噬细胞难于破坏病原体,是前者的实例。AIDS (“获得性免疫缺陷综合征”),一种传染病,起因于破坏CD4+T细胞的HIV病毒,是后者的实例。另一种以衰弱的免疫应答为特征的疾病是癌症。与健康个体不同,癌症患者的免疫系统已经不能有效识别和/或破坏肿瘤细胞。

[0007] 尽管寄予很大期望,迄今为止没有药物能够直接增强免疫系统的活性。但是,近来生物疗法已被用于募集免疫系统,直接地或者间接地,用于对抗诸如癌症的疾病。现在单克隆 (MAb) 抗体经常被用于生物疗法。例如,单克隆抗体可以与特异类型的癌细胞作用,具有直接或者间接的抗癌效果。

[0008] 肿瘤疫苗可以用于治疗或者初次治疗后的预防。抗肿瘤疫苗可能需要以CD4或者CD8表型的肿瘤特异的细胞毒性T细胞形式诱导细胞免疫。普遍认为有效的抗癌免疫需要长时间产生和维持的这类细胞毒性细胞。此外,证据表明必须激活免疫系统的固有装备 (innate arm) 以产生有效的抗肿瘤疫苗。增强或者产生体液应答的疫苗能够产生可以在相对较长的时间段内被检测到的抗体。如果有效,这些抗体需要能够在活细胞检测中靶定细胞表面抗原。保持针对抗原表位的特异性细胞免疫应答(获得性免疫)可能需要更频繁的免疫,尽管记忆细胞能够维持应答和再刺激免疫表位的能力。因而,如果能够获得加强的针对肿瘤疫苗的癌症特异性细胞免疫应答将是非常有利的。

[0009] 在天平的另一端,过度免疫系统包括进许多其他病症,特别是自身免疫病症,例如红斑狼疮,I型糖尿病(有时称为“少年发病糖尿病”),多发性硬化,牛皮癣,类风湿性关节炎和诸如克罗恩氏病(Crohn's Disease) 和溃疡性结肠炎(UC) 的炎性肠疾病。在这些病症中,免疫系统不能正确区分自身和非自身,攻击患者自身机体的一部分。疾病中过度免疫应答的其他实例包括超敏反应,例如变态反应和哮喘。

[0010] 当这些病症造成过度组织损伤时,经常利用免疫系统的抑制控制自身免疫病症或者炎症。免疫抑制药物故意诱导免疫缺陷以避免对移植器官的排斥。常用的免疫抑制剂包括糖皮质激素,咪唑硫嘌呤,氨甲蝶呤,环孢子菌素,环磷酰胺和巯基嘌呤。在器官移植中,

选择性的T细胞抑制避免器官排斥,使用环孢子菌素、他克莫司、霉酚酸酯(mycophenolate mofetil)和多种其他药物。

[0011] T淋巴细胞在调控免疫应答中起着重要作用。辅助T细胞表达CD4表面标志物,协助B细胞的抗体产生,并辅助CD8T细胞发展细胞毒活性。其他CD4T细胞抑制抗体产生和细胞毒性。T细胞调节被感染或者致瘤细胞的攻击和机体细胞耐受性之间的平衡。失调的免疫攻击可能导致自身免疫,而减弱的免疫应答导致慢性感染和癌症。

[0012] 本文的肿瘤坏死因子受体25(TNFR25)还可以互换的指如此处所述的死亡受体3(Death receptor 3,DR3),是T细胞功能的调节剂。死亡受体3(DR3)(Chinnaiyan等人,Science 274:990,1996)是TNF受体家族的成员。它还被称作TRAMP(Bodmer等人,Immunity 6:79,1997),wsl-1(Kitson等人,Nature 384:372,1996),Apo-3(Marsters等人,CurrBiol 6:1669,1996),和LARD(Screaton等人,Proc Natl Acad Sci USA 94:4615,1997),并包含典型的死亡结构域。用人DR3(hDR3)转染293细胞诱导凋亡和激活NF- $\kappa$ B。最近已经鉴定DR3的同源配体为TL1A(Migone等人,Immunity 16:479,2002),并已经显示,通过表达cIAP2诱导NF- $\kappa$ B和抑制凋亡,其对T细胞上的DR3具有共刺激活性(Wen等人,J Biol Chem 25:25,2003)。TL1A还结合诱饵受体3(DcR3/TR-6),表明生物学的TL1A可及性的细微调整(fine-tuning)具有非常重要的意义。已经观察到人DR3mRNA的多种剪接形式,显示转录后水平的调节(Screaton等人,Proc Natl Acad Sci USA 94:4615,1997)。

[0013] 许多TNF受体家族成员具有通过凋亡诱导细胞死亡或者诱导T细胞功能的共刺激信号的能力。最近针对TNF-R1证实了这些相对途径的调节,所述TNF-R1是包含原型(prototypic)死亡结构域的受体,其能够引起受体阳性T细胞的凋亡或者增殖(Micheau和Tschoopp.Ce11114:181,2003)。由TNF-R1组成的信号复合物通过TRADD、TRAF2和RIP引起的NF- $\kappa$ B活化来诱导FLIPL与由TNFR1、TRADD和FADD组成的第二信号复合物的结合,只要NF- $\kappa$ B信号持续,就阻止半胱天冬酶8活化。已经证明DR3能够在转染细胞中诱导凋亡并诱导NF- $\kappa$ B和所有三种MAP-激酶途径(Chinnaiyan等人,Science 274:990,1996;Bodmer等人,Immunity 6:79,1997;Kitson等人,Nature 384:372,1996;Marsters等人,Curr Biol 6:1669,1996;Screaton等人,Proc Natl AcadSci USA 94:4615,1997;Wen等人,J Biol Chem 25:25,2003)。NF- $\kappa$ B的阻断,而不是MAP激酶的阻断和蛋白合成的抑制导致DR3介导的细胞死亡,表明NF- $\kappa$ B信号通过抗细胞凋亡蛋白的合成调节抗细胞凋亡作用。人DR3mRNA在淋巴组织中表达,主要在脾,淋巴结,胸腺,和小肠中,表明DR3在淋巴细胞中的重要功能。通过同源重组已经在胚胎干细胞中去除鼠DR3(Wang等人,Mol Cell Biol 21:3451,2001)。DR3/-小鼠显示抗CD3在胸腺中的减弱的阴性选择,而对超级抗原显示正常的阴性选择,对胸腺细胞显示未受损的阳性选择。成熟的外周T细胞不受DR3缺陷的影响。尽管进行了大量初步研究,DR3的生理机能仍然没有充分表征。

[0014] 所有此处引用的科技出版物包括专利文件,为了所有目的在此以参考的方式完整引入。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明的一个方面涉及抗体,所述抗体结合肿瘤坏死因子受体25(TNFR25)抗原并可以作为TNFR25激动剂。在一个实施方式中,当利用gp96-Ig-卵清蛋白交叉初免(cross-primed)时,所述抗体相对于对照抗体能够增强OT-I CD8细胞扩增。在另一个实施方式中,

所述抗体是纯化的单克隆抗体4C12。

[0017] 本发明的另一个方面涉及TNFR25特异性毒素，包括与结合TNFR25受体的多肽连接的毒性剂。在这方面的每一个实施方式中，包含毒素的部分包括单克隆抗体4C12或者4C12的免疫特异部分。在另一个实施方式中，毒性剂选自放射性同位素，蓖麻毒，相思豆毒素，白喉毒素，假单胞菌属外毒素，或者金属离子。在另一实施方式中，结合TNFR25受体的多肽是TL1A蛋白或者其片段或者变异体。

[0018] 在本发明发明的另一个方面，在治疗患者癌症的方法中使用TNFR25特异性毒素。具体地，所述方法包括通过给予患者TNFR25特异性毒素并给予患者化疗剂，去除患者的CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>T调节细胞(Tregs)。

[0019] 本发明的另一个方面涉及激活细胞表达的TNFR25受体的方法，包括将细胞与TNFR25激动剂接触。该激动剂可以选自单克隆抗体4C12；结合TNFR25的抗体，并且当利用gp96-Ig-卵清蛋白交叉初免时，该抗体相对于对照抗体能够增强OT-I CD8细胞的扩增；可溶性TL1A蛋白；具有能够驱动TNFR25激动剂抗体转基因表达的表达盒的表达载体；具有能够驱动可溶性TL1A转基因表达的表达盒的表达载体；或者具有能够驱动TNFR25转基因表达的表达盒的表达载体。该方法还包括观察TNFR25受体信号传递的增强。

[0020] 本发明的一个其他方面涉及能够作为TNFR25拮抗剂的抗体。在一个实施方式中，所述抗体结合TL1A，并且当利用gp96-Ig-卵清蛋白交叉初免时，该抗体相对于对照抗体能够降低OT-I CD8细胞扩增。在另一个实施方式中，所述抗体是纯化的单克隆抗体L4G6。

[0021] 本发明的另一个方面涉及抑制细胞中TNFR25受体信号传递的方法。该方法包括将细胞与TNFR25拮抗剂接触。该方法还包括观察TNFR25受体信号传递的减弱。

[0022] 本发明的另一个方面涉及肿瘤疫苗，所述肿瘤疫苗包括肿瘤抗原和作为生物效应调节剂的TNFR25激动剂。该疫苗的另一个实施方式还包括佐剂。

[0023] 在本发明的另一个方面，在分离肿瘤特异性抗原后，用包括肿瘤特异性抗原和TNFR25激动剂的疫苗免疫患者以抵抗肿瘤。

[0024] 本发明的另一个方面涉及治疗和/或预防肠炎症的方法，包括给予有需要的患者有效量的包括TNFR25激动剂的治疗组合物。

[0025] 本发明的另一个方面涉及一种促进器官移植的治疗组合物，包括TNFR25拮抗剂和免疫抑制剂。在这方面的每一个实施方式中，所述免疫抑制剂是糖皮质激素，咪唑硫嘌呤，氨基蝶呤，环孢子菌素，环磷酰胺，巯基嘌呤，他克莫司或者霉酚酸酯。

[0026] 在本发明的另一个方面，在从供体移植组织到宿主的方法中使用TNFR25拮抗剂组合物。该方法包括以下步骤：从供体中获得组织；给予宿主TNFR25拮抗剂组合物；和移植组织到宿主中。

[0027] 本发明的另一个方面涉及抑制同源CD8T细胞群的克隆性增殖的方法。该方法包括将CD8T细胞暴露于它们的同源抗原和将CD8T细胞暴露于TNFR25拮抗剂。在另一个实施方式中，同源抗原与从供体移植到宿主的组织有关。

[0028] 本发明的另一个方面涉及包括多肽的分离的TNFR25拮抗剂，所述多肽由包括严紧条件下与SEQ ID NOS:4,5,6和/或16杂交的序列的核酸编码，并且其中该序列编码能够结合TL1A蛋白的氨基酸序列。在一个实施方式中，该序列在严紧条件下与SEQ ID NO:4杂交。在另一个实施方式中，该序列在严紧条件下与SEQ ID NO:5杂交。在另一个实施方式中，该

序列在严紧条件下与SEQ ID N0:6杂交。在另一个实施方式中，该序列在严紧条件下与SEQ ID N0:16杂交。在另一个实施方式中，TL1A是人或者小鼠TL1A。

[0029] 本发明的另一个方面涉及治疗和/或预防肺炎症的方法，包括给予有需要的患者有效量的治疗组合物，所述组合物包括包含多肽的TNFR25拮抗剂，所述多肽由包括严紧条件下与SEQ ID N0s:4,5,6和/或16杂交的序列的核酸编码，并且其中该序列编码能够结合TL1A蛋白的氨基酸序列。

[0030] 本发明的另一个方面涉及从供体移植组织到宿主的方法，包括从供体获得组织；给予宿主包括多肽的TNFR25拮抗剂，所述多肽由包括严紧条件下与SEQ ID N0s:4,5,6和/或16杂交的序列的核酸编码，并且其中该序列编码能够结合TL1A蛋白的氨基酸序列；及将所述组织移植入所述宿主。

[0031] 本发明的另一个方面涉及组合物，包括由严紧条件下与SEQ IDN0s:3和/或7杂交的序列编码的多肽，并且其中该序列编码能够结合TNFR25受体蛋白的氨基酸序列；和毒性剂。在一个实施方式中，所述毒性剂选自放射性同位素，蓖麻毒，相思豆毒素，白喉毒素，假单胞菌属外毒素，和金属离子。

[0032] 本发明的另一个方面涉及治疗患者癌症的方法，包括通过给予患者一种包含如权利要求39所述的毒素的组合物去除患者的CD4+/CD25+T调节细胞(Tregs)；和给予患者化疗剂。

[0033] 本发明的另一个方面涉及治疗和/或预防肠炎症的方法，包括给予有需要的患者有效量的治疗组合物，所述组合物包括由严紧条件下与SEQ ID N0s:3和/或7杂交的序列编码的多肽，并且其中该序列编码能够结合TNFR25受体蛋白的氨基酸序列。在一个实施方式中，所述炎症是过敏性肠综合征导致的。在另一个实施方式中，所述肠炎症是克罗恩氏病导致的。

[0034] 本发明的另一个方面涉及肿瘤疫苗，包括肿瘤抗原和由严紧条件下与SEQ ID N0s:3和/或7杂交的序列编码的多肽，并且其中该序列编码能够结合TNFR25受体蛋白的氨基酸序列，所述多肽作为生物效应调节剂。

[0035] 本发明的另一个方面涉及表达载体，所述表达载体包括严紧条件下与SEQ ID N0s:3和/或7杂交和编码能够结合TNFR25受体蛋白的氨基酸序列的核酸序列。

[0036] 本发明的另一个方面涉及表达载体，所述表达载体包括严紧条件下与SEQ ID N0s:4,5,6和/或16杂交的核酸，并且其中该序列编码能够结合TL1A蛋白的氨基酸序列。

[0037] 根据下面的详细说明，其中只展示和描述本发明的优选实施方式，简单地通过实现本发明的最佳预期方式进行说明，本发明的其他优点对本领域技术人员将是显而易见的。作为将要实现的，本发明还可以采用其他和不同的实施方式，其多个细节可以在不同明显的方面进行改进，所有这些都不脱离本发明的实质。无需这些具体细节的一些或者全部，本发明也可以实现。在其他情况下，没有详细描述公知的操作方法，以免不必要的模糊本发明。因此，附图和说明实质上被认为是说明性的，而不是限制性的。

[0038] 附图简述

[0039] 图1A描述鼠TNFR25在淋巴结细胞中的表达。对作为第一抗体的同种型对照抗体，用黑色数字表明MFI，对抗TNFR25用灰色表示。TNFR25的检测需要三夹心法，首先是仓鼠抗TNFR25单克隆抗体，然后是山羊抗仓鼠生物素和PE-标记的Strept-抗生物素蛋白。图1B描

述TNFR25在活化淋巴细胞上的表达。利用固定的抗CD3 (5 $\mu$ g/ml) 和抗CD28 (1 $\mu$ g/ml) 或者LPS (1 $\mu$ g/ml) 进行24小时完成脾细胞的活化。以CD4或者CD8或者B220阳性和7-AAD阴性细胞对细胞进行设门(下标表示活化的CD4, CD8或者B细胞)。在直方图中,显示静止脾细胞和活化脾细胞中TNFR25表达的MFI。图1C描述TNFR25在胸腺细胞上的表达。以CD4/CD8双阴性, 双阳性或者单阳性细胞对胸腺细胞设门, 并评估抗TNFR25荧光。

[0040] 图2A描述鼠TNFR25的剪接形式。对从静止鼠脾细胞和鼠细胞系获得的mRNA进行RT-PCR获得剪接形式。CRD: 半胱氨酸-富集结构域; TM: 跨膜结构域; DD: 死亡结构域。星号: 在框的终止密码子。在剪接形式1-4中, 外显子2和3之间的内含子不被剪接, 包含一个未成熟终止密码子。剪接形式1-4很可能是无功能的蛋白。小鼠 $\Delta$ 5和 $\Delta$ 6(对应于人 $\Delta$ 6和 $\Delta$ 6,7)缺少完整的跨膜结构域, 预测其是分泌形式, 能够作为TL1A的可溶性诱饵受体。 $\Delta$ 5,6(可能对应于人A3)和FL剪接形式在本报告中作为转基因被研究。 $\Delta$ 5,6,8和 $\Delta$ 5,6,9(无人的同系物)被预测是膜锚定的, 但缺少死亡结构域, 可能具有改变的信号传递性质或者可能作为显性阴性剪接形式。此处公开的优选的DNTNFR25是在TM结构域后被截短的。图2B描述活化诱导的TNFR25的其他剪接。小鼠和人的TNFR25均在活化之后被剪接。此处显示人的剪接, 因为凝胶电泳后TNFR25的剪接形式比鼠形式在大小方面分离的更好。通过测序确认剪接形式。利用Ficoll-Hypaque梯度离心分离PBL。每个样本使用五百万个细胞, 提取mRNA, 并利用Invitrogen cDNA合成试剂盒转变为cDNA。显示通过PHA (5 $\mu$ g/ml), 固定的抗CD3 (5 $\mu$ g/ml) 和可溶性抗CD28 (1 $\mu$ g/ml), 或者PMA (10ng/ml) 和伊屋诺霉素 (400ng/ml) 活化PBL。在指定时间点收集细胞, 进行RT-PCR;  $\beta$ -肌动蛋白被用作内参。图2C描述活化诱导的剪接是PKC-依赖的和蛋白合成-不依赖的。单独用PMA (10ng/ml) 或者单独用伊屋诺霉素 (400ng/ml) 或者它们的组合刺激新分离的PBL细胞。用H7 (50 $\mu$ M) 或者放线菌酮 (10 $\mu$ g/ml) 预处理PBL半小时, 然后在细胞培养物中添加PMA和伊屋诺霉素。12小时后收集细胞进行RT-PCR分析。

[0041] 图3显示TNFR25转基因在CD2启动子和增强子下的表达和功能。图3A描述TNFR25在转基因小鼠中相对B6野生型小鼠和同种型对照的表达。腹股沟淋巴结细胞对CD4, CD8, B220, CD11c阳性细胞, 或者NK 1.1阳性和CD阴性细胞, 或者NK1.1/CD3双阳性细胞设门。相应MFI被指明。FL TNFR25,  $\Delta$ 5,6TNFR25和DN TNFR25的表达谱是相同的。图3B描述可选剪接的TNFR25转染的肿瘤细胞的Western印迹。上样50 $\mu$ g来自转染了3种TNFR25剪接形式的P815裂解产物的蛋白, 用抗TNFR25抗体10D1进行印迹。第1道:DNTNFR25; 第2道: $\Delta$ 5,6TNFR25; 第3道:FL TNFR25。在Western印迹中该抗体不检测 $\Delta$ 5,6TNFR25。图3C显示相对于野生同类, FLTNFR25-tg淋巴结细胞和胸腺细胞中CD4和CD8阳性细胞减少的细胞含量(cellularity) ( $n=5$ ) \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001。图3D描述FL和 $\Delta$ 5,6TNFR25转基因细胞受损的活化诱导的增殖。通过胸腺嘧啶核苷摄取刺激3天后, 最后6小时期间测量纯化的CD4或者CD8细胞的增殖。在微量滴定板上用固定的抗CD3 (2 $\mu$ g/ml) 活化细胞, 包含或者不包含可溶性抗CD28 (1 $\mu$ g/ml) 或者PMA (10ng/ml) 和伊屋诺霉素 (400ng/ml)。使用1000U/ml重组小鼠IL-2。图3E显示转染FLTNFR25(上栏)或者 $\Delta$ 5,6TNFR25(下栏)的EL4细胞对TNFR25触发的应答中, 测量FL TNFR25和 $\Delta$ 5,6TNFR25激活的NF- $\kappa$ B NF- $\kappa$ B的活化。细胞用激动型(agonistic) TNFR25抗体4C12 (5 $\mu$ g/ml) 处理50分钟; 如所示, 以25%的TL1A转染的EL4细胞上清液形式添加可溶性TL1A25、50或者75分钟; 通过直接添加TL1A转染EL4细胞到表达TNFR25的EL4, 给予膜结合TL1A (MTL1A) 50分钟。对照接受EL4(未转染)上清液50分钟。制备

核提取物,用EMSA分析;箭头指明活化的NF- $\kappa$ B。图3F描述野生、FL TNFR25和 $\Delta$  5,6TNFR25转基因CD4T细胞的初始Th2偏性细胞因子的产生。来自脾的CD4T细胞经阴性选择纯化,用固定的抗CD3 (2 $\mu$ g/ml) 和可溶性抗CD28 (1 $\mu$ g/ml) 活化3天。收集上清液用于细胞因子ELISA检测。附图表示3个独立实验,n.s.:不显著;\*p<0.05;\*\*p<0.001;\*\*\*p<0.001。图3G说明TNFR25能够同时刺激Th1或者Th2细胞因子的产生。在非极化(Th中性)、Th1或者Th2极化条件下,检测再刺激的FL TNFR25-tg CD4T细胞的细胞因子产生。单独用固定的抗CD3 (2 $\mu$ g/ml) 和可溶性抗CD28 (1 $\mu$ g/ml) (Th中性),或者联用IL-12 (5ng/ml) 和抗IL-4 (20 $\mu$ g/ml) 用于Th1极化,或者联用IL-4 (10ng/ml) 、抗IFN- $\gamma$  (10 $\mu$ g/ml) 和抗IL-12 (10 $\mu$ g/ml) 用于Th2极化,作用4天,活化CD4细胞。收集细胞,洗涤后再铺板于抗CD324小时,收集上清液用于细胞因子ELISA分析。

[0042] 图4显示TNFR25转基因细胞减少的增殖不是由于凋亡、IL-2或者IL-2受体表达的缺失。图4A显示转基因CD4和CD8细胞中IL-2-Ra (CD25) 在活化时的正常上调。在用固定的抗CD3和可溶性抗CD28活化72小时后,收集脾细胞,洗涤,用抗CD25-FITC、抗CD8-PE和抗CD4-CY染色。上栏为野生型,下栏为 $\Delta$  5,6TNFR25-tg细胞。图4B证明转基因细胞在活化时不经历增加的凋亡。用固定的抗小鼠CD3 (2 $\mu$ g/ml) 和可溶性抗mCD28 (1 $\mu$ g/ml) 活化CD4细胞3天,再用Annexin-V-PE和7-AAD染色。Annexin-V阳性和7-AAD阴性细胞表示凋亡的细胞。图4C显示 $\Delta$  5,6TNFR25转基因T细胞产生降低的IL-2。通过阴性选择纯化T细胞,用固定的抗CD3和可溶性抗CD28活化3天。通过ELISA检测分析上清的IL-2产生;\*\*p=0.0078。图4D显示在初始应答中显性阴性TNFR25转基因细胞不是Th2极化的。来自脾的CD4T细胞经阴性选择纯化,用固定的抗CD3 (2 $\mu$ g/ml) 和可溶性抗CD28 (1 $\mu$ g/ml) 活化3天。收集上清用于细胞因子ELISA检测。附图表示3个独立实验。图4E描述DN TNFR25转基因和野生小鼠相同的抗体-同种型应答。用溶于无菌PBS的100 $\mu$ g DNP-KLH腹腔内免疫小鼠,在免疫3周后通过ELISA评价血清中DNP特异性IgG1和IgG2a抗体。用0.8 $\mu$ g/ml DNP-BSA包被高结合96孔板,以检测抗DNP的特异性抗体。附图表示3个独立实验中的一个。

