

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷
C07K 16/28
A61K 38/17 A61K 39/395
A61P 37/06

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00804735.9

[43]公开日 2002 年 12 月 25 日

[11]公开号 CN 1387538A

[22]申请日 2000.1.14 [21]申请号 00804735.9
[30]优先权
[32]1999.1.15 [33]US [31]60/116,168
[86]国际申请 PCT/US00/01044 2000.1.14
[87]国际公布 WO00/42073 英 2000.7.20
[85]进入国家阶段日期 2001.9.7
[71]申请人 比奥根公司
地址 美国马萨诸塞州
[72]发明人 保罗·伦纳特

[74]专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 26 页 序列表 3 页
附图 5 页

[54]发明名称 针对 TWEAK 及 TWEAK 受体的拮抗剂
和它们在治疗免疫性疾病中的应用

[57]摘要
本发明涉及可修饰 TWEAK 活性的制剂和它们
作为治疗制剂在免疫性疾病的治疗中的应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 阻断动物中免疫性疾病的发生或处理或降低其严重程度或其影响的一种方法，其包括投放药物组合物的步骤，该药物组合物包括一种治疗有效量的 TWEAK 阻滞剂和可药用载体。

2. 一种抑制动物免疫应答的方法，此方法包括投放药物组合物的步骤，此药物组合物包括一种有效剂量的 TWEAK 阻滞剂和药学上有效的载体。

3. 依照权利要求 1 或 2 的方法，其中 TWEAK 阻滞剂从下列选择：

- (a)一种直接针对 TWEAK 配体的抗体；
- (b)一种直接针对 TWEAK 受体的抗体；
- (c)一种修饰 TWEAK 配体与受体结合的制剂；
- (d)一种修饰细胞表面受体聚集的制剂；和
- (e)一种能阻断 TWEAK 受体的细胞内信号传递的制剂；

4. 依照权利要求 1 或 2 的方法，其中所述动物为哺乳动物。

5. 依照权利要求 4 的方法，其中所述哺乳动物是人。

6. 依照权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 TWEAK 阻滞剂包括一种可溶性的 TWEAK 受体，它有一个能选择性地与表面 TWEAK 配体结合的配体结合区。

7. 权利要求 6 的方法，其中可溶性 TWEAK 受体包括人免疫球蛋白 IgG 区。

8. 权利要求 7 的方法，其中人免疫球蛋白 IgG 区包括负责特异性抗原结合的区域。

9. 依照权利要求 1 或 2 的方法，其中直接针对 TWEAK 受体的抗体包括单克隆抗体。

10. 依照权利要求 1 或 2 的方法，其中 TWEAK 阻滞剂包括直接针对 TWEAK 表面配体的单克隆抗体。

11. 依照权利要求 10 的方法，其中所述抗体直接针对 TWEAK 配体的一个亚单位。

12. 依照权利要求 2 的方法，其中免疫应答是 Th1 细胞介导的免疫应答。

13. 依照权利要求 2 的方法, 其中免疫应答是 Th2 细胞介导的免疫应答。

14. 依照权利要求 2 的方法, 其中免疫应答包括 Th1 和 Th2 细胞介导的免疫应答。

5 15. 依照权利要求 2 的方法, 其中 TWEAK 阻滞剂包括直接针对 TWEAK 受体的单克隆抗体。

16. 一种药物组合物, 其包括一种治疗有效量的 TWEAK 阻滞剂和可药用载体。

17. 依照权利要求 16 的组合物, 其中 TWEAK 阻滞剂从下列选择:

- 10 (a)一种直接针对 TWEAK 配体的抗体;
- (b)一种直接针对 TWEAK 受体的抗体;
- (c)一种修饰 TWEAK 配体与受体结合的制剂;
- (d)一种修饰细胞表面受体聚集的制剂; 和
- (e)一种能阻断 TWEAK 受体的细胞内信号传递的制剂。

15 18. 依照权利要求 16 的组合物, 其中 TWEAK 阻滞剂包括一种可溶性的 TWEAK 受体, 它有一个能选择性地与表面 TWEAK 配体结合的配体结合区。

19. 依照权利要求 18 的组合物, 其中可溶性 TWEAK 受体包括人免疫球蛋白 IgG 区, 该区中已插入了负责特异性抗原结合的区。

20 20. 权利要求 16 的组合物, 其中 TWEAK 阻滞剂包括直接针对 TWEAK 受体的单克隆抗体。

21. 依照权利要求 16 的组合物, 其中 TWEAK 阻滞剂包括直接针对 TWEAK 表面配体的单克隆抗体。

25 22. 依照权利要求 21 的组合物, 其中所述抗体直接针对 TWEAK 配体的一个亚单位。

针对 TWEAK 及 TWEAK 受体的拮抗剂
和它们在治疗免疫性疾病中的应用

5

发明领域

本发明涉及组合物和方法，其中包括结合新蛋白 TWEAK 的制剂，本发明还涉及 TWEAK 结合制剂在阻断免疫性疾病的发生(development)中的应用。TWEAK 结合制剂包括单克隆抗体，其在本发明中用于阻断慢性移植物抗宿主疾病的发生；可溶性 TWEAK-受体-Ig 融合蛋白或修饰 TWEAK 同其受体结合的其它分子。本发明的其它实施方案包括与 TWEAK 受体结合以修饰它们的活性或修饰它们的细胞内信号传导的制剂。

发明背景

15 免疫性疾病表现为多种疾病和病理状态，包括自身免疫病、急性和慢性炎症、器官移植排斥、移植物抗宿主疾病(GVHD)、淋巴细胞恶变、败血症和其它形式的休克、见于 HIV 和 SCIDS 中的免疫应答能力的丧失、和对肿瘤生长的免疫应答失败。

许多免疫性疾病由对抗原的异常或无控制的应答引起。自身免疫性疾病是由免疫系统对自身抗原不适当的反应造成的，结果导致细胞和组织的损害。当来自骨髓移植物(BMT)的供体细胞同宿主(即病人)的抗原发生反应时，GVHD 发生。当病人的免疫系统同来自移植器官的抗原反应时器官移植排斥发生。急性炎症反应例如超敏状态和休克是对激发抗原无控制的免疫应答的结果。

25 T 细胞依赖性免疫应答需要 T 细胞对抗原的识别。例如，GVHD 是由供体 T 细胞同宿主免疫细胞间复杂的相互作用所引起的。首先发生的是供体 T 细胞对非自身即宿主抗原的识别。这些抗原被称为同种异体抗原。供体细胞对同种异体抗原的识别导致免疫调节性和炎性细胞因子及趋化因子的产生，它们提高和加速供体抗宿主的免疫应答。这种疾病的发生可以是急性的或慢性的，这取决于控制免疫应答类型的细胞因子复杂网络的调节作用。免疫应答可被鉴定为 Th0、Th1 或 Th2，其依据 1) 免疫应答过程中活化 T 细

胞产生的细胞因子和趋化因子的性质 2) 免疫应答过程中辅助细胞和其它细胞产生的细胞因子和趋化因子的性质。免疫应答过程中重要的非 T 细胞是 B 细胞、树突细胞、单核细胞和巨噬细胞、滤泡树突细胞和内皮细胞。所产生的细胞因子共同影响多种细胞类型的分化；所产生的趋化因子影响细胞的游走和定位。Th0 应答的特点是此前未受过刺激的(初始的)T 细胞受到短暂的刺激。Th0 细胞产生中等量的多种细胞因子，其中，典型的是 IL-2 和 TNF。在多种因素作用下，Th0 细胞受到反复或慢性刺激后可分化成 Th1 或 Th2 细胞。这些因素包括但不限于辅助细胞细胞因子的产生、T 细胞受体的参与程度和接受的第二信号如通过 CD28 共刺激受体传递的信号的性质。具体地，活化 T 细胞同最初由活化巨噬细胞产生的 IL-12 的接触支持其向 Th1 细胞的分化，而同 IL-4 和 IL-10 的接触支持其向 Th2 细胞分化。

Th1 细胞产生与炎症反应、T 细胞细胞毒作用和巨噬细胞活化有关的细胞因子如 IL-2 和 IFN- γ 。Th1 T 细胞同吸引细胞进入组织炎症部位的趋化因子如 Mip-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、IP-10 和 MIG 反应。因为细胞毒性 T 细胞和活化巨噬细胞有清除损伤和感染的细胞的作用，所以 Th1 应答负责控制对细胞内病原体的免疫应答。重要的是，巨噬细胞和内皮细胞中象 IP10 和 MIG 这样的 Th1 趋化因子的产生受 IFN- γ 的密切调节，而 IFN- γ 即是 Th1 T 细胞产生的典型的趋化因子。这样，反馈环路便可在活化 T 细胞和它们的环境之间形成，反馈环路的形成促进了在特定时间和部位特定类型免疫应答的发生。

Th2 T 细胞产生细胞因子如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10，这些细胞因子有助于体液免疫应答的产生，包括需要 IgE、IgA 和 IgG 产生的体液免疫应答。这些 Ig 应答由 T 细胞介导的 B 细胞的活化引起，B 细胞的活化即是将 B 细胞的 Ig 表型由表面结合型 IgM 和 IgD “转换”成分泌型 Ig。正常情况下，分泌型 Ig 控制来自循环中的病原体的感染(IgG)、粘膜表面如肠道和口腔的感染(IgA)和呼吸道的感染(IgE)。Ig 的过量产生可导致疾病，如 SLE (IgG 和 IgA)、超敏反应(I 型)(IgE)和 GVHD(IgG、IgA 和 IgE)。Th2 T 细胞也有助于那些介导对病原体产生急性应答(如在呼吸道中)的嗜酸性粒细胞和肥大细胞的活化。Th2 T 细胞对趋化因子如 eotaxin 和 MDC 产生反应，这些趋化因子的产生受 IL-4 紧密调节，而 IL-4 是 NK1.1 和活化 T 细胞产生的典型的细胞因子。

