

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國 (地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☐無主張優先權
美國 1998年04月03日 09/054,488 ☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱
面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

相關申請案

本發明是有關一種拮抗-受體，另外在文獻中稱之為CD40CR, gp39, 或最近稱為CD40B-細胞抗原之CD154, 及此受體之可溶性配體，包括含有至少一部份CD40蛋白質之融合分子。此至少有一部份是基於以下發現，即可溶性CD40/免疫球蛋白融合蛋白質，經由與輔助T-細胞膜上新穎的39kD蛋白質結合而可抑制輔助T-細胞調介之B-細胞活化作用。本發明提出實質上純的CD40CR受體；CD40CR可溶性配體，包括抗-gp39抗體及其片段，以及含有至少CD40蛋白質一部份之融合分子；以及控制及一細胞活化作用之方法，其尤其可用於治療過敏或自體免疫疾病。較特別地，本發明是有關使用抗-gp39抗體來治療全身性紅斑瘡(SLE)或藥物誘生之狼瘡。

發明背景

由Mitchison, Benacerraf及Raff的研究先建議，在 T_h 及B-細胞間之物理性交互作用是發展體液免疫反應必要的。後來的研究証明， T_h 可與II類主要組織相容性複合體(MHC)相容的抗原-呈現性B細胞形成物理性共軛物(Vitetta et al., Immunol. Rev., 99:193-239 (1987))，且在這些共軛物中是B細胞會對 T_h 有反應(Barrett et al., J. Immunol., 143:1745-1754 (1989))。由 T_h -衍生之淋巴激素可在B細胞上展現強力的生長及分化作用之發現可推知，可溶性因子經由活化之 T_h 調介交互作用之B細胞之活化作用而可於近處釋出。然而，經分子選殖之淋巴激

五、發明說明(2)

素，不論單獨的或組合下，無一者可顯示出誘生B細胞循環入口之能力。而血漿膜部份和可溶性因子不同，其來自經活化之 T_h 可誘生B-細胞循環入口(Hodgkin et al., J. Immunol., 145:2025-2034 (1990); Noelle et al J. Immunol., 146:1118-1124 (1991))。由經活化的 T_h 來的經純化的血漿膜部份之研究推知，在經活化 T_h 之膜上所表現之蛋白質負責最初之體液免疫力(Noelle et al., J. Immunol., 146:1118-1124 (1991); Bartlett et al., J. Immunol., 145:3956-3962 (1990))。

來自活化的 T_h 之經純化的血漿膜(PM^{ACT})已被用來檢視此效應物功能之本質(Hodgkin et al., J. Immunol., 145:2025-2034 (1990); Noelle et al., J. Immunol., 146:1118-1124 (1991))。 PM^{ACT} 來自經活化之 T_h ，而非休眠的 T_h (PM^{REST})，其表現出之活性可以抗原非特異之II類未受限方式誘生B-細胞循環入口。此外，已示出由 PM^{ACT} 表現之活性需4-6小時之活化作用，重新的RNA合成，且本質上是蛋白質。(Bartlett et al., J. Immunol, 145:3956-3962 (1990))。

發明要點

本發明是有關拮抗-受體，稱之為CD40CR，為CD40 B-細胞抗原之受體，以及此受體之可溶性配體，包括含有至少一部份CD40蛋白質之融合分子。其至少有一部份是基於以下發現，即可溶性CD40/免疫球蛋白融合蛋白質經由與新穎39kD受體蛋白質結合，可抑制輔助T-細胞調介之B細

五、發明說明(3)

胞活化作用(稱為CD40拮抗-受體之"CD40CR")，以及發現單株抗體，稱為MR1，直接針對此39kD受體，可抑制輔助T-細胞調介之B細胞活化作用。

本發明提出CD40CR可溶性配體實質上純的CD40CR受體，包括抗體，以及含有至少CD40蛋白質部份之融合分子；及控制B細胞活化作用之方法。

在本發明特殊具體實例中，個體中B-細胞之活化作用可因個體之輔助T細胞與治療有效劑量之可溶性配體或CD40CR接觸而抑制。B-細胞活化作用之此抑制作用，尤其可用於治療過敏或自體免疫疾病。

較特別地，本發明提出於有所需個體中治療狼瘡之方法，如目前有全身性紅斑狼瘡，或有藥物-誘生之狼瘡，甚至是疾病過程之進階階段(其中常可觀察到腎損害)，此方法是投予治療有效劑量之抗-gp39抗體，如抗-人類gp39抗體或其片段，揭示於共有之美國專利案No. 08/475,847，公告於1995年6月7日。

本發明的一個優點是其可介入非抗原特異之免疫反應方面。目前對過敏的療法包括針對特定抗原施行減敏作用，且要求各病人接受測試以鑑知與感受性有關之抗原。就實際而言，詳盡分析病人對各個及每一可能過敏原之反應實質上是不可能的。再者，在大多數自體免疫狀況中，病因性抗原通常是未知的或甚至與疾病過程無關。本發明是有關抗原-非特異的CD40/CD40CR交互作用，其因此勿需鑑定與過敏或自體免疫力有關之抗原。因此，本發明在治療

五、發明說明(4)

過敏或自體免疫狀況中特別有益處，其中的免疫原是未知的，或是有多重之組份，例如，在花粉熱中，普卡醯胺可誘生狼瘡或全身性紅斑狼瘡(SLE)。其也可應用於免疫活化作用之急性治療之中，例如，可用於預防治療。

縮寫

Ig	免疫球蛋白
mab	單株抗體
PM ^{ACT}	製備自休眠的輔助T細胞之漿膜
PM ^{REST}	製備自休眠的輔助T細胞之漿膜
PAGE	聚丙烯醯胺凝膠電泳
rIL4	重組體間白素4
rIL5	重組體間白素5
SN	上清液
T _h	輔助T-細胞
T _h 1	指1.6, aI-A ^d -受限之兔子免疫球蛋白特異純系

附圖說明

圖1，單株抗體及CD40-Ig對於PM^{ACT}誘生B-細胞RNA合成上之作用。

A圖：休眠的B-細胞與Pmtest或PM^{ACT}(來自T_h1)共培養，25微克/毫升的抗-CD4，抗-LFA-1或抗-ICAM-1，或其各自之組合(各25微克/毫升)加至含有PM^{ACT}之孔洞中，再由[³H]-尿嘧啶核苷之納入作用偵測B細胞RNA之合成。B-細胞RNA合成由培養係42-48小時時進行。所呈現之結果為三次培養之算術平均值+/- s.d，且為5次此種實

五、發明說明 (5)

驗之代表值。

B圖：休眠中之B細胞與來自 T_h1 (●, ▲)或 T_h2 (□)之 PM^{ACT} 共培養。對含 T_h1 PM^{ACT} 之培養中(●, ▲)加入漸增量之CD40-Ig(▲)或對照組蛋白質CD7E-Ig(●)。對含有 T_h2 PM^{ACT} 之培養中(□)，加入漸增量之CD40-Ig，於培養後42-48小時，評估B-細胞RNA合成。所呈現之結果為三次培養之算術平均值 $\pm$ s.d.，且為3次此種實驗之代表值。

C圖：休眠的B-細胞與LPS(50微克/毫升)或 PM^{ACT} 共培養。在培養物中加入CD40-Ig(25微克/毫升；有陰影的)或CD7E-Ig(25微克/毫升；實心的)。加A圖般決定RNA之合成。所呈現的結果是三次培養之算術平均值 $\pm$ s.d.，且為3次此實驗之代表。

圖2，CD40-Ig抑制之B-細胞分化及增值作用。

A圖：休眠的B-細胞與 PM^{ACT} ，rIL4(10毫微克/毫升)及rIL5(5毫微克/毫升)共培養。在培養之初，或在培養後1-2或3天時，加入CD40-Ig或CD7E-Ig(25微克/毫升)。於培養第6天，回收個別孔洞中之SN，並利用抗-同型特異的ELISA定量IgM(■)及IgG₁(●)，如所述(Noelle et al., J. Immunol., 146:1118-1124 (1991))。在 PM^{ACT} ，IL4及IL5存在下(無加入之CD40-Ig)，IgM及IgG₁之濃度分別是4.6微克/毫升及126毫微克/毫升。於無IL4及IL5下，並未測及IgM及IgG₁。結果為3次此種實驗之代表。

五、發明說明(6)

B圖： T_h1 休眠或以抗-CD3活化16小時，照射並與休眠的B-細胞(4×10^4 /孔)在IL4存在下(10毫微克/毫升)培養。在培養物中加入0及25微克/毫升竹的CD40-Ig(▲)或CD7E-Ig(●)。在培養後66-72小時，孔洞追加以 $1.0 \mu\text{Ci}$ [^3H]-胸苷，再予以回收。虛線表示B-細胞對休眠的 T_h 之反應。結果是三次培養之算術平均值 $\pm$ s.d.，且為2次此實驗之代表。

圖3，CD40-Ig可偵測表現在經活化的，而非休眠的 T_h 上之分子，休眠及活化之 T_h 回收再與融合蛋白質在 4°C 下培育20分鐘，再加上FITC-共軛的山羊抗-hIgG(25微克/毫升)。分析至少5000細胞/樣品以決定陽性細胞之百分率及MFI。結果為6次此種實驗之代表。由概圖可顯示出CD40-Ig結合。

圖4，CD40-Ig可免疫沉澱來自經活化 T_h1 溶胞產物之39kD蛋白質。 T_h1 以不溶解之抗-CD3休眠或活化16小時。來自休眠的或經活化 T_h 之 [^{35}S]-標記之蛋白質，以經純化之抗體或融合蛋白質(1-10微克)免疫沉澱。凝膠概況為3次此實驗之代表。

圖5，與所誘生之39 kd T_h 膜蛋白質特異的單株抗體(mab)，可抑制 PM^{ACT} 對B-細胞RNA合成之誘導作用。休眠的B-細胞及 PM^{ACT} 與各10微克/毫升的抗 α/β ，抗-CD3，CD40-Ig或MR1共培養。如圖1所述地決定RNA之合成。所示之結果是三次培養之算術平均值 $\pm$ s.d.，且為3次此種實驗之代表值。

五、發明說明 (7)

圖 6，MR1 及 CD40-Ig 可確認表現在經活化之 T_h 上之相同分子。

A 圖：經活化之 T_h 以 MR1 或對照組 Ig 螢光標記。為評估 CD40-Ig 及 MR1 是否競爭與活化 T_h 之結合，變化濃度之 MR1 或對照組倉鼠 Ig (抗- α/β TCR) 與抗-CD40 (20 微克/毫升) 一起加入。經過在 4°C 下培育 20 分鐘，樣品洗滌，再與 FITC-共軛的 mab 抗-人類 IgG，共培育。結果為 3 次此種實驗之代表。

B 圖：來自 [^{35}S]-甲硫胺酸-標記之經活化的 T_h 之蛋白質與 MR1 (10 微克/樣品) 或 CD40-Ig (10 微克/樣品) 免疫沉澱，並以 PAGE 及螢光層析解析，結果為 2 次此種實驗之代表。

圖 7，CD40-Ig 與人類細胞株之結合。各樣的人類 T-細胞株與經生物素-標記之 CD40-Ig 曝露，並以流動細胞計數評估。

圖 8，A 圖：來自 Stamenkovic et al., EMBO J., 8:1403-1410 (1989) 之 CD40 cDNA 核苷酸序列。穿膜區在底下劃線。

B 圖：可用來表現 CD40-Ig 之質體之圖解在 Δ CD40 融合位置處之胺基酸序列示於 CD40 圖下方。

圖 9，由不同的經處理的 NZB/NZW F_1 ，老鼠群的產生之抗-(ss)DNA 抗體之效價。空心圈 (---○---) 代表 4 至 10 個月大以 MR-1 處理之老鼠；空心三角形 (---△---) 代表發展生成蛋白尿係未有反應之接受 MR-1 之老鼠，實心正方形 (---■---) 代表發展生成蛋白尿係確有反應之接受 MR-1 之