[0043] 图5显示TNFR25转基因小鼠在体内刺激(challenge) 后出现Th2-偏性应答(biased response)。图5A证明在免疫的TNFR25-tg小鼠中,抗体-同种型是Th2偏性的。用不含佐剂、溶于无菌PBS的100 $\mu$ gDNP-KLH腹腔内免疫小鼠。免疫1周后通过ELISA评价血清中的DNP特异性IgG1和IgG2a抗体。用0.8 $\mu$ g/ml DNP-BSA包被高结合96孔板,以检测抗DNP的特异性抗体。数据表示3个独立实验中的一个。\*\*p<0.11;n.s.:不显著。图5B显示TNFR25信号传递在支气管肺泡液(BALF) 中调节嗜曙红细胞增多。如实施例10-15所述,对野生型和 $\Delta$  5,6TNFR25-tg小鼠进行免疫和气道刺激(challenge)。灌洗气道,从Wright-Giemsa染色的细胞离心涂片制品获得差异细胞计数。\*:p<0.05;n.s.:不显著。图5C显示TNFR25-tg小鼠中加重的肺部炎症。

[0044] 用卵清蛋白腹腔内致敏和气道刺激的小鼠的肺组织结构。在支气管灌洗后,取出肺,固定于10%中性缓冲福尔马林中。然后将肺用石蜡包埋,切成5 $\mu$ m厚,用H&E(左栏) 或者过碘酸-席夫染色反应(PAS,右栏) 检测粘液产生。上面两栏野生型B6小鼠;下栏 $\Delta$  5,6TNFR25-tg小鼠。图5D显示TNFR25信号控制血清IgE水平。在第0天和气雾剂刺激3天后(第15天) 对小鼠取血。分离血清,利用夹心ELISA分析进行ELISA卵清蛋白特异性IgE。因为没有OVA特异性IgE的标准蛋白,结果显示为0.D.单位。附图表示3个独立实验中的一个。\*\*:p<0.01。图5E描述TNFR25-tg小鼠中支气管淋巴结细胞增加的Th2细胞因子产生。在气雾剂刺

激1天后(第13天)收集支气管淋巴结,在体外用100 $\mu$ g/ml卵清蛋白再刺激细胞4天。然后通过ELISA分析上清的细胞因子产生。该图是2个独立实验的代表。 $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ 。

[0045] 图6显示显性阴性的TNFR25干扰Th2极化和肺部炎症。图6A显示DN TNFR25转基因阻断内源TNFR25的细胞因子共刺激。用抗CD3,或者用激动型抗TNFR25抗体4C12和抗CD3联用,刺激野生型和DN TNFR25-tg CD4细胞3天,通过ELISA分析上清的细胞因子。图6B显示DN TNFR25通过内源TNFR25阻断增殖的共刺激。在增殖检测中,用抗CD3,4C12,或者抗CD3和4C12的组合活化野生型和DN TNFR25-tg CD4细胞3天,在最后8小时测量胸腺嘧啶核昔的掺入。图6C显示DN TNFR25-tg CD4T细胞在二级活化(secondary activation)时产生减少的Th2细胞因子。野生型和转基因CD4T细胞经阴性选择纯化,用固定的抗CD3(2 $\mu$ g/ml)和可溶性抗CD28(1 $\mu$ g/ml)活化3天。然后收集细胞,洗涤,重新铺板,用固定的抗CD3(1 $\mu$ g/ml)再刺激2天。收集上清用于细胞因子ELISA检测。n.s.:不显著的;  $***p < 0.001$ 。图6D描述在体外DN TNFR25-tg CD4T细胞抵抗Th2极化。纯化野生型和DN TNFR25-tg CD4细胞,并在中性(ThN)或者Th2极化条件(通过添加IL-4并用抗体阻断IFN- $\gamma$ )下用抗CD3和抗CD28活化4天。收集细胞,洗涤后重置于抗CD324h,收集上清,用ELISA分析细胞因子。图6E显示相对野生型小鼠,DN TNFR25-tg 小鼠BALF中减少的细胞渗出。激发小鼠,然后根据标准步骤用卵清蛋白进行气雾剂刺激; $n=5$ ;\*:  $p < 0.05$ 。图6F描述免疫和气道刺激后DN TNFR25-tg 小鼠中肺部炎症的抑制。上栏:抗原气雾剂暴露后,DN TNFR25-tg 小鼠中未出现血管周围浸润。下栏:DNTNFR25-tg 小鼠中未出现粘液产生过剩和杯状细胞增生。如图5所示,通过卵清蛋白免疫和后续气雾剂暴露,诱导肺部炎症。野生型对照小鼠具有如图5所示的典型炎症。图6G显示DN TNFR25-tg 小鼠中卵清蛋白特异性IgE产生的抑制。通过ELISA测定血清中卵清蛋白特异性IgE。 $**p < 0.01$ 。图6H描述支气管淋巴结中DN TNFR25对Th2而不是Th1细胞因子产生的抑制。在气雾剂刺激1天后收集支气管淋巴结,在体外用1001.tg/ml卵清蛋白再刺激细胞4天。然后通过ELISA分析上清的细胞因子产生。该图是表示2个独立实验的代表。n.d.:未检测;n.s.:不显著的;\*:  $p < 0.05$ 。

[0046] 图7显示TL1A封闭抗体消除肺部炎症,并减少肺中Th2细胞因子的产生。图7A-D显示抗TL1A抗体L4G6是TL1A的功能拮抗剂。a.P815转染子,转染FL TNFR25,b.转染 $\Delta$ 5,6TNFR25和c.转染TL1A,用合适的抗体通过流式细胞术染色。d.L4G6阻断TL1A介导的TNFR25转染细胞的细胞毒性。从P815-TL1A转染细胞上清收集的系列稀释的可溶性TL1A与51Cr标记的P815-TNFR25靶细胞混合。在检测物中添加不同的抗小鼠TL1A单克隆抗体,5小时后分析51Cr的释放。图7E显示TL1A封闭抗体L4G6在野生型C57B16小鼠体内抑制粘液产生和肺部炎症。图解:卵清蛋白初免(priming),气雾剂刺激和给药封闭抗体(L4G6)或者对照抗体的方案。用对照IgG(左)和L4G6-IgG(右)进行PAS染色后的肺部组织结构。注意在L4G6治疗动物中无粘液产生(箭头指向用对照IgG处理的小鼠中的粘液)。图7F显示相对于对照IgG治疗动物,L4G6治疗小鼠中BALF细胞渗出减少。\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; n.s.:不显著的。图7G显示在用L4G6阻断TL1A后,用卵清蛋白再刺激的支气管淋巴结细胞产生IL-5和IL-13减少。 $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ 。实验细节如图5所示。图7H显示在气雾剂刺激后,肺的CD11c阳性细胞亚群(箭头)中TL1A的表达。在卵清蛋白-气雾剂刺激前后收集支气管淋巴结,分析CD11c细胞的TL1A表达。所有其他的支气管淋巴结细胞是TL1A阴性的。图7I显示在气道刺激后,来

自卵清蛋白免疫小鼠的支气管淋巴结细胞的淋巴细胞缺乏TL1A表达。在夹心法中用抗TL1A作为初始单克隆抗体对单细胞悬浮液染色。利用各自的标记抗体作为群标志物对细胞进行设门，显示TL1A直方图。抗TL1A；同种型对照。图7J显示TL1A在体外活化的T淋巴细胞中表达。用板结合的抗CD3或者LPS活化脾细胞24小时，然后用如图1所示的抗TL1A夹心法和标明的群标志物染色。甚至在LPS活化后，B细胞也是TL1A阴性的。设门群标志物，显示活化细胞中的TL1A表达。

[0047] 图8显示对于肺部炎症的诱导，NKT细胞中需要TNFR25信号。按照材料和方法的标准步骤，NKT缺陷 $\text{Ja}18$ 敲除小鼠 (Cui, J. 等人 Science 278, 1623–6 (1997)) 用卵清蛋白和明矾初免。在第11天，小鼠接受静脉注射所示的过继转移310万部分纯化的野生型NKT细胞或者DN TNFR25-tg NKT细胞或者PBS。第12天小鼠用卵清蛋白雾化刺激，第14天进行分析。野生型小鼠作为肺部炎症诱导的阳性对照，被免疫和卵清蛋白雾化刺激但无过继细胞转移的 $\text{Ja}18\text{k.o.}$ 小鼠作为阴性对照。数据来自两个独立实验每组的4只小鼠。 $\text{Ja}$ 是NKT缺陷小鼠 (Cui, J. 等人 Science 278, 1623–6 (1997))。

[0048] 图9显示肺部TL1A/TNFR25介导的NKT细胞和Th2极化的CD4细胞的触发模型。该模型显示TL1A和TNFR25之间潜在的相互作用，其有助于IL-13的产生和AHR的诱导。先前已经给出了需要NKT细胞的IL-13产生的证据 (Akbari, O. 等人, Nat Med 9, 582–8 (2003))。该文显示对于肺部炎症、CD11c+细胞的TL1A表达和通过TNFR25的CD4Th2效应物的共刺激，NKT细胞中的TNFR25信号传递的需求。因为CD4效应物能够表达TL1A，有可能CD4和NKT细胞之间的TL1A/TNFR25相互作用提供它们在哮喘中协同作用的分子联系。此外，其他肺相关细胞可能表达TL1A并促进引发肺部炎症。

[0049] 图10描述小鼠接受1百万OT-I-gfp静脉注射的试验的结果。2天后它们接受指定剂量的溶于PBS的卵清蛋白的腹腔内免疫(蓝色曲线)；利用EG7-gp96-Ig或者3T3-ova-gp96-Ig-24小时内注射细胞分泌gp96-Ig的数量(以ng计)标示在横坐标上；3T3-ova-24小时内注射细胞分泌卵清蛋白的数量标示在横坐标上。5天后，通过流式细胞术检测腹膜腔(PEC)和脾中的OT-I扩增。用3T3-ova-gp96-Ig免疫后，CD8细胞中OT-I的比例在PEC中达到50%，在脾中达到8%。

[0050] 图11A显示抗TNFR25mAb 4C12起激动性作用和杀伤TNFR25转染EL4细胞而不是野生型EL4的试验的结果。在图11B，在EG7-gp96-Ig免疫后24小时和72小时，腹腔内给予50 $\mu\text{g}$ 激动性4C12或者拮抗性抗TL1A L4G6或者对照IgG。4C12造成OT-I扩增的8–10倍增加和腹腔渗出细胞的加倍(每组n=4只小鼠)。抗TL1A抑制CD8扩增。

[0051] 图12显示热休克蛋白gp96对CD8细胞的交叉初免。用gp96-Ig和卵清蛋白转染疫苗细胞(同种异体的或者同系基因型的)，因此它们分泌gp96-Ig伴侣卵清蛋白肽。利用导致其活化和gp96\_Ig与其结合肽的吞噬的DC上的CD91和TLR2/4检测gp96。活化的DC上调B7(不依赖CD40-L)并通过Kb交叉对付(cross-reactive) gp96结合肽(在B6小鼠中)。OT-I是表达gfp的TCR转基因CD8细胞，其过继转移到对Kb-ova特异的B6小鼠。它们的扩增可以方便的利用绿色荧光蛋白来检测。

[0052] 图13显示FoxP3阳性CD4+CD25+Tregs表达TNFR25。通过去除B细胞CD8细胞和单核细胞纯化CD4细胞，然后通过磁力分选CD25进行阳性选择，随后进行活化。

[0053] 图14显示从DSS诱导的结肠炎中缺乏DN TNFR25-tg小鼠的康复。每组中5只小鼠接

受含2%DSS的饮用水共8天,然后恢复到正常水。

[0054] 图15显示TNFR25信号传递消除Treg抑制。

[0055] 图16显示gp96-Ig腹腔内免疫后,Gfp-OT-I定位到粘膜。小鼠通过过继转移接受1百万gfp-OT-I静脉注射。2天后,小鼠腹腔内接受4百万EG7-gp96-Ig(左)或者4百万EG7(右栏)作为刺激物。4天后,除了对PEC、脾和淋巴结中进行细胞的常规分析外,分析IEL、派氏淋巴结(Peyer's patches)和LPL中的gfp-OT-I比例。

[0056] 图17显示SEQ ID N0s:1-7和SEQ ID NO:16和选定的公共数据库登录号。

[0057] 发明详述

[0058] 本发明的目的是提供利用免疫调节剂的新的组合物和方法,所述免疫调节剂能够刺激或者间接增强免疫系统或者在其它情况下具有免疫抑制效果。此处公开的TNFR25激动剂代表生物效应调节剂,当给予肿瘤疫苗时,所述生物效应调节剂改变机体细胞免疫防御和癌细胞之间的相互作用以加强、指导或者修复机体抵抗癌症的能力。此处公开的TNFR25特异性毒性剂能够通过去除癌症患者天然存在的免疫抑制细胞,增强化疗方案的效果。此处公开的TNFR25激动剂还具有愈合作用。在其他情况下,它们可以用于治疗诸如炎症性肠病引起的疾病慢性炎症。此处公开的TNFR25拮抗剂能够抑制CD8T细胞介导的细胞免疫应答,例如能够治疗哮喘和减轻组织移植后的器官或者组织排斥。

[0059] 1. 定义

[0060] 在描述本发明时,将使用下列术语,如下面所示进行定义。

[0061] “抗原”包括可以被抗体分子特异结合的任何物质。因此,术语“抗原”包括生物分子,包括但不限于,简单的中间代谢物,糖,脂,自体酸(autoacids),以及激素以及大分子例如复合糖类,磷脂,核酸和蛋白。

[0062] 抗原组合物可以包括抗原(例如,肽或者多肽),编码抗原的核酸(例如,抗原表达载体),或者表达或者展现抗原的细胞。参见美国公开号2003/0185840,在此以参考将其完整引入。

[0063] “免疫原”是一种大分子抗原,能够引发淋巴细胞活化,导致抗原特异性免疫应答。因此免疫原包括任何包含一种或者多种抗原决定簇的分子,所述抗原决定簇将刺激宿主的免疫系统以起始分泌的、体液的和/或细胞抗原-特异性应答。

[0064] 术语“抗体”包括多克隆和单克隆抗体制品。本发明的抗体可以在任何哺乳动物中制备,包括小鼠,大鼠,兔子,山羊和人。抗体可以是下列免疫球蛋白类中任意一类的成员:IgG,IgM,IgA,IgD,或者IgE,和其亚类,优选的是IgG1抗体。

[0065] 术语抗体还指本说明书所述抗体的功能同等物。功能同等物具有与那些抗体相当的结合特征,包括,例如,嵌合、杂交、人源化和单链抗体及其片段。产生这类功能同等物的方法公开于PCT申请W093/21319,欧洲专利申请号239,400;PCT申请WO 89/09622;欧洲专利申请338,745;和欧洲专利申请EP 332,424。功能同等物包括多肽,所述多肽具有与本发明抗体的可变或者高变区的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列。“基本上相同”的氨基酸序列此处定义为与另一氨基酸序列具有至少70%,优选的至少大约80%,和更优选的至少大约90%同源性的序列,按照Pearson和Lipman的FASTA搜索法检测,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85,2444-2448(1988)。

[0066] 此处使用的术语“单克隆抗体”是指具有同质性抗体群的抗体组合物。该术语不限

于抗体的物种或者来源,也不受其制备方法的限制。该术语包括全体免疫球蛋白。

[0067] 制备多克隆和单克隆抗体的方法是本领域已知的。通过目标抗原免疫合适的动物,例如小鼠,大鼠,兔子,羊或者山羊,产生多克隆抗体。为了增强免疫原性,在免疫前抗原可以连接到载体。合适的载体通常是大的、代谢缓慢的大分子例如蛋白,多糖,聚乳酸,聚乙醇酸,聚合氨基酸,氨基酸共聚物,脂聚集物(例如油滴或者脂质体),和失活的病毒颗粒。这类载体对本领域普通技术人员来说是公知的。此外,抗原可以偶联到细菌类毒素,例如来自白喉,破伤风,霍乱,等等的类毒素,以增强其免疫原性。

[0068] 当需要大量血清时,优选的用兔子、绵羊和山羊制备多克隆血清。这些动物之所以是好的设计选择,还因为标记的抗兔子、抗羊和抗山羊抗体的提供。通常通过在盐水中,优选的在佐剂例如弗氏完全佐剂("FCA")中,混合或者乳化抗原,并且肠胃外的注射混合物或者乳剂(通常皮下或者肌内的),进行免疫。通常2-6周后,用盐水中、优选弗氏不完全佐剂("FIA")中的抗原进行一次或者多次注射后,对动物加强免疫。也可以利用本领域已知的方法,通过体外免疫产生抗体。然后从免疫动物获得多克隆抗血清。

[0069] 通常利用以下方法制备单克隆抗体:Kohler和Milstein,Nature (1975) 256:495-497,或者其改进,或者Campbell的"Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas"Burdon等人,Eds.,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985);以及利用Huse等人在Science 246, 1275-1281 (1989) 中描述的重组DNA方法。

[0070] 通常,按照上述方法免疫小鼠或者大鼠。但是,不是从动物取血以获得血清,而是摘除脾(和可选的若干大的淋巴结)并将其解离成单细胞。如果需要,通过将细胞悬液经过包被抗原的板或者孔,可以筛选脾细胞(在去除非特异性粘附细胞后)。表达对抗原特异的膜结合免疫球蛋白的B细胞,将与板结合,不会随剩余的悬浮液被洗掉。然后诱导所获B细胞或者所有解离的脾细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤,在选择培养基(例如,次黄嘌呤,氨基蝶呤,胸腺嘧啶核苷培养基,"HAT")中培养。然后通过有限稀释将所获杂交瘤种到板上,检测与免疫抗原特异结合(并且不和无关抗原结合)的抗体的产生。然后在体外(例如,在组织培养瓶或者空心纤维反应器),或者体内(例如,在小鼠腹水中)培养挑选的单克隆抗体-分泌杂交瘤。

[0071] "抗原结合部位",或者"结合部分"是指参与抗原结合的免疫球蛋白分子部分。抗原结合部位由重("H")和轻("L")链的N端可变("V")区氨基酸残基形成。位于重和轻链V区的3个高度变异的伸展(stretches)被称为"高变区",其插入称为"框架区"或者"FR"的更保守的侧翼伸展之间。因此术语"FR"是指天然存在于免疫球蛋白的高变区之间和附近的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的3个高变区和重链的3个高变区在三维空间中彼此相对排列形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合抗原的三维表面互补,每条重和轻链的3个高变区被称为"互补决定区"或者"CDR"。

[0072] 此处使用的术语"免疫特异性","免疫结合"和"免疫结合性质"是指免疫球蛋白分子和抗原之间存在的类型之间的非共价相互作用,所述免疫球蛋白对该抗原是特异的。免疫结合相互作用的强度或者亲合力可以表示为相互作用的解离常数( $K_d$ ),其中更小的 $K_d$ 表示更强的亲合力。可以利用本领域公知的方法定量所选多肽的免疫结合性质。这类方法需

要测定抗原结合部位/抗原复合物形成和解离的速率,其中所述速率取决于复合物伴侣的浓度,相互作用的亲合力和双向等同影响速率的几何参数。因此,通过计算结合和解离的浓度和实际速率可以确定“开速率常数(on rate constant)”( $K_{on}$ )和“关速率常数(off rateconstant)”( $K_{off}$ )。 $K_{off}/K_{on}$ 的比例能够去除所有和亲合力无关的参数,因此等于解离常数 $K_d$ 。通常参见Davies等人(1990)Annual Rev.Biochem.59:439-473。

[0073] 本领域已知许多治疗有效的分子,所述分子包括能够展示抗体分子的免疫结合性质的抗原结合部位。蛋白水解酶木瓜蛋白酶优选的切割IgG分子产生若干片段,其中两个(“F(ab)”片段)均包括一个共价杂二聚体,该杂二聚体包括完整的抗原结合部位。酶胃蛋白酶能够切割IgG分子得到若干片段,包括“F(ab')2”片段,该片段包括两个抗原结合部位。通过优先对IgM,很少情况下对IgG或者IgA免疫球蛋白分子的蛋白水解切割,产生“Fv”片段。但是,Fv片段更常见的是利用本领域已知的重组技术获得。Fv片段包括非共价VH::VL杂二聚体,该杂二聚体包括保留天然抗体分子的大部分抗原识别和结合能力的抗原结合部位。Inbar等人(1972)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69:2659-2662;Hochman等人(1976)Biochem 15:2706-2710;和Ehrlich等人(1980)Biochem 19:4091-4096。

[0074] 单链Fv(“sFv”)多肽是共价连接的VH::VL杂二聚体,由通过肽-编码连接子连接的包括VH-和VL-编码基因的基因融合物表达。Huston等人(1988)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 85(16):5879-5883。已经描述了许多识别用于将抗体天然聚集的-但化学分离的-轻和重多肽链的V区转入sFv分子的化学结构的方法,该sFv分子将折叠形成与抗原结合部位结构基本上类似的三维结构。参见,例如,Huston等人的美国专利5,091,513和5,132,405;Ladner等人的美国专利4,946,778。

[0075] 此处使用的“同源抗原”是指CD8T细胞受体(TCR)的免疫特异的抗原。这类抗原,通常衍生自例如病原体、移植组织(同种抗原)和肿瘤细胞,被免疫系统识别为非自身的。同源抗原与其CD8T细胞受体的结合导致T细胞的克隆性增殖。然后扩增的同源CD8T细胞群能够诱发抵抗侵入同源抗原来源的细胞免疫应答。

[0076] 本发明的抗体还可以用于制备“免疫毒素”。杂交分子组合了抗体的特异性或者具有毒素毒性的抗原。因而,免疫毒素分子具有抗原结合部分和毒性剂部分。免疫毒素优选的是对细胞表面分子例如TNFR25特异的,并促进毒性剂输送到表达上述细胞表面分子的细胞。

