[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410078988.X

[51] Int. Cl.
*A61K 38/17 (2006.01)*
*A61K 39/395 (2006.01)*
*A61P 13/12 (2006.01)*
*A61P 43/00 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100352497C

[22] 申请日 1999.4.2
[21] 申请号 200410078988.X
分案原申请号 99806756.3
[30] 优先权
[32] 1998.4.3 [33] US [31] 09/054488
[73] 专利权人 达特茅斯学院理事
地址 美国新罕布什尔州
[72] 发明人 R·J·诺伊勒 C·M·伯恩斯
[56] 参考文献
US5672347A 1997.9.30
US5474771A 1995.12.12
WO9623071A 1996.8.1
审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 27 页 附图 12 页

[54] 发明名称

应用特异性结合 CD40CR(CD40 配体)的抗体抑制体液免疫

[57] 摘要

提供一种用抗 - gp39 抗体或片段治疗狼疮的方法。这种治疗方法已显示可逆转疾病，特别是逆转为狼疮患者主要致死原因的狼疮性肾病。

1. 有效量的至少一种特异性结合 CD40L 的可溶性 CD40 或可溶性 CD40 融合蛋白或其结合片段在生产用于使患有表现为蛋白尿的狼疮患者的蛋白尿减轻的药物中的用途。

2. 权利要求 1 的用途，其中 10 μg-1000 μg 所述可溶性 CD40 或可溶性 CD40 融合蛋白存在于单位剂量形式的药物中。

3. 权利要求 1 的用途，其中所述可溶性 CD40 或可溶性 CD40 融合蛋白结合人 CD40L。

4. 权利要求 1 的用途，其中所述药物还含有特异性结合 CD40L 的抗体或其结合片段。

5. 权利要求 1 的用途，其中所述可溶性 CD40 融合蛋白为 CD40-Ig。

# 应用特异性结合 CD40CR (CD40 配体)的抗体抑制体液免疫

本申请是分案申请，原申请的申请日为 1999 年 4 月 2 日，申请号为 99806756.3 (PCT/US99/07321)，发明名称为“抗-gp39 抗体在狼疮及相关肾病的治疗和/或逆转中的应用”。

## 相关申请

本发明涉及 B 细胞抗原 CD40 的反-受体，文献中选择性称为 CD40CR、gp39 或最新的 CD154，以及这类受体的可溶性配体，包括至少含有一部分 CD40 蛋白的融合分子。这是基于，至少是部分基于对可溶性 CD40/免疫球蛋白的融合蛋白可通过与辅助性 T 细胞膜上新的 39kD 的蛋白受体结合而抑制辅助性 T 细胞介导的 B 细胞的活化的发现。本发明提供大致纯的 CD40CR 受体；提供 CD40CR 的可溶性配体,包括抗-gp39 抗体及其片段和至少含有一部分 CD40 蛋白的融合分子；并提供控制 B 细胞激活的方法，该方法在治疗变态反应或自身免疫性疾病中特别有用。更准确地说，本发明涉及抗-gp39 抗体在系统性红斑狼疮(SLE)或药物引起的狼疮的治疗中的应用。

## 发明背景

Mitchison、Benacerraf 和 Raff 的研究首次提出 $T_h$ 和 B 细胞间相互的物理性相互作用是体液免疫应答发生的基础。随后的研究证实 $T_h$ 与 II 类主要组织相容性复合体(MHC)相容性抗原-提呈 B 细胞形成物理缀合物(Vitetta 等, Immunol. Rev., 99:193-239 (1987))，在这些缀合物中 B 细胞应答 $T_h$ (Barrett 等, J. Immunol., 143:1745-1754 (1989))。因为发现 $T_h$-衍生淋巴因子对 B 细胞的生长和分化发挥有效的影响，提出活化的 $T_h$ 附近释放的可溶性因子介导相互作用的 B 细胞的激活。然而，没有任何一种分子克隆的淋巴因子，无论是单独或结合，表现出诱导进入 B 细胞周期的能力。与可溶性因子不同，活化 $T_h$ 的浆膜部分可诱导 B 细胞周期进入(Hodgkin 等, J. Immunol., 145:2025-

2034 (1990); Noelle 等, J. Immunol., 146:1118-1124 (1991))。应用活化 $T_h$ 的纯化浆膜部分的研究提示，在活化的 $T_h$ 的膜上表达的一种蛋白始动体液免疫(Noelle 等, J. Immunol., 146: 1118 –1124 (1991); Bartlett 等, J.Immunol., 145:3956-3962 (1990))。

已将活化 $T_h$ 细胞膜的纯化浆膜($PM^{ACT}$)用于研究这种效应因子功能的性质(Hodgkin 等, J. Immunol., 145:2025-2034 (1990); Noelle 等, J.Immunol., 146:1118-1124 (1991))。活化 $T_h$ 的 $PM^{ACT}$ 而不是静息 $T_h$ ($PM^{REST}$)表现出以抗原非特异性、II 类-非限制性方式中诱导 B 细胞周期进入的活性。此外，证实这种由 $PM^{ACT}$ 表达的活性需要活化 4-6 小时、从新合成 RNA，而且在本质上是蛋白质(Bartlett 等, J. Immunol., 145:3956-3962 (1990))。

## 发明概述

本发明涉及命名为 CD40CR 的 B 细胞抗原 CD40 的反-受体和这一受体的可溶性配体，包括至少含有一部分 CD40 蛋白的融合分子。这是基于，至少是部分基于对可溶性 CD40/免疫球蛋白的融合蛋白可通过与辅助性 T 细胞膜上新的 39kD 的蛋白受体(CD40 的反-受体命名为“CD40CR”)结合而抑制辅助性 T 细胞介导的 B 细胞的活化的发现，以及基于命名为 MR1 的直接针对该 39kD 受体的单克隆抗体能够抑制辅助性 T 细胞介导的 B 细胞的激活的发现。

本发明提供 CD40CR 的可溶性配体(包括抗体)的大致纯 CD40CR 受体，和至少含有一部分 CD40 蛋白的融合分子；并提供控制 B 细胞激活的方法。

在本发明具体的实施方案中，通过将治疗有效量可溶性配体或 CD40CR 与受试者的辅助性 T 细胞接触而抑制受试者的 B 细胞的激活。对 B 细胞激活的这种抑制或许在变态反应或自身免疫性疾病的治疗中特别有用。

更具体地说，本发明为需要这种治疗的狼疮病受试者，如进行

性系统性红斑狼疮或药物性狼疮，甚至处于疾病过程的晚期阶段(此时常观察到肾脏损害)的患者，提供治疗方法，该治疗方法为给予治疗有效剂量的抗-gp39抗体，例如公开于普通转让的美国第08/475,847号(1995年6月7日申请)中、现在已允许使用的抗-人gp39抗体或其片段。

本发明的一个优点是它可以介入抗原非特异性的免疫应答的一个方面。目前变态反应的许多疗法包括对特定抗原的脱敏疗法，都需要对每个患者进行检测以便于鉴定与过敏性有关的抗原。实际问题是，将患者对每个和每种潜在变应原作详尽分析事实上是不可能的。而且，大多数自身免疫性疾病中，病因性抗原通常是未知的甚或与疾病进程无关。涉及抗原非特异性CD40/CD40CR相互作用的本发明避免了对变态反应或自身免疫性有关的抗原的特征鉴定的需要。因此，本发明在那些免疫原未知或具有多组分免疫原的变态反应和自身免疫性疾病如枯草热、普鲁卡因酰胺所致的狼疮或系统性红斑狼疮(SLE)的治疗应用中特别具有优势。也可将其应用于急性治疗免疫激活，如过敏反应的治疗。

## 缩略语

| | |
|---|---|
| Ig | 免疫球蛋白 |
| Mab | 单克隆抗体 |
| $PM^{ACT}$ | 由活化的辅助性T细胞制备的浆膜 |
| $PM^{REST}$ | 由静息辅助性T细胞制备的浆膜 |
| PAGE | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| rIL4 | 重组白细胞介素-4 |
| rIL5 | 重组白细胞介素-5 |
| SN | 上清液 |
| $T_h$ | 辅助性T细胞 |
| $T_h1$ | 指D1.6，为I-$A^d$-限制性兔免疫球蛋白特异性克隆 |

## 插图说明

图 1. 单克隆抗体和 CD40-Ig 通过 $PM^{ACT}$ 对引导 B 细胞 RNA 合成的影响。

A 组. 将静息 B 细胞与 $T_h1$ 的 Pmtest 或 $PM^{ACT}$ 一起培养。向含有 $PM^{ACT}$ 的各孔中加入 25 μg/ml 抗-CD4、抗-LFA-1 或抗-ICAM-1 或这些物质的复合物(每种 25 μg/ml)，并通过[$^3$H]-尿嘧啶核苷的掺入测定 B 细胞的 RNA 合成。培养 42-48 小时后评估 B 细胞的 RNA 合成。所给出的结果为三个复孔培养物的算术平均数+/-标准差，并且代表 5 个这样的实验。

B 组. 将静息 B 细胞与 $T_h1$ (●,▲)或 $T_h2$(□)的 $PM^{ACT}$ 一起培养。向含有 $T_h1PM^{ACT}$ 的培养物(●,▲)的孔中加入逐渐增量的 CD40-IG (▲)或对照蛋白质 CD7E-Ig (◆)。向含有培养物 $T_h2PM^{ACT}$ (□)的孔中加入逐渐增量的 CD40-Ig。培养 42-48 小时后评估 B 细胞的 RNA 合成。所述结果为三个复孔培养物的算术平均数+/-标准差，并且代表 3 个这样的实验。

C 组. 将静息 B 细胞与 LPS (50 μg/ml)或 $PM^{ACT}$ 一起培养。向培养物的孔中加入 CD40-Ig(25 μg/ml; 孵化)或 CD7E-Ig(25 μg/ml; 固体)。按 A 组中所述测定 RNA 合成。所示结果为三个复孔培养物的算术平均数+/-标准差，并且代表 3 个这样的实验。

图 2. CD40-Ig 抑制 B 细胞的分化和增殖

A 组. 将静息 B 细胞与 $PM^{ACT}$、rIL4(10 ng/ml)以及 rIL5(5ng/ml)一起培养。在培养开始时或在培养开始后第一、第二或第三天时，加入 CD40-Ig 或 CD7E-Ig(25 μg/ml)。在培养第六天时，收集各孔 SN 并按 Noelle 等(J. Immunol., 146:1118-1124(1991))所述，用抗-同种型特异性的 ELISA 定量 IgM(■)和 $IgG_1$(●)。在 $PM^{ACT}$、IL4 和 IL5 存在下(未加入 CD40-Ig)，IgM 和 $IgG_1$ 的浓度分别是 IgM 为 4.6 μg/ml 和 $IgG_1$ 为 126 ng/ml。在 IL4 和 IL5 缺乏时，未测到 IgM 或 $IgG_1$。结果代表 3 个这样的实验。

B 组. 用抗-CD3 静息或活化 $T_h1$ 16 小时，辐射后在 IL4(10 ng/ml)存在下，以 $1\times10^4$ /孔与静息 B 细胞($4\times10^4$ /培养物)一起培养。向培养物中加入从 0-25 μg/ml 的 CD40-Ig(▲)或 CD7E-Ig(●)。在培养后 66-72 小时，用 1.0 μCi 的[$^3$H]-胸腺嘧啶核苷对各孔施以脉冲并收集该培养物。所述虚线表示 B 细胞对静息 $T_h$ 细胞的应答。所示结果为三个复孔培养物的算术平均数+/-标准差，并且代表 2 个这样的实验。

