

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580007275.7

[51] Int. Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 3 月 14 日

[11] 公开号 CN 1929855A

[22] 申请日 2005.1.31

[21] 申请号 200580007275.7

[30] 优先权

[32] 2004.1.29 [33] GB [31] 0402051.7

[86] 国际申请 PCT/EP2005/000934 2005.1.31

[87] 国际公布 WO2005/074973 英 2005.8.18

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.6

[71] 申请人 苏珊·玛丽亚·梅特卡夫

地址 英国剑桥

[72] 发明人 苏珊·玛丽亚·梅特卡夫

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 3 页 说明书 36 页 附图 4 页

[54] 发明名称

诱导或调节免疫反应的方法

[57] 摘要

公开了促轴素，也称作 MARCH VII 适当地在脊椎动物，例如哺乳动物中诱导或调节对于外源或自身抗原的免疫反应的应用。作为本发明的其它方面还提供了分离的促轴素以及由促轴素编码或衍生的多肽和核苷酸，包含上述一种或多种的组合物和测定方法。

1. 促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸直接或间接地诱导或调节个体和/或离体细胞群对抗原的免疫反应的应用。

2. 促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸在生产直接或间接地诱导或调节个体和/或离体细胞群对抗原的免疫反应的药物中的应用。

3. 根据权利要求1或权利要求2的应用，其中所述免疫反应是在脊椎动物中，其中所述个体具有组织或细胞移植物。

4. 促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸或在个体中改变其量或活性的物质在生产加强或减弱针对抗原的攻击性免疫反应或改变免疫系统对抗原的耐受性的药物中的应用。

5. 促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸对于测定免疫状态的应用。

6. 一种在个体中控制免疫系统对于给定抗原的反应的方法，所述方法包括向个体施用促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸或提高由促轴素直接或间接表达的多肽的量或活性的物质。

6. 根据权利要求5的方法，包括加强或提高个体的免疫系统针对抗原的攻击性反应的方法，所述方法包括向个体施用降低由促轴素直接或间接表达的多肽的量或活性的物质。

7. 一种确定个体免疫状态的方法，所述方法包含测定促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸在测试样品中的表达水平，所述样品包括从个体中取出或获得的组织、细胞和/或体液，并将测试样品的水平与对照样品的水平进行比较，其中在测试样品中的水平大于对照样品中的水平表示个体中的免疫状态包含耐受性免疫反应，个体中的免疫状态包含攻击性免疫反应。

8. 分离的促轴素，由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸。

9. 一种生产促轴素多肽的方法，包括在允许表达促轴素多肽的条件下在培养基中使细胞的培养物生长，并从培养物或从宿主细胞中纯化

所述多肽。

10. 一种用于表达促轴素，由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸序列的载体，所述载体包含促轴素或编码促轴素的多核苷酸序列，启动子序列和终止序列。

11. 一种包含 促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸以及可药用的稀释剂、载体或赋形剂的组合物。

12. 一种筛选化合物的方法，包括将包含一种或多种待筛选的化合物的测试样品与选自促轴素，由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸和这种多核苷酸或多肽的片段的结合剂接触并确定所述化合物是否已经结合到所述结合剂上。

13. 根据权利要求 12 的方法，用于鉴定结合到促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸上的物质，其包括：

(a) 将某种物质与促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸接触；

(b) 确定所述物质是否结合到所述多核苷酸或多肽上；和

(c) 检测在所述物质和所述多核苷酸或多肽之间形成的复合物的形成，从而如果形成了复合物，则对所述物质进行检测。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中将所述化合物在细胞中与促轴素或促轴素的多肽或多核苷酸接触，其中所述复合物驱动受体基因序列在细胞中的表达，并且通过检测报道基因序列表达来检测所述复合物。

15. 一种试剂盒，其包含：

i) 一种多核苷酸或多肽探针和/或单克隆抗体，所述探针或抗体包含促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸；和任选地

ii) 用于实施根据任一项在前权利要求的方法的定量标准品。

16. 一种检测促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸的诊断方法，其包括：

(a) 将待测试由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸是否存在的样品与结合到由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸上的化合物接触；

(b) 确定所述化合物是否结合到所述样品的组分上；和

(c) 检测在所述样品和所述蛋白质或多核苷酸之间形成的复合物的形成，从而如果形成了复合物，则对所述多肽或多核苷酸进行检测。

17. 一种评估个体的免疫反应的诊断方法，包括从个体中获得测试样品，将所述测试样品与一种或多种促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸的抗体或多核苷酸探针一起温育并测定所述多核苷酸探针或抗体与测试样品内组分的结合。

18. 根据权利要求 16 或 17 的方法，其中步骤(c)包括用离体免疫细胞群进行测试。

19. 根据权利要求 16 或 17 的方法，其中步骤(c)包括体内测试。

20. 结合到由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸上的化合物在生产药物中的应用，所述药物用来治疗个体和/或离体细胞群以调节对于抗原的免疫反应。

诱导或调节免疫反应的方法

本发明涉及一种多核苷酸，由这种多核苷酸编码或衍生的多肽和蛋白质的应用，以及所述多核苷酸、多肽和蛋白质的用途，并且涉及诱导或调节对抗原的免疫反应的方法，进一步涉及测定个体对于给定抗原的免疫状态的方法。具体地，本发明涉及促轴素(axotrophin)，也称作 MARCH VII 适当地在脊椎动物，例如哺乳动物中诱导或调节对于外源或自身抗原的免疫反应的应用。本发明还提供分离的促轴素以及由促轴素编码或衍生的多肽和核苷酸，包含上述一种或多种的组合物和测定方法。

如本文所用的，提及促轴素包括提及与促轴素鉴定序列具有至少 75% 和 优选至少 90% 序列同一性的多核苷酸或多肽序列。发现促轴素在个体的免疫反应中发挥重要作用，使得它在多种分子生物学领域技术人员已知的技术中的许多应用成为可能，如用作杂交探针，用作 PCR 引物，用于阵列中，用于计算机可读介质中，用于对全长基因进行测序，用于蛋白质的重组生产，和用于生成反义 DNA 或 RNA，其化学类似物等等。

鉴定出来的多核苷酸和多肽序列在，例如，诊断学、法医学、基因图谱、鉴定是造成遗传病症或其它遗传特征的原因的突变、评估生物多样性、用作表达测定中的引物和产生许多其它类型的依赖于 DNA 和氨基酸序列的数据和产品中具有多种用途。促轴素是已知的并且促轴素基因的详细资料可以见于 GenBank 数据库和其它地方，有各种编号包括 AK022973 和 NM_022826.2 (人) 和 AF155739 和 NM_020575 (鼠)。人促轴素蛋白质序列可以在编号 NP_073737.1 下找到而鼠促轴素蛋白质可以在 NP_065600.1 下找到。这些序列在下面分别以序列识别号 001 - 004 给出。促轴素是被鉴定为在小鼠胚胎、神经和造血干细胞中富集的 216 种基因中的一种，如在 Science, Vol

298,597-600 18 October 2002 中所述, 并且表明(在表1中)参与信号和遍在蛋白途径。于2001年出版的 *Genes & Development* 15: 2660-2674 公开了小鼠蛋白促轴素具有 RING-CH 结构域并且是正常脑发育所必需的并且促轴素基因的破坏可以导致神经变性和胼胝体发育不全。从已出版的文献中几乎不能得知有关促轴素功能的信息。

本发明人现在发现促轴素在基因组、mRNA 和/或蛋白质水平上诱导或调节对抗原的免疫反应。据信调节可以通过反义 DNA 或 RNA 或结合分子来控制。另外, 已经发现促轴素调节 T 淋巴细胞增殖并调节白血病抑制因子 (LIF) 的释放, 例如如下面实施例中所示的从活化的 T 淋巴细胞中释放。W003/052424 披露了 c-kit (CD117), STAT3, 干细胞因子 (SCF) 和 LIF 在耐受性免疫反应中得以提高, 并且这些可以用于调节对抗原产生的免疫反应。LIF 鼠序列可以以 SWISSPROT P09056 获得。人序列可以以 SWISSPROT P15018 获得。

本发明提供促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸诱导或直接或间接调节对抗原的免疫反应的应用, 所述抗原可以是“外源”抗原(例如同种异体的, 异种的, 原核的, 病毒的或合成的)或自体的(“自身的”)抗原。

免疫反应可以在离体、体内或体外细胞群中操纵。

提及与本发明相关的任何免疫反应的“调节”都包括调节细胞群的表型发育和维持, 所述细胞群调节对给定抗原的免疫性。

本文提及“衍生自”促轴素的物质包括, 例如, 反义序列包括 RNAi, 单链或多链的, 和结合促轴素的多肽或多核苷酸的小分子, 包括抗体特别是单克隆抗体。提及“直接或间接”衍生自促轴素的物质包括任何这些多核苷酸或小分子。

本文提及“多肽”包括蛋白质并且特别是成熟蛋白质。

本发明还提供促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸在生产药物中的应用, 所述药物直接或间接地诱导或调节脊椎动物对抗原的免疫反应, 所述抗原可以是“外源”抗原(例如同种的, 异种异体的, 原核的, 病毒的或合成的)或自体的(“自身的”)抗原。

根据本发明生产的药物适于治疗个体以减轻移植组织、细胞或器官的排斥。

本发明进一步提供促轴素或由促轴素编码或衍生的多核苷酸调节LIF表达的应用。LIF可以诱导或直接或间接调节脊椎动物对抗原的免疫反应，所述抗原可以是“外源”抗原（例如同种异体的，异种的，原核的，病毒的或合成的）或自体的（“自身的”）抗原。

适当地，由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸使得对LIF敏感的癌性免疫细胞离体或在体内被靶标。

不希望被任何理论所束缚，据信促轴素还在基因组和/或蛋白质水平上调节Foxp3和SOCS3的表达并且这在T细胞调节中起作用。

本发明在另外的实施方案中提供了促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸在体内、离体或体外环境中于细胞群里诱导或调节T细胞增殖的应用。T细胞优选为T淋巴细胞。

有利地，本发明可以用于引导脊椎动物例如哺乳动物的免疫反应接受移植的器官、组织、细胞、基因或基因产物、人造物质，或任何其它用于体内的物质，例如为了治疗的目的。本发明特别可应用于干细胞在治疗或其它方面中的使用。

可以利用促轴素的免疫抑制性活性保护引入的生物材料免受免疫攻击，例如在细胞移植中，来治疗疾病，包括神经变性疾病，用于移植的组织如骨髓，皮肤，软骨，骨，腱，肌肉包括心肌，血管，角膜，神经细胞，胃肠细胞及其它，以及用于移植的器官包括肾，肝，胰包括胰岛细胞，心脏和肺。

适当地，可以在离体宿主免疫细胞中改进由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸或影响促轴素活性的调节性多肽或多核苷酸序列的表达以改变免疫反应来接受引入的生物材料。或者，或另外，可以离体对促轴素在生物材料中的表达进行调节以便当引入体内时携带免疫调节特性。

促轴素通过上调或下调T淋巴细胞以及实现NK细胞和其它细胞群的细胞溶解活性可以用于治疗免疫病症包括重度联合免疫缺陷病

(SCID)。这些免疫缺陷可能是遗传性的或由病毒性(例如 HIV)以及细菌性或真菌性感染造成的,或可能源自自身免疫病症。更具体地,由病毒性、细菌性、真菌性或其它感染引起的传染性疾病可以利用由促轴素编码或衍生的蛋白质或多核苷酸进行治疗,包括由 HIV、肝炎病毒、疱疹病毒、分枝杆菌、数种利什曼原虫、数种疟疾引起的感染和各种真菌性感染如念珠菌病以及在加强免疫系统通常可能是需要的情况下,例如在癌症的治疗中。

利用由促轴素编码或衍生的蛋白质或多核苷酸可以治疗的自身免疫病症包括,例如,结缔组织疾病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、自身免疫性肺炎、吉兰-巴雷综合征、自身免疫性甲状腺炎、胰岛素依赖性糖尿病、重症肌无力、移植物抗宿主疾病和自身免疫性炎性眼病。本发明的这种蛋白质(或其拮抗剂,包括抗体)还可以用于治疗变态反应和过敏症(例如,过敏反应、血清病、药物反应、食物过敏、昆虫毒液过敏、肥大细胞增生症、过敏性鼻炎、过敏性肺炎、荨麻疹、血管性水肿、湿疹、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、多形性红斑、多形糜烂性红斑、变应性结膜炎、特应性角膜结膜炎、性病性角膜结膜炎、巨乳头状结膜炎和接触性过敏症),如哮喘(特别是变应性哮喘)或其它与呼吸有关的问题。

在使用促轴素中,下调可能是抑制或阻抑已进行中的免疫反应的形式或者可能涉及防止免疫反应的诱导。

在免疫反应过程中促轴素在下调或防止一种或多种功能中例如在减少干扰素 γ 释放中的应用可以用于组织、皮肤和器官移植的情况和用于移植物抗宿主疾病(GVHD)。通过下调促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸上调攻击性免疫反应也是有用的。免疫反应的上调可以是增强现存免疫反应或引发初始免疫反应的形式。例如,增强免疫反应可以用于病毒感染的情况中,包括全身性病毒性疾病如流感和感冒。促轴素的调节适当地促进 T 细胞介导的针对肿瘤细胞的免疫反应。