五、發明說明(8)

老鼠，且實心圈(---●---)代表未接受治療之老鼠。數值為各組三次效價之平均值 $\pm$ SEM。

圖10，經處理NZB/NZW F1老鼠不同群之存活。空心圈(---○---)代表4至10個月大經MR-1處理之老鼠。空心三角形(---△---)代表發展蛋白尿後無反應之接受MR-1之老鼠，實心正方形(---■---)代表發展蛋白尿係確有反應之接受MR-1之老鼠，且實心圈(---●---)代表未接受治療之老鼠。

發明詳細說明

本發明提出實質上經純化之CD40CR受體；CD40CR之可溶性配體，包括抗-gp39抗體及其片段，以及含有CD40之融合分子；及利用可溶性配體控制B細胞活化之方法。

基於揭示明白之目的，且不欲予以限制，本發明之詳細說明分成以各段：

(i)可與CD40CR結合之配體；

(ii)用來鑑定CD40CR之方法；

(iii)經純化CD40CR之製備；

(iv)可與CD40CR結合之配體之用法；及

(v)CD40CR之用法，

(iii)經純化CD40CR之製備，特別是治療正面進行中之狼瘡，如全身性紅斑狼瘡，或藥物誘生之狼瘡。

本發明提出CD40CR之可溶性配體，包括(1)含有至少一部份CD40蛋白質之融合分子，及(ii)可與CD40CR特異結合之抗體或抗體片段，或gp-39，或CD154如此之抗原也是已知的。

五、發明說明(9)

所謂"可溶性"，如此中所用的指本發明之配體並非長久地與細胞漿膜結合。然而，本發明的可溶性配體可固定在非細胞之固相載體上，包括脂質，蛋白質或碳水化合物分子，珠粒，小囊，磁性粒子，纖維等，或可關閉在植入物或小囊內。

此配體與CD40CR結合的能力，可由証明配體結合至相同蛋白質如CD40-Ig(下文)或MR1(下文)，或與CE40CR結合之另一抗體，如共有之美國專利案No. 08/475,847所揭示，而予以証實。

本發明之配體可與適合的載劑一起包含在醫藥組合物內。

本發明提出為CD40CR配體之可溶性融合分子。此融合分子含有至少一部份之CD40蛋白質，並粘附至第二分子。CD40的部份較好缺少穿膜區域。依據本發明可使用之CD40蛋白質部份定義為可與CD40CR結合的任何部份，如已示出可與如MR1或CD40-Ig相同蛋白質結合之部份。

可使用之第二分子包括肽及蛋白質，脂質及碳水化合物，且於本發明之較佳具體實例中，可為免疫球蛋白分子，或其部份(如Fv, Fab, F(ab')₂, 或Fab'片段)或CD8，或另外的粘附分子，如B7。第二分子可衍生自非人類或人類來源，或可為嵌合的。第二分子也可以是一種酵素，毒素，生長因子，淋巴激素，抗增殖劑，烷化劑，抗代謝藥，抗生素，長春生物鹼，與鉑鉻合之複合物，放射性同位素，或螢光化合物。

本發明的融合分子可由化學合成產生，或較好是利用重

五、發明說明(10)

組體DNA技術。

例如，編碼至少一部份CD40蛋白質之核酸序列，可組合以編碼第二分子之核酸序列，於適合的表現載體中，再於原核或較好是真核表現系統中表現，如酵母，桿病毒，或哺乳動物表現系，包括導入外來基因動物。

另外，至少部份的CD40蛋白質可利用電泳技術表現，或利用與CD40或第二分子結合之配體行親和力層析，可與CD40結合之配體包括下列，如：抗-CD40抗體，如G28-5，由具編號HB9110貯於ATCC之融合瘤所產生，及CD40CR，完全述於下文。若第二分子是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段，可使用含有抗-免疫球蛋白抗體之親和力管柱；若第二分子含有F_c片段，可使用蛋白質A管柱。

依據本發明較佳具體實例，CD40部份可利用核酸序列產生，其可編碼CD40部份，其自穿膜區上游截斷。此一核酸序列可由水解含有編碼CD40抗原之cDNA之質體而製成，如 Stamenkovic et al., EMBO J., 8:1403-1410 (1989)中所述，利用Pst1(P)及Sau3A(S3)限制酶。所生成的P/S 3片段再繼代選殖至已用P及BamHI(B)水解之相同質體，以產生經截斷的CD40基因(見圖8)。

特言之，但不予以限制，在本發明明具體實例中，用來產生含有至少一部份CD40以及免疫球蛋白序列之配體之表現載體，較好可含有由病毒衍生之複製源，細菌之複製源，細菌選擇性標幟，其核啟動子及加強子序列，與編碼免疫球蛋白固定區之DNA序列以限制位置分隔，如此可繼代選

五、發明說明 (11)

殖編碼至少一部份CD40之DNA序列，繼之為聚腺苷化訊號序列(見圖8.b)。

在本發明特異的具體實例中，經載斷之CD40基因可繼代選殖至免疫球蛋白融合質體，如 Aruffo et al., Cell. 61:1303-1313 (1990)所述，利用MluI及B水解，以形成質體pCD40-Ig，其編碼融合分子CD40-Ig(見圖8)。CD40-Ig融合蛋白質再由將pCD40-Ig質體轉感至cos細胞而產生，形成過渡之表現系統。所產生之CD40-Ig可收集自cos細胞上清液，並以如 Aruffo et al., Cell, 161:1303-1313 (1990)所述之蛋白質A管柱層析純化。

本發明之可溶性配體較好含有抗體分子，單株抗體分子，或這些抗體分子之片段，其含有抗原組合位置，其可與CD40CR(gp39)結合，較好是人類gp39。此配體可進一步含有一個第二分子，其可為蛋白質，脂質，碳水化合物，酵素，毒素，生長因子，淋巴激素，抗增殖劑，烷化劑，抗代謝藥，抗生素，長春生物鹼，鉑絡合之複合物，放射同位素，或螢光化合物，而且也可連接至抗體分子或片段。

當配體是單株抗體時，或其片段，單株抗體可利用任何技術製成拮抗CD40CR(gp39)，其經由在培養中連續的細胞株可提供作為抗體分子產製之用。例如，最先由Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495-497)所發展之融合瘤技術，以及更常被應用的其他技術，如人類B細胞融合瘤技術(Kozbar et al., 1983, Immunology Today, 4:72))及EBV-融合瘤技術，以產生人類單株抗體(Cole et

五、發明說明 (12)

al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp 77-96)等均在本發明範圍之內。通常以人類化及嵌合的抗-gp39抗體為較佳，因為較不致於誘生免疫原反應(HAMA反應)。

含有分子同型的抗體片段可以已知技術產生。例如，此片段可含有下列，但不限於此： $F(ab')_2$ 片段，可由以胃蛋白酶處理抗體分子而產生； Fab' 片段，可由還原 $F(ab')_2$ 片體雙硫橋而產生； $F(ab')_2$ 片段，可由胃蛋白酶處理抗體分子而產生；及 $2Fab$ 或 Fab 片段，其可由胃蛋白酶處理抗體分子及還原劑還原雙硫鍵橋而產生。

如上示，本發明也提出由技藝中已知技術產製之嵌合體或人類抗體，如示於Morrison et al, Proc Natl. Acad, Sci. U.S.A. 81:6851-6855 (1984)或歐洲專利案No. 85305604,2，刊物號:No 0173494, Morrison et al., 公告於1986年3月5日。

產製抗體用之免疫原可為含有CD40CR的任何來源。例如經活化之 T_h ，如經活化的人類 T_h 細胞可充作免疫原。另外，實質上經純化之CD40CR，依5.3所示製備，可予以使用。若以經活化之 T_h 為免疫原，可測試抗血清拮抗經活化的(非休眠的) T_h 細胞之反應性。

同時，免疫原可包括重組體gp39或其片段。在此方面，編碼鼠類及人類gp39之DNA's已被選殖，並以重組方法表現。這些蛋白質提供一個可產製抗-gp39抗體之潛在的免疫原。

五、發明說明 (13)

在本發明一個較佳具體實例中，可溶配體是抗-人類gp39單株抗體，又較好是人類化或嵌合體抗-人類gp39抗體。以下方法可用來產生MR1單株抗體，其可與gp39特異地結合，且可用來產生其他相對於CD40CR之抗體。

倉鼠以 $5 \cdot 10^6$ 經活化的 T_h1 細胞(D1.6)腹膜內免疫接種，以每週為間隔歷6週。當拮抗鼠類 T_h1 之血清效價大於約1:10,000，以聚乙二醇進行細胞融合，並使用免疫倉鼠脾細胞及NSI。以流動細胞計數在休眠的及活化的 T_h1 上篩選含有正成長之融合瘤孔洞中之SN。進一步測試一個特殊的融合瘤，其可產生可選擇性確認活化之 T_h 之mab，並繼代選殖以衍生MR1。MR1於腹水中產生，再以離子交換HPLC純化。

另外，且較好，可依美國專利案No. 08/475,847製備拮抗人類gp39之抗體，此案已本文列為參考。

本發明也提出含有單株抗體之配體，及其片段，其可競爭地抑制MR1與其標的抗原或CD40-Ig與其受體之結合。

CD40CR特徵在於(i)其可與CD40，含有至少一部份CD40之融合分子，及抗體如MR1結合之能力；(ii)其可刺激B-細胞循環入口，增殖，及分化之功能特性，及(iii)其細胞分佈。

CD40CR之特徵在於其與配體，如CD40，含有CD40之融合分子，及拮抗CD40CR之抗體結合之能力。

如下文所詳述，許多技術可用來鑑定CD40CR。例如，已示出CD40-Ig及MR1可確認相同的39kD分子。頃發現

五、發明說明 (14)

CD40-Ig及MR1均可自放射標記之 T_h 溶胞產物中免疫沉澱出39kD蛋白質(圖5b)。再者，以CD40-Ig免疫沉澱39kD蛋白質，可移去 T_h 溶胞產物中可為MR1確認之抗原。

CD40CR也可以其刺激B-細胞循環入口，增殖，及分化之能力而鑑定之。

例如，頃發現來自活化的(PM^{ACT})非休眠的(PM^{REST}) T_h 細胞之漿膜(PM)可誘導B-細胞RNA合成(圖1a)；此誘導作用可做為B細胞活化之指示，並不為抗體，如抗-LFA-1，抗-CD4，抗-ICAM-1所影響。然而，CD40-Ig或MR1可抑制 PM^{ACT} 誘生之B細胞活化作用，如圖1b及圖6所示。

B細胞活化作用之誘導也可利用以下技術偵測，如 $[^3H]$ -尿嘧啶納入RNA(如B細胞分化，RNA合成增加)，或 $[^3H]$ -胸苷之納入，其可偵測與細胞增殖有關之DNA合成。為使CD40CR在B細胞增殖之作用有最佳之偵測，間白素-4(IL-4)可以約10毫微克/毫升之濃度加至培養基中。

另外，B細胞活化作用可以免疫球蛋白分泌之功能予以偵測。例如，CD40CR，以實質上純化型式，或於PM中呈現，或另外型式，可與IL-4(10毫微克/毫升)及IL-5(5毫微克/毫升)一起加至休眠的B-細胞中。經過3天培養後，可加入額外量之培養基。於培養第6天時，可回收來自個別培養基之上清液，並如Noelle et al., J. Immunol., 146:1118-1124 (1991)所述地定量IgM及IgI。