图 3. CD40-Ig 测定在活化 $T_h$ 而不是静息 $T_h$ 上表达的分子。收获静息和活化 $T_h$，并与融合蛋白一起于 4℃孵育 20 分钟后，加入 FITC-偶合的羊抗-hIgG(25 μg/ml)。通过分析至少 5000 细胞/样品，测定百分率阳性细胞和 MFI。结果代表 6 个这样的实验。CD40-Ig 以实心分布图表示。图 3A 为静息 $T_h$ 细胞的结果，图 3B 为活化 $T_h$ 细胞的结果。

图 4. CD40-Ig 免疫沉淀活化 $T_h1$ 溶解物的 39kD 蛋白。用不溶性的抗-CD3 静息或活化 $T_h1$ 16 小时。用纯化抗体或融合蛋白(1-10μ)免疫沉淀静息或活化 $T_h$ 的[$^{35}$S]-标记的蛋白。所述凝胶分布图代表 3 个这样的实验。

图 5.诱导的 39kD $T_h$ 膜蛋白特异性单克隆抗体抑制 $PM^{ACT}$ 诱导的 B 细胞 RNA 合成。将静息 B 细胞和 $PM^{ACT}$ 分别与各 10 μg/ml 的抗-α/β、抗-CD3、CD40-Ig 或 MR1 一起培养。按图 1 所述测定 RNA 合成。结果以三个复孔培养物的算术平均数+/-标准差表示，并且代表 3 个这样的实验。

图 6. MR1 和 CD40-Ig 识别活化 $T_h$ 上表达的相同分子。

A 组. 将活化 $T_h$ 用 MR1 或对照 Ig 荧光染色。为评估 CD40-Ig 和 MR1 是否竞争性结合活化 $T_h$，将不同浓度梯度的 MR1 或对照仓鼠 Ig(抗-α/β TCR)与抗-CD40(20 μg/ml)一起加入到其中。于 4℃孵育 20 分钟之后，洗涤样品品并与 FITC-偶合的、抗人 $IgG_1$ 的单克隆抗体一起孵育。结果代表 3 个这样的实验。

B 组. 用 MR1(10 μg/样品)或 CD40-Ig(10 μg/样品)免疫沉淀[$^{35}$S]—蛋氨酸-标记的活化 $T_h$ 的蛋白并通过 PAGE 和荧光自显影分离该蛋

白。结果代表 2 个这样的实验。

图 7. CD40-Ig 与人细胞系的结合。将多种人 T-细胞系暴露于生物素-标记的 CD40-Ig，并通过流式细胞法评估其结合。

图 8.

A 组. Stamenkovic 等的 CD40 cDNA 的核苷酸序列(EMBO J., 8: 1403-1410(1989))。下划线为跨膜区。

B 组. 可用于表达 CD40-Ig 的质粒示意图。△CD40 融合位点的氨基酸序列标示于以下的 CD40 蛋白的图解部分。

图 9.

不同治疗组 NZB/NZW F1 小鼠所产生的抗-(ss)DNA 抗体的滴度。空心环(---○---)代表用 MR-1 治疗的 4-10 月龄小鼠；空心三角(---△---)代表在发生蛋白尿后接受 MR-1 不发生反应的小鼠；实心方块(---■---)代表在发生蛋白尿后接受 MR1 发生反应的小鼠，而实心环(---●---)代表未接受治疗的小鼠。得出的数值是每组三个滴度的平均值 +/- SEM。

图 10.

不同治疗组的 NZB/NZW F1 小鼠的存活率。空心环(---○---)代表用 MR1 治疗的 4-10 月龄小鼠；空心三角(---△---)代表在发生蛋白尿后接受 MR1 不发生反应的小鼠；实心方块(---■---)代表在发生蛋白尿后接受 MR1 发生反应的小鼠，而实心环(---●---)代表未接受治疗的小鼠。

## 发明详述

本发明提供大致纯 CD40CR 受体；提供 CD40CR 的可溶性配体，包括抗-gp39 的抗体及其片段和含有 CD40 的融合分子；并提供应用可溶性配体控制 B 细胞激活的方法。

为了公开清楚而不是限制本发明，将本发明的详细说明分成下述部分：

(i) 结合 CD40CR 的配体;

(ii) 用于鉴定 CD40CR 的方法;

(iii) 纯化的 CD40CR 的制备;

(iv) 结合 CD40CR 的配体的用途; 和

(v) CD40CR 的用途。

(iii) 纯化 CD40CR 的制备; (尤其是治疗进行性狼疮, 如系统性红斑狼疮或药物性狼疮)。

本发明提供 CD40CR 的可溶性配体, 包括(i)至少含有一部分 CD40 蛋白的融合分子和(ii)与 CD40CR 特异性结合的抗体或抗体片段、或 gp39、或已知所述抗原的 CD154。

本文所用术语“可溶性”, 表示本发明的配体并非总是与细胞浆膜结合。然而, 本发明的可溶性配体可固定在非细胞性固体支持物上, 包括脂质、蛋白质、或碳水化合物分子、圆珠、囊泡、磁性颗粒、纤维等, 或可包埋于植入物或囊泡中。

这样的配体与 CD40CR 结合的能力可通过证明所述配体与 CD40-Ig *(如下)*或 MR1 *(如下)*相同的蛋白结合、或结合 CD40CR 的另一种抗体(如普通转让的美国第 08/475,847 号中所公开的抗体)而证实。

本发明的配体可与合适的载体一起组成药用组合物。

本发明提供为 CD40CR 配体的可溶性融合分子。这类融合分子含有至少与第二个分子连接的一部分 CD40 蛋白。所述 CD40 部分优选缺乏 CD40 跨膜区。可根据本发明使用的 CD40 蛋白的一部分定义为能与 CD40CR 结合的任何部分, 如显示与相同蛋白如 MR1 或 CD40-Ig 结合的部分。

可使用的第二分子包括肽类和蛋白质、脂质和碳水化合物, 在本发明优选实施方案中, 可以为免疫球蛋白分子或其部分(如 Fv、Fab、$F(ab')_2$或 Fab'片段)、或 CD8、或其它粘附分子如 B7。第二分子可得自非人类来源或人类来源, 或可以是嵌合体. 第二分子也可

以是一种酶、毒素、生长因子、淋巴因子、抗增殖剂、烷化剂、抗代谢剂、抗生素、长春花生物碱、铂配位配合物、放射性同位素或荧光化合物。

可通过化学合成或优选通过DNA重组技术生产本发明的融合分子。

例如，可将至少编码一部分CD40蛋白的核酸序列与编码第二个分子的核酸序列在合适的表达载体中组合，然后在原核或优选真核表达系统如酵母、杆状病毒或哺乳动物表达系统(包括转基因动物)中表达。

或者，至少一部分CD40蛋白可通过电泳技术或用与CD40或第二个分子结合的配体作亲和层析表达。与CD40结合的配体包括(但不局限于)抗-CD40抗体如由杂交瘤产生的G28-5(该杂交瘤保藏号为HB9110并保藏于美国典型培养物保藏中心)和CD40CR，下文将作详细说明。如果第二个分子是免疫球蛋白或免疫球蛋白片段，可应用含有抗-免疫球蛋白抗体的亲和层析柱；如果第二个分子含有Fc片段，可应用蛋白A柱。

根据本发明的优选实施方案，可用编码CD40蛋白(该蛋白从跨膜区域上游截断)的核酸序列生产CD40的一部分。可通过消化含有编码CD40抗原的cDNA的质粒来制备这种核酸序列，如按Stamenkovic等(EMBO J., 8: 1403-1410(1989))所述，用Pst I (P)和Sau 3A (S3)限制性酶消化。将所得到的P/S3片段亚克隆入用P和Bam H I (B)消化的相同质粒中，以生产截短的CD40基因(见图8)。

在本发明非限性具体实施方案中，用于生产含有至少一部分CD40以及免疫球蛋白序列的表达载体可优选由病毒性复制起点、细菌性复制起点、细菌性选择标记、以及通过限制性内切酶位点从编码免疫球蛋白恒定区的DNA序列中分离的真核启动子和增强子序列组成，后接多聚腺苷酸信号序列，所述限制性内切酶位点可允许亚克隆编码至少一部分CD40的DNA序列(见图8.B)。

在本发明特定实施方案中，可将截短的 CD40 基因亚克隆到免疫球蛋白的融合质粒中，如 Aruffo 等所述(Cell, 61:1303-1313 (1990))，用 MIu I 和 B 消化，构建 pCD40-Ig 质粒，该质粒编码融合分子 CD40-Ig (见图 8)。然后可通过将 pCD40-Ig 质粒转染至 COS 细胞，形成瞬时表达系统而产生 CD40-Ig 融合蛋白。自 COS 细胞上清液收集所产生的 CD40-Ig，并按 Aruffo 等，Cell, 161: 1303-1313 (1990)所述经蛋白 A 柱层析进行纯化。

本发明的可溶性配体优选包括抗体分子、单克隆抗体分子、或含有与 CD40CR (gp39)(优选人 gp39)结合的抗原结合位点的这些抗体分子的片段。这类配体还可含有第二个分子，该分子可是蛋白质、脂质、碳水化合物、酶、毒素、生长因子、淋巴因子、抗增殖剂、烷化剂、抗代谢剂、抗生素、长春花生物碱、铂配位配合物、放射性同位素或荧光化合物并且可与所述抗体分子或片段连接。

当所述配体是单克隆抗体或其片段时，可应用任何能提供由细胞系连续培养而产生抗体分子的技术制备抗 CD40CR (gp39)的单克隆抗体。例如，由 Kohler 和 Milstein 首先研制的杂交瘤技术(1975, Nature, 256:495-497)以及近来可用的其它技术，如人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbar 等，1983, Immunology Today, 4:72)和产生人单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术(Cole 等，1985，单克隆抗体和癌症的治疗，Alan R. Liss, Inc.，第 77-96 页)第均在本发明范围内。通常优选人源化或嵌合型抗-gp39 抗体，因为它们在给药后不易引起免疫原性应答(HAMA 应答)。

可通过已知技术产生含有独特型所述分子的抗体片段。例如，这类片段包括但不局限于：$F(ab')_2$ 片段，它可通过应用胃蛋白酶处理所述抗体分子产生；Fab'片段，它可通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫键产生；$F(ab')_2$ 片段，它可通过应用木瓜蛋白酶处理所述抗体分子产生；以及 2Fab 或 Fab 片段，它们可通过应用木瓜蛋白酶和还原二硫键的还原剂处理所述抗体分子产生。

如上所述，本发明也提供通过本领域已知的技术产生的嵌合体或人的抗体，如 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:6851-6855 (1984)或欧洲专利申请第 85305604.2 号、公布第 0173494 号(Morrison 等, 1986 年 3 月 5 日公布)中所述的技术。

用于产生抗体的免疫原可以是含 CD40CR 的任何来源。例如，活化的 $T_h$，如可将活化的人 $T_h$ 细胞用作免疫原。此外，可应用按下述 5.3 部分所述制备的大致纯 CD40CR。如果将活化的 $T_h$ 用作免疫原，可测试抗血清的抗活化 $T_h$ 细胞而不是静息 $T_h$ 细胞的反应性。