促轴素的多肽可能参与调节哺乳动物细胞,包括,例如,单核细

胞、成纤维细胞、嗜中性白细胞、T 细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、上皮和/或内皮细胞的趋化性或化动活性。本发明提供趋化性或化动组合物例如包含促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸的蛋白质、抗体、结合伴侣，或调节剂，在创伤和其它组织损伤的治疗中，以及在局部感染的治疗中提供特别益处。例如，淋巴细胞、单核细胞或嗜中性粒细胞吸引到肿瘤或感染部位上可以导致针对所述肿瘤或感染因子的增强的免疫反应。

本发明还可以适当地用于引导免疫系统允许接受与自身免疫疾病或病症相关的抗原，或对该抗原至少减弱的攻击性反应，可以在自体免疫反应中引发先天性或适应性免疫反应。

另外，本发明可以用来引导免疫反应排斥器官、组织、细胞、病原体如原核生物、酵母或真菌、寄生虫或病毒、基因或基因产物、人造物质、或任何其它可以侵入或进入身体内或在体内生成的物质；其中该物质是有害的、致病的（例如赘生性组织或感染组织）或对宿主患者有害的。

本发明还可以用来在接种疫苗后增强针对抗原的免疫反应的程度，特别是在目前的疫苗接种方法在产生针对生物制剂的保护性免疫排斥反应中成功有限的情况之下，所述生物制剂包括例如与细菌战相关的生物制剂。

本发明的特别有利的方面是由特异抗原激活产生的反应的特异性。可以将免疫反应指向由体内信号途径调节引发的耐受性或攻击。在用抗原刺激后，可以按照本发明的各方面将响应细胞指向耐受性或攻击并且非响应细胞不受调节性适应影响。靶抗原自身触发响应细胞或响应细胞群；只能响应其它抗原的细胞不被触发，所以不能接受此时针对相关抗原的耐受性或攻击的引导。作为备选或补充，免疫细胞可以离体导向调节耐受性或攻击。可以取出免疫细胞，例如血液和/或脾的免疫细胞，在返回到个体之前用抗原处理并且导向耐受性或攻击。

如本文所用的，术语“抗原”具有本领域一般理解的意义并且包

括任何天然产生的、重组的或合成的产物如多肽，其可以进行糖基化。术语抗原还包括蛋白质载体和非蛋白质分子如类固醇、碳水化合物或多核苷酸的复合物。

在本文中抗原还用来指任何包含多种抗原和抗原表位的物质，例如细胞或组织、器官、移植物、事实上脊椎动物，例如哺乳动物的免疫系统可以对其产生免疫反应的任何物质。

所述抗原可以是与人或动物疾病相关的病原性生物的抗原。引发动物疾病的生物包括例如口蹄疫病毒、新城疫病毒、狂犬病病毒和沙门氏菌属 (*Salmonella*) 物种。引发人类疾病的生物包括例如细菌如沙门氏菌属物种包括鼠伤寒沙门菌 (*S. typhimurium*) 和伤寒沙门菌 (*S. typhi*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 如金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、百日咳、霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*)、病原性大肠杆菌 (*E. coli*)、分枝杆菌物种如结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 和副结核分枝杆菌 (*M. paratuberculosis*)。病毒生物包括例如 HIV-1 或 HIV-2 (其包括病毒抗原 gp160/120)、HBV (其包括表面或核心抗原)、HAV、HCV、HPV (例如 HPV-16)、HSV-1 或-2、EB 病毒 (EBV)、亲神经性病毒、腺病毒、巨细胞病毒、脊髓灰质炎病毒和麻疹病毒。

天花和炭疽热也是目标病原体并且可以将其用于本发明。真核病原体包括酵母，如白色念珠菌 (*C. albicans*)，曲霉菌，血吸虫，原生动物，变形虫，疟原虫，包括例如疟疾，弓形体，贾第鞭毛虫和利什曼原虫。

所述抗原还可以是肿瘤相关抗原。这些抗原包括 CEA、 α 胎儿蛋白 (AFP)、neu/HER2、多态内皮粘蛋白 (PEM)、N-CAM 和 Lewis Y。

所述抗原可以是异常表达的抗原，如 p53 或病毒性修饰的抗原。

诸如上述的抗原可以以纯化自所述生物的培养物的蛋白质形式，或更加优选地通过所需抗原的重组生产而获得。还可以通过化学合成生产抗原，例如采用自动肽合成仪如可以商购的合成仪。

只要保留所需活性就可以使用适当的片段，而非野生型多肽。技术人员能够轻易地以保守方式，例如不破坏功能，对任何多肽的氨基

酸序列进行改变。

本发明的另一方面提供一种在个体中调节对抗原的免疫反应的方法，该方法包括向所述个体提供促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸。

这种提供可以通过施用一种或多种多肽，或可以通过施用编码所述多肽的多核苷酸。另一种方法包括施用上调所述多肽表达的物质，例如通过结合相关基因的启动子或其它调节元件。

本发明还提供一种调节个体对抗原的免疫反应的方法，该方法包括施用影响在个体中的促轴素活性的物质。

可以上调在个体中由促轴素直接或间接表达的多肽的量，从而提高或加强活性，或下调，从而降低或减弱活性。提高的活性与促进免疫耐受性相关，而降低的活性与促进针对抗原的免疫反应，即攻击性反应相关。

因而，按照本发明提供了一种控制免疫系统对于给定抗原的反应的方法，例如提高个体免疫系统对抗原的耐受性，所述方法包括向所述个体施用促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸或提高由促轴素直接或间接表达的多肽的量或活性的物质。

另外，按照本发明提供了一种加强或提高个体的免疫系统针对抗原的攻击性反应的方法，所述方法包括向所述个体施用降低由促轴素直接或间接表达的多肽的量或活性的物质。

物质可以通过结合或与其相互作用来降低由促轴素直接或间接表达的多肽的量或活性。这种物质可以是例如具有适当结合特异性的抗体分子，或其它结合所述多肽的肽基或非肽基分子。可以通过例如下调相关基因的启动子功能或通过处理编码 mRNA 以减少翻译（例如通过反义或 dsRNA 抑制，RNAi，或核酶消化）或借助于促进所述多肽降解的物质，例如利用遍在蛋白化可以减少所述多肽的产生。

物质可以通过结合，例如通过结合编码多核苷酸序列的启动子或增强子区以提高启动子功能来提高由促轴素直接或间接表达的多肽的量或活性。

本发明的另一方面提供一种增强个体中针对抗原的攻击性免疫反应，或提供增强的攻击性免疫反应或减弱的攻击性免疫反应，或促进个体中耐受性的方法，所述方法包括向所述个体施用包含抗原或编码抗原的多核苷酸的组合物以及施用包含由促轴素直接或间接表达的多肽或改变这种多肽在个体中的量或活性的物质的组合物。

可以将两种或多种组合物作为组合制剂提供用于同时或连续施用。

促轴素的表达产生的物质，例如 LIF 的水平可以通过编码多核苷酸，或通过内源性表达水平的改变，或通过多肽活性的改变，例如借助于小分子或其它活性剂进行改变，以便调节个体免疫系统对目标抗原显示的耐受性或攻击性的存在或程度。本发明可以在多种情况下使用，包括关于计划的移植，关于病原体或其它异物的潜在刺激，关于宿主的转化细胞，例如癌细胞或病毒感染细胞，以及在自身免疫病症中对免疫系统的调节。

按照本发明调节或影响的攻击性免疫反应可以是不适当的免疫反应，例如在自身免疫疾病中，或适当的免疫反应，例如对病原体的免疫反应。

已经发现促轴素在脊椎动物例如哺乳动物包括人中提供免疫反应的调节。适当地所述反应为脊椎动物中对抗原的耐受性免疫反应。

在另一个实施方案中，本发明提供促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸用于测定免疫状态的应用。促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸适用于临床医学或兽医学中。

本发明还提供一种确定个体免疫状态的方法，所述方法包含测定促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸在测试样品中的表达水平，所述样品包括从所述个体中取出或获得的组织、细胞和/或体液，并将测试样品的水平与对照样品的水平进行比较，其中在测试样品中的水平大于对照样品中的水平表示个体中的免疫状态包含耐受性免疫反应，或者其中在测试样品中的水平低于对照样品中的水平表示个体中的免疫状态包含攻击性免疫反应。

可以利用免疫状态的测定评估与对抗原的免疫反应，对患病组织如肿瘤的免疫反应，对移植组织，细胞或其它材料的耐受性相关的个体的免疫状态（例如当需要减弱或免除对受体的免疫抑制疗法时表明对器官同种异体移植物或异种移植物的耐受性状态）。因而，这种测定可以用在诊断情况中，以确定个体的免疫系统的状态。它可以用来评估正在进行的治疗的益处或成功。

所述方法对于确定个体的免疫状态特别有益，所述个体具有组织或细胞移植物并且任选地正在进行治疗。适当地，对包含外周血的测试样品确定所述水平。在此提及“个体”包括动物以及人。

另一方面提供所公开的促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸或在个体中改变其量或活性的物质，在生产加强或减弱个体中针对抗原的攻击性免疫反应或改变免疫系统对抗原的耐受性的药物中的应用，或在本文列出的治疗方法中的应用。这种药物一般用于与抗原相关的疾病或病症的治疗或预防，所述抗原可以是病原体、患病细胞如肿瘤，或待移植的材料，如器官、组织或细胞。

一般，以分离的和/或纯化的，即基本上纯的形式提供根据本发明的这种物质。在优选的实施方案中，所述物质在一种组合物中，其中它适当地代表至少 80%活性成分，优选至少 90%，更加优选至少 95%并且特别是 98%（以组合物的重量计）。

由促轴素编码或衍生的多肽或影响这种多肽的活性或量的肽基物质，例如通过与它结合（如抗体分子）或通过与影响由编码基因的表达所述多肽产生的启动子元件结合，或可以用于本发明的任何方面或实施方案中的其它多肽，可以通过重组表达进行生产。

要按照本发明的实施方案给予个体的物质可以根据需要以“预防上有效的量”或“治疗上有效的量”进行给药。预防效果可以足以加强或减弱个体对随后抗原刺激的攻击性免疫反应（根据需要的是针对抗原的攻击性免疫反应还是耐受性反应）。最优选地所述效果足以防止个体患由于随后的抗原刺激而产生的一种或多种临床症状。治疗效果足以加强或减弱个体对先发生的反应的攻击性免疫反应，优选地足

以完全或部分地拮抗所述反应,例如在自身免疫病症或在移植排斥中。最优选地所述效果足以改善一种或多种临床症状。实际给药的量,给药的速率和时间将根据待治疗疾病的性质和严重性决定。治疗的处方,例如剂量决定等,是在全科医师和其它医生的职责之内,一般考虑待治疗的病症,个体患者的状况,给药部位,给药方法和医生已知的其它因素。上述技术和方案的例子可以见于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980。

本发明还提供对本发明多核苷酸具有特异性的核酶,其基于促轴素的核苷酸序列。

此外,本发明还包括生产用于治疗免疫系统疾病或与免疫系统相关疾病的药物的方法,包括施用调节促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸的整体活性的化合物或其它物质。化合物和其它物质能够在靶基因/蛋白表达或靶蛋白活性的水平上实现这种调节。

在另一方面本发明提供分离的促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸,包括重组 DNA 分子,克隆的基因或其简并变体,特别是天然产生的变体如剪接变体,等位变体,反义多核苷酸分子,和特异性识别存在于这些多肽上的一种或多种表位的抗体,以及产生这些抗体的杂交瘤。

本发明的多核苷酸序列还包括独特性识别或体现促轴素的序列信息的促轴素的节段。通过克隆适当的多核苷酸序列并根据本领域已知的方法在载体中表达它可以生产分离的多核苷酸序列。

本发明的多核苷酸还包括在严格杂交条件下与 (a) 促轴素的互补体; (b) 编码促轴素的多核苷酸序列; (c) 作为促轴素的等位变体的多核苷酸; (d) 编码由促轴素编码或衍生的物种同源物 (例如正同源物 (ortholog)) 或 (e) 编码包含任一种由促轴素编码或衍生的多肽的特定结构域或截断的多肽的多核苷酸杂交的多核苷酸。

作为提供免疫反应的手段,离体、原位或在体内适当地通过使用载体,更加具体地为病毒载体 (例如,腺病毒,腺伴随病毒,或逆转录病毒),或离体通过使用物理的 DNA 转移方法 (例如,脂质体或化