[0077] 优选的,“毒性剂”对其输送到的细胞具有细胞抑制和/或细胞毒性作用。优选的毒性剂是,例如,放射性同位素,荧光剂,化学发光剂,酶,酶底物,酶辅因子,酶抑制剂,染料,和金属离子。毒性剂包括但不限于碘-131,铟-111,和锝-99m,锝-99m,铟-111,钇-90,阿霉素(Yang等人,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:1189-1193),柔红霉素(Diener等人(1985)Science 231:148-150;Dillman等人(1988)Cancer Res.48:6097-6102),甲氨蝶呤(Uadia et al,(1985)J Natl Cancer Inst.74:29-35;Deguchi等人(1986)Cancer Res.46:3751-3755),和苯丁酸氮芥(Symth等人(1986)J Immunol.137:3361-3366)。其他毒性剂包括蓖麻毒,相思豆毒素,白喉毒素和假单胞菌属外毒素,或者其酶活性部分(A链)。参见,例如,Frankel等人的美国专利4,753,894;Nevelle,等人(1982)Immunol Rev 62:75-91;Ross等人(1980)European J Biochem 104;Vitteta等人(1982)Immunol Rev 62:158-183;Raso等人(1982)Cancer Res 42:457-464,和Trowbridge等人(1981)Nature 294:171-173。还包括

括酶活性毒素及其片段,例如蒴莲根毒素, $\alpha$ -帚曲菌素(alpha-sarcin),油桐蛋白,石竹素蛋白,美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI,PAPII,和PAP-S),苦瓜抑制剂,泻果素,巴豆毒素,石碱花(*sapaonaria officinalis*)抑制剂,白树毒素,mitogellin,局限曲菌素,酚霉素,和伊诺霉素。

[0078] “毒性剂”还可以是化疗剂。此处使用的术语“化疗剂”通常涉及给药以停止、减缓或者逆转不需要的细胞增殖的化合物。优选的这类药剂具有抗增殖效果。

[0079] 化疗剂可以是抗代谢产物例如5-FU,例如,基于5-FU的化疗法,包括给药5-FU,其衍生物,单独或者与其他化疗剂联用,例如甲酰四氢叶酸或者DPD抑制剂,例如尿嘧啶,5-乙炔基尿嘧啶,溴乙基尿嘧啶,胸腺嘧啶,苄基羟苄基尿嘧啶(benzyloxybenzyluracil,BBU)或者5-氯-2,4-二羟基吡啶。此外,已经发现与5-FU或者其衍生物与DPD抑制剂5-乙炔基尿嘧啶联用相比,化学式(I)的5'-脱氧-胞昔衍生物和5-FU或者其衍生物的共给药显著促进化疗剂选择性输送到肿瘤组织。

[0080] 或者,遗传毒性剂是那些形成持久基因组损伤的药剂,优选的在临床控制不需要的细胞增殖中用作化疗剂。遗传毒素诱导的DNA损伤的细胞修复的速率,以及细胞分裂周期中细胞生长的速率,影响遗传毒素疗法的结果。用于治疗众多癌症的一类遗传毒性化合物是DNA烷化剂和DNA插入剂。补骨脂素是已知可用于皮肤疾病例如牛皮癣、白癜风、真菌感染和皮肤T细胞淋巴瘤的光化学治疗的遗传毒性化合物。*Harrison's Principles of Internal Medicine*,Part 2Cardinal Manifestations of Disease,Ch.60(12th ed.1991)。另一类遗传毒性化合物,其成员能够烷基化或者插入DNA,包括合成的和天然来源的抗生素。本发明尤其感兴趣的是抗肿瘤抗生素,包括但不限于下列代表的化合物种类:安吖啶;放线菌素A、C、D(或者称为更生霉素)或者F(或者称KS4);重氮乙酰丝氨酸;博来霉素;洋红霉素(carubicin),柔红霉素(daunorubicin),或者14-羟基柔红霉素(阿霉素或者多柔比星);丝裂霉素A、B或者C;米托蒽醌;普卡霉素(光辉霉素);等等。另一类经常使用和烷基化DNA的遗传毒性剂包括卤代乙基亚硝脲(haloethyl nitrosoureas),尤其是氯乙基亚硝脲。这一大类的代表成员包括亚硝脲氮芥,毗葡亚硝脲,福莫司汀,环己亚硝脲,嘧啶亚硝脲,雷莫司汀和链脲佐菌素。卤代乙基亚硝脲第一药剂可以是任意上述代表化合物的类似物或者衍生物。

[0081] 当前可以通过铂配位化合物例如顺铂或者奥沙利铂控制的肿瘤包括包括睾丸、子宫内膜、颈、胃、扁平细胞、肾上腺皮质和小细胞肺癌以及成神经管细胞瘤和成神经细胞瘤。其他细胞毒性抗癌治疗剂包括,例如,用于睾丸癌的BEP(博来霉素,鬼臼乙叉甙,顺铂),用于膀胱癌的MVAC(氨甲蝶呤,长春花碱,多柔比星,顺铂),用于非小细胞肺癌治疗的MVP(丝裂霉素C,长春花碱,顺铂)。

[0082] 另一类遗传毒性剂,其成员烷基化DNA,包括硫和氮芥。这些化合物主要通过在鸟嘌呤的N7原子形成共价加合物来损伤DNA。这大类的典型成员包括苯丁酸氮芥,环磷酰胺,异磷酰胺,苯丙氨酸氮芥,氮芥(mechloroethamine),新氮芥(novembicin),氯乙环磷酰胺,等等。与所选细胞基因组中特异序列共价或者非共价相互作用的寡核苷酸或者其类似物也可以用作遗传毒性剂,如果需要选择一个或者多个预定的基因组靶标作为基因组损伤的部位。

[0083] 另一类药剂,其成员烷基化DNA,包括氮丙啶和甲基三聚氰胺。这些类例如包括六

甲密胺(六甲三聚氰胺),三亚乙基磷酰胺(TEPA),三亚乙基硫化磷酰胺(ThioTEPA)和三乙烯胺三嗪。

[0084] 其他类的DNA烷化剂包括烷基磺酸盐,以白消安为代表;azinidines,以芐替派为代表;和其他,以例如丙脒腙、米托蒽醌和甲基苄肼为代表。每一类均包括各自代表化合物的类似物和衍生物。

[0085] 在一个实施方式中,化疗剂是诸如EGFR和HER2-neu的受体酪氨酸激酶的抑制剂,并用作增殖细胞生长的选择性抑制剂。例如,erbstatin,一种EGF受体酪氨酸激酶抑制剂,减缓表达EGFR的人癌细胞的生长。苯乙烯的不同衍生物据称也具有酪氨酸激酶抑制性质,可用作抗癌剂。两种这类苯乙烯衍生物是I类RTK抑制剂,其效果已经通过减缓注入裸鼠的人鳞状细胞癌的生长证明。一些4-苯胺喹唑啉衍生物可用作受体酪氨酸激酶的抑制剂。这些化合物显示的非常紧密的结构-活性之间的关联提示清楚确定的结合模式,其中喹唑啉环结合在腺嘌呤口袋内,而苯胺基环结合在相邻的、唯一亲脂性的口袋内。已经在临幊上对作为抗癌药的3种4-苯胺喹唑啉类似物(两种可逆的和一种不可逆的抑制剂)进行了评估。此外,单克隆抗体曲妥单抗(Herceptin<sup>TM</sup>)用于治疗过表达HER2-neu的转移性乳腺癌。Scheurle,等人,Anticancer Res 20:2091-2096,2000。

[0086] “表达载体”是任意的遗传成分,例如,质粒、染色体、病毒、表现为细胞内多核苷酸复制的自主单位(即,能够在其自身控制下复制)或者使其能够通过插入宿主细胞染色体进行复制,具有与其结合的另一多核苷酸片段,以引起所结合的片段的复制和/或表达。合适的载体包括,但不限于病毒、质粒和粘粒。

[0087] 表达载体包含“表达盒”,所述表达盒包括待转录的多核苷酸序列,该序列与影响载体连接或者插入所需宿主细胞并影响待表达的多核苷酸的转录的多核苷酸序列进行可操作的连接。这类序列包括影响转录的启动子序列,增强转录的增强子序列,核糖体结合位点序列和转录和翻译终止序列。或者,可能无需将载体连接或者整合入宿主细胞DNA序列,表达载体就能够直接表达其编码的核酸序列产物。

[0088] 术语“可操作的连接”是指一条DNA片段与另一条DNA片段连接,这种方式使这些片段以预期的方式发挥功能。编码基因产物的DNA序列被可操作的连接到调控序列,当其被连接到调控序列时,例如,启动子,增强子和/或沉默子,这种方式能够直接或者间接的调控DNA序列的转录。例如,当一DNA序列相对启动子的转录起始位点连接到启动子的下游,相对转录起始位点在正确的读码框中并允许转录沿着DNA序列进行延伸时,该DNA序列被可操作的连接到启动子。当增强子或者沉默子连接到DNA序列的方式使DNA序列的转录分别增强或者减弱时,增强子或者沉默子被可操作的连接到编码基因产物的DNA序列。增强子和沉默子可以位于DNA序列编码区的上游、下游或者嵌入其中。如果信号序列可以表达为参与多肽分泌的前蛋白,则作为信号序列的DNA被可操作的连接到编码多肽的DNA。通常利用本领域技术人员已知的限制性核酸内切酶在合适的限制性位点或者通过接头或者连接子插入序列之中,实现DNA序列与调控序列的连接。

[0089] 此处使用的“小分子”是指设计与已知涉及特定疾病状态的特定蛋白相互作用的分子量合成化合物。这类化合物文库可以利用例如组合化学轻易地合成,可利用常规技术筛选TNFR25激动/拮抗活性。

[0090] 术语“TNFR-SF25”,“TNFR25”或者“DR3”对于以往不清楚其完整生物功能的TNF受

体家族的成员，在本文中可以互换使用。参见美国专利6,713,061，和Borysenko，等人，Biochem Biophys Res Commun. 2005 Mar 18; 328 (3): 794-9, Sheikh, 等人, Curr. Cancer Drug Targets. 2004 Feb; 4 (1): 97-104, 在此以参考的方式将其完整引入。但是，本发明人做出了许多重要的发现。编码小鼠TNFR25的cDNA序列如SEQ ID NO:1所示。编码人TNFR25的cDNA序列如SEQ ID NO:2所示。

[0091] 与TNF-R家族的任何其他成员不同，发现DR3表达受选择的mRNA剪接的控制。静止的T细胞很少或者几乎不表达DR3蛋白，但包含高水平的随机剪接的DR3mRNA。通过T细胞受体活化T细胞时，蛋白激酶C (PKC) 被活化。PKC活化依次介导全长DR3的正确剪接和蛋白的表面表达。这种对DR3表达的独特调控允许DR3蛋白在T细胞中快速表达，并通过影响控制DR3剪接和表达的PKC水平能够实现对DR3表达的环境调控。

[0092] DR3还参与共刺激T细胞极化和刺激Th2极化细胞中IL-13和IL-10的产生。这是一个重要的发现，因为在其他情况下，IL-10的产生在抑制炎症性肠病中起着关键作用。

[0093] 在T细胞活化和抗原暴露时，T细胞中TNFR25的转基因表达介导细胞因子的TH2极化和抗体产生。此外转基因TNFR25部分抑制TCR驱动的CD4和CD8细胞增殖，并减少淋巴器官中T细胞总数而且不诱导凋亡。CD8细胞比CD4细胞更受TNFR25的影响。因此，通过造成针对TH2或者针对混合TH1/TH2应答的续发极化，TNFR25信号传递在对病原体的效应物应答中非常最重要。

[0094] 在小鼠的哮喘模型中，TNFR25转基因小鼠对抗原诱导的气道炎症高度敏感，在通过吸入接触抗原时在肺中产生IL-13和嗜酸性粒细胞的数量增加。当与野生型小鼠比较时，表达显性阴性形式TNFR25的转基因小鼠显示对气道高反应性增强的抗性。

[0095] 此处“TL1A”是指TNF-样因子，其通过包含结合死亡结构域的受体DR3，作为IFN- $\gamma$ 分泌的共刺激物。TL1A，和TNF一样，据推测也作为同源三聚体的可溶形式进行循环。因此，此处使用的“可溶性TL1A”是指同源三聚体TL1A。该术语不限于任何种类的特异形式。但是，人TL1A单体的cDNA序列如SEQ ID NO:7所示，小鼠的如SEQID NO:3所示。

[0096] 已经表明TL1A通过作为Th1极化细胞因子，在炎症性肠病 (IBD) 中发挥作用。已经证明TL1A蛋白的数量和TL1A阳性细胞的数目与炎症的严重程度相关联，最明显地是在克罗恩氏病 (CD) 中。还证明向来自CD患者的受PHA刺激的固有层单个核细胞培养物中添加重组人TL1A，显著增加IFN- $\gamma$  产生达到4倍，而在对照患者中只观察到很小的影响。此外，阻断抗TL1A的抗体能够改善野生型小鼠的哮喘，表明TNFR25和TL1A涉及哮喘的发病机理。

[0097] 人体受体通过被天然(例如激素，细胞因子和神经递质)或者合成(例如药物，例如，抗体或者小分子)激动剂刺激或者抑制来起作用。

[0098] 此处“TNFR25激动剂”是指结合TNFR25受体并在细胞中触发应答的物质，所述细胞中TNFR25受体的表达类似于将细胞暴露于天然TNFR25配体，例如TL1A时观察到的应答。激动剂在含义上是拮抗剂的反义词，虽然拮抗剂也能结合受体，但它不能活化受体，实际上是完全的或者部分的阻断由内源或者外源激动剂引起的活化。部分激动剂活化受体，但不造成和完整激动剂同样的生理变化。

[0099] 作为TNFR25激动剂，可溶性TL1A可以用治疗剂形式给药患者，以增强给定细胞群中TNFR25受体的活化。或者，TNFR25激动剂的另一个实例是能够结合和活化TNFR25的抗体。例如，单克隆抗体4C12结合和活化TNFR25信号途径。在另一个实施方式和本发明背景下，

TNFR25激动剂可以源自具有表达盒的表达载体,所述表达盒能够异位驱动TNFR25激动剂抗体和/或TL1A蛋白在选定位置或者选定时间进行转基因表达。在另一个实施方式中,通过一种具有能够驱动TNFR25自身的转基因表达的表达盒的表达载体提供导致组织中TNFR25信号传递增强的TNFR25激动剂。这在组织中需要增强TNFR25信号的情况下是有用的,其中相对于受体存在过量的外源或者内源TNFR25激动剂。

[0100] 此处“TNFR25拮抗剂”是指抑制TNFR25受体正常生理机能的物质。这类药剂通过干扰内源受体激动剂/配体例如TL1A与TNFR25受体的结合起作用。TNFR25拮抗剂的一个实例是显性阴性TNFR25受体。优选地,此处使用的TNFR25拮抗剂是对TL1A特异的抗体,它干扰TL1A活化TNFR25受体的能力。最优选地,该抗体是单克隆抗体L4G6。在另一个实施方式中,TNFR25拮抗剂是TNFR25的胞外部分或者TNFR25的选择剪接形式与免疫球蛋白的Fc部分或者任何其他合适的融合伴侣的融合蛋白。在另一个实施方式中,TNFR25拮抗剂是TNFR25的可溶性形式,通过在跨膜结合结构域上截断制备,其或者作为其他剪接形式或者作为人工构建物。在另一个实施方式中,TNFR25拮抗剂是特异结合TNFR25并干扰其结合天然配体的抗体。在另一个实施方式中,TNFR25拮抗剂可以是具有表达盒的表达载体,所述表达盒能够驱动反义mRNA、RNAi或者核糖酶的转基因表达,所述反义mRNA、RNAi或者核糖酶能够在选定位置或者选定时间敲除内源TNFR25和/或TL1A mRNA的转录和/或翻译。在另一个实施方式中,通过提供具有能够驱动显性阴性TNFR25转基因表达的表达盒的表达载体,可以在组织中减弱TNFR25信号传递。

[0101] TNFR25拮抗剂或者激动剂可以采用适体的形式。“适体”是基于结合其他分子的能力选自随机库(pool)s的DNA或者RNA分子。在一个实施方式中,适体特异结合TNFR25以阻断与其天然配体例如TL1A的结合,或者结合TL1A自身,从而阻止其结合TNFR25。在另一个实施方式中,适体特异结合TNFR25受体并活化它。

[0102] 此处使用的“显性阴性”或者“DN”是指外源给予的TNFR25结构变异数,用于封闭内源TNFR25。例如,摩尔过量的DN将与内源TNFR25竞争结合TNFR25配体,例如TL1A。除了缺失胞内结构域以外,DN优选地与野生型TNFR25相同。或者,除了缺失跨膜和胞内结构域以外,DN与野生型TNFR25相同。小鼠DN TNFR25的编码序列如SEQID N0:4所示。人DN TNFR25的编码序列如SEQ ID N0:5所示。只包含胞外结构域的人DN TNFR25的编码序列如SEQ ID N0:6所示。

[0103] 本发明还涉及与SEQ ID N0s:3-7基本上相同的编码序列。技术人员还清楚与SEQ ID N0s:3-7基本上相同的寡聚核苷酸序列分别可以不同于SEQ ID N0s:3-7,相对于至少一个核苷酸碱基的相同。但是,所有与SEQ ID N0s:3-7基本上相同的寡聚核苷酸序列将在严紧条件(如此处定义)下分别与SEQ ID N0s:3-6互补序列的全部或者部分(即,靶序列)杂交。术语“杂交特异地”或者“特异地杂交”是指寡聚核苷酸(例如,引物或者标记探针)和靶序列之间的互补杂交。术语特异的包含少量错配,该错配是可以接受的,通过降低杂交介质的严紧性来实现PCR聚合酶所需的引发或者杂交信号的检测。

[0104] 在严紧杂交条件下,只有高互补的,即基本上相同的核酸序列才能杂交。优选地,这类条件阻止20个连续核苷酸中具有3个或者更多错配的核酸杂交,更优选地20个连续核苷酸中具有2个或者更多错配,最优选地20个连续核苷酸中具有1个或者更多错配。杂交核酸的杂交部分与靶序列或者其互补序列的序列至少大约90%相同,优选地至少大约95%,

或者最优先地大约至少大约98%。

[0105] 下面定义了与核酸样本在严紧条件下的核酸杂交。核酸双链或者杂交稳定性表示为熔解温度( $T_m$ )，这是探针从靶DNA解离的温度。该熔解温度用于限定所需的严紧条件。如果待测序列与探针基本上相同，而不是相同，则首先确定在特定浓度的盐(例如SSC或者SSPE)条件下只有同源杂交发生的最低温度是有用的。然后假定1%错配导致 $T_m$ 降低1°C，杂交反应中最终洗涤的温度相应降低(例如，如果序列与探针具有>95%的同一性，最终洗涤温度降低5°C)。实际上，每1%错配的 $T_m$ 变化在0.5°C和1.5°C之间。

[0106] 严紧条件包括68°C下在5×SSC/5×Denhart's溶液/1.0%SDS中杂交，和室温下在0.2×SSC/0.1%SDS中洗涤。中等严紧条件包括42°C下在3×SSC中洗涤。可以改变盐浓度和温度的参数以实现引物和靶核酸之间同一性的最适水平。很容易在本领域找到关于这类条件的其他教导，例如，Sambrook, Fischer和Maniatis, Molecular Cloning, a laboratory manual, (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1989) and F.M. Ausubel等人eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (1994)。

[0107] 此处作为术语使用的“免疫抑制剂”是治疗炎性疾病和促进器官移植必需的重要药物。例如，环孢菌素A(CsA)具有相当的免疫抑制活性。它极大促进了器官移植，通常在自身免疫疾病的治疗中使用。关于CsA用途和作用机理的综述可以参见Wenger等人；Cyclosporine Chemistry, Structure-activity relationships and Mode of Action, Progress in Clinical Biochemistry and Medicine, Vol. 2, 176 (1986)。但是，CsA药效大，可能具有严重的副作用例如肾衰竭、骨髓抑制和不育症。

[0108] 皮质激素因其抗炎效果而被用于炎性病症。它们作用迅速，深切影响免疫系统的诸多部分以及大多数其他身体系统。皮质激素是治疗大多数类型血管炎的基础，常和其他免疫抑制药物联用。但是，皮质激素的长期使用也可能具有严重的副作用包括高血压、体重增加、痤疮和脸水肿。其他免疫抑制剂包括咪唑硫嘌呤，氨甲蝶呤，环磷酰胺，巯基嘌呤，他克莫司和霉酚酸酯。

[0109] 作为常见物质，激动剂和拮抗剂可以作为被吞服、注射、吸入的组合物对患者给药或者经由栓剂给药。或者，组合物可以配制成滴耳剂或滴眼剂。

[0110] 此处使用的术语“哮喘”包括任何特征为阵发性呼吸困难反复发作的哮喘状态(即，“可逆性阻塞性气道疾病”)，表现为支气管痉挛性收缩(通常所说的“支气管痉挛”)造成的喘鸣。根据本发明可以治疗乃至预防的哮喘状态包括变应性哮喘和支气管变态反应，其特征表现在致敏个体中，由各种因素包括锻炼，尤其是剧烈运动(“锻炼-诱导的支气管痉挛”)，刺激性颗粒(花粉，灰尘，棉，猫皮屑)引起，以及轻度到中度哮喘、慢性哮喘、严重慢性哮喘、严重的和不稳定的哮喘、夜间哮喘和精神应激。本发明的方法尤其可用于预防哺乳动物中哮喘的发作，例如，人类所受的下气道和肺部的可逆阻塞性疾病以及锻炼-诱导的支气管痉挛的困扰。在此处公开的治疗哮喘的方法中，优选的输送本发明拮抗剂的方法是采用吸入。

[0111] 存在若干不同类型的装置，它们通常利用不同的机理和方法来产生用于吸入的气雾剂。最常用的装置是定量吸入器(MDI)，它包括一个具有包括低沸点喷射剂的制剂的药剂容器。该制剂在压力下装在容器中，当容器阀门打开后，定量制剂释放为气雾剂。当该制剂

暴露于容器外的大气压力时,低沸点喷射剂很快蒸发或者“闪蒸 (flashes)”。无喷射剂的包含药物的制剂颗粒被吸入到患者的肺部,此后进入患者的循环系统。存在许多不同类型的MDI装置。这类装置公开于1995年4月11日授权的美国专利5,404,871和1994年11月15号授权的美国专利5,364,838。

[0112] 另一类型的装置是干粉吸入器 (DPI) 装置。如其名称所示,这类装置使用干粉制剂,其粉末通过气体喷发被吹成雾化的云状物。典型的DPI装置见于1998年7月7日授权的美国专利5,775,320和1998年4月21日授权的美国专利5,740,794。

[0113] 另一类型的气雾剂输送装置通过多孔膜压成制剂。制剂移动通过小孔后分散形成小颗粒,被患者吸入。这类装置见于1996年8月13日授权的美国专利5,554,646和1996年6月4日授权的美国专利5,522,385。