所述免疫原也可包括重组 gp39 或其片段。在这点上，已用重组方法克隆并表达编码鼠和人 gp39 的 DNA。这些蛋白质为抗-gp39 抗体的产生提供潜在的免疫原。

在本发明的优选实施方案中，所述可溶性配体是抗-人 gp39 单克隆抗体，更优选人源化或嵌合型抗-人 gp39 抗体。将下述方法用于产生 MR1 单克隆抗体，该抗体特异性地与鼠 gp39 结合，并可用来产生针对 CD40CR 的其它抗体。

将 5-$10^6$ 活化的 $T_h1$ 细胞(D1.6)每隔一周腹腔注射，持续 6 周免疫仓鼠。当抗鼠 $T_h1$ 的血清滴度大于 1: 10,000 时，采用免疫仓鼠的脾细胞和 NSI，用聚乙二醇进行细胞融合。用流式细胞仪在静息和活化 $T_h1$ 上从含有生长的杂交瘤的孔中筛选上清液。进一步测试一种产生选择性识别活化 $T_h$ 的单克隆抗体的具体杂交瘤，并将其亚克隆以衍生出 MR1。在腹水中产生 MR1 并通过离子交换高压液相层析纯化。

此外，更优选根据美国第 08/475,847 号制备抗-人 gp39 抗体，该文献通过引用整体结合到此处。

本发明也提供包括单克隆抗体或其片段的配体，该单抗或其片段能够竞争性抑制 MR1 与其靶抗原或 CD40-Ig 与其受体的结合。

可通过(i) CD40CR 结合 CD40、至少含有一部分 CD40 的融合分子和诸如 MR1 的抗体的能力；(ii) CD40CR 能够刺激 B 细胞进入细

胞周期、增殖和分化的功能特性；以及(iii) CD40CR 的细胞分布来鉴定 CD40CR。

可通过 CD40CR 结合诸如 CD40、含有 CD40 的融合分子以及针对 CD40CR 的抗体的配体的能力鉴定 CD40CR。

如下文更详细的讨论，将几种技术用于鉴定 CD40CR。例如，证实 CD40-Ig 和 MR1 能识别同样的 39kD 分子。发现 CD40-Ig 和 MR1 二者均可从放射性标记的 $T_h$ 溶解物中免疫沉淀 39kD 蛋白质(图 4)。此外，39kD 蛋白质与 CD40-Ig 的免疫沉淀去除了由 MR1 从 $T_h$ 溶解物中识别的抗原。

还可用 CD40CR 刺激 B 进入细胞周期、增殖和分化能力鉴定 CD40CR。

例如，发现活化的($PM^{ACT}$)而不是静息的($PM^{REST}$) $T_h$ 细胞浆膜(PM)可诱导 B 细胞的 RNA 合成(图 1A)；指示 B 细胞的活化的该诱导作用不受抗体如抗-LFA-1、抗-CD4、抗-ICAM-1 的影响。然而，如图 1B 和图 6 所示，发现 CD40-Ig 或 MR1 能够抑制 $PM^{ACT}$ -诱导的 B 细胞活化。

可通过诸如[$^3$H]-尿嘧啶核苷掺入 RNA (如 B 细胞分化，RNA 合成增加)或通过[$^3$H]-胸腺嘧啶核苷的掺入(测定与细胞增殖有关的 DNA 合成)技术测定 B 细胞活化的诱导作用。为获得 CD40CR 对 B 细胞增殖的影响的最佳测定，可以约 10ng/ml 浓度将白细胞介素-4 (IL4)加入到培养基中。

此外，可根据免疫球蛋白分泌的功能测定 B 细胞的活化。例如，可将 CD40CR (大致纯形式，或存在 PM 中，或反之)与 IL4 (10ng/ml)和 IL5 (5ng/ml)一起加入到静息 B 细胞中。 培养 3 天后，可加入额外体积的培养基。在培养的第 6 天时，收集各培养物的上清液(SN)并按照 Noelle 等所述(J. Immunol., 146:1118-1124 (1991))测定 IgM 和 $Ig_1$ 的量。

也可通过 CD40CR 的细胞分布鉴定 CD40CR。例如，根据流式

细胞仪测定，观察到 CD40-Ig 与活化而非静息 $T_h1$ 结合(图 3)。而且，观察到 CD40-Ig 与 Jurkat 细胞、HSB2 细胞和人外周血中的活化 T 细胞的结合，但未表现出明显的与 CEM 细胞、HPBALL 细胞、或鼠 thyoma 细胞的结合。

例如，并不是限制，可如下通过流式细胞仪评价存在于特定细胞类型(“测试细胞”)上的 CD40CR。可用静息(阴性对照)和活化(阳性对照) $T_h$ 细胞平行测试受试细胞。所有细胞以约 $1 \times 10^5$ 细胞/50μl 的浓度与配体(如 CD40-Ig 或 MR1)在 4℃ 培养 20 分钟，然后加入 FITC-偶合的抗-配体的抗体。可在所有样品中加入终浓度为 2μg/ml 的碘化丙锭。然后在例如 BD FACSCAN 上进行流式细胞仪分析。在正向门控细胞前向散射与侧向散射后，红色为阴性(因为碘化丙锭排阻)，可确定活细胞的绿色荧光对数。

本发明提供大致纯 CD40CR。可通过下述方法，由携带 CD40CR 的细胞如活化的辅助性 T 细胞、Jurkat 和 HSB2 细胞制备这种 CD40CR。

可按照 Noelle 等所述(J. Immunol., 146:1118-1124 (1991))，通过不连续蔗糖梯度的沉降作用，从合适的细胞如活化的 $T_h1$ 细胞，制备细胞浆膜。然后可通过以下方法分离 CD40CR：用温和去污剂抽分离膜粗提取物，之后进行尺寸排阻层析，再后用结合到固体支持物上合适配体(如 MR1 或 CD40-Ig)进行亲和层析、免疫沉淀(如用 CD40-Ig 或 MR1)和/或凝胶电泳。

可以预期所产生的蛋白质的分子量约为 39 kD。

本发明提供可溶性 CD40CR (即无细胞)，该可溶性 CD40CR 可包含在与合适的载体一起组成的药用组合物中。它更进一步提供与第二个分子结合的 CD40CR，所述第二个分子可以是肽、蛋白质、脂类、碳水化合物、酶、毒素、生长因子、淋巴因子、抗增殖剂、烷化剂、抗代谢剂、抗生素、长春花生物碱、铂配位配合物、放射性同位素或荧光化合物。

本发明进一步提供通过化学合成或 DNA 重组技术制备的大致纯 CD40CR。例如，可通过将从活化的辅助性 T 细胞制备的 cDNA 插入到λgt10 表达系统中，然后用 MR1 或 CD40-Ig 结合筛选，以鉴定 CD40CR-表达克隆，从而分离出 CD40CR 的基因。或者，可将从活化的辅助性 T 细胞制备的 cDNA 转染到 COS 细胞中，用 MR1 或 CD40-Ig 筛选转染细胞的上清液，鉴定 CD40CR 产物。然后可应用本领域已知的表达系统将 CD40CR 的基因用于表达 CD40CR。

本发明提供利用与 CD40CR 结合的配体控制 B 细胞激活的方法。具体地讲，它提供抑制 B 细胞激活的方法，包括将 B 细胞和 $T_h$ 细胞的混合物暴露于与 CD40CR 结合的有效浓度配体。在前面 5.1 部分对可应用的配体已有说明。可以在体外或体内实施本发明的方法。有效浓度指能抑制 B 细胞激活的配体的浓度，可用本领域已知的任何技术(包括前述 5.2 部分所述技术)测定，至少约 30%，优选约 75%。根据本发明优选的、特定的非-限制性实施方案，可将 CD40-Ig 用作配体，在此情况下有效浓度可以至少是约 10μg/ml。在本发明的另一个具体的非-限制性实施方案中，可应用 MR1 单克隆抗体，在该情况下有效浓度可以至少是约 10μg/ml。如果在体内实施所述方法，配体的有效浓度指配体的血浆浓度或局部浓度。例如，最好是在局部区域抑制 B 细胞的激活，以便于限制对整个免疫系统的影响。

在具体的实施方案中，本发明提供治疗患有与 B 细胞激活有关的疾患的受治疗者的方法，包括对受试者给予治疗量的与 CD40CR 结合的配体。受试者可以不是人类或优选人类。

与 B 细胞激活有关的疾患包括但不局限于变态反应(包括过敏症)；自身免疫性疾病，包括药物性狼疮、系统性红斑狼疮、成人类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、硬皮病、Sjogren 氏综合征等；以及涉及 B 细胞的病毒性疾病，包括 EB 病毒(Epstein -Barr)感染和包括人类免疫缺陷病毒感染的逆转录病毒感染。

由于已提出 B 细胞激活与诱发潜伏期人类免疫缺陷病毒复制有

关，最好是将本发明的所述配体给予那些还未发展为艾滋病(AIDS)或 ARC 的人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性个体。

如上所述，及在下述实施例中，特别优选使用抗-gp39 抗体或其片段，包括其在药物性狼疮或系统性红斑狼疮中的应用。如下述实施例的基本数据和实验所证实，已发现所述抗-gp39 抗体的治疗减少了自身抗体的产生和减轻肾病，并使 NZB/NZW (公认的人类 SLE 的动物模型)存活期延长。

此外，在蛋白尿 2-3+的小鼠(活动性狼疮状态)中进一步证实，给予抗-gp39 抗体竟然逆转病情(证据是给予抗体后生存期延长和无蛋白尿)。因此，在公认的人类狼疮的动物模型发生肾病后，用抗-gp39 抗体治疗显示，逆转狼疮病进程。这证实在治疗狼疮和其它自身免疫性疾病中，抗-gp39 抗体用于人类的治疗用途的可能性。特别是它证实了可将这类抗体用于治疗活动性进行性疾病、甚至处于疾病晚期阶段的患者。这种治疗将有效地治疗甚至可能逆转疾病进程如狼疮患者常见的肾损害。

在合适的药用载体中，可通过本领域已知的任何方法给予配体，包括静脉注射、腹腔注射、皮下注射、鞘内注射、关节内注射或肌肉注射，以及口腔、鼻内、眼内和直肠给药，并且其可微球体、脂质体和/或缓释植入物中。

将配体的治疗量定义为可显著减轻 B 细胞激活或 T 细胞活化的临床有害影响的量，并且可随所用的配体和所治疗而变化。如果应用 CD40-Ig，则无论是系统(血浆浓度)或局部治疗浓度可以为约 10μg/ml。如果应用 MR1 或其它抗-gp39 抗体，如人源化或嵌合型抗-人 gp39 抗体或其片段，则无论是系统(血浆浓度)或局部治疗浓度可以是约 10μg/ml。

在本发明的进一步的实施方案中，上述方法可利用含有毒素或抗代谢剂的配体，这样将杀死 $T_h$ 细胞或使其受损，因为破坏 $T_h$ 细胞使得增加 B 细胞激活。

也可用本发明的配体来标记活化的T细胞，是一种可用于T细胞疾病的诊断的技术。为此，可将含有酶、放射性同位素、荧光化合物或其它可检测标记的配体体外或体内暴露于T细胞，测定所述结合量。

也可将本发明的配体用于传递活化T细胞的物质如生长因子。

本发明提供利用CD40CR或含CD40CR的分子控制B细胞激活的方法，所述CD40CR或含CD40CR的分子是按照前述方法制备。具体地说，提供促进B细胞激活的方法，包括将B细胞暴露于有效浓度的CD40CR。可在体内或体外实施该方法。有效浓度指诱导B细胞激活的受体的浓度，可通过本领域已知的任何技术测定，至少约30%。在本发明特定的、非限制性实施方案中，局部或系统的CD40CR浓度可为约10μg/ml。