学处理)适当地进行编码由促轴素编码或衍生的多肽的功能性基因的递送。可以使用裸DNA或RNA来体内表达编码的基因产物。利用直接注射或使用基因枪(Yang等, 1990)或任何其它适合技术, 如局部地可以递送裸DNA例如用于治疗银屑病。转化的或转染的或者进行遗传工程改造以包含促轴素或由其编码或衍生的多核苷酸或表达促轴素多肽的细胞可以用来递送功能物质。

在另一方面, 本发明提供用于表达促轴素, 由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸序列的载体, 该载体包含促轴素或编码促轴素的多核苷酸序列, 例如与其互补或其反向的多核苷酸序列, 启动子序列和终止序列。

可以使用病毒载体以递送促轴素或由它编码的多核苷酸用于体内适当地进行生产。促轴素或由促轴素编码的多核苷酸可以用在基因治疗方法中, 所述多核苷酸编码多肽或其它肽分子进行根据本发明的应用。这需要使用合适的用于表达的调节元件和合适的用于体内递送表达单元(编码序列和调节元件)至宿主细胞的载体。多种载体, 包括病毒载体和质粒载体, 是本领域已知的, 见例如美国专利号 5, 252, 479 和 WO 93/07282 和无数的其它出版物。特别地, 许多病毒已经被用作基因转移载体, 包括乳多空病毒, 如 SV40, 牛痘病毒, 疱疹病毒, 包括 HSV 和 EBV, 以及逆转录病毒。许多现有技术中的基因治疗方案已经使用灭活的鼠逆转录病毒。已经开发出许多腺病毒和腺伴随病毒载体。病毒载体的替代方案包括由脂质体和直接DNA摄取和受体介导的DNA转移介导的转移。

由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽的表达适当地在诱导型调节元件的控制下, 在此情况中内源基因的调节序列可以被同源性重组所替代。可以使用基因靶向以便使用分离自不同基因的调节序列或由遗传工程方法合成的新调节序列替换基因现有的调节区。这些调节序列可以由启动子, 增强子, 支架结构附着区, 负调节元件, 转录起始位点, 调节蛋白结合位点或所述序列的组合组成。或者, 影响RNA或产生的蛋白质的结构或稳定性的序列可以通过靶向替换, 去除, 添加,

或修饰。这些序列包括聚腺苷化信号，mRNA 稳定性元件，剪接位点，用于增强或改进蛋白质的运输或分泌特性的前导序列，或改变或提高蛋白质或 RNA 分子的功能或稳定性的其它序列。

抑制多肽表达的其它方法包括通过本领域已知的方法将反义分子导入本发明的多核苷酸，它们的互补体，它们的转录 RNA 序列，或 RNA 的翻译产物中。另外，可以利用定向缺失方法，或通过插入负调节元件如组织特异性的沉默子来抑制本发明的多肽。“基因沉默”技术由 Fire 等在 EP-A-1042462 和 Nature Vol 391 pp 806-811, "Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *C. elegans*" 中公开。

如本文所用的术语“分离的”指与至少一种其它组分（例如，多核苷酸或多肽）分离的多核苷酸或多肽，所述其它组分与所述多核苷酸或多肽一起存在于它的天然来源中。在一个实施方案中，在只有正常存在于相同溶液中的溶剂、缓冲剂、离子或其它组分（如果有什么区别的话）存在时发现所述多核苷酸或多肽。术语“分离的”和“纯化的”并不包括存在于其天然来源中的多核苷酸或多肽。

如本文所用的术语“简并性变体”包括与根据本发明的序列不同，但是由于简并性编码与它相同的多肽序列或具有至少 75% 和优选地至少 90% 序列同一性的序列的核苷酸序列。

可以在多核苷酸阵列上提供收集的促轴素的序列信息或对它的识别信息。在一个实施方案中，在多核苷酸阵列上提供序列信息的程序段以检测包含促轴素或促轴素节段的多核苷酸。可以设计所述阵列来检测与促轴素的完全匹配或错配。还能够以计算机可读形式提供收集的信息。

如本文所述，本发明进一步提供经遗传工程改造以包含促轴素或根据本发明的载体的细胞。适当地根据本发明的细胞，优选宿主细胞，已经用促轴素或另一种本发明的多核苷酸进行转化或转染以表达促轴素或由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽序列。可以采用已知的转化、转染或感染方法。

用于在多种不同细胞中克隆和表达多核苷酸或多肽的系统是已知的。合适的宿主细胞包括细菌、真核细胞如哺乳动物和酵母细胞，和杆状病毒系统。本领域现有的用于异源多肽表达的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞，HeLa 细胞，幼仓鼠肾细胞，COS 细胞和许多其它细胞。常用的优选细菌宿主为大肠杆菌。

又一个方面提供一种方法，其包括将多核苷酸导入宿主细胞中。所述导入，其一般可以（特别是对于体外导入）非限制性地称作转化，可以采用任何现有技术。

对于真核细胞来说，合适的技术可以包括磷酸钙转染，DEAE-葡聚糖，电穿孔，脂质体介导的转染和利用逆转录病毒或其它病毒的转导，例如用牛痘病毒，或对于昆虫细胞，用杆状病毒。对于细菌细胞来说，合适的技术可以包括氯化钙转化，电穿孔和利用噬菌体的转染。作为备选，可以采用多核苷酸的直接注射。在鉴定包含目标多核苷酸的克隆中可以使用标记基因如抗生素抗性或敏感性基因，如本领域所公知的。

导入后可以引发或允许由多核苷酸的表达，例如通过在适于基因表达的条件下培养宿主细胞（其可以包括真正转化的细胞，尽管更有可能所述细胞为转化细胞的后代），从而产生编码的肽或多肽。如果所述肽或多肽偶联到合适的信号前导肽上得以表达，它可以从细胞分泌到培养基中。在表达产生后，可以根据情况从宿主细胞和/或培养基中分离和/或纯化肽或多肽，并且随后根据需要使用，例如在组合物的配制中使用。

适当地，在体内细胞中表达的促轴素的多核苷酸与对于宿主细胞异源的驱动细胞中多核苷酸的表达的调节序列有效连接。这些方法可以用来提高或降低本发明的多核苷酸的表达。本发明还涉及生产促轴素多肽的方法，包括在允许表达所需多肽的条件下在合适的培养基中使本发明细胞的培养物生长，并从培养物或从宿主细胞中纯化所述多肽。优选的实施方案包括那些，其中由这种方法生产的蛋白质是所述蛋白质的成熟形式以及任何其它保留成熟蛋白任何功能活性的多肽。

在优选的实施方案中，由促轴素编码或衍生的多肽用于生成特异性结合所述多肽的抗体。这些抗体，特别是单克隆抗体，可以用于检测或量化组织中的多肽，特别是为了免疫诊断的目的。通过重组方法可以全部或部分生产本发明的多肽但是也可以进行化学合成。

这种方法可以包括将抗体分子群与促轴素或由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽接触并选择所述群中结合和/或影响多肽或多核苷酸活性的一种或多种抗体分子。

利用诸如噬菌体展示，动物免疫系统的旁路直接参与 (by-passing direct involvement of an animal's immune system) 等技术，可以常规地获得抗体分子。代替或除了免疫动物之外，获得所披露抗体分子的方法还可以包括在噬菌体颗粒表面上展示抗体分子群，每个颗粒都包含展示于其表面上的编码抗体分子的多核苷酸。多核苷酸可以取自展示抗体分子的噬菌体颗粒，所述抗体分子能够结合一种或多种目标肽，以便进行操作和/或用于生产编码的抗体分子或其衍生物（例如融合蛋白，包括恒定区或其它氨基酸的分子，等等）。例如如在 US-A-5643768，US-A-5658754，W095/11922 中所公开的，可以使用核糖体或多核糖体，而不是使用用于展示的噬菌体（如例如在 W092/01047 中的）。

可以向非人哺乳动物施用一种或多种肽以使它们接触由该哺乳动物的免疫系统产生的抗体分子群，随后可以从该哺乳动物中获取能够结合所述肽的一种或多种抗体分子，或可以从该哺乳动物中获取产生这些抗体分子的细胞。可以将所述哺乳动物处死。

如果细胞取自哺乳动物，这些细胞可以用来生产所需的抗体分子，或者可以使用后代或衍生细胞系。具体地这些后代或衍生细胞系可以包括杂交瘤细胞。

可以单独地或混合地以分离的形式提供抗体分子。可以以分离形式提供多种抗体分子。

在不含污染物如能够结合其它多肽的抗体和/或不含血清组分的意义上，分离出根据本发明的优选抗体。对于一些目的来说单克隆抗

体是优选的，尽管多克隆抗体也在本发明的范围之内。

可以以许多方式对根据本发明有用的抗体进行修饰。事实上术语“抗体分子”应当被视为涵盖包含抗体抗原结合结构域使它能够结合抗原或抗原表位的抗体片段和衍生物。能够结合抗原或其它结合伴侣的抗体片段例子是由 VL, VH, CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段；由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；由 VH 结构域组成的 dAb 片段；分离的 CDR 区和 F(ab')₂ 片段，包括在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段。还包括单链 Fv 片段。

可以在由促轴素编码或衍生的蛋白质或多核苷酸存在时离体培养细胞以便产生所需的免疫反应，例如对随后的允许导入免疫原性生物材料的体内再导入的免疫抑制。在其它应用中，阻止促轴素的表达或抑制促轴素的活性可能是有利的以便增强针对抗原的攻击性免疫活性。可以适当地采用反义疗法或基因疗法来负调节由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸的表达。

通过用异源启动子全部或部分地替换天然产生的启动子而进行允许、提高或降低内源促轴素多肽表达的细胞或组织的修饰以提供提高的多肽表达，从而使细胞在较高水平上表达所述蛋白或者显示响应于药物化合物的诱导表达。

在另一方面，本发明提供控制，例如通过向细胞导入促轴素或由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽提高自体的或其它干细胞或前体细胞和/或免疫细胞的离体生产。在为了治疗目的，特别是为了调节免疫反应进行体内递送之前对细胞进行处理。

在优选的实施方案中，可以在一种或多种特异性分化因子（例如对于给定 T 细胞受体（“TCR”）的靶抗原）以及对该抗原的反应存在时离体培养来自个体的淋巴细胞，利用由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸的上调和下调，对所述抗原进行改变、修饰或量化以便对耐受性进行调节或使所述反应对所述抗原具有攻击性。离体衍生的分化克隆可以进行繁殖并且可以用来治疗受体，特别是原始供体，以调节

免疫反应。例如，在接纳器官移植物自身之前可以使受体对外源器官同种异体移植物具有特异耐受性。

通过由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸、类似物，包括片段和融合蛋白、抗体和其它结合蛋白和在免疫反应中直接抑制或激活具有促轴素活性的多肽的化合物可以提供本发明方法中的免疫反应的调节或诱导。

根据本发明的多核苷酸分子和载体可以以分离的和/或纯化的形式提供，例如以基本上纯的或同质的形式。术语“分离”可以用来反映所有这些可能性。

根据本发明使用的肽、多肽、抗体、多核苷酸或其它分子或物质可以配制成组合物，并且可以用于药物领域。

本发明还涉及包含分离的促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸以及可药用的稀释剂、载体或赋形剂的组合物，所述稀释剂、载体或赋形剂为适当无毒的并且不应干扰活性成分的功效。载体或其它物质的确切性质可以取决于给药途径，例如口服、静脉内、经皮或皮下、鼻、肌内、腹膜内途径。

所述稀释剂、载体或赋形剂可以是凝胶、油或脂质体的形式，并且独立地和优选地包含亲水性物质，例如水。载体或其它物质的确切性质可以取决于给药途径，例如口服、静脉内、经皮或皮下、鼻、肌内、腹膜内途径。

口服用的组合物可以是片剂、胶囊、粉末或液体形式。片剂可以包括固体载体如明胶或助剂。液体药物组合物一般包括液体载体如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成的油。可以包括生理盐水溶液，葡萄糖或其它糖溶液或二醇类如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

对于静脉内、经皮或皮下注射，所述活性成分将适当地为胃肠外可接受的水溶液形式，其是无热原的并且具有合适的 pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员完全能够利用，例如，等渗载体制备合适的溶液如氯化钠注射液、林格注射液、乳酸化林格注射液。根据需要，可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。

可以单独或与其它治疗联合施用所述组合物，所述联合治疗可以是同时或连续的，这取决于要治疗的病症和备选的或另外的治疗的有效性。

在本发明中，可以将组合物施用于个体，特别是人和其它灵长类动物。可以对人或其它哺乳动物施用，例如啮齿类动物如小鼠、大鼠或仓鼠、豚鼠、兔、绵羊、山羊、猪、马、牛、驴、狗或猫。向非人哺乳动物递送不必是为了治疗目的，而是可用于实验环境，例如用于研究对目标抗原的免疫反应的机制，例如对抗癌症、病原体等等的保护作用。

通过将促轴素或由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽或其结合片段用于药物筛选技术中，本发明对筛选化合物特别有用。

本发明提供一种筛选化合物的方法，包括将包含待筛选的一种或多种化合物的测试样品与选自促轴素，由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽和这种多核苷酸或多肽的片段的结合剂接触并确定所述化合物是否已经结合到所述结合剂上。