[0114] 对于可吸入组合物,合适的载体可以是无定形粉末、结晶性粉末或者无定形和结晶性粉末组合的形式。合适的材料包括糖类,例如,单糖例如果糖,半乳糖,葡萄糖,D-甘露糖,山梨糖,等等;二糖,例如乳糖,海藻糖,纤维二糖,等等;环糊精,例如2-羟丙基- $\beta$ -环糊精;和多糖,例如棉子糖,麦芽糖糊精,葡聚糖,等等;(b)氨基酸,例如甘氨酸,精氨酸,天冬氨酸,谷氨酸,半胱氨酸,赖氨酸,等等;(c)有机酸和碱制备的有机盐,例如柠檬酸钠,抗坏血酸钠,葡糖酸镁,葡糖酸钠,盐酸氨基丁三醇,等等;(d)肽和蛋白,例如天冬酰苯丙氨酸甲酯,人血清白蛋白,明胶,等等;(e)多羟糖醇,例如甘露醇,木糖醇,等等。优选的载体组包括乳糖,海藻糖,棉子糖,麦芽糖糊精,甘氨酸,柠檬酸钠,盐酸氨基丁三醇,人血清白蛋白,和甘露醇。

[0115] 这类载体材料可以在喷雾干燥前与本发明的激动剂或者拮抗剂混合,即,通过将载体材料添加到用于喷雾干燥的缓冲溶液。用这种方法,该载体材料将与本发明的激动剂或者拮抗剂颗粒同时形成,并作为它们的一部分。通常,当载体与本发明的激动剂或者拮抗剂通过喷雾干燥一起形成时,每个单位颗粒中存在的本发明的激动剂或者拮抗剂的重量百分数范围从5%到95%,优选的从20%到80%。颗粒的其余部分主要是载体材料(通常从5%到95%,按重量计算一般从20%到80%),但还包括缓冲液并可能包括如上所述的其他组分。已经发现颗粒中载体的存在不会显著干扰本发明激动剂或者拮抗剂的全身吸收,所述颗粒被输送到肺的肺泡区(即,在小于10 $\mu\text{m}$ 的所需粒度范围内)。

[0116] 或者,载体可以单独制备为干粉形式并通过混和与本发明的激动剂或者拮抗剂干粉组合。单独制备的粉末载体通常是晶状的(以防止吸水),但在一些情况下是无定型的或者是晶状和无定型的混合物。可以选择载体颗粒的粒径以改进本发明激动剂或者拮抗剂粉末的流动性,范围通常从25 $\mu\text{m}$ 到100 $\mu\text{m}$ 。这个粒度范围内的载体颗粒通常不进入肺的肺泡区,经常在吸入前在输送装置中与本发明的激动剂或者拮抗剂分离。因此,进入肺肺泡区的颗粒基本上由本发明的激动剂拮抗剂和缓冲物组成。优选的载体是具有上述粒径范围内的晶状甘露醇。

[0117] 本发明的干粉组合物优选地利用常规方式通过在流动空气或者其他生理可接受的气流中分散进行雾化。一个适于这类分散的系统描述与共同待决申请序列号07/910,048,其公开为WO 93/00951,在此以参考方式将其完整引入。

[0118] 通过在合适的溶剂例如磷酸钠缓冲盐水中加入所需量的本发明组合物和制剂,然后进行过滤灭菌,制备无菌注射溶液。此处使用的“生理上可接受的载体”包括对人等等无

毒的任何及所有的溶剂、分散介质、抗细菌和抗真菌剂。这类介质和药剂用于药学活性物质的用途是本领域公知的。所述介质或者药剂必须适合保持本发明蛋白链的正确构象及其在治疗组合物中的用途。组合物中还可以添加辅助活性成分。示范性的药学可接受的载体和稀释剂以及药物制剂的说明参见于Remington's Pharmaceutical Sciences, 本领域的标准文件, 和USP/NF。

[0119] 所述组合物给药的剂量和方式应该根据其特性、剂型、给药途径和其他已知的或者本领域能够轻易辨别的相关特征来调整。

[0120] 2.TNFR25激动剂作为T细胞极化和肺部炎症的直接增效剂

[0121] TNFR25和其配体TL1A被发现是T细胞极化和肺部炎症的直接增效剂。在激动型TNFR25-转基因小鼠中观察到的恶化的肺部炎症证明TL1A和TNFR25在肺部疾病中的重要功能。TNFR25的过表达导致活化时CD4细胞的强Th2偏性。该偏性从而可能导致卵清蛋白模型(ovalbumin model) 中恶化的肺部炎症。

[0122] 本发明人注意到在鼠哮喘模型中, TNFR25信号途径的阻断导致Th2细胞因子产生减少, 这抑制肺部炎症。CD4细胞上的TNFR25触发Th1和Th2极化细胞的IL-13分泌, 起始和加剧肺部炎症的NKT细胞需要TNFR25信号传递。TNFR25触发的长期IL-13产生还造成慢性肺炎的继发症 (sequaeiae) 、气道重塑和纤维化, 所述慢性肺炎包括但不限于慢性哮喘。在过继转移实验中显性阴性TNFR25突变体对NKT细胞TNFR25信号的阻断消除了肺部炎症。诸如这类的TNFR25信号阻断将有利于治疗急性和慢性哮喘和其他肺部病症。

[0123] 在导致肺部炎症的一连串事件中, NKT细胞的IL-13产生是一个早期步骤 (Akbari, O. 等人, Nat Med 9, 582-8 (2003))。本研究证明NKT细胞在哮喘中的关键功能, 因为过继转移实验表明NKT细胞使用的诱导肺部炎症的主要分子开关是TNFR25。在TCR活化细胞中利用PKC介导的TNFR25剪接, 通过抗原特异性的CD4记忆细胞, TNFR25还具有改变初始效应物应答的能力。因此TNFR25在肺中记忆应答启始的早期起作用。因此, 通过抗TL1A或者其他步骤造成的TNFR25信号阻断中断了事件的级联, 从而导致被认为引起哮喘发作的急性肺部炎症。

[0124] 在野生型小鼠中可以遗传地实现TNFR25的阻断, 以及通过两个独立方法的抗体阻断得到相似的结果。体内干扰TNFR25信号传递导致减少的抗原再刺激的引流支气管淋巴结产生的IL-13, IL-5和IL-4, 并抑制肺部炎症。重要地是, 在初免和Th2极化的气道抗原刺激期间的抗TL1A抗体阻断能够有效抑制肺部炎症, 表明TNFR25在肺效应期的直接作用。

[0125] 3.NKT细胞的组成性TNFR25表达和活化T细胞的诱导性表达。

[0126] 为研究TNFR25和其同源配体TL1A的生物功能, 按照标准步骤产生仓鼠抗小鼠单克隆抗体。为了通过流式细胞术可信地检测原代细胞低水平的TNFR25表达, 必须开发一种三层夹心检测法。没有活化的情况下, 在初始CD4T细胞中检测到低水平的TNFR25, 还在CD8

[0127] T细胞中检测到更低水平的TNFR25, 但在B细胞中未检测到(图1a)。此外CD11c+细胞的一个亚群表达TNFR25。NKT细胞组成性表达相对较高水平的TNFR25, 而只有小部分CD3阴性NK11+细胞显示TNFR25表达(图1a)。在胸腺中, 与外周T细胞类似, CD4和CD8单一阳性的细胞表达TNFR25, 而CD4、CD8双阳性和双阴性胸腺细胞不表达TNFR25(图1c)。

[0128] 当用抗CD3和抗CD28活化外周T细胞时, CD4+和CD8+细胞的TNFR25表达均被上调(图1b)。另一方面B细胞的LPS活化不导致TNFR25表达。鼠TNFR25mRNA在T细胞中组成性表

达,但与人TNFR25类似进行随机剪接(Screaton,G.R.等人Proc Natl Acad Sci U SA 94,4615-9.(1997))(图2)。活化T细胞中增加的TNFR25蛋白表达与活化诱导的全长TNFR25的剪接相关,所述全长TNFR25来自随机剪接的TNFR25mRNA。T细胞中TNFR25活化诱导的剪接被化学抑制剂H7阻断,表明PKC在剪接中的功能(图2)。

[0129] TNFR25在NKT和活化T细胞中的优先表达和其活化诱导的对全长TNFR25的剪接和表面表达的快速增加提出以下问题,即TNFR25在免疫系统中的生物功能。除了胸腺中阴性选择的轻度缺陷外,小鼠中敲除TNFR25基因不显示明确的TNFR25缺陷表型。因此,对CD2启动子和增强子驱动的T细胞表达的TNFR25转基因的生物学影响进行分析。

[0130] 全长TNFR25 (FLTNFR25,如图2) 和缺失外显子5和6的另一种TNFR25剪接产物 ( $\Delta$  5,6TNFR25,图2) 用于转基因表达。 $\Delta$  5,6TNFR25缺失编码第4半胱氨酸富集胞外结构域的外显子5和6。它锚定在膜上,但是,具有类似FL TNFR25的完整胞内信号传递结构域,并且结合TL1A和激动型抗TNFR25抗体(4C12)。此外显性阴性突变体,DNTNFR25,其在跨膜结构域后被截短,表达为转基因,将在下面进行描述。

[0131] 4.TNFR25的转基因过表达促进CD4细胞的Th2极化并在AHR卵清蛋白模型中介导增加的肺部炎症。

[0132] 对获得并分析各TNFR25转基因的获得4个独立的原代(founders),并进行分析。所有原代 $\Delta$  5,6TNFR25、TNFR25和DNTNFR25中CD2启动子和增强子支持的位置的独立的转基因表达,在静止T细胞、NKT细胞、NK NK细胞和CD11c+细胞亚群中显示高水平的表达。B细胞不表达转基因(图3a)。对转染肿瘤细胞进行的Western印迹,以验证了流式细胞术检测抗体的可靠性(图3b),在转基因脾细胞中检测到相同的Western印迹条带,而内源分子低于Western印迹的检测水平。在Western印迹中利用抗体10D1检测不到 $\Delta$  5,6剪接形式(图3b),表明该抗体结合外显子5或者6。FL TNFR25的转基因过表达与中枢初级和次级淋巴器官相对非转基因同窝的T细胞数目减少有关; $\Delta$  5,6转基因对细胞含量的影响在胸腺是中等的,在次级淋巴器官中是不显著的。当比较相等数目的纯化转基因和非转基因同窝的CD4和CD8细胞时,转基因小鼠中减少的T细胞数目伴随着对抗CD3和CD28刺激应答的增殖的减少(图3d)。在从24到72小时的所有时间点均观察到减少的增殖。但是,利用佛波酯PMA和Ca离子载体伊屋诺霉素对TNFR25-tg CD4或者CD8细胞的刺激恢复了正常增殖,表明转基因细胞的增殖能力没有内在缺陷。相对于同窝对照,CD3/CD28活化的TNFR25-tg T细胞通常上调CD25,只产生大约一半数量的IL-2(图4)。过量IL-2的外源添加没有恢复增殖(图3d)。利用annexin V染色进行测定,TNFR25-tg T细胞的凋亡没有增加(图4),表明增殖减弱不是由引起细胞死亡的TNFR25信号造成的。

[0133] FL和 $\Delta$  5,6TNFR25转染的EL4细胞用于比较由可溶性TL1A、膜结合TL1A(EL4-TL1A)或者激动型抗TNFR25抗体(4C12)触发的剪接变异体的信号传递特性。利用EMSA检测,所有3种配体在25分钟内快速诱导NF- $\kappa$ B活化(图3e)。

[0134] 在用板结合的抗CD3和可溶性抗CD28初始活化后,与非转基因同窝相比,FL和 $\Delta$  5,6TNFR25转基因细胞产生Th2细胞因子的数量明显增加,包括IL-4,IL-5,IL-13和IL-10(图3f)。当FL TNFR25-tg CD4细胞不是用 $\Delta$  5,6TNFR25转基因活化时,IFN- $\gamma$ 减少,表明剪接变异体功能的微小差异。尽管TNFR25转基因CD4细胞的增殖减少,增加的Th2细胞因子产生在活化24小时内就已经能够检测到,并在之后几天持续增加,表明活化前已存在Th2偏性。

[0135] 随后检测FL TNFR25转基因CD4细胞的Th2偏性是否能够在Th1极化条件下被改变。在Th中性条件下, TNFR25-tg CD4细胞产生与Th2极化条件下野生型CD4细胞一样多的IL-4(图3g)。Th2极化条件下FLTNFR25-tg细胞的孵育对IL-4或者IL-13的产生没有额外影响, 表明细胞在Th中性条件下的初始活化期间已经被最大程度的Th2极化。但是, 通过在培养物中包括IL-4的抗体并添加外源IL-12, FLTNFR25-tg CD4细胞能够被极化到Th1。在这些条件下, FL TNFR25-tg细胞产生比Th1极化的野生型细胞更高水平的IFN- $\gamma$ (图3g), 表明TNFR25转基因还可以共刺激Th1细胞因子。Th1极化的FL TNFR25-tg CD4细胞, 与野生型Th1细胞不同, 还产生IL-13, 但只有最小量的IL-4。尽管TNFR25的转基因过表达自发的偏向Th2, 但是在合适的极化条件下也能够共刺激Th1或者Th2型细胞因子的产生。此外, 在Th1或者Th2极化条件下, TNFR25信号传递共刺激IL-13产生。

[0136] 通过免疫和抗体同种型产生的分析对TNFR25-tg小鼠体内的自发Th2偏性进行评价。利用 $\Delta$ 5,6TNFR25转基因小鼠进行体内试验。对于NF- $\kappa$ B诱导和凋亡的诱导,  $\Delta$ 5,6-TNFR25显示与FLTNFR25相同的信号传递性质(图3e), 并产生相似的Th2偏性细胞因子模式。但是, 与FL转基因小鼠不同,  $\Delta$ 5,6转基因小鼠在淋巴结(图3c)和脾中具有正常的CD4T细胞量, 因此可以更精确地在体内实验中表现TNFR25功能。

[0137] 相对非转基因同窝, DNP-KLH免疫的TNFR25-tg小鼠产生的抗原特异性IgG1/IgG2a抗体的比例增加, 表明体内Th2型抗体的比例增加(图5a)。如果没有免疫, 野生型和转基因小鼠的IgG1和IgG2a水平相同, 证明活化是显示Th2偏性必需的。

[0138] TNFR25-tg CD4细胞的Th2偏性和它们增加的IL-13产生表明TNFR25过表达可能倾向于加重哮喘的变态反应肺炎特征, 因为IL-13是该病症的标记细胞因子(Elias, J.A, 等人 Am J Respir Cell Mol Biol 28, 401-4 (2003))。利用用于实验性肺部炎症的小鼠经典卵清蛋白模型, 检测该假设。TNFR25-tg B6小鼠和野生型对照在第0和5天腹腔内用卵清蛋白和明矾初免。在第12天, 用雾化的卵清蛋白对它们进行气道刺激, 在1到3天后进行分析。TNFR25-tg小鼠的支气管肺泡液(BALF)中包含数量显著增加的嗜酸性粒细胞(图5b), 与血清中卵清蛋白特异性IgE水平增加(图5d)和支气管淋巴结细胞的卵清蛋白再刺激引起的Th2细胞因子产生升高(图5e)相关。相对野生型细胞, 转基因支气管淋巴结细胞中IFN- $\gamma$ 的产生减少。TNFR25-tg小鼠肺的组织病理学分析显示大规模嗜酸性粒细胞的血管周围肺部浸润, 增加的支气管粘液产生和PAS染色的杯状细胞增生(图5c), 符合T细胞中TNFR25过表达引起的肺部炎症恶化。

[0139] 5. 在初免小鼠的气道刺激期间TNFR25的遗传或者抗体阻断肺部炎症。

[0140] 制备TNFR25的显性阴性突变体DN TNFR25以在气道刺激期间阻断TNFR25信号, DN TNFR25表达为CD2启动子和增强子调控下的转基因构建体。DN TNFR25转基因缺失完整的胞内信号结构域, 但与其跨膜和胞外结构域的全长TNFR25相同。

[0141] 通过流式细胞术检测, 转基因DN TNFR25与激发激动型TNFR25转基因的表达水平相同(图3a)。利用表面荧光强度检测表达的分子数目, 检测到转基因TNFR25表达的表达是超过内源TNFR25的3到4倍摩尔量。这种DN TNFR25过表达的水平抑制内源TNFR25的活性。野生型和DN转基因CD4细胞的初始抗CD3活化刺激Th1和Th2细胞因子的分泌(图4, 插图d)。在野生型细胞的初始抗CD3活化期间, 激发动型抗体(4C12)对TNFR25的触发共刺激Th1和Th2细胞因子产生, 但这种对TNFR25的共刺激作用被DN TNFR25转基因阻断(图6a), 表明转基因

阻断内源基因的功能。类似地,4C12的激发激动型作用共刺激野生型CD4细胞的增殖,而这种增殖在DN TNFR25-tg CD4细胞中被阻断(图6b),表明内源TNFR25被抑制。重要地是,CD4细胞中DN TNFR25的表达大大减少了细胞二度级活化时通常观察到的、上调的Th2细胞因子产生,所述细胞已经在Th中性条件下进行初免(图6c),表明TNFR25信号极大促进Th2极化或者是Th2极化所需的,并且这些信号被DN转基因阻断。更重要地是,即使在Th2极化条件下,DNTNFR25-tg细胞也不能被Th2极化,所述条件通过添加IL-4以及IFN- $\gamma$ 和IL-12的阻断抗体来提供(图6d)。另一方面,即使在非极化(Th中性,ThN)条件下,DN TNFR25-tg CD4细胞的Th1极化也不受影响。因此尽管在CD4细胞的初始活化中TNFR25共刺激Th1和Th2细胞因子的产生,在体外TNFR25信号表现出是促进Th2极化必需的。Th1极化与TNFR25无关,但Th1细胞中的TNFR25信号途径促进IL-13产生(图3g)。用DNP-KLH免疫DN TNFR25-tg小鼠后,DN TNFR25-tg小鼠体内TNFR25信号的缺失不影响野生型小鼠中发现的正常IgG1对IgG2a的抗体比例(图4)。

[0142] 然后,检测DN TNFR25-tg小鼠在肺部炎症模型中是否具有改变的应答。与野生型小鼠相比,当通过组织病理学和PAS染色检查时,DN TNFR25-tg小鼠在气道刺激时显示BALF中显著减少的嗜酸细胞浸润,缺失的肺部炎症和血清中减少的IgE产生(图6e-图6g)。对来自气道刺激的DN TNFR25-tg小鼠的支气管的引流淋巴结用卵清蛋白进行再刺激,显示减少的Th2细胞因子产生,但IFN- $\gamma$ 产生正常(图6h)。该数据表明TNFR25在肺部免疫应答中起到关键作用。

[0143] 为证实野生型小鼠中TNFR25阻断的遗传数据,制备小鼠TL1A的单克隆抗体。利用TNFR25和TL1A转染细胞(图7a,b),鉴定终止TNFR25信号的TL1A阻断抗体。TL1A转染细胞在其表面表达TL1A(图7c),并像其他TNF超家族成员一样,分泌TL1A到上清中。包含TL1A的上清造成 $^{51}\text{Cr}$ 通过凋亡从FL TNFR25或者 $\Delta$ 5,6TNFR25转染肿瘤细胞的快速释放,如先前所报道(Chinnaiyan,A.M.等人Science 274,990-2.(1996);Kitson,J.等人Nature 384,372-5.(1996);Screaton,G.R.等人Proc Natl Acad Sci U S A 94,4615-9.(1997);Bodmer,J.L.等人Immunity 6,79-88.(1997);Marsters,S.A.等人CurrBiol 6,1669-76.(1996);Tan,K.B.等人Gene 204,35-46(1997))(图7d)。抗TL1A抗体之一L4G6完全阻断TL1A介导的TNFR25转染细胞的裂解,而若干其他抗TL1A抗体不起作用或者只介导不完全的裂解抑制(图7d)。因此选择L4G6抗体用于TL1A的体内阻断,以阻断未发生遗传学改变的野生型小鼠中的TNFR25信号。按常规用卵清蛋白/明矾免疫小鼠两次。在气道刺激前1天和随后3天,腹腔内注射50 $\mu\text{g}$ L4G6,然后对小鼠进行分析(图7e)。对照接受相同的数量和方案的仓鼠IgG。在气雾剂刺激期间和之后,以这种方式给药的L4G6抑制嗜酸性粒细胞渗入BALF,阻断过度粘液产生,和减少体外用卵清蛋白再刺激时支气管淋巴结细胞的Th2细胞因子产生(图7e-图g)。

[0144] 气雾剂刺激期间抗TL1A对肺部炎症的阻断被气道中TL1A的表达所证明。发现在气道刺激后而不是气道刺激前,支气管的引流淋巴结中CD11c+细胞亚群表达较低水平的TL1A(图7h)。在气雾剂刺激前后,支气管淋巴结中所有其他的细胞群都是TL1A阴性的(图7i)。在卵清蛋白初免或者气道刺激前后的任意时刻,腹股沟淋巴结的CD11c+细胞或者任何其他细胞类型都不表达TL1A。但是利用抗CD3和抗CD28活化,在纯化的CD4+和CD8+脾或者淋巴结细胞中可以在24小时内体外诱导TL1A表达(图7j)。LPS活化的增殖B细胞不表达TL1A(图7j)。

[0145] 6. 在抗原初免和气雾剂刺激的NKT缺陷小鼠中, DN TNFR25转基因NKT细胞未能加剧肺部炎症。

[0146] 已经显示野生型NKT细胞到NKT缺陷小鼠的过继转移导致卵清蛋白模型中肺部炎症和气道高反应性的恢复, 并且需要NKT细胞产生IL-13 (Akbari, O. 等人 Nat Med 9, 582-8 (2003); Lisbonne, M. 等人 J Immunol 171, 1637-41 (2003); Meyer, E.H. 等人 Proc Natl Acad Sci U SA 103, 2782-7 (2006))。NKT细胞还涉及哮喘患者的病理生理学 (Sen, Y. 等人 J Immunol 175, 4914-26 (2005). Akbari, O. 等人 N Engl J Med 354, 1117-29 (2006))。为确定在NKT细胞中组成性表达的TNFR25 (图1a) 是否涉及触发肺部炎症, 转移的野生型和DN TNFR25-tg NKT细胞被过继转移入卵清蛋白初免的NKT-缺陷小鼠 (Cui, J. 等人 Science 278, 1623-6 (1997)) (Ja18k.o.) (图8)。尽管过继转移的野生型NKT细胞在气道抗原刺激时恢复肺部炎症, 但相同数量的DNTNFR25-tg NKT细胞不能发挥这样的作用。该数据证明NKT细胞中的TNFR25信号对致敏小鼠接触气道抗原期间引发肺部炎症非常关键。