在具体的实施方案中，本发明给患有与体液免疫减弱有关的免疫缺陷疾病的受试者提供治疗方法，包括给予受试者治疗量的CD40CR。受试者可以不是人类，但是优选人类。

与体液免疫减弱有关的免疫缺陷疾病包括获得性免疫缺陷，如由化疗或放射治疗导致的，以及涉及到体液免疫的遗传性疾病。

在合适的药用载体中，可通过本领域已知的任何方法给予CD40CR，包括静脉注射、腹腔注射、皮下注射、鞘内注射、关节内注射或肌肉注射，以及口腔、鼻内、眼内和直肠给药，并且它可包含在微球体、脂质体、和/或缓释植入物中。

CD40的CD40CR治疗量定义为可至少增加产生约30%免疫球蛋白的量。

在进一步的实施方案中，可将CD40CR偶合到毒素上，给予处于优选破坏表达CD40的B细胞的情况下的受试者。这种情况的实例包括接受器官移植或患有多发性骨髓瘤或其它B细胞恶性肿瘤或自身免疫病的患者。

也可将CD40CR用于标记表达CD40的B细胞，为一种可用于

B 细胞疾病的诊断的技术。为此，将与酶、放射性同位素、荧光化合物或其它可检测标记结合的受体体外或体内暴露于 B 细胞，并测定所述结合的量。

也可用 CD40CR 将与其结合的分子传递给 B 细胞。

## 实施例 1

## 活化的辅助性 T 细胞上的新型受体 CD40CR 结合 CD40 并转导 B 细胞关联性激活信号

### 材料和方法

#### 动物

将雌性 DBA/2J 小鼠(Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)用于制备填料细胞(filler cell)以支持 $T_h$ 克隆的生长，并用于制备静息 B 细胞。

D 1.6 为一种 I-$A^d$-限制性的兔免疫球蛋白-特异性 $T_h1$ 克隆(Kurt-Jones 等, J. Exp. Med., 166:1774-1787 (1987))，得自 David Parker 博士(University of Massachusetts, Worcester)。D 1.6 在本文称为 $T_h1$。

按照 Noelle 等(J. Immuno., 146:1118-1124 (1991))所述，将 $T_h1$(8 × $10^6$/孔)于簇集孔(6 孔板, Corning, NY)中培养，该板各孔已用抗-CD3 40μg/4ml PBS 包被 16 小时。

按照 Noelle 等(同上)所述，通过不连续蔗糖梯度沉降制备细胞浆膜。

按照 Defranco 等(J. Exp. Med., 155:1523 (1982))所述，通过在不连续珀可(Percoll)梯度沉降制备静息脾 B 细胞。从 70-75% (密度为 1.087-1.097)珀可的界面分离的细胞通常>95% $mIg^+$，具有均匀、低度接近前向的光散射并且对 Con A 不应答。

用离子交换 HPLC 从小鼠(该小鼠经过辐射并且骨髓业已重建)腹水中纯化下述单克隆抗体：抗-CD3：145-2C11 (Leo 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:1374-1378 (1987))；抗 -α，β:H57-597；抗 -

CD4:GK1.5 (Wilde 等, J. Immunol., 131:2178-2183 (1983)); 抗-ICAM:YN1/1.7.4 (Prieto 等, Eur. J. Immunol., 19:1551-1557 (1989)); 抗-LFA-1: FD441.8 (Sarmiento 等, Immunol. Rev., 68:135 (1982)); 以及抗-大鼠/仓鼠 κ 链: RG-7 (Springer, Hybrid., 1:257-273 (1982))。

通过用限制性酶 Pst I (P)和 Sau 3A(S3)消化质粒制备 CD40 的融合蛋白，该质粒含有编码 CD40 抗原的 cDNA (Stamenkovic Seed, EMBO J., 8:1403-1410 (1989))。将这一 P/S3 片段亚克隆到同样的质粒中，该质粒用 P 和 Bam H1 (B)消化。允许制备编码从跨膜结构域上游截断的 CD40 蛋白质的 CD40Δ。然后将编码 CD40Δ的 DNA 片段亚克隆到该免疫球蛋白融合质粒中(Aruffo 等, Cell, 61: 1303-1313 (1990))，用 MIu I 和 B 消化。按照 Aruffo 等所述(Cell, 61: 1303-1313 (1990))，通过瞬时转染到 COS 细胞中产生所述 CD40-Ig 融合蛋白并将其在蛋白 A 柱上纯化。

白细胞介素 4(IL4): 重组鼠 IL4 由 C. Maliszewski 和 K. Grabstein 博士慷慨提供(Immunex Corporation, Seattle, WA.)。

白细胞介素 5(IL5): 重组鼠 IL5 购自 R&D 研究所(Sarrento, CA.)。

将 $3 \times 10^4$ 静息 B 细胞在 A/2 微量滴定板孔(Costar, Cambridge, MA)中培养于 50μl cRPMI 中。向这些孔中，加入 0.5μg $T_h1$ 或 $T_h2$ 膜蛋白。在 42-48 小时，各孔用 2.5μCi $^3$H-尿嘧啶核苷(New England Nuclear, Boston, MA)施以脉冲，收集各孔，并通过液体闪烁分光术测定放射活性。所述结果以 cpm/培养物+/-标准差表示。

如上所述培养静息 B 细胞。向培养孔中，加入 0.5μg $T_h1$ 膜蛋白、IL4 (10ng/ml)和 IL5 (5ng/ml)。培养第三天，加入另外的 50μl cRPMI。培养第六天，收集各孔的上清液并按 Noelle 等(J. Immunol., 146:1118-1124 (1991))所述，测定 IgM 和 $IgG_1$ 的量。

将 $4 \times 10^4$ 静息 B 细胞在 A/2 微量滴定板孔(Costar, Cambridge, MA)中培养于 50μl cRPMI 中。向这些孔中，加入 $1 \times 10^4$ 静息或活化、辐射的(500 拉德(rad)) $T_h1$ 和 IL4 (10ng/ml)，培养第三天，按照 Noelle

等在 J. Immunol., 146:1118-1124(1991)中所述，各孔用 1μCi $^{3}$H-胸腺嘧啶核苷脉冲处理。

将 5-10 × $10^{4}$ 活化的 $T_h1$ (D1.6)隔周腹腔注射，持续免疫仓鼠 6 周。当抗鼠 $T_h1$ 的血清滴度大于 1: 10,000 时，采用免疫仓鼠的脾细胞和 NSI，用聚乙二醇进行细胞融合。用流式细胞仪在静息和活化 $T_h1$ 上筛选含有生长的杂交瘤的孔的上清液。进一步测试一种能产生选择性识别活化 $T_h$ 的单克隆抗体的特定杂交瘤，并将其亚克隆以衍生 MR1。在腹水中产生 MR1 并通过离子交换 HPLC 纯化。

收集静息和活化 $T_h$ (与抗-CD3 一起 16 小时)并以 1 × $10^{5}$ 细胞/50μl 与融合蛋白在 4℃培养 20 分钟，然后加入 FITC-偶合的羊抗-人(h) IgG (25μg/ml; Southern Biotechnology, Birmingham, AL)。在所有样品中加入碘化丙锭至终浓度为 2μg/ml。在 BD FACSCAN 上进行流式细胞分析。在正向门控细胞前向散射与侧向散射后，红色为阴性(因为碘化丙锭排阻)，可确定活细胞的绿色荧光对数。

阳性细胞百分率和 MFI 的测定至少要分析 5,000 存活细胞。用 MR1 染色利用 FITC-偶合的 RG7，为小鼠抗-大鼠/仓鼠κ 链的单克隆抗体。

用不溶性抗-CD3 静息或活化 $T_h1$ 16 小时。用 1mCi [$^{35}$S]-甲硫氨酸/半胱氨酸标记静息和活化 $T_h$(20 × $10^{6}$/ml)的蛋白质 1 小时，此时如所述(Noelle 等，(1986) J. Immunol., 137:1718-1726)，将其用含 10% 胎牛血清的 RPMI 洗涤两次并在抽提缓冲液中溶解所述细胞沉淀。向 500μl 的溶解物(相当于 5 × $10^{6}$ 细胞)中加入纯化的抗体或融合蛋白(1-10μg)于 4℃作用 16 小时。此时，将溶解物移至含有 50μl 填充蛋白 A-琼脂糖的试管中。将沉淀蛋白 A-琼脂糖重新悬浮并将试管于 4℃振荡孵育 1 小时。然后用 3 × 高严格性洗涤缓冲液洗涤样品。将沉淀的蛋白 A-琼脂糖重新悬浮于 30μl 的 SDS 样品缓冲液中，并在 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。在电泳凝胶后，固定所述凝胶并进行荧光自显影。

为确定所述细胞表面分子，该分子介导由 $PM^{ACT}$ 诱导进入 B 细胞周期，向 $PM^{ACT}$ 和 B 细胞的培养物中加入针对 $T_h$ 膜蛋白的单克隆抗体。$PM^{ACT}$ 诱导 B 细胞的 RNA 合成是用 $PM^{REST}$ 观测的 8 倍(图 1A)。单独或以结合形式加入抗-LFA-1、抗-CD4、抗-ICAM-1，都不能抑制由 $PM^{ACT}$ 引起的 B 细胞 RNA 合成。

在人类体系中，已证实抗-CD40 的单克隆抗体诱导 B 细胞增殖(Clark 和 Lane, (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:97-127)，因此暗示 CD40 是 B 细胞的重要触发分子。为测定 CD40 是否参与由 $PM^{ACT}$ 引起的 B 细胞 RNA 的合成，将人 CD40 的细胞外结构域和人 $IgG_1$ (CD40-Ig) 的 Fc 结构域的可溶性融合蛋白加入到 $PM^{ACT}$ 和 B 细胞的培养物中。制备从 $T_h1$ 和 $T_h2$ 衍生的 $PM^{ACT}$ 并将其用于刺激 B 细胞 RNA 的合成。CD40-Ig 加入培养物导致对 B 细胞 RNA 合成的剂量依赖性的抑制，由 $T_h1$ 和 $T_h2$ 衍生的 $PM^{ACT}$ 引起，而 CD40-Ig 约为 5μg/ml。而 CD7E-Ig 融合蛋白(Damle 和 Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6403-6407 (1991))甚至当应用 25μg/ml 时仍无作用。

为研究 CD40-Ig 是否抑制由 T-非依赖性活化剂引起的 B 细胞的激活，在有 LPS 和 CD40-Ig 存在下培养 B 细胞。第二天，评定 RNA 合成(图 1C)。CD40-Ig 对由 LPS 引起的 B 细胞激活无抑制作用，但抑制 B 细胞对 $PM^{ACT}$ 的应答。

在 $PM^{ACT}$、IL4 和 IL5 存在时，B 细胞多克隆性分化产生 Ig(Hodgkin 等，(1990) J. Immunol. 145:2025-2034; Noelle 等,(1991) J. Immunol. 146:1118-1124)。为评价这一过程中对 CD40 信号的需要，在培养初始、或在培养的随后数天加入 CD40-Ig。在培养初始 CD40-Ig 的加入(图 2A)与其缺乏时的对照水平相比，其对产生多克隆 IgM 和 $IgG_1$ 的抑制大于 95%。与此相反，在培养的第一天和第二天 CD40-Ig 的加入则表明，其对 IgM 和 $IgG_1$ 的产生的抑制作用即使有的话，也是极微小的。这些数据表明 24 小时后，通过 CD40 发出的信号对于 B 细胞的分化分泌 Ig 不再是必需的。

