

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380110061.3

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年9月20日

[11] 公开号 CN 1835769A

[22] 申请日 2003.12.29

[21] 申请号 200380110061.3

[30] 优先权

[32] 2002.12.30 [33] US [31] 60/436,934

[86] 国际申请 PCT/US2003/041294 2003.12.29

[87] 国际公布 WO2004/060041 英 2004.7.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.30

[71] 申请人 比奥根艾迪克 MA 公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 保罗·D·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 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 14 页

[54] 发明名称

KIM - 1 拮抗剂及其在免疫系统调节中的应用

[57] 摘要

公开了使用 KIM - 1 拮抗剂抑制 T 细胞和第二细胞, 例如抗原呈递细胞之间信号传递。这种抑制有益于治疗疾病, 包括各种自身免疫性疾病和移植物抗宿主病。也公开了使用 KIM - 1 拮抗剂抑制哺乳动物中淋巴细胞或其它免疫细胞分泌 IFN - γ 。对 IFN - γ 的抑制有益于治疗炎性疾病或病症, 例如, 炎症性肠病。

1. 一种抑制在 T 细胞和参与哺乳动物免疫反应的第二细胞之间信号传递的方法, 包括: (a) 鉴定从患免疫疾病或病症的哺乳动物或准备用于组织移植的哺乳动物中选出的哺乳动物; 和(b) 向该哺乳动物施用从下组中选出的有效量的 KIM-1 拮抗剂: (i) 包括 KIM-1 Ig 区, 缺少跨膜区和 KIM-1 胞质区的多肽; (ii) 抗 KIM-1 抗体; 和(iii) 抗 KIM-1 抗体的抗原结合片段。
2. 权利要求 1 的方法, 其中第二细胞是抗原呈递细胞(APC)。
3. 权利要求 1 的方法, 其中 T 细胞是活化的 T 细胞。
4. 权利要求 1 的方法, 其中 T 细胞是辅助 T 细胞。
5. 权利要求 4 的方法, 其中辅助细胞 T 是 Th2 细胞。
6. 权利要求 1 的方法, 其中 T 细胞是移植的、供体 T 细胞。
7. 权利要求 1 的方法, 其中 APC 是选自单核细胞、巨噬细胞、树突细胞或 B 细胞。
8. 权利要求 1 的方法, 其中 APC 呈递自身抗原。
9. 权利要求 1 的方法, 其中多肽进一步包括 KIM-1 粘蛋白区。
10. 权利要求 1 的方法, 其中多肽进一步包括异源部分。
11. 权利要求 10 的方法, 其中异源部分选自免疫球蛋白(Ig)部分、血清白蛋白部分、靶向部分、报告分子部分、和便于纯化的部分。
12. 权利要求 11 的方法, 其中异源部分是 Ig 部分。
13. 权利要求 12 的方法, 其中 Ig 部分是 Fc 部分。
14. 权利要求 1 的方法, 其中所述多肽结合到聚合物上。
15. 权利要求 14 的方法, 其中聚合物选自聚亚烷基二醇、糖聚合物或多肽。
16. 权利要求 15 的方法, 其中聚合物是聚亚烷基二醇。
17. 权利要求 16 的方法, 其中聚亚烷基二醇是聚乙二醇(PEG)。
18. 权利要求 17 的方法, 其中聚合物的平均分子量是从 2,000 Da 到 30,000 Da。
19. 权利要求 18 的方法, 其中聚合物的平均分子量是从 5,000 Da 到 20,000 Da。
20. 权利要求 19 的方法, 其中聚合物的平均分子量是约 10,000 Da。

21. 一种抑制哺乳动物中 B 细胞活化的方法, 包括使 B 细胞与选自以下的有效量的 KIM-1 拮抗剂接触: (a)包括 KIM-1Ig 区, 缺少跨膜区和 KIM-1 胞质区的多肽; (b)抗 KIM-1 抗体, 或(c) 抗 KIM-1 抗体的抗原结合片段。

22. 权利要求 21 的方法, 其中 B 细胞的活化是通过活化的 T 细胞介导。

23. 权利要求 22 的方法, 其中活化的 T 细胞是 Th2 细胞。

24. 权利要求 22 的方法, 其中活化的 T 细胞是移植的、供体 T 细胞。

25. 一种抑制哺乳动物中产生抗一种或者多种抗原的抗体亚型的方法, 包括施用选自以下的有效量的 KIM-1 拮抗剂: (a)包含括 KIM-1Ig 区, 缺乏跨膜区和 KIM-1 胞质区的多肽; (b)抗 KIM-1 抗体; 或(c)抗 KIM-1 抗体的抗原结合片段。

26. 权利要求 25 的方法, 其中抗体是 IgG 类。

27. 权利要求 26 的方法, 其中抗体是 IgG1 亚类。

28. 权利要求 27 的方法, 其中在哺乳动物的免疫系统首次识别所述一种或多种抗原前的 30 分钟和 30 天之间向哺乳动物施用有效量的多肽。

29. 权利要求 28 的方法, 其中一种或多种抗原是同种抗原。

30. 权利要求 28 的方法, 其中一种或多种抗原是自身抗原。

31. 权利要求 28 的方法, 其中哺乳动物的免疫系统首先识别一种或多种抗原作为表位在自身免疫疾病病程中传播过程的一部分。

32. 一种在自身免疫性疾病中抑制表位传播的方法, 包括施用选自以下的有效量的 KIM-1 拮抗剂: (a)包括 KIM-1Ig 区, 缺乏跨膜区和 KIM-1 胞浆区的多肽; (b)抗 KIM-1 抗体; 或(c)抗 KIM-1 抗体的抗原结合片段。

33. 一种治疗 Th2 细胞介导的疾病的方法, 包括施用选自以下的有效量的 KIM-1 拮抗剂: (a)包括 KIM-1Ig 区, 缺乏跨膜区和 KIM-1 胞质区的多肽; (b)抗 KIM-1 抗体; 或(c)抗 KIM-1 抗体的抗原结合片段。

34. 权利要求 33 的方法, 其中 Th2 细胞介导的疾病选自重症肌无力、自体免疫溶血性贫血、查加斯病、格雷夫斯病、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、韦格纳肉芽肿、结节性多动脉炎、急骤进展性新月体性肾小球肾炎、移植物抗宿主疾病(GVHD)或系统性狼疮性肾炎(SLE)。

35. 一种抑制 GVHD 的方法, 包括施用选自如下的有效量的 KIM-1 拮抗剂: (a)包括 KIM-1Ig 区, 缺乏跨膜区和 KIM-1 胞质区的多肽; (b)抗 KIM-1

抗体；或(c)抗 KIM-1 抗体的抗原结合片段。

36. 一种多肽，包括 KIM-1 Ig 区和 Fc 部分，缺少跨膜区和 KIM-1 胞质区。

37. 一种在哺乳动物中抑制淋巴细胞分泌 IFN- γ 的方法，包括向哺乳动物施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

38. 一种治疗哺乳动物炎症性疾病或病症的方法，包括向哺乳动物施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

39. 权利要求 38 的方法，其中炎症性疾病或病症是炎症性肠病。

40. 权利要求 38 的方法，其中炎症性疾病或病症是急性或慢性炎症。

41. 权利要求 4 的方法，其中辅助 T 细胞是 Th1 细胞。

KIM-1 拮抗剂及其在免疫系统调节中的应用

发明领域

本发明领域为药学、免疫学、分子生物学和蛋白质化学。

发明背景

KIM-1(肾损伤分子-1)是 I 型细胞膜糖蛋白(Ichimura 等, 1998, *J. Biol. Chem.* 273: 4135-4142)。KIM-1 的胞外部分(胞外结构域)包含一个 6 个-半胱氨酸免疫球蛋白样区和以粘蛋白样 O-糖基化蛋白为特征的富含 T/SP 的区域。粘蛋白区就像柄一样从细胞表面向外延伸 Ig 样区(Jentoft, 1990, *Trends Biochem. Sci.* 15: 291-294)。KIM-1 已被定为甲型肝炎病毒的受体(Kaplan 等, 1996, *EMBO J.* 15: 4282-4296; WO 96/04376; 美国专利 No. 5,622,861)。已发现了两种 KIM-1 剪接变体, 一种主要存在于肝脏(Feigelstock, 1998, *J. Virol.* 72: 6621-6628), 另一种主要存在于肾脏(Ichimura 等, *supra*)。

KIM-1 是称作 TIM(T 细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域)家族的基因家族中的一员。除了 KIM-1, 人至少有另外两种 TIM 基因家族的成员。一个成员被克隆并被最初称作“200 基因”(W0200073498), 但随后称作 TIM-3。另一个成员被克隆并被称作“基因 58”(W099/38881)。

KIM-1 作为肾脏损伤的临床诊断标志物吸引了人们的兴趣(Bailly 等, 2002, *J. Biol. Chem.* 277: 39739-39748; Han 等, 2002, *Kidney Intl.* 62: 237-244)。已报道 KIM-1 的小鼠同系物 (TIM-1)存在于被认为与气道高反应性的发生相关的遗传基因座内(McIntire 等, 2001, *Nature Immunology* 2: 1109)。已报道一种叫做 TIM-2 的小鼠蛋白在体内抗原特异性 T 细胞的产生中起作用(Kumanogoh 等, 2002, *Nature* 419: 629-633)。称作 TIM-3 的小鼠蛋白与小鼠免疫反应的调控有关(Monney 等, 2002, *Nature* 415: 536-541)。

发明概述

已经发现用 KIM-1 拮抗剂治疗哺乳动物改变 T 细胞与其它免疫系统细

胞之间的相互作用，例如，树突细胞、单核巨噬细胞、和 B 细胞，从而能强烈抑制 IgG 对抗原的反应。另外，已发现这种治疗几乎消除了在对随后用抗原的攻击反应中由记忆 B 细胞产生 IgG1。另外，已发现阻断 KIM-1 与其受体的结合减少在混合淋巴细胞应答(MLR)试验中由参与抗原应答的免疫细胞分泌 IFN- γ 。基于这些发现，本发明提供在自身免疫性疾病和哺乳动物免疫系统的其它病症中治疗性调节免疫功能的方法。

本发明提供抑制哺乳动物中 T 细胞和第二细胞，例如，抗原递呈细胞(APC)之间信号传递的方法。该方法包括鉴定哺乳动物，例如，患有免疫疾病或病症的动物，或者准备接受组织移植的动物；以及给予哺乳动物有效量的下列各种 KIM-1 拮抗剂中的一种：(a)包括 KIM-1 Ig 区，缺少跨膜区和 KIM-1 胞质区的多肽；(b) 抗 KIM-1 抗体；和 (c) 抗 KIM-1 抗体的抗原结合片段。

T 细胞可以是活化的 T 细胞，例如，辅助 T 细胞。其可以是 Th2 细胞或 Th1 细胞。在本发明的一些实施方案中 T 细胞是被移植的，供体 T 细胞。APC 可以是，但不限于，单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、或者 B 细胞。在本发明的一些实施方案中，APC 呈递自身抗原。

优选地，KIM-1 拮抗剂是可溶性的多肽，其除了 KIM-1 Ig 区外可包括 KIM-1 粘蛋白区。在一些实施方案中多肽包括异源部分(heterologous moiety)，例如，免疫球蛋白(Ig) 部分，血清白蛋白部分，靶向部分，报告分子部分，多聚化部分，以及便于纯化的部分。优选的异源部分是 Ig 部分如 Fc 部分。

在一些实施方案中，KIM-1 拮抗剂是与如聚亚烷基二醇、糖聚合物、或多肽的聚合物偶联的多肽。优选的聚合物是聚亚烷基二醇，特别优选聚乙二醇(PEG)。聚合物的平均分子量优选从 2,000 Da 到 30,000 Da，优选从 5,000 Da 到 20,000 Da，例如，约 10,000 Da。

本发明提供抑制哺乳动物中 B 细胞活化的方法，例如，通过活化的 T 细胞如 Th2 细胞。该方法包括使 B 细胞或其它 APC 与有效量的 KIM-1 拮抗剂接触，或者 T 细胞，如果拮抗剂是抗 KIM-1 抗体。在本发明的一些实施方案中，活化的 T 细胞是被移植的，供体 T 细胞。

本发明提供在哺乳动物中抑制产生抗体如 IgG 的亚型的方法，所述亚型例如，对一种或多种抗原具有反应性的 IgG1。该方法包括施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。在一些实施方案中，在哺乳动物的免疫系统首次识别一种或

多种抗原前 30 分钟和 30 天之间施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。抗原为同种抗原或自身抗原，根据被治疗的疾病、障碍或情况不同。

本发明提供在自身免疫性疾病中抑制疾病复发的方法。该方法包括施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

本发明提供在自身免疫性疾病中抑制表位扩散的方法。该方法包括施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

本发明提供治疗 Th2 细胞介导的疾病的方法，例如，系统性红斑狼疮、重症肌无力、自身免疫溶血性贫血、查加斯病 (Chagas' disease)、格雷夫斯病 (Graves' disease)、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、韦格纳肉芽肿 (Wegener's granulomatosis)、结节性多动脉炎 (polyarteritis nodosa)、急骤进展性新月体性肾小球肾炎 (rapidly progressive crescentic glomerulonephritis)、或移植物抗宿主病 (GVHD)、哮喘、特应性皮炎 (atopic dermatitis)、特应性疾病 (atopy disorders) 如气道高反应性疾病 (airway hyperresponsive disease) 和 气道应激综合征 (airway distress syndromes)。该方法包括施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

本发明提供抑制 GVHD 的方法。该方法包括在移植前 30 分钟和 30 天之间施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

本发明提供抑制哺乳动物中由淋巴细胞分泌 IFN- γ 的方法。该方法包括向哺乳动物施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

本发明提供抑制 Th1 T 细胞效应子功能的活化，因此抑制在炎性情况中细胞免疫应答。这种炎性情况的实例是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease)。该方法包括向哺乳动物施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

本发明提供治疗哺乳动物炎性疾病或病症的方法，例如，炎症性肠病如克隆病 (Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、以及回肠炎。该方法包括向哺乳动物施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

如这里使用的，“抗 KIM-1 抗体”指抗体，例如 IgG 分子，其特异性结合全长 KIM-1 多肽的细胞外部分。

如这里使用的，“全长的人 KIM-1 多肽”意思是全部 SEQ ID NO :1 或全部 SEQ IDNO :2 的多肽。这两种多肽代表人 KIM-1 基因的剪接变体。

如这里使用的，“异源部分 (heterologous moiety)”意思是不以全长 KIM-1 多肽出现的氨基酸序列。

如这里使用的，“KIM-1 拮抗剂”意思是 (a) 包括 KIM-1 Ig 区，缺少跨膜

区和 KIM-1 胞质区的多肽; (b) 抗 KIM-1 抗体; 或者(c) 抗 KIM-1 抗体的抗原结合片段, 每一个均阻断、抑制、或干扰天然存在的 KIM-1 的生物学活性。

如这里使用的, “KIM-1 融合蛋白”意思是包括融合到异源部分上的 KIM-1 部分的融合蛋白。

如这里使用的, “KIM-1 片段”意思是全长 KIM-1 多肽的生物活性片段。

如这里使用的, “KIM-1 多肽”意思是单独的 KIM-1 部分或包括 KIM-1 部分的融合蛋白。

如这里使用的, “KIM-1 Ig 区(domain)”意思是 SEQ ID NO :1 中的一部分, 其氨基端是 29-36 位氨基酸, 其羧基端是 105-107 位氨基酸。

如这里使用的, “KIM-1 粘蛋白区”意思是 SEQ ID NO :1 中的一部分, 其氨基端是 126-130 位氨基酸, 其羧基端是 255- 274 位氨基酸。

如这里使用的, “KIM-1 跨膜区”意思是 SEQ ID NO :1 的 290-311 位氨基酸部分。

如这里使用的, “KIM-1 胞质区”意思是 SEQ ID NO :1 的 312-334 位氨基酸, 或 SEQ ID NO :2 的 312-359 位氨基酸。

除非另外定义, 这里所使用的所有专业和科学术语具有与发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。为避免冲突, 本说明书, 包括定义, 将决定。所有这里提及的出版物、专利和其它参考资料并入作为参考。

尽管可在本发明的实践或检验中使用与这里所描述的那些相似或等同的方法和材料, 但是下面描述了优选的方法和材料。材料、方法和实例只是用来说明的, 并不打算用来限制。本发明的其它特点和优点将从详细的描述和从权利要求中显而易见。

附图的简要描述

图 1(现有技术)是人 KIM-1 多肽的两个天然存在的剪接变体的图示。这两个氨基酸序列从 1 到 323 残基完全相同。信号序列(1-20 位残基)用下划线标出。跨膜区(290-311 位残基)用双下划线标出。

图 2(现有技术)是 359 个氨基酸的人 KIM-1 剪接变体的图示。信号序列和跨膜区用黑色阴影表示。Ig 区中的半胱氨酸残基用“C”表示。倒置的三角形表示 N-聚糖(glycan)附着点。TSP 富集区, 其对应于粘蛋白区, 用加宽的阴影表示。