T 细胞和 B 细胞的相互作用是一个复杂的和受到精密调节的过程。为了开始活化过程, B 细胞必须接受通过 B 细胞抗原受体(膜 Ig)传递的抗原信号。继而, B 细胞须接受来自活化 T 细胞的特异性接触依赖性和接触非依赖性信号。其中一种所需的接触依赖性信号通过 T 细胞表面 CD40L 和 B 细胞表面 CD40 的结合而传递;另一种所需的接触依赖性信号通过活化 T 细胞和 NK1.1 细胞分泌的 IL-4 同 B 细胞表面 IL-4 受体的结合而传递。这些信号似乎出现在二级淋巴器官如脾脏的 T 细胞区域。脾脏、淋巴结、扁桃体、Peyer's 淋巴集结和其它二级和三级淋巴器官中有明显的 T 细胞和 B 细胞定居的微解剖区。首先, 通过跨越内皮细胞层如淋巴结和 Peyer's 淋巴集结的高内皮小静脉和脾脏的边缘窦内皮细胞层, 所有的淋巴细胞从血液或淋巴液中游出, 进入这些器官的 T 细胞区域。然后, B 细胞运动到称为 B 细胞滤泡的 B 细胞区。穿越 T 细胞区后未活化 B 细胞几天后离开滤泡。活化 B 细胞经历一个分化的过程。一些称为浆细胞的活化 B 细胞分泌大量抗原特异性、低亲和力 IgM 或 IgG 抗体。这些 B 细胞通常在诱导免疫应答后的早期出现, 然后转移到脾脏的红髓和其它解剖学部位, 随后的几天它们在那里停留、分泌抗体。其它活化 B 细胞在被成为次级滤泡或生发中心的滤泡部位分化。生发中心在称为滤泡树突细胞(FDC)的特异性抗原滞留细胞的网络周围形成, 这些 FDC 提呈抗原以驱动或精神调节生发中心的反应。在生发中心中, B 细胞转换了它们的 Ig 表型并且经历了“亲和力成熟”的过程, 因此, 可对它们的抗原靶呈现很高的亲和力。尽管在某些疾病如慢性 GVHD 和自身免疫性疾病中 Ig 识别自身抗原, 但在正常情况下, 抗原靶是外来抗原。最后, B 细胞离开滤泡, 再次通过 T 细胞区, 通过输出循环离开此器官进入血流。

已完全分化因而表达高亲和力 Ig 的 B 细胞称为母细胞, 它们离开 B 细胞滤泡定居在其它各种环境中, 包括脾脏的红髓、骨髓、肝脏、或呼吸道和肠道的内壁粘膜层。这些完全分化的 B 细胞中有一部分称为记忆细胞, 它们能存活很长时间, 如果再次遇到相同抗原, 它们会迅速作出反应。

B 细胞在淋巴器官中从一个部位向另一部位迁移需要特异性信号指导它们和保证它们存活。例如, 脾脏中 B 细胞滤泡的组织需要多种信号。这些包括 BCA 配体与趋化因子 BLR-1 受体之间的相互作用、TNF 与 TNF-R55 之间的相互作用和 LT β 与 LT β -R 之间的相互作用(参见 Chaplin 和 Fu, 最新免疫学观点(Current Opin.Immunol.)10:298-297 (1998))。缺乏这些分子途

径中的任何一种的小鼠都将会丧失脾脏中 B 细胞滤泡的完整性。此外, 所有这些基因缺陷型小鼠也丧失了脾脏中经历生发中心反应的能力。对其它分子途径的阻断仅仅影响生发中心反应。如, CD40L 缺陷的小鼠保存了 B 细胞滤泡, 但生发中心未形成。生发中心环境中的 B 细胞需要通过 CD40 的信号维持存活、下调 IgM 和转换 Ig 的表达。

B 细胞不但在滤泡和生发中心中移动, 而且活化后离开滤泡, 移向身体的其它部位。在骨髓中能发现记忆 B 细胞, 并且, 表达 IgA 的 B 细胞特异地移向肠道和其它粘膜部位的细胞层。其它信号可能指导活化 T 细胞到达淋巴区室内和淋巴区室之间的特定部位。例如, 细胞毒性 T 细胞能迁移到感染或其它发现有抗原攻击的部位, 并且溶解它们的靶目标。指导不同微解剖部位之间 T 和 B 细胞的所有信号的一致性尚不为人知。但在二级淋巴器官和感染或炎症部位似乎有多种途径协调 T 和 B 细胞对抗原的应答。

GVHD 是抗原驱动免疫应答的很好的研究例证。GVHD 是人类患者骨髓移植(BMT)常见的致命后果。此疾病可为急性或慢性。GVHD 急性和慢性形式分别是抗原特异性 Th1 和 Th2 应答的典型实例。此疾病的急性形式发生在 BMT 后的最初二个月内, 以供体细胞毒 T 细胞介导的皮肤、肠道、肝脏和其它器官的损伤为其特点。此疾病的慢性形式出现较晚(BMT 后 100 天以上), 以免疫球蛋白(Ig)包括自身抗体的过量产生, 以及 Ig 沉积引起的皮肤、肾脏和其它器官的损伤为其特点。急性 GVHD 的产生可以预见其随后的慢性 GVHD 的发生。因而, 同一病人可先后产生这两种疾病。大约 50 % BMT 病人发生急性或慢性 GVHD。近 90 % 的急性 GVHD 病人发展为慢性 GVHD。目前对大多数病人中慢性 GVHD 的治疗方法都未获成功。

GVHD 可用亲代至 F1 代细胞移植方案构建小鼠模型。在此处描述的模型中, 将来自 DBA2 小鼠的脾细胞静脉注入称为 B6D2F1 的(DBA2xC57B1/6) F1 代小鼠体内。注入的脾细胞构成移植物, DBA2 是该移植物的供体。接受移植物的 F1 小鼠是宿主。移植物中的供体 T 细胞将宿主细胞上 MHC 标志物的一半(单体型)识别为异物, 因为它们来源于亲代 C57B1/6。这引发了供体 T 细胞对宿主的应答, 导致 GVHD 的发生。当 DBA/2 亲代脾细胞注入 B6D2F1 宿主体内时, 慢性 GVHD 发生。相反, 当 C57B1/6 脾细胞注入 B6D2F1 宿主体内时, 急性 GVHD 发生。尽管使用这两种注射方案引起不同疾病的内在机制尚不清楚, 但人们相信包含在 DBA/2 脾细胞移植物中的细胞表达的细胞

因子易于使慢性 GVHD 的发生；包含在 C57B1/6 脾细胞移植物中的细胞表达的细胞因子易于使急性 GVHD 的发生。干扰 T 细胞与抗原提呈细胞(树突细胞、巨噬细胞、B 细胞：APC)相互作用的制剂能有效地阻断急和慢性 GVHD。

- 5 多组证据提示急性 GVHD 是 Th1 介导的疾病(Krenger 和 Ferrara, 免疫学研究(Immunol. Res.)15:50-73(1996);Willianson 等,免疫学杂志 (J.Immunol.) 157L689-699(1996))。CD4+和 CD8+T 细胞、自然杀伤(NK)细胞、和活化粒细胞如巨噬细胞的细胞毒活性是 Th1 介导的 T 细胞应答的很明确的结果,并且呈现对 IL-2 和 IFN- γ 表达的特征性依赖, IL-2 和 IFN- γ 是典型的 Th1
- 10 细胞因子。这种细胞毒作用是急性 GVHD 的一个明确特征。此外,阻滞涉及 Th1 T 细胞分化的关键性细胞因子的制剂,如针对 IL-2 和 IL-12 的 mAb,可以阻断急性 GVHD 的发生。细胞毒作用可以直指细胞(如通过宿主细胞的吞噬作用)或者通过分泌的细胞因子如能导致凋亡或细胞死亡的 TNF 的作用来实现。供体抗宿主细胞毒作用的后果表现为多种形式。首先,宿主淋巴细胞
- 15 被迅速破坏,导致患急性 GVHD 的小鼠的深度免疫抑制。第二,供体淋巴细胞移入宿主脾脏中并扩增,而且它们的细胞毒作用可以在体外利用表达被供体细胞识别为异己的宿主抗原的细胞系直接检测。例如,表达合适抗原的细胞系可以用放射性镅 51 同位素标记。培养基中该放射性同位素的释放是被标记细胞死亡的证据。第三,当其它组织和细胞群也遭到破坏时,此疾病即
- 20 向危重演变,所以,是否存活是此疾病的可预测的后果。

- 慢性 GVHD 倾向于是 Th2 T 细胞介导的疾病 (De Wit 等,免疫学杂志 (J.Immunol.) 150:361-366(1993))。在小鼠模型中,此疾病的发生依赖于 Th2 细胞因子 IL-4,并且用抗 IL-4 的 mAb 处理能阻断其发生。这样处理也能阻断宿主 B 细胞的扩展和伴随的高 Ig 产生。GVHD 可以以多种方式随后出现。
- 25 供体 T 细胞和宿主 B 细胞群的扩展可以通过脾指数测定,脾指数是脾重与体重的比值,用对照(无疾病的)小鼠校准。疾病小鼠的 B 细胞活化可以利用对 B 细胞活化标志物的分析检测。最后, B 细胞活化效应可以通过循环中(即血清中)的 Ig 水平或诱导疾病的几周后收获的宿主脾细胞培养液中产生的 Ig 水平观察到。发病动物的循环 Ig 将包含抗自身的抗体。最终,发病动物由于累积的 Ig 沉积而导致肾脏和其它器官的衰竭,并因此使存活性成为疾病活动的相关指标。
- 30

在本发明中，我们用慢性 GVHD 小鼠模型展示了 TWEAK 特异性单克隆抗体能有效和特异地阻断 GVHD 的发生。在经过抗-TWEAK 治疗的动物体内，脾指数的降低、宿主 B 细胞活化标志物的丢失和 Ig 产量的下降提示慢性 GVHD 的发生受到阻断。

5

发明概述

本发明提供阻断动物体内免疫性疾病产生或处理或降低其严重程度或影响的方法，其包括投放包含治疗有效量的 TWEAK 阻滞剂和可药用载体的药物组合物。此组合物可以是直接针对 TWEAK 配体的抗体；直接针对 TWEAK 受体的抗体；修饰 TWEAK 受体与配体结合的制剂；修饰细胞表面受体集聚的制剂；能阻断 TWEAK 受体细胞内信号传导的制剂。在优选实施方案中，抗体是单克隆抗体。在更优选实施方案中，单克隆抗体直接针对 TWEAK 表面配体。使用的动物可以是哺乳动物和人。TWEAK 阻滞剂可以是可溶性的 TWEAK 受体，其有一个能选择性地与表面 TWEAK 配体相结合的配体结合区域。在一个实施方案中，可溶性 TWEAK 受体可以包括一种人免疫球蛋白 IgG 区。在一个优选实施方案中，人的免疫球蛋白 IgG 区包括特异性抗原结合区。