所述结合剂可以是任何合适的形式，包括载体、细胞或组合物，并且以已知的筛选化合物的方式使用。

在这种测试中采用的多肽、多核苷酸或片段可以是在溶液中游离的，固定于固体支持物上，载于细胞表面上或位于细胞内。一种药物筛选的方法利用以重组多核苷酸稳定转化的真核或原核宿主细胞，所述细胞表达促轴素多肽或其片段。可以在竞争性结合测定中针对这些转化的细胞筛选化合物。这些细胞，是存活的或固定的形式，可以用于以已知的方式进行结合测定。

可以利用分离的促轴素的蛋白质和多核苷酸获得和鉴定结合到由相应于促轴素的开放阅读框(“ORF”)编码或衍生的多肽上或结合到由促轴素编码或衍生的多肽的特定结构域上的物质。

本发明提供一种鉴定结合到促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸上的物质的筛选方法，包括：

(a) 将某种物质与促轴素或由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多

肽接触;

(b) 测定所述物质是否结合到所述多核苷酸或多肽上; 和

(c) 检测在所述物质和所述多核苷酸或多肽之间形成的复合物的形成, 从而如果形成了复合物, 则对所述物质进行检测。

在优选的筛选方法中, 将化合物与促轴素的多肽或多核苷酸在细胞中接触足够的时间以便与所述多肽或多核苷酸形成该化合物的多肽复合物, 其中所述复合物驱动受体基因序列在细胞中的表达, 并且通过检测报道基因序列表达来检测所述复合物。

本发明还提供一种试剂盒, 其包含促轴素或多核苷酸探针和/或单克隆抗体, 和任选地用于实施本发明的方法的定量标准品。

本发明进一步提供一种诊断方法以鉴定促轴素或多肽或编码促轴素的多核苷酸在测试样品中的存在或表达, 所述方法利用多核苷酸探针或促轴素的抗体, 任选地与合适的标记缀合或结合。

本发明提供一种用于检测促轴素或由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽的诊断方法, 包括:

(a) 将待测试由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽是否存在的样品与结合到由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽上的化合物接触;

(b) 确定所述化合物是否结合到所述样品的组分上; 和

(c) 检测在所述样品和所述蛋白质或多核苷酸之间形成的复合物的形成, 从而如果形成了复合物, 则对所述多肽或多核苷酸进行检测。

优选地所述诊断方法包括将样品在严格杂交条件下与退火到促轴素的多核苷酸上的多核苷酸引物接触并且扩增退火的多核苷酸, 从而如果扩增了多核苷酸, 则在样品中检测促轴素的多核苷酸。

在优选的实施方案中, 用来评估个体免疫反应的诊断方法包括从个体中获得测试样品, 例如血液, 将测试样品与针对促轴素或由促轴素编码或衍生的多核苷酸或多肽的一种或多种抗体或一种或多种多核苷酸探针一起温育, 并测定所述多核苷酸探针或抗体与测试样品内组分的结合。

根据本发明的实施方案的测定法可以采用 ELISA, 蛋白质印迹法, 免疫组织化学, 鉴定药物在经诱导的针对调节耐受性, 无反应性或缺失, 对抗排斥的倾向性方面对免疫反应的影响和任何其它本领域现有的合适技术。

可以对含有 cDNA 和/或 mRNA 的制剂进行测试。由于 RNA 酶的广泛存在 RNA 比 DNA 更难以操作, 这是可以进行 cDNA 分析的一个原因。

不过, 由于对测试样品中的所有多核苷酸或者甚至是整个目标基因进行测序一般在时间上或付出劳动上没有效率, 可以采用使用一个或多个引物对的特异性扩增反应如 PCR 来扩增多核苷酸中的目标区域, 如果其存在于样品中的话。这可以定量地进行, 允许测定测试样品中促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸的量。

利用特异性探针可以筛选多核苷酸。这种探针在序列中对应于相关基因的区域, 或者在适当严格的条件下对应其互补体, 这种探针特异性杂交到测试多核苷酸上表示目标多核苷酸分子的存在, 并且这也能够进行量化以提供测试样品中这种多核苷酸分子的量的指征。

在 PCR 中可以类似地使用特异性寡核苷酸引物以特异性扩增特定的序列, 如果其存在于测试样品中的话。

一种方法可以包括一种或多种(例如两种)探针或引物杂交到靶多核苷酸上。当所述多核苷酸是双链 DNA(例如 cDNA)时, 杂交之前一般先进行变性以产生单链 DNA。所述杂交可以作为 PCR 方法的一部分, 或作为不涉及 PCR 的探针杂交方法的一部分。使用选自许多本领域技术人员已知的筛选方法鉴定成功的杂交事件并且可以允许存在于原始样品中的多核苷酸的量的定量。

利用本领域技术人员已知的多种技术中的任何一种可以测量探针结合到靶多核苷酸(例如 DNA)上。例如, 可以对探针进行放射性、荧光或酶学标记。探针杂交可以采用标准的印迹技术。

例如通过从诸如脾细胞的细胞或生物组织或体液, 尿, 唾液, 粪便, 口腔拭子, 活检组织或血液中提取多核苷酸可以提供多核苷酸的测试样品。

可以检验测试样品中特异性结合成员的结合伴侣的存在，所述特异性结合成员如抗体分子（或抗体的混合物），对多肽或目标多肽是特异的。在测定结合之前，通过与特异性结合成员如抗体分子在合适的进行特异性结合的条件下接触可以对样品进行测试，例如利用所讨论的报道系统。当使用一组抗体时，可以对每种抗体采用不同的报道标记从而能够确定每种抗体的结合。

可以使用特异性结合成员如抗体分子将它的结合伴侣多肽从测试样品中分离和/或纯化，以允许进行所述多肽的测序和/或生化分析以便确定它是否具有促轴素或由促轴素编码或衍生的多肽或多核苷酸的序列和/或特性。利用自动测序机器进行氨基酸测序是本领域的常规技术。

例如可以将包含一种或多种多肽的测试样品作为粗制的或部分纯化的细胞或细胞裂解物制剂提供，例如使用组织或细胞，如来自脾或体液，优选血液。

其它测试可以包括使用取自测试动物、个体、受试者或患者的血液或脾细胞，以及用抗原离体刺激细胞以确定对于该抗原的攻击性或耐受性反应的存在或缺乏。

合适的探针可以，例如，用于确定特异性 mRNA 分子是否存在于细胞或组织中，或用于从染色体 DNA 中分离类似的多核苷酸序列，例如如由 Walsh 等 (Walsh, P. S 等, 1992, PCR Methods Appl 1: 241-250) 所描述的。它们可以通过切口平移, Klenow 填补反应, PCR, 或本领域已知的其它方法进行标记。合适的探针, 其制备和/或标记在 Sambrook, J. 等, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; 或 Ausubel, F. M. 等, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York N. Y. 中进行了详细阐述。

将本说明书中提及的所有文件都并入作为参考。通过下列非限制性实施例和附图对本发明进行说明。

实施例 1

移植耐受性：比较同种异体耐受性与同种异体排斥的基因表达模式

在小鼠中，通过在血管化心脏移植物的受体中的 CD4/CD8 阻抑可以诱导感染调节型耐受性。一旦建立，这种移植耐受性就很强并且分离的“耐受性”脾细胞显示强烈的免疫调节特性，能够对具有完全免疫能力的原初受体施加供体特异性的同种异体耐受性。利用^{BALB/c-耐受型} CBA [H-2^k] 小鼠，我们在一系列时间点并且与^{BALB/c-排斥型} CBA [H-2^k] 小鼠脾细胞的相同离体系列相比较分析了对供体 (BALB/c [H-2^d]) 抗原的脾细胞反应。排斥的主要特征是快速的干扰素 γ 的释放。相反地，在耐受性中干扰素 γ 低并且比在对第三种抗原 (C57BI10 [H-2^b]) 的反应中释放的更少。致敏耐受性的阳性标志是 STAT3 和 c-kit 的高度表达，和 LIF 的释放。在此我们给出了四种基因阵列的化合物比较 (耐受性与排斥，在 48h，和在 123h)，其中出现了相对少数的差异表达的基因。在排斥中，有干扰素 γ 和 粒酶 B mRNAs 的强烈进行性扩增。在耐受性中，Emk 和 促轴素在 123h 时都得上调。缺少 Emk 的小鼠发生自身免疫疾病 (Hurov 等, Mol Cell Biol, 2001)。缺少促轴素的小鼠在发育过程中显示异常的轴突移动。总之，我们的结果提示了在发育调节和免疫调节之间的联系，并且强调了促轴素在调节型耐受性中的可能作用。

材料和方法

生成^{BALB/c-致敏的} CBA 小鼠

利用 Chen 所描述的技术 [Chen Z. K., Cobbold, S. P., Waldmann, H. & Metcalfe, S. M. Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance. Transplantation 62, 1200-1206 (1996)], 10-12 周龄的 CBA 小鼠 (H2^k) 接受了完全错配的血管化 BALB/c (H2^d) 心脏移植物至颈部。如以前所述 [Chen, Z. K., Cobbold, S. P., Waldmann, H. & Metcalfe, S. M. Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance. Transplantation 62, 1200-1206 (1996)] 利用阻抑 CD4 和

CD8 的 mAbs 通过 21 天的隔天治疗期产生耐受性。至少在移植 100 天之后从耐受型受体中分离^{BALB/c-耐受型} CBA 脾细胞用于离体分析。为了进行比较,给 10-12 周龄的未处理 CBA 小鼠移植 BALB/c 尾部皮肤,其到第 10 天时出现排斥,或移植 BALB/c 心脏,其在第 7 天出现排斥。在第 14 天收集^{BALB/c-排斥型} CBA 脾细胞用于离体分析。根据 Home Office licence under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986, UK 实施所有操作。

离体培养

培养条件已经在别处进行了详细描述 [Metcalf, S. M. & Moffatt-Bruce, S.D. An ex vivo model of tolerance versus rejection: Comparison of STAT1, STAT4, STAT5 and STAT6. Clin. Chem. and Lab. Med. 38, 1195-1199 (2000)]。简言之,反应性脾细胞获得自^{BALB/c-耐受型} CBA, 或^{BALB/c-排斥型} CBA 小鼠,并在总共 10ml 的添加了 10% FCS 的生长培养基中使用 4×10^7 反应细胞和 6×10^7 刺激细胞,通过受辐照的 BALB/c 脾细胞 (供体抗原) 离体刺激耐受型和排斥型细胞群。48h 后,取出耐受型和排斥型脾细胞各一瓶用于总 RNA 制备。在第 120h 时用另外的 7×10^7 刺激性脾细胞加强第二对瓶 (一个为耐受型的,一个为排斥型的),然后在第 123h 时收获。收获时,将细胞收集到冰上,在用 0.25% 胰酶短暂处理后包括任何粘附细胞。在将细胞重悬至均匀后,取 1.5ml 的试样用于 RNA 提取。在冰冷的 0.1% BSA/PBS 中洗涤后,将细胞收集入无菌的 15ml 的 Falcon 离心管中并于 1600rcf 在 +4℃ 下沉淀 5min。弃去上清液并将试管中的上清液残留物擦干净,然后将细胞重悬于预冷的 Trizol 试剂中,涡旋,随后立即保存在 -80℃ 下。每 6×10^6 细胞使用 1 ml Trizol。

RNA 分离

将样品置于室温并在加入 1ml 氯仿之前放置 10 分钟,并涡旋成乳液。在 15 分钟后于 1600rcf 在 40℃ 下将样品离心 10 分钟。将上层相转移到无 RNA 酶的 Eppendorff 管的 400 μ l 等分试样中并加入等体积的异丙醇。在轻轻混合并放置 15 分钟后,于 13,000g 在 40℃ 下

将样品离心 10 分钟。移除并弃去上清液。将 RNA 沉淀在 350 μ l 的 75 % 乙醇中洗涤并于 7500g 在 40℃ 下沉淀 5 分钟。吸去上清液并将沉淀风干 20 分钟。通过 50 μ l DH_2O 溶解和连续转移将每种样品的等份 RNA 沉淀收集在一起；使用第二份 50 μ l 来从每只管中连续收集洗液，给出 100 μ l DH_2O 中的最终样品总体积。将这保存于 80 °C 直到转移至 Hinxton Hall 的 MRC HGRC 用于 cRNA 的用户服务制备和通过标准方法使用 Affymetrix U74 芯片的阵列。

基因阵列

利用 dChip 软件 [Wong, C. U. W. H., PNAS USA, 98, 31, 2001] 准备组合阵列的分析。

结果

匹配的耐受型和排斥型样品对的组合的 48h 和 123h 阵列给出 129 种显示差异表达的基因。为了鉴定在耐受性或在排斥中显示偏向表达的那些基因，将结果以三种方式进行归类：显示从 48h 到 123h 阳性转变的那些基因 (表 1)；在 123h 时具有高度表达的那些基因 (表 2)；和显示从 48h 到 123h 阳性转变的那些基因 (耐受型)，而排斥对应物显示阴性转变 (表 3)。