图 3 是总结在接受绵羊红细胞初次攻击的 Bal b/c 小鼠第 14 天测得的免疫球蛋白效价的直方图(实验 1)。

图 4 是总结在接受绵羊红细胞初次攻击的 Bal b/c 小鼠第 14 天测得的免疫球蛋白效价的直方图(实验 2)。

图 5 是总结在接受绵羊红细胞初次攻击的 C57B1/6 小鼠第 7 天测得的免疫球蛋白效价的直方图。

图 6 是总结在被允许从初次攻击(图 3)完全恢复后,接着被再次攻击的实验 1 的小鼠中测得的免疫球蛋白效价的直方图。在再次攻击后第 3 天测量免疫球蛋白效价。

图 7 是总结在被允许从初次攻击(图 4)完全恢复后,接着被再次攻击的实验 2 的小鼠中测得的免疫球蛋白效价的直方图。在再次攻击后第 3 天测量免疫球蛋白效价。

图 8 是总结在小鼠 MLR 培养物中 IFN γ 产量数据的直方图。辐射过的 Balb/c 脾细胞用于刺激 C57B16 小鼠的脾细胞。在培养基中培养 48 小时后收获上清液并用于测量 IFN γ 水平。在孵育期间用 mAbs 3A2 和 1H9 处理培养物显著降低分泌到上清液中的 IFN γ 的水平。

图 9 是总结小鼠 MLR 培养物中细胞增殖数据的直方图。辐射过的 Balb/c 脾细胞用于刺激 C57B16 小鼠的脾细胞。在培养基中培养 72 小时后向培养物中加入活体染料(vital dye),允许显色 1-4 个小时。在 3 天培养期间用抗 KIM-1 抗体处理培养物不影响细胞增殖。

图 10 是总结小鼠 MLR 培养物中 IFN γ 产量数据的直方图。辐射过的 Balb/c 脾细胞用于刺激 C57B16 小鼠的脾细胞。在培养基中培养 48 小时后收获上清液并用于测量 IFN γ 水平。在孵育期间用 KIM-1-Ig 融合蛋白处理培养物显著降低分泌到上清液中的 IFN γ 的水平。

图 11 是总结小鼠 MLR 培养物中细胞增殖数据的直方图。辐射过的 Balb/c 脾细胞用于刺激 C57B16 小鼠的脾细胞。在培养基中培养 72 小时后向培养物中加入活体染料,允许显色 1-4 个小时。在 3 天培养期间用 KIM-1-Ig 融合蛋白处理培养物不影响细胞增殖。

图 12A 和 12B 是总结人 MLR 培养物中 IFN γ 产量数据的直方图。辐射过的 JY 细胞用于刺激正常人供体的外周血单个核细胞。在培养基中培养 5 天后收获上清液并用于测量 IFN γ 和 IL-2 水平。在孵育期间用 mAbs AUF1 和

AKG7 处理培养物显著降低分泌到上清液中的 IFN γ 水平(图 12A), 而 IL-2 的水平保持不变(图 12B)。

图 13 是总结人 MLR 培养物中细胞增殖数据的直方图。辐射过的 JY 细胞用于刺激正常人供体的外周血单个核细胞。在培养基中培养 6 天后向培养基中加入活体染料, 允许显色 1-4 个小时。在 6 天培养期间用抗人 KIM-1 单克隆抗体处理培养物不显著影响细胞增殖。

图 14 是总结在小鼠中诱发炎症性肠病后体重丢失数据的直方图。将雌性 Balb/c 小鼠暴露于葡聚糖硫酸钠(DSS)。8 天后, 将小鼠改回到净水(plain water)饲养并允许从 DSS 暴露中恢复。3 天后, 称小鼠的重量。将重量换算成实验开始时重量的百分比。用 KIM-1-Ig 融合蛋白治疗赋予小鼠显著的保护, 如体重记分增加所示。每组有 10 只小鼠。均数的等值检验得到 $p = 0.0001$ 的统计学意义。

图 15A 和 15B 是总结在小鼠中诱发炎症性肠病后临床记分数据的直方图。3 天恢复期后, 评价小鼠腹泻和便中出现血的情况。用 KIM-1-Ig 融合蛋白治疗的小鼠的记分显著高于未治疗或对照-Ig 治疗组(图 15A)。这部分由于在粪粒中出现血的小鼠显著减少(图 15B)。均数等值检验(means equivalence tests)得到未经治疗的对照组的临床记分与 KIM-1-Ig 治疗组相比的显著的显著值($p = 0.05$)。

发明详述

天然人 KIM-1 基因编码含有 334 个氨基酸或 359 个氨基酸(SEQ ID NO: 1)的多肽(图 1), 根据剪接变异不同, 其至少是部分组织依赖性的。两个序列都包括: 信号序列、Ig 区、粘蛋白区、跨膜区、以及胞质区。

使用可溶的, 二聚化的, KIM-1 胞外结构域-Fc 融合蛋白(每个单体含有小鼠 KIM-1 胞外结构域和人 Fc 部分)和公认的动物模型(小鼠 SRBC 应答), 本发明人获得了哺乳动物免疫反应的意义深远的改变。不打算被理论束缚, 本发明人将所观察到的结果解释为表明该融合蛋白作为 KIM-1 拮抗剂起作用, 并且这种拮抗作用干扰 KIM-1 介导的 T 细胞和 APCs 之间的信号传递相互作用。这种干扰的下游效应包括哺乳动物免疫反应的有用调节。这种调节可用于治疗自身免疫性疾病以及其它疾病和障碍, 其中免疫系统通过 T 细胞毒性或者通过免疫球蛋白应答攻击不恰当的靶。免疫系统调节将有利于的

疾病或病症的实例包括,但不限于,关节炎,系统性红斑狼疮(也称为 SLE 或狼疮),以及移植物抗宿主疾病(GVHD)。

在本发明的方法中,可溶的 KIM-1 拮抗剂多肽或 KIM-1 封闭抗体(或结合抗原的抗体片段)可以作为预制成的多肽直接施用。可选择地,其可通过核酸载体(编码和表达该多肽)间接施用。无论哪种方法,结果都是拮抗 KIM-1 介导的对 T 细胞的效应,包括 T 细胞活化和刺激 T 细胞增殖。这种位于 T 细胞上的对 KIM-1 的拮抗作用可直接通过阻断 T 细胞自身的破坏作用达到期望的治疗效果。另外,这种拮抗作用可间接地达到期望的治疗效果,通过阻断活化的 T 细胞介导的 B 细胞的活化作用,因而减少有害抗体的产生。

在不同的疾病中,包括自身免疫性疾病和某种类型的病原感染,损害由自身抗体应答引起,即,产生识别自身抗原的抗体。本发明提供通过干扰 T 细胞的活化和分化来减少这种损害的方法和分子。这反过来干扰活化的 T 细胞介导的 B 细胞活化,其干扰由 B 细胞产生和分泌的特异性免疫球蛋白,例如, IgG1。因此,以自身抗体应答为特征的任何疾病或病症均可通过使用本发明的方法和分子治疗。

当治疗某种自身免疫性疾病时,暴露于抗原,以及免疫系统应答都是短暂的。这导致产生缓解期(remissions),在缓解期施用有效量的 KIM-1 拮抗剂将抑制随后对一种或多种抗原的免疫反应的再活化。本发明可以这种方法阻止疾病复发。当治疗某种自身免疫性疾病时,哺乳动物的免疫系统首先识别一或多种抗原作为自身免疫疾病病程中表位传播过程的一部分。

一旦移植,在移植物抗宿主病(GVHD)中许多损害直接由在宿主内被活化(对宿主抗原的应答)的供体 T 细胞的作用所致,例如:在骨髓移植中。由于其能干扰 T 细胞活化,本发明有益于抑制 GVHD。除了活化的供体 T 细胞的直接作用的损害,在 GVHD 中也有由抗体介导的成分。因为这种抗体介导的成分依赖供体 T 细胞的活化,其活化产生自身抗体的 B 细胞,因此本发明减少自身抗体介导的损害,以及在 GVHD 中细胞免疫介导的损害。

抗体介导的自身免疫性疾病

系统性红斑狼疮(SLE; lupus)是一种 T_H -2 介导的自身免疫障碍,以高水平的针对细胞内抗原如双链 DNA,单链 DNA,和组蛋白的自身抗体为特征。考虑到这些特点,系统性红斑狼疮作为可根据本发明治疗的自身免疫性疾病

的例子。

适合依据本发明治疗的其它器官特异性或系统性自身免疫性疾病的实例包括重症肌无力、自身免疫溶血性贫血、查加斯病、格雷夫斯病，特发性血小板减少性紫癜(ITP)、韦格纳肉芽肿，结节性多动脉炎和急骤进展性新月体性肾小球肾炎。见，例如，Benjamini 等 1996, *Immunology, A Short Course, Third Ed.* (Wiley-Liss, New York)。另外，类风湿性关节炎(RA)，曾被认为由细胞毒性 T 细胞的细胞毒活性介导，现已知具有 B 细胞和/或抗体成分(Leandro 等，2002, *Ann. Rheum. Dis.*, 61: 863-866; De Vita 等, *Arthritis Rheum.* 46: 2029-2033; Tsuji 等，2002, *J. Exp. Med.* 196:1277-1290)，因此适于根据本发明的治疗。

对一些致病性感染剂的正常免疫反应引起有害的自身抗体应答。一个例子是查加斯病，一种在慢性感染了克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)的人和试验动物中形成的炎性心肌病。抗自身抗体存在于查加斯病病人的血清中(Bach-Elias 等,1998,*Parasitol. Res.* 84:796-799; Tibbetts,等, 1994, *J. Immunol.* 152:1493-1499)，因此这种疾病适于根据本发明的治疗。

由感染产生的自身抗体破坏细胞的另一个例子是特发性血小板减少性紫癜(ITP)，其中自身抗体导致血小板破坏(通过补体或具有 Fc 或 C3b 受体的吞噬细胞)并可导致出血。ITP 适于根据本发明的治疗。

移植物抗宿主病(GVHD)

GVHD 作为可使用本发明的方法进行治疗的 T 细胞介导的疾病的例子。当供体 T 细胞把宿主抗原识别为外源抗原时，引起 GVHD。GVHD，常常是骨髓移植(BMT)病人的致命性结果，可以是急性的或慢性的。GVHD 的急性和慢性型分别作为产生抗原特异性 Th1 和 Th2 应答的例子。急性 GVHD 在骨髓移植后头两个月内发生，特点是供体细胞毒性 T 细胞介导的对皮肤、肠、肝脏，和其它器官的损害。慢性 GVHD 似乎较晚(移植后 100 天)，特点是免疫球蛋白(Ig)产生过多，包括自身抗体，和由 Ig 沉积所致的对皮肤、肾脏，和其它器官的损害。将近 90%的急性 GVHD 继续发展成慢性 GVHD。慢性 GVHD 似乎是 Th2 T 细胞介导的疾病(De Wit 等，1993, *J. Immunol.* 150: 361-366)。急性 GVHD 是 Th1 介导的疾病(Krenger 等, 1996, *Immunol. Res.* 15: 50-73; Williamson 等, 1996, *J. Immunol.* 157: 689-699)。T 细胞细胞毒是急性

GVHD 的特点。可在好多方面看到供体抗宿主细胞毒性的后果。首先，宿主淋巴细胞被迅速破坏，结果经历急性 GVHD 的小鼠受到极度地免疫抑制。其次，供体淋巴细胞移入并在宿主脾脏中扩增，它们的细胞毒活性可在体外通过利用表达可被供体细胞识别(作为外源抗原)的宿主抗原的细胞系直接测量。第三，由于另外的组织和细胞群被破坏，因此该病成为致命的。

慢性 GVHD 由抗体介导的宿主组织和细胞的破坏所致，被称为“SLE 样”GVHD。表现包括自身抗体形成、各种器官中 Ig 沉积(肾脏、肝脏)、皮疹、淋巴增生、Sjögren 样损害、硬皮病样损害、多动脉炎，和其它病变。这种疾病部分是由自身抗体形成介导。考虑到前面的原因，慢性 GVHD 适于根据本发明的治疗。

其它 Th2 相关疾病

特应性疾病的特点是免疫系统细胞，包括活化的 T 细胞和 APC，表达细胞因子、趋化因子和其它分子，这些分子以 Th2 应答为特征，如 IL-4、IL-5 和 IL-13 细胞因子。因而这种特应性疾病可用拮抗产生 Th2 应答的方法来治疗，如本发明的 KIM-1 拮抗剂。特应性疾病包括哮喘、气道高反应性和应激性综合症，以及如特应性皮炎的病变。本发明提供抑制特应性疾病的方法。该方法包括施用有效量的 KIM-1 拮抗剂。

由活化的淋巴细胞、APC 和促炎细胞因子介导的炎症疾病和病症

在小鼠和人模型系统中使用混合淋巴细胞反应试验(MLR)，本发明人已经证明阻断 KIM-1 结合其受体，例如，使用抗 KIM-1 单克隆抗体或 KIM-1-Ig 融合蛋白，减少由应答细胞分泌的 $IFN\gamma$ 。因此，KIM-1 拮抗剂可用于治疗由 $IFN\gamma$ 介导的任何疾病或病症。

$IFN\gamma$ 是免疫反应中关键的细胞因子。它对炎症和免疫进程的发展和程度有多向性(pleiotropic)影响 (Boehm 等 1997, *Ann Rev Immunol* 15 : 749-795)。 $IFN\gamma$ 产量的缺乏降低抗病毒和细菌的应答并且减弱炎症反应。使用 KIM-1 拮抗剂可有助于降低 $IFN\gamma$ 产量过度或不适当的疾病中的 $IFN\gamma$ 产量。这种疾病或病症的例子包括自身免疫性疾病、结肠炎和慢性炎症。

$IFN\gamma$ 是 T 细胞活化和 B 细胞应答的关键成分。它影响 T 细胞效应细胞发育(例如，通过与 IL-4 交叉调控)和 B 细胞的活化(例如，通过对 MHC 介导

的抗原递呈作用和 B7 分子表达的调控)。IFN γ 是 Th1 T 细胞介导的免疫反应的关键成分。IFN γ 显著影响其它免疫系统成分，如巨噬细胞和中性粒细胞。它刺激它们活化并释放有毒的效应分子。

IFN γ 对组织固有细胞类型(resident cell types)有强烈的影响。内皮由 IFN γ 活化。当用 IFN γ 刺激时，患病组织中的固有细胞，例如，类风湿性关节炎中的滑膜细胞，分泌 TNF 和其它细胞因子，MCP-1 和其它趋化因子，以及有毒的效应分子如氧化氮。所有这些由 IFN γ 介导的后面的功能在炎症期间影响细胞运输到组织中。

如在实施例 5(下面)中所示，阻断 KIM-1 结合其受体将在 SRBC 模型系统中减少或消除 IgG1 生成。在 MLR 试验中，本发明人发现阻断 KIM-1 结合其受体将减少由淋巴细胞产生的 IFN γ 。不打算被理论束缚，注意到 IgG1 产量的降低和 IFN γ 产量的降低可能代表 KIM-1 阻断的两种单独的效应，可能无直接联系。因此，当根据本发明使用 KIM-1 拮抗剂用于调节免疫功能时，KIM-1 拮抗剂可通过两种单独的作用机理提供有益的效果。

融合蛋白和偶联多肽

本发明的一些实施方案包括 KIM-1 拮抗剂多肽，其中 KIM-1 部分融合到异源部分上形成 KIM-1 融合蛋白。KIM-1 融合蛋白，与单独的 KIM-1 部分相反，可用于完成各种目的。这些目的包括，例如，增加血清半衰期，提高生物利用率，在体内靶向特异性器官或组织类型，提高重组体表达效率，提高宿主细胞分泌，以及易于纯化。根据将要获得的目的，异源部分可以是惰性的或者是有生物学活性。同样地，其可选择与 KIM-1 部分是稳定地融合或是可裂解的，在体外或在体内裂解。完成不同的目的的异源部分是本领域中公知的。

作为表达 KIM-1 融合蛋白的可选择的方法，所选择的异源部分可预先形成并用化学方法偶联到 KIM-1 部分上。在绝大多数情况中，所选择的异源部分，无论融合或偶联到 KIM-1 部分上将起相似的功能。因此，在下面异源氨基酸序列的讨论中，除非另有说明，应当理解异源序列可以融合蛋白的形式或作为化学偶联物被连接到 KIM-1 部分上。

药学上有活性的多肽如 KIM-1 多肽常常显示在体内被迅速清除，需要很大剂量以便在体内获得治疗性有效浓度。另外，小于约 20 kDa 的多肽可能

经过肾小球滤过，其有时导致肾中毒。可使用相对小的多肽如 KIM-1 片段的融合或结合以减少或避免这种肾中毒的危险。已知各种异源氨基酸序列，即，多肽部分或“载体”，用于提高治疗性多肽的体内稳定性，即，血清半衰期。

由于其半衰期长，在体内分布广，没有酶或免疫功能，因此基本上全长的人血清白蛋白(HSA)，或 HSA 片段，是优选的异源部分。通过应用如那些在 Yeh 等，1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1904- 1908 和 Syed 等，1997, *Blood* 89: 3243-3252 中所教导的方法和材料，HSA 可被用于形成显示药学活性的 KIM-1 融合蛋白或偶联物，其由于 KIM-1 部分显示体内稳定性显著增加，例如，高出 10 倍到 100 倍。优选地，将 HSA 的 N-末端融合到 KIM-1 部分的 C-末端。由于 HSA 是一种天然分泌的蛋白质，因此当融合蛋白在真核表达系统，例如，在哺乳动物中生产时，可利用 HAS 信号序列获得 KIM-1 融合蛋白分泌到细胞培养基中。