因此，数据进一步提示了 CD40 参与了 $PM^{ACT}$ 引起的 B 细胞的激活。为证实 CD40 也和由完整、存活、活化的 $T_h$ 引起的 B 细胞的激活有关，进行了研究。用不溶性抗-CD3 激活 $T_h1$ 16 小时，收集并辐射所述 $T_h1$。在 IL4 存在下，将该辐射过的 $T_h1$ 与 B 细胞一起培养并在培养第三天检测 B 细胞的增殖。用 $T_h1$ 达到 B 细胞增殖时需要外源性的 IL4，因为 $T_h1$ 不产生 IL4 (Noelle 等，(1989) J. Immunol. 143:1807-1814)。与用 $PM^{ACT}$ 的观察相同，CD40-Ig 以剂量依赖性方式抑制由辐射过的 $T_h$ 引起的 B 细胞的增殖(图 2B)。其阴性对照，CD7E-Ig 未显示明显作用。

为观察活化的 $T_h1$ 是否表达对 CD40 的结合蛋白，将静息和活化的 $T_h1$ (16 小时)用 CD40-Ig 或 CD7E-Ig 染色，随后用 FITC-抗-HigG。通过流式细胞仪法评估 CD40-Ig 的结合(图 3)。将用抗-CD3 激活 16 小时的 $T_h1$，而非静息 $T_h1$，用 CD40-Ig 而不用对照的 CD7E-Ig 染色，阳性率 56%。为鉴定该 CD40-Ig 结合蛋白，将 $T_h1$ 蛋白质用 [$^{35}$S]-甲硫氨酸/半胱氨酸生物合成性标记并用 CD40-Ig 或 CD7E-Ig 免疫沉淀蛋白质。将该免疫沉淀的蛋白质用 SDS-PAGE 分离并荧光自显影(图 4)。一条显著带的表观分子量为 39kD 和一条低分子量的带是β2 微球蛋白。在缺少单克隆抗体时，则看不到显著的带。也可从用 $^{125}$I 向量(vectorially)标记的活化 $T_h$ 中免疫沉淀 39kD 带，证实所述 39kD 蛋白质是膜蛋白。

研制了针对在活化 $T_h$ 上而不在静息 $T_h$ 上选择性表达的抗原的特异性单克隆抗体，用以鉴定引起 $T_h$ 效应阶段活性的 $T_h$ 分子。一种这样的单克隆抗体 MR1，识别在活化 $T_h1$ 上选择性表达的抗原。为研究 MR1 和 CD40-Ig 是否识别相同的分子，进行了流式细胞学和阻断研究。活化的而不是静息的 $T_h$ 细胞，其 CD40-Ig 和 MR1 的染色分别大约为 56%和 61% (图 6)。MR1，但不是另一仓鼠抗-T 细胞单克隆抗体抗α/β TCR，以剂量依赖性方式阻断活化 $T_h$ 细胞与 CD40-Ig 的染色。这些数据提示 CD40-Ig 和 MR1 识别 39kD $T_h$ 蛋白上的重叠或同一表

位。为进一步证实 CD40-Ig 和 MR1 识别相同的分子，通过从放射标记的 $T_h$ 溶解物中免疫沉淀蛋白质，鉴定结合 MR1 的所述抗原。CD40-Ig 和 MR1 两者均免疫沉淀 39kD 的蛋白质(图 4)。最后，39kD 蛋白质与 CD40-Ig 的免疫沉淀去除了由来自活化 $T_h$ 的放射标记的溶解物中的 MR1 识别的抗原，支持所述 MR1 抗原和 CD40 结合蛋白质是相同的这一原则。

用 MR1 进行功能性研究，以阐明这一单克隆抗体是否中和由 $PM^{ACT}$ 表达的活性。将 $PM^{ACT}$ 和 B 细胞单独、或在仓鼠单克隆抗体或 CD40-Ig 存在下培养。两种仓鼠单克隆抗体，抗α/β TCR 和α-CD3 不能抑制由 $PM^{ACT}$ 引起的静息 B 细胞的激活。与此相反，MR1 或 CD40-Ig 抑制 B 细胞激活(图 6)。

所述数据显示用单克隆抗体阻断突出的 $T_h$ 表面分子(LFA-1、CD4、ICAM-1、CD3、α/β TCR)不妨碍活化 $T_h$ 诱导进入 B 细胞周期的能力。与此相反，特异性针对 CD40 结合蛋白的 CD40-Ig 或单克隆抗体，以剂量依赖性方式阻断 T-依赖性 B 细胞的激活。而且，所述 CD40 结合蛋白被鉴定为是在活化而非静息的 $T_h$ 膜上选择性表达的 39kD 的蛋白质。特异性针对所述 39kD CD40 结合蛋白的 CD40-Ig 和单克隆抗体二者均阻断由 $PM^{ACT}$ 引起的 B 细胞的激活。

尽管许多膜蛋白与 $T_h$-依赖性 B 细胞发送信号有关，但此处提供的证据排除了某些分子(LFA-1、CD4、CD3、α/β TCR 、ICAM-1)的作用，暗示 CD40 作为 B 细胞受体用于由 $T_h$ 关联发送信号。数据显示特异性针对 CD40 结合蛋白的 CD40-Ig 和单克隆抗体抑制 $T_h$-依赖性 B 细胞的激活。

CD40 的配体是表达于活化的、而非静息的 $T_h$ 上的 39kD 的蛋白质。生化研究指出，该 39kD 蛋白质是一单链分子，因为电泳的迁移不受还原剂的影响。根据在该研究中提供的功能性研究，活化的 $T_h1$ 和 $T_h2$ 二者均表达所述 39kD CD40 结合蛋白。这与所述功能性研究是一致的，所述研究显示 $T_h1$ 和 $T_h2$ 二者均诱导 B 进入细胞周期。

在试图进一步鉴定所述 39kD 蛋白质的特征时，将编码分子量范围为 39kD 的 CD 蛋白质(Cd53、CD27 和 CD69)的 cDNA 瞬时转染到 COS 细胞中并测试所述细胞的 CD40-Ig 的结合。没有一个转染细胞表达结合 CD40-Ig 的蛋白质。因此猜测该 39kD 蛋白质不是这类 CD 蛋白质中的一种。

在 $T_h$ 和 B 细胞间传导信号的生化基础是令人难以捉摸的。对作为辅助性 T 细胞传导信号的分子的 CD40 的鉴别，引起对已知偶合于 CD40 分子的特异性生化途径的关注。借助于其胞外区域的 4 个富含半胱氨酸的基元的存在，CD40 成为神经生长因子受体(NGFR)家族的一员。已表明单克隆抗体通过 CD40 发送信号(Uckun 等, J. Biol. Chem. 266:17478-17485(1991))参与酪氨酸激酶的激活，结果增加了肌醇三磷酸的产生和至少 4 个独特的丝氨酸/苏氨酸激酶的激活。基于从所述 NGF 受体家族其它成员发送信号中获得的信息，预期活化 $T_h$ 和 B 细胞间的相互作用将在同一生化过程许多环节中产生作用。

关于免疫荧光结合研究，用生物素-琥珀酰亚胺(Sigma)将 CD40 Ig 融合蛋白与生物素偶合。然后通过用藻红蛋白(PE)-链霉亲和素(Becton-Dickinson)的二步染色法和 Coulter Epics C 仪器进行流式细胞学分析。筛选多个 T 细胞系的代表结果在下面提呈。发现 Jurkat 和 HSB2 细胞系特异性地结合，而其它 T 细胞系包括 CEM、HPBALL 和小鼠 thyoma 则不与 CD40 Ig 融合蛋白结合(图 7)。

## 实施例 2

## 用于治疗或预防狼疮的抗 gp39 抗体的应用

系统性红斑狼疮(SLE)是一种特征为产生多种致病性自身抗体(Boumpas, Ann Int Med, 1995)的疾病。这些抗体直接通过识别正常细胞上的抗原决定簇或间接通过免疫复合物的形成而引起损害，所述免疫复合物可沉积于正常组织中并激活补体级联系统。

如同正常的抗体应答一样，目前从对近亲交配的小鼠品系的 SLE

和类-狼疮病的研究中已了解清楚，狼疮 B 细胞自身抗体的产生依赖于 $CD4^+$的辅助性 $T(T_h)$细胞的协同作用。实施例来自于传统的 SLE 小鼠模型的研究，该模型为在许多方面(包括自身抗体的产生和免疫复合物性肾小球肾炎的发生)与人 SLE 相似的 NZB/NZW 的雌性后代病鼠。用给小鼠减少抗-CD4 抗体的治疗方法阻止并确实逆转了肾炎。不幸的是，从治疗的角度来说，对人类自身免疫性疾病甚至是抗-CD4 抗体的短暂性治疗试验，也可在某些病例中引起该重要的淋巴细胞的亚群的长期衰竭。而且抗-CD4 抗体在诸如类风湿性关节炎的疾病中的小规模临床试验中的功效令人失望。

更特异性的免疫抑制是切实可行的，因为鉴定了参与 $T_h$ 细胞辅助的数种分子相互作用，使得可以仅靶向提供积极参与为抗体产生提供帮助的 Th 细胞。一个实例是通过 $T_h$ 细胞上的 CD28/CTLA4 和 B 细胞上的 B7.1/B7.2 之间的相互作用传递第二信号。针对此二者的任何一个参与者的阻断抗体可在体外使 T 细胞低应答。当给予 NZB/NZW 小鼠甚至疾病晚期病鼠时，目前含有小鼠细胞外结构域 CTLA-4 与小鼠 Ig Cg2a 链结合的融合蛋白显示出可阻断自身抗体的产生，据推测是在所治疗小鼠中通过竞争性抑制 B7.2 与内源性 CTLA-4 的结合发挥作用。

## 实验结果

我们在 NZB/NZW 鼠中研究了给予抗-CD40L 抗体对 4 到 10 月龄 SLE 小鼠的效应。抗-CD40L 抗体的治疗显著减少了这些小鼠的抗-DNA 自身抗体的产生，缓解了肾病并延长了生存期，在治疗小鼠中未引发抗-抗体应答或容易引起明显的体液免疫系统的损害。这些数据包含于图 6 中。在 11 月龄时，60%的抗-CD40L 抗体治疗的小鼠仍然存活，而不是未治疗或 Hig 治疗的小鼠(图 9)。对抗-CD40L 抗体治疗后的长期存活者的肾组织学检查显示微不足道的病理变化并且在肾小球没有明显的免疫沉积。