在从 48h 到 123h 表达提高的基因中，10 个是在耐受型培养物中，提高 1.71 倍到 4.00 倍。在排斥反应中相同基因的表达既不显示表达的提高也不显示表达的降低 (表 1 (a))。值得特别注意的是促轴素，一种新发现的干细胞基因；与细胞周期和细胞迁移相关联的细胞周期调节蛋白 B2；可能在染色质重构中发挥作用的组蛋白 H2A-X；和 ELKL 基序激酶，也称作 Erk，是调节免疫反应和保护以避免自身免疫伤害所必需的。表 1 (b) 显示在排斥中表达提高的 5 种基因。这种提高也是对排斥特异性的，除了粒酶 B 在耐受性和排斥中都有两倍提高；不过在排斥中粒酶 B mRNA 的实际水平比在耐受性中高六倍。在排斥中干扰素 γ mRNA 的 12 倍提高与我们先前的发现，即在这些培养物中的高干扰素 γ 蛋白释放相一致。

在四种阵列的情况中，在 123h 时显示高度表达的那些基因中，15 个是在耐受型组中（表 2 (a)）并且包括促轴素。在排斥中，在表 2 (b) 中按照表达水平的顺序归类了 13 种基因，其中粒酶 B 和干扰素 γ 为最高。所以这种分析方法对于粒酶 B 和干扰素 γ 显示出与表型的相关性，并且再次认定促轴素与耐受性相关，尽管实际的表达水平并不高。进行了进一步的分析，鉴定了在耐受性中显示提高的表达而在排斥中显示降低的表达的那些基因（表 3）。这揭示了参与染色体结构和重构的组蛋白 H2A-X；ELKL 基序激酶；剪接因子 3b 亚基 1 (SF3b-155)，其作为 mRNA 剪接复合物的一部分起作用并且可能参与外显子去除；和细胞周期调节蛋白 B2，细胞周期的调节剂并且当与 cdc2. 复合时还参与细胞迁移。

表 1a 和 1b：显示提高的表达的基因 (48h 对 123h)

基因	编号	耐受性： 倍数提高	排斥： 倍数提高
耐受性			
双特异性磷酸酶 1	X61940	4.00	0.99
BCL2 样 11	AA796690	3.11	1.15
促轴素*	AW212859	2.9	1.00
H2A 组蛋白家族，成员 X	M33988	2.22	0.46
干扰素刺激蛋白 (20kDa)	AW122677	2.21	0.95
趋化因子 (C-C) 受体 6	AJ222714	2.02	0.95
细胞周期调节蛋白 B2	X66032	2.01	0.59
Paneth 细胞增强的表达	U37351	2.0	0.98
剪接因子 3b，亚基 1， 155kDa	A1844532	1.93	0.59
ELKL 基序激酶**	X70764	1.71	0.63
排斥			
干扰素 γ	K00083	0.69	11.98
戊二酰 CoA 脱氢酶	U18992	1.20	5.10
CD3 抗原， γ 多肽	M18228	1.23	3.22
白介素 1 受体拮抗剂	L32838	1.00	2.57
粒酶 B	M12302	2.07	2.52

表 2a 和 2b: 在四种阵列的情况中在 123h 时显示高度表达的基因

基因	编号	在 123h 时的表达水平
耐受性		
-2 微球蛋白	X01838	9047
环指蛋白 10	AB026621	4127
CD53 抗原	X97227	3927
鸟苷酸核苷酸结合蛋白 1	M55544	1005
亚精胺精胺 N1 酰基转移酶	L10244	1002
糖蛋白 49A	M65027	975
趋化因子 (C-C) 受体 6	AJ222714	972)
BCL2 样 11	AA796690	752
Paneth 细胞增强的表达	U37351	753
EST	AW047461	744
趋化因子 (C-C 基序) 配体 9	C-U49513	593
EST	A1060627	562
双特异性磷酸酶 1	X61940	536
表达的序列 AU021774	A1854141	438
促轴素*	AW212859	416
排斥		
粒酶 B	M12302	6766
干扰素 γ	K00083	3103)
金属硫蛋白 2	K02236	1952
凝集素, 半乳糖结合性, 可溶性 1	X15986	1887
RNA 结合基序蛋白 3	AB016424	1725
酸性核磷蛋白 32 家族, 成员 B	A1842771	1665
戊二酰辅酶 A 脱氢酶	U18992	1350
STAT3	U08378	1026
STAT5A	AJ237939	988
Calcylicin	X66449	856
CD3 抗原焦磷酸酯	M18228	517
IL1 受体拮抗剂	L38838	511
Exp 序列 AU044919	X67210	356

表 3. 在耐受性中显示提高的表达并且在排斥中显示降低的表达的基因

基因	编号	基因说明
<i>H2A</i> 组蛋白家族, 成员 <i>X</i>	M33988	染色质重构 (Bassing; Bruno)
<i>ELKL</i> 基序激酶**	X70764	免疫调节 (Hurov)
剪接因子 <i>3b</i> , 亚基 <i>1</i> , 155kDa	A1844532	RNA 剪接, 内含子去除 (Horie)
细胞周期调节蛋白 <i>B2</i>	X66032	细胞周期; 细胞迁移 (Manes)

实施例 2

干细胞基因 *axot* 与 LIF 的调节和 T 淋巴细胞的促有丝分裂活化作用相关

干细胞自我更新的“干性质 (stemness)”¹ 对它们在器官形成过程中分化的控制, 是再生医学新领域的基础。白血病抑制因子 (LIF) 对于这种控制来说是关键性的, 其作为干细胞分化的抑制因子起作用^{2, 3}。LIF 和 *axot*, 一种新的干细胞基因^{1, 4}, 也与免疫耐受性相关的发现提示了干性质和免疫性之间的关系。为了探索这种关系我们已经研究了是否来自 *axot*^{-/-} 小鼠的免疫细胞有别于 *axot*^{+/-} 同窝出生仔畜的那些免疫细胞。我们发现 (i) 促轴素的存在涉及 T, 而非 B 淋巴细胞增殖的衰减; (ii) 促轴素的缺乏导致 T 细胞细胞因子的过度释放; 和 (iii) LIF 的 *axot* 基因剂量依赖性抑制。这是第一个证据, 即由 LIF 介导的命运确定 (fate determination) 可能与促轴素相关联, 并且证明了干性质和免疫耐受性之间的共同性, 其可能有助于接受为了治疗性组织再生而植入的干细胞同种异体移植物。

干细胞方面的命运确定是发育中的重要特征, 提供了整个生物体内多能性自我更新与分化功能之间的平衡。在再生医学中, 了解干细胞的命运确定的分子基础是重要的, 如果它们要成功地用于疾病的治疗中。命运确定途径还在免疫系统中发挥关键作用, 其中微调反应性以确保对自身组织的保护性耐受性同时能够攻击外来病原体。尽管对调节性耐受性途径了解得不多, 最近的论证, 即单个基因, *foxp3*, 能

够使原初 CD4⁺ T 细胞分化成调节性 T 细胞 (Treg)^{5, 6, 7}, 暗示了 "master" 的存在变换为免疫性方面的命运确定。我们最近发现对于干细胞调节常见的免疫耐受性的特征, 提出了两个重要的问题: “干性质” 信号在自身免疫性中是通过抑制免疫效应细胞的终末分化发挥作用吗? 异源干细胞是通过 “干性质” 信号传导使同种异体免疫反应偏向同种异体耐受性, 从而有利于成功的治疗性移植吗? 此论文描述了我们如何发现在胚胎、神经元和造血干细胞中表达的促轴素¹, 不仅参与 T 淋巴细胞反应性的调节, 还参与 LIF 的调节, 由此提供了一种免疫调节的新概念。

已经在以往的研究中利用离体模型比较了相对于免疫攻击与免疫耐受性相关的分子事件⁸。这来自这样的小鼠, 其中完全错配的心脏移植, 正常情况下到第 7 天被排斥, 在 CD4 和 CD8 的短期阻抑后被无限期地接受 (参考文献 9)。一旦建立, 这种移植耐受性就能使自身永久存在并且分离的 “耐受型” 脾细胞显示强大的免疫调节特性, 当注入具有完全免疫能力的原初受体时能够施加供体特异性的同种异体耐受性。我们对耐受型脾细胞, 相对于来自已经被致敏排斥相同供体型的小鼠的脾细胞的离体反应进行了特征鉴定, 排斥的主要特征是快速的干扰素 γ 释放和编码干扰素 γ 和粒酶 B 的基因的强烈扩增表达。明显相反地, 耐受性显示与干性质一样的特征, 这些特征是 LIF 的释放和 c-kit (干细胞因子 (SCF) 受体) 和 STAT3 (响应于 SCF 和 LIF 活性的转录 3 的信号转导物和激活剂) 的增多。我们发现 LIF 和耐受性的关系在克隆的 Treg 中也是明显的, 显示与 Th1 和 Th2 克隆相反的高水平的 LIF 释放。在基因水平上, 耐受性与新发现的干细胞基因, *axot* (Genbank 编号 AF155739) 的强烈诱导相关。为了检验我们的假设, 即干性质和耐受性是相关联的, 我们研究了促轴素是否影响免疫反应性。

我们首先考虑对有丝分裂原的淋巴细胞反应性。将 *Axot* 无效 (*axot*^{-/-}) 小鼠与表达一个 *axot* 等位基因 (杂合的, *axot*^{+/-}) 或两个等位基因 (野生型; *axot*^{+/+}) 的同窝出生仔畜进行比较。从脾中新分

离完整的细胞群并且我们利用伴刀豆球蛋白 A (conA) 作为 T 细胞有丝分裂原, 或利用脂多糖 (LPS) 作为 B 细胞有丝分裂原测量有丝分裂活化。我们还通过比较 48h 和 72h 时的 DNA 合成寻找对于响应性的任何动物学作用。由于激活的淋巴细胞显示同步化进入细胞周期, S 期峰出现在 48h (参考文献 10), 我们推理与 *axot*^{+/+} 细胞相比, 在 *axot* 无效细胞中 DNA 合成的一致减弱将表明由于缺少促轴素而丧失有丝分裂响应性。不过, 当与野生型细胞相比时, T 细胞增殖的水平在 *axot* 无效细胞中显示显著的提高。这并非由改变的动力学引发, 因为 *axot*-相关的差别在 48h 和 72h 都相似 (图 1a, 图 1b)。所以促轴素似乎抑制 T 细胞的增殖性反应。另外, 由于杂合的 *axot*^{+/-} T 细胞显示中间的高增殖, 所述抑制似乎对 *axot* 基因的剂量敏感。与 T 细胞明显相反, B 淋巴细胞增殖并未被促轴素显著改变 (图 1c, 图 1d)。我们推断促轴素在有丝分裂刺激后在使 T, 而非 B 淋巴细胞增殖衰减中发挥作用。在 7 天时间内在 *axot*^{+/+}, *axot*^{+/-}, 或 *axot*^{-/-} 脾细胞的培养物中没有发生自发的有丝分裂。

作为 *axot* 无效脾细胞中功能性的进一步测试, 我们测量了在对有丝分裂原的响应中的细胞因子释放。在 *axot* 无效和 *axot* 杂合的细胞培养物中, conA 处理之后促轴素的缺乏与白介素 2 (IL2) 的两倍提高相关 (图 2a)。这种 IL2 等值揭示了 IL2 并不是 T 细胞增殖的限制性因子, 其中有四倍的差异。脾脏 B 细胞并不释放 IL2 (图 2b) 而 T 和 B 细胞都在对其各自的有丝分裂原的响应中释放 IL10。再者, 只有 conA-处理的培养物被促轴素的缺乏所影响, 在 *axot*^{+/-} 和 *axot*^{-/-} 细胞培养物中都有 IL10 的十倍提高 (图 2c, 图 2d)。这些发现显示促轴素的部分或全部减少导致来自活化 T 细胞的 IL2 和 IL10 两者的一般性增加, 但是对于从活化 B 细胞中释放 IL10 没有影响。还测量了干扰素 γ 和 IL4 并且显示与在 conA-处理的培养物中对于 IL2 所发现的相似的 *axot* 相关的增加, 如在图 1 的图法中所详述的。LPS 处理的培养物对于干扰素 γ 和 IL4 为阴性。

出乎意料的是, 我们发现在对 conA 的响应中 LIF 的释放被促轴素

强烈地抑制并且这种抑制是基因剂量依赖性的(图 2)。不管 *axot* 基因型如何在 LPS 处理的培养物中都没有 LIF。基于 LIF 浓度与 *axot* 基因剂量的关系, 我们假设基因剂量与促轴素的表达水平相关。因而 LIF 释放和 T 细胞增殖看来都受到促轴素的决定性影响并且我们的结果与三者之间的相互依赖性联系相一致。