本发明的一些实施方案使用 KIM-1 多肽，其中 KIM-1 部分融合到 Fc 区上，即，Ig 重链恒定区的 C-末端。KIM-1-Fc 融合潜在的优点包括可溶性、体内稳定性，和多价位，例如，二聚。使用的 Fc 区可以是 IgA、IgD、或 IgG 的 Fc 区(铰链-CH₂-CH₃)。可选择地，其可以是 IgE 或 IgM Fc 区(铰链-CH₂-CH₃-CH₄)。优选 IgG 的 Fc 区，例如，IgG1 Fc 区或 IgG4 Fc 区。用于构建和表达编码 Fc 融合的 DNA 的材料和方法在本领域中是已知的，可以应用，不用过多试验就可获得 KIM-1 融合体。

优选地，构建有方向的 KIM-1-Fc 融合，其中 KIM-1 部分形成融合蛋白的氨基末端部分。构建和表达具有这种方向的 Fc 融合的例子，见，例如，Wallner 等，美国专利 No. 5,547, 853 (pSAB152)。可选择地，可构建具有相反方向的融合，即，其中 KIM-1 部分形成融合的羧基末端部分。这种方向的例子和讨论，见，例如，Lo 等，美国专利 No. 5,541, 087。

本发明的一些实施方案使用根据 Lo 等，美国专利 No. 5,541, 087，通过构建 KIM-1 免疫融合(immunofusin)DNA 获得的 KIM-1 融合蛋白。免疫融合 DNA 包括编码分泌盒的多核苷酸。分泌盒包括编码(以 5'到 3'方向)信号序列的序列，免疫球蛋白 Fc 区和融合到分泌盒 3'端的 KIM-1 部分。DNA 可在宿主细胞中以高水平表达，宿主细胞高效地产生和分泌融合蛋白。不需要溶解宿主细胞就可以从培养基中收集所分泌的免疫融合物。

在一些实施方案中，该 DNA 序列在 KIM-1 部分和异源部分之间编码蛋

白酶剪切位点。剪切位点提供用于所编码的融合蛋白的蛋白酶性剪切，因此将 Fc 区从靶蛋白中分离。有用的蛋白酶剪切位点包括蛋白酶如胰蛋白酶、纤溶酶或肠激酶 K 识别的氨基酸序列。

KIM-1 多肽构建体可被整合到可复制的表达载体中。有用的载体包括线性核酸、质粒、噬菌粒、粘粒等。一种示范性的表达载体是 pSAB152(Wallner 等, 美国专利 No. 5,547, 853)。另一种示范性的表达载体是 pdC, 其中免疫融合 DNA 的转录被置于在人巨细胞病毒的增强子和启动子的控制下(Lo 等, 1991, *Biochim. Biophys. Acta* 1088: 712; 和 Lo 等, 1998, *Protein Engineering* 11: 495-500)。可用编码 KIM-1 多肽的 DNA 转化或转染适当的宿主细胞, 并用于 KIM-1 多肽的表达和分泌。优选的宿主细胞包括永生的杂交瘤细胞、骨髓瘤细胞、293 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、Hela 细胞, 以及 COS 细胞。

完全完整的, 野生型 Fc 区显示效应子功能在根据本发明的 Fc 融合蛋白中正常地是不必要的和不希望的。因此, 在 KIM-1-Fc 融合蛋白的构建中优选从 Fc 区删除某些结合位点。例如, 由于不必与轻链的共表达, 因此重链的蛋白结合位点, Bip(Hendershot 等, 1987, *Immunol. Today* 8: 111-114), 从 IgE 的 Fc 区中删除, 这样这个位点不干扰融合蛋白的有效分泌。同样地, 在 Fc 区中存在的负责结合免疫球蛋白轻链的半胱氨酸残基应当被删除或用另外的氨基酸取代, 这样当其以免疫融合物形式产生时, 这些半胱氨酸残基不干扰 Fc 区的正确折叠。跨膜区序列, 如那些在 IgM 中存在的序列, 应当被删除。

优选 IgG1 Fc 区。可选择地, 免疫球蛋白 γ 的其它亚类(γ -2, γ -3 和 γ -4) 的 Fc 区可在分泌盒中使用。优先在分泌盒中使用的免疫球蛋白 γ -1 的 IgG1 Fc 区包括绞链区(至少部分)、CH2 区、和 CH3 区。在一些实施方案中, 免疫球蛋白 γ -1 的 Fc 区是删除 CH2 的 Fc, 其包括部分绞链区和 CH3 区, 但不包括 CH2 区。Gillies 等, 1990, *Hum. Antibod. Hybridomas*, 1: 47 描述了删除 CH2 的 Fc。在一些实施方案中, 使用 IgA、IgD、IgE、或 IgM 的 Fc 区。

KIM-1-Fc 融合蛋白可构建成几种不同的构型。在一种构型中 KIM-1 部分的 C-末端直接融合到 Fc 部分的 N-末端。在轻微不同的构型中, 短接头, 例如, 2-10 个氨基酸, 在 KIM-1 部分的 C-末和 Fc 部分的 N-末端之间结合到融合物中。这种接头提供构象的弹性, 其在一些情况中可提高生物学活性。如果在 Fc 部分中保留足够长的绞链区部分, 那么 KIM-1-Fc 融合将二聚化,

因此形成二价分子。单体 Fc 融合物的同源群将产生单特异性的、二价二聚体。两种具有不同特异性的单体 Fc 融合物的混合将产生双特异性的、二价二聚体。

可使用现有技术中已知的方法构建 KIM-1 偶联物。许多含有相应的氨基反应基和巯基反应基的交联剂中的任何一种均可用于将 KIM-1 连接到血清白蛋白上。合适接头的实例包括插入巯基反应性-马来酰亚胺的胺反应性交联剂。这些包括, 例如, SMCC、AMAS、BMPS、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS、或 GMBS。其它合适的接头插入巯基反应性-卤代乙酸基团。这些包括, 例如, SBAP、SIA、SIAB, 提供保护性或非保护性硫醇用于与巯基反应产生可还原键的是 SPDP、SMPT、SATA、或 SATP, 所有这些都可以买到(例如, Pierce Chemicals)。本领域的技术人员可类似地设想用另外的策略将 KIM-1 N-末端与血清白蛋白连接。

本领域中的技术人员可生产对血清白蛋白的偶联物, 其不靶向 KIM-1 多肽的 N-末端或血清白蛋白上的巯基部分。例如, 可使用基因工程技术生产 KIM-1 白蛋白融合物, 其中 KIM-1 部分在其氨基末端(N-ter)、羧基末端(C-ter), 或在两端与血清白蛋白基因融合。

KIM-1 多肽的其它衍生物包括修饰的 KIM-1 或其片段与其它蛋白或多肽的共价或聚合偶联物, 如通过在重组体培养物中合成作为另外的 N-末端或 C 末端。例如, 结合肽在蛋白的 N-末端区可以是信号(或前导)多肽序列, 其在翻译同时或翻译后(co-translationally or post-translationally)指导蛋白从其合成位点转移到其细胞膜或细胞壁内外的功能位点(例如, 酵母 α 因子的前导区)。KIM-1 多肽可被融合到异源肽上以易于纯化或 KIM-1 部分的鉴定(例如, 组氨酸/ KIM-1 融合物)。KIM-1 部分也可被连接到 Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(DYKDDDDK) (SEQ ID NO:)上(Hopp 等, 1988, *Biotechnology* 6: 1204)。这个序列具有高抗原性并提供被特异性单克隆抗体可逆性结合的表位。所以, 它易于所表达的重组体蛋白的分析和纯化。这个序列被牛粘膜肠激酶在紧接 Asp-Lys 配对后面的残基处特异性切割。

使用采用基因融合构建体的表达系统以提高蛋白在细菌中的产量。使用正常情况下以非常高的水平表达的细菌蛋白作为融合蛋白的氨基末端融合配偶体, 有助于确保信息有效的转录和翻译, 以及在一些情况中确保融合蛋白的分泌和溶解 (Smith 等, 1988 *Gene* 67:31; Hopp 等, *supra*; La Vallie

等, 1993, *Biotechnology* 11: 187)。

偶联的聚合物(不同于多肽)

本发明的一些实施方案包括 KIM-1 多肽, 其中一种或多种聚合物结合(共价连接)到 KIM-1 多肽上。适与这种偶联的聚合物的实例包括如多肽(上面所讨论的)、糖聚合物和聚亚烷基二醇链。典型地, 但不是必须地, 将聚合物结合到 KIM-1 多肽上用于提高以下一种或多种特性: 可溶性, 稳定性, 或生物利用率。

用于与 KIM-1 多肽结合的优选的聚合物种类是聚亚烷基二醇。聚乙二醇(PEG)是优选的聚亚烷基二醇。与单独的 KIM-1 多肽相比, PEG 部分, 例如, 1-6 PEG 聚合物, 可与每种 KIM-1 多肽共价结合以提高血清半衰期。PEG 部分是无抗原性并且基本上是生物学惰性。在本发明的实践中使用的 PEG 部分可以是分枝的或不分枝的。

附着到 KIM-1 多肽上的 PEG 部分的数量和单个 PEG 链的分子量可变化。总的来说, 聚合物的分子量越高, 附着到多肽上的聚合物链就越少。优选地, PEG 的平均分子量从 2 kDa 到 100 kDa。更优选地, 平均分子量从 5 kDa 到 20 kDa, 最优选 8-12 kDa。

聚合物, 例如, PEG, 可通过多肽上的任何合适的, 暴露的活性基团连接到 KIM-1 多肽上。暴露的活性基团可以是, 例如, N 末端氨基或内部赖氨酸残基的 ϵ 氨基, 或两者。可使用天然存在的赖氨酸残基用于这种目的, 或者可将赖氨酸残基人工改造到 KIM-1 氨基酸序列内。活化的聚合物可在 KIM-1 多肽上的任何游离氨基处反应和共价连接。游离的羧基、适当活化的羰基、羟基、胍基、咪唑、被氧化的碳水化合物部分和 KIM-1 的巯基(如果可利用)也可以用作聚合物附着的反应基团。

优选地, 在结合反应中, 根据多肽浓度不同, 每摩尔多肽使用约 1.0 到约 10 摩尔活化的聚合物。通常, 所选的比值代表使反应最大而损害 KIM-1 部分的期望的药理学活性的副反应(常常是非特异的)最小之间的平衡。优选地, 保留 KIM-1 多肽生物学活性的至少 50%, 最优选地几乎 100%保留。

可使用常规的化学方法将聚合物结合到 KIM-1 多肽上。例如, 聚亚烷基二醇部分可被偶联到 KIM-1 多肽的赖氨酸 ϵ 氨基上。连于赖氨酸侧链的键可用 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活性酯如 PEG 琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(SS-PEG)

和琥珀酰亚胺基丙酸酯(SPA-PEG)。合适的聚亚烷基二醇部分包括,例如,羧甲基-NHS、正亮氨酸-NHS、SC-PEG、tresylate、醛、环氧化物、羰基咪唑、和 PNP 碳酸盐(酯)。这些试剂可买到。可用另外的胺反应性 PEG 接头取代琥珀酰亚胺基部分。这些包括,例如,异硫氰酸盐(酯)、硝基苯基碳酸盐(酯)、环氧化物、和苯并三唑碳酸盐(酯)。优选的条件是使选择性和程度或反应达到最大。这种反应条件的最优化是在本领域普通技术人员掌握之内。

可通过现有技术中已知的任何 PEG 化反应进行 PEG 化。见,例如, *Focus on Growth Factors*, 3: 4-10, 1992 ; 公开的欧洲专利申请 EP 0 154 316 和 EP 0 401 384。可使用与活性聚乙二醇分子(或类似有活性的水溶性聚合物)酰化反应或烷基化反应进行 PEG 化。

通过酰化的 PEG 化通常包括使有活性的聚亚烷基二醇的酯衍生物反应。任何活性 PEG 分子均可用于 PEG 化。优选的活化 PEG 酯是 PEG 酯化形成的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。如这里所使用的,“酰化”包括在治疗性蛋白和水溶聚合物如 PEG 之间的下列类型的连接: 酰胺、氨基甲酸酯、氨基甲酸乙酯等。见,例如, *Bioconjugate Chem.* 5: 133-140, 1994。应当选择反应参数以避免将破坏或灭活 KIM-1 多肽的温度, 溶剂和 pH 的条件。

优选地, 连接键是酰胺。优选地, 至少最终产物的 95% 是单、二, 或三 PEG 化的。然而, 根据所使用的特异性反应条件不同, 可以不同量形成某些具有更高程度 PEG 化的种类。可选择地, 纯化的 PEG 化的种类从混合物, 特别是未反应的种类中分离, 通过常规的纯化方法, 包括, 例如, 透析、盐析、超滤、离子交换层析、凝胶过滤层析、以及电泳。

通过烷基化的 PEG 化通常包括使 PEG 的末端醛衍生物与 KIM-1 在还原剂存在时反应。另外, 可操纵反应条件以利于基本上仅在 KIM-1 的 N-末端的 α -氨基上 PEG 化(即, 单-PEG 化的蛋白)。在单 PEG 化或聚 PEG 化的情况中, PEG 基团优选通过 -CH₂-NH-基团附着到蛋白上。特别关于 -CH₂-基团, 这种类型的键被称为“烷基”键。

通过还原性烷基化以产生单 PEG 化产物的衍生化作用, 利用不同种类的可用于衍生化作用的伯氨基基团(赖氨酸对 N-末端)的差异反应性。反应是在允许利用赖氨酸残基的 ϵ -氨基和蛋白 N-末端的 α -氨基之间的 pKa 差异的 pH 下完成。通过这种选择性的衍生化作用, 控制含有活性基团如醛的水溶

性聚合物附着到蛋白上：与聚合物的结合主要发生在蛋白的 N-末端，没有发生对其它活性基团如赖氨酸侧链氨基的有意义的修饰。在酰化和烷基化方法中使用的聚合物分子可从上述水溶性聚合物中选择。应当修饰所选择的聚合物以具有单一活性基团，如用于酰化的活性酯或者用于烷基化的醛，结果聚合的程度可被控制到本方法所提供的程度。示范性的活性 PEG 醛是聚乙二醇丙醛，其是水溶性的，或单 C₁-C₁₀ 烷氧基或其芳氧基衍生物(见，美国专利 No. 5,252, 714)。聚合物可以是分枝的或不分枝的。对于酰化反应，所选择的聚合物应当具有单一活性酯基。对于还原性烷化，所选择的聚合物应当具有单一活性醛基。通常，将不会从天然存在的糖基残基中选择水溶性聚合物，因为这些通常由哺乳动物重组表达系统更方便地制备。

制备 PEG 化的 KIM-1 的方法通常包括步骤(a)在使分子附着到一个或多个 PEG 基团的条件下，使 KIM-1 蛋白或多肽与聚乙二醇(如 PEG 的活性酯或醛衍生物)反应，以及(b)获得反应产物。总的来说，基于已知的参数和期望的结果将一步步决定酰化反应的最佳反应条件。例如，PEG: 蛋白的比例越大，聚 PEG 化产物的百分率就越高。

还原性烷基化以产生基本上均一(homogeneous)的单聚合物/KIM-1 群通常包括以下几步：(a)在还原性烷基化反应条件下，在适于在 KIM-1 的氨基末端的 α -氨基的 pen-nit 选择性修饰的 pH，使 KIM-1 多肽与活性 PEG 分子反应；以及(b)获得反应产物。

对于基本上均一的单聚合物/KIM-1 群，还原性烷基化反应条件是那些允许水溶性聚合物部分选择性附着到 KIM-1 的 N-末端的条件。这种反应条件通常提供赖氨酸氨基和 N-末端的 α -氨基之间的 pKa 差异(pKa 是 50%的氨基被质子化，50%未被质子化的 pH)。该 pH 也影响将使用的聚合物与蛋白的比。总的说来，如果 pH 较低，将期望聚合物大大地超过蛋白(即，活性 N-末端 α -氨基越少，达到最佳条件所需要的聚合物就越多)。如果 pH 较高，聚合物: 蛋白的比值不必那样大。(因为可利用的活性基团越多，需要的聚合物分子就越少)。为了本发明的目的，优选的 pH 是在 3-9 的范围，优选 3-6。

KIM-1 多肽可包含标签，例如，可随后被蛋白酶解释放的部分。因此，赖氨酸部分可被选择性修饰，通过首先将修饰的组氨酸标签与低分子量如将与赖氨酸和 N-末端都反应的 Traut's 试剂(Pierce)接头反应，然后释放组氨酸标签。多肽然后将包含游离 SH 基，该 SH 基可被含有巯基活性头部基团如

马来酰亚胺基、乙烯砜基、卤代乙酸基团、游离的或被保护的 SH 的 PEG 选择性修饰。

Traut's 试剂可以用将建立 PEG 附着的特异性位点的任何接头取代。作为例子, Traut's 试剂可被 SPDP、SMPT、SATA、或 SATP(所有都可从 Pierce 买到)取代。类似地, 可将蛋白与插入马来酰亚胺(例如, SMCC、AMAS、BMPS、MBS、EMCS、SMPB、SMPH、KMUS、或 GMBS)、卤代乙酸基团(SBAP、SIA、SIAB)、或乙烯砜基的胺反应性接头反应, 以及将最终的产物与含有游离 SH 基的 PEG 反应。对所使用的接头的唯一限制是不能阻滞随后 N-末端标签的去除。