本发明进一步包括抑制动物体内免疫应答的方法，该方法包括投放包含治疗有效量的 TWEAK 阻滞剂和可药用载体的药物组合物。免疫应答可以是 Th1 或 Th2 介导的免疫应答或同时发生这两种免疫应答。

本发明也包括含有治疗有效量的 TWEAK 阻滞剂和可药用载体的组合物。

附图简述

图 1 显示可溶性重组小鼠和人 TWEAK 蛋白的序列对照。

图 2 显示对仓鼠抗 TWEAK mAb AB.D3 与表达小鼠 TWEAK 蛋白或人 TWEAK 蛋白的 EBNA293 细胞结合的荧光活化细胞筛选(FACS)分析结果，其与识别非相关蛋白(匙孔蛾血蓝蛋白，Keyhole Limpey Hemocyanin)的仓鼠 mAb 的结合作用比较。

图 3 显示对 mAb AB.D3 阻断 FLAG 标记的重组可溶性人 TWEAK 与 TWEAK 受体阳性细胞结合的作用的 FACS 分析结果。

图4显示用抗TWEAK mAb AB.D3、抗CD40L mAb MR1、对照mAb处理的或未经任何处理的慢性GVHD小鼠体内B细胞活化状态的FACS分析结果。

5

发明详述

定义

为了能完全理解此处描述的发明，进行以下详细说明。

本发明中术语“体液应答”和“细胞应答”是指动物对抗原的免疫应答，表现为动物产生针对抗原的抗体或对抗原产生细胞毒应答或两者兼有。

10 Th1类T辅助细胞对细胞应答的诱导是重要的，而Th2类T辅助细胞对高亲和力抗体的有效产生是重要的。

本发明中使用的术语“T辅助(Th)细胞”是T细胞的一个功能亚群，其辅助产生细胞毒性T细胞，并且与B细胞合作刺激抗体产生。T辅助细胞识别与MHC II类分子相结合的抗原，并且对效应细胞提供接触依赖和接触非
15 依赖性(细胞因子和趋化因子)信号。

术语“Th1”是T辅助细胞的一个亚类，其产生TNF、 γ 干扰素和IL-2(和其它细胞因子)，引发与细胞性(即非免疫球蛋白)应答有关的炎症反应。

20 术语“Th2”是T辅助细胞的一个亚类，其产生IL-4、IL-5、IL-6、IL-10和其它细胞因子，它们与针对免疫攻击的免疫球蛋白(体液)应答有关。

本发明中使用的术语“生发中心”是指抗原免疫后形成的二级B细胞滤泡。该组织学位点的出现与最佳记忆的产生、同种型转换、体细胞高变和因此的抗体应答的亲和力成熟有关。

25 术语“抗体产生细胞”是指获得来自Th细胞的接触依赖和接触非依赖信号并分泌免疫球蛋白IgM、IgG、IgA或IgE的B细胞。

术语抗体的“Fc区”是指抗体分子中包含铰链区、CH2和CH3区，但不包括抗原结合部位的部分。此术语也包括IgM或其它抗体同种型的等价区域。

30 术语“抗TWEAK抗体”是指能与TWEAK蛋白至少一个表位特异结合的任何抗体。

术语“抗TWEAK受体抗体”是指能与TWEAK受体至少一个表位特异结合的任何抗体。

术语“TWEAK受体信号传导”是指与TWEAK受体途径和其导致的下游反应有关的分子反应。

- 5 术语“TWEAK或TWEAK受体修饰剂”是指能修饰配体与TWEAK受体的结合、能修饰细胞表面TWEAK受体集聚或TWEAK受体信号传导、或能影响TWEAK受体细胞内信号传导中止方式的任何制剂。

10 术语“TWEAK配体”或“TWEAK蛋白”是指能与TWEAK受体特异性结合的TWEAK的任何单聚体、多聚体或异源多聚体复合物或它们的衍生物。

术语“实验对象”是指一种动物或来源于一种动物的一种或多种细胞。优选所述动物为哺乳动物。细胞可以是任何形式的，包括但不限于存留在组织中的细胞、细胞集聚物、永生化的细胞、转染或转化的细胞和来源于在物理(physically)和表型方面已改变了的动物的细胞。

15 **TWEAK配体**

TWEAK是近来发现的TNF蛋白家族成员(Chicheportiche等, 生物化学杂志(J.Biol.Chem.)51:32401-32410 (1997))。TNF蛋白家族成员与TNF受体(TNF-R)家族中蛋白的受体结合。TNF家族蛋白与它们的受体之间的作用影响免疫系统的许多功能。人们熟知的实例包括CD40L蛋白, 其结合CD40
20 受体从而促进B细胞分化成为抗体产生细胞(Grewal和Flavell, 免疫学研究16:57-70(1997)); 淋巴毒素- β 配体(LT- β), 其与淋巴毒素 β 受体结合, 通过调节滤泡树突细胞的分化状态影响体液免疫应答(Mackay和Browning, 自然395:26-27(1998)), 和OX40L, 其结合OX40受体以调节B细胞对T细胞信号的应答(Flynn等, 实验医学杂志188:297-304(1998))。
25 TNF/TNF-R家族中人们熟知的在免疫系统中起重要作用的其它配体/受体对包括TNF/TNF-R55、FasL/Fas和CD27/CD70。

至今人们只了解TWEAK生物学的部分内容。纯化的可溶性TWEAK蛋白可用于诱导一些肿瘤细胞系的分化和/或死亡。这些肿瘤细胞系包括HT29腺癌细胞(细胞通过凋亡过程死亡)、HeLa子宫颈癌细胞(形态学的改变)和
30 A375黑色素瘤细胞(抗增殖)。TWEAK还可诱导HT29和A375细胞系分泌趋化因子IL-8, 并且对成纤维细胞系WI-38也有相同作用(Chicheportiche

等, 生物化学杂志 51:32401-32410(1997))。另外, TWEAK 也可诱导多种正常内皮细胞系的增殖(Lynch 等, 干扰素细胞因子研究杂志(J. Interferon Cytokine Res.)18:A-46(1998))。

已有人描述了一种假定的 TWEAK 受体(Marsters 等, 当代生物学 5 (Curr.Biol.) 8:525-528 (1998))。此受体可称为 TRAMP、Apo3、WSL-1、DR-3、或 LARD, 是 TNF-R 家族的一个成员。TRAMP 的活化能通过参与级联反应依赖性细胞死亡信号传导途径或经由 NF-kB 信号途径的细胞活化诱导凋亡(Ashknazi 和 Dixit, 科学 281:1305-1308 (1998))。

TWEAK 在小鼠和人组织中广泛表达, 在其它组织例如心脏、大脑、肺、10 肝脏中、在二级淋巴器官如脾脏、淋巴结中和外周血淋巴细胞(PBMC)中已发现其信使 RNA(mRNA)。在免疫系统细胞发育地初级淋巴器官如胸腺、骨髓和胎肝脏中未见 TWEAK 表达。因此, TWEAK 在免疫系统中的作用可能表现在免疫应答方面而不是表现在免疫系统的发育方面。

蛋白配体和它们的受体之间的相互作用可通过许多特定的方式修饰。例如, 15 如, 特异识别配体的单克隆抗体可以通过识别结合部位或通过生理性干扰配体和受体之间的相互作用阻断或修饰配体和受体的结合。另一方面, 当多种配体对应一个受体时, 抗-配体 mAb 可通过影响它与其它配体的结合而影响受体的信号传导。已发现 B7 家族 CD28 配体的 mAb 存在这样复杂的作用 (Lenschow 等, 实验医学杂志 181:1145-1155 (1995))。在一种特定配体存在 20 多种受体的系统中, 抗-配体 mAb 可通过例如, 修饰与一种配体结合的受体, 而使与另一种受体结合的配体保持不变而发挥更复杂的效应。识别所述受体的 mAb 也可以用来修饰配体的结合, 或它们自身也可诱导或修饰受体的信号传导。因此, 抗-受体 mAb 可以用作拮抗剂或激动剂。用来在人或小鼠多系统中修饰 TNF/TNF-R 家族成员中配体/受体相互作用的 mAb 包括 25 特异性针对 TNF、CD40L、LT- β 、Fas-L 和 TR2/HVEM 的 mAb。MAb 可用来阻断免疫性疾病和其它疾病的发生或发展。例如, 抗-CD40L 可在系统性红斑狼疮(SLE)的治疗中应用, 以及用于控制器官移植失败。

把编码受体细胞外部分的序列克隆到编码人免疫球蛋白(Ig)重链的序列上, 然后在适当的细胞系中用适当的基因启动子表达此杂交基因, 也可以产生 30 配体/受体相互作用的有效抑制物。纯化的受体-Ig 融合蛋白在体内和体外可用于结合现有蛋白配体, 进而修饰该配体与天然的细胞结合的受体之间的

相互作用。修饰作用可通过多种机制产生，这与上述抗-配体 mAb 的情况相似。在小鼠或人的系统中修饰 TNF/TNF-R 家族成员的配体/受体相互作用的受体-Ig 融合蛋白有 TNF-R55-Ig、TNF-R75-Ig、LT β -R-Ig 和 OX40-Ig 等。受体-Ig 融合蛋白能用来阻断免疫性疾病或其它疾病的发生或发展。例如，TNF-R75-Ig 已用来治疗炎性 Bowel 病(IBD)。

在本发明中我们证实特异地结合小鼠和人 TWEAK 的 mAb 可阻断一种典型的抗原引发的免疫性疾病-移植物抗宿主疾病(GVHD)的发生。我们的发明预示 TWEAK 和 TWEAK 受体修饰剂在治疗外源抗原进入病人体内所导致的多种免疫性疾病，如骨髓或干细胞移植引起的 GVHD，和移植物排斥引起的器官移植失败中的应用。此发明进一步预示 TWEAK 和 TWEAK 受体修饰剂在治疗各种自身免疫性疾病中的应用，所述疾病如 SLE、特发性血小板减少性紫癜、Wegener's 肉芽肿病、结节性多动脉炎、视网膜葡萄膜炎、急性进行性新月形肾小球肾炎、类风湿性关节炎、多发性硬化症和溃疡性结肠炎等。其它预示的应用包括治疗急慢性炎症如过敏性炎症、哮喘、嗜酸性粒细胞增多症、Graves'病和 Chagas'病等。