CD40CR也可由其細胞分佈鑑定之。例如，可觀察到

五、發明說明 (15)

CD40-Ig可與經活化的，非休眠的 T_h1 結合，如流動細胞計數所評估的一般(圖3)。再者，CD40-Ig可結合至Jurkat細胞，HSB2細胞及活化的T-細胞(來自人類周邊血液)，但似乎不與CEM細胞，HPBALL細胞，或鼠類甲狀腺瘤細胞顯著地結合。

例如，但不予以限制，CD40CR在特定細胞型式上之存在("受試細胞")可如下以流動細胞計數評估。受試細胞可與休眠的(陰性對照組)及經活化的(陽性對照組) T_h 細胞平行測試。所有細胞均以約 1×10^5 細胞/50微升之濃度與配體(如CD40-Ig或MR1)在 4°C 下共培育20分鐘，再加上FITC-共軛之抗-配體抗體。可在所有樣品中加入碘化丙鎗，至終濃度2微克/毫升。再進行流動細胞計數分析，如在BD FACSCAN上進行。細胞經向前及側面分散之陽性限制，以及紅色的電負性(用於碘化丙鎗排阻作用)，可確認存活細胞之對數綠色螢光。

本發明提出實質上純化的CD40CR。此CD40CR可製備自攜有CD40CR之細胞，如活化之輔助T細胞，Jurkat及HSB2細胞，利用以下方法製備。

漿膜可製備自適合的細胞，如經純化之 T_h1 細胞，利用Noelle et al., J. Immunol. 146:1118-1124 (1991)所述之不連續蔗糖梯度沉降作用。再利用緩和去污劑解離粗製的膜萃取物可分離出CD40CR，再進行大小排阻層析，繼以親和力層析，利用結合至固相載劑之適合的配體(如MR1或CD40-Ig)，免疫沉澱(如利用CD40-Ig或MR1)及/

五、發明說明 (16)

或凝膠電泳。

所生成之蛋白質預期有約39 kD之分子量。

本發明提出一種可溶的CD40CR(即無細胞的)，其可與適合的載劑一起包含於醫學組合物中。此中進一步提出CD40CR，其連接至一個第二分子，其可為肽，蛋白質，脂質，碳水化合物，酵素，毒素，生長因子，淋巴激素，抗增殖劑，烷化劑，抗代謝藥，抗生素，長春生物鹼，鉍絡合之複合物，放射同位素，或螢光化合物。

本發明進一步提出實質上純化的CD40CR，其可利用化學合成或重組體DNA技術製備。例如，CD40CR之基因可由將製備自經活化的輔助T細胞之cDNA嵌入 λ gt10表現系中而分離，再以MR1或CD40-Ig結合來篩選，以鑑定CD40CR-表現純系。另外，製備自經活化的輔助T細胞之cDNA可轉感至COS細胞，其上清液再以MR1或CD40-Ig篩選以鑑定CD40CR產製者。再使用CD40CR之基因，利用技藝中已知之表現系來表現CD40CR。

本發明提出控制B-細胞活化之方法，其中利用可與CD40CR結合之配體。特言之，其提出抑制B-細胞活化之方法，此方法包括將B-細胞及T_H細胞之混合物，曝於有效濃度之可與CD40CR結合之配體上。可使用之配體述於上5.1段落中。本發明方法可於試管內或液體內實行。有效濃度指可抑制B-細胞活化之配體濃度，由技藝中已知之任何技術偵測(包括示於5.2者)，抑制至少約30%，且較好約75%。依據本發明較佳，特異且非限制性實例，CD40-Ig

五、發明說明(17)

可充作配體，此中有效濃度可至少約10微克/毫升。在另一特異且非限制的具體實例中，可使用單株抗體MR1，其中有效濃度可至少約10微克/毫升。若方法於活體內實行，配體之有效濃度可指配體之血漿濃度或局部濃度。例如，希望可在局部區域中抑制B-細胞活化作用，以限制整體在免疫系統上之作用。

在特殊具體實例中，本發明提出治療個體罹患與B-細胞活化有關之失調症之方法，此方法包括對個體投予治療有效劑量之可與CD40CR結合之配體。個體可為非人類，或較好是人類。

與B細胞活化有關之失調症包括如，過敏反應(包括過敏)；自體免疫狀況包括藥物誘生之狼瘡，全身性紅斑狼瘡，成人類風濕性關節炎，幼年型類風濕性關節炎，硬皮病，謝格連氏症候群；以及涉及有B細胞之病毒疾病，包括EB感染，及反轉錄病毒感染包括人類免疫缺失病毒之感染。

因為已建議B細胞活化與人類免疫缺失病毒自潛伏期複製之誘導作用有關，因此希望可對尚未發展AIDS或ARC之HIV陽性個體投予本發明之配體。

如上文所討論的，及實例中所述，抗gp39抗體或其片段之特佳應用包括可用於治療由藥物誘生之狼瘡，或全身性紅斑狼瘡。已發現，如基礎數據及實例中實驗所述，抗-gp39抗體療法可減少自體抗體之產製，及腎疾，而造成在NZB/NZW中延長之存活，此為人類SLE可接受之動物模式。

再者，在老鼠中已進一步示出可用於發展2-3⁺蛋白尿(活

五、發明說明 (18)

性狼瘡疾病狀況)，其中抗-gp39抗體之投予確實可反轉疾病(由投予抗體後存活延長且無蛋白尿可証知)。因此，在人類狼瘡可接受之動物模式中發展成腎病後，以抗-gp39抗體治療已示出可反轉狼瘡之過程。此証實了在治療狼瘡及其他自動免疫疾病時，抗-gp39抗體用於人類治療應用上之能力。特言之，其証實此抗體可用於治療具活躍地正在進行之疾病之個體，即使是在此疫之較進展之階段。此種療法可有效地治療，且潛在地甚至可反轉疾病過程，如常在有狼瘡病人中造成的腎傷害。

配體可在適合的藥用載劑中被投予，利用技藝中熟知之方法，包括靜脈內，腹膜內，皮下，鞘內，關節內或肌肉內注射，及口服，鼻內，眼內及經肛門投藥，且可包含在微球，脂質體及/或持續釋出之植入物內。

配體之治療有效劑量定義為，可顯著減少B-細胞活化作用或T細胞活化作用不良之臨床作用之劑量，且可依所使用之配體及所處理之狀況而定。若使用CD40-Ig，治療濃度在全身時(血漿濃度)或局部時可為約10微克/毫升。若使用MR1或另外的抗-gp39抗體，如人類化或嵌合的抗-人類gp39抗體或其片段，治療濃度在全身(血漿濃度)或局部可為約10微克/毫升。

在進一步的具體實例中，上述之方法可利用含有毒素或抗代謝藥之配體，如此T_h細胞可被殺死或損害，且B細胞活化作用可因為T_h細胞之破壞結果而有所增加。

本發明的配體也可用來標記經活化的T細胞，此技術可用

五、發明說明 (19)

於T細胞失調症之診斷中。至此，含有酵素，放射同位素，螢光化合物或其他可偵測之標幟之配體，可於試管內或活體內曝於T細胞下，且再定量結含量。

本發明之配體也可用來遞送物質，如生長因子，以活化T-細胞。

本發明提出控制B細胞活化之方法，此中利用如上文製備之CD40CR或含有CD40CR之分子。特言之，其提出促進B-細胞活化之方法，此方法包括將B細胞曝於有效濃度的CD40CR下。此方法可於活體內或試管內實行。有效濃度指可誘生B-細胞活化作用之受體濃度，可由技藝中已知之任何技術偵測，達至少約30%，在本發明特異且非受限之具體實例中，CD40CR濃度可為局部或全身之約10微克/毫升。

在特殊具體實例中，本發明提出治療個體罹患與減弱之體液免疫力有關之免疫缺失失調症之方法，此方法包括對個體投予治療有效劑量之CD40CR。個體可以是非人類，或較好是人類。

與減弱的體液免疫力有關之免疫缺失失調症包括，如因化學療法或放射療法所引起的後天免疫缺乏症，以及涉及有體液免疫力之遺傳失調症。

CD40CR可以在適合的藥用載劑中，以技藝中已知之任何方法投予，包括靜脈內，腹膜內，皮下，鞘內，關節內，或肌內注射，及口服，鼻內，眼內，及經肛門投藥，且可包含在微球，脂質體及/或持續釋出之植入物內。

五、發明說明 (20)

CD40CR之治療劑量可定義為，可增加至少約30%免疫球蛋白產製之含量。

在進一步具體實例中，CD40CR可共軛至毒素，且在可差別地破壞表現CD40之B-細胞之狀況下投予至個體。此狀況實例包括接受器官移植或罹患多發性骨髓瘤或另外的B-細胞惡疾，或自體免疫疾病之病人。

CD40CR也可用來標記表現CD40之B細胞，此技術可用於診斷B-細胞失調症。在此，連接至酵素，放射性同位素，螢光化合物或其他可偵測標幟之受體，可於液體內或試管內曝於B細胞下，再定量結合量。

CD40CR也可用來遞送分子，此中其係連接至B-細胞。

實例1

在活化之輔助T細胞上之新穎受體，CD40CR，可與

CD40結合且可轉導訊號以供B-細胞之同源活化

材料及方法

動物

使用雌的DBA/2J老鼠(Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)製備充填細胞以支持 T_h 純系之生長，且可用於製備休眠的B-細胞。

D1.6，一種I-A^d-受限之兔子Ig-特異的 T_h1 純系/kurt-Jones et al., J. Exp. Med., 166:1774-1787 (1987))得自 Worcester Massachusetts University, Dr. David Porker。D1.6在此稱為 T_h1 。

$T_h1(8 \times 10^6/\text{孔洞})$ 在塗佈有40微克/4微升之PBS/孔洞之

五、發明說明 (21)

群集式孔洞中(6個孔洞, Corning, NY)與抗-CD3共培育16小時, 如Noelle et al所述(J. Immunol., 146:1118-1124 (1991))。

由不連續蔗糖梯度沉降法製備血漿膜, 如Noelle et al., 所述(上文)。

休眠的脾B細胞在不連續Percoll梯度上以沉降法製備, 如Defranco et al., (J. Exp. Med. 155:1523 (1982))所述。分離自70-75%(1.087-1.097之密度)Percoll介面之細胞典型有>95% mIg⁺, 具有均勻且低度之幾乎向前之光線掃描, 且對Con A不反應。

以下的mabs以離子交換HPLC純化自老鼠之腹水, 其經過照射及骨髓重組: 抗-CD3:145-2C11 (Leo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:1374-1378 (1987); 抗- α , β :H57-597; 抗-CD4: GK1.5 (Wilde et al., J. Immunol., 131:2178-2183 (1983); 抗-ICAM:YN1/1.7.4 (Prieto et al., Eur. J. Immunol., 19:1551-1557 (1989)); 抗-LFA-1:FD 441.8 (Sarmiento et al., Immunol Rev. 68:135 (1982)); 及抗-兔子/倉鼠K鏈:RG-7(Springer, Hybrid, 1:257-273 (1982))。

CD40融合蛋白質之製備係以限制酶 Pst I(P) 及 Sau3A(S3) 水解含有編碼CD40抗原之cDNA之質體 (Stamenkovic and Seed., EMBO J., 8:1403-1410 (1989))。此P/S 3片段再繼代選殖至以P及 Bam H1(B) 水解之相同質體。如此可製備CD40 Δ , 其編碼自穿膜區上游

五、發明說明 (22)

經截斷之CD40蛋白質。編碼CD40 Δ 之DNA片段再繼代選殖至免疫球蛋白融合質體 (Aruffo et al., Cell, 61:1303-1313 (1990)) 利用 MluI 及 B 水解。CD40-Ig 融合蛋白質之產生係在 cos 細胞中轉感，並在蛋白質 A 管柱上純化，如 Aruffo et al 中所述 (Cell, 61:1303-1313 (1990))。