[0147] 7. TNFR25激动剂作为抗肿瘤免疫应答的直接增效剂

[0148] 成熟的树突状细胞进行一个重要的过程, 称为“交叉呈递”, 这使得它们能够有效地激发对肿瘤特异肽特异的T细胞毒性细胞。肿瘤抗原被降解, 并在MHC I类蛋白上呈递给循环的CD8T细胞。

[0149] 为证明TNFR25激动剂是有效的肿瘤疫苗BRMs, 给小鼠注射EG7肿瘤细胞和OT-I细胞。然后观察OT-I细胞的克隆性增殖。EG7是EL4小鼠腹水淋巴瘤淋巴母细胞, 其被遗传改变以表达卵清蛋白, 这是鸡蛋清的主要蛋白成分。小鼠被接种EG7细胞并接受卵清蛋白特异性T细胞受体转基因细胞 (OT-I) 的过继转移。通过对肿瘤特异性卵清蛋白抗原的应答, OT-I细胞在体内作为指示细胞。理论上, 小鼠的树突状细胞把肿瘤特异性卵清蛋白呈递给并活化卵清蛋白特异性 (OT-I) T细胞。但是, 在这种情况下并且在人肿瘤疫苗试验中经常可以观察到, OT-I细胞对EG7肿瘤细胞没有反应性。

[0150] 相反, 用编码热休克蛋白gp96 (gp-96-Ig) 分泌形式的构建体共转染EG7细胞提供一种分泌gp96Ig和包含卵清蛋白作为替代抗原的肿瘤。在利用gp96Ig分泌物初始注射和一次加强后, 将CD8OT-I细胞暴露于分泌的分子伴侣热休克蛋白和肿瘤特异性卵清蛋白的组合导致OT-I从所有CD8细胞的0.5%的起始比例扩增到超过50%。因此, 与利用完整卵清蛋白的交叉初免相比, gp96-Ig-卵清蛋白对CD8细胞的交叉初免增强了10,000到1,000,000倍。参见实施例19和图10和12。还可参见Am J Reprod Immunol. 2002 Oct; 48 (4): 220-5。

[0151] 当OT-I CD8细胞利用gp96-Ig-卵清蛋白交叉初免时, 在TNFR25激动剂抗体4C12存在的条件下, OT-I CD8扩增相对于对照抗体额外增加10倍。但是, 当OT-I CD8细胞利用gp96-Ig-卵清蛋白交叉初免时, 在TL1A封闭抗体L4G6存在的条件下, OT-I CD8扩增相对于对照抗体减少10倍。参见图11。

[0152] 因此, TNFR25激动剂是肿瘤疫苗有效的生物效应调节剂, 因为它们增强T细胞活化和对肿瘤特异性抗原的细胞免疫应答, 而TNFR25拮抗剂阻断或者抑制T细胞活化。因此, 本发明另一个方面涉及增强肿瘤疫苗效果的方法和治疗剂。

[0153] 肿瘤疫苗希望利用机体先天免疫系统的元件抵抗癌症。肿瘤疫苗包含一种或者多种肿瘤特异性抗原, 并且可能包含佐剂和生物效应调节剂。肿瘤特异性抗原是基本上限于在肿瘤细胞内和表面表达的多肽, 可用于刺激针对那些肿瘤细胞的免疫应答。不同类型的

疫苗用于治疗不同类型的癌症。对于能够用作疫苗的抗原组合物，抗原组合物必须诱导针对细胞或者组织中抗原的免疫应答。此处使用的“抗原组合物”可以包括抗原(例如，肽或者多肽)，编码抗原的核酸(例如，抗原表达载体)，或者表达或者展示抗原的细胞。参见美国公开号2003/0185840，在此以参考的方式将其完整引入。

[0154] 生物反应调节剂(BRM)，已经显示上调T细胞免疫或者下调抑制性细胞活性。这类BRM包括，但不限于，甲腈咪胍(CIM; 1200mg/d) (Smith/Kline, PA)；低剂量环磷酰胺(CYP; 300mg/m<sup>2</sup>) (Johnson/Mead, NJ)，细胞因子例如 $\gamma$ -干扰素、IL-2或者IL-12或者编码参与免疫辅助功能蛋白的基因，例如B-7。

[0155] 在本发明这方面的一个实施方式中，肿瘤疫苗组合物包括肿瘤抗原组合物和TNFR25激动剂。在另一个实施方式中，TNFR25激动剂是抗体4C12。在优选的实施方式中，TNFR25激动剂作为生物效应调节剂添加到肿瘤疫苗中。更优选的，TNFR25激动剂是抗体4C12。在另一个实施方式中，肿瘤疫苗包含佐剂。

[0156] 肿瘤疫苗佐剂可能包括IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12,  $\gamma$ -干扰素, GM-CSF, BCG, 氢氧化铝, MDP化合物，例如thur-MDP和nor-MDP, CGP (MTP-PE), 类脂A, 和单磷酸类脂A (MPL)。RIBI也是一种佐剂，其包含从细菌提取的3种成分：MPL, 海藻糖二霉菌酸酯(TDM) 和细胞壁骨架(CWS)，这些成分溶于2%角鲨烯/Tween 80乳剂中。甚至可以使用MHC抗原。示范性的，通常优选的佐剂包括完全弗氏佐剂(非特异的免疫应答激发剂，包含灭活的结核分枝杆菌)，弗氏不完全佐剂和氢氧化铝佐剂。

[0157] 疫苗的制备在本领域通常是公知的，所述疫苗包含作为活性成分的肽序列，如美国专利4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; 和4,578,770所示，均在此以参考方式引入。

[0158] 通常，这类疫苗制备为可注射的。还可以制备为液体溶液或者悬浮液；在注射前适于溶解或者悬浮在液体中的固体形式。该制剂也可以被乳化。经常将活性免疫原性成分与赋形剂混合，所述赋形剂是药学可接受的并且和活性成分相容。合适的赋形剂是，例如，水，盐水，葡萄糖，甘油，乙醇，或者类似物和其组合。此外，如果需要，疫苗可能包含少量辅助物质例如湿润剂或者乳化剂，pH缓冲剂，或者增强疫苗效力的佐剂。

[0159] 8. TNFR25免疫毒素作为先天抗肿瘤免疫应答的间接增效剂

[0160] 许多科学家和公司研究CD4+/CD25+T调控细胞(Tregs)，因为它们对多种疾病治疗的广泛潜在影响。尽管许多人暴露于相同的环境变态反应原，对变态反应原的敏感性也是常见的，但是只有一小部分人发展成变态反应疾病例如哮喘。其原因到目前还是不清楚的，但可能与有效调控Tregs的存在相关，所述Tregs在健康的变态反应原暴露的个体中抑制气道炎症。因此，已知Treg有助于保持对自身和非自身的外周耐受。但是，根据记载Treg还阻碍机体抵抗癌症的能力。在这些病例中，Treg干扰机体的肿瘤杀伤免疫细胞。因此，Tregs作用为专注的抑制性细胞，可能在防止肿瘤中被免疫系统识别中起作用，所述肿瘤例如头和颈的鳞状细胞癌。参见Br J Cancer, 2005 Mar 14; 92 (5): 913-20。

[0161] 本发明人已经注意到Treg具有表明它们被活化的性质。已经报道了Tregs上表达其他TNF受体。GITR由活化的Tregs表达。已发现它的连接终止Treg的抑制活性(Nocentini等人，Eur J Immunol. 2005 Apr; 35 (4): 1016-22)。TNFR25具有多种使其成为Treg细胞多能调节物的性质。a) TNFR25蛋白表达被PKC诱导的mRNA剪接快速上调；b) 包括诱饵受体和显性

阴性形式的若干功能剪接形式允许调控的微调;c) 克罗恩氏病中TL1A表达表现出被高度调节;此外活化淋巴细胞中的TL1A表达允许检测淋巴细胞密度。最后,它们至少部分的通过分泌TNFR25信号引发的细胞因子IL-10和IL-13来发挥它们的调节功能。本发明人最先注意到FoxP3表达,CD4+/CD25+培养的Treg表达非常高的TNFR25水平。因此,本发明人总结得出,TNFR25调节Treg功能,并且TNFR25可以用作体内耗尽Tregs的分子标签。参见实施例20。此外,TNFR25激动剂消除Treg抑制。参见图15。

[0162] 因此,本发明的另一个方面涉及可用于增加抗癌疗法效能的方法和治疗剂,所述抗癌疗法通过耗尽患者CD4+/CD25+T调控细胞(Tregs)来实现。在本发明这方面的一个实施方式中,利用免疫毒素耗尽Treg。在该实施方式中,该免疫毒素具有对TNFR25特异的抗原结合部分;并与毒性剂偶联。在替代实施方式中,给患者提供与毒性剂偶联的可溶性TL1A。另一实施方式涉及具有化疗剂和TNFR25特异性免疫毒素的化疗组合物。另一实施方式涉及具有化疗剂和与毒性剂偶联的TL1A的化疗组合物。

[0163] 本发明的另一个方面涉及可用于增强抗癌疗法效能的方法和治疗剂,通过提供患者TNFR25激动剂,减少CD4+/CD25+T调控细胞(Tregs)介导的抑制来实现。

[0164] 9. 作为抗炎剂的TNFR25激动剂

[0165] 利用缺失胞内死亡结构域的TNFR25显性阴性形式(DN-TNFR25)和缺失外显子5和6的另一种TNFR25剪接形式(delta 5,6-TNFR25),所述外显子5和6编码第四个胞外半胱氨酸富集域,本发明人发现TNFR25功能是粘膜损伤后恢复体内稳态所需的。具体地,本发明人在小鼠中在CD2启动子调控下转基因表达TNFR25的显性阴性形式(DN-TNFR25)。给予小鼠右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)来诱导结肠炎,作为人克罗恩氏病的模型。在饮用含2%DSS的水5天后,野生型C57B1/6小鼠出现结肠炎、腹泻和体重减轻。但是,如果恢复为正常水,野生型小鼠在一周内康复并恢复体重,而DN TNFR25-tg表达小鼠患有与野生型小鼠相似类型的疾病,但腹泻显得更严重。此外,恢复为正常水不引起它们的康复。相反,所有DN TNFR-tg表达小鼠持续体重减轻,在第二周内死亡。表达TNFR25功能转基因(全长TNFR25或者剪接形式△5,6-TNFR25)的小鼠以类似于野生型小鼠的方式康复。参见实施例21和22和图14。

[0166] 克罗恩氏病的现有治疗利用抗炎剂,免疫抑制剂和TNF抑制剂。所有这些都是针对症状的。刺激TNFR25信号向致病事件链中深入了一步。活化的TNFR25刺激IL-10和IL-13产生,然后依次刺激TGF-β产生,引起稳态的恢复。这种治疗是能治愈的或者接近治愈的。

[0167] 因此,本发明的另一个方面涉及通过给药患者治疗量的TNFR25激动剂来治疗患者炎症性肠病的方法。另一个实施方式涉及通过升高肠粘膜区域的IL-10水平来治疗患者炎症性肠病的方法。在另一个实施方式中,TNFR25激动剂是抗体4C12。在另一个实施方式中,TNFR25激动剂是TL1A的可溶性形式。在优选的实施方式中,炎症性肠病是克罗恩氏病。

[0168] 考虑到TNFR25激动剂的这种抗炎活性,本发明的另一个方面给需要减轻炎症的患者提供治疗方法和治疗剂。在一个实施方式中,给药患者包含TNFR25激动剂的组合物,以减轻炎症和促进康复。在一个实施方式中,给药患者包含TNFR25激动剂4C12的组合物。这种实施方式可用于减轻慢性炎症应答在细胞水平介导的疾病的症状,包括心血管疾病(例如,动脉粥样硬化),自身免疫疾病包括系统性红斑狼疮(SLE),多发性硬化(MS),糖尿病(尤其是I型糖尿病),强直性脊柱炎,关节炎(特别是类风湿性关节炎),哮喘和变态反应,骨再吸收病症,眼科病症包括视网膜病,和纤维化疾病。

[0169] 10. TNFR25拮抗剂作为免疫抑制剂

[0170] 现在很多器官和组织可以常规的从一个人移植到另一个人。除了供体和受体是单卵双生的“相同”双胞胎这种罕见情况以外,这类移植被称作异源移植。对于从一个个体移植组织到另一个个体,其组织配型是非常重要的,因为组织受体将对所有的非自身蛋白产生强烈的体液和细胞免疫反应。组织分型涉及鉴定供体和受体细胞上的MHC抗原,并且利用与受体细胞有尽可能多的MHC等位基因的供体细胞。对于成功的移植,MHC I类(尤其是HLA-B)和II类HLA-DR等位基因的配型比其他MHC抗原的配型更重要;MHC配型比少量组织适合性抗原的配型更重要。

[0171] HLA配型提高移植存活率,但不能阻止排斥,甚至在MHC相同的同胞兄妹中(除同卵双生以外)。同种异体MHC被CD8T细胞(I类)或者CD4T细胞(II类)识别;达到10%的T细胞能够识别给定的同种异体MHC,因为它类似于自身MHC+外源肽。

[0172] 移植成功的提高起因于增长的技术知识,更多进行HLA配型和缩短器官运输时间的移植中心的出现,和更多免疫抑制药物(环孢子菌素和他克莫司)的提供,所述免疫抑制药物阻断针对同种异体抗原的T细胞活化。仍然存在的问题是器官短缺,现有疾病破坏移植器官的能力(糖尿病和HBV感染是两个实例),免疫抑制药物的副作用和高成本。

[0173] 考虑到现有的阻断T细胞活化的免疫抑制剂相关的主要副作用,以及观察到TNFR25拮抗剂例如TL1A封闭抗体L4G6是同源CD8T细胞克隆性增殖有效抑制剂(参见图11,实施例19),本发明的另一个方面涉及TNFR25拮抗剂在预防组织排斥以促进组织移植中的用途。在一个实施方式中,向移植受体提供TNFR25拮抗剂以抑制CD8T细胞的克隆性增殖和减轻TNFR25对T-reg的抑制,所述CD8T细胞携带同种异体抗原特异性T细胞受体(TCRs)。在另一个实施方式中,TNFR25拮抗剂和免疫抑制剂一起提供给移植受体。

[0174] 实施例

[0175] 实施例1:培养基和试剂

[0176] 细胞在IMDM必需培养基(Invitrogen)中培养,所述培养基添加10%热灭活FBS(Invitrogen),10 $\mu$ g/ml庆大霉素(Invitrogen),和50 $\mu$ M $\beta$ -巯基-乙醇(Bio-Rad)。从2C11和OKT3细胞系(ATCC,Manassas,VA)的培养上清中分别纯化单克隆抗小鼠CD3和抗人CD3。单克隆抗小鼠CD28和抗人CD28购自eBioscience(San Diego,CA),ConA,PHA和LPS购自Sigma(St,Louis,MO)。重组鼠IL-2来自BioSource International(Camarillo,CA)。PMA,伊屋诺霉素,H7,和放线菌酮购自Calbiochem(San Diego,CA)。

[0177] 直接偶联的单克隆抗体,包括FITC-CD4,Cychrome-CD4,PE-CD8a,Cychrome-CD8a,FITC-B220,PE-B220,FITC-CD25,PE-CD11c,PEDX5,FITC-CD3,PE-NK1.1,PE-Annexin V和7-AAD购自BD/PharMingen(San Diego,CA)。仓鼠IgG对照购自eBioscience。

[0178] 实施例2:抗mTNFR25和mTL1A单克隆抗体的产生

[0179] 用弗氏佐剂中的50 $\mu$ g mTNFR25-Ig或者mTL1A-MBP(麦芽糖结合蛋白)腹腔内免疫亚美尼亚仓鼠,每隔两周一次,共3次。在融合前3天,仓鼠用50 $\mu$ g相应蛋白静脉内加强免疫。利用ClonaCell-HY试剂盒(StemCell Technologies Inc.,BC,Canada),在PEG存在条件下,仓鼠脾细胞与鼠骨髓瘤SP20融合,然后种在基于甲基纤维素的培养基中两周。挑选1千个集落,在包被免疫融合蛋白或者对照蛋白-Ig融合蛋白的板上通过ELISA进行分析。通过流式细胞术和Western印迹,检验阳性克隆的上清液检测转染细胞中mTNFR25亚型的能力。在蛋

白G柱上从Nutridoma-SP (Roche, Indianapolis, IN) 上清液中纯化抗体,在PBS中透析,过滤除菌。

[0180] 实施例3:流式细胞术分析mTNFR25和mTL1A的表达

[0181] 从独立实验所标的淋巴器官中制备单细胞悬浮液。在染色前,细胞用纯化的抗小鼠CD16/CD32 (Fc- $\gamma$  III/II受体;BD) 和纯化的人IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 处理以封闭与FcR的非特异结合。在4℃细胞用亚美尼亚仓鼠抗小鼠TNFR25或者抗小鼠TL1A染色30分钟。细胞在FACS缓冲液(包含0.5%BSA和2mM EDTA的PBS) 中洗涤,然后用生物素标记的山羊抗亚美尼亚仓鼠IgG (杰克逊immunoresearch) 在4℃染色30分钟。洗涤细胞,然后用链霉亲和素-PE或者链霉亲和素-Cychrome (BD) 在4℃染色30分钟。洗涤细胞,然后用针对不同细胞群的直接偶联的细胞表面标志物标记。利用Becton Dickinson FACS LSR装置和CELLQuestTM软件对样本进行分析。

[0182] 实施例4:RT-PCR

[0183] mTNFR25剪接形式的鉴定:利用Micro Fast-Track试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 从鼠细胞系或者组织中提取信使RNA,利用Superscript II试剂盒 (Invitrogen) 对cDNA进行逆转录。利用TOPO克隆试剂盒 (Invitrogen) 将RT-PCR产物亚克隆入PCR II载体,通过DNA测序确认为mTNFR25的剪接形式。使用下列引物进行鼠TNFR25的剪接分析。上游引物,外显子2:CAG TGA GTC CCA GAA GAG GT (SEQ ID NO:8);下游引物,外显子7:GGA TAG CCC CAA AAAGGA AC (SEQ ID NO:9);上游引物,外显子7:TCC TTT TTG GGGCTA TCC TG (SEQ ID NO:10);下游引物,外显子10:GGT ATT TCTCCA TGA CGC TT (SEQ ID NO:11)。

[0184] 对活化诱导的人TNFR25其他剪接进行分析,因为在小鼠中不同剪接形式的PCR产物更难在琼脂糖凝胶中区分,但对人类剪接形式似乎是相似的。使用下列PCR引物。上游外显子4:TTC ACC CTT CTACTG CCA AC (SEQ ID NO:12);下游,外显子7:TAA CCA GGG GCTTGT GAG GC (SEQ ID NO:13)。利用Ficoll Hypaque密度梯度离心,从健康供体分离人外周血单个核细胞。每份样本中5百万个细胞用PHA (5 $\mu$ g/ml),或者固定的抗-CD3 (OKT3, 5 $\mu$ g/ml) 和抗-CD28 (1 $\mu$ g/ml),或者PMA (10ng/ml) 和伊屋诺霉素 (400ng/ml) 活化。在指定时间点收集细胞,提取mRNA,利用Invitrogen试剂盒转换为cDNA。人 $\beta$ -肌动蛋白被用作内参。利用Molecular Analyst软件 (BioRad) 的帮助完成PCR产物的定量。

[0185] 实施例5:转基因小鼠的产生

[0186] 利用限制酶位点EcoRI和SalI,将鼠TNFR25构建体克隆为在人CD2启动子和局部控制区(Dr.A.Singer, NIH惠赠)的调控下。利用校正酶,通过PCR产生3个mTNFR25构建体。所述构建体是鼠TNFR25的全长分子 (FL TNFR25),缺失第5和第6外显子的TNFR25剪接变异体 ( $\Delta$  5,6TNFR25),和在跨膜结构域末端终止并缺失完整胞内结构域的TNFR25显性阴性形式 (DN TNFR25,如1-234)。通过测序确认PCR产物的序列。利用迈阿密大学医学院的转基因设备将DNA显微注射入授精卵。对来自尾部活组织切片的DNA进行PCR,筛选潜在的原代小鼠。引物对位于克隆位点的上游和下游,因此对所有的mTNFR25转基因使用相同的引物。上游引物是5'CGC TCT TGC TCTCTG TGT ATG3' (SEQ ID NO:14),下游引物是5'CTG CCA GCCCTC TTC CAT C3' (SEQ ID NO:15)。通过半合子转基因动物与野生型C57BL/6J小鼠的系列交配,转基因小鼠培育成C57BL/6J背景 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)。所有小鼠在6-12周龄使用,在无病原体的设备中饲养。迈阿密大学动物动物实验管理委员会 (University of

Miami Animal Care and Use Committee) 批准所有的动物使用步骤。

[0187] 实施例6:核提取物制备和NF $\kappa$ B活化的电泳迁移率变动分析

[0188] 107个EL4- $\Delta$ 5,6TNFR25或者EL4-FL TNFR25细胞用可溶性或者膜结合TL1A或者用TNFR25激动型抗体4C12进行处理,如图例所示,然后在800g离心5分钟进行收集。

[0189] 利用小量制备实验方法分离核提取物,按照文献所述(Harhaj,E.W.等人)Virology 333,145-58 (2005) 进行EMSA。核提取物(6 $\mu$ g)在室温下与32P标记的高亲合力 $\kappa$ B探针孵育20分钟,然后在非变性5%聚丙烯酰胺凝胶上解离DNA-蛋白复合物。

[0190] 实施例7:T细胞增殖检测

[0191] 脾细胞以 $1 \times 10^5$ 细胞/孔浓度种于96孔平底板,设3个重复孔。利用具有或者不具有可溶性抗-CD28(1 $\mu$ g/ml)条件下的固定抗-CD3(2 $\mu$ g/ml),或者ConA(5 $\mu$ g/ml)或者PMA(1 $\mu$ g/ml)和伊屋诺霉素(400ng/ml)活化细胞。为了T细胞增殖, $1 \times 10^5$ 细胞/孔的纯化CD4T细胞或者 $5 \times 10^4$ 细胞/孔的纯化CD8T细胞用包被的抗-CD3(2 $\mu$ g/ml)和可溶性抗-CD28(1 $\mu$ g/ml)进行刺激。在培养基中添加指定实验的1000U/ml的重组mIL-2。细胞培养72小时,用1 $\mu$ Ci/孔3H-胸腺嘧啶核昔(Perkin Elmer,Boston,MA)脉冲孵育的最后6个小时,并利用闪烁计数器定量胸腺嘧啶核昔掺入。

[0192] 按照制造商的实验步骤,利用SpinSep试剂盒(StemCellTechnology Inc.),通过阴性选择从脾细胞和/或淋巴结纯化鼠CD4或者CD8或者T细胞。利用FACS分析检测,纯度通常在90%-96%左右。