材料和方法

小鼠 6 到 8 周龄的雌性 DBA/2、C57B1/6 小鼠和(DBA/2 $\times$ C57B1/6)的 F1 代杂交小鼠购自 Jackson 实验室(Bar Harbor,ME USA)，常规保护条件下圈养，根据惯例处理。

单克隆抗体 识别人和小鼠 TWEAK 蛋白的单克隆抗体在美国仓鼠体内用可溶性人 TWEAK 蛋白制成，可溶性人 TWEAK 蛋白是用杆状病毒制成并依照 Chicheportiche 等，生物化学杂志(J.Biol. Chem.)(1997) 51:32401-32410 所述纯化的。第一次免疫，每只仓鼠腹膜内注射在弗氏完全佐剂(CFA)中的 50 μ g TWEAK。随后的各次免疫(首次免疫后的 14、28、42 天)每只仓鼠腹膜内注射在弗氏不完全佐剂(IFA)中的 50 μ g TWEAK(14 和 28 天)或 33 μ g TWEAK。用不含佐剂的 100 μ g TWEAK 腹膜内注射进行脾细胞融合形成杂交瘤前的最后一次免疫。应用标准方法生成杂交瘤(Lerner,Yale, 耶鲁生物医学杂志 54:387-402(1981))。

产生抗鼠 CD40L mAb MR1 的杂交瘤(Noelle 等，美国国家科学院院报 89:6550-6554(1992))购自 ATCC(Rockville, MD USA)。产生抗-KLH mAb

Ha4/8 的杂交瘤从 Dr. Mendrick(人类基因组科学有限公司 Rockville, MD USA)获得。

Mab 活性的 ELISA 分析 抗人 TWEAK mAb 结合人和小鼠 TWEAK 的能力可以通过多种实验检测。抗人 TWEAK 的几种 mAb 在用 ELISA 检测法
5 进行最初的筛选时发现其也识别小鼠 TWEAK 蛋白。小鼠 TWEAK 蛋白用与 Chicheportiche 等, 生物化学杂志 51: 32401 - 32410(1997)中所述的人 TWEAK 蛋白生成的相同方法在杆状病毒中产生。用纯化的人和小鼠 TWEAK 蛋白包被 96 孔板, 检测各种仓鼠 mAb 与这些已固定的蛋白的结合能力。用过氧化物酶偶联的驴抗仓鼠 IgG(Jackson 免疫研究, West Grove, PA
10 USA)和相应依赖过氧化物酶的酶反应观察固定的 TWEAK 蛋白对仓鼠 mAb 的捕获。

Mab 活性的 FACS 分析 可溶性 TWEAK 蛋白可诱导 HT29 细胞的凋亡, 这提示这些细胞表达 TWEAK 受体(Chicheportiche 等, 生物化学杂志 51: 32401-32410 (1997))。检测纯化的 mAb(10 μ g/ml)对 FLAG 标记的鼠或人
15 TWEAK 与 HT29 细胞结合的阻断能力, 这通过生物素化的抗 FLAG 抗体、链亲和素 - 过氧化物酶和适当的酶底物来检测。

慢性 GVHD 的诱导 将 6 到 8 周龄的 DBA/2 和 B6D2F1 雌性小鼠处死, 用无菌技术取脾。将该器官在干燥的玻片之间轻轻研磨, 使大块组织碎片沉降, 制备成单个细胞悬液, 然后沉淀已澄清的上清液。将此细胞沉淀重新悬浮在 Gey's 缓冲的高渗溶液中, 再冰浴 3 分钟溶解红细胞。每个被粉碎的脾脏加 5ml Gey's 液。重新沉淀细胞溶液, 将其重新悬浮在无菌、无致热原的 PBS 中, 再次沉淀, 并重悬于无菌、无热原质的 PBS 中。用血球计数器测定细胞数量, 调细胞密度至 2×10^8 /ml。使该溶液滤过 70 μ m 的细胞滤器, 将其保存在冰上直至使用。6 - 8 周龄的 B6D2F1 雌性小鼠用作接受者。
20 给每个接受者尾静脉注射 500μ l(1×10^8)细胞。实验组接受 DBA/2 移植物 (DBA/2>F1); 对照动物组接受 B6D2F1 移植物(F1>F1)。注射的 14 天后检测动物的慢性 GVHD 的产生。

对慢性 GVHD 的阻断 小鼠接受抗 TWEAK mAb AB.D3、抗 CD40L mAb MR1、对照 mAb Ha4/8 的处理或不接受任何处理。治疗的时间安排是:
30 移植物注射之 4 小时前以及之后的 2、4 和 6 天每次腹膜内注射 mAb 250 μ g。

对疾病发生情况的检测 实验的第 14 天, 处死小鼠并称重。然后无菌技术取脾并称重。依照脾重比体重的比值计算对照 F1>F1 组每个动物的脾指数, 计算后取一个均值。其它组的平均脾指数用对照值校正。依照前述方法分离这些脾脏中的脾细胞, 在无菌 PBS 中稀释到 1×10^7 细胞/ml 的浓度。染色 100 μ l 细胞的下列细胞表面标志以便 FACS 分析。所述所有 mAb 均购自 Pharmingen (San Diego, CA. USA)。链亲和素试剂购自南方生物技术公司 (Birmingham, AL., USA)。脾细胞用生物素化抗-H-2K^b 染色, H-2K^b 是区别供体细胞(H-2K^b)和宿主细胞(H-2K^{b+})的一种单体型标志, 它通过与直接偶联的 FITC 或 PE 标记的抗-CD4、抗-CD8、抗-B220、抗-CD69、抗-I-A^d、抗-L-选择素、抗-H2D^d在包含阻断Fc受体非特异结合的 10 μ g/ml FcBlocktm (Pharmingen)的 PBS/0.5%牛血清白蛋白(BSA)/0.1% 叠氮钠(FACS 缓冲液)中的不同组合来实施所述区别。将细胞与 mAb 在冰上孵育 1 小时。然后将每个标本重悬在 2ml FACS 缓冲液中, 洗涤, 离心以沉淀细胞。将细胞重新悬浮在包含 CyChrome 标记的链亲和素的 FACS 缓冲液中, 其中链亲和素与生物素化的 mAb 结合而为 FACS 分析提供第三条途径。最后一次洗涤后, 用 FACS 扫描仪和 Cellquest 软件(Becton Dickenson, San Jose, CA. USA)分析。

使细胞沉淀, 将其以 1×10^7 细胞/ml 的浓度重新悬浮在包含 10%胎牛血清(FBS)/4mM 谷氨酰胺的 DMEM 中, 进行 Ig 分泌的体外分析。6 孔培养板中每孔加入 1 ml, 24 小时后收集细胞上清液。

20 抗-TWEAK 抗体的来源 在本发明的一个实施方案中, 直接针对 TWEAK 的抗体(Ab)行使 TWEAK 阻滞剂的功能。可针对 TWEAK 蛋白可能的单体型、双体型或三体型产生 Ab, 而不管它们是否包含异源亚单位。此外, 可以针对 TWEAK 蛋白的可溶型、突变型、改变型或嵌合形式产生 Ab。此发明中的抗-TWEAK Ab 可以是多克隆或单克隆的(mAb), 也可以通过修饰使它们阻断 TWEAK 与其受体结合的能力、它们的体内生物可利用性、稳定性或其它所需最优选。

直接针对 TWEAK 的多克隆抗体血清可以通过常规技术制备, 包括用完全弗氏佐剂(CFA)中的人 TWEAK 皮下注射动物如山羊、兔子、大鼠、仓鼠或小鼠, 然后, 使用不完全佐剂(IFA)腹膜内或皮下加强注射。用常规免疫学方法筛选含有直接针对 TWEAK 的所需 Ab 的多克隆抗血清。

用常规方法制备直接针对人 TWEAK 的仓鼠单克隆抗体(mAb)，即用 CFA 中的重组可溶性人 TWEAK 皮下注射亚美尼亚(armenian)仓鼠，然后，用 IFA 中的重组可溶性人 TWEAK 腹膜内或皮下加强注射。根据布达佩斯条约的规定，将产生仓鼠抗 TWEAK mAb AB.D3 的杂交瘤细胞系(AB.D3.7.2.) 5 存放在美国典型培养物保藏中心(ATCC)(Rockville,MD)，保藏号为_____。一旦该申请被授予专利，对公众获得上述 ATCC 保藏物的所有限制永远取消。

各种形式的抗 TWEAK Ab 也可以通过常规 DNA 重组技术制备(Winter 和 Milstein, 自然 349, 293-99 (1991))。例如，“嵌合”抗体可通过动物抗 10 体的抗原结合区与人抗体的恒定区的连接而构建(Cabilly 等, US 4,816,567; Morrison 等, 美国国家科学院院报 81, 6851-55 (1984))。当嵌合 Ab 用于人体的临床治疗时，可以降低动物 Ab 引发的可观察到的免疫应答。

另外，识别 TWEAK 的重组“人源化抗体”可以人工合成。人源化 Ab 是主要包含人 IgG 序列的嵌合体，其中已插入特异性抗原结合区(WO 15 94/04679)。用所需抗原免疫动物，分离相应的 Ab，再去除可变区序列中与抗原特异结合的部分。任何将动物源抗原结合区克隆到人的抗体基因中已删除抗原结合区的相应部位。人源化 Ab 使人类抗体中异源(种间)序列的使用最小化，并减少受治疗者中激发免疫应答的可能性。

不同类别的重组抗-TWEAK Ab 的构建，也能通过制造含抗 TWEAK 20 可变区与分离自不同类免疫球蛋白的人的恒定区(CH1、CH2、CH3)的嵌合或人源化 Ab 来完成。例如，抗原结合价提高了的抗-TWEAK IgM Ab 也可以重组产生，其方式是将抗原结合位点克隆到携有人 IgM 重链恒定区的载体上(Arulanandam 等, 实验医学杂志 177, 1439-50 (1993); Lane 等, 欧洲免疫学杂志 22, 2573-78 (1993); Traunecker 等, 自然 339, 68-70 (1989))。