間白素 4 (IL4): 重組體老鼠 IL4 由 Drs. C. Maliszewski and K. Grabstein, Immunex Corporation, Seattle, WA 慷慨提供。

間白素 5 (IL5): 重組體老鼠 IL5 購自 R&D Research, Sarrento, CA。

3×10^4 休眠的 B-細胞培養在 A/2 微滴定孔洞中之 50 微升 cRPMI 中 (Costar, Cambridge, MA)。在這些孔洞中，加入 0.5 微克 T_h1 或 T_h2 膜蛋白。由 42-48 小時，孔洞追加以 $2.5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -尿苷 (New England Nuclear, Boston, MA)，回收，再以液體閃爍分光光度決定放射活性。結果以 cpm/培養物 $\pm$ s.d. 表示。

休眠的 B-細胞如上述般培養。在培養孔洞中，加入 0.5 微克的 T_h1 膜蛋白，IL4 (10 毫微克/毫升) 及 IL5 (5 毫微克/毫升)。在培養的第 3 天，加入額外的 50 微升 cRPMI。在培養的第 6 天，回收來自個別孔洞之 SN，再定量 IgM 及 IgG₁，如 Noelle et al. (J. Immunol., 146:1118-1124 (1991)) 所述。

4×10^4 休眠的 B-細胞培養在 A/2 微滴定孔洞之 50 微升

五、發明說明 (23)

cRPMI 中 (Costar, Cambridge, MA)。在這些孔洞中，加入 1×10^4 休眠的或活化的，經照射的 (500 雷) T_h1 及 IL4 (10 毫微克/毫升)。在培養的第 3 天，孔洞追加以 $1 \mu Ci$ 的 3H - 胸苷，如上述 (Noelle et al., (1991) J. Immunol. 146:1118-1124)。

倉鼠以 $5-10 \times 10^6$ 經活化的 T_h1 (D1.6) 腹膜內免疫接種，以每週為間隔共歷 6 週。當拮抗鼠類 T_h1 之血清效價大於 1:10,000，以聚乙二醇利用免疫倉鼠脾細胞及 NS1 進行細胞融合。自含有漸長融合瘤之孔洞中篩選 SN，在休眠的及活化的 T_h1 上進行流動細胞計數。其中一個特殊的融合瘤，其可產生可選擇性確認活化之 T_h 之 mab，進一步測試並繼代選殖以衍生 MR1。MR1 於腹水中產生並以離子交換 HPLC 純化。

回收休眠的及活化的 T_h (以抗-CD3 歷 16 小時)，並以 1×10^5 細胞/50 微升與融合蛋白質在 $4^\circ C$ 下培養 20 分鐘，繼以 FITC-共軛之山羊抗人類 (h) IgG (25 微克/毫升；Southern Biotechnology, Birmingham, AL)。在所有樣品中，加入碘化丙鎗，終濃度為 2 微克/毫升。在 BD FACSCAN 上進行流動細胞螢光光度分析。細胞經過向前及側面分散之陽性限制，以及紅色的電負性 (用於碘化丙鎗排阻作用)，可確認存活細胞之對數綠色螢光。為決定陽性細胞百分率及 MFI，至少要分析 5,000 個存活細胞。應用 FITC-共軛之 RG7 染 MR1，一種老鼠抗-大鼠/倉鼠 k 鍵 mab。

T_h1 是休眠的或以不溶的抗-CD3 活化 16 小時。來自休眠

五、發明說明 (24)

的及活化的 T_h 之蛋白質(20×10^6 /毫升)標記以 $1 \text{ mCi}[^3\text{S}]$ -甲硫胺酸/半胱胺酸，歷1小時，此時其以RPMI/10%FCS洗二次，細胞團塊再以萃取緩衝溶液溶解，如上述(Noelle et al., (1986) J. Immunol. 137:1718-1726)。經純化的抗體或融合蛋白質(1-10微克)加至 4°C 之500微升溶胞產物中(5×10^6 細胞當量)歷16小時。在此時，溶胞產物轉移至含有50微升緊填的蛋白質A-Sepharose試管中。成團塊之蛋白質A-Sepharose再懸浮，管子在 4°C 下培育1小時，並拌以攪拌。樣品再以高迫切度之洗滌緩衝溶液洗滌。成團塊之蛋白質A-Sepharose再懸浮於30微升SDS樣品緩衝溶液中，並在10%聚丙烯醯胺凝膠上進行。凝膠進行後，凝膠予以固定再進行螢光分析。

爲了定義可調介 PM^{ACT} 對B細胞循環入口誘導作用之細胞表面分子，在 PM^{ACT} 及B-細胞培養中加入 T_h 膜蛋白之mabs。 PM^{ACT} 誘導之B細胞RNA合成較 PM^{REST} 的多8倍(圖1a)。加入抗-LFA-1，抗-CD4，抗-ICAM-1單獨的，或組合，無法誘導 MP^{ACT} 對B細胞RNA之合成。

在人類系統中，已示出抗-CD40 mab可誘導B-細胞增殖作用(clark and Lane, (1991) Ann. Rev. Immunol, 9:97-127)由是意味CD40是B-細胞的重要啓動分子。爲了決定CD40是否涉及於 PM^{ACT} 對B細胞RNA合成之誘導中，在 PM^{ACT} 及B細胞培養物中加入人類CD40細胞外區域及人類IgG， F_C 部份之可溶性融合蛋白質(CD40-Ig)。可製備由 T_h1 及 T_h2 衍生之 PM^{ACT} ，並用來刺激B細胞之RNA合成

五、發明說明 (25)

。在培養物中加入CD40-Ig，可造成B細胞RNA合成依劑量之抑制作用，其由來自 T_h1 及 T_h2 之 PM^{ACT} 誘導可達約5微克/微升CD40-Ig。CD7E-Ig融合蛋白質(Damle and Aruffo, (1991) Proc. Natl. Acad. USA 88:6403-6407)即便使用達25微克/毫升也無作用。

為檢視CD40-Ig是否可抑制T-獨立活化劑對B細胞之活化作用，於是在LPs及CD40-Ig存在下培養B-細胞。於第2天，評估RNA之合成(圖1c)。CD40-Ig對於LPS抑制B細胞活化上無效力，然而可抑制B細胞對 PM^{ACT} 之反應。

於 PM^{ACT} ，IL4及IL-5存在下，B細胞可多株地分化產生Ig(Hodgkin et al., (1990), J. Immunol. 145:2025-2034; Noelle et al., (1991) J. Immunol. 146:1118-1124)。為評估在此過程中CD40傳訊之先決條件，於是在培養之初或在培養次日，即加入CD40-Ig。在培養之初加入CD40-Ig(圖2a)可抑制95%以上多種IgM及IgG₁之產製，此及與其不存在下之對照水平比較而言。相反的，在培養的第1及2天加入CD40-Ig對於IgM及IgG₁之產製少有(若有的話)抑制作用。這些數據顯示經過24小時後經由CD40之傳訊，對於B-細胞分化至Ig分泌不再必要。

迄今之數據顯示CD40涉及於 PM^{ACT} 對B細胞之活化作用中，進行研究以確定CD40也涉及於完整的，存活的，經活化的 T_h 對B細胞之活化作用中。 T_h1 以不溶的抗-CD3活化16小時，回收再照射之。經照射之 T_h1 於IL4存在下與B-細胞共培養，並在培養的第3天決定B-細胞之增殖作用。為達

五、發明說明 (26)

到 T_h1 對 B 細胞之增殖作用，外來的 IL4 來源是必要的，因為 T_h1 不會產生 IL4 (Noelle et al., (1989) J. Immunol, 143:1807-1814)。CD40-Ig 可抑制經照射的 T_h 以劑量一依賴方式誘導 B 細胞增殖作用，類似在 PM^{ACT} 中所觀察的 (圖 2b)。陰性的對照組，CD7E-Ig，並無可感知之作用。

為檢視經活化之 T_h1 是否可表現對 CD40 之結合蛋白質，休眠的及活化的 (16 小時) T_h1 以 CD40-Ig 或 CD7E-Ig 染色，繼以 FITC-抗-HiGg。CD40-Ig 之結合以流動細胞計數評估 (圖 3)。 T_h1 (以抗-CD3 活化 16 小時) 而非休眠的 T_h1 ，以 CD40-Ig 染色有 56% 陽性，但對照組 CD7E-Ig 則否。為鑑知 CD40-Ig 結合蛋白質， T_h1 蛋白質以 [^{35}S]-甲硫胺酸/半胱胺酸生合成標記之，蛋白質再以 CD40-Ig 或 CD7E-Ig 免疫沉澱。經免疫沉澱的蛋白質以 SDS-PAGE 螢光分析解析 (圖 4)。一個主帶具有 39kD 表現分子量，及一個低分子量帶，B2-微球蛋白。在 mab 不存在下，並未見主帶。39kd 帶也可自活化的 T_h 中免疫沉澱，其在載體上標以 ^{125}I ，証實 39kD 蛋白質是一種膜蛋白質。

與在經活化的及休眠的 T_h 上選擇性表現之抗原具特異性之 Mabs，被發展出來以鑑定負責 T_h 效應物期活性之 T_h 分子。此 mab 之一，MR1，可確認可在經活化 T_h1 上選擇性表現之抗原。為檢視 MR1 及 CD40-Ig 是否可確認相同分子，於是進行流動細胞計數及阻斷研究。CD40-Ig 及 MR1 可分別染 56% 及 61% 經活化的，非休眠的 T_h (圖 5a)。MR1，但非

五、發明說明 (27)

另一倉鼠抗-T細胞 mab，抗- α/β TCR，可以劑量一依賴方式阻斷CD40-Ig對經活化 T_h1 之染色。這些數據顯示，CD40-Ig及MR1可確認39kD T_h 蛋白質上重疊的或相同的表位。為進一步証明CD40-Ig及MR1可確認相同的分子，可經由自放射標記之 T_h 溶胞產物中免疫沉澱出蛋白質而鑑知可與MR1結合之抗原。CD40-Ig及MR1均可免疫沉澱出39kD蛋白質(圖1，5b)。最後，以CD40-Ig免疫沉澱39kD蛋白質可移去經活化 T_h 之放射標記之溶胞產物中為MR1所確認之抗原，如此支持了MR1抗原及CD40結合蛋白質是相同的此一論點。

以MR1進行功能研究以強調此mab是否可中和由 PM^{ACT} 所表現之活性。 PM^{ACT} 及B-細胞單獨培養，或在倉鼠mabs或CD40-Ig存在下。有二種倉鼠mabs，抗- α/β TCR及 α -CD3，無法抑制 PM^{ACT} 對休眠的B細胞之活化作用。相反的，MR1或CD40-Ig可抑制B細胞之活化作用(圖6)。

數據顯示，以mabs阻斷主要的 T_h 表面分子(LFA-1, CD4, ICAM-1, CD3, α , β TCR)無法阻礙經活化之 T_h 誘生B細胞循環入口之能力。相反的，CD40-Ig或與CD40結合蛋白特異之mab，均可以劑量一依賴方式阻斷 T_h -依賴之B細胞活化作用。再者，CD40結合蛋白質39kD蛋白質是相同的，其可在活化的而非休眠的 T_h 之膜上選擇性表現。CD40-Ig及與39kD CD40結合蛋白質特異的mab，均可阻斷 PM^{ACT} 對B細胞之活化作用。

雖然有許多膜蛋白涉及於 T_h -依賴之B-細胞傳訊中，但此

五、發明說明 (28)