获得的数据也提示，抗-CD40L 抗体疗法可避免两个主要的使用抗-淋巴细胞的细胞表面分子的抗体的免疫疗法顾虑：发生抗-抗体应答和治疗后长期免疫抑制。在我们的一组实验(cohort)中，对抗-CD40L 抗体治疗有效、在 11 个月时存活的小鼠未发生抗-抗体应答，在接受另一种属来源抗体的动物中几乎是一固定现象。我们推测这是由于抗-CD40L 抗体防止了针对自身的抗体的产生。在用相同的抗-CD40L 抗体 MR-1 处理的正常小鼠研究中，未观察到抗-MR-1 的应答，提示我们在 NZB/NZW 小鼠上观察到的应答可能代表一种局限于自身免疫性小鼠的特别的超敏反应。总之，这个观察对于抗-人 CD40L 抗体的治疗性应用具有重要意义，因为用抗-CD40L 抗体特别是用“人源化”型抗体治疗避免抗体治疗的严重并发症。在我们的研究中，发生抗-抗-CD40L 抗体应答的小鼠在其抗-DNA 抗体的产生或生存方面并不比对照小鼠好，提示无论如何，抗-CD40L 抗体不能防止该类小鼠的产生抗体防。抗-抗-CD40L 抗体的产生可导致快速清除随后给予的抗-CD40L 抗体，并因此失去治疗疗效。为支持该观点，当用非特异性仓鼠 IgG 处理小鼠时，在抗-CD40L 抗体处理无反应小鼠亚群的肾小球中鉴定发现仓鼠抗体沉积，而抗-CD40L 抗体应答者则无此现象。这一观察与抗-抗-CD40L 抗体免疫复合物在连续给予抗-CD40L 抗体的肾脏中的形成和沉积是一致的，这可能使肾小球肾炎恶化而非预防。

最后，证实随着用抗-CD40L 抗体治疗的停止，至多 4 个月后抗-KLH 抗体应答能力恢复，确立所述抗体对体液免疫系统的免疫抑制作用是潜在可逆的，因此抗-CD40L 抗体的治疗法适用于人类治疗的应用。

在这些实验中，将 200μg 的 MR-1 每周两次腹腔注射给予 4-10 月龄 NZB/NZW 小鼠。同样，通过将 MR-1 剂量增加到 250μg，每周三次，腹腔注射 4 到 10 月龄小鼠的治疗方案，实现治疗。将这个剂量用于胶原蛋白-引起的类风湿性关节炎模型，导致治疗小鼠 100% 存

活(Durie, Science,1993)。应用这一方案，现在所述 NZB/NZW 小鼠在 11 月龄时都 100% 存活(图 10)，而小鼠的两个对照组在 10 月龄时全部死亡。

## 确定狼疮疾病的治疗

尽管目的是用抗-gp39 抗体防止 NZB/NXW F1 小鼠的 SLE，但是并没有预示可将这一抗体用于介入活动性进展性疾病状态。为测定是否可用抗体治疗而逆转所确立的疾病，使一组小鼠发展到用尿测验片测定有 2-3+蛋白尿(相当与 100mg/天到 500mg/天)。此时，将小鼠随机分组为继续不治疗组或接受 MR1(100μg/天)组。所述 10 只未治疗小鼠在 10 月龄时全部死亡。与此相对照，10 只 MR-1 治疗小鼠中的 5 只存活至 11 月龄。其中 3 只小鼠健康且无蛋白尿。然而，有趣的是，这些小鼠中有 1 只未出现高-滴度的抗-DNA 抗体(表 1)。5 只存活鼠中有 2 只表现出疾患并具高滴度的抗-DNA 抗体和 4+蛋白尿。

因此，发现在肾病发生后用 MR1 治疗可逆转部分小鼠的疾病。在 1 只应答小鼠中发现用 MR1 治疗逆转了蛋白尿，但未逆转抗-DNA 抗体的产生，进一步增加了 MR1 发挥着不同于消除 T-依赖性抗体产生的其它机理的可能性。

同样，用肿瘤坏死因子(TNF-α)治疗 NZB/NZW 小鼠也显示能显著延缓肾炎的发展(Jacob, Science, 1988; Gordon, 1989)。令人感兴趣的是，在 NZB/NZW F1 小鼠中观察到的重型肾炎，部分是由于自 NZW 亲代获得的定位于 H-2 复合体上的显性基因。所述 NZW 小鼠具有降低的 TNF-α水平，该水平与位于 H-2 复合体中的 TNF-α基因的多态性有关。所述 NZB/NZW F1 小鼠也具有显著降低的 TNF-α的水平。此外，用抗-IL-10 抗体治疗的 NZB/NZW F1 小鼠基本上延迟了肾炎的发生并延长了存活期。当与抗- TNF-α抗体联合治疗时，在治疗小鼠中出现由 IL-10-诱导的 TNF-α水平上调介导的有益作用，消除了抗

-IL-10 应答。

在初步实验中，我们也用 ELISA 测定了小鼠 TNF-α的水平，该小鼠分别为给予前和给予后 MR-1 的 4 个治疗组。所述水平示于表 2。根据蛋白尿和抗-DNA 抗体产生的降低，仅有对 MR-1 治疗应答的小鼠证实了 TNF-α从治疗前的 2.16pg/ml 增加到治疗后的 35.01 pg/ml。这些数据提示所述 MR-1 效应至少可部分通过 NZB/NZW F1 小鼠的 TNF-α的增加介导。

此外，这些结果都证实利用抗-gp39 抗体和其活性片段用于治疗人类狼疮病即系统性红斑狼疮或药物引起的狼疮。特别是，可将这些抗体用于特征常表现为肾炎的活动性、进行性狼疮的治疗介入中。这类抗体应抑制所述疾病的进程，甚至有逆转病程的可能性。

表 1

| 年龄 (月) | MR1 治疗 (周) | 治疗后 蛋白尿 | 缓解 (周) | 用 MR1 再治疗 | 持续时间 (周) | 治疗后 蛋白尿 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 7 | 13 | +4 | N/A | N/A | - | - |
| 9 | 6 | 0 | 0 | 无 | - | - |
| 6 | 6 | 0 | 12 | 无 | - | - |
| 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 | - | - | - | |

表 2.

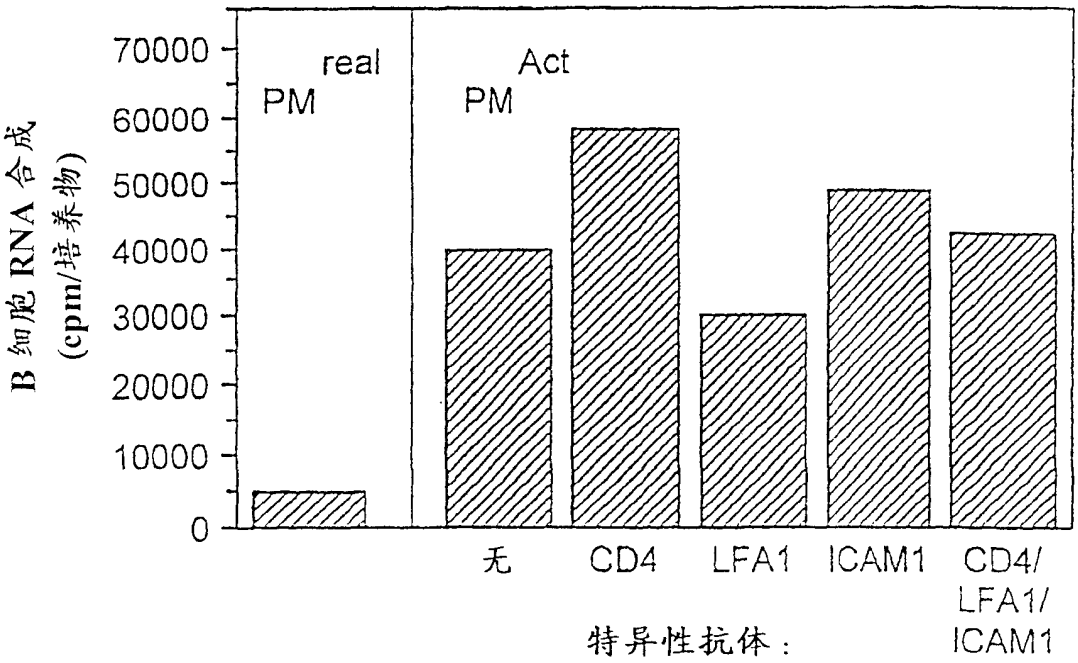
| 小鼠* | 所采样品的年龄(mos.) | TNF-α(pg/ml)# |
|---|---|---|
| 未治疗 | 2 | 5.5 |
| | 9 | 3.1 |
| MR-1 存活 | 2 | 2.2 |
| | 9 | 35.0 |
| MR-1 死亡 | 2 | 0.0 |
| | 8 | 4.3 |

*每一治疗组的 1 只小鼠。

#值表示用 TNF-α ELISA 试剂盒(Genzyme,Cambridge, MA)测定的复份的平均值。

本文引述的多种公开出版物通过引用整体结合到本文中。

图 1A


B 细胞 RNA 合成
(cpm/培养物)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
real PM
Act PM
无
CD4
LFA1
ICAM1
CD4/ LFA1/ ICAM1
特异性抗体：

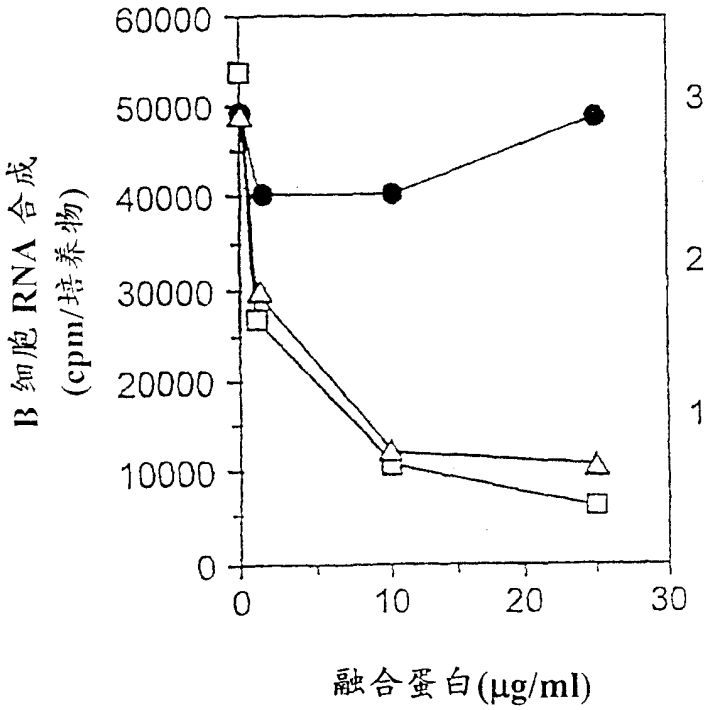

B 细胞 RNA 合成
(cpm/培养物)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
10
20
30
融合蛋白(μg/ml)