在一些实施方案中, 聚亚烷基二醇部分偶联到 KIM-1 多肽的胱氨酸基团上。使用例如, 马来酰亚胺、乙烯砜基、卤乙酸基团、和巯基可影响偶联。

可选择地, KIM-1 多肽通过不稳定的键结合到聚乙二醇上。该不稳定的键可被切割, 例如, 生化水解、蛋白酶解、或巯基裂解。例如, 该键可在体内(生理)条件下被切割。

可通过用于使生物活性材料与惰性聚合物反应的任何合适的方法进行该反应, 优选地在约 pH 5-8, 例如, pH 5, 6, 7, 或 8, 如果活性基团位于 N-末端的 α -氨基。通常该过程包括制备活化的聚合物, 然后使蛋白与活化的聚合物反应以产生适于制备制剂的可溶性蛋白。

在 KIM-1 多肽上的一个或多个位点可偶联聚合物。例如, 可将 1, 2, 3, 4 或 5 个 PEG 部分附着到氨基末端。

抗 KIM-1 抗体

根据本发明所使用的抗 KIM-1 抗体或其抗原结合片段可以是各种类型分子中的任何一种, 包括, 但不限于, 多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)、人源化抗体、完全人抗体、嵌合抗体、单链抗体、双抗体(diabody)、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂、Fv 片段、Fd 片段、dAb 片段、以及含有互补决定区(CDR)的片段。

如这里所使用的: Fd 意思是由 V_H 和 C_{H1} 区构成的片段; Fv 意思是由抗体单臂的 V_L 和 V_H 区构成的片段; dAb 意思是由 V_H 构成的片段(Ward 等, 1989, *Nature* 341: 544-546)。如这里所使用的, 单链抗体(scFv)意思是一种抗体, 其中 V_L 区和 V_H 区配对, 通过能使它们成为单一蛋白链的合成接

头形成单价分子(Bird等, 1988, *Science* 242: 423-426; Huston等, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883)。如这里所使用的, 双抗体意思是双特异抗体, 其中在单一多肽链上表达 V_H 和 V_L 区, 但使用非常短不允许在相同链上的两个区之间配对的接头, 因此迫使这两个区与另一链的互补区配对并生成两个抗原结合位点(见, 例如, Holliger,等, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; 和 Poljak 等, 1994, *Structure* 2: 1121-1123)。

通常用于获得抗体的可应用的方法在现有技术中是已知的。制备抗 KIM-1 抗体的有用的方法和材料的综述, 见, 例如, Harlow 等, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*; Yelton,等, 1981, *Ann. Rev. Biochem.*, 50: 657-80.; 和 Ausubel 等, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: John Wiley & Sons)。抗 KIM-1 抗体的抗原结合特性可通过本领域普通技术人员进行测定, 使用多种常规方法中的任何一种, 包括, 例如, 放射免疫测定法、免疫印迹试验和 ELISA。生产本发明抗体的其它技术包括体外将淋巴细胞暴露于 KIM-1 多肽, 或者筛选在噬菌体或类似载体上的抗体库。见, 例如, Huse 等, 1989, *Science*, 246: 1275-1281。

载体

本发明提供包括编码 KIM-1 多肽的核酸的载体。载体和可操作地连接到本发明的核酸上的表达调控序列的选择依赖于所期望的功能特性, 例如, 蛋白表达, 以及将被转化的宿主细胞。本发明的载体可能至少能指导复制或插入到宿主染色体中, 优选也能表达包含在 rDNA 分子中的结构基因。

对于调控可操作地连接的编码序列表达有用的表达控制元件在现有技术中是已知的。实例包括, 但不限于, 可诱导的启动子、组成型启动子、分泌信号、和其它调控元件。当使用可诱导启动子时, 其可被控制, 例如, 通过其营养状态的改变、或者温度、宿主细胞培养基的改变。

载体包括原核复制子, 即, 具有能指导原核宿主细胞中染色体外的重组 DNA 分子自主复制和维持的 DNA 序列, 如用其转化的细菌宿主细胞。这种复制子在现有技术中是公知的。另外, 包括原核复制子的载体也可包括其表达赋予可检测的标记如药物抗性的基因。细菌药物抗性基因典型的是那些赋予氨基青霉素或四环素抗性的基因。

包括原核复制子的载体可进一步包括用于指导编码基因序列在细菌宿

主细胞中表达的原核的或噬菌体启动子。在含有用于插入本发明的 DNA 片段的方便的限制性酶切位点的质粒载体中典型地提供与细菌宿主相容的启动子序列。这种载体质粒的实例是 pUC8、pUC9、pBR322 和 pBR329 (BioRad Laboratories)、pPL 和 pKK223 (Pharmacia)。任何合适的原核宿主都可用于表达编码本发明蛋白的重组 DNA 分子。

真核细胞表达载体在现有技术中是已知的并可买到。典型地,这种载体含有用于插入所期望的 DNA 片段的方便的限制性酶切位点。示范性载体包括 pSVL 和 pKSV-10(Pharmacia)、pBPV-1、pML2d(International Biotechnologies)、pTDTI(ATCC 31255)。

真核细胞表达载体可包括可选择性的标记,例如,药物抗性基因。优选的药物抗性基因赋予新霉素抗性,即,新霉素磷酸转移酶(neo)基因(Southern 等,1982, *J. Mol. Anal. Genet.* 1:327-341)。

为了表达抗体或抗体片段,将编码部分或全长轻和重链的 DNAs 插入到表达载体中。表达载体包括质粒、逆转录病毒、粘粒、YACs、EBV 衍生的游离基因等。选择表达载体和表达控制序列与所使用的表达宿主细胞相容。抗体轻链基因和抗体重链基因可被插入到独立的载体中。在一些实施方案中,两种基因被插入到相同的表达载体中。

方便的载体是编码有功能的完整的人 C_H 或 C_L 免疫球蛋白序列的载体。优选地,如上所述,限制性酶切位点进行改造使得任何 V_H 或 V_L 序列可被容易地插入和表达。在这种载体中,剪接通常发生在插入的 J 区中的剪接供体位点和前述人 C 区的剪接受体位点之间,也在位于人 C_H 外显子内的剪接区上。聚腺苷酸化和转录终止发生在编码区的天然染色体位点下游。重组体表达载体也可编码便于从宿主细胞中分泌抗体链的信号肽。

用于哺乳动物宿主细胞表达的优选的调控序列包括在哺乳动物细胞中指导蛋白高水平表达的病毒元件,如来源于逆转录病毒 LTRs、巨细胞病毒(CMV)(如 CMVV 启动子/增强子)、猿猴病毒 40(SV40)(如 SV40 启动子/增强子)、腺病毒,(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))、多形瘤的启动子和增强子以及强哺乳动物启动子如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子。病毒调控元件及其序列的进一步描述,见,例如,Stinski 的美国专利 No.5,168,062, Bell 等的美国专利 No.4,510,245 和 Schaffner 的美国专利 No.4,968,615。

重组表达载体可携带调控载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制的

起点)和可选择的标记基因。可选择的标记基因便于载体被引入到其中的宿主细胞的选择(见,例如,美国专利 Nos.4,399,216, 4,634,665 和 5,179,017, 所有都是 Axel 等的专利)。例如,典型地可选择的标记基因在载体被引入的宿主细胞中赋予对药物,如 G418、潮霉素或氨基喋呤的抗性。优选的可选择的标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于使用氨基喋呤选择/扩增 dhfr 宿主细胞)和 neo 基因(用于 G418 选择)。

编码 KIM-1 多肽和抗-KIM-1 抗体的核酸,以及包含这些核酸分子的载体,可用于转化合适的宿主细胞。将外源 DNA 引入到哺乳动物中的方法在现有技术中是公知的,包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、多核苷酸包裹到脂质体中、以及 DNA 直接显微注射到细胞核内。另外,核酸分子可通过病毒载体被引入到哺乳动物细胞中。

宿主细胞的转化可通过适于所用载体和宿主细胞的常规方法进行。关于原核宿主细胞的转化,可采用电穿孔和盐处理法(Cohen 等, 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114)。关于脊椎动物细胞的转化,可以采用电穿孔、阳离子脂质或盐处理法(见,例如, Graham 等, 1973, *Virology* 52: 456-467; Wigler 等, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1373-1376)。

宿主细胞可以是原核的或真核的。优选的真核宿主细胞包括,但不限于,酵母和哺乳动物细胞。有用的真核宿主细胞的实例包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(ATCC 登记号 No. CCL61)、NIH 瑞士小鼠胚胎细胞 NIH-3T3 (ATCC 登记号 No. CRL1658), 以及幼仓鼠肾细胞(BHK)。可用作宿主用于表达的哺乳动物细胞系在现有技术中是已知的,包括许多可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生细胞系。除了别的以外,这些包括,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NSO、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如, Hep G2)、A549 细胞,以及许多其它细胞系。

使用已知技术可提高生产细胞系表达多肽。例如,谷氨酰胺合成酶(GS)系统通常在某种情况下用于提高表达。见,例如,欧洲专利 Nos.0216846、0256055、和 0323997 以及欧洲专利申请 No.89303964.4。

制剂

包含 KIM-1 多肽、抗 KIM-1 抗体、或抗 KIM-1 抗体的抗原结合片段的

组合物可含有适当的药学上可接受的载体。例如，他们可含有赋形剂和/或辅料，便于将活性化合物加工成预定用于输送到作用位点的制剂。用于肠胃外给药的合适的制剂包括水溶型活性化合物的水溶液，例如，水溶性盐。此外，活性化合物的悬液可作为适当的油性注射悬液施用。合适的亲脂性溶剂和载体包括脂肪油，例如，芝麻油，或合成的脂肪酸酯，例如，乙基油酸酯或甘油三酯。水性注射悬液可含有增加悬液粘性的物质，包括，例如，羧甲基纤维素钠、山梨醇和葡聚糖。可选择地，悬液也可含有稳定剂。也可使用脂质体包封本发明的分子用于递送到细胞或胞间隙内。示范性的药学上可接受的载体是生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂、水、盐、磷酸缓冲盐、葡萄糖、甘油、乙醇等。在一些实施方案中，组合物包括等张剂，例如，糖，多元醇如甘露醇、山梨醇，或氯化钠。在一些实施方案中，组合物包括药学上可接受的物质如润湿剂或者少量辅助物质如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂，其提高活性成分搁置期或效力。

本发明的组合物可以各种形式，包括，例如，液体、半固体和固体剂型，如液体溶液(例如，可注射的和难熔(infusible)的溶液)、分散体或悬液。优选的形式根据打算施用的方式和治疗应用的不同。在一些实施方案中，组合物是可注射或不溶的液体形式，如类似于那些用于人被动免疫的组合物。

组合物可被制成溶液、微乳剂、分散体、脂质体，或其它适于高药物浓度的有序结构。可通过将溶于适当溶剂的活性成分以所需量与以上列举的成分中的一种或其组合混合，根据需要，随后过滤灭菌制备无菌注射液。通常，通过将活性物质结合到无菌载体中制备分散体，其中无菌载体含有碱性分散剂和来自以上列举的那些中的所必需的其它成分。就用于制备无菌可注射液的无菌粉末来说，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，产生活性成分的粉末，向先前无菌过滤的溶液中加入任何另外期望的成分，可维持溶液的适当流动性，例如，通过使用包衣如卵磷脂，通过保持所需颗粒的大小，以及通过使用表面活性剂。通过在组合物中包括延迟吸收的物质，例如，单硬脂酸盐和明胶，可延长可注射的组合物的吸收。

在一些实施方案中，活性成分是用控制释放的制剂或装置制成。这样的制剂和装置的实例包括植入物、经皮贴剂、以及微囊包埋递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，例如，乙烯乙基醋酸酯、聚酸酐、聚乙烯醇酸、胶原、聚原酸酯，以及聚乳酸。制备这种制剂和装置的方法在现有

技术中是已知的。见，例如，*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, 1978, J. R. Robinson, 编, Marcel Dekker, Inc., New York.

也可将补充的活性化合物结合到化合物中。在一些实施方案中，KIM-1 多肽、抗 KIM-1 抗体或其片段与第二种免疫调制剂同时施用，所述第二种免疫调节剂例如，BAFF-R-Ig、LTJ3-R-Ig、CTLA4-Ig、抗 CD40L、或抗-CD20 单克隆抗体。

可调整剂量方案以提供所期望的最佳反应。例如，可以施用单剂，可随着时间施用几个分开的剂量，或者剂量可由治疗情况的紧急所指示按比例减少或增加。制备给药容易的剂量单位形式的肠胃外组合物是有利的，如这里所使用的剂量单位形式一致是指完全分散的单位，作为单位剂量适于将被治疗的哺乳动物受试者，每个单位与所需要的药学载体结合，含有经计算产生期望治疗效果的预定量的活性化合物。

在一些实施方案中，KIM-1 的治疗有效剂量是 0.1 到 100 mg/kg。在一些实施方案中，治疗有效剂量是 0.5 到 50mg/kg。在一些实施方案中，治疗有效剂量是 1.0 到 10mg/kg，例如，约 5mg/kg。也可通过体外测量适当(治疗)时期包被靶细胞(KIM-1 或 KIM-1 受体阳性细胞，根据修饰剂的不同)所需的修饰剂浓度的实验，评价有效剂量的决定。FACS 和 ELISA 受体配体结合试验可用于监视细胞包被反应。基于这些体外结合试验的结果，可选择适宜修饰剂浓度的范围。

通过与药学上可接受的无毒辅料或载体混合，可将本发明的分子制成药物组合物。这种组合物可被制成用于肠胃外给药，特别是以液体溶液或悬液的形式。组合物可以单位剂型施用，并可通过任何合适的方法制备。这些方法在现有技术中是已知的。例如，见，*Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., Easton, PA 1980)。

液体剂型包括药学可接受的溶液、乳剂、微乳液，和悬液。除了活性化合物，液体剂型可含有惰性成分包括水、乙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1, 3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇、山梨聚糖的脂肪酸酯、及其混合物。

可通过在可降解的聚合物如聚交酯-聚乙醇酸交酯 (polyactide-polyglycolide) 中形成药物的微囊包埋的基质，制备可注射的贮存制剂。根据药物与聚合物的比率，及所用聚合物的特性，可以控制药物释放

的速率。其它示范性的生物可降解的聚合物包括聚原酸酯和聚酸酐。贮存可注射的制剂也可通过将药物陷入与身体组织相容的脂质体或微乳剂中制备。

实施例

本发明通过以下列试验实例进一步阐述。实施例仅用作说明目的，不当被解释为以任何方式限制本发明的范围或内容。

实施例 1: 人 KIM-1 胞外域-Fc 构建体(pHI105)

将人 KIM-1 的胞外域(1-290 残基) 融合到人 IgG1 的 Fc 部分(铰链,CH2,CH3) 并克隆到 pEAG347(一种 Biogen 哺乳动物表达质粒)中。该质粒含有用于组成型表达的串联启动子和用于稳定表达细胞系的氨甲喋呤选择的二氢叶酸还原酶基因。编码的融合多肽的氨基酸序列如下:

```

1      10      20      30      40      50      60
MHPOVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAVTSMCWNRGSCSLFTCQNG

      70      80      90      100     110     120
IVWINGTHVTFYRKDTRYKLLGDLRRDVSILTIENTAVSDSGVYCCRVEHRGWFNDMKITV

      130     140     150     160     170     180
SLEIVPPKVTTTPIVTTVPTVTTVVRTSTTVPTTTTVPTTMSIPTTTTVPTTMTVS

      190     200     210     220     230     240
TTTSVPTTTSIPTTTSVPVTTTVSTFVPPMPLPRQNHEPVATSPSSPQPAETHPTTLOGA

      250     260     270     280     290     300
IRREPTSSPLYSYTTDGNDTVTESSDGLWNNNQTLFLEHSLLTANTTKGVDKTHTCFPC

      310     320     330     340     350     360
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

      370     380     390     400     410     420
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVY

      430     440     450     460     470     480
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK

      490     500     510     518
LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

信号序列用下划线表示。Fc 铰链用方框表示。

实施例 2: 人 KIM1_{ECD} 粘蛋白 Δ -Fc (pHI100)

将编码与人 IgG1 Fc 部分(铰链,CH2,CH3)融合的人 KIM-1 1-129 残基的 DNA 克隆到 pEAG347(一种 Biogen 哺乳动物表达质粒)中, 其含有用于组成型表达的串联启动子和用于稳定表达细胞系的氨甲喋呤选择的二氢叶酸还原酶基因。编码的融合多肽的氨基酸序列如下:

```

      10      20      30      40      50      60
MHPOVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAVTSMCWNRGSCSLFTCQNG
      70      80      90     100     110     120
IVWTNGTHVTYRKDTRYKLLGDLSRRDVSLTIENTAVSDSGVYCCRVEHRGWFNDMKITV
      130     140     150     160     170     180
SLEIVPPKVVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
      190     200     210     220     230     240
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
      250     260     270     280     290     300
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVRGFYPSDIAVEWESNGQPENN
      310     320     330     340     350
YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

实施例 3: 人 KIM1_{ECD}-6 个组氨酸(pVB602)