[0193] 实施例8:利用DNP-KLH对小鼠的免疫,抗体同种型的确定,和细胞因子ELISA

[0194] 成年(6-10周龄)转基因和野生型小鼠在腹膜内用100 $\mu$ gDNP偶联的钥孔血蓝蛋白(DNP-KLH)(CalBiochem)进行免疫。免疫1周和3周后,从小鼠取血,分离血清,按照制造商的实验步骤(BD)利用ELISA对抗DNP特异性IgG1、IgE和IgG2a抗体进行分析。来自单独动物的血清被吸附到包被0.8 $\mu$ g/ml DNP-白蛋白(DNP-BSA)(CalBiochem)的96孔板,利用ELISA检测结合抗体的同种型。

[0195] 为检测细胞培养上清液中的细胞因子产生,按照制造商的说明书进行夹心ELISA。利用来自BD的抗体对进行IL-2,IFN- $\gamma$ ,和IL-4分析。用于IL-13ELISA的试剂购自R&D Systems(Minneapolis,MN),用于IL-5和IL-10ELISA的试剂购自eBioscience。

[0196] 实施例9:CD4T细胞体外极化为Th1或者Th2细胞

[0197] 如上所述利用阴性选择纯化CD4T细胞。单独利用固定的抗-mCD3(2 $\mu$ g/ml)和可溶性-mCD28(1 $\mu$ g/ml),或者在IL-12(10ng/ml)和抗-mIL-4(20 $\mu$ g/ml)存在的条件下用于Th1分化,或者利用IL-4(10ng/ml),抗-mIFN- $\gamma$ (10 $\mu$ g/ml),和抗-mIL-12(10 $\mu$ g/ml)作用7天对CD4T细胞进行活化。收集细胞,洗涤,以 $1 \times 10^5$ 细胞每孔重新种板,用固定的抗CD3再刺激。24小时后收集上清,利用ELISA评价细胞因子的产生。

[0198] 实施例10:用于变应性哮喘鼠模型的免疫实验方法

[0199] 按照前述产生和回交至少七代得到C57BL/6J背景的DNTNFR25-tg(SEQ ID NO:16编码), $\Delta$ 5,6TNFR25-tg,和FL TNFR25-tg小鼠与购自国家癌症研究所(Frederick,MD)的野生型C57BL/6J小鼠进行比较。在第0天通过腹膜内注射66 $\mu$ g卵清蛋白(结晶的鸡卵清白蛋白,等级V;Sigma)致敏小鼠,所述卵清蛋白吸附于6.6mg硫酸铝钾(明矾;Sigma),溶于200 $\mu$ l PBS。在第5天,在腹膜内用相同剂量的卵清蛋白和明矾对小鼠加强免疫。在第12天,利用超

声雾化器(MABIS Healthcare Inc.,Lake Forest,IL),用溶于PBS的0.5%卵清蛋白对小鼠进行气雾剂刺激。在单一气雾剂暴露后3天,测定小鼠肺的变态反应性炎症。通过CO<sub>2</sub>的吸入处死小鼠。在套管插入气管后,用1ml PBS灌洗肺4次。计数从BAL液体回收的细胞,用于细胞涂片制备(50,000个细胞或者更少/载玻片)。对每个用Wright-Giemsa染色(Sigma)的细胞涂片计数>200个细胞,以确定巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和中性粒细胞的不同细胞数目。

[0200] 实施例11:肺部组织结构

[0201] 在支气管灌洗步骤后从小鼠摘除肺,固定于10%中性缓冲福尔马林中。样本送交迈阿密大学医学院Sylvester癌症中心的组织病理学核心实验室,在那里标本被包埋、切片并用苏木精和曙红染色。切片还用过碘酸-席夫(PAS染色)以检测粘液产生。

[0202] 实施例12:用于血清总IgE和卵清蛋白特异性Ig的ELISA

[0203] 在致敏前(第0天),气雾剂刺激后3天(第15天)和在一些实验中气雾剂刺激前1天(第11天),从小鼠取血。根据制造商的实验方案(BD)通过ELISA定量总IgE水平。通过首先用溶于PBS的0.01%OVA包被板,随后加入稀释的血清样本,然后加入第二生物素标记的抗IgE抗体(BD),在夹心ELISA中检测卵清蛋白特异性IgE。

[0204] 实施例13:支气管淋巴结细胞的体外再刺激和细胞因子产生。

[0205] 在气雾剂刺激后1天或者3天,收集支气管淋巴结,制备单细胞悬浮液。细胞种子圆底96孔板,1×10<sup>6</sup>细胞/孔,添加100μg/ml卵清蛋白培养4天。然后按照所述收集上清用于细胞因子ELISA检测。

[0206] 实施例14:细胞毒性检测

[0207] 在<sup>51</sup>Cr标记的P815-TNFR25转染靶细胞中添加系列稀释的可溶性mTL1A上清,所述上清从P815-TL1A转染细胞中收集。为检验TL1A阻断活性,在培养物中添加不同的抗TL1A单克隆抗体,4小时后检测Cr释放,每个样本重复3次。在只包含<sup>51</sup>Cr标记靶细胞的孔中计算自发释放。在包含<sup>51</sup>Cr标记靶细胞和1%SDS的孔中计算100%释放(阳性对照)。细胞毒活性的百分比按如下方式计算:(样本的平均读数-自发释放的平均读数)/阳性对照的平均读数。从EL4-转化子(transfetants)也获得相似数据。

[0208] 实施例15:拮抗性抗mTL1A抗体对肺部炎症的阻断

[0209] 在第0天和第5天腹膜内用明矾中的卵清蛋白对小鼠进行致敏,然后在第12天用溶于PBS的0.5%卵清蛋白进行气雾剂刺激1小时。从第11到14天,通过每天腹膜内注射50μg/小鼠,给予小鼠L4G6或者相同量的对照仓鼠IgG(Jackson Immuno Research)。第15天对变态反应肺部炎症进行评估。

[0210] 实施例16:NKT细胞的过继转移

[0211] Ja18k.o.小鼠(Cui,J.等人Science 278,1623-6(1997))由Michael Lotze(U.Pittsburgh)惠赠,获得M.Taniguchi(Ciba University,Japan)的允许。根据制造商的说明书,利用EasySep小鼠通用NK阳性选择试剂盒(StemCell Technologies,Vancouver,Canada)通过阳性选择,从10只小鼠汇集的脾细胞中分离野生型和DN TNFR25-tg小鼠的NKT细胞。

[0212] 实施例17:统计分析

[0213] 通过GraphPad Prism Software(San Diego,CA)进行利用双尾Student's t检验

的统计分析;  $p < 0.05$  被认为是显著的。文中数据显示为平均值土标准误。

[0214] 实施例18:DR3和TL1A抗体的产生

[0215] 产生、纯化DR3-Ig融合蛋白,并用于免疫仓鼠。获得杂交瘤上清,利用DR3-Ig融合蛋白作为筛选剂通过ELISA进行筛选。通过DR3转染肿瘤细胞的流式细胞术,通过Western印迹和通过功能研究,确认杂交瘤的性质。所有抗体都能利用FACS在转染细胞中检测到全长和其他剪接的DR3,一种抗体在Western印迹中检测到DR3,而抗体(4C12)显示激动型活性,在TL1A缺失的情况下调节DR3信号。

[0216] 通过用TL1A-麦芽糖-结合-蛋白融合免疫仓鼠,获得TL1A单克隆抗体。通过流式细胞术TL1A抗体检测到转染的TL1A。抗体(L4G6)显示拮抗活性,阻断TL1A结合DR3。

[0217] 实施例19:通过TNFR25的信号传递增强CD8交叉初免

[0218] Strbo等人(Am J Reprod Immunol. 2002 Oct; 48(4):220-5)最近描述了一种基于新热休克蛋白gp96的系统,该系统在体内调节强的、抗原特异性CD8-CTL扩增。在该模型系统中,释放的gp96-Ig(被工程化进行分泌)活化树突状细胞,并为CD8细胞的交叉呈递和交叉初免提供分子伴侣肽(图12)。该系统非常有用,因为它不需要CD4的帮助。分泌的gp96通过CD91和TLR2/4提供DC的活化信号,所述TLR2/4另由CD4细胞上的CD40-L提供。因此,在CD40-L缺陷小鼠中,该系统的CD8(OT-I)扩增正常进行。它已经被用于研究粘膜免疫和检测TNFR25在CD8扩增中的功能。

[0219] EG7-gp96是利用卵清蛋白和gp96-Ig转染,源自EL4淋巴瘤的细胞系。该细胞分泌与卵清蛋白肽相关的gp96-Ig。与单独的卵清蛋白相比,用gp96-Ig作为分子伴侣的卵清蛋白-肽增强CD8细胞的交叉初免(图10)达大约10,000倍。100ng ova-gp96-Ig扩增B6小鼠中的OT-I,从转移后CD8细胞中0.5%的比例到EG7-gp96-Ig免疫后脾中20%的比例。

[0220] 为了检测TNFR25信号对CD8扩增的影响,如上所述的TCR转基因OT-I模型,与EG7-gp96-Ig介导的刺激一起使用。为了检测TNFR25信号的作用,小鼠在EG7-gp96-Ig免疫后24小时和72小时,接受激动型抗TNFR25抗体(4C12),TNFR25结合但非激动型抗体(L4G6)或者对照IgG。在免疫后第5天监测腹膜腔中的OT-I扩增。通过EG7-gp96-Ig,4C12造成细胞招募入腹膜腔的增加,导致细胞数目的加倍。此外,4C12还特异的引起OT-I扩增超过8倍的增加。L4G6抗TNFR25抗体不诱导细胞招募入腹膜腔的增加,并抑制OT-I扩增。

[0221] 这些数据显示激动型抗TNFR25抗体共刺激CD8细胞和/或通过TNFR25抑制Treg的抑制作用。TNFR25对初始T细胞的共刺激导致增加的增殖和二级活化时的Th2极化。此外,T调控细胞中的TNFR25信号传递导致它们对抑制(suppression)的临时抑制(inhibition)。该组合效应然后导致增加的CD8扩增和细胞募集,如图11所示。

[0222] 实施例20:CD4+CD25+T调控细胞表达高水平的TNFR25

[0223] 为了检测TNFR25的表达,通过CD4细胞的阴性选择然后用抗CD25磁力分选,从脾中纯化CD4+CD25Tregs。用抗CD3、抗CD28珠子培养细胞,珠子与细胞的比例为3:1,添加2000U/ml人IL-2。在这些条件下细胞将在3-4天后开始增殖,持续扩增大约3周。培养的细胞然后通过FACS进行CD4和CD25的分析,通过胞内流式细胞术进行FoxP3表达和TNFR25表面分析。图13显示利用该方法得到的Tregs基本上是纯的,表达FoxP3和TNFR25。

[0224] 实施例21:TNFR25阻断引起右旋葡聚糖硫酸钠结肠炎的致死性

[0225] 右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)模型被广泛用作结肠炎模型,该模型在一些方面代表克

罗恩氏病。初始损伤是DSS对通透性屏障的破坏作用,所述通透性屏障通常由肠上皮提供。DSS的这种作用允许正常肠道菌群到达粘膜免疫系统中的部位,这引起了类似克罗恩氏结肠炎的炎性免疫反应。在暴露包含2%DSS的饮用水的8天期间,野生型(wt)B6小鼠患有腹泻和体重减轻。当恢复为正常水时,B6小鼠康复并恢复它们的正常体重。TNFR25还影响结肠炎疾病的病程。在本实验中,野生型和转基因小鼠暴露2%DSS水共7天。如图14所示,DN TNFR25-tg小鼠患有类似于野生型小鼠的疾病,但是当恢复为正常水时,DNTNFR25-tg小鼠没有康复,不同于野生型小鼠。相反,DN TNFR25-tg小鼠持续体重减轻,在第12和16天之间死亡。 $\Delta$ 5,6-TNFR25-tg小鼠类似于野生型小鼠,尽管一只小鼠的死亡可能还显示了被干扰的免疫应答。得出两个结论:在DN TNFR25-tg小鼠中,继发免疫应答比在野生型小鼠中更强,导致致死性,而野生型小鼠正常健康和稳态的恢复取决于功能正常的T调控(Treg)细胞。DN TNFR25-tg小鼠中Treg功能被干扰。后一结论是很可能的,因为众所周知通过保持对养分和正常肠道菌落的耐受和对肠病原体的免疫应答之间的正确平衡,Treg功能对保持粘膜免疫系统的稳态非常重要。

[0226] 实施例22:用EG7-gp96-Ig的免疫诱导OT-I细胞迁移到粘膜部位派氏淋巴结,固有层淋巴细胞(LPL)和上皮内淋巴细胞IEL)

[0227] 如图16所示(右列),EG7细胞不能造成OT-I的克隆性增殖或者迁移到粘膜部位。另一方面EG7细胞分泌gp96-Ig引起脾、淋巴结和腹膜腔中OT-I的克隆性增殖(未显示)和它们到粘膜部位的迁移(图16)。在派氏淋巴结中,8%的细胞为CD8+,6.7%的CD8细胞是OT-I;在IEL中,61%的细胞是CD8+,9%的CD8是OT-I。在LPL中,29%的CD8细胞是OT-I。免疫后迁移到IEL的OT-I细胞是 $\alpha$ Eb7+和 $\alpha$ 4 $\beta$ 7+但保留CD8 $\alpha\beta$ 和TCR $\alpha\beta$ ,不像残留的CD8IEL,其大多数是CD8 $\alpha\alpha$ 和50%TCR $\gamma\delta$ 。

[0228] 本文只描述了本发明优选的实施方式和其通用性的几个实施例。应当理解本发明能够在不同的其他组合和环境中使用,能够在此处表述的发明构思范围内进行改变或者改进。因此,例如,仅仅利用常规试验方法,本领域技术人员就将识别,或者能够确定,此处描述的具体物质和方法的很多等同物。这类等同物被认为在本发明的范围内。