25 除此之外，标准重组 DNA 技术可以通过改变抗原结合位点邻近区的氨基酸残基来改变重组 Ab 与它们的抗原的亲和力。人源化 Ab 的抗原结合亲和力可通过基于分子模型的诱变提高(Queen 等, 美国国家科学院院报 86, 10029-33 (1989); WO 94/04679)。

有可能根据靶向的组织类型或预想的具体治疗方案提高或降低抗 30 TWEAK Ab 对 TWEAK 的亲和力。例如，通过使病人抗 TWEAK Ab 的水平

保持不变，而修饰 TWEAK 途径的能力下降，将有利于进行半预防性治疗。同样，对 TWEAK 的亲合力提高的 TWEAK Ab 有利于短期治疗。

仓鼠抗人 TWEAK 单克隆抗体的产生举例说明于实施例 1。

抗 TWEAK mAb 在阻断慢性 GVHD(一种由抗原引起的免疫性疾病)的发生中的应用。我们现在显示，在小鼠慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)模型中 TWEAK 阻滞剂 mAb AB.D3 对免疫应答的發生的作用。对慢性 GVHD 的阻断能力包括对 B 细胞活化和增殖的作用，和对分泌型 IgG 产生的作用。小鼠用 250 μ g 抗 TWEAK mAb AB.D3、抗-KLH 对照 mAb Ha4/8 或抗-CD40L mAb MR1 进行腹膜内(ip)注射，或不作任何处理。4 小时后，给小鼠静脉注射(iv) 0.5ml 1×10^8 个自 DBA/2 中分离的脾细胞。静脉注射的 DBA/2 脾细胞构成同种异体移植物。给予移植物的 2、4 和 6 天后，小鼠再次用 250 μ g 抗 TWEAK mAb AB.D3、抗-KLH 对照 mAb Ha4/8 或抗-CD40L mAb MR1 处理。对照组小鼠接受 1×10^8 个不能在 B6D2F1 接受者体内引起疾病的 B6D2F1 脾细胞。另外，未接受移植物或未接受处理的 B6D2F1 小鼠用作对照。给予移植物的 14 天后，处死小鼠，检查疾病的证据。

未经处理的接受移植物的小鼠的表现能提示发生了慢性 GVHD 的各种症状。脾增大是供体 T 细胞和宿主 B 细胞活化，并且，正经历多克隆扩增，伴随细胞数量的显著增加的证据。在 B 细胞亚群上出现表面蛋白如 CD69 提示 B 细胞的活化。CD4⁺和 CD8⁺T 细胞失去 L-选择素分子表示 T 细胞活化。Ig 分子如 IgG 类、IgA 和 IgE 分泌到血清中或体外细胞培养液中提示 B 细胞已经活化，并且已进行了 Ig 类别转换。鉴于此，血清中或体外细胞培养液中抗自身 Ig 的出现提示正在生成的 Ig 对自身抗原存在不适当的识别作用。最后，检测抗体存活可判断不同治疗效果。

在脾增大、B 细胞活化和 GVHD 期间 Ig 的分泌方面我们对对照小鼠和未经处理的接受同种异体移植物的 小鼠进行了比较。抗 CD40L mAb MR1 在这些实验中被用作阳性对照，因为以前已有实验证明，阻滞 CD40L/CD40 之间的相互作用是一种有效的干扰慢性 GVHD 发生的方式(Durie 等，临床杂志 94:1333-1338(1994))。针对匙孔蛾血蓝蛋白(KHL)的仓鼠 mAb Ha4/8 作为阴性处理对照。两个实验的结果显示在表 2 中。在两个实验中，用抗-TWEAK mAb AB.D3 进行的处理可降低脾肿大程度约 33%(与未经处理的同种异体移植物接受者相化)。用阴性对照 mAb Ha4/8 处理无效果，但用抗

CD40L mAb MR1 处理可阻断脾肿大近 70%。为研究抗 TWEAK mAb AB.D3 处理对细胞群体的影响,对注射移植物 14 天后的受体小鼠的脾细胞进行 FACS 分析。从每组小鼠中取 3-4 个小鼠的脾细胞进行分离和汇集。受体 B 细胞的活化是慢性 GVHD 的确定特征。在未治疗组和对照 mAb 治疗组的小鼠中,一小部分但可观察到的 B200+B 细胞表达活化标志物 CD69(图 4 和表 3)。相反,在 MR1 或 AB.D3 治疗的小鼠中确无 B200+B 细胞表达 CD69。在 AB.D3 小鼠脾脏中,未检测到 B 细胞活化可能是因为几种作用机制中的一种或一种以上在起作用,包括 T 细胞的活化失败、B 细胞活化失败或细胞死亡(凋亡)。其次,我们检测不同处理组中小鼠脾细胞培养液中 IgG 的总量,以判断 B 细胞群 CD69 活化标志物的丢失是否与功能表现即 IgG 的产生相关。未经处理的对照小鼠、MR1 处理的小鼠和经 AB.D3 处理的小鼠产生的 IgG 的总量比未处理的或经 Ha4/8 处理的同种异体移植物受体小鼠(表 4)明显降低。此结果显示活化 B 细胞的 Ig 分泌作为慢性 GVHD 的确定特征被抗-TWEAK mAb 的处理阻断。抗-TWEAK mAb 在阻断慢性 GVHD 的发生中的应用在实施例 2 中说明。

其它抗体介导的疾病 许多器官特异性和系统性自身免疫病涉及病理性抗体应答。这样的情况包括重症肌无力、自身免疫性溶血性贫血、Chaga's 病、Grave's 病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、系统性红斑狼疮(SLE)、Wegener's 肉芽肿病、结节性多动脉炎和急性进行性新月形肾小球肾炎(摘自 Benjamini 等,免疫学简论(Immunology, A Short Course), (Wiley-Liss, New York 3d ed. (1996))。

尽管 SLE 的病因尚未明确,但对临床病理的免疫学机制已相当了解。出于未知原因, SLE 患者产生抗机体核成分的抗体(抗核抗体(ANA))特别是抗天然双链 DNA 的抗体。临床上,这些抗体的存在与 SLE 中发生的肾脏病变密切相关。这些抗体与 DNA 的复合物似乎来源于正常组织的降解,并且,象任何免疫集聚物疾病一样,这样的复合物形成沉淀,沉积在肾小球基底膜上、动脉壁中和关节滑膜腔中。这些复合物活化补体级联反应并吸引粒细胞。紧随其后的炎症反应以肾小球肾炎为特点,引起肾脏的损伤,导致蛋白尿和血尿。

SLE 已经在小鼠模型中研究了几十年。阻断 T 和 B 细胞活化关键步骤的制剂如 CTLA4-Ig 融合蛋白和抗 CD40L 可阻断 SLE 的发生 (Grewal 和

Flavell, 免疫学综述 153:85-106(1996))。近来, 在几个模型中对特异性针对鼠 CD40 配体的制剂的治疗功效进行了评价(Mohan 等, 免疫学杂志 154, 1470-1480(1995))。将诱导病理性抗体产生的细胞移入体内可使狼疮加重, 这可通过投入阻断 CD40/CD40 配体相互作用的单克隆抗体得到抑制。而且, 5 用抗 CD40 配体的抗体短期治疗狼疮小鼠时发现, 抗体从它们的系统中被清除后很久还对它们的自发疾病有延续的治疗效果。实验提示, 病理性 B 细胞即使在该治疗后 9 个月也不能产生抗体, 提示自身免疫性记忆 B 细胞的扩增有一段时间的延迟, 其可使治疗效果维持很长的一段时间。进一步地, 抗 CD40L 治疗能阻断或延迟自发性 SLE 小鼠模型的 SLE 的进展(Kalled 等, 免疫学杂志 160:2158-2165(1998))。正如我们所显示的那样, 调节 TWEAK/TWEAK 受体之间的相互作用的制剂在体内可抑制 B 细胞活化和 Ig 10 的产生, 此发明的试剂将用于 SLE 的治疗或预防。

对一些致病性感染因子的正常免疫应答可引发自身抗体应答, 其可超过正常范围和出现医学问题。一个实例是 Chagas'病, 一种炎性心肌病, 它在慢性克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)感染的人和实验动物体内发生。近来, 几项 15 研究已经鉴定了 Chagas'病人体内的抗自身抗体(Bach-Elias 等, 寄生虫研究 (Parasitol.Res.) 84:796-799(1998))。此外, 有确切实验证据表明, 心脏特异性自身免疫应答的诱导是人 Chagas'心肌病的可能发病机制。近期研究(Tibbetts 等, 免疫学杂志 152, 1493-1499(1994))测定心脏抗原特异性抗体可在克氏锥虫感染的心脏病 C57B1/6 小鼠体内产生。克氏锥虫巴西(Brazil)株的感染使 20 C57B1/6 小鼠出现与慢性感染人体中所见组织学类似的心肌病。这些小鼠的抗血清与三种心脏抗原反应, 而感染了克氏锥虫 Guayas 株后不产生心肌病的 C57B1/6 小鼠不产生这些抗体。这些资料提示这些抗体是心肌病的特异性标志物。TWEAK 修饰剂阻断 B 细胞活化和 Ig 产生的能力对阻断 Chagas'病患者发生心脏损伤是有用的。 25

特定传染病或其它未知的原因所产生的自身抗体对细胞造成损伤的另一个实例是特发性血小板减少性紫癜(ITP)。在这种情况下, 直接针对血小板的抗体引起血小板的破坏(通过补体或带有 Fc 或 C3b 受体的巨噬细胞), 从而导致出血。体内抑制这类抗体介导型自身免疫应答的制剂如本发明抑制抗体 30 产生的 TWEAK 修饰剂也可用于治疗或预防这些自身免疫疾病。

对某些致病性感染因子的正常免疫应答也能激发过度超敏反应，其本身成为医学问题。I型超敏反应最常见实例是过敏反应。它们由IgE抗体介导，IgE通过其Fc部分结合到肥大细胞和嗜碱性粒细胞的受体上，激发能介导过敏反应的药理活性物质的释放。ITP和Goodpasture's综合症有时被认为是II型反应，其IgM或IgG抗体结合到细胞表面的抗原上并活化补体系统时产生。然后，粒细胞被吸引到活化部位，粒细胞的裂解酶的释放损伤细胞使其被破坏。风湿性关节炎被认为是由III型超敏反应引起，其由结合到正常IgG的Fc部分的免疫复合物(在此实例中是风湿因子，一种IgM自身抗体)介导。这些免疫复合物参与引起关节的炎症和此疾病特征性的损伤。因为这些病理变化部分由抗体介导，抑制抗体产生的制剂如本发明中的TWEAK修饰剂对这些疾病的治疗和预防也是有用的。