通过表型和组织学结构的分析, 我们探索了促轴素对淋巴器官表型组成的影响。如下通过 FACS 分析对细胞亚群进行鉴定: 表达 T 细胞标记物 CD3, CD4 和 CD8; B 细胞标记物 CD19; T 细胞和调节性耐受型 T 细胞的激活标记物, CD25; 和树状突细胞的标记物, CD205 和 DC33D1 的细胞。这些标记物中没有一个显示 *axot*^{+/+}, *axot*^{+/-}, 和 *axot*^{-/-} 同窝出生仔畜之间的差异表达(图 3)。类似地, 脾和胸腺的组织学评估显示在这三种 *axot* 基因型之间无显著性差异。

命运确定由遗传程序所控制, 所述遗传程序通过改变小环境中细胞因子相互作用的性质和频率而得以改变, 所述小环境是对于全能和多能干细胞, 以及对于前体细胞的分化而言的。LIF 除了是神经生成细胞因子外¹², 还是干细胞自我更新的重要决定子¹¹。在显示了至少在激活的 T 细胞内促轴素可以作为 LIF 的负调节物起作用后, 我们提出 LIF 表达与促轴素表达功能性相联系, 促轴素在协调 LIF 释放的正和负调节中发挥作用。这将使促轴素成为一种通过 LIF 的命运确定的潜在调节剂。促轴素的分子功能尚有待测定并且促轴素可能如何影响 LIF 释放尚不清楚。将来的工作将包括这种关系的阐释, 探索促轴素对 LIF 基因表达¹³, 以及对通过 LIF-R/gp130 复合物调节 LIF 诱导的信号传导^{14, 15, 16, 17}的影响。

作为工作模型, 我们提出由促轴素调节的 LIF 活性与免疫耐受性相关。LIF 可以将原初 T 细胞引导向响应于所呈递抗原的相对未分化的, 非攻击性的表型, 其中呈递的环境直接或间接地引发产生耐受性的 LIF 活性(例如通过不成熟的或调节性树突细胞进行的抗原呈递¹⁸, ¹⁹和相关的维生素 D 活性²⁰, 或由于 CD4/CD8(参考文献 9)或 CD28(参考文献²¹)的功能改变而导致的减弱的 T 细胞反应性)。此后, 后生

变化, 包括 *foxp3* 和 *ROG* 的表达¹⁸, 和 Id 转录因子的诱导²², 将为了可遗传的 Treg 活性而稳定耐受性表型。在干细胞生物学和调节性免疫耐受性之间的联系与免疫相关疾病的治疗性干涉和与器官移植受体的免疫抑制性治疗有直接相关性。该工作还对干细胞用于再生医学具有主要牵连, 因为我们发现的特性可以提高患者中移植的干细胞的成功结果。

总之, 我们已经发现 促轴素抑制成体小鼠中的 T 淋巴细胞增殖反应性并且促轴素能够作为 LIF 的负调节剂而起作用, 暗示促轴素通过 LIF 起作用来调节 T 细胞。

方法

小鼠

利用基因捕获插入生成 *axot* 无效 BALB/c 小鼠并通过基因组 DNA 的 PCR 分析对来自杂合亲本的同窝出生仔畜进行基因型分析以鉴定先前详述的 *axot*^{+/+}, *axot*^{+/-} 和 *axot*^{-/-} 幼畜。从 5 月龄的同窝出生仔畜中获得脾、胸腺和淋巴结并在细胞制备进行下面所述分析之前置于冰上。淋巴结组织产生非常少的细胞并被弃去。还从 *axot*^{+/+}, *axot*^{+/-} 和 *axot*^{-/-} 同窝出生仔畜中取脾和胸腺进行组织学分析。将这些器官解剖开并固定于 70% 乙醇中。将固定的组织包埋在石蜡块中并进行切片, 随后利用标准方法以苏木精和曙红进行染色。

增殖测定

将脾细胞和胸腺细胞从每种器官中取出并收集在无菌的生长培养基[添加了 10% FCS (Gibco™ Invitrogen Co.), 200mM L-谷氨酰胺, 100U/mL 青霉素和 100μg/mL 链霉素 (Sigma Chemical Co.) 的 RPMI-1640 (Gibco™ Invitrogen Co.)] 中。洗涤细胞悬浮液, 重悬于生长培养基中并利用血球计进行计数。

将细胞以每孔 5×10^5 有核细胞接种于平底 96 孔 Nunclon™ 组织培养平板中的 100 μl 生长培养基里并于 37℃, 5%CO₂ 中孵育 48h 或 72h。在开始时加入 50 μg/mL 的 LPS, (Sigma Chemical Co.) 和 10 μg/mL 的 conA (ICN Biochemicals, USA) 作为有丝分裂原。所有

的实验都以一式三份进行。紧接在收获之前,收集上清液进行 ELISA 分析并将细胞在预热的包含最终浓度为 $1 \mu\text{Ci/mL}$ 的甲基- ^3H 胸苷 (TRK686, 比活性 80Ci/mmol , Amersham Biosciences) 的 GM 中孵育 2 小时。利用 Filtermate196, Packard 收集器收获细胞并利用 Packard TopCount.NXT™ 微平板闪烁和发光计数器进行计数。

为了测定 LIF 对 Con A 刺激的影响,将 BALB/c *axot*^{+/+} 脾细胞和胸腺细胞在 Con A ($2 \mu\text{g/mL}$ 或 $10 \mu\text{g/mL}$) 以及 500pg/mL 或 1000pg/mL rmLIF (Santa Cruz Biotechnology, SC-4378) 存在时进行孵育。如上所述测量有丝分裂发生。对照以各自的浓度只包括 GM, 只包括 conA, 和只包括 LIF。

ELISA

对于干扰素 γ (DY485), IL2 (DY402), IL4 (DY404), IL10 (DY417) 使用 DuoSet® ELISAS 而对于 LIF (MLF00) 使用 Quantikine® Immunoassay, 来自 R & D Systems, 在 96 孔 Falcon® 平板中对 48h 的培养物上清液进行 ELISA。通过利用微软 Excel 软件处理光密度数据建立标准曲线并利用标准曲线确定细胞因子浓度。

流式细胞测量术

将脾细胞和胸腺细胞悬浮液进行 RBC 排除并在与下面详述的各种单克隆抗体混合之前于 FACS 染色溶液 (1xPBS 中的 0.2%BSA 和 0.1% 叠氮化钠) 中洗涤,这些单克隆抗体被直接或间接地与藻红蛋白 (PE) 或异硫氰酸荧光素 (FITC) 缀合。PE-大鼠抗小鼠 CD19 (557399), PE-仓鼠抗小鼠 TCR α 链 (553172) 和大鼠抗小鼠树突细胞克隆 33D1 (551776) 来自 Pharmingen。大鼠抗小鼠 CD205-FITC (MCA949F), 小鼠抗大鼠 IgG2a 重链-FITC (MCA278F) 和小鼠抗大鼠 IgG2b 链-FITC 来自 Serotec Ltd. 而兔抗小鼠 CD25 (IL2Ra) 和山羊抗兔 IgG (H & L)-PE (4050-89) 分别来自 Santa Cruz Biotechnology 和 Southern Biotechnology Associates。抗 CD4 (YTS177.9.6) 和抗 CD8 (YTS 105.18.10) 由牛津大学 (University of Oxford) Stephen Cobbold 教授赠予。在配备了 CellQuest 软件的 Becton Dickinson FACSCalibur

仪器上进行分析。

参考文献

1. Ramalho-Santos, M. , Yoon, S. , Matsuzaki, Y. , Mulligan, R. C. & Melton, D.A. "Stemness" : transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* **298**, 597-600 (2002).
2. Murray, P. & Edgar, D. The regulation of embryonic stem cell differentiation by leukaemia inhibitory factor (LIF). *Differentiation* **68**, 227-234 (2001).
3. Viswanathan, S. et al. Supplementation-dependent differences in the rates of embryonic stem cell self-renewal, differentiation, and apoptosis. *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 505-517 (2003).
4. Baker, R. K. et al. In vitro preselection of gene-trapped embryonic stem cells for characterising novel developmentally regulated genes in the mouse. *Dev Biol.* **185**, 201- 214 (1997).
5. Hori, S. et al. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
6. Fontenot, J. D. , Gavin, M. A. , & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330-336 (2003).
7. Khattri, R. , Cox, T. , Yasayko, S. A. & Ramsdell, F. An

essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells, *Nat. Immunol.* **4**, 337-342 (2003).

8. Metcalfe, S. M. & Moffatt-Bruce, S. D. An *ex vivo* model of tolerance versus rejection : Comparison of STAT1, STAT4, STAT5 and STAT6. *Clin. Chem. and Lab. Med.* **38**, 1195-1199 (2000)

9. Chen, Z. K., Cobbold, S. P., Waldmann, H. & Metcalfe, S. M. Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance. *Transplantation* **62**, 1200-1206 (1996).

10. Milner, S.M. Activation of mouse spleen cells by a single short pulse of mitogen. *Nature* **268**, 441-442 (1977).

11. Zandstra, P. W, Le, H. V., Daley, G. Q., Griffith, L. G. & Lauffenburge, D. A. Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation. *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 607-617 (2000).

12. Patterson, P. H. Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 7833-7835 (1994).

13. Bamberger, A. M., et al. Regulation of the human leukemia inhibitory factor gene by ETS transcription factors. *Neuroimmunomodulation* **11**, 10-19 (2004).

-
14. Moon, C. et al. Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 9015–9020 (2002).
15. Cheng, J. G., Chen, J. R., Hernandez, L., Alvord, W. G. & Stewart, C. L. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8680–8685 (2001).
16. Takahashi, Y. et al. SOCS3 : an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *EMBO J* **22**, 372–384 (2003).
17. Bartoe, J. L. & Nathanson, N. M. Independent roles of SOCS-3 and SHP-2 in the regulation of neuronal gene expression by leukemia inhibitory factor. *Brain Res Mol Brain Res.* **107**, 109–119 (2002).
18. Cobbold, S. P. et al. Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation tolerance: molecular markers and mechanisms. *Immunol. Rev.* **196**, 109–124 (2003).
19. Jeudes, A. E. & Von Herrath, M. G. Using regulatory APCs to induce/maintain tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1005**, 128–137 (2003).
20. Adorini L. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells

inhibiting autoimmune diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **987**, 258-261 (2003).

21. Tang, Q. et al. CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* **171**, 3348-3352 (2003).

22. Ying, Q. L., Nichols, J. , Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and

图例

图 1.

由来自 $axot^{+/+}$, $axot^{+/-}$ 和 $axot^{-/-}$ 同窝出生仔畜的脾细胞进行的 DNA 合成和细胞因子释放

(a) 用 conA (左手图示) 或 LPS (右手图示) 刺激了 48h (上图) 或 72h (下图) 的脾细胞的 H^3 -胸苷标记。在对每种基因型减去各自的背景对照后显示了 DNA 合成和标准偏差。背景对照都小于 300cpm。
(b) 在用 conA (上图) 或 LPS (下图) 刺激后 48h 时在上清液中 IL2 和 IL10 的水平。还测量了干扰素 γ 和 IL4: 干扰素 γ 只存在于 conA 培养物上清液中, 对于 $axot^{+/+}$, $axot^{+/-}$ 和 $axot^{-/-}$ 培养物来说浓度分别为 538pg/ml, 1410pg/ml, 和 909pg/ml。IL4 也只发现于 conA 培养物上清液中并且对于 $axot^{+/+}$, $axot^{+/-}$ 和 $axot^{-/-}$ 培养物来说浓度分别为 121pg/ml, 263 pg/ml, 和 92pg/ml。对于每种 EILSA 的拟合良度回归分析如下: IL2, $R^2 = 0.946$; IL4, $R^2 = 0.925$; IL10, $R^2 = 0.939$; 和干扰素 γ $R^2 = 0.937$ 。

图 2.

促轴素对于 LIF 释放的影响

在 48h 的 conA (左图) 或 48h 的 LPS (右图) 刺激后 LIF 从 $axot^{+/+}$, $axot^{+/-}$ 和 $axot^{-/-}$ 同窝出生仔畜的脾细胞中释放出来。对于拟

合良度的回归分析为 $R^2 = 0.999$ 。

图 3.