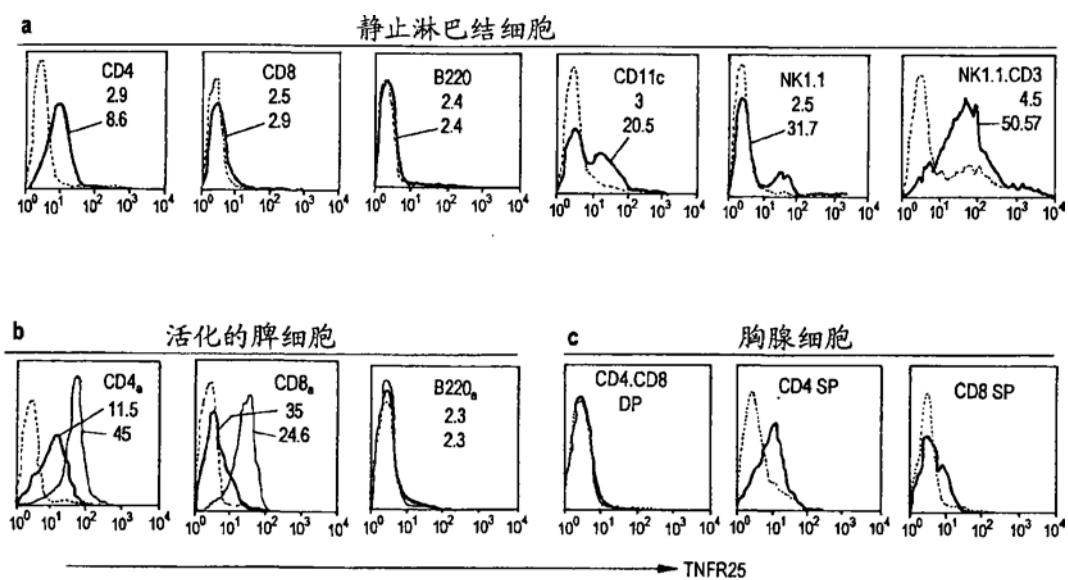


图1

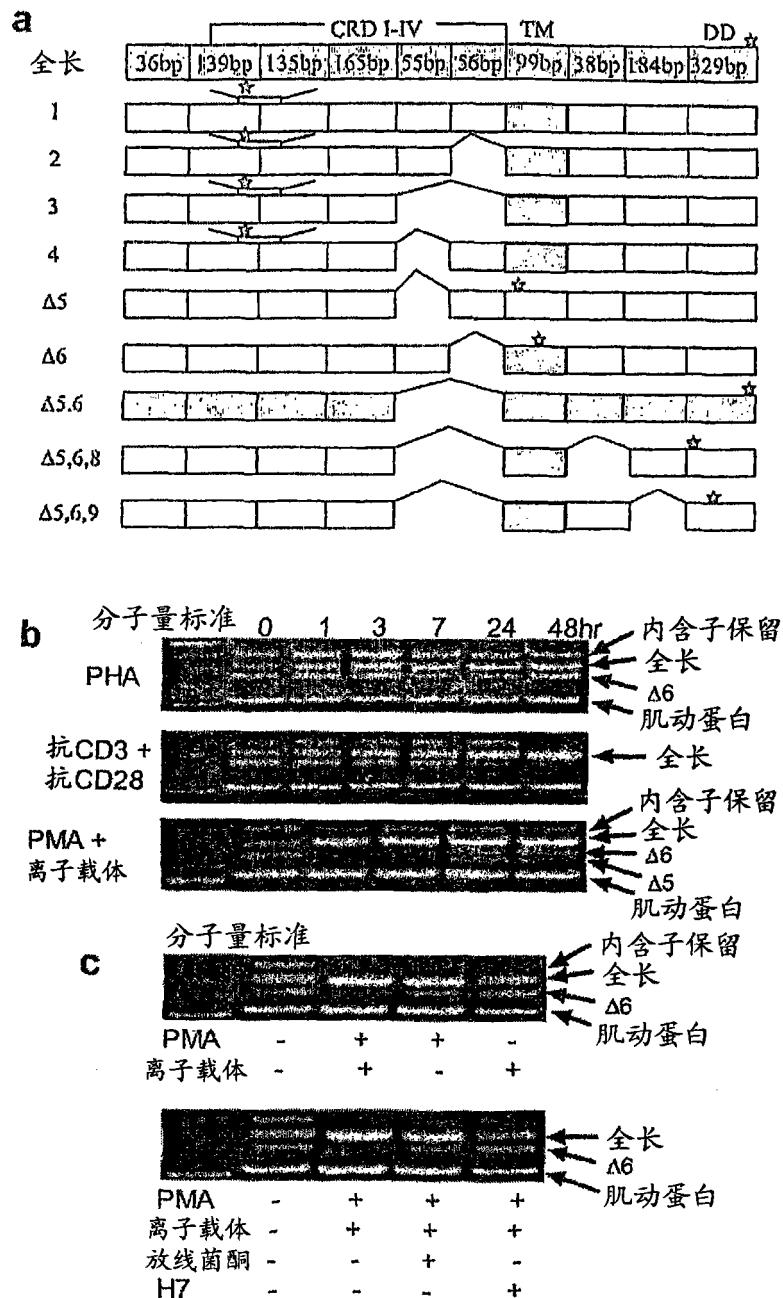


图2

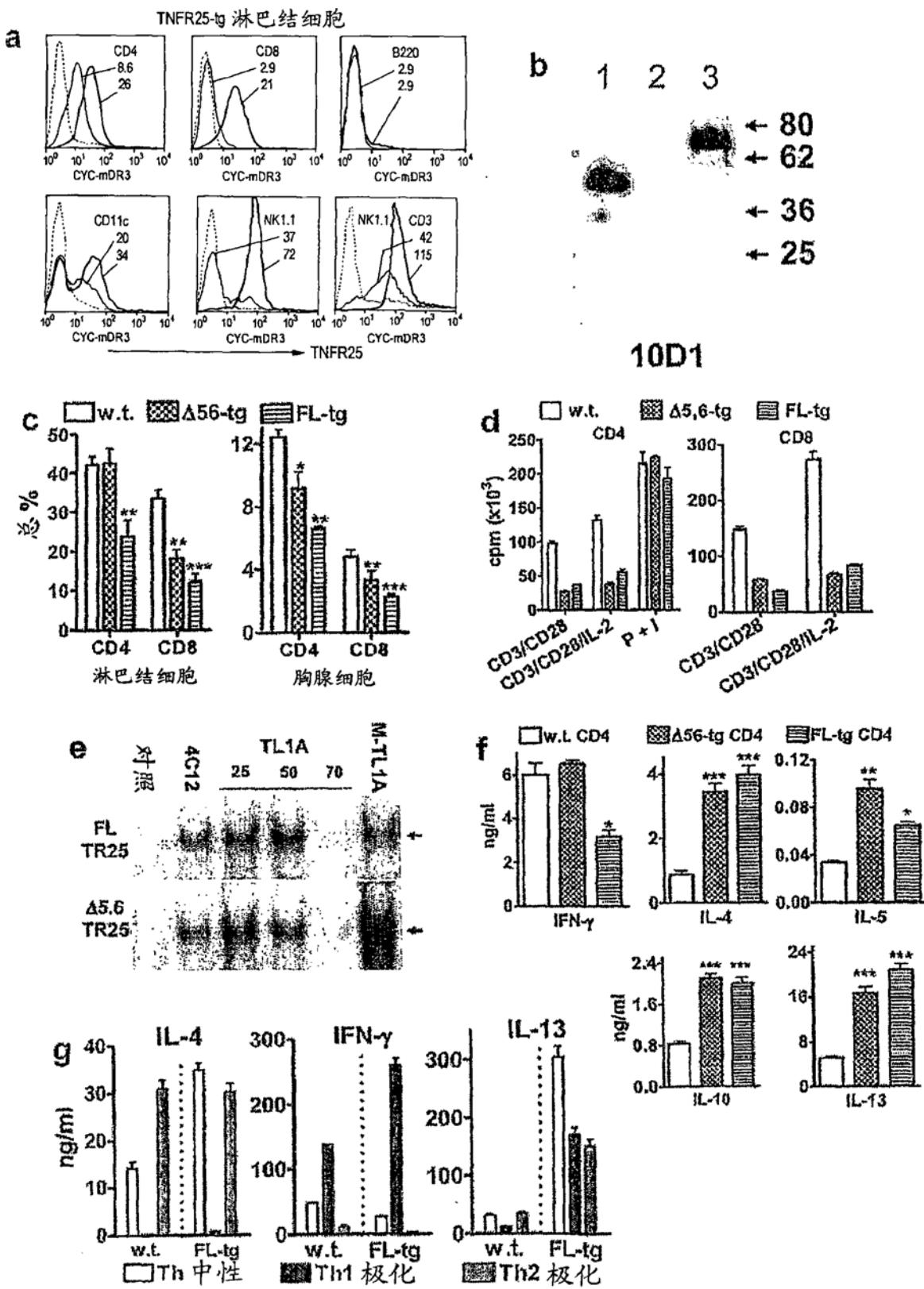


图3

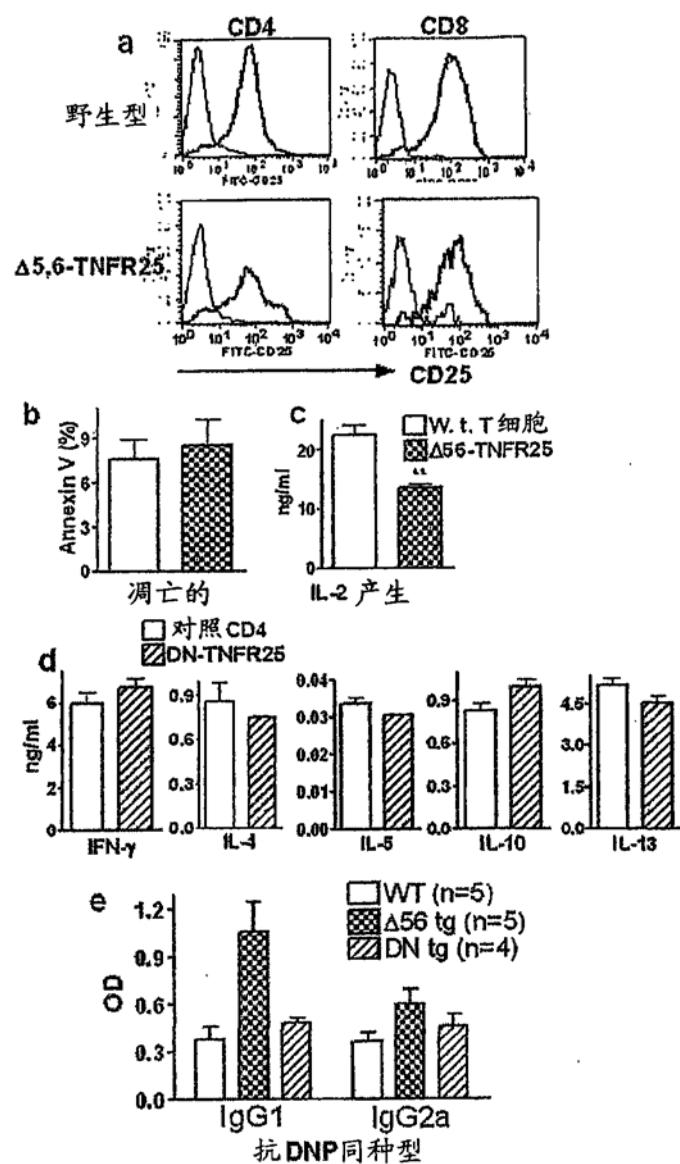


图4

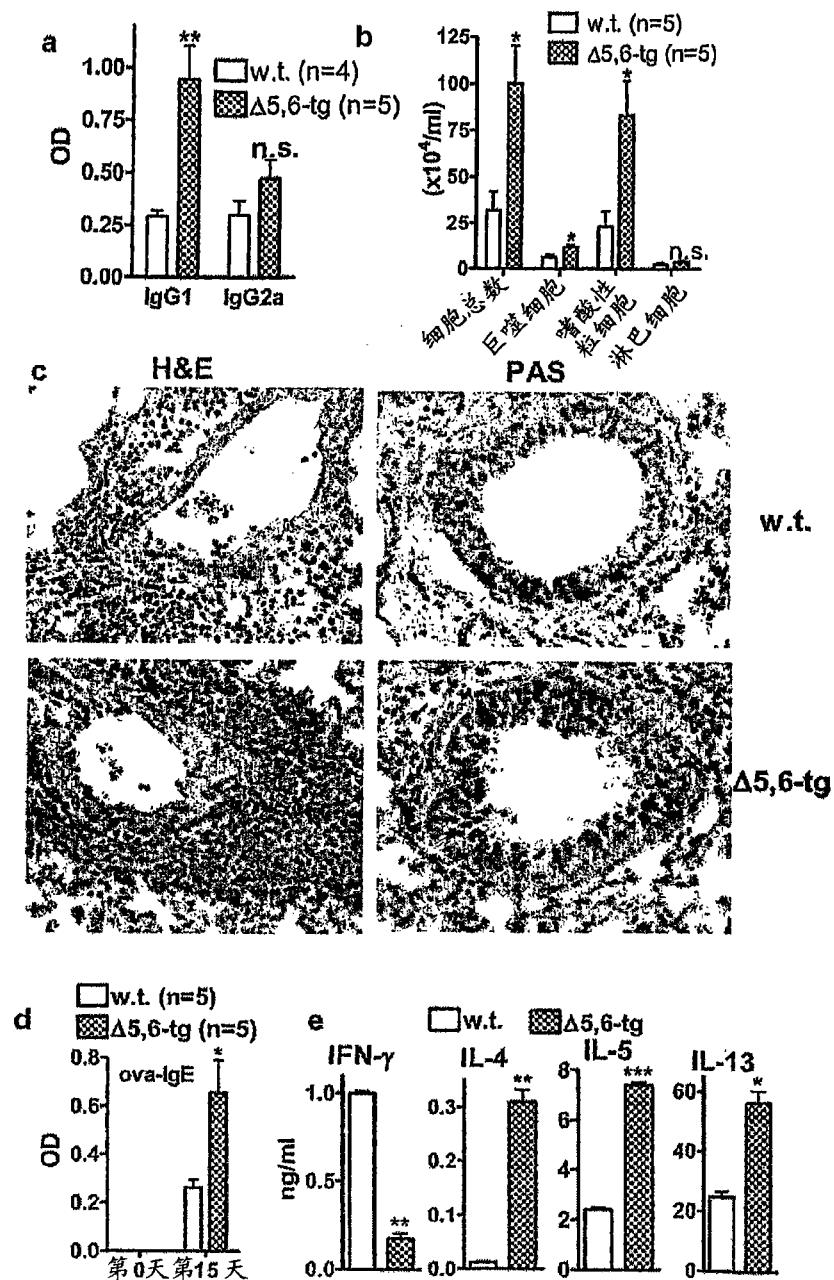


图5

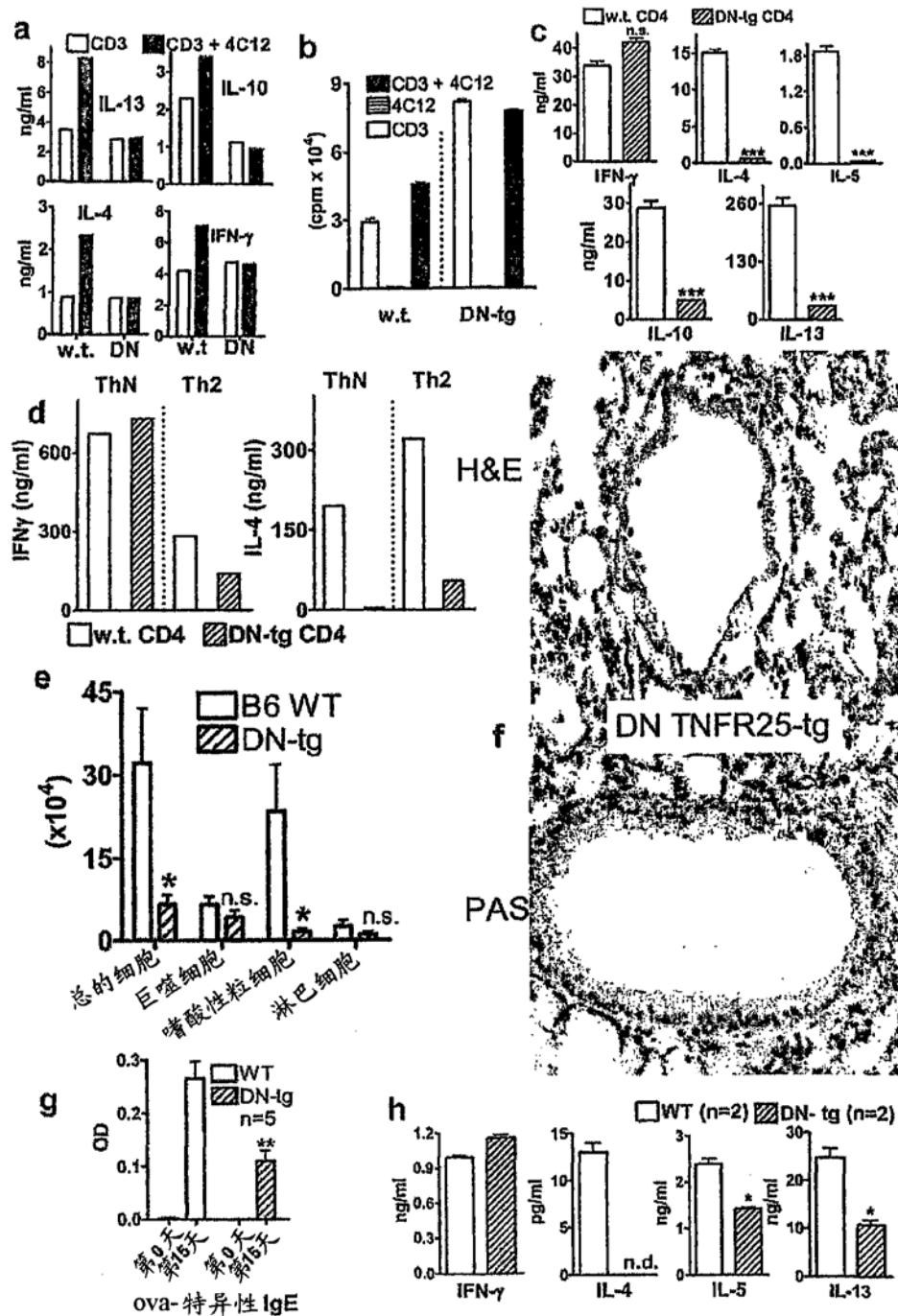


图6

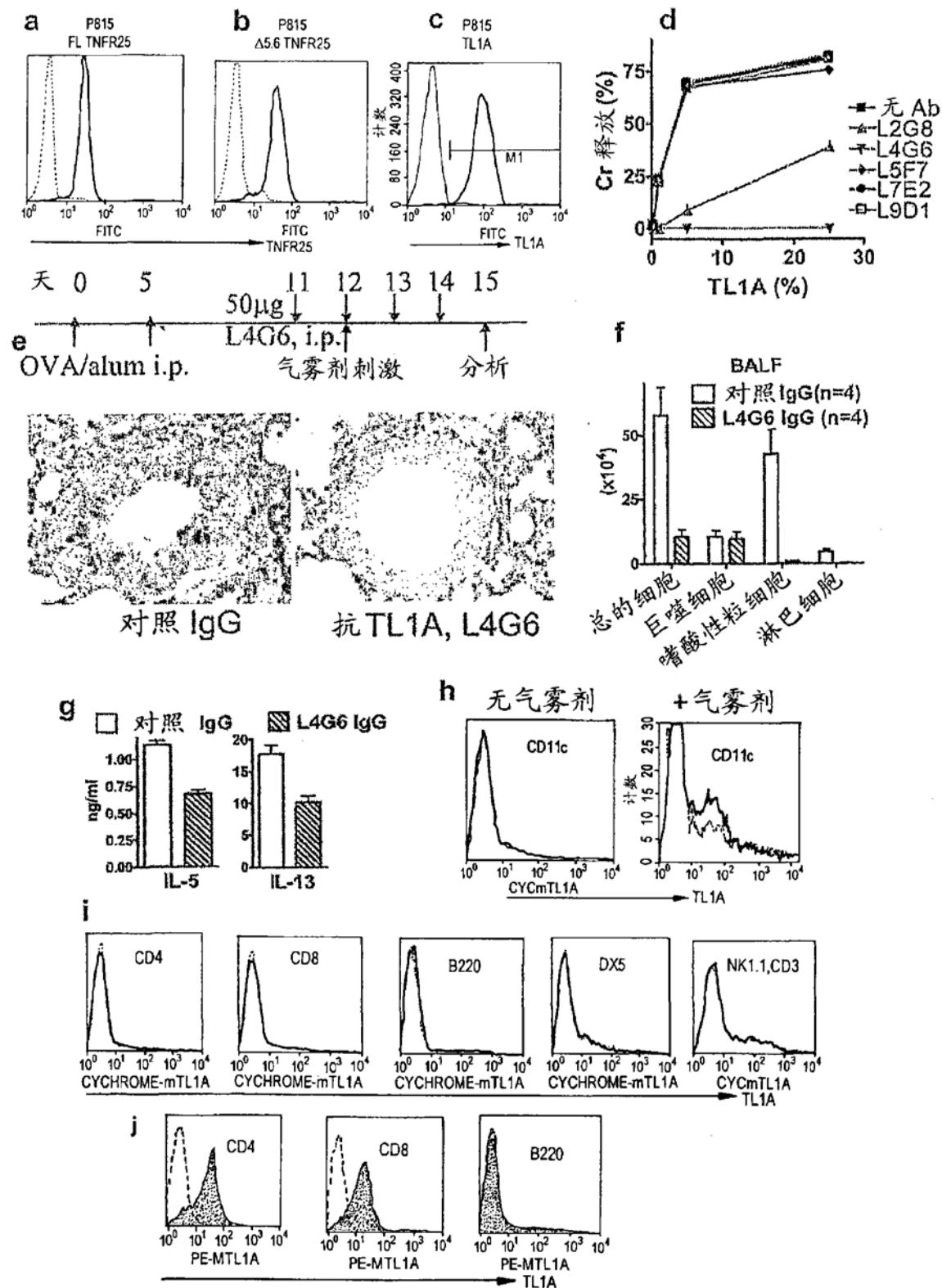


图7

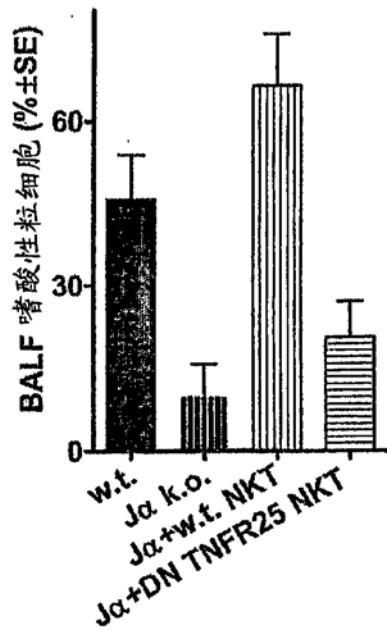
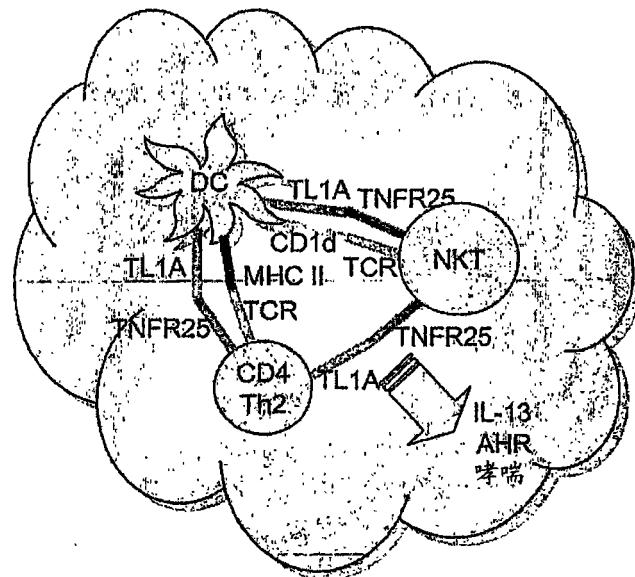