将人 KIM-1 的细胞外域(1-290 残基)融合到包括 6 个组氨酸残基重复的短 C-末端肽[VEHHHHHH]并克隆到 pCA125 中, 一种 BIOGEN 哺乳动物表达质粒, 含有用于在哺乳动物中短暂组成型表达的 CMV 启动子。编码的融合多肽的氨基酸序列如下:

```

      10      20      30      40      50      60
MHPOVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAVTSMCWNRGSCSLFTCQNG
      70      80      90     100     110     120
IVWINGTHVTYRKDTRYKLLGDLSSRDVSLTIENTAVSDSGVYCCRVEHRGWFNDMKITV
      130     140     150     160     170     180
SLEIVPPKVTTTPIVTTVPTVTTVVRTSTTVPTTTTVPTTTVPTTMSIPTTTTVPTTMTVS
      190     200     210     220     230     240
TTTSVPTTTSIPTTTSVPVTTTVSTFVPPMPLFRQNHEPVATSPSSPQPAETHPTTLQGA
      250     260     270     280     290
IRREPTSSPLYSYTTDGNDIVTESSDGLWANNQTLFLEHSLLTANTTKGVEHHHHHH

```

实施例 4: 小鼠 KIM-1-Fc 融合物

将两侧为 NotI 和 SalI 位点的 PCR 扩增的小鼠 kim-1 的胞外域与人 IgG1 Fc(作为 SalI-NotI 片段从 EAG409 中分离的)融合, 并克隆到 Ebna 293 细胞表达载体 CH269(构建体 PEM073-6)和 CHO 细胞表达载体 pV90 (构建体 PEM078-1)。SalI 位点位于 kim1 和 Fc 的连接处。最终用于融合的 ORF 的核苷酸序列如下(SalI 位点在上面的实例中):

```

atgaatcagattcaagcttcattcaggcctcactgcttcccaggcactgtgattctatgtggaagtaaaggg
ggtagtgggtcaccctgtcacacttccatgtacttactcaacatcgtggaatcacaacgacatgttggggccgagggc
aatgccatcttctgcttgcataaacacttatttgaccaatggacatcgtgtcacctatcagaagagcagtcggtac
aactaaaggggcatattcagaaggagatgtgccttgacgatagagaactctgttgagagtgacagtggtctgtattg
ttgtcagtgagattcctggatggttaatgatcagaaagtgacctttcattgcaagttaaccagagattcccacac
gtcctccaacaagaccacaaactacaaggccacagctacaggaagaccacgactattcaacaagatccacacatgta
ccaacatcaatcagagtcctacactcctccaacatctacacacacatggactcacaaccagaaccactacatt
ttgtcccatgagacaacagctgaggtgacaggaatccatccatcactcctacagactggaatggcactgcgacatcct
caggagatacctggagtaatcacactgaagcaatccctccagggagccgcagaaaaaccctactaagggcGTCGACaaa
actcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttcctctccccccaaaaccaagga
caccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttca
actggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtg
gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaagccctccc
agccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggg
atgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaaggcttctatcccagcgacatcggcgtggagtgaggag
agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgtgactccgacggctccttctcctctacgcaa
gctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccact
acacgcagaagagcctctccctgtctcccgggaaatga

```

ukim-1 胞外域-人 Fc 的翻译序列如下。由 SalI 位点贡献的两个连接氨基酸用粗体显示:

MN**QIQVFISGL**LLLLPGTVDSYVEVKGVVGH**PVTL**PCTYSTYRGITTCWGRGQCP
 SSACQNTLIWTNGHRV**TYQ**SSRYNLKGHISEGDVSLTIENS**VES**DSGLYCCR**VEIP**
 GWFNDQKV**TFSLQ**VK**PEIP**TRPPTRPTTT**TRPT**ATGRPTT**ISTR**S**THV**PTSIRVSTSTPP
 TSTHTW**THKPE**PTTFC**PHET**TA**EV**TGIP**SHT**PTD**WNG**TATSSGDTWSNHTEA**IP**PG
 KPQKNPTKGVDK**TH**TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEK**TISK**AKGQPREPQVY**TLPP**SRDELTK**NQV**SLTCLVKG**FY**PS
 DIAVEWESNGQPENNYK**ITTP**VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV**FSC**SVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

实施例 5: 小鼠 SRBC 模型中 KIM-1-Fc 融合物

啮齿动物对绵羊红细胞(SRBC)的免疫反应依赖于感受态 T 细胞与 APCs 和 B 细胞的相互作用。因此, 抗 SRBC 应答对于检查淋巴细胞和 APC 上的细胞蛋白在免疫反应的发育和成熟中的作用是一种有用的模型。在小鼠中抗 SRBC 应答由产生 IgM 和产生各种 IgG 同种型构成, 包括高水平的 IgG1 同种型, 也见到相当水平的 IgG2a 和 IgG2b。IgG1 被认为是由 Th2 介导的免疫反应驱动的同种型, 其特点是表达如 IL-4、IL-5 和 IL-13 的细胞因子。IgG2a 和 IgG2b 同种型更具有 Th1 驱动的免疫反应的特征, 与 IL-12 的表达有关。最后, IgG3 同种型是不依赖 T 的免疫反应的典型。在抗 SRBC 应答中表现所有 4 种同种型。

抗 SRBC 应答的过程是在小鼠用 KIM-1-Ig 融合蛋白(mKIM-1-Ig)处理以阻断在 T 细胞上的依赖 KIM-1 的活性之后。在攻击前的那一天(D-1)用 150 ugs/小鼠 mKIM-1-Ig 处理小鼠, 在第 0 天用 100 μ l 溶于 PBS 的 10% SRBC 溶液(Colorado 血清公司)攻击, 然后用 150 μ g mKIM-1-Ig 在第 3 和 6 天再次处理。在免疫后第 7、14、21 和 30 天, 给小鼠放血采集血清样品, 使用血细胞凝集试验获得抗 SRBC 抗体效价。这种试验依赖于抗体交联和聚集(“凝集”)SRBC 的能力, 基于它们的五聚体结构(对于 IgM)或基于出现第三种抗独特型抗血清(对于 Ig 类)。

简言之, 方案如下。将血清样品适当稀释(1:15 到 1:200), 根据被测定的同种型和反应的时间而不同, 然后使用从 Corning(Costar[®] #3795)获得的 96 孔试验板以 1:2 步骤(in 1:2 steps)滴定。对于 IgM 试验, 一式两份分析血清样

品。向孔中加入 25 μ l 溶于葡萄糖-PBS(G-PBS)的 10% SRBC, 允许凝集反应在 37 $^{\circ}$ C 进行 1 小时。对于 Ig 试验, 将血清样品加到平板内并一式三份稀释。将 25 μ l 在 G-PBS 中稀释的 1% 2-巯基乙醇(Sigma)加到每个血清样品系列中, 然后将平板在培养基在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。这是破坏将 IgM 五聚体结合在一起的所有二硫键, 因此消除任何 IgM 背景。然后, 将 25 μ l 溶于 G-PBS 的 10% SRBC 溶液, 和 25 μ l 在 G-PBS 中 1:250 稀释的抗独特型抗血清(羊抗-鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、或 IgG3, 所有都来自 Southern Biotechnology Associates)加入到每一式三份中的前两份以交联所存在的那个亚型的抗 SRBC IgGs。将每一式三份中的第 3 个孔留下来不被交联, 用作 2-巯基乙醇处理后可能残存的任何残余 IgM 活性的对照。平板在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。所有分析平板留下来在 4 $^{\circ}$ C 过夜, 在评分和照相前以稳定得到的血细胞凝集。记下所有效价作为得到阳性凝集读数的最后一次稀释。

将用 mKIM-1-Ig 处理对抗 SRBC 反应的效果与未用 SRBC 攻击, 或用 SRBC 攻击但给予抗 CD40L、非特异性多克隆 hIgG, 或 PBS 的对照组小鼠比较。与预期的一样, 未被攻击和抗 CD40L 处理的小鼠没有抗 SRBC 反应。给予 SRBC 和施用 PBS 或 hIgG 的小鼠对被检验的 Ig 的所有类型都有强烈的抗体效价。用 mKIM-1-Ig 处理的小鼠则相反, 非常显著和特异性缺乏 IgG1 抗 SRBC 同种型。在使用小鼠 Balb/c 系的 2 个独立试验中, 检测到 IgG1 抗 SRBC 的水平显著缺乏(图 3 和 4)。诱导抗 SRBC 反应后 7 天, 在用 mKIM-1-Ig 处理的小鼠中 IgG1 效价平均低于对照处理的小鼠 70%。到诱导抗 SRBC 反应后 14 天, IgG1 效价减少超过 85%。在使用小鼠 C57B1/6 系的一个实验中观察到类似的缺乏(图 5)。Balb/c 小鼠和 C57B1/6 小鼠被认为在它们的免疫反应中具有不同的倾向性, Balb/c 小鼠的特点是具有主要地 Th2 介导的应答, C57B1/6 小鼠具有主要地 Th1 介导的应答。因此, 在这些小鼠品系中, 小鼠 KIM-1-Ig 融合蛋白阻断产生 IgG1 同种型的能力超越了品系中固有的 Th 倾向性。令人惊奇地, mKIM-1-Ig 处理的影响延续到再次应答, 对随后的 SRBC 攻击没有由记忆 B 细胞产生 IgG1(图 6 和 7)。

实施例 6: 移植物抗宿主病(GVHD)

在小鼠中使用亲本细胞移入 F1 细胞的移植方案模拟 GVHD。小鼠 DBA2 系的脾细胞被静脉注射到(DBA2 x C57B1/6)F1 小鼠中, 其被称为 B6D2F1。

注入的脾细胞构成移植物，DBA2 小鼠是该移植物的供体。接受移植物的 F1 小鼠是宿主。在移植物中存在的供体 T 细胞将宿主细胞上的一半 MHC 标记(单倍型)识别为外源标记，因为它们来源于其它品系，C57B1/6 亲代。这诱导供体 T 细胞抗宿主反应，导致 GVHD。当 DBA/2 亲本脾细胞注射到 B6D2F1 宿主中时，发生慢性 GVHD。相反，当 C57B1/6 脾细胞注射到 B6D2F1 宿主中时，发生急性 GVHD。虽然仍不清楚什么机理负责使用这两种注射方案所产生的显著不同的疾病结果，但是相信在 DBA/2 脾细胞移植物中含有的细胞所表达的细胞因子有助于产生慢性 GVHD，而在 C57B1/6 脾细胞移植物中含有的细胞所表达的细胞因子有助于产生急性 GVHD。干扰 T 细胞与抗原呈递细胞(例如，树突细胞、巨噬细胞、B 细胞: APC)相互作用的试剂有效地阻断急性和慢性 GVHD。

KIM-1 拮抗剂在慢性 GVHD 的小鼠模型中减轻免疫反应的发展。阻断慢性 GVHD 的能力包括对 B 细胞活化和增殖的影响，以及对产生所分泌的 IgG 的影响。小鼠腹腔内(ip)用 KIM-1 拮抗剂或修饰剂处理，对照处理，或者留下来不被处理。4 小时后，小鼠接受从 DBA/2 小鼠中分离的 1×10^8 脾细胞，静脉内(iv)给予 0.5ml 注射剂。静脉注入的 DBA/2 脾细胞构成同种移植物。给予移植物后 2、4 和 6 天，小鼠再次用 KIM-1 拮抗剂或修饰剂处理或者用对照处理。另外对照组的小鼠接受 1×10^8 B6D2F1 脾细胞，其在 B6D2F1 受体中不能诱导疾病。可选择地，未移植的和未处理的 B6D2F1 小鼠用作对照。给予移植物后第 14 天处死小鼠，检查疾病的证据。

未处理的移植物受体小鼠表现多种指示产生慢性 GVHD 的症状。脾肿大，或者脾脏增大，是供体 T 细胞和宿主 B 细胞被活化的证据，经历多克隆扩增，细胞数量急剧增加。细胞表面蛋白如 B 细胞亚型上的 CD69 的出现指示 B 细胞活化。CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的 L-选择蛋白分子的丧失是 T 细胞活化的证据。Ig 分子，如 IgG 类、IgA、和 IgE，分泌进入血清，或者在体外细胞培养物试验中，指示 B 细胞被活化，并已转换了它们的 Ig 种类。在这点上，抗自身 Ig 出现在血清中或在体外细胞培养物试验显示产生的 Ig 具有不适当的自身抗原识别。最后，可测量存活作为不同治疗方案的结果。用 KIM-1 拮抗剂(例如,KIM-1-Ig)的治疗阻断慢性 GVHD 的发展，如表现为脾肿大程度减少、淋巴细胞群的多克隆扩增减少、指示淋巴细胞活化的细胞表面标记减少或消失、Ig 分泌减少、和/或死亡率降低。

我们将对照小鼠与未被处理的同种移植物-受体小鼠比较, 检查 GVHD 期间脾肿大、B 细胞活化和 Ig 分泌的程度。在这些实验中, 抗 CD40L mAbMR1 用作阳性对照, 因为先前显示阻断 CD40L/CD40 相互作用是干扰慢性 GVHD 发生的有效方法(Durie 等, 1994, *J. Clin. Invest.* 94: 1333-1338)。为了研究受用 KIM-1 拮抗剂处理影响的细胞群, 对从移植物注射后 14 天的受体小鼠中获取的脾细胞进行 FACS 分析。从每组 3-4 只小鼠中分离和汇集脾细胞。受体 B 细胞的活化是定义慢性 GVHD 的特征。在经受慢性 GVHD 的小鼠中, 少量但容易看得见的比例的 B200+ B 细胞表达活化标志物 CD69。因此, CD69 表达作为疾病程度的衡量标准。也测量不同处理组小鼠的脾细胞培养物中的总 IgG, 因为 B 细胞所表达的 CD69 指示它们的活化状态。

在小鼠模型中, 疾病的发展依赖于 Th2 细胞因子 IL4, 可通过用抗-IL4 mAb 处理被阻断。这种处理阻止宿主 B 细胞的扩增, 以及伴随的 Ig 产生过多。GVHD 的发展可以多种方式进行。通过脾指数测量供体 T 细胞和宿主 B 细胞群的扩增, 所述脾指数是脾重量与体重的比, 对对照(无病的)小鼠标准化。使用 B 细胞活化标记的分析测量患病小鼠中 B 细胞的活化。最后, B 细胞活化的效果可在循环(例如, 在血清中)中或由疾病诱发后数周收获的宿主脾细胞培养物所产生的 Ig 的水平中看到。在患病动物中循环的 Ig 将含有抗自身抗体。最终, 患病动物死于由于累积的 Ig 沉积所导致的肾或其它器官衰竭, 因此是否存活是疾病活动的相关衡量标准。

实施方案7: SCID-hu 小鼠模型

可在 SCID-hu 小鼠中研究人免疫反应。例如, SCID 小鼠腹腔内注射 $2-5 \times 10^7$ 人外周血单个核细胞, 这些细胞存在于肠道中一段时间并发挥功能, 以及对抗原攻击起反应。用人 PBLs 重建 NOD-SCID 小鼠, 这些小鼠具有另外的优点, 人细胞(T、B、APC)播种到脾内, 可支持系统免疫反应。在 Berney 等, 2001, *Transplantation* 72: 133-140 中讨论了合适的模型。免疫反应的其它模型使用 SCID/米色小鼠, 包括 PBLs 或胎儿细胞(fetal cells)与胎儿肠系膜淋巴结的共移植以提供对免疫反应的支持(Carballido 等, 2000, *Nat. Med.* 6 : 103-106)。

用从破伤风类毒素(TT)免疫的人供体中分离的外周血单个核细胞(PBMCs)重建 SCID-hu 或 NOD-SCID-hu 小鼠。这样重建的 SCID-hu 小鼠具

有定居于各种区室包括腹膜中的人细胞。这样重建的 NOD-SCID-hu 小鼠具有存在于各种区室包括位于它们的次级淋巴器官内,如脾中的人 T 细胞。在这些重建的小鼠中,通过用与 TT、或与 TT 的抗原部分、或与脂质体、或者与含有 TT 的脂质体偶联的抗原免疫诱发初次免疫反应。这样重建并被攻击的小鼠对抗原(例如, NP、DNP、KLH、OVA、HIVgp120 或其部分、黑色素瘤相关抗原 GD2、羊粘蛋白等许多例子)产生高效价($> 1:1000$) Ig。一些实例存在于 Ifverson 等, 1995, *Immunology* 84:111-116 中。这样重建并随后用 KIM-1 拮抗剂或修饰剂处理的小鼠对抗原攻击不产生高效价。

在其它的方法中, SCID-hu 小鼠是用人胎儿骨、胸腺、皮肤碎片、以及肠系膜淋巴结(MLN)重建。MLN 的出现足以支持对 TT-免疫的强烈的免疫反应(而且,因为所有的供体组织都是胎儿的,所以这严格地说是初次免疫反应)。在 Carballido 等, 2000, *Nat. Med.* 6: 103-106 中详细讨论了这种模型。TT 免疫导致人淋巴细胞增殖和活化,以及由 B 细胞分泌 IgM 和 IgG。用 KIM-1 拮抗剂或修饰剂处理重建的 SCID 小鼠一旦受到 TT 攻击则减少人淋巴细胞增殖、活化、以及免疫球蛋白的分泌。

在这些模型,或其它类似 NOD-SCID-hu 或 SCID-hu 模型的修饰中,在疾病背景中测量再次免疫反应,例如,迟发型超敏反应(DTH)。在这种情况下在用 TT 免疫的个体的 PBMCs 重建的 SCID 或 NOD-SCID 小鼠的爪垫中给予 TT 攻击,在反应中测量爪垫的肿胀。DTH 反应依赖于重建的小鼠循环中出现的人记忆 T 细胞。这种模型也可被用于检测移植病人中供体组织可能发生的排斥,与在“trans vivo”模型中一样。在 Carrodegua 等, 1999, *Hum. Immunol.* 60: 640-651 中讨论了这类方法的一个实例。用 KIM-1 拮抗剂或修饰剂处理这样重建的小鼠预防 DTH 反应。在 SCID 小鼠中人疾病反应的其它模型包括在小鼠中转移自身免疫病人的脾细胞或 PBMCs,其中它们继续表达免疫球蛋白和疾病的其它标志物(见 Martino 和 Grinaldim 1997, 在: *Immunology Methods Manual*, vol 3. Lefkovits, 编, Academic Press, San Diego)。在从病人中转移自身免疫细胞前,用 KIM-1 拮抗剂或修饰剂处理这些小鼠,减少免疫球蛋白和或自身免疫病变的其它标志物的表达。