中呈現的証據則使某些分子之貢獻被除去(LFA-1, CD4, CD3, α , β TCR, ICAM-1)且暗示CD40是 T_h 同源傳訊的B-細胞受體。數據顯示CD40-Ig及與CD40結合蛋白質特異的mab可抑制 T_h -依賴的B-細胞活化作用。

CD40之配體是一種39kD的蛋白質，其可在經活化的但非休眠的 T_h 上表現。生化研究顯示39kD蛋白質是一個單鏈分子，由電泳圖上之移動不受還原劑影響。依據在此研究中呈現之功能研究知，經活化的 T_h1 及 T_h2 均可表現39kD CD40結合蛋白質。此與顯示 T_h1 及 T_h2 均可誘生B-細胞循環入口之功能研究是一致的。在進一步鑑定39kD蛋白質之企圖中，編碼MW範圍在39kD之CD蛋白質之cDNA(Cd53, CD27及CD69)瞬時轉感至cos細胞內，再測試細胞之CD40-Ig結合性。經轉感的cos細胞，無一者可表現可結合CD40-Ig之蛋白質。因此懷疑39kD蛋白質非這些CD蛋白質之一。

關於 T_h 及B細胞間訊號轉導之生化基礎已被迴避。CD40充作T細胞訊號轉導分子之確認有助於集中注意力在已知偶合至CD40分子之特異生化路徑上。CD40經由其細胞外區域上存在有四個富含半胱胺酸之特徵，可知其為神經生長因子受體(NGFR)族中之一員。mab經由CD40傳訊已示出(Uckun et al., J. Biol. chem. 266:17478-17485 (1991))涉及酪胺酸激酶之活化，造成肌醇三磷酸鹽產製之增加1及至少4種不同的絲胺酸/蘇胺酸激酶之活化。依據由NGF受體族其他成員傳訊所得之資料，可期望在經活化之

五、發明說明(29)

T_h 及 B 間之交互作用可造成許多相同的生化過程。

於免疫螢光結合研究中，CD40Ig 融合蛋白質利用生物素-琥珀醯亞胺(Sigma)共軛至生物素。再利用二步驟染色進行流動細胞計數分析，此中使用藻紅蛋白(PE)-鍵抗生物素蛋白(Becton-Dickinson)並配合 Coulter Epics C 儀器。篩選多重 T 細胞株之個別結果示於下。咸發現，Jurkat 及 HSB2 細胞株可特異地結合至 CD40 Ig 融合蛋白質，而其他 T 細胞株包括 CEM，HPBALL 及鼠甲狀腺瘤則否(圖 7)。

實例 2

使用抗-gp39 抗體以治療或預防狼瘡

全身性紅斑狼瘡(SLE)是一種疾病，其特徵在於產生各樣的致病性自體抗體(Boumpas, Ann Int Med. 1995)，這些自體抗體造成傷害，或直接經由在正常細胞上表後之確認，或間接經由免疫複合物之形成，其貯置在正常組織中並可活化補體聯級。

至於正常抗體反應，目前自同系繁殖之老鼠株中之 SLE 及類一狼瘡疾病研究中已明瞭，即狼瘡 B 細胞自體抗體產製係以來自 CD4+T 輔助(T_h)細胞之合作為據。有一實例來自 SLE 典型鼠類模式之研究，NZB/NZW 老鼠之雌性後代，其罹患在許多方面和人類 SLE 相似之疾病，包括產生自體抗體及發展免疫複合物血管球性腎炎。以耗盡之抗-CD4 抗體治療這些老鼠，可預防且確實逆轉腎炎。不幸地自治療觀點而言，在人類自體免疫疾病中即使以抗-CD4 抗體短暫的治療嘗試，均會造成在某些例中引起此危急的淋巴球子集

五、發明說明 (30)

延長之耗盡。再者，抗-CD4抗體在如類風濕關節炎之疾病中之小的臨床嚐試方面，其效力是令人失望的。

較特異的免疫遏止目前是可行的，此乃因為已鑑知有許多的分子交互作用涉及於 T_h 細胞輔助中，使其可僅對準在可活躍地涉及於對抗體產製提供輔助的 T_h 細胞。一個實例是二次訊號，傳遞自 T_h 細胞上之CD28/CTLA4及B細胞上B7.1/B7.2間之交互作用。任一參與者之阻斷抗體，均可於試管內使T細胞反應不足。近來，由鼠類CTLA-4細胞外區域連接至鼠類Ig Cg2a鏈所組成之融合蛋白質示出可阻斷自體抗體之產製並延長壽命，此當給予NZB/NZW老鼠而言，即使其有在末期階段之疾病，推測是在接受治療之老鼠中會競爭性抑制B7.2與內源CTLA-4之結合。

實驗結果

吾等研究對4至10個月大之NZB/NZW老鼠SLE上投予抗-CD40L抗體之作用。抗-CD40L抗體治療可顯著地減低抗-DNA自體抗體之產製及腎病，並延長這些老鼠之存活，且不致誘生抗-抗體反應，或在經治療老鼠中造成體液免疫系表現的破壞。這些數據示於圖9。11個月大(經抗-抗D40L抗體-處理之老鼠，非未處理的或經HIg處理之老鼠，有60%是活的(圖9)。於抗-CD40L抗體治療後長期存活者之腎組織學檢查顯示口無病理學變化，且在腎小球中無顯著的免疫沉積現象。

所得的資料也建議，抗-CD40L抗體療法可克服免疫治療中與使用抗-淋巴球細胞一表面分子抗體有關的二個問題：抗

五、發明說明 (31)

-抗體反應之發展及治療後免疫遏止之延長。在吾等之研究中，就存活11天反應抗-CD40L抗體治療之老鼠而言，其並未發展出抗-抗體反應，在接受由另外種類衍生之抗體之動物中是幾乎不會變之現象。吾等推測這是由於抗-CD40L抗體預防其本身抗體之產製所致。在以相同的抗-CD40L抗體，MR-1處理正常老鼠之研究中，並未見抗-MR-1反應，由此推知在NZB/NZW老鼠中所觀察到的反應可代表限於自體免疫老鼠之特殊反應過度。在任一例子中，此觀察對於抗-人類CD40L抗體之治療應用具重要的意喻，因為抗體療法的此嚴重的併發症可因抗-CD40L抗體療法而阻止，特別是採用抗體之"人類化"版本。在吾等之研究中，確實發展出抗-抗-CD40抗體反應之老鼠，在其抗-DNA抗體產製成或存活上並不比對照老鼠來得好，由此推知不論什麼理由，由此老鼠子集所產生之抗體，並不為抗-CD40L抗體所預防。抗-抗-CD40L抗體之發展造成接下來投予之抗-CD40L抗體快速之清除，且因此失去治療效力。在支持此論點下，如以非特異的倉鼠IgG所治療之老鼠，可在非反應性抗-CD40L抗體處理之老鼠子集之腎小球內鑑知有倉鼠抗體之沉積，且非在抗-CD40L抗體-反應者中。此觀察和連續投予抗-CD40L抗體而在腎中可形成及沉澱之抗-抗-CD40L抗體免疫複合物符合，可能是惡化，而非預防，血管球性腎炎。

最後，一旦停止抗-CD40L抗體治療，則表現出抗-KLH抗體反應之能力在至多4個月後會恢復，其中抗體在體液免

五、發明說明 (32)

疫系之免疫遏止作用是可逆的，且因此抗-CD40L抗體治療適合人類治療應用。

在這些實驗中，NZB/NZW F1老鼠以200微克MR-1腹膜內處理，每週二次，由4-10個月大開始。同時，利用治療策略也可達成治療，增加劑量到250毫克MR-1，一週腹膜內注入三次，由4至10個月大開始。此劑量已用於類風濕性關節炎之以膠原蛋白誘導之模式中，並在經治療組老鼠中造成100%存活(Durie, Science, 1993)。利用此策略，NZB/NZW老鼠目前在11個月時有100%的存活率(圖10)，而二個對照組老鼠均在10個月時死亡。

已証實之狼瘡疾病之治療

雖然在NZB/NXW F1老鼠中以抗-gp39抗體預防SLE是令人感興趣的，但並不意味此抗體可治療性應用於正活躍進行之疾病狀態中。爲了決定以抗體治療是否可逆轉已証實之疾病，令一群老鼠發展2-3+蛋白尿(相當於100毫克/天至500毫克/天)，由尿計量方法決定。在此時，老鼠任意指定以不再治療或接受100微克/天MR-1。10個未處理老鼠在10個月大時全部死亡。相反的，10隻經MR-1處理之老鼠有5隻在11個月大時仍存活。此中3隻是健康且無蛋白尿。有趣的，此中有一隻老鼠雖然如此卻有高效價的抗-DNA抗體(表1)。5隻存活者中有2隻似乎是生病的，且有高效價的抗-DNA抗體及4+蛋白尿。

因此，項發現在發展成腎病後以MR-1治療可在某些老鼠中逆轉疾病。在吾等有反應老鼠中的發現，即以MR-1治療

五、發明說明 (33)

可逆轉蛋白尿，而非抗-DNA抗體之產製，進一步生成MR-1作用另一機制之可能性，非惡化T-依賴性抗體之產製。

同時，也示出以腫瘤壞死因子(TNF- α)治療NZB/NZW老鼠，可顯著地延緩腎炎之發展(Jacob, Science, 1988; Gordon, 1989)。令人感興趣的，在NZB/NZW F1老鼠中所觀察到的嚴重型腎炎，可部份歸因於來自NZW親代之顯性基因，其中指向H-2複合物。NZW老鼠TNF- α 水平有所減低，其符合TNF- α 基因中之多形性，其則位於H-2複合物之內。NZB/NZW F1老鼠也有顯著在水平的TNF- α 。再者，以抗-IL-10抗體治療NZB/NZW F1老鼠，可實質地延緩腎炎之發作並延長存活期。在接受治療老鼠中所見之有益作用似乎是由IL-10誘導之TNF- α 水平正面調控所調介，因為以抗-TNF- α 抗體共同治療可廢除抗-IL-10反應。

在一個初步實驗中，吾等也在投予MR-1前及後的每組各4隻老鼠中，以ELISA檢查TNF- α 之水平。水平示於表2。就蛋白尿之解析及抗-DNA抗體產製而言，僅對MR-1治療有所反應的老鼠可証明TNF- α 由2.16微微克/毫升治療前增加至35.01微微克/毫升治療後。這些數據可推知MR-1作用至少有一部份是經由NZB/NZW F1老鼠TNF- α 之增加所調介的。

再者，這些結果証實了抗-gp39抗體及其活性片段於治療人類狼瘡，即全身性紅斑狼瘡或藥物誘生之狼瘡，之利用性。特別地，這些抗體可用於活性，正在進行之狼瘡之治療性介入，而此類狼瘡常有的特徵是腎炎。此種抗體應

五、發明說明 (34)

可抑制疾病之進行，且可能甚至會逆轉此疾病過程。

表 1

治療後有 蛋白尿之 年齡(月)	MR1 治療期 (週)	治療後之 蛋白尿	緩解 (週)	以MR1 再治療	作用期 (週)
7	13	+4	N/A	N/A	-
-					
9	6	0	0	無	-
-					
6	6	0	12	無	-
-					
5	6	0	11	有	6 (0)
0					
8	1	死亡	-	-	-
-					
6	18	死亡	-	-	-
-					
6	6	0	9	有	3 (+4)
+4					
6	6	死亡	-	-	-
-					
7	5	死亡	-	-	-
6	2	死亡	-	-	-

(請先閱讀背面之注意事項再寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱 用於治療及/或改善狼瘡及狼瘡相關腎疾之抗-gp-39抗體)

本發明提出利用抗-gp39抗體或片段治療狼瘡之方法。此種治療法已示出可反轉疾病，且特別是與狼瘡有關之腎疾，即狼瘡個體之主要殺手。

英文發明摘要 (發明之名稱 : USE OF ANTI-gp-39 ANTIBODIES FOR TREATMENT AND/OR REVERSAL OF LUPUS AND LUPUS ASSOCIATED KIDNEY DISEASE)

A method of treating lupus using anti-gp39 antibodies or fragments is provided. Such treatment has been shown to reverse disease, and in particular lupus-associated kidney disease, the major killer of lupus subjects.