导致对病人显著抗体介导型损伤的这类疾病的其它实例包括Graves'病和急性溶血性贫血。预计TWEAK修饰剂在预防和治疗这样的疾病方面会显示功效。

对细胞免疫应答的抑制 我们证实体内给予TWEAK蛋白活性修饰剂可阻断抗体介导的(体液的)免疫疾病、慢性GVHD。其它有效的能阻断GVHD发生的免疫系统修饰剂包括抗CD40L和CTLA4-Ig融合蛋白。这些制剂可阻断T和B细胞活化关键步骤(Grewal和Flavell, 免疫学综述 153:85-106(1996))。所以，对所述其它有效免疫系统途径的制剂处理不限于体液免疫应答。例如，抗CD40L和CTLA4-Ig可分别或联合用于控制动物模型体内的器官移植排斥(Kirk等, 美国国家科学院院报 94: 8789-8794 (1997))。对移植器官的免疫应答主要由Th1 T细胞介导，并包含细胞毒细胞免疫应答。在其它多种免疫疾病如炎症肠道疾病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、糖尿病、溃疡性结肠炎和Crohn's病等自身免疫疾病中，这些细胞免疫应答引起细胞介导型损伤。基于TWEAK或TWEAK受体修饰剂具备阻断慢性GVHD发生的能力，我们的发明预计它们能在细胞免疫疾病中得到应用。

利用TWEAK和TWEAK受体修饰剂的治疗 给予有效量本发明组合物以治疗特定临床疾病。针对具体应用的优选药物和治疗有效量方案可由本领域技术人员视具体情况，如病人的病情和体重、期望治疗的程度和该病人对该治疗的耐受情况而定。

预计约 5mg/kg 的 TWEAK 或 TWEAK 受体修饰剂适于作为最佳治疗剂量的起点。

治疗有效剂量可通过体外实验确定,该实验测定包被靶细胞(根据所述修饰剂分别为 TWEAK 或 TWEAK 受体阳性细胞)至适当(治疗)时间段所需修饰剂的浓度。本文所述 FACS 和 ELISA 受体-配体结合实验能用来监控所述细胞包被反应。可根据这些体外结合实验的结果选出适于在动物中进行检测的修饰剂浓度范围。

本发明可溶性修饰剂(包括抗 TWEAK 和抗 TWEAK-R 抗体的分离和纯化形式、受体-Ig 融合蛋白、其它 TWEAK 和 TWEAK 受体修饰剂包括天然试剂或化学衍生的试剂、和它们的盐或可药用衍生物)可用显示免疫抑制活性的任何常规可接受之给药模式单独或联合给药。

在这些治疗中使用的药物组合物也可有多种形式。例如,固体、半固体、和液体剂型,如片剂、丸剂、粉剂、液体溶液或悬浮剂;栓剂、注射液和浸剂(infusible solution)。优选形式取决于给药模式及所用治疗剂。给药模式可包括口服、肠胃外、皮下、静脉、伤口内或局部给药。

在本发明中,可把 TWEAK 和 TWEAK 受体修饰剂放进无菌、等渗配方中,加入或不加入刺激摄入或促进稳定的辅因子。优选配方是液体,或冻干粉剂。例如,本发明中的 TWEAK 和 TWEAK 受体修饰剂可以用 5.0mg/ml 一水合柠檬酸、2.7mg/ml 柠檬酸三钠、41mg/ml 甘露醇、1mg/ml 甘氨酸和 1mg/ml 聚山梨醇酯(polysorbate)20 的缓冲液稀释。此溶液可冰冻干燥,冰冻储存并在投药之前用无菌的注射用水(USP)重新溶解。

组合物也优选包括本领域熟知的常规可药用载体(参见 Remington 氏药理学,第 16 版,Mac 出版公司,1980)。这些可药用载体包括其它药剂、载体、基因载体、佐剂、赋形剂等,如人血清白蛋白或血浆制品。组合物优选为单位剂型并通常每天给药一次或多次。

本发明的药物组合物也可以已微球体、脂质体、其它微颗粒运送系统或控释制剂的形式被置于受感染组织或血流内、附近或其它相关联部位。控释载体的适当实例包括以成型颗粒的形式存在的半渗透性多聚基质如栓剂或微胶囊。可植入式或微胶囊式控释基质包括多聚乳糖(美国专利 3773319; EP 58481), L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸酯的共聚物(Sidman 等,生物多聚物(Biopolymers), 22, 547-56(1985)); 聚(2-羟乙基-异丁烯酸酯)或乙烯乙酸乙

烯酯(Langer 等, 生物医学研究杂志(J. Biomed. Mater. Res.), 15, 167-277 (1981); Langer, 化学技术(Chem.Tech.), 12, 98-105(1982))。

包含 TWEAK 或 TWEAK 受体修饰剂的药物组合物的优点 本发明的 TWEAK 或 TWEAK 受体修饰剂能抑制免疫应答, 表现为对慢性 GVHD 模型中 B 细胞活化和 Ig 产生的抑制。选择性抑制这类免疫介导型应答的能力可用于免疫性疾病包括各种自身免疫病、器官移植排斥、和急、慢性炎症的治疗。此类病理性免疫疾病的治疗通常需要对广泛的细胞类型和免疫学应答具有多种效应的免疫调节和免疫抑制制剂。这些非特异性免疫抑制剂通常需要以引起不良副作用的高且频繁的细胞毒剂量使用。例如, 目前常用的三种免疫抑制剂包括类固醇、环磷酰胺和硫唑嘌呤。类固醇是多效的抗炎制剂, 它以逆转多种病理性 T 细胞效应的方式抑制活化巨噬细胞并抑制抗原提呈细胞的活性。环磷酰胺(一种烷基化制剂)通过抑制 DNA 的复制和修复而介导细胞死亡。硫唑嘌呤是一种抑制 DNA 合成的抗增殖制剂。这些非特异性免疫抑制制剂通常需要以增加其毒性(例, 肾-和肝-毒性)和引起不良反应的高剂量使用。因而, 它们不适合长期使用。

因而, 急需能克服常规治疗所带来的问题的其它制剂和药物。

以下实施例描述了本发明的抗-TWEAK mAb、该 mAb 的鉴定方法和该 mAb 在阻断抗原驱动型免疫疾病方面的使用。这些实施例不应解释为限制: 这些实例只为了达到说明的目的, 而本发明只受权利要求的限制。

实施例

实施例 1: 针对 TWEAK 蛋白的单克隆抗体的产生

识别人和鼠 TWEAK 蛋白的单克隆抗体在美国仓鼠体内用如所述产生于杆状病毒中的可溶性人 TWEAK 蛋白制成(Chicheportiche 等, 生物化学杂志 51:32401-32410(1997))。第一次免疫, 每只仓鼠腹膜内注射 50 μ g 在弗氏完全佐剂(CFA)中的 TWEAK。随后的各次免疫(首次免疫后的 14、28、42 天)每只仓鼠腹膜内注射在弗氏不完全佐剂(IFA)中的 TWEAK 50(14 和 28 天)或 33(42 天) μ g。用不含佐剂的 100 μ g TWEAK 腹膜内注射进行脾细胞融合形成杂交瘤前的最后一次免疫。应用标准方法生成杂交瘤(Lerner, 耶鲁生物医学杂志 54:387-402(1981))。

用 ELISA format 试验初步筛选 Mab 活性。鼠 TWEAK 蛋白用类似于 TWEAK 蛋白生成的相同方法(Chicheportiche 等, 生物化学杂志 51:32401-

32410(1997))在杆状病毒中产生。用纯化的人和鼠 TWEAK 蛋白包被 96 孔板, 检测各种仓鼠 mAb 与这些固相化蛋白的结合能力。用 HRP 偶联的驴抗仓鼠 IgG(Jackson 免疫研究, West Grove, PA USA)和相应酶反应观察固相化 TWEAK 蛋白对仓鼠 mAb 的捕获。23 种 mAb 中有 8 种 mAb 既可识别鼠 TWEAK 蛋白又可识别人 TWEAK 蛋白(表 1)。

表 1

克隆	人 TWEAK ELISA	鼠 TWEAK ELISA	配体封闭 FACS	对 hTWEAK/293 的 FACS 结合	对 mTWEAK/293 的 FACS 结合
AB.D3.7.2	+++	+++	+	+	+
AA.DB5	+++	-	+/-	+	+
AC.H5.24	+++	+++	-	nd	nd
AA.G9	+++	-	+/-	+	-
AB.H12.1	+++	+++	-	-	-
BA.F5.35.2*	+++	+++	+	+	-
BG.A12.5*	++	+++	+	+	-
BE.D5	++	-	+/-	+	-
AF.D4	++	-	+	+	-
AB.G11.1*	+++	+++	+	+	+
BE.B3.6.1*	++	-	-	+	-
AA.AC2.3.2	+++	-	+/-	nd	nd
BB.B12.1.31.3	++	-	+/-	+	-
AA.DG7.14*	+++	+++	+	+	+
BD.A3	++	-	-	-	-
BC.B10.21*	+++	+++	+	+	+
BG.E8	++	-	+/-	+	-
AE.C10.4*	+++	-	+	+	-
AA.BB4.2*	+++	-	+	+	-
AA.EC10.2*	+++	-	+	+	-
AD.B5.9*	+++	-	-	-	-
AB.D4.67.19	+++	-	-	-	-

人 TWEAK ELISA: 测定 mAb 与人 TWEAK 包被板结合的能力

鼠 TWEAK ELISA: 测定 mAb 与鼠 TWEAK 包被板的交叉反应

配体封闭 FACS: 检测 mAb 是否能封闭与 HT29 细胞结合的人 TWEAK 标记

EBNA293 转染体的 FACS 分析: 用人和鼠 TWEAK 的 cDNA 转染 EBNA293 细胞, 3 天后检测 mAb 的反应性

5

种系之间抗原表位的保守性意外地使小鼠和人 TWEAK 之间在一定程度上保持蛋白同源性(图 1)。用 FACS 分析来确定抗-TWEAK mAb 是否能与表达在细胞表面的 TWEAK 蛋白结合。将人和小鼠 TWEAK cDNA 序列克隆至表达载体 CH269 (Chicheportiche 等, 生物化学杂志 1:32401-32410(1997)), 10 这些构建体用于转染以在 EBNA293 细胞中产生瞬时表达蛋白。包括 AB.D3 在内的四种 mAb 与表达小鼠 TWEAK 的 EBNA293 细胞紧密结合(图 2)。这四种 mAb 也能阻断人 TWEAK 与已知表达一或多种 TWEAK 受体的 HT29 细胞结合(例如, 图 3)。这些 FACS 分析结果综合提示抗-TWEAK mAb 能特 15 异识别 TWEAK 蛋白, 并能修饰 TWEAK 蛋白与一或多种 TWEAK 受体结合的能力。