图 1B

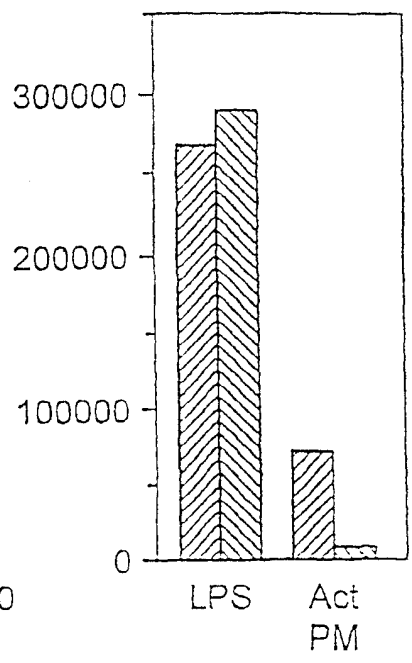

300000
200000
100000
0
LPS
Act PM
组别：

图 1C

图 2A

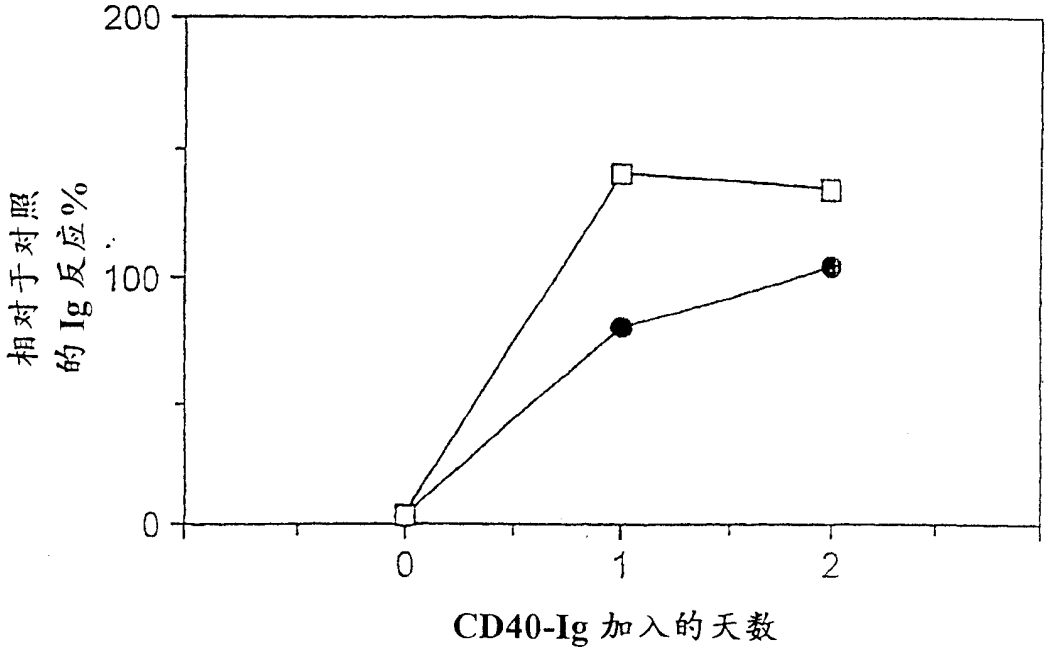

200
100
0
相对于对照
的 Ig 反应%
0
1
2
CD40-Ig 加入的天数

图 2B

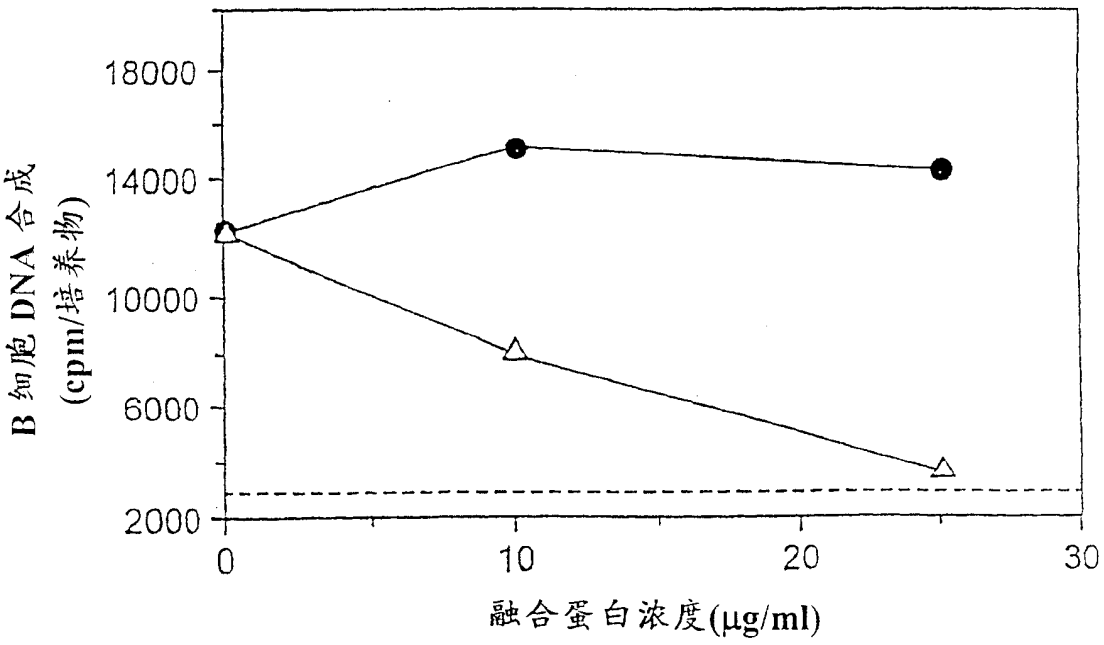

18000
14000
10000
6000
2000
B 细胞 DNA 合成
(cpm/培养物)
0
10
20
30
融合蛋白浓度(μg/ml)

图 3A

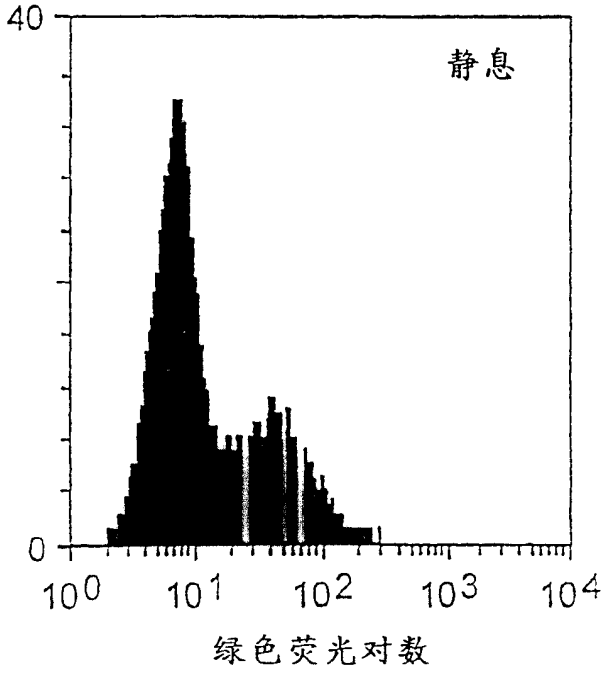

40
静息
0
$10^0$
$10^1$
$10^2$
$10^3$
$10^4$
绿色荧光对数

图 3B

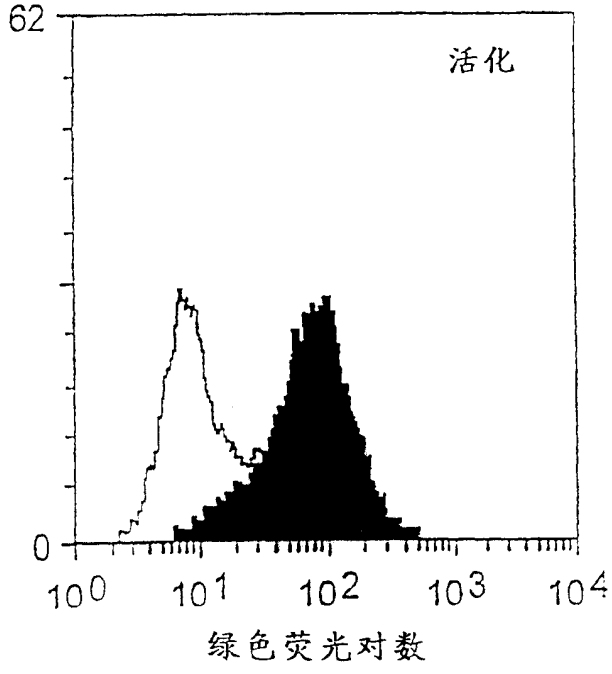
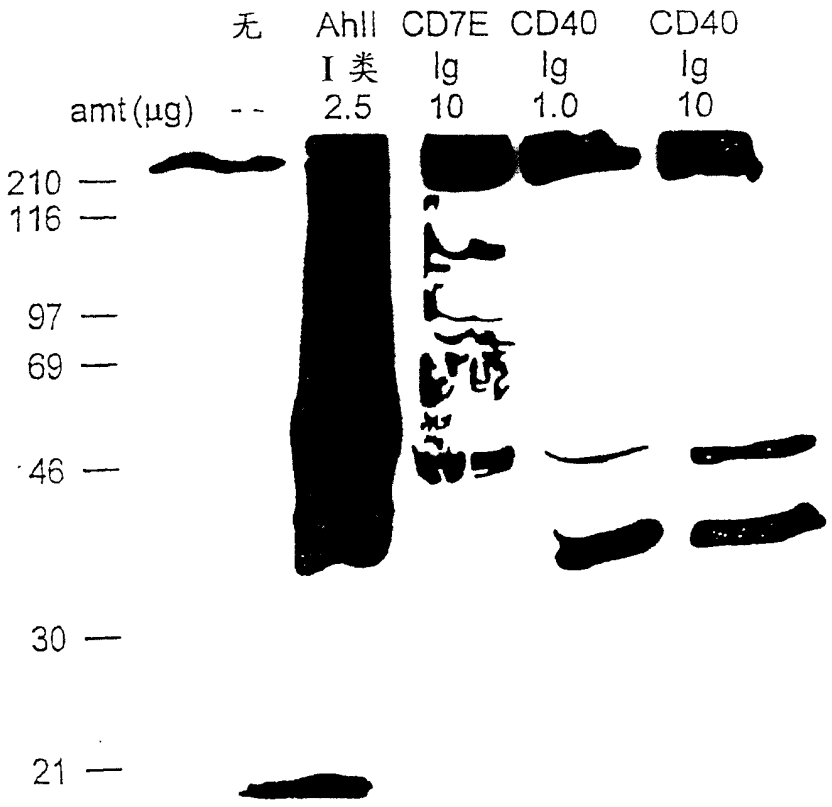
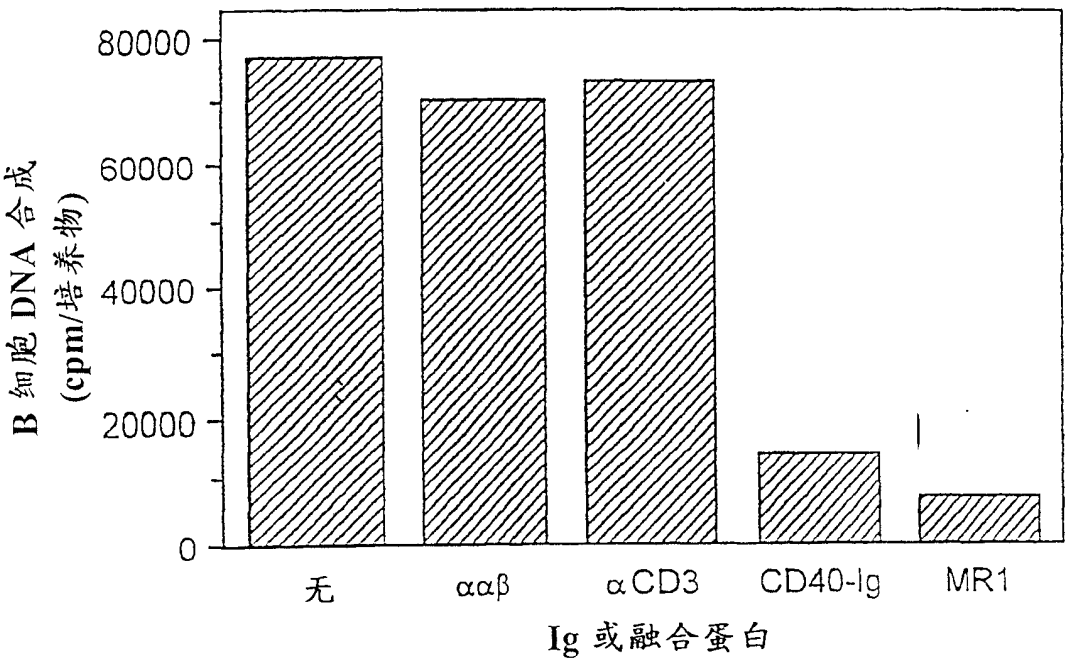