申請日期	88.6.28
案 號	8810532
類 別	A61K 38/17, 39/395

(以上各欄由本局填註)

88年7月6日 修正
補充

公告本

A4
C4

發明專利說明書 I224969

一、發明 名稱	中 文	用於治療及/或改善狼瘡及狼瘡相關腎疾之抗-gp-39抗體
	英 文	USE OF ANTI-gp-39 ANTIBODIES FOR TREATMENT AND/OR REVERSAL OF LUPUS AND LUPUS ASSOCIATED KIDNEY DISEASE
二、發明 人	姓 名	1. 魯道夫 J. 諾麗 2. 克里斯多夫 M. 伯恩斯
	國 籍	美國
三、申請人	住、居所	1. 美國新罕布夏州寇尼希市陸拉3路257號信箱 2. 美國新罕布夏州里米市河路114號
	姓 名 (名稱)	達特茅斯學院基金會
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國新罕布夏州哈諾維市
	代 表 人 姓 名	強 M. 卡佛拉

五、發明說明 (35)

表 2

老鼠 *	採樣年齡(月)	TNF- α (微微克/毫升)#
未治療	2	5.5
	9	3.1
MR-1 存活的	2	2.2
	9	35.0
MR-1 死亡的	2	0.0
	8	4.3

* 來自各治療群中的一隻老鼠

數值代表利用來自 Genzyme, Cambridge, MA 之 TNF- α ELISA 套組進行分析，所得二次結果之平均。

此中所示之各種刊物係以全文列為本案參考。

圖式簡單說明

圖 1 單株抗體及 CD40-Ig 對於 PM^{ACT} 誘生 B-細胞 RNA 合成上之作用。

圖 2 CD40-Ig 抑制之 B-細胞分化及增值作用。

圖 3 CD40-Ig 可偵測表現在經活化的，而非休眠的 T_h 上之分子。

圖 4 CD40-Ig 可免疫沉澱來自經活化 T_h1 溶胞產物之 39kD 蛋白質。

圖 5 與所誘生之 39 kd T_h 膜蛋白質特異的單株抗體 (mab)，可抑制 PM^{ACT} 對 B-細胞 RNA 合作之誘導作用。

圖 6 MR1 及 CD40-Ig 可確認表現在經活化之 T_h 上之相同分子。

圖 7 CD40-Ig 與人類細胞株之結合。

圖 8A CD40 cDNA 核苷酸序列。

圖 8B 可用來表現 CD40-Ig 之質體之圖解。

圖 9 由不同的經處理的 NZB/NZW F₁，老鼠群的產生之抗-(ss)DNA 抗體之效價。

圖 10 經處理 NZB/NZW F₁ 老鼠不同群之存活。

六、申請專利範圍

公告本

1. 一種造成腫瘤壞死因子-2(TNF- α)實質增加而治療個體狼瘡之醫藥組合物，其包括治療有效劑量之可與gp39特異結合之抗體。
2. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該狼瘡是全身性紅斑狼瘡。
3. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該狼瘡是藥物誘生之狼瘡。
4. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該抗體是人類化的抗-人類gp39抗體。
5. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該抗體是嵌合的抗-人類gp39抗體。
6. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其係採全身性投藥。
7. 根據申請專利範圍第6項之醫藥組合物，其係用於治療與狼瘡有關之腎疾。
8. 根據申請專利範圍第7項之醫藥組合物，其係經由減少蛋白尿而減輕及/或反轉該腎疾。
9. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中進一步含有腫瘤壞死因子。
10. 根據申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中含有由10微克/毫升至1000微克/毫升範圍之抗-gp39抗體。

93. 8. 10 修正
* 月 日
補充

圖 1A

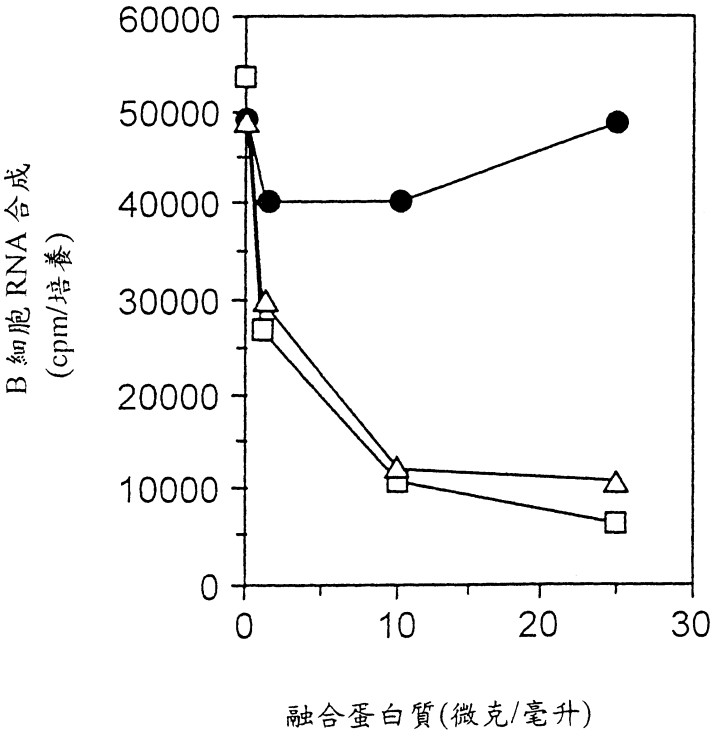
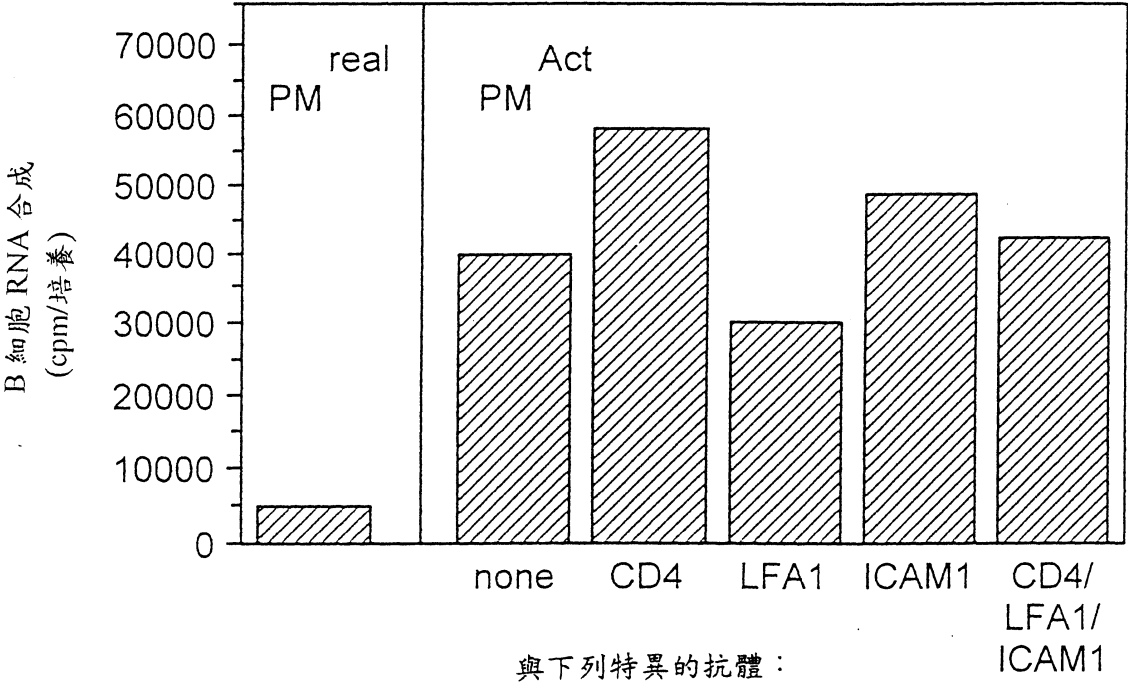