实施例 2

抗-TWEAK mAb AB.D3 在阻断慢性 GVHD 小鼠模型的脾肿大、B 细胞活化和 Ig 产生方面的应用

6-8 周龄 B6D2F1 雌性小鼠按“方法”一节中所述用 DBA/2 脾细胞移植 20 植物诱导慢性 GVHD。每个接受者尾静脉注射 $500 \mu\text{l}(1 \times 10^8)$ 细胞。实验组接受 DBA/2 移植物(DBA/2>F1), 对照组动物接受 B6D2F1 移植物(F1>F1)。小鼠接受抗 TWEAK mAb AB.D3、抗 CD40L mAb MR1、对照 Ha4/8 的处理或不接受任何处理。移植物注射之前 4 小时以及注射后的 2、4 和 6 天腹膜内注射 mAb $250 \mu\text{g}$ 。实验的第 14 天处死小鼠, 计算对照 F1>F1 组每个动物的 25 脾重比体重的比值作为脾指数, 取均值。其它组的平均脾指数用该对照值校正。两个独立实验的结果在表 2 中显示。接受 DBA/2 移植物(DBA/2>F1)的动物, 未接受任何处理或用对照 mAb Ha4/8 处理的动物与 F1>F1 移植物对照组相比脾重明显增加。此结果反映在脾指数上, 其从校正的对照值 1.0 增加到 2.6。用抗 CD40L mAb MR1 处理的小鼠, 脾指数降至接近对照水平(1.1), 30 用抗 TWEAK mAb AB.D3 处理的小鼠, 脾肿大降低了 35%, 脾指数到 1.7(表 2)。

治疗 处理组	表 2	实验 1	实验 2	均值
F1>F1(对照组)		1.0	1.0	1.0
DBA/2>F1, 未处理组		2.7	2.6	2.65
DBA/2>F1, Ha4/8 处理组		2.9	2.6	2.75
DBA/2>F1, MR1 处理组		1.1	1.1	1.1
DBA/2>F1, AB.D3 处理组		1.8	1.7	1.75

实验的第 14 天，处死小鼠并称重。然后无菌取脾并称重。计算对照 F1>F1 组每个动物的脾重比体重的比值作为脾指数，取均值。其它组的平均脾指数用该对照值校正。

- 5 用 FACS 分析对照小鼠和疾病小鼠(代表各种处理组)脾脏中各群淋巴细胞的活化状态。首先，我们分析了各组小鼠中移入的供体细胞数量。在所有 DBA/2>F1 处理组中，宿主小鼠脾脏中检测到的供体细胞为几乎相同的百分数(平均 = 6.2%)(表 3)。此结果提示不同的 mAb 处理不影响供体细胞的移入。

表 3

处理组	%H-2K ^b 阴性(供体)细胞
F1>F1(对照组)	0.2
DBA/2>F1, 未处理组	5.9
DBA/2>F1, Ha4/8 处理组	9.9
DBA/2>F1, MR1 处理组	5.5
DBA/2>F1, AB.D3 处理组	4.3

- 10 各组小鼠脾细胞在冰上用 PE-偶联的抗-H2K^b和 FITC-偶联的抗-H2D^d染色,用 FACS 分析来检测 MHC 等位基因的表达。宿主脾细胞的两种标志物均为阳性，但供体脾细胞为 H2K^b 阴性。百分数值反映淋巴细胞群中的事件，如通过前向和侧向散射特性所确定。

- 15 随后，利用淋巴细胞活化两个标志物：在 B220 + B 细胞上表达的 CD69 和在 CD4 + 和 CD8 + T 细胞上表达的 L - 选择素。当比较对照组和未处理组的 DBA/2>F1 小鼠时，我们注意到 CD69 + B 细胞从 2.5%增加到 6.2%(表 4)。CD69 + B 细胞数量的增加被 MR1(3.3%)或 AB.D3(2.1%)的处理阻断，但不被 Ha4/8(6.5%)的处理阻断(图 4 和表 3)。两个实验的数据见表 4。

表 4

处理组	% B220+/CD69+(双阳性)细胞		
	实验 1	实验 2	均值
F1>F1， 对照组	2.5	2.0	2.25
DBA/2>F1， 未处理组	6.2	5.5	5.9
DBA/2>F1， Ha4/8 处理组	6.5	4.7	5.6
DBA/2>F1， MR1 处理组	3.3	nd	3.3
DBA/2>F1 ， AB.D3 处理组	2.1	3.2	2.65

脾细胞用 PE-标记型抗-B220 和 FITC-标记型抗-CD69 在冰上染色 1 小时，然后用 FACS 缓冲液洗涤并分析。百分数是基于在淋巴细胞群中收集到的基本数据，如通过前向和侧向散射特性所确定。

5

为了进行 Ig 分泌的体外分析，对从各处理组收获的脾细胞的培养上清进行 ELISA 分析。表 5 的结果为第二次实验每组 3 只小鼠的均值。用 MR1 或 AB.D3 处理使未处理组和 Ha4/8 处理的 DBA/2>fl 组中观察到的自发 IgG 生成的 4－8 倍增加被阻止。

10

表 5

处理组	自发性体外 IgG 生成
F1>F1(对照组)	125ng/ml+/-20ng/ml
DBA/2>F1， 未处理组	750ng/ml+/-65ng/ml
DBA/2>F1， Ha4/8 处理组	500ng/ml+/-150ng/ml
DBA/2>F1， MR1 处理组	0
DBA/2>F1 ， AB.D3 处理组	125ng/ml+/-20ng/ml

为了进行 Ig 分泌的体外分析，使细胞沉淀，以 1×10⁷ 细胞/ml 的浓度重悬于含 10% 胎牛血清(FBS)/4mM 谷氨酰胺的 DMEM 中。6 孔培养板中每孔加入 1 ml。24 小时后收集细胞上清液。取每个处理组 3 只小鼠之每只小鼠两个孔的均值。

15

序列表

<110> BIOGEN, INC.

<120> 修饰 TWEAK 活性的试剂及其作为治疗剂在免疫性疾病的治疗中的应用

<130>A068PCT

<140>PCT/US00/01044

<141>2000-01-14

<150>60/116, 168

<151>1999-01-15

<160>2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210>1

<211>225

<212>PRT

<213>鼠

<400>1

Val Leu Ser Leu Gly Leu Ala Leu Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

Val Val Ser Leu Gly Ser Trp Ala Thr Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ser
 20 25 30

Gln Glu Glu Leu Thr Ala Glu Asp Arg Arg Glu Pro Pro Glu Leu Asn
 35 40 45

Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp Val Val Pro Phe Leu Glu Gln Leu
 50 55 60

Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg
 65 70 75 80

Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp
 85 90 95

01-09-07

Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Thr
 100 105 110

Lys Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Ile Gly Glu
 115 120 125

Phe Thr Val Ile Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His
 130 135 140

Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asn
 145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Pro Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu
 180 185 190

Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala
 195 200 205

His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val
 210 215 220

His
 225

<210>2

<211>249

<212>PRT

<213>人

<400>2

Met Ala Ala Arg Arg Ser Gln Arg Arg Arg Gly Arg Arg Gly Glu Pro
 1 5 10 15

Gly Thr Ala Leu Leu Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Gly Leu Ala Leu
 20 25 30