图8



支气管淋巴结

图9

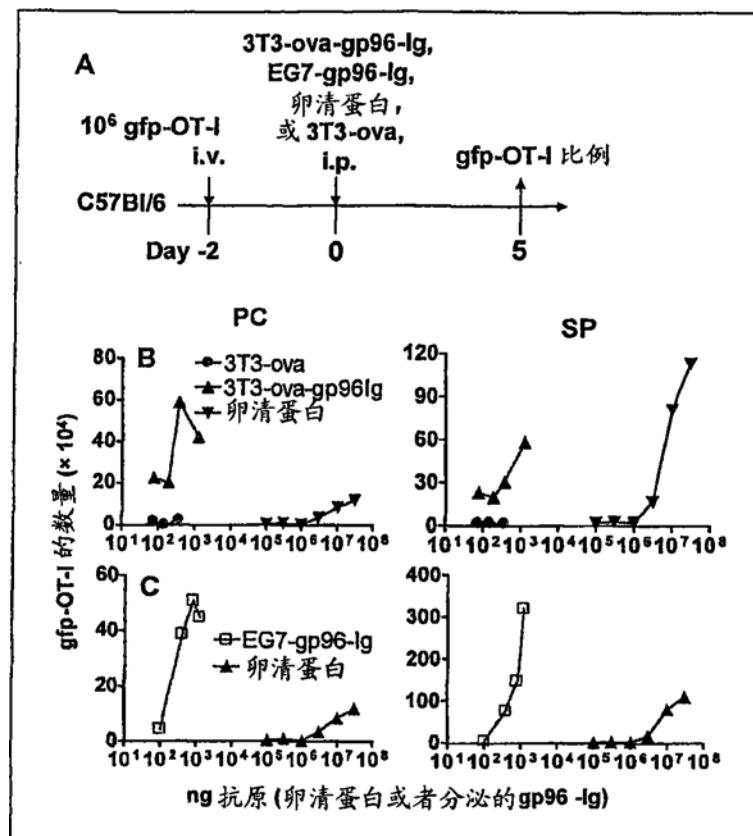


图10

### TNFR25共刺激引起的增加的OT-I扩增

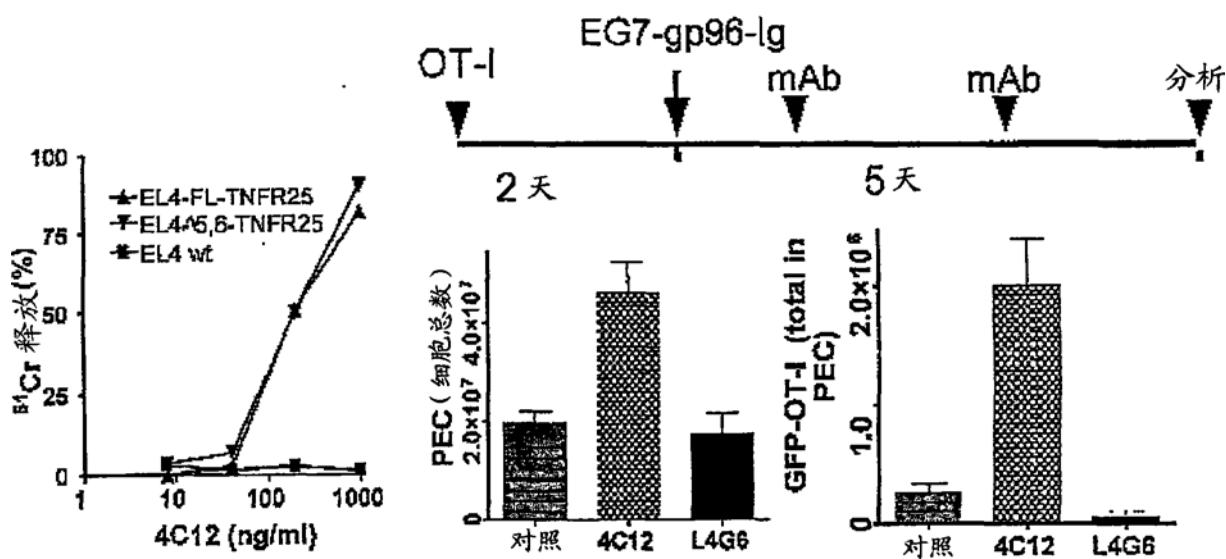


图11

## 分泌的 Gp96-Ig 对 CD8 交叉初免的机制

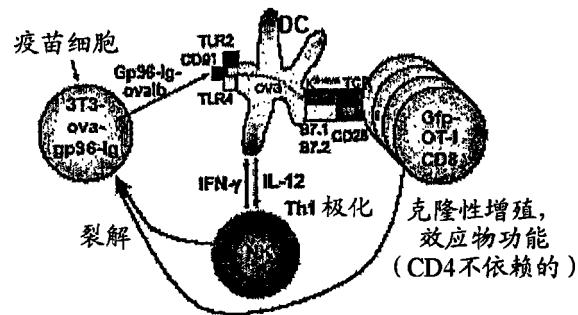


图12

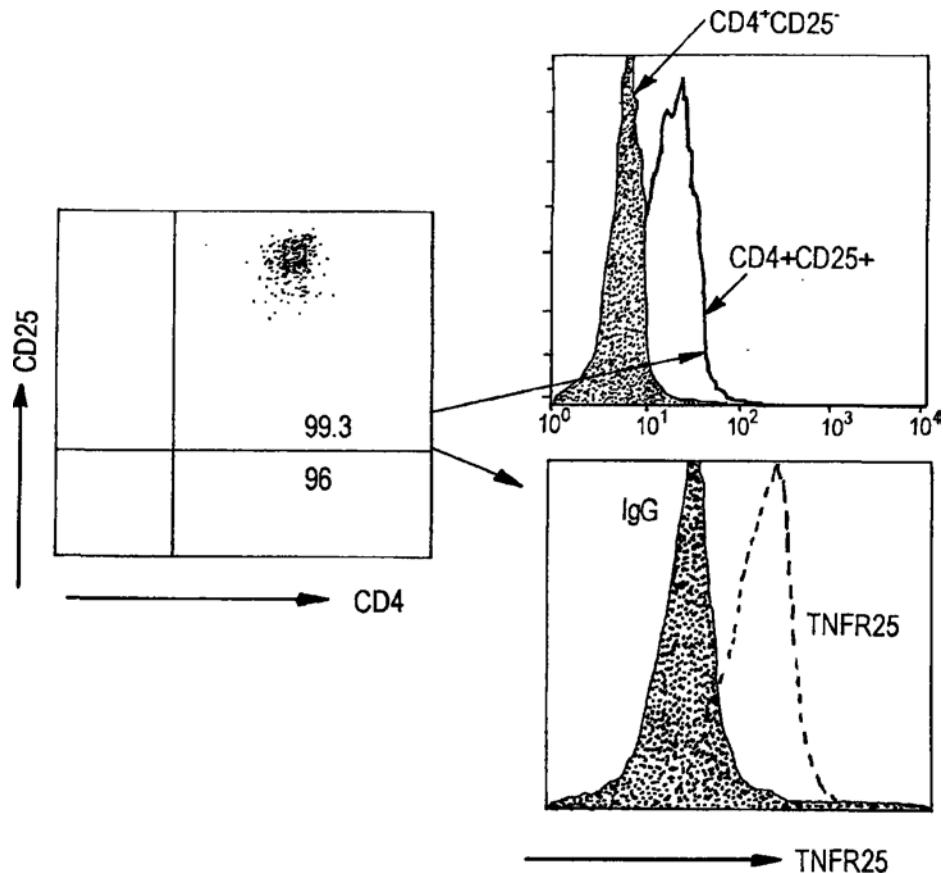


图13

## 结肠炎康复需要TNFR25

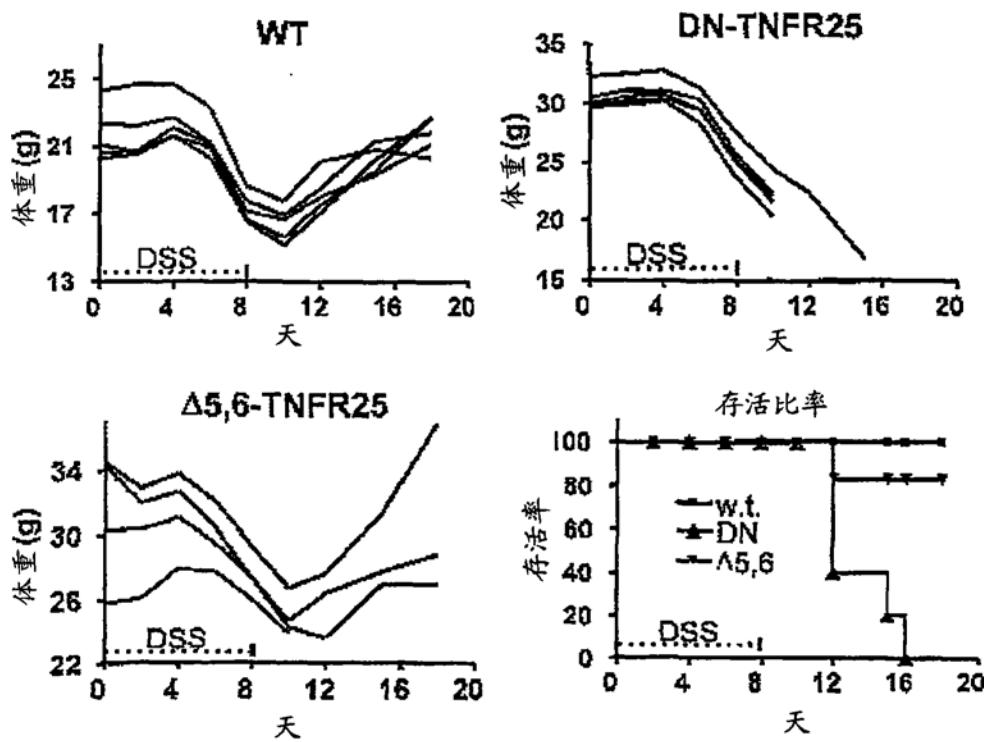


图14

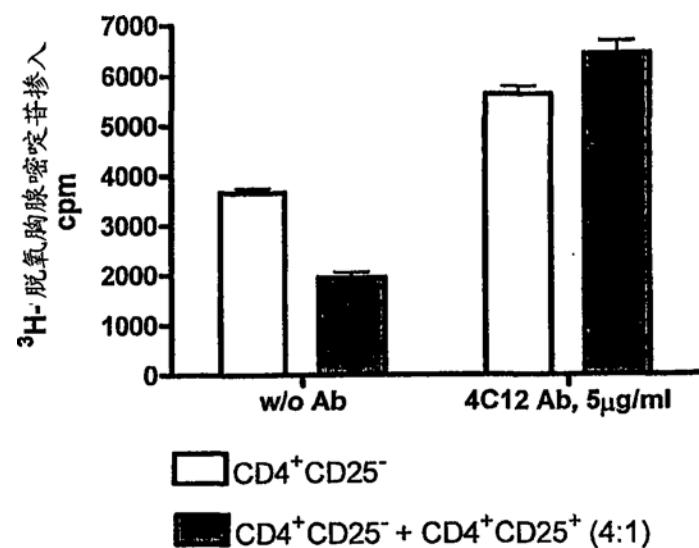


图15

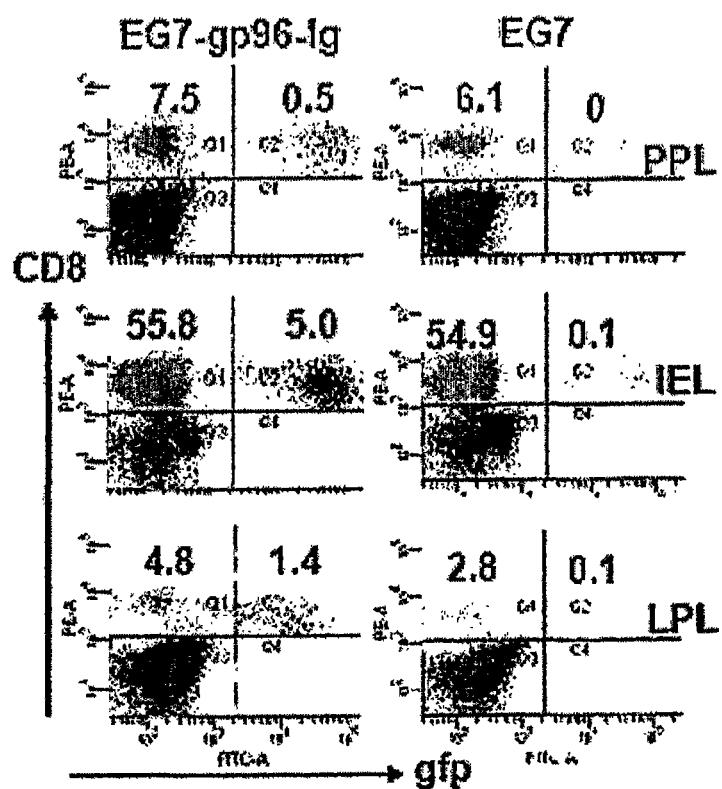


图16

SEQ ID NO: 1 - 小鼠 TNFR25 cDNA; NM\_033042

```

1 gggagttgtt ctggatggcg cggggccggg cgggcagcag ctactctagt ctaggaacat
61 aggggctgag ctgggttgggg aagccccggg ttacgcgacc gaccagagcc gcactcacaa
121 gggcccaggc ggtacacacc gcaatggagg cacggctgt gcggggctgc gtggggggc
181 ctctgttctt accactgtgt ctgctgtgc tgctgtgt gctgttgggt ggcaggggcc
241 agggcggcat gtctggcagg tggactgtg ccagtggatc ccagaagagg tatggcccg
301 tttgtgcag gggctgcaca aaggacact acatgaaggg cccctgcga gaaccctgtg
361 gcaactccac ctgccttccc tgccttcgg acacccctt gaccagagac aaccactta
421 agactgactg taccggctgc caagtctgtg atgaagaggg ccttcaagtg acccttgaga
481 actgctcgcc aaagtccggac accccactgtg gctggcagtc aggctgggt gtgtactgtc
541 ccaccgtgcc atgtggaaa agctcacctt totctgtgt cccatgcggg gotacgcacac
601 cagtcacatga ggctccaacc cccggccctt ggctgcctgg ctcttatata cgtggcaatg
661 actgcacgtc ctggcccaacg ggcttcagca gcgttggccc taaggcttgc actgtgtct
721 gtggctggaa gcagatgtt tgggtccagg tgcttctagg agtcgcgttc ctttttgggg
781 ctatccatgt ctgtcatat tgcgtatggc agccttgtaa ggccgtggc actgcagaca
841 cagctgggac ggagccctg ggctcaccac agactggccca tctctcagcc tcagacagcg
901 cccacaccctt ctggcaccc tcaagcagta ctggggaaaat ctgtaccact gtccagttgg
961 taggcaacaa ctggaccctt ggcttataccc agactcagga ggtggctgc ggacaggcc
1021 cacaaccctg ggatcagctg ccaaacagaa ctcttggaaac tcctctggca tctccgcct
1081 cgccagcgcc ccctgcgggc tctccggctg ctgtgcctca gcctggcccg cagctctac
1141 atgtatggaa tgcgttccca gcacgaaggt ggaaggagtt cgtgcgcacg ctggggctgc
1201 gggaaaggaa aattgaagcc gtggagggtt aaatctgcgg cttccgagac cagcagttatg
1261 agatgctaa ggcgtggcgt cagcagcagc ctgcaggccat cgggtccatc tatgcggctc
1321 tggagcgcggaa gggctgtggaa ggctgtggcg aggacctgtc cagccgcctg cagcgtggcc
1381 cgtgtatggaa ggtccatcat ccactttgac accctgtgt cccttgaagg agocctaagt
1441 attgttactt atgcgtgtatg acattttatg tcaattacta accccctgcgtt gtggcctgc
1501 gtgcgcggc tggctgcctc acttttgctt atctgcagca cggagctctt gctaaggggaa
1561 ggcgtatggaa gaaataccag aaggggccaa gtgattgggt gtcagctgt taattagccc
1621 gagtttggac ttggattaa atttcataag aaaaggcagct gcttg

```

SEQ ID NO: 2 - 人TNFR25 cDNA; NM\_148965

```

1 cggggccctgc gggcgccggg ctgaaggcgg aaccacgacg ggcagagagc acggagccgg
61 gaagccctg ggcggccctgc ggagggtat ggagcagcgg cggcggggct ggcggccgg
121 ggcggccggc ctctcttgg tgctgtggg gggccggcc cagggccggca ctctgtaccc
181 caggtgtgac tgcgtgggtt acttccacaa gaagattggt ctgttttggt gcaagaggctg
241 cccagccggg cactacgtt agggcccttgc cacggagccca tgcggcaact ccacctgcct
301 tgcgtgttccc caagacacet tcttggctg ggagaaccac cataattctg aatgtggcc
361 ctgcaggcc tgcgtatggc aggcctccca ggtggcgtt gagaactgtt cagcagtggc
421 cgacaccgc tgcgtgttgc agccaggctg gtttggag tgcgggtca gccaatgtgt
481 cagcagttca cccttctact gccaaccatg cctagactgc gggccctgc accgcccacac
541 acggctactt tgcgttcccgca gagatactgatg ctgtgggacc tgcctgcctg gcttctatga
601 acatggcgat ggctgcgtt cctgcggccac gccacccccc tccctgcag gggcaccctg
661 gggagctgtc cagagcgttgc tgcgtgttgc tgcgtgttgc ggcagatgtt gttgtttctg
721 ggtccagggtt ctcttggctg gccttgggtt ccccttcctt ctggggccca ccctgaccta
781 cacataccgc cactgtgttgc ctcacaaggc cctgggttact gcaatgttgc ctggatggaa
841 ggctctgacc ccaccacccgg ccacccatct gtcacccttgc gacagcgcggc acacccttct
901 agcaccttgc gacagcgtt gaaagatgtt caccgttccat ttgtgggtt acagctggac
961 ccctggctac cccggagaccc aggaggccgtt ctgcggccgtt gtgacatgtt cctggggacca
1021 gttggccaggc agagctcttgc gccccgttgc tgcgttccaca ctctgccttgc agtccccccgg
1081 cggctcgccca gccatgtatgc tgcaggccggg cccgcgttgc tacgacgttgc tggacgcgg
1141 cccagccggg cgctggaaagg agttcggttgc caccgtgggg tgcgtggagg cagagatgtt
1201 agccgtggag gtggatgttgc gccgttccatg agaccacgtt tacgagatgtt tcaagcgctg
1261 ggcgcaggcag cagcccgccgg ggcctggatgc cggttacgcg gccctggatgc gcatggggct

```

1321 ggacggctgc gtggaaagact tgccgagccg cctgcagcgc ggcccggtac acggcgccca  
1381 ctgcccacct aggccgctctg gtggcccttg cagaaggccct aagtacggtt attatgcgt  
1441 gtagacattt tatgtcaactt attaagccgc tggcacggcc ctgcgttagca gcaccagccg  
1501 gccccacccc tgctcgcccc tatcgctcca gccaaggcga agaagcacga acgaatgtcg  
1561 agaggggggtg aagacatttc tcaacttctc ggccggagtt tggctgagat cgccgtattt  
1621 aatctgtgaa agaaaaacaaa acaaaaacaaa aaaaaaaaaa aaaaa

SEQ ID NO: 3 - 小鼠TL1A cDNA; AF520786

1 atggcagagg agctgggtt gggcttcgga gaaggagtcc cagtggaaat gtcgcggaa  
61 ggctgttagac acaggccaga ggccaggggcc gggcttagctg ccaggagcaa agcctgcctg  
121 gctctcacct gctgcctgtt gtcatttccc atcctcgac gacttagcac ctccttaatg  
181 gctggccagc tccgggtccc cgaaaaagac tgtatqcttc gggccataac agaagagaga  
241 tctgagcctt caccacagca agtttactca cctcccagag gcaagccgag agcacacac  
301 aacaattaaga aacaaacccc agcaccacat ctgaaaaatc agctctctgc tctacactgg  
361 gaacatgacc tagggatggc cttcaccaag aacgggatga agtacatcaa caaatccctg  
421 gtgatcccag agtcaggaga ctatttcatac tactcccaga tcacattccg agggaccac  
481 tctgtgtgtg gtgacatcatcg tcgggggaga cgaccaaaca agccoaagactc catcaactgt  
541 gtcatcacca aggttagcaga cagctaccct gagccctgccc gcctactaac agggtccaaag  
601 tctgtgtgtg aaataagcaa caactgggtc cagtcctct accttggggc catgttctcc  
661 ttggaagaag gggacagact aatggtaaac gtcagtgaca ttccttgggt ggattacaca  
721 aaagaagata aaactttctt tggaaccttc ttgctataa

SEQ ID NO: 4 - 小鼠 DN TNFRSF25 cDNA

```
atggagg cacggctgct gcggggctgc gtgggtggagc  
ctctgttcc accactgctg ctgctgctgc tgctgtcgct gctgcttgtt ggccaggccc  
agggcggcat gtctggcagg tttgactgtg ccagttagtc ccagaagagg tatggccccgt  
tttggcag gggctgccc aaggacact acatgaaggc cccctgcgcga gaaccctgtg  
gcaactccac ctgccttccc tggccctcgg acacccctt gaccagagac aaccacttta  
agactgactg tacccgctgc caagtctgtg atgaagaggc cttcaagtg acccttgaga  
actgctcggc aaagtccggac acccaactgtg gctgccagtc aggctgggtt gttgactgtc  
ccaccgtgccc atgtggaaa agctcacctt tctcttgggtt cccatgcggg gctacgacac  
cagttccatgaa ggctccaacc ccccgccctt gcctgcctgg cttcttatata cgtggcaatg  
actgcacgtc ctgcggccacg ggcttcagca gcgttggccc taaggcttgc actgtgtct  
gtggctgaa gcagatgttt tgggtccagg tgcttcttagg agtcgcgttc cttttgggg  
ctatccatgt ctgtccatata
```

SEQ ID NO: 5 - 人 DN TNFRSF5 cDNA (仅胞外 + 跨膜)

atggagcagcgg cccggggct gcgcggcggt  
ggcggcgccg ctcttcctgg tgctgtggg ggcccggcc cagggcggca ctctgttagcccc  
cagggtgtac tttgtccggtg acttccacaa gaagatttgt ctgttttgtt gcagaggctg  
cccagcgggg cactacctga agggcccttg cacggagccc tgccggcaact ccacactgtt  
tgtgtgtccc caagacacct tcttggcttg ggagaaccac cataattctg aatgtgcccc  
ctgccagggc tttgtgtatggc agggcctccca ggtggcgctg gagaacttgt cagcagtggc  
cgacacccgc tttgtggctgtt agccaggctg ttgttgtggag tgccaggatca gccaatgtgt  
cagcagtgtca cccttctact gccaaccatg ccttagactgc gggggccctgc accggccacac  
acggctactc ttgttcccgca gagatactga ctgtgggacc tgccctgcctg gctttatgt  
acatggcgat ggctgcgtgt cctggcccccac gcccaccccg tcccttgcaag gaggccaccc  
gggagctgtc cagagcgctg tgccgcgttc tgtgtgtggaa ggcagagtag gtgtgttctg  
ggtccaggatg ctcctggctg gccttgttgtt ccccttcctg ttggggccca ccctgacacta  
caca

SEQ ID NO: 6 - 人 DN TNFR25 cDNA (仅胞外)

```

at ggagcagccg ccgcggggct gcgcggcggt
ggcggcggcgt ctcctcctgg tgctgtgtgg ggcccgccc cagggcggca ctgcgtacccc
cagggtgtac tggccgggtg acttccacaa gaagattggt ctgttttggt gcagaggctg
cccagcgggg cactacctga aggcccctt cacggagccc tgcggcaact ccacctgcct
tgtgtgtccc caagacacct tcttggcctg ggagaaccac cataattctg aatgtgcccg
ctgcaggcc tggatgagc aggcctccca ggtggcgctg gagaactgtt cagcagtggc
cgacacccgc tggctgtgt agccaggctg gtttggtggag tgccagggtca gccaatgtgt
cagcagttca cccttctact gccaaccatg cctagactgc gggccctgc accgccccac
acggctactc tggccccca gagatactga ctgtgggacc tgccctgcctg gcttcttatga
acatggcgat ggctgcgtgt cctgccccac gccacccccc tcccttgcag gggccccctg
gggagctgtc cagagcgtcg tggcgtgtc tgtggctgga ggcagagtag gtgtgttctg
g

```

SEQ ID NO: 7 - 人 TL1A cDNA; AF520785

```

1 gagagggaaa agggaaaggag gagactgagt gattaagtca cccactgtga agagctggc
61 ttcttattaa tgggggctct ctctgcccag gaggtaatgg tgcctccagg agcagcagga
121 gcatggccga ggatctggga ctgagctttt gggaaacagc cagtgggaa atgctgccag
181 agcacggcag ctgcaggccc aaggccagga gcagcagcgc acgctggct ctcacctgtct
241 gcctgggtt gtcctcccttc cttggcaggac tcaccacata cctgcttgc agccagctcc
301 gggcccaaggg agggccctgt gtgcagttcc aggtctaaa aggacaggag tttgcacctt
361 cacatcagca agtttatgca cctcttagag cagacggaga taagccaagg gcacacctga
421 cagttgtgag acaaactccc acacacact ttaaaaatca gttcccaagct ctgcactggg
481 aacatgaact aggcctggcc ttccaccaaga accgaatgaa ctataccaac aaattccgtc
541 tgatcccaga gtcgggagac tacttcattt actccctagg cacattccgt gggatgacact
601 ctgagtgca gtaaatcaga caagcaggcc gaccaaaacaa gcccagactcc attactgtgg
661 tcatcaccaaa ggtaacagac agtaccctg agccaaacccca gtcctcatg gggaccaaggt
721 ctgtatgcga agtaggttagc aactggttcc agcccatcta ctcggagcc atgttctct
781 tgcaagaagg ggacaagcta atggtaacg tcaatgtacat ctctttgggt gattacacaa
841 aagaagataa aacccctttt ggagccttct tactatagga ggagagcaaa tatcattata
901 tgaaaagtccct ctgccaccga gttccattt ttctttgttc aaatgtatt ataaccagg
961 gtttcttgg ggccgggagt agggggcatt ccacaggag aacgggttagt ctatgaaatt
1021 tggggcccaa aatttcacac ttcatgtgcc ttactgtatg gaggactaac tggaaaaggc
1081 tgaagagagc aaatatattt ttaagatggg ttggaggatt ggcgagttt taaatattaa
1141 gacactgatc actaaatgaa tggatgatct actcgggtca ggattgaaag agaaatattt
1201 caacacccctcc ctgctataca atggtcacca gtggtccagt tattgttcaa ttgtatcata
1261 aatttgcttc aattcaggag ctttgaagga agtccaaggaa aagctctaga aaacagtata
1321 aacttcaga ggcaccaatttttccacata ctttcatgtcc ttgcctaaaa
1381 aaaatgaaaaa gagagttggt atgtctcatg aatgttccaca cagaaggagt tggtttcat
1441 gtcatctaca gcatatgaga aaagctaccc ttcttttgc tatgtacaca gatatctaaa
1501 taaggaaatgtatgatccatc aaaaatacaac agttgttgc attcagtaga
1561 gtttcttgc ccacccatattt tggctgggt totacccat cccagaaggac actatgaaaa
1621 acaagacaga ctccactcaa aatttatattt aacaccacta gataactccct gatcaaacat
1681 cagtcacat actctaaaga ataactccaa gtcctggccca ggccgactgg ctcacacccctg
1741 taatcccaac actttggggag gccaagggtgg gtggatcatc taaggccggg agttcaagac
1801 cagctgacc aacgtggaga aaccccatctt cttactaaaaa tacaaaattt gcccggcggt
1861 gtagcgtatcc tggctactca ggaggccggag gcagaagaat tgcttgaact
1921 ggggaggcag aggttgcgtt gagcccatg cgcgcattt cactccagcc tgggtacacaa
1981 gagcaaaaact ctgtccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

SEQ ID NO: 16 - mDN-TNFR25 cDNA

```

ATGGAGGCAC GGCTGCTGCG GGGCTGCGTG GTGGAGCCTC TGTCCTACC ACTGCTGCTG
CTGCTGCTGC TGCTGCTTGG TGGCCAGGGC CAGGGCGGCCA TGCTGGCAG GTGTGACTGT
GCCAGTGAGT CCCAGAAAGAG GTATGGCCCG TTTTGTGCA GGGGCTGCC AAAGGGACAC

```

TACATGAAGG CCCCCCTGCGC AGAACCCGT GGCAACTCCA CCTGCCTTCC CTGTCCCTCG  
GACACCTTCT TGACCAGAGA CAACCACTTT AAGACTGACT GTACCCGCTG CCAAGTCTGT  
GATGAAGAGG CCCTTCAAGT GACCCTTGAG AACTGCTCGG CAAAGTCGGA CACCCACTGT  
GGCTGCCAGT CAGGCTGGTG TGGTACTGC TCCACCGAGC CATGTGGGAA AAGCTCACCT  
TTCTCTTGTG TCCCATGCGG GGCTACAACA CCAGTCCATG AGGCTCCAAC CCCCCGGCCC  
TGCCTGCCTG GCTTCTATAT ACGTGGCAAT GACTGCACGT CCTGCCCCAC GGGCTTCAGC  
AGCGTTTGCC CTAAGGCTTG CACTGCTGTC TGTGGCTGGA AGCAGATGTT TTGGGTCCAG  
GTGCTTCTAG GAGTCGCGTT CCTTTTGGA GCTATCCTGA TCTGTGCATA TGGCTCTGGA  
AGCGGGAGCG TCGACGATCT TTACGACGAT GATAAATAGT AA

图17