62
活化
0
$10^0$
$10^1$
$10^2$
$10^3$
$10^4$
绿色荧光对数

图 4


无
AhII
I 类
CD7E
Ig
CD40
Ig
CD40
Ig
amt(μg)
- -
2.5
10
1.0
10
210
116
97
69
46
30
21

# 图 5


80000
60000
40000
20000
0
B 细胞 DNA 合成
(cpm/培养物)
无
ααβ
αCD3
CD40-Ig
MR1
Ig 或融合蛋白

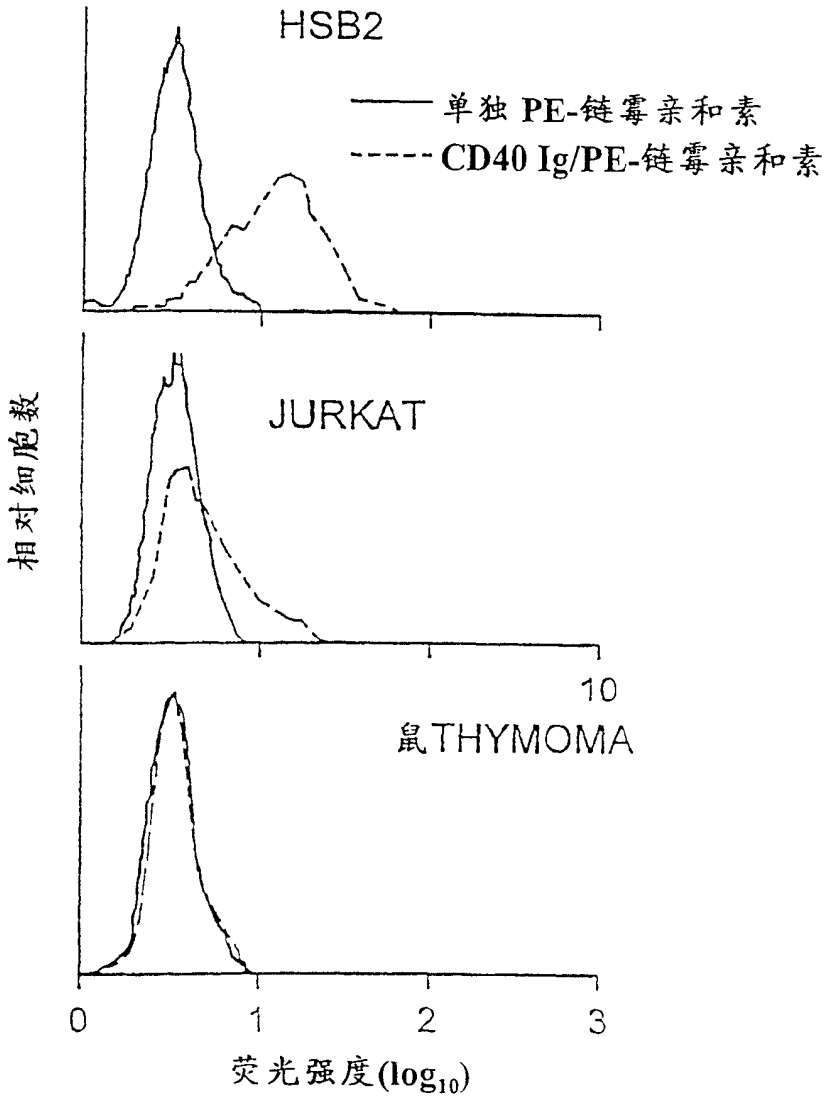
# 图 6A

| 染色 Ab<br>或融合蛋白 | 阻断 Ab | 静息 $T_h$ | 活化 $T_h$ |
|---|---|---|---|
| CD40 (50 μg/ml) | --- | 4.9 | 56.5 |
| MRI (50 μg/ml) | --- | 5.7 | 61.8 |
| | | | |
| CD40 (50 μg/ml) | MRI (50 μg/ml) | 5.0 | 11.7 |
| CD40 (50 μg/ml) | MRI (25 μg/ml) | --- | 20.7 |
| CD40 (50 μg/ml) | MRI (10 μg/ml) | --- | 30.3 |
| CD40 (50 μg/ml) | MRI (5 μg/ml) | --- | 49.5 |
| CD40 (50 μg/ml) | α–α,β(50 μg/ml) | --- | 63.0 |

# 图 6B



# 图 7


HSB2
单独 PE-链霉亲和素
CD40 Ig/PE-链霉亲和素
JURKAT
10
鼠THYMOMA
相对细胞数
0
1
2
3
荧光强度(log10)

# 图 8A-1

```
gcctcgctcc ccccccccagt ggtcctgccg cctggtctca cctcgcc atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc 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 ctc 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 ggt gaa agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac aaa 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 ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa
Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu

ggc tgg cac tgt acg agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg 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 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 gtg 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 gcc 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 ctc ttg gtc ctg gtc ttt atc aaa aag gtg gcc aag aag cca acc aat aag gcc ccc
Ile Leu Phe Ala Ile Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn Lys Ala Pro
```

# 图 8A-2

cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat ttt 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 cccacccagg agtgtcccca cgtgggcaaa caggcagttc cccacagacc ctggtgctgc tgctgcaccc
Arg Gln

ctccacgcag aagcggccag ctatgcccag tcagtgccag cccctc

# 图 8B

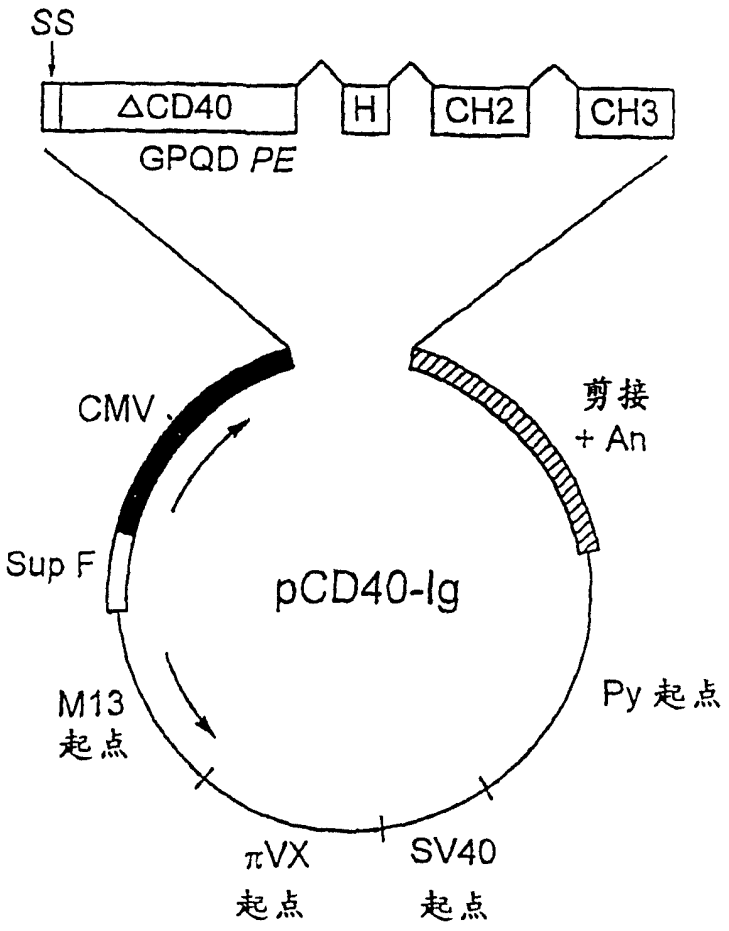
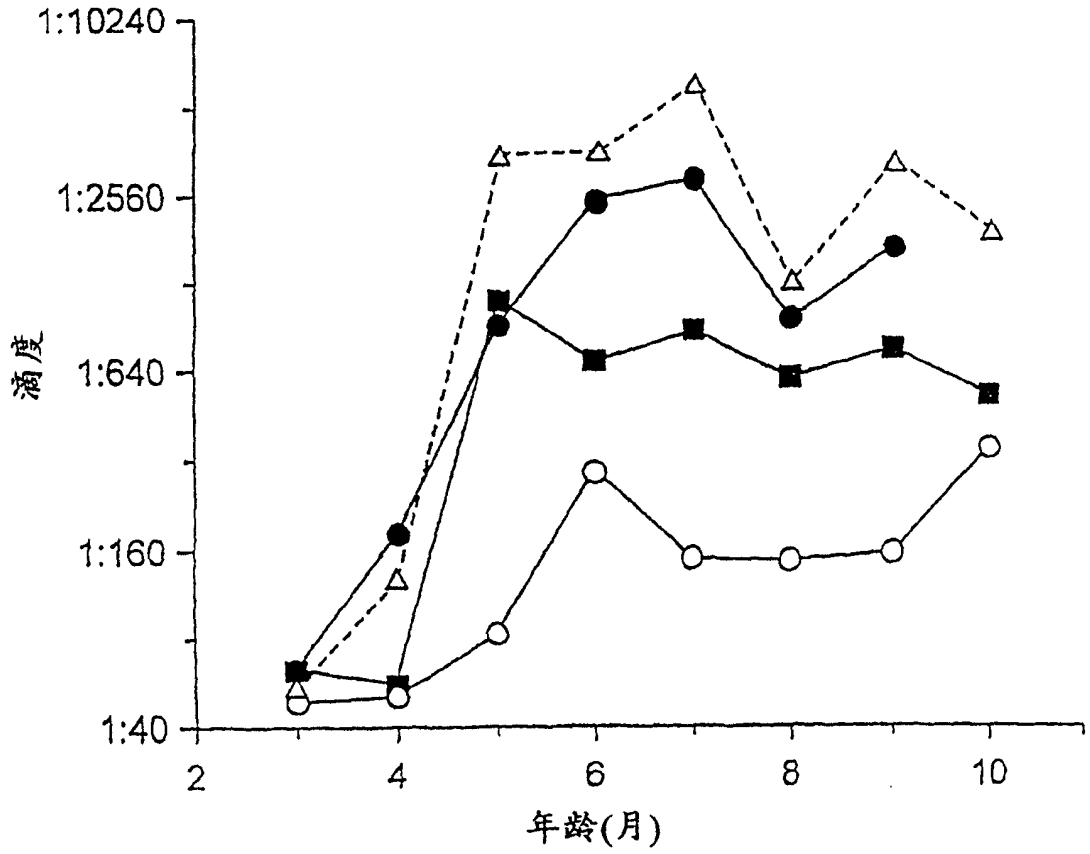

SS
ΔCD40
H
CH2
CH3
GPQD PE
CMV
剪接
+ An
Sup F
pCD40-Ig
M13
起点
Py 起点
πVX
起点
SV40
起点

图 9



# 图 10