非常有价值的利用 SCID 小鼠的方法包括将疾病组织异种移植到受体小鼠上。例如,从牛皮癣或特应性皮炎病人中转移皮肤的方法是这些疾病广泛使用的模型。特应性皮炎是 Th2 介导的细胞免疫疾病,其可在 SCID 小鼠中

通过将 PBMCs 和皮肤的活检物一起转移到受体小鼠中模拟。用 KIM-1 拮抗剂或修饰剂处理这些小鼠防止细胞的累积和局部的细胞因子分泌，其是皮肤移植中淋巴细胞和效应细胞(嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞，等)活化的证据。这是在供体病人中预防皮炎有效的证据。

实施例 8. 特应性疾病的其它鼠模型

在小鼠中建立过敏反应、哮喘、气道超敏反应(AHR)，和其它特应性疾病的有用模型。例如，过敏性皮炎是通过用抗原使外皮致敏诱导。在一个实例中，抗原是卵白蛋白(OVA)。对这种致敏的Th2反应表现为在皮肤中出现嗜酸粒细胞、Th2细胞因子在皮肤中的局部表达、以及对吸入抗原引起的气道超敏反应(AHR)。首先用KIM-1拮抗剂或修饰剂处理的OVA致敏的小鼠的皮肤中没有嗜酸粒细胞，并且Th2细胞因子的水平降低。重复致敏的小鼠产生OVA特异性IgE，并且在体外用OVA刺激后它们的脾细胞分泌Th2细胞因子IL-4和IL-5。用KIM-1拮抗剂或修饰剂处理时，Th2免疫反应的这些现象被阻止。可选择地，可用i.p.注射抗原(第0天)对小鼠(例如，BALB/c小鼠)致敏，然后3周后(一次)和四周后(3次：例如26、27、28天)通过鼻内给予抗原再次攻击。这产生肺高反应性(AHR)，其通过Th2细胞因子如IL-13介导。一旦用KIM-1拮抗剂或修饰剂处理会阻断这种Th2免疫反应。

使用OVA特异性TCR转基因模型(DO 11.10)，我们诱导OVA特异性免疫反应，然后将Th2 OVA特异性T细胞转移到初始受体(naive recipients)，其然后用OVA气雾剂攻击。这些小鼠迅速发生抗原特异性AHR。当小鼠在OVA气雾剂攻击前用KIM-1拮抗剂或修饰剂处理会阻断这种反应。

乙酰甲胆碱(methacholine)气雾剂治疗诱导肺募集嗜酸粒细胞，导致小鼠AHR。用KIM-1拮抗剂或修饰剂治疗小鼠阻止了AHR的产生。

实施例 9: 胶原诱导的关节炎

在关节炎的这种鼠模型中，使用胶原触发T细胞介导的B细胞活化和产生自身抗体，其攻击关节，导致类似类风湿性关节炎的情况。在小鼠的各种品系中这种反应被高效价的IgG1控制。尤其是，在由于遗传缺陷导致缺少IL-12的小鼠(IL-12敲除小鼠：IL-12^{-/-})中IgG1效价非常高，这些抗体有效地介导关节破坏。

在两个部位通过皮内注射溶于完全弗氏完全佐剂的胶原处理小鼠：对每只耳朵给予少量胶原，以及对两肩之间的皮肤给予少量胶原。3周后小鼠用溶于盐的可溶性胶原强化，使用腹腔内途径。1周内，通过用卡钳测量关节的肿胀和通过测量抗体效价评估关节损害。在病程发展过程中小鼠的治疗改善了疾病评分。尤其是，在疾病开始之前的那一天用 0.1-1 mg/kg 的 KIM-1 拮抗剂或修饰剂处理，随后进行治疗，将会阻止疾病发展，通过关节肿胀的减轻和免疫球蛋白效价的降低来评价。这是治疗中的预防性治疗。

诱导后，以及加强前，用 KIM-1 拮抗剂的治疗改善疾病发展，通过关节肿胀的减轻和免疫球蛋白滴度的降低评价。这是治疗中的治疗性治疗。强化注射后用 KIM-1 拮抗剂或修饰剂的治疗阻止疾病发展，通过关节肿胀的减轻和免疫球蛋白效价降低来评价。这是治疗的治疗过程。

实施例 10: 狼疮的小鼠模型

在 NZB/W 模型中，NZB 系的小鼠与 NZW 系的小鼠交配，随着时间推移，F1 后代产生狼疮样疾病。疾病的表现包括产生自身抗体和类风湿因子。由于产生大量的 Ig 和 RF 造成肾中 Ig 沉积，导致随着时间降低肾的功能，可通过尿中的蛋白尿来测量。

NZB/W F1 后代在 5 月龄左右开始出现疾病的症状，此时伴有中等蛋白尿评分(PU 为 2)。到 9 月龄时小鼠将达到最大值 PU = 4，将开始死于肾脏衰竭的结果。另一个称做 SNF1(SWR x NZB F1 杂交)的模型具有类似的动态过程。

在疾病发病前用 0.1-1 mg/kg 的 KIM-1 拮抗剂处理小鼠，随后进行治疗。这阻止了疾病的发展，通过 PU 评分，和/或通过测量血清中免疫球蛋白的效价，和/或通过脾增生的免疫组织化学分析，和/或通过肾脏中肾小球结构中的免疫复合物沉积和变化的免疫组织化学分析来测量。

在诱导疾病后用 KIM-1 拮抗剂的治疗，例如在第 5 个月时，但在疾病严重之前(即, PU= 2-3)，改善了疾病的发展或逆转了疾病的损害。这可通过 PU 评分，和/或通过测量血清中免疫球蛋白的效价，和/或通过脾增生的免疫组织化学分析，和/或通过肾脏中肾小球结构中的免疫复合物沉积和变化的免疫组织化学分析来测量。

在疾病严重之后(PU = 3-4)用 KIM-1 拮抗剂的治疗可阻止疾病发展或逆

转疾病损害。这可通过 PU 评分, 和/或通过测量血清中免疫球蛋白的效价, 和/或通过脾增生的免疫组织化学分析, 和/或通过肾脏中肾小球结构中的免疫复合物沉积和变化的免疫组织化学分析来测量。

实施例 11: 混合淋巴细胞反应 (MLR)

小鼠 MLR 试验和 KIM-1 的拮抗作用。 根据以下方法进行混合淋巴细胞反应(MLR): 使用无菌技术从 C57B16 和 Balb/c 小鼠中分离脾, 粗略地研磨以释放淋巴细胞, 然后用低张液(Gey's 液)处理以裂解红细胞。剩余细胞通过细胞滤器(BD Falcon, Bedford, MA USA)从残余组织中分离, 然后用无菌的, 无热原的 PBS 洗涤, 以及离心沉淀细胞。再次在 PBS 溶液中重悬细胞, 再次沉淀, 然后重悬浮于完全 RPMI 培养基中。计数细胞并根据需要进行稀释。Balb/c 淋巴细胞用作刺激细胞, 因此, 在使用前将这些细胞在 3000 RAD 照射。

为了建立试验, 将刺激细胞加入到孔中, 随相对于效应细胞数量的比率而改变(2×10^5 /孔)。培养基补充 20 $\mu\text{g/ml}$ 大鼠抗 KIM-1 抗体, 或 KIM-1-Ig 融合蛋白以及对照 Ig 融合蛋白, 如指示的。在 3 个相同的平板中建立培养物, 每个实验条件用每个平板中的 3 个孔代表。一个平板使用 MTS 测定 (CellTiter 96, Promega, Madison, WI USA) 用于产生细胞增殖数据。其它平板用于收集上清液样品用于细胞因子分析。ELISAs (Pierce Endogen, Rockford, IL USA 或) 用于测量培养物上清液中的 mIFN γ 、mTNF、和 mIL-2 的水平。来自增殖试验和 ELISAs 的标准误小于 10%, 图中已经被省略。注意到培养物中 IFN γ 与阳性对照值有大的偏差, 而 IL-2 和 TNF 的水平在阳性对照和处理组之间没有显著性差异。因此, IL-2 和 TNF 数据已被省略; 显示每个代表性实验的 IFN γ 和细胞增殖的数据。

用大鼠抗小鼠 KIM-1 mAbs 3A2.5 和 1H9.11 处理 MLR 培养物显著降低分泌到上清液中的 IFN γ 的水平(图 8)。这种效果对 IFN γ 是特异性的, 因为观察到分泌到上清液中的 IL-2 或 TNF 的水平没有减少。这种效果不是由于在这些培养物中细胞数量减少, 因为细胞增殖试验显示在培养物中活细胞的数量是相似的(图 9)。

用 KIM-1-Ig 融合蛋白处理 MLR 培养物显著减少分泌到上清液中的 IFN γ 水平(图 10)。这种效果对于 IFN γ 是特异性的, 因为注意到分泌到上清液中

的 IL-2 或 TNF 水平没有减少(数据没有显示)。这中效果不是由于在这些培养物中细胞数量减少, 因为细胞增殖试验显示在用 KIM-1-Ig 融合蛋白处理的培养物中活细胞数量与未被处理的对照非常相似(图 11)。

人 MLR 试验和 KIM-1 的拮抗作用。根据以下方法进行混合淋巴细胞反应(MLR): 使用 Ficoll 梯度离心法从正常人供体获得的全血中分离出外周血单个核细胞。细胞然后用无菌的, 无热原的 PBS 洗涤, 离心沉淀细胞。再次在 PBS 溶液中重悬细胞, 再次沉淀, 然后在完全 RPMI 培养基中重悬。计数细胞并根据需要进行稀释。JY 细胞(ATCC, Bethesda, MD USA)用作刺激细胞, 因此, 在使用前将这些细胞在 10000 RAD 照射。

为了建立试验, 将刺激细胞加入到孔中, 随相对于效应细胞数量的比率而改变(2×10^5 /孔)。培养基补充 20 $\mu\text{g/ml}$ 小鼠抗 KIM-1 抗体, 如指示的。在 3 个相同的平板中建立培养物, 每个实验条件用每个平板中的 3 个孔代表。一个平板使用 MTS 测定(CellTiter 96, Promega, Madison, WI USA)用于产生细胞增殖数据。其它平板用于收集上清液样品用于细胞因子分析。ELISAs(Pierce Endogen, Rockford, IL USA 或 R+D Systems, Minneapolis, MN USA)用于测量培养物上清液中的 hIFN γ 、hTNF、和 hIL-2 的水平。来自增殖试验和 ELISAs 的数值的标准误小于 10%, 图中已经被省略。观察到培养物中 IFN γ 与阳性对照值有大的偏差, 而 IL-2 和 TNF 的水平在阳性对照和处理组之间没有显著性差异。TNF 数据已被省略。显示这个代表性实验的 IL-2、IFN γ 和细胞增殖的数据。

用小鼠抗人 KIM-1 mAbs AUF1 和 AKG7 处理 MLR 培养物显著减少分泌到上清液中的 IFN γ 的水平(图 12A)。这种效果对 IFN γ 是特异性的, 因为注意到分泌到上清液中的 IL-2 或 TNF 的水平没有减少(图 12B)。这种效果不是由于在这些培养物中细胞数量减少, 因为细胞增殖试验显示培养物中的活细胞的数量是相似的(图 13)。

实施例 12: 小鼠炎症性肠病(IBD)模型

可溶型 KIM-1-Ig 融合蛋白在实验小鼠的 IBD 模型中能影响症状的进程或严重程度。在这种模型中, 使用 DSS 慢性刺激大肠(结肠), 导致产生炎症。已知在小鼠模型和在病人中促炎介质如 IFN γ 、TNF、和 IL-12 对于 IBD 的产生和严重程度很重要(Egger 等, 2000, *Digestion* 62: 240-248; Monteleone 等,

2000, *Ann. Med.* 32: 552-560; Bouma 等, 2003, *Nat. Rev. Immunol.* 3: 521-533)。如上所述, MLR 数据提示对 KIM-1 的调节可影响产生促炎介质如 IFN γ 。因此, 在体内检验 KIM-1-修饰剂。假设 KIM-1-Ig 融合蛋白通过干扰一种或多种配体与在细胞上所表达的 KIM-1 之间的相互作用起作用, 所述细胞如活化的淋巴细胞或其它免疫细胞。

在小鼠中使用葡聚糖硫酸钠(DSS)模型诱导 IBD(Copper 等, 1993, *Lab. Invest.* 69:238-249)。提供溶于无菌蒸馏水的 4.5% DSS (ICN Biomedicals, Aurora OH USA)溶液作为饮用水源。也对小鼠进行腹泻程度评分(1:软便, 2:稀便, 3:明显水便, 4:严重失禁)以及使用 ColoScreen 玻片(Helena Labs, Beaumont TX USA)对便中是否出现血评分(0:无, 1:血)。少量, 但可检测到的血给予中间分 0.5。在第 0、2、和 5 天腹腔内给予小鼠 200 μ gs KIM-1-Ig 融合蛋白或多克隆 hIgG 对照(SandImmune, Sandoz, Geneva Switzerland)。在第 8 天, 换掉 DSS 水, 给予正常饮用水。继续监控体重和临床评分直到第 12 天实验结束。

在 IBD 诱导期间(第 0、2、和 5 天)小鼠的治疗对累积的体重丢失和疾病评分有显著影响, 直到并包括第 8 天。因此, 小鼠被取消 DSS 水并回到正常饮用水, 监控它们的恢复。如体重丢失的程度(图 14)和它们的临床评分(腹泻和出血; 图 15A)所示, 在第 0、2、和 5 天接受 KIM-1-Ig 融合蛋白的小鼠在第 11 天(进入恢复期的 3 天)一直较为健康。在 KIM-1-Ig 治疗群体中极少的小鼠在便中出现血(图 15B)。

这些数据提示在体内 KIM-1 的调节在急性炎症过程中有保护作用, 所述急性炎症如 DSS 对肠粘膜损伤后出现的炎症。这些结果提示 KIM-1 拮抗剂将在其它急性或慢性炎症背景中有效, 例如, 在类风湿关节炎、多发性硬化、牛皮癣和胰腺炎中。

其它实施方案在下列权利要求内。

MHPOVILSLHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCYSGAVTSMCWNRGSCSLFTCQNG 60
 IVWTNQHVTYRKDTRYKLLGDLRRDVSLENTAVSDSGVYCCRVEHRCWFNDMKITV 120
 SLEIVPPKVTTFPIVTTVPTTIVRTSTTVPVTTTVPVTTTMSIPTTTTVPVTTMTVS 180
 TTTSVPTTTSIPTTTSVPTTIVSTFVPPMPLPRQNHPEPVATSPSSPQPAETHPTTLQGA 240
 IRREPTSSPLYSYTTDGNPTVTESSDGLWNNQHQLFLEHSLLTANPKGIYAGVCISVL 300
 VLIALLGVIIAKKYFFKKEVQQL{RPHKSCIHORE 334 (SEQ ID NO:1)
 SVSFSSLIQIKALQNAVEKEVqaedniyIENSLYATD 359 (SEQ ID NO:1)