来自 $axot^{+/+}$ 和 $axot^{-/-}$ 小鼠同窝出生仔畜的脾和胸腺的表型特征

制备完整的脾和胸腺细胞群，如材料和方法中所述的那样进行染色和分析。将 FACs 数据以直方图形式用负染色的截断值来给出，所述负染色由穿过 CD4, CD8, CD3, CD19, DC33d1, 和 CD25 染色的每个数据组的垂直线来显示。小鼠 $axot^{+/+}$ 和 $axot^{-/-}$ 基因型如上面每个图中所示。还分析了 $axot^{+/-}$ 脾细胞和胸腺细胞并给出与所示那些相同的结果。CD205 染色始终为阴性。

序列表

<110> Susan Marie Metcalfe
 <120> 诱导或调节免疫反应的方法
 <160> 4
 <210> 1
 <211> 2728
 <212> mRNA
 <213> 人
 <400> 1

```

gggtggctggt tctgcgccgg atccgggaga ggggcgggcg ccattgtgct tcgctgccga      60
ctgcatttcc tcagtcacgg gcctagaact ccaaggagaa aggcggcgaa aaatctttaa      120
gaatggagtc taaaccttca aggattccaa gaagaatttc tgttcaacct tccagctcct      180
taagtgttag gatgatgtct ggaagcagag gaagtagttt aaatgatacc tatcactcaa      240
gagactcttc atttagattg gattctgaat atcagctctac atcagcatca gcactctcgt      300
caccatttca atctgcatgg tatagtgaat ctgagataac tcaggagaca cgtcaagat      360
cgcagaacca gcaacgggat catgattcaa aaagacctaa actttcctgt acaaacgtga      420
ctacctcage tgggagaaat gttggaaatg gtttaaacac attatcagat tcactcttga      480
ggcatagtca agttcctaga tcttcatcaa tggactttgg atcatttggg acagacttaa      540
tgagagagag gagagatttg gagagaagaa cagattcctc tattagtaat cttatggatt      600
atagtcaccg aagtgggtgat ttcacaactt catcatatgt tcaagacaga gttecttcat      660
attcacaagg agcaagacca aaagaaaact caatgagcac tttacagttg aatacatcat      720
ccacaaacca ccaattgcct tctgaacatc agaccatact aagttctagg gattccagaa      780
attctttaag atcaaatitt tcttcaagag aatcagaatc ttcccgaagc aatacgcagc      840
ctggattttc ttacagttca agtagagatg aagccccaal cataagcaat tcagaaaggg      900
ttgttttcac tcaaagacca tttcaagaat cttctgacaa tgaaggtagg cggacaacga      960
ggagattgct gtcacgcata gcttctagca tgcactctac ttttttttca cgaagatcta      1020
gtcaggattc cttgaataca agatcattga attctgaaaa ttcttacgtt tctccaagaa      1080
tcttgacagc ttcacagtcc cgtagtaatg taccatcagc tictgaagti cccgataata      1140
gggcgtctga agcttctcag ggatttcgat ttcttaggcg aagatggggg ttgtcatctc      1200
ttagccacaa tcatagctct gagtcagatt cagaaaattt taaccaagaa tctgaaggta      1260
gaaatacagg accatggtta tcttctcacc ttgaaatag atgcacacct ttgttctcta      1320
gaaggaggcg agagggaaga gatgaatctt caaggatacc tacctctgat acatcatcta      1380
gatctcatat ttttagaaga gaatcaaatg aagtggttca cttgaagca cagaatgatc      1440
ctcttgagagc tgctgccaac agaccacaag catctgcagc atcaagcagt gccacaacag      1500
gtggctctac atcagattcg gctcaagggt gaagaaatac aggaatatca gggattcttc      1560
ctggttcctt attccggttt gcagtcctcc cagcacttgg gagtaatttg accgacaatg      1620
tcatgatcac agtagatatt attccttcag gttggaattc agctgatggt aaaagtgata      1680
aaactaaaag tgcgccttca agagatccag aaagattgca gaaaataaaa gagagcctcc      1740
tttttagagga ctcagaagaa gaagaagggt acttatgtag aatttgtcaa atggcagctg      1800
catcatcatc taatttgetg atagagccat gcaagtgcac aggaagtttg cagtatgtcc      1860
accaagactg tatgaaaaag tggttacagg ccaaaattaa ctctggttct tcattagaag      1920
ctgtaaccac ctgtgaacta tgtaaagaga agttggagct taacctggag gattttgata      1980
ttcatgaact acatagagct catgcaaatg aacaagctga gtatgagttt atcagctctg      2040
gtctctacct agtgggtgta ttgcacttgt gcgaacaaag cttttctgat atgatgggaa      2100
atacaaatga accaagcaca cgtgtccgat ttattaacct tgcaagaact cttcaggcac      2160

```

```

atatggaaga tctcgaaact tcagaggaig atlccgaaga agacggagac cataacagga      2220
catttgatat tgcctaactt catataagac agatggatga tctgtgaaca taagtgttta      2280
ttaaaaatgg caattaaata taaattactt ttgtggggga atgcctaata aatacatiga      2340
ctatatataa aatgaatata tacatacaca tgtatgectg tatatatata ttcattctcc      2400
agtgtttgctg aattaaaatt ctgctggact ttttaacata gcaaatccga tgtttataaa      2460
ctggtaatca aaaagggttt ttcttttagg tgagtgggaa agtattaccc ttgttttaaa      2520
tatctaagca atgcctatca accctttttt gtgttatgat tactgtagtc atatttatga      2580
aaaaaggttt gtgttttact ctgtctagtg agaaaagtg gacaaaatat acttttgaag      2640
taaaatgcta tatggcacct aattattttt tcttttaaaa tgccttaagt tgcagtcica      2700
tttgataat catttgettc cagtgttt                                     2728

```

<210> 2

<211> 2720

<212> mRNA

<213> 鼠

<400> 2

```

cgcatccgga ggggcggcgg ccattgtgt tegtgcgga cttctctgcc ggtageccga 60 gagecgagcc gageccagcg
aggaaggcgg cggcgggtgtg gctgcggcga gcgcgacact 120 cctgcagcg gagtgcctcg tggaagaggg aaaccttaag
aatggagtct aaaccttcca 180 ggattccaag aagaatttct gttcaacct ctggctcttt aagcactagg atgggtgtctg 240
gaaacagagg aaccagtita aatgattcat atcattctag agactcctcc ttiagactgg 300 attctgaata tcagctcgca
tcagcatcag cgtgtgcac accatgtcag cctgcctggt 360 acagttagtc tgagatacct cagggagcgc gggcacgagc
acagaccag cagcgggac 420 atgactcaaa gagaccaag ctttctgtga caaactgtgc atctacctca gtggggagga 480
acggtgggag tgggttaaat acagtgtcag attctcttg gaggeatagt caagttccca 540 gatcttcac aatggtaatt
ggttcatttg gaacagactt gatgagagaa aggagagatt 600 tggacaggag aagagagtc tccalcagca atcttatgga
ttataatcac cgaagtgggt 660 atttcacaac ttcacatat gttcaagaaa gatttcctt ttcattatca cagggagcaa 720
gacccaaaaga gaatgcagtg agcattttac agttgaattc atcaccacc aatcaccaat 780 tgccttctga ccatcagaca
gtaccaagti clagggactc cagtagaagt tctttcagat 840 cacattttt tccaagacaa tcagaatcti ttgcacacag
ttcacatcct gcattttcat 900 atttttcaag tagaaatgaa actccaacta taagcaatte agaaagggti tcatctcaga 960
gaccatatcg agaactctct gacaatgaag gtaggcgtag aactaggaga ttgctgtcac 1020 ggatagcttc tagcatgca
tctacttttt tctcagaaag atctagtcaa gattccttga 1080 atacaagatc tttagattct gaaaattata ttctctcag
aacctgact tcacagtctc 1140 ggaataatgg aacctctcg tctctgacg tcagttaggg cagggcagct gaagcatctc 1200
agggatttag atttcttag cgaagatggg ggttgtctgc gtcagccaa aatcatagct 1260 ctgaaccaga ggcagaaaat
tttaaccaag aatcagaagg tagaaatca ggaccatggt 1320 tgtctcttc acttagaaat agatgcacac ctttgtctc
gagaaggagg cgagagggaa 1380 gggatgagtc ttcaagaatg tctacgtcag atgtaccacc tagatctcat attttcagaa 1440
gagattcaaa tgaagtagtt catcttgaag cacagggtga ctcccttggg gctgtgcca 1500 accgaccaca agcatctgga
gcgtcaagca gtgtgtctgc aggttggtcc accccagagt 1560 tgcctcaggg tggaagaaat ccaggactaa cagggtctt
tcttggtcc ttgttcgggt 1620 ttgcagtcac accagcactc ggcagtaac ttgctgacaa tgcattgatt actgtagata 1680
ttatcccttc tggttggaat tcaactgatg ggaaaaatga taaagctaaa agtgcacctt 1740 caagagaccc agaaaaactt
cagaaaatca aagaaagcct ccttttagag gactctgatg 1800 atgaagaaga aggggactta tgtagaattt gtcagatggc
agcagcgtca tcatctaatt 1860 tattgataga gccgtgcaaa tgcacaggga gcctgcagta cgtccatcaa gactgtatga 1920
aaaagtgggt acaagccaaa attaatcttg gctcttcalt agaggctgtg actacctgtg 1980 aactctgtaa agagaagttg
caacttaacc tggaggattt tgatattcat gaactacata 2040 gactctatgc aatgaacaa gctgagtatg agtttatcag
ctctggcttc tactagtgtg 2100 tcttactgca ctgtgtgaa caaagcttt ctgatatgat gggaaataca attgaaccaa 2160
gcactcgtgt ccgattttatt aaccttgcaa gaactctca ggcacatatg gaagatctcg 2220 aaacttcaga ggaatgaatc
tgaagaagat ggagaccata agagaatgct tgatattgcc 2280 taacttcatt taagaaaaaa aaaaaaagg atgactctgtg
aacatgttta ttaaaactgg 2340 caattaagta tggataattt catggggtaa tgcctagtag attaatgtac tatacataaa 2400
atgaatatat atatatacat gtataaatgt aatatatat tcatctcaa gtattgtga 2460 actgaaatte ttgagctgga

```

ccctttaaca ctggccagcg aatctcatgt ttataatatg 2520 taatccaagc atttttcctt ttggtgagtg ggaaagcatt
acccttgitt gaaatatcta 2580 aacagigctc atcaacttc ttctttgttg caattactgt agtcatatit atgggaaaaa 2610
aatgtttgtg tallagtctc ttgctagtga aaaaaagtc gataaaatgt ccttttgaaa 2700 taaaatgcca atggcaccta
2720

<210> 3
<211> 704
<212> 多肽
<213> 人
<400> 3

l meskpsripr risvqpsssl sarmmsgsrq sslndtyhsr dssfrldsey qstsasasas
61 pfqsawyses eitqarsrs qnqqrhdsk rpklsctnet tsagrngng lntlsdsswr
121 hsqvprsssm vlgsfgtdlm rerrdlertr dssislmdy shrsgdfts syvqdrpsy
181 sqgarpkens mstlqlntss tnhqlpsehq tilssrdsrn slrsnfssre sessrsntqp
241 gfsysssrde apiisnserv vssqrpfqes sdnegrrtr rllsriassm sstffsrrss
301 qdslntrsln sensyvspri ltasqsrnv psasevpdnr aseasqgrf lrrrwglssl
361 shnhssesds enfnqesegr ntgpwlsssl rnrctplfsr rrrregrdess riptsdtsr
421 shifresne vvhleaandp lgaaanrpqa saasssatg gtsdsaqgg rntgisgilp
481 gslfrfavpp algsnltdnv mitvdiipsg wnsadgksdk tksapsrdpe rlqkikesll
541 ledseeeegd lcricqmaaa ssnlliepc ktgslqyv qdcmkklqa kinsgsslea
601 vttcelckek lelnledfdi helhrahane qaeyefissg lylvvlhlc eqsfddmngn
661 tnepstvrfr inlartlqah medletsedd seedgdhnr fdia

<210> 4
<211> 693
<212> 多肽
<213> 鼠
<400> 4

l meskpsripr risvqpsssl strmvsgnrg tnlndsyhsr dssfrldsey qsasasacas
61 pcqpawyses eipqgarara qtqqrhdsk rpklsctnca stsagrnggs glntvsdssw
121 rhsqvprssm mvlgsfgtdl merrdldrr ressislmd ynhrsgdftt ssyvqervps
181 sysqgarpke navstlqlns sstnhqlpsd hqtvpsrds srssfrshfs prqsesfrns
241 shpafsyfss rnetptisns ergssqrpyr essdnegrrt trllsrias smsstffsrr
301 ssqdslntrs lssenyispr tltsqsrnng tsssdvseg raacasqgr flrrrwglss
361 lsqnhsspe aenfnqeseg rnsqpwlsll lnrctplfs rrrregrdes srmstdvpp
421 rshifrrdsn evvhleaagd slgaaanrpq asgasssaaa ggstpelppg grnpgltil

481 pgs1frfavp palgsnladn vmitvdiips gwnstdgknd kaksapsrdp eklqkikesl
541 lledsddeee gdlcricqma aasssnllie pckctgslqy vhqecmkkwl qakinsgssl
601 eavttcelck eklqlnledf dihelhrraha neqaeyefis sglylvvlh lceqsfsdmm
661 gntiepstrv rfinlartlq ahmedletse def