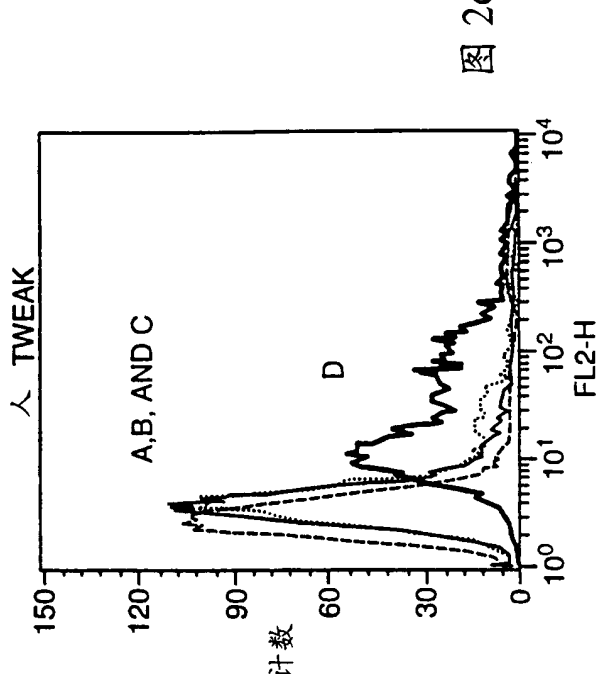
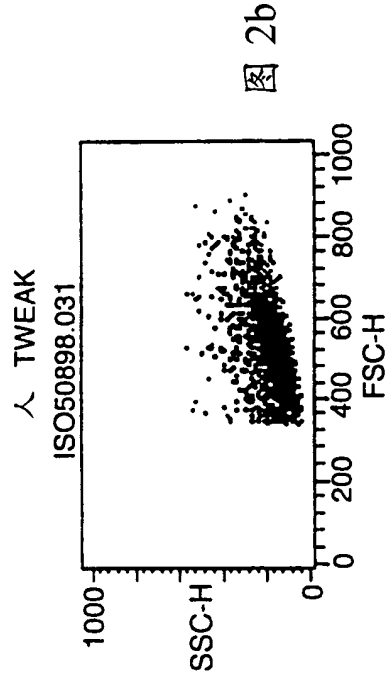
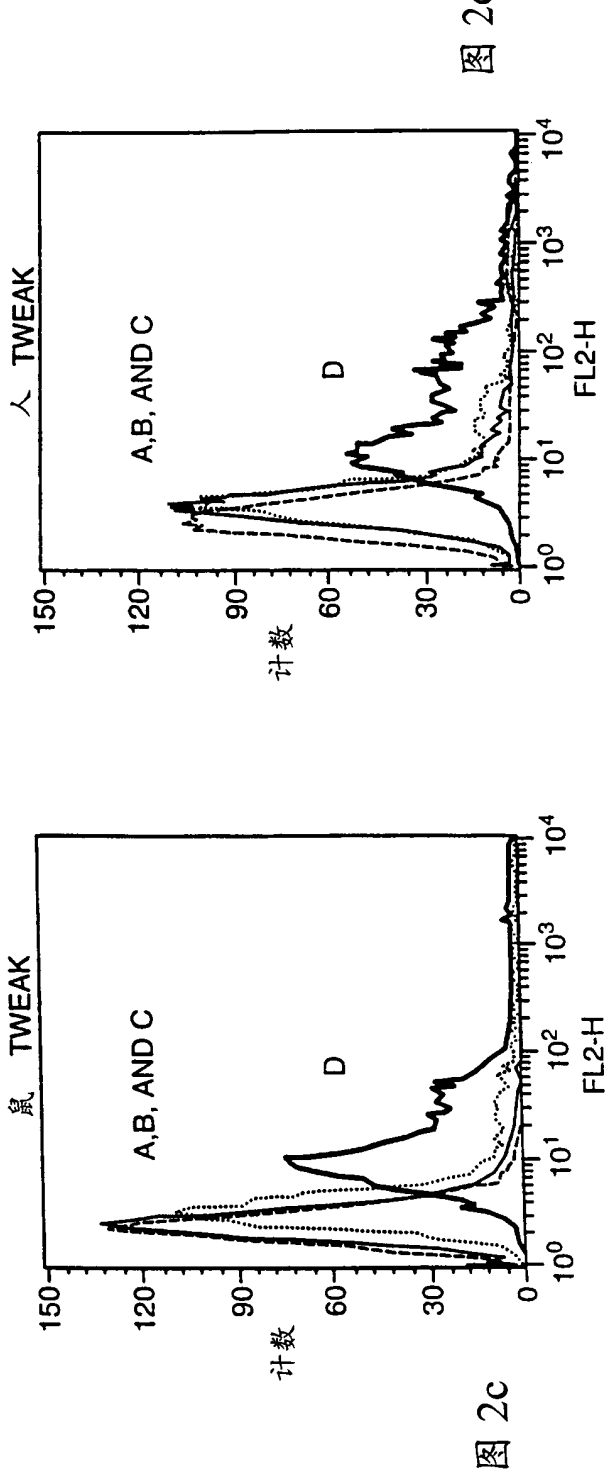
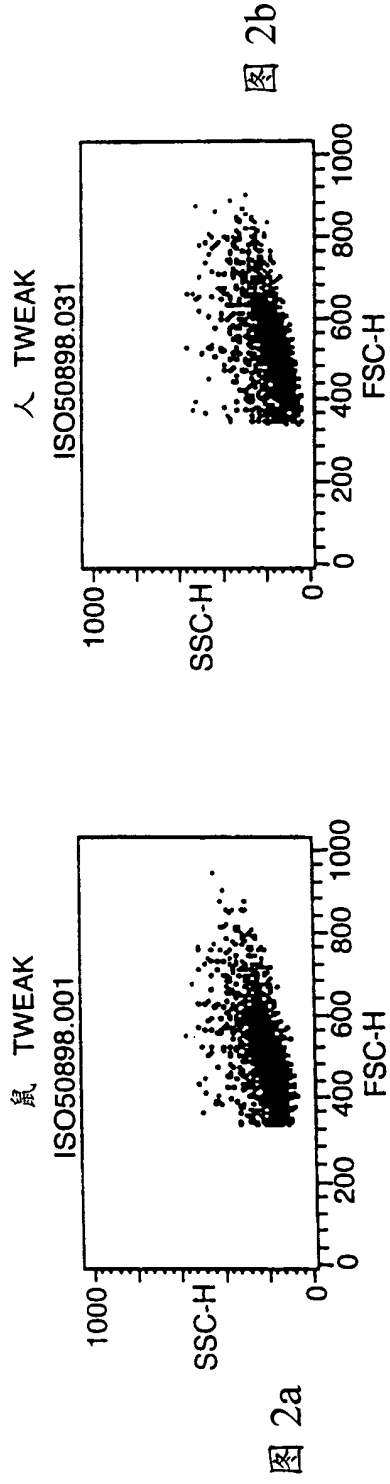
Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly Ser Arg Ala
 35 40 45

Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu Val Ala Glu Glu

50	55	60
Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp		
65	70	75 80
Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro		
	85	90 95
Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu		
	100	105 110
Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly		
	115	120 125
Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu		
	130	135 140
Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu		
145	150	155 160
Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr		
	165	170 175
Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu		
	180	185 190
Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg		
	195	200 205
Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu		
	210	215 220
Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu		
225	230	235 240
Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His		
	245	

Human	1	MAARRSQRRRRGEPGTALLVPLALGLGLALACLGLLLVVSLGSRASL
Mouse	1	-----VLSLGLALACLGLLLVVSLGSWATL
Human	51	SAQEPAQEELVAEEDQDPSELNPQTEESQDPAPFLNRLVRRRRSAPKGRK
Mouse	27	SAQEPSQEELTAEDRRREPPELNPQTEESQDVVFLEQLVRRRRSAPKGRK
Human	101	TRARRAIAAHYEVHPRPGQDGAQAGVDGTVSGWEEARINSSSPLRYNRQI
Mouse	77	ARPRRAIAAHYEVHPRPGQDGAQAGVDGTVSGWEETKINSSSPLRYDRQI
Human	151	GEFIVTRAGLYLYLCQVHFDEGKAVYKLDDLVDGVLALRCLEEFSAATA
Mouse	127	GEFTVIRAGLYLYLCQVHFDEGKAVYKLDDLNVGVLALRCLEEFSAATA
Human	201	SSLGPGQLRLCQVSGLLALRPGSSLRIRTLPPWAHLKAAPFLTTFGLFQVH
Mouse	177	SSPGPQLRLCQVSGLLPLRPGSSLRIRTLPPWAHLKAAPFLTTFGLFQVH

图 1



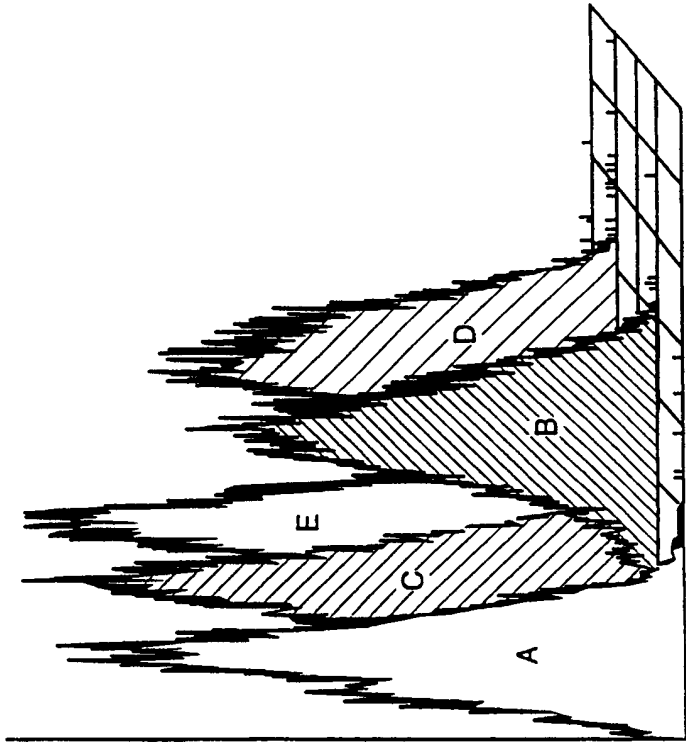


图 3b

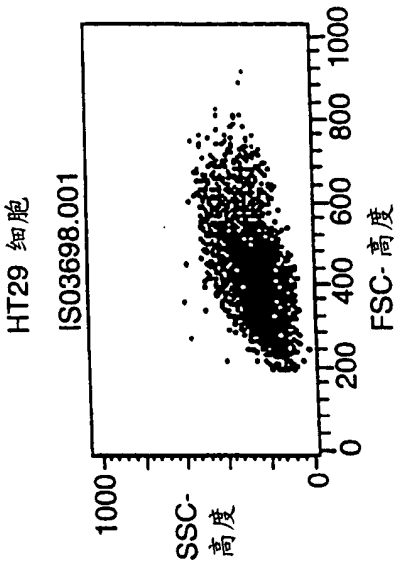


图 3a

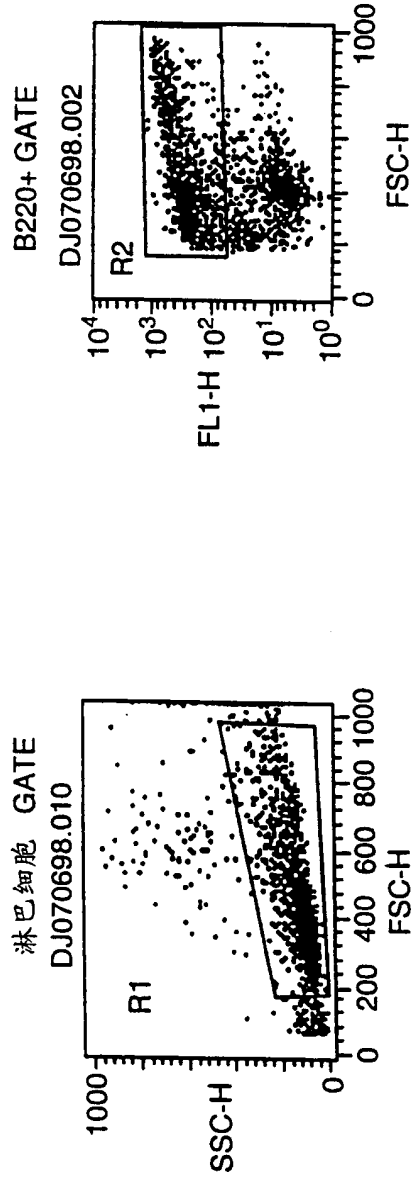


图 4a

图 4b