图 1



图 2

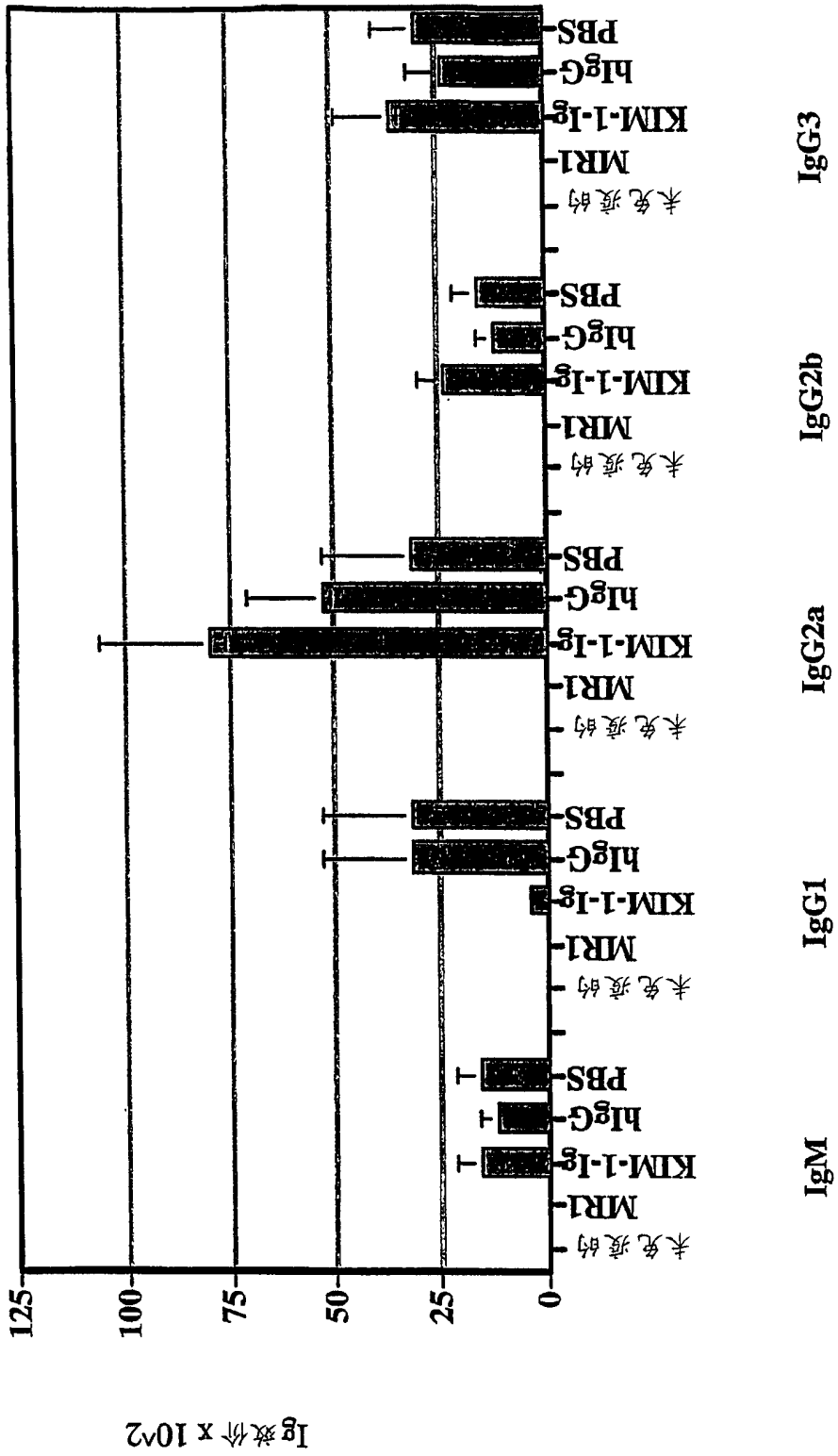


图 3

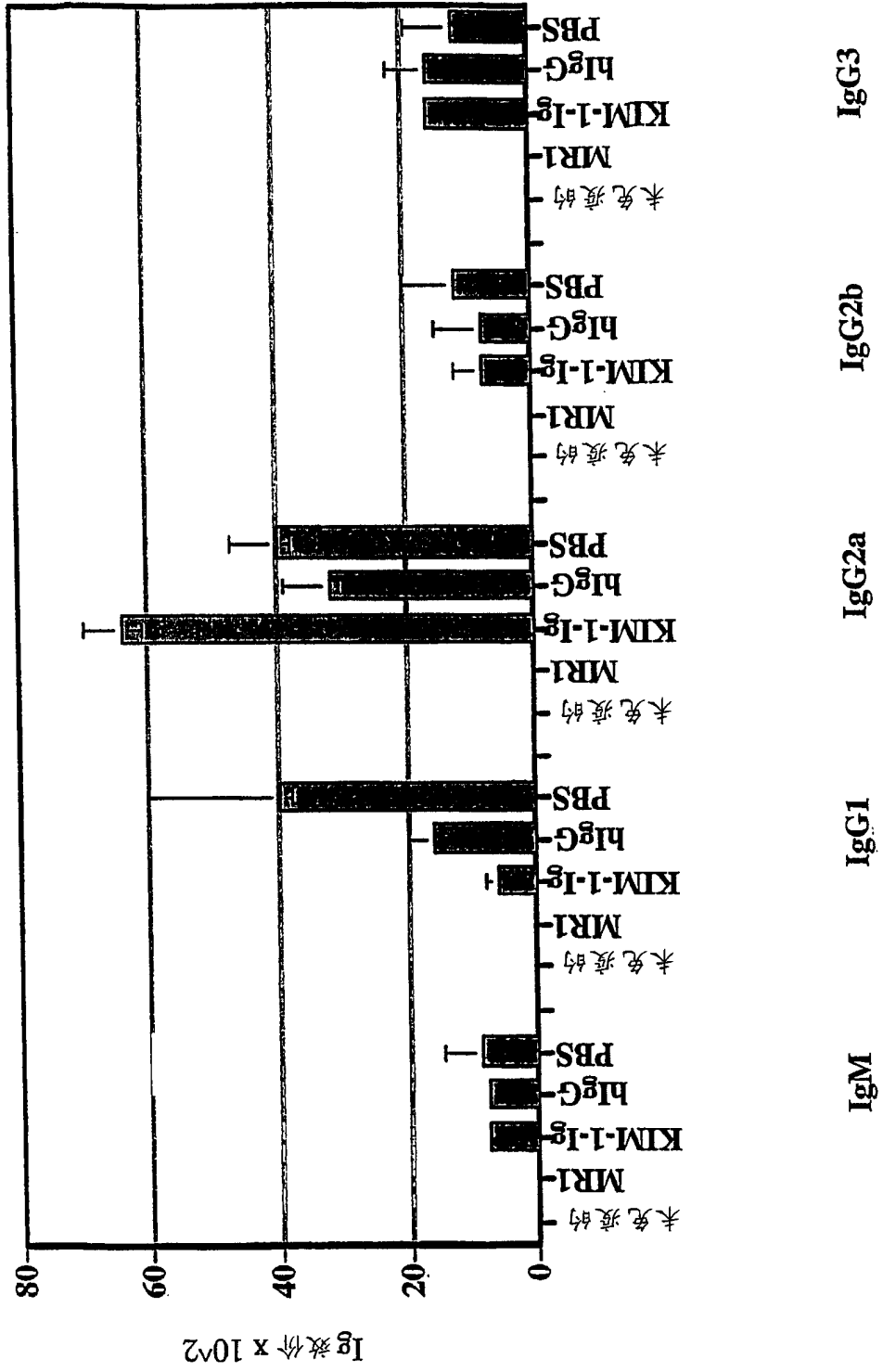


图 4

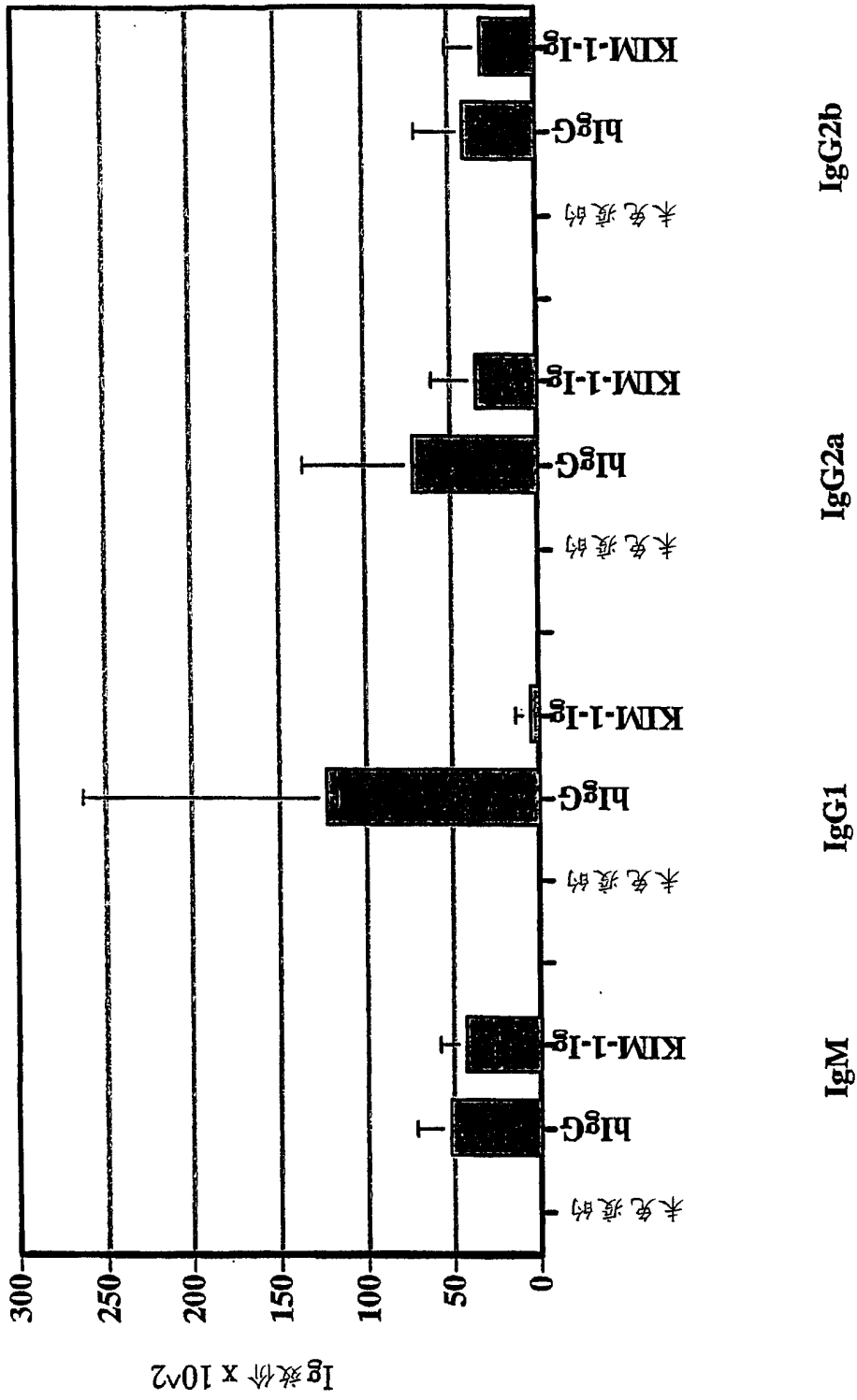


图 5

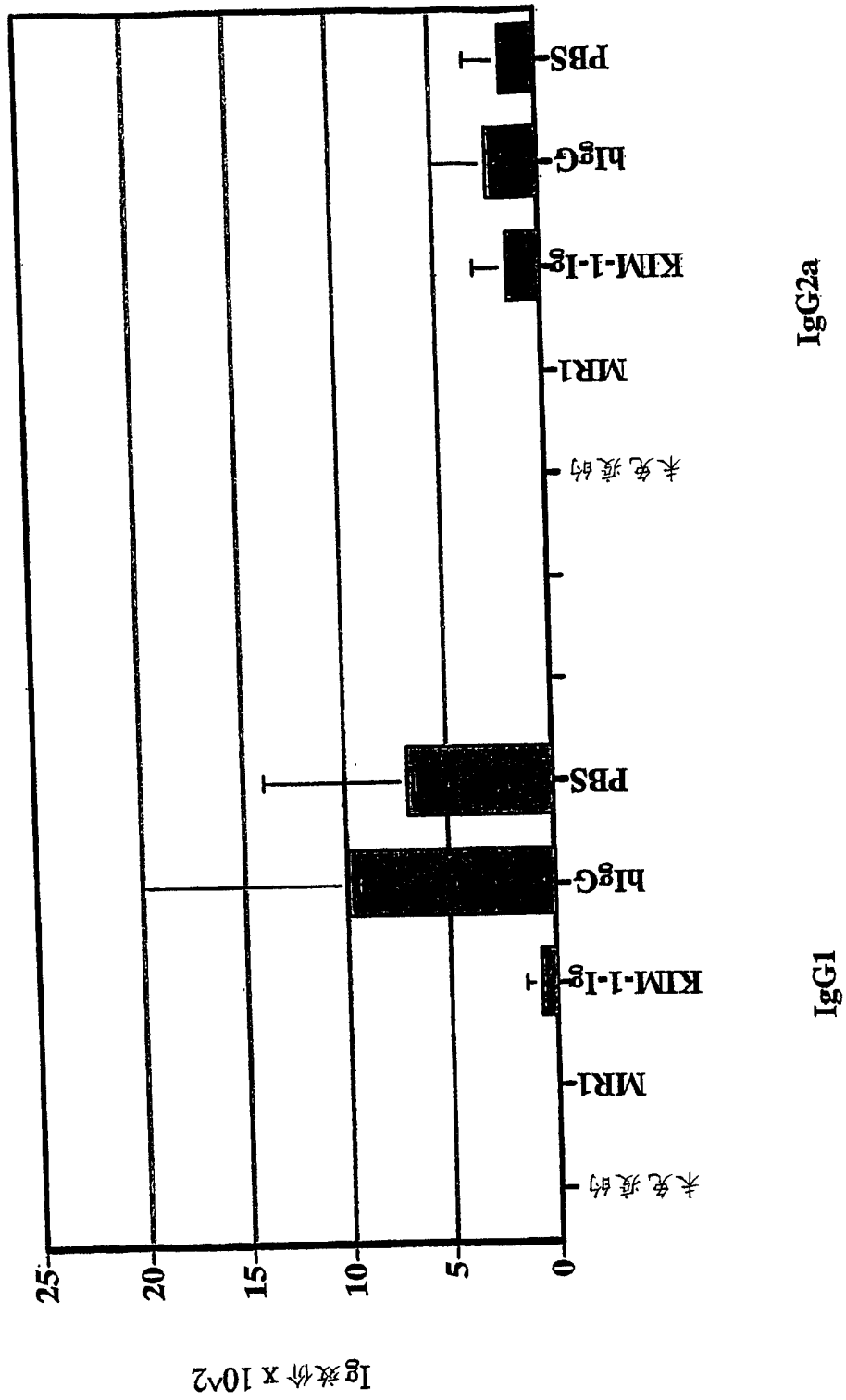


图 6

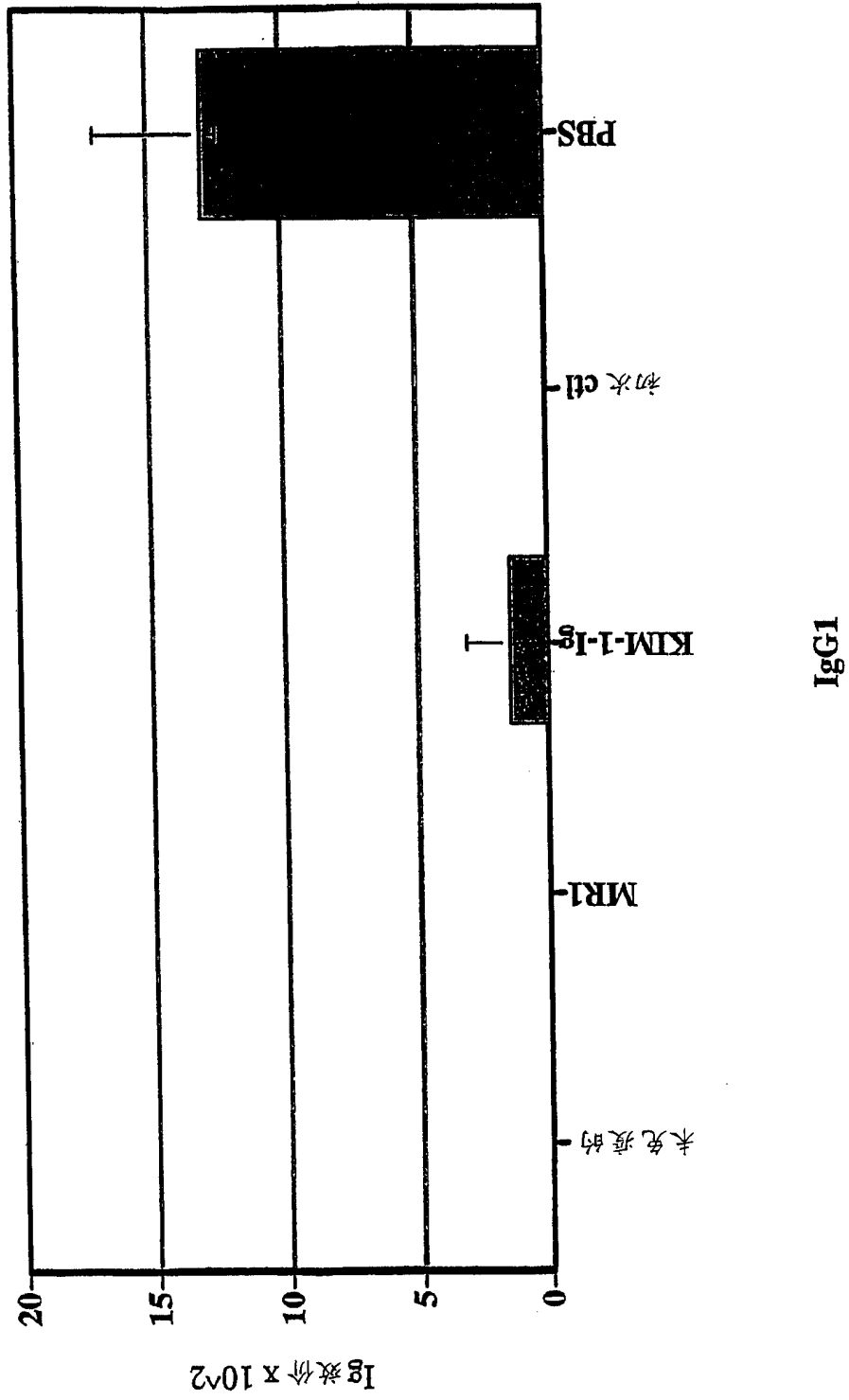
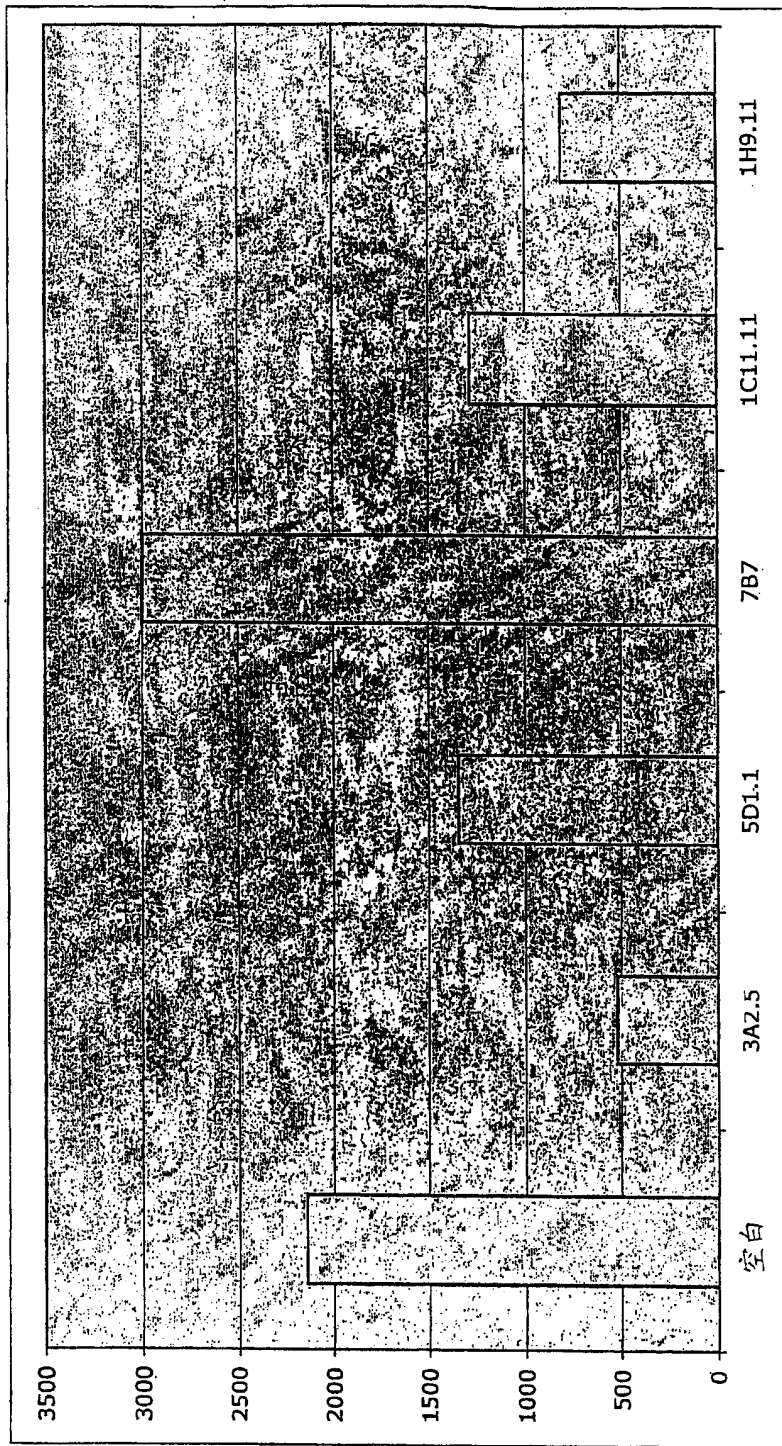