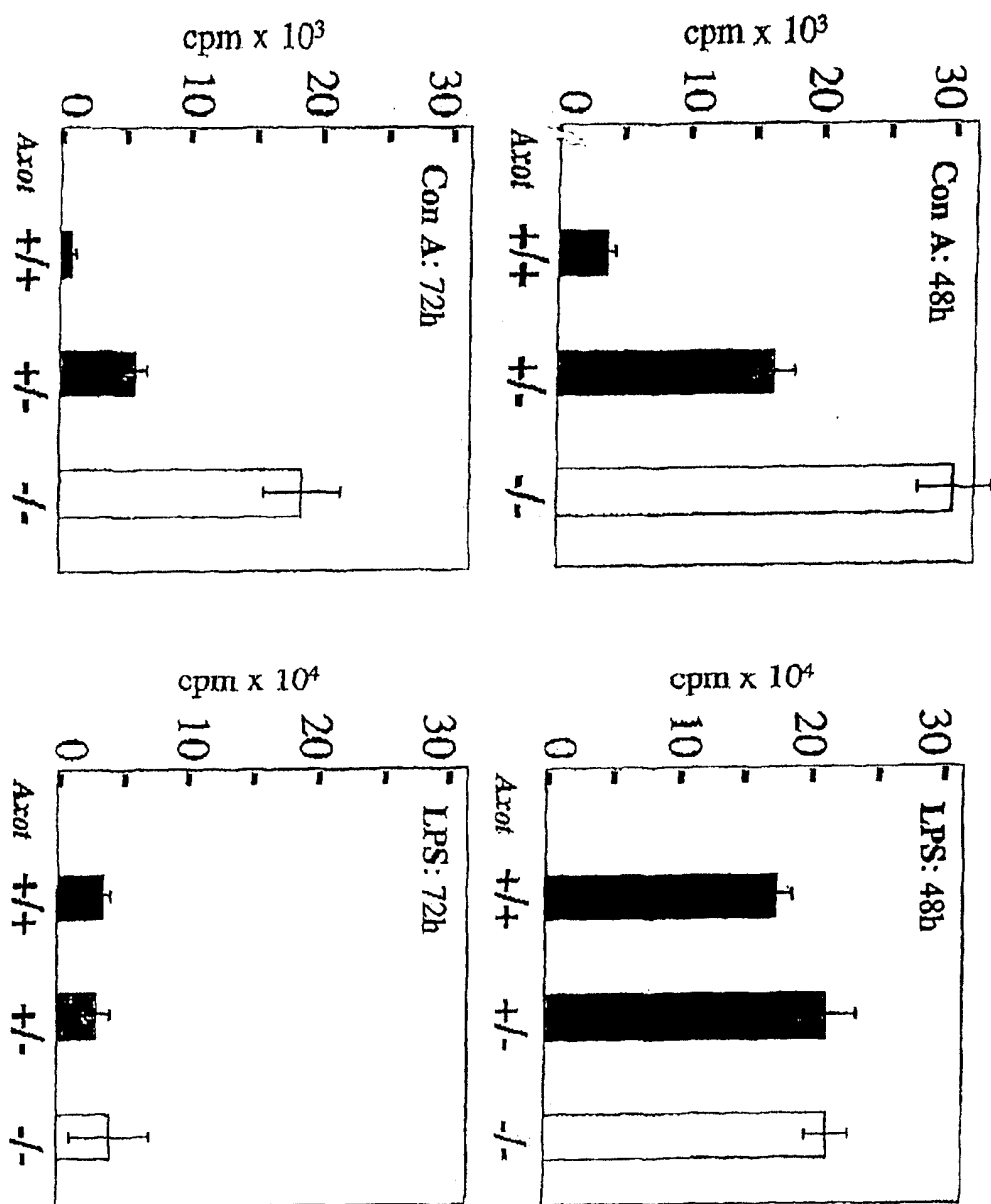


图 1a

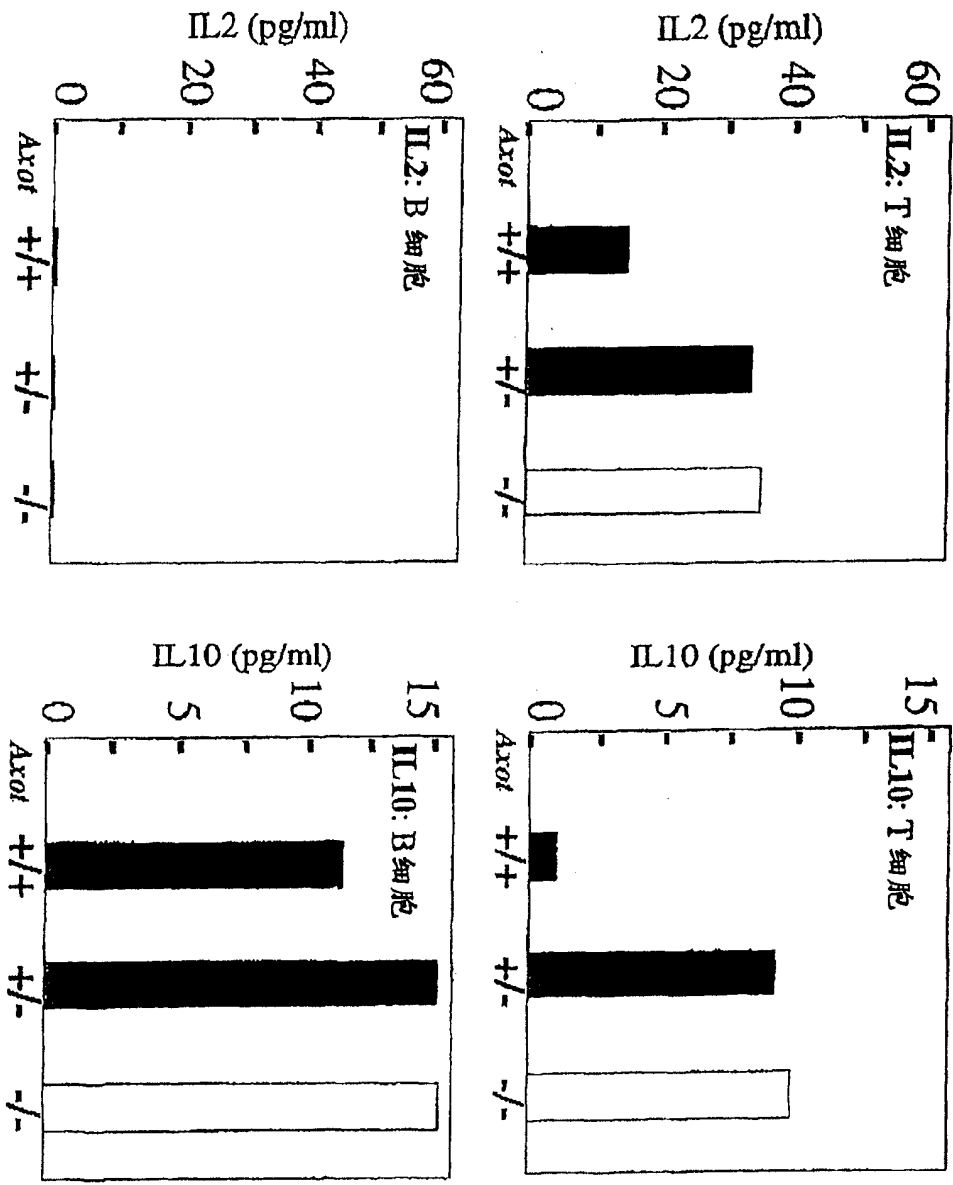


图 1b

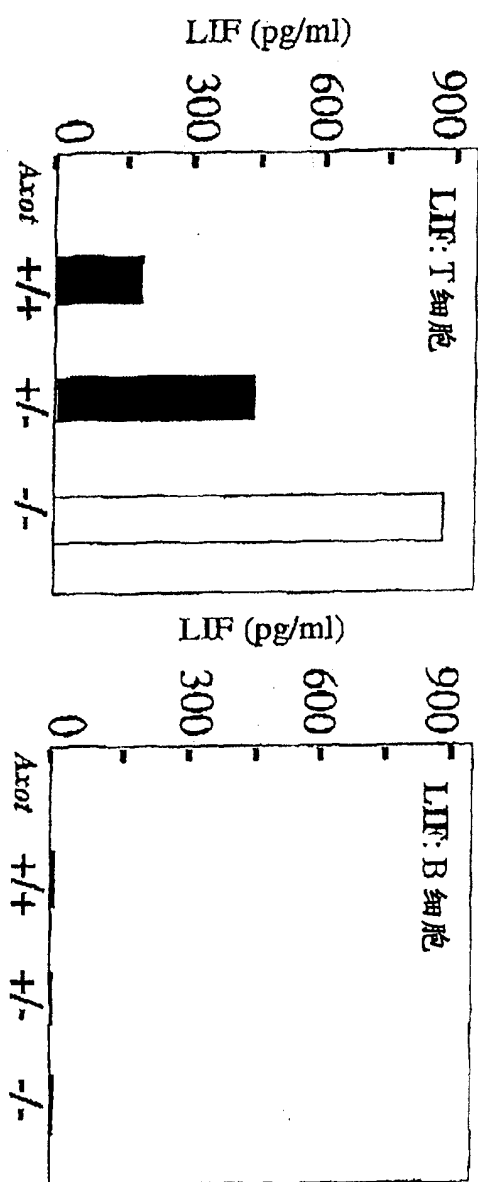


图 2

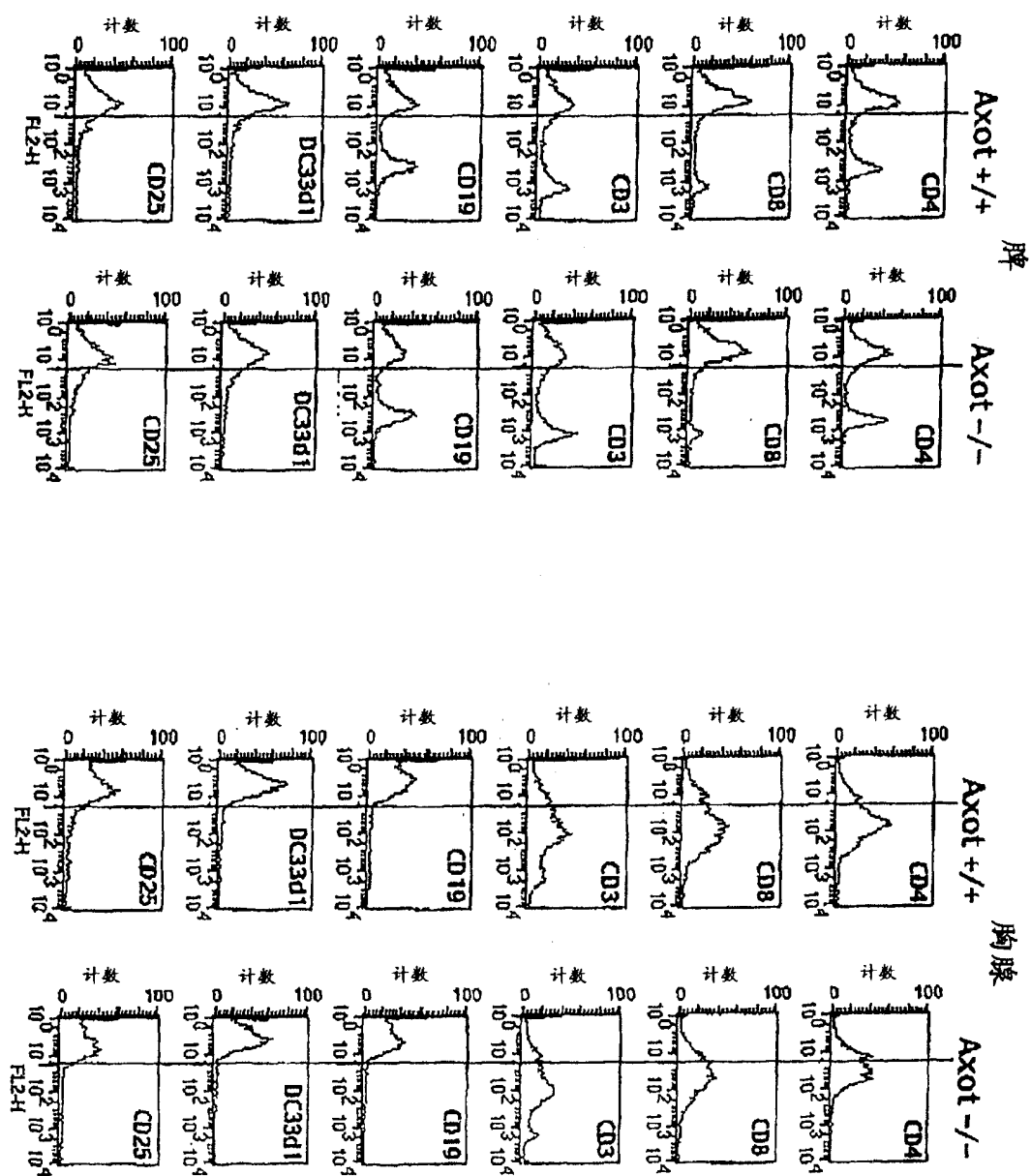


图3