圖 1B

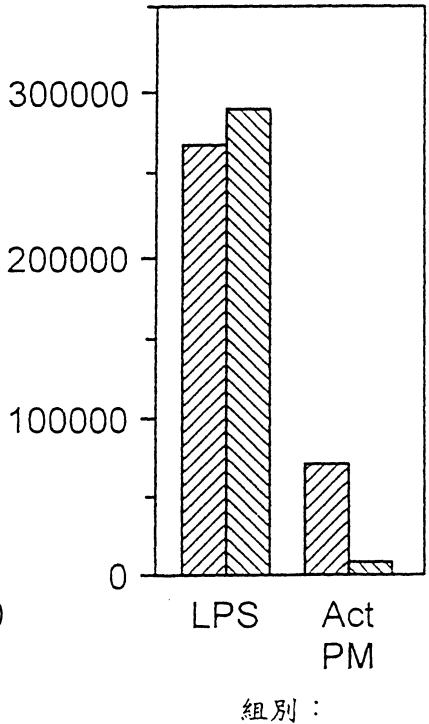


圖 1C

93. 8. 10 修正
* 月 日 補充

圖 2A

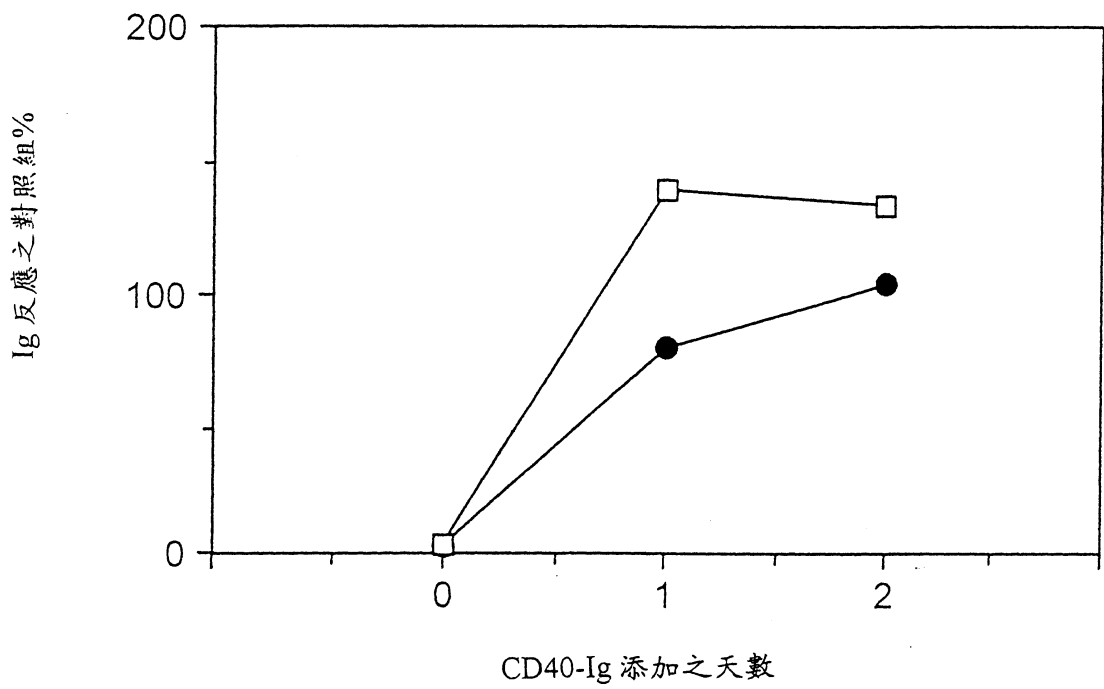


圖 2B

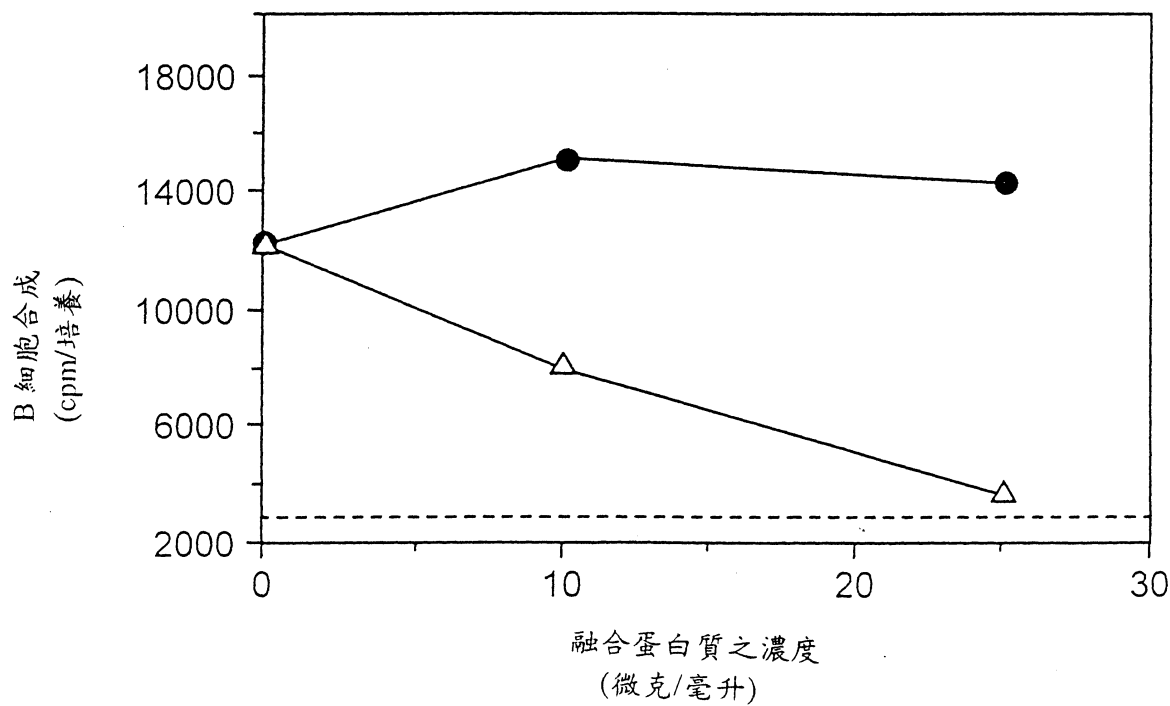


圖 3A

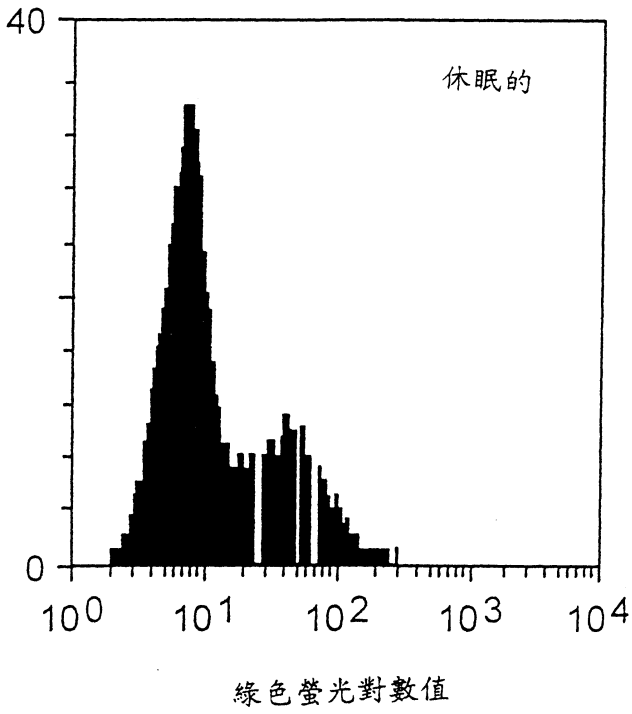
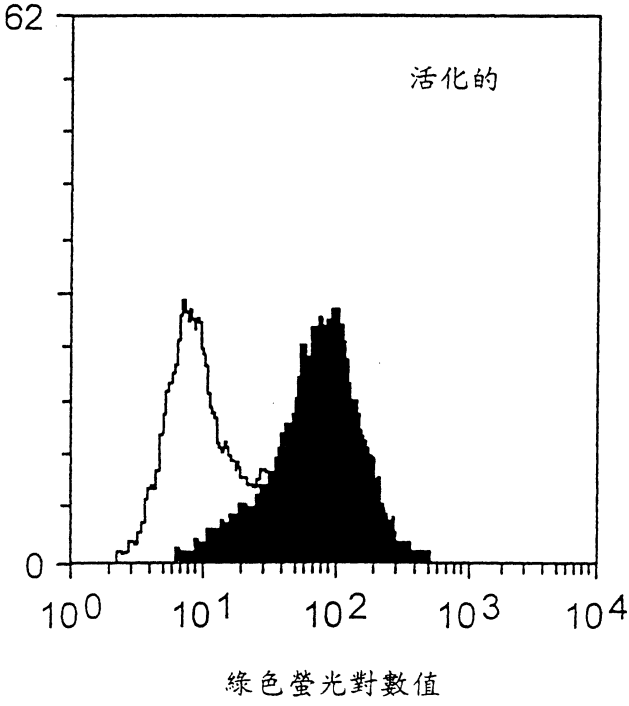


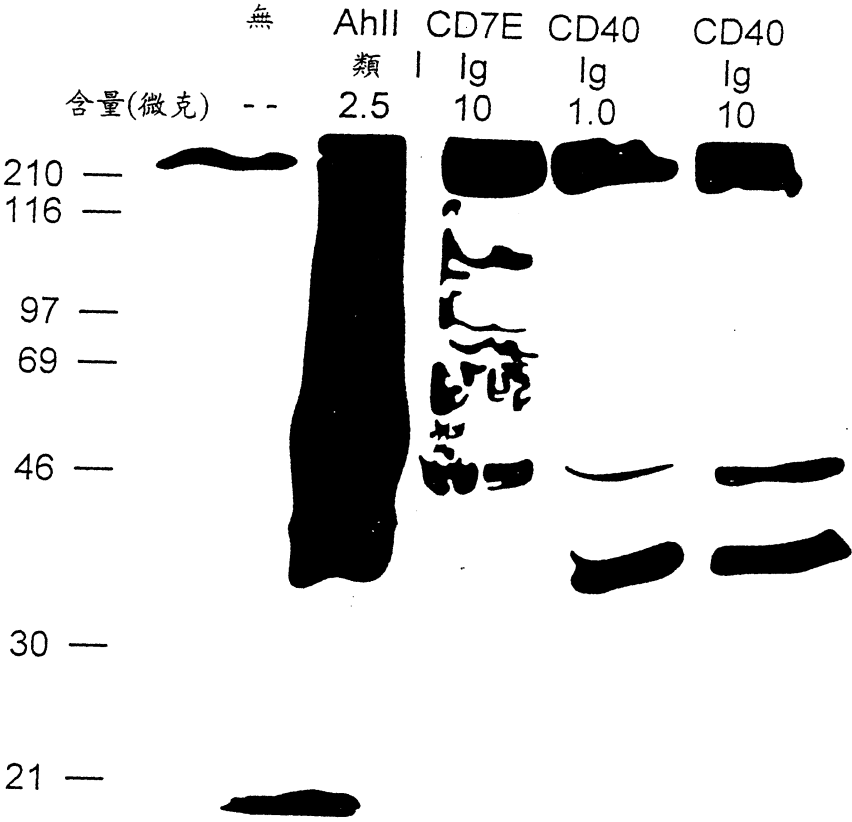
圖 3B



93. 8. 10
* 月 日

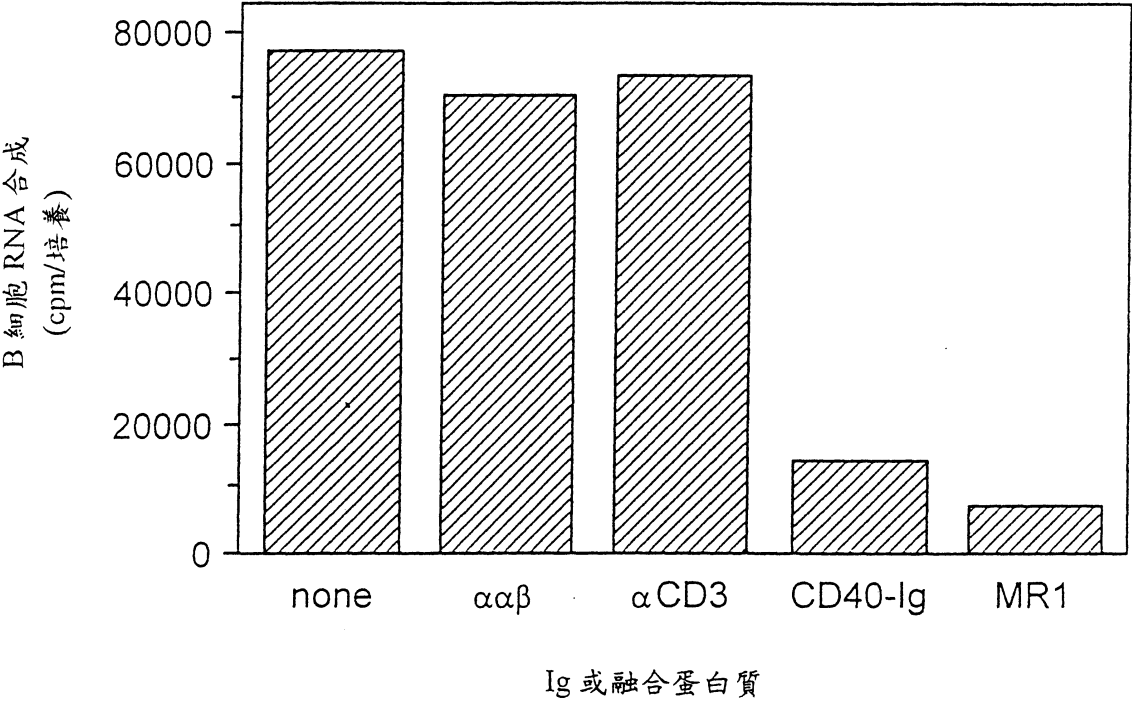
修正
補充

圖 4



93. 8. 10 修正
* 月 日
補充

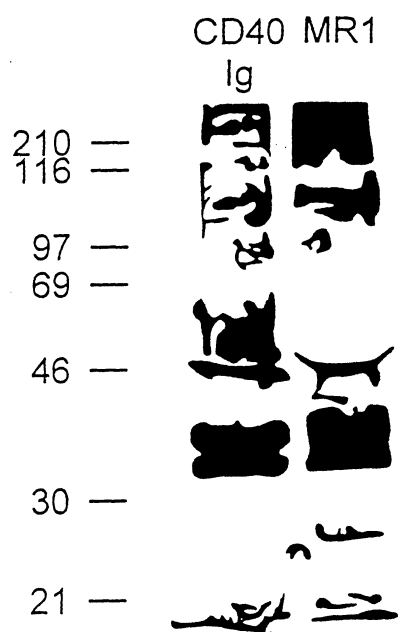
圖 5



93. 8. 10 修正
年 月 日 補充

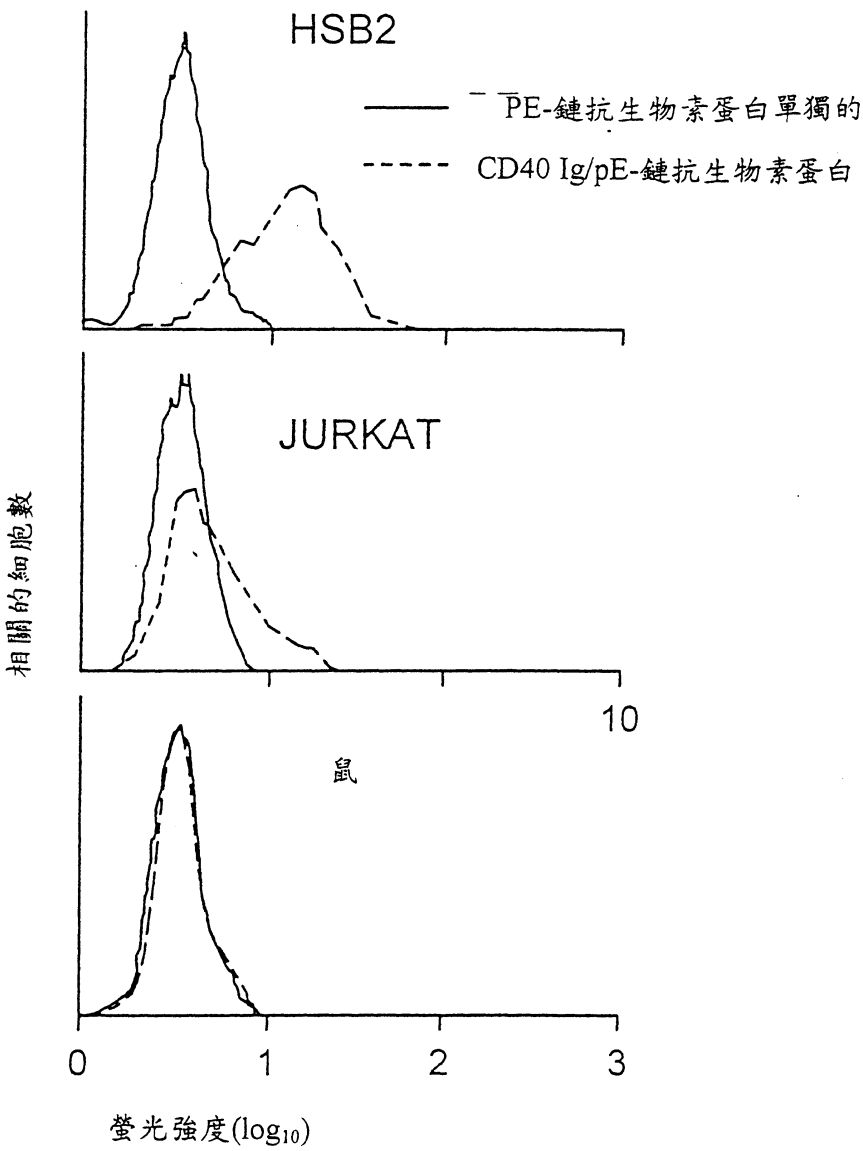
圖 6

染色 Ab 或融合蛋白質	阻斷 Ab	休眠 T_h	活化 T_h
CD40 (50 微克/毫升)	---	4.9	56.5
MRI (50 微克/毫升)	---	5.7	61.8
CD40 (50 微克/毫升)	MRI (50 微克/毫升)	5.0	11.7
CD40 (50 微克/毫升)	MRI (25 微克/毫升)	---	20.7
CD40 (50 微克/毫升)	MRI (10 微克/毫升)	---	30.3
CD40 (50 微克/毫升)	MRI (5 微克/毫升)	---	49.5
CD40 (50 微克/毫升)	α - α , β (50 微克/毫升)	---	63.0



93. 8. 10 修正
年 月 日 補充

圖 7



93. 8. 10 修正
★ 月 日 補充

```

gctcgtctcc cccccccagt ggtctgtccg cctgtgtctca cctcgcg atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctg ctc tgg
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp

ggc tgc ttg ctg acc gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta ata aac agt
Gly Gly Cys Leu Leu Thr Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser

cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc
Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys

ctt cct tgc tgc ggt gaa agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gaa aca cac tgc cac cag cac aaa tac tac tgc
Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys

gac ccc aac cta cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa
Asp Pro Asn Leu Leu Arg Val Gln Gln Lys Ser tca gaa aca gac acc Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu

ggc tgg cac tgt acg agt gag gac ggc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tgc ccc ggc ttt ggg gtc
Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Pro Gly Phe Gly Val

aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat atg gtc tca
Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser

tct gct ttc gaa aaa tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag gca ggc aca
Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr

aac aag act gat gtt gtg tgt ggt ccc cag gat cgg ctg aga gac gtc ctg gtg gtg atc ccc atc atc ttc ggg
Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly

atc ctg ttt gcc atc ctg ttg gtc ctg gtc ttc atc aaa aag gtc gcc aag aag cca acc aat aag gcc gcc
Ile Leu Phe Ala Ile Leu Leu Val Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn Lys Ala Pro

```

8A-1

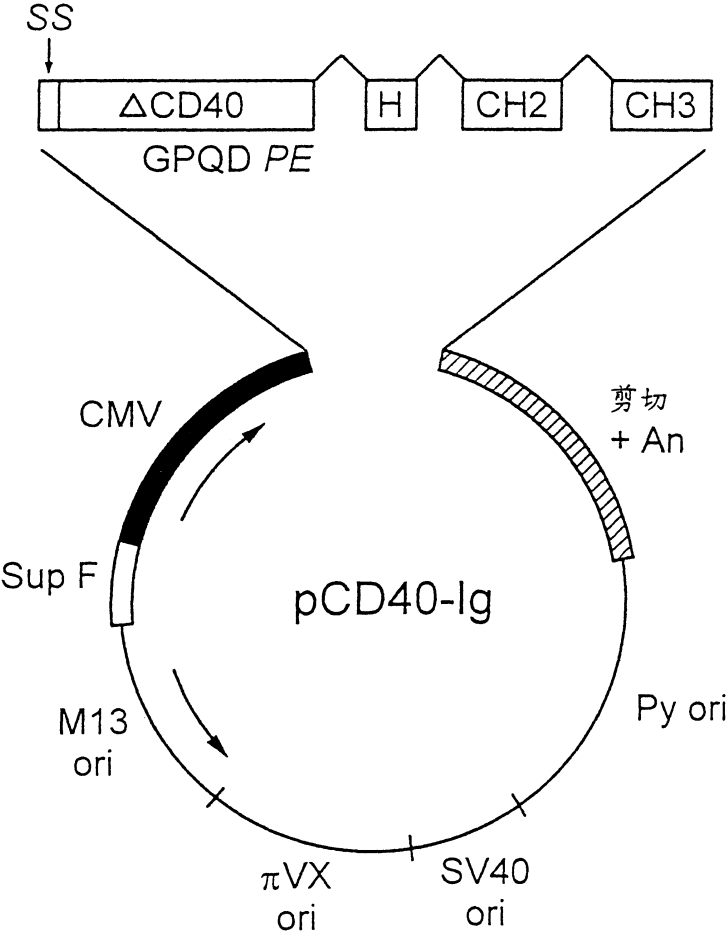
93. 8. 10 修正
* 月 日 補充

cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat tt ccc gac gat ctt cct ggc tcc aag act gct gct cca gtg
His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp Asp Leu Pro Gly Ser Lys Thr Ala Ala Pro Val
cag gag act tta cat gga tgc caa ccc gtc acc cag gag gat ggc aaa gag agt cgg atc tca gtc cag gag
Gln Glu Thr Leu His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser Val Gln Glu
aga cag tgaggctcca cccaaccagg agtgcacca cgtgggcaaa caggcagttc ccacacagacc ctggtgctgc tgcgtcaccc
Arg Gln
ctccacgcag aagcggccag ctatgccacg tcagtgccag cccctc

圖 8A-2

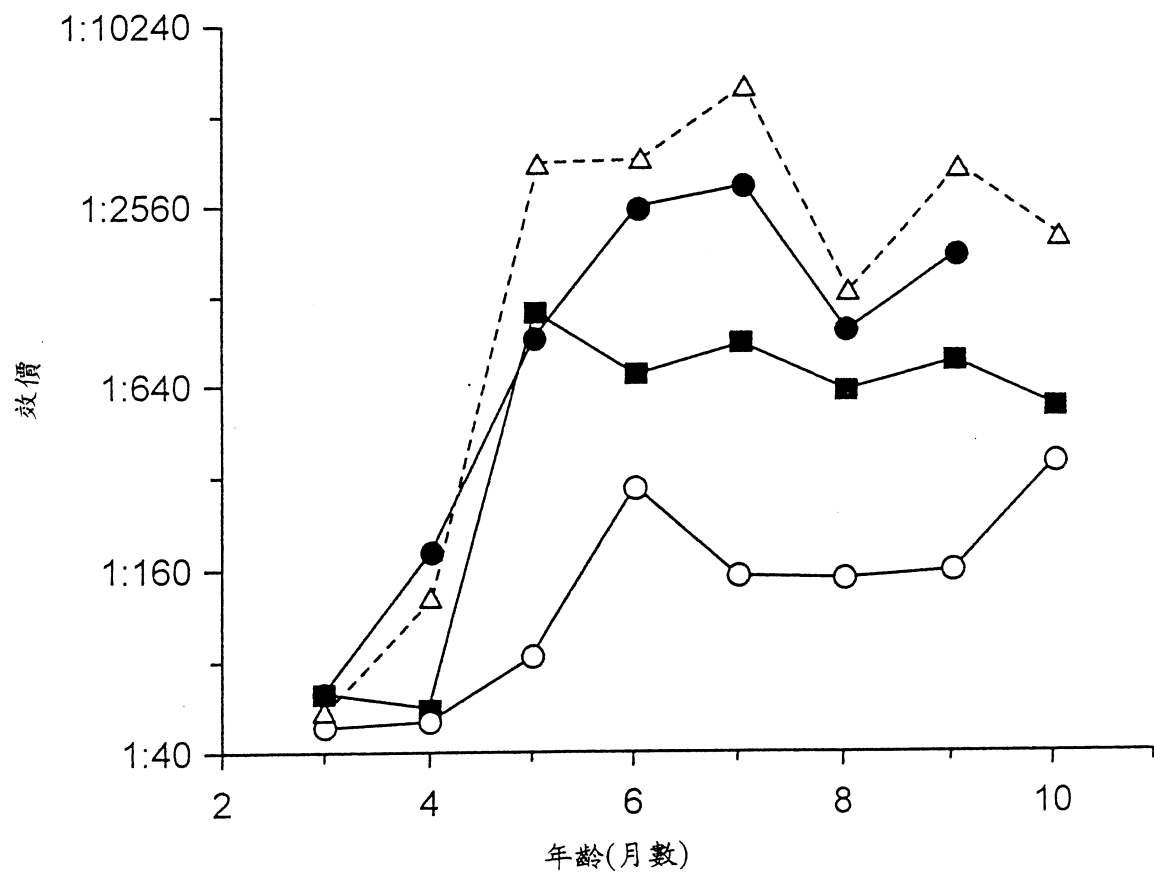
93. 8. 10 修正
* 月 日
補充

圖 8B



93. 8. 10 修正
* 月 日 補充

圖 9



93. 8. 10 修正
年 月 日
補充

圖 10