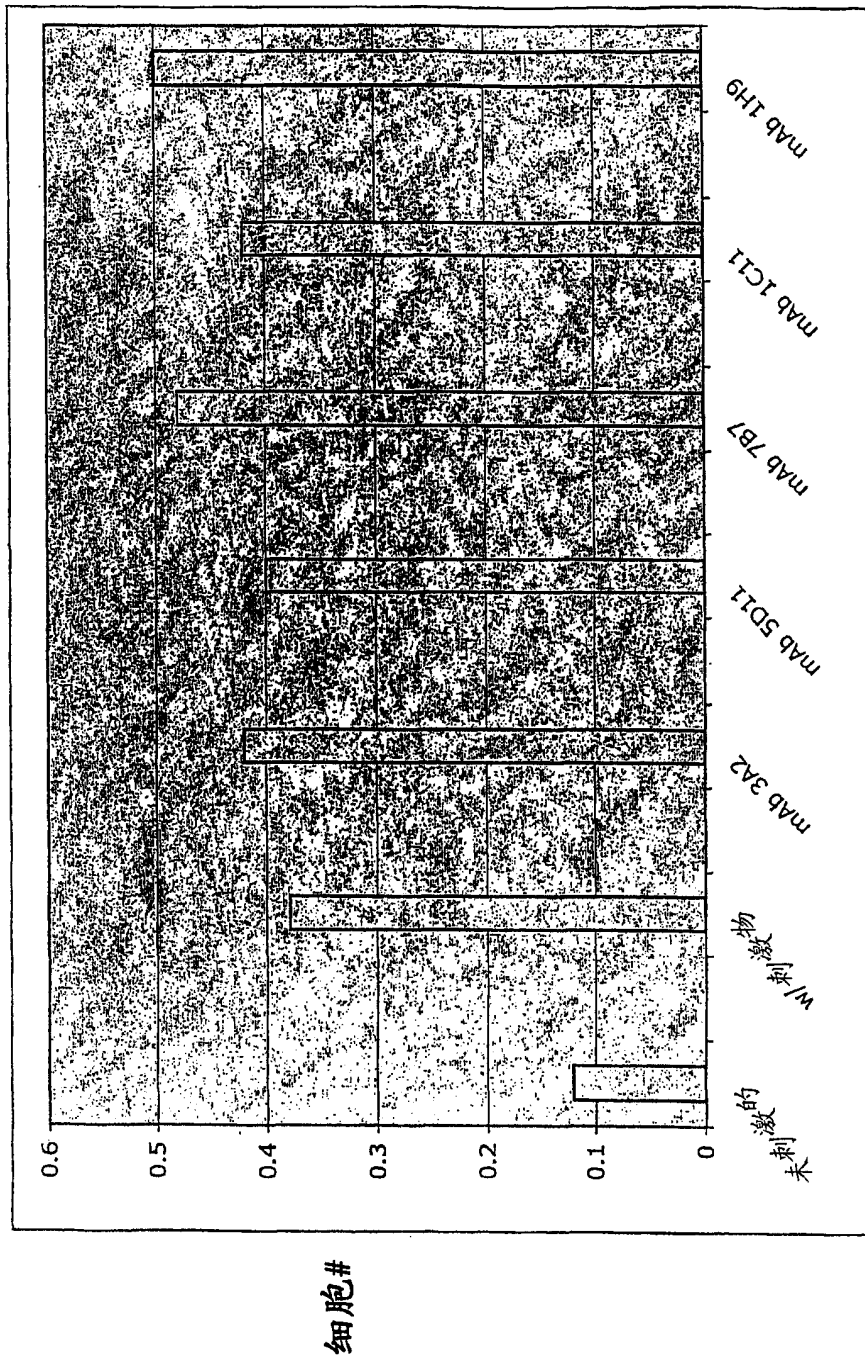
图 7



IFN γ
(pg/ml)

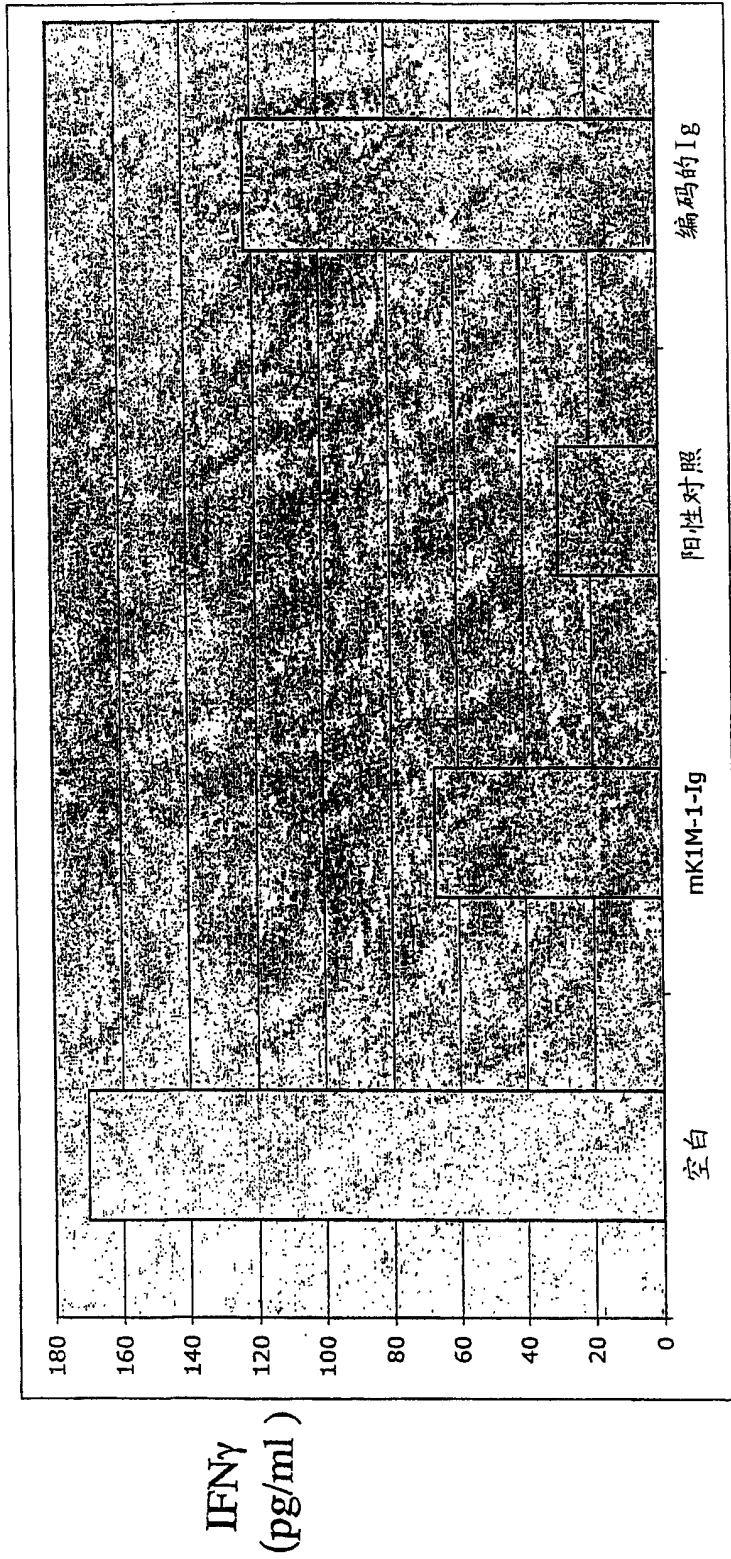
单克隆抗体

图 8



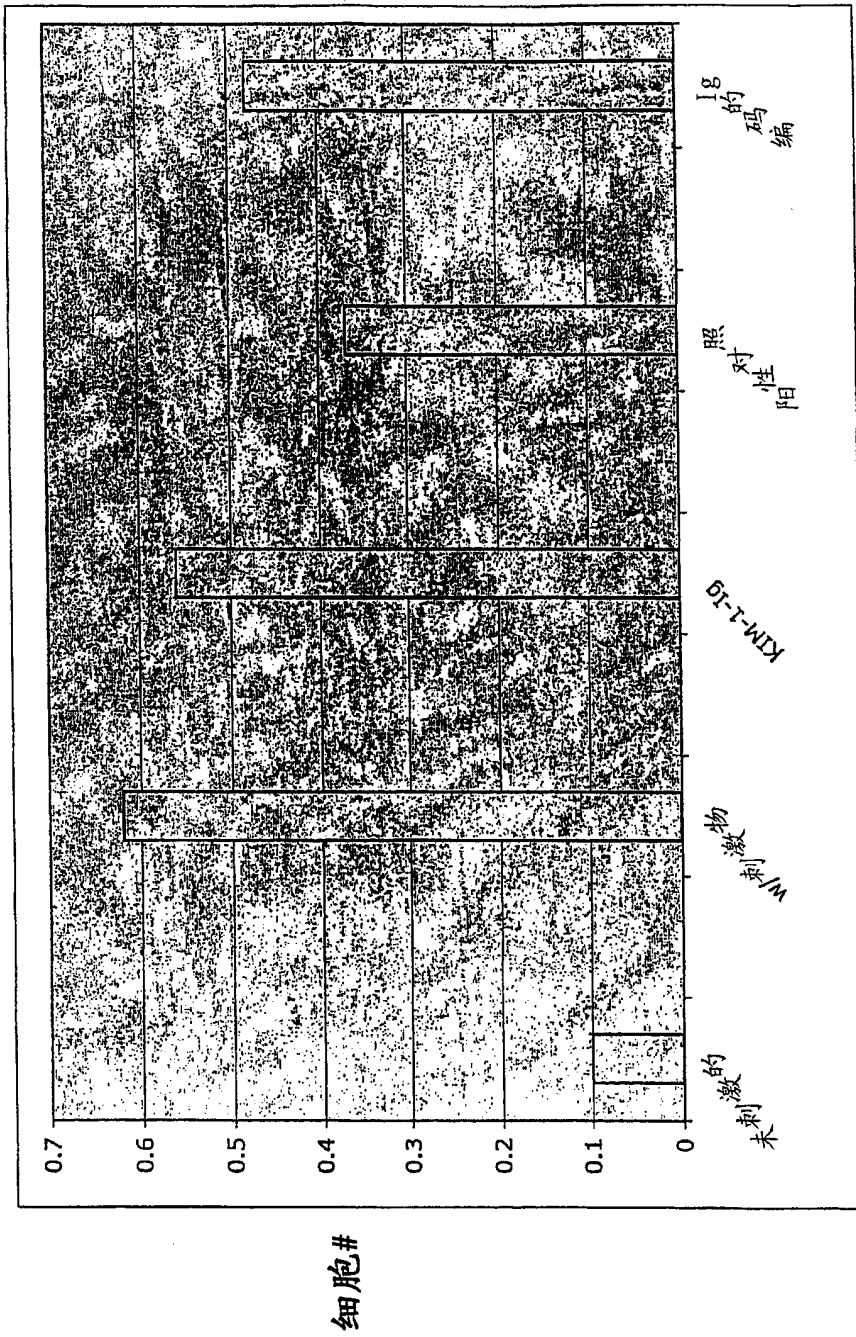
治疗组

图 9



KIM-1-Ig 和对照融合蛋白

图 10



治疗组

图 11

图 12A

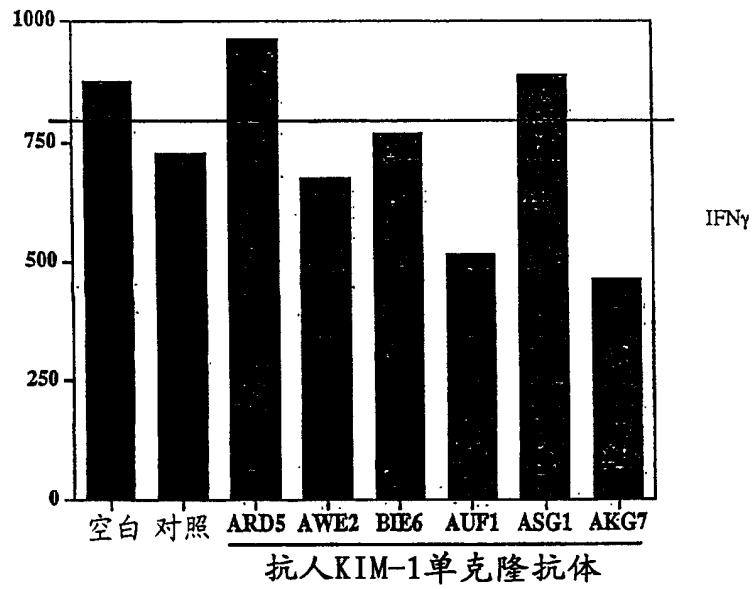
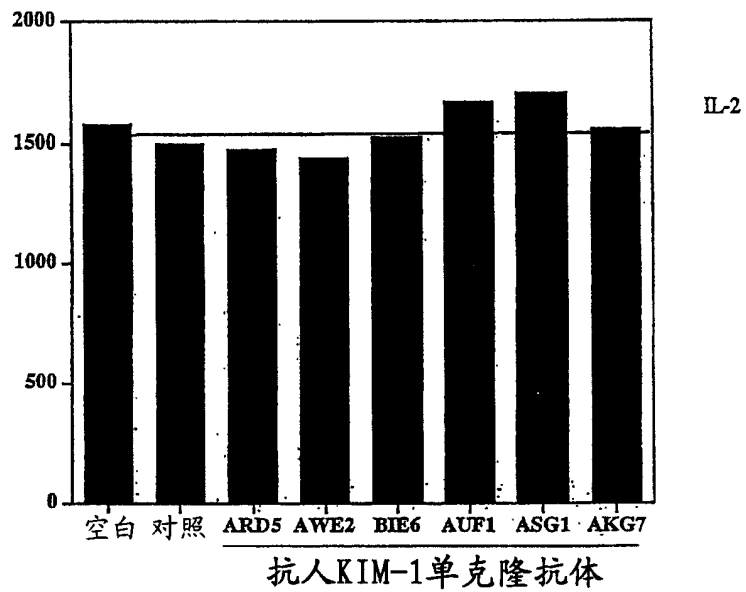


图 12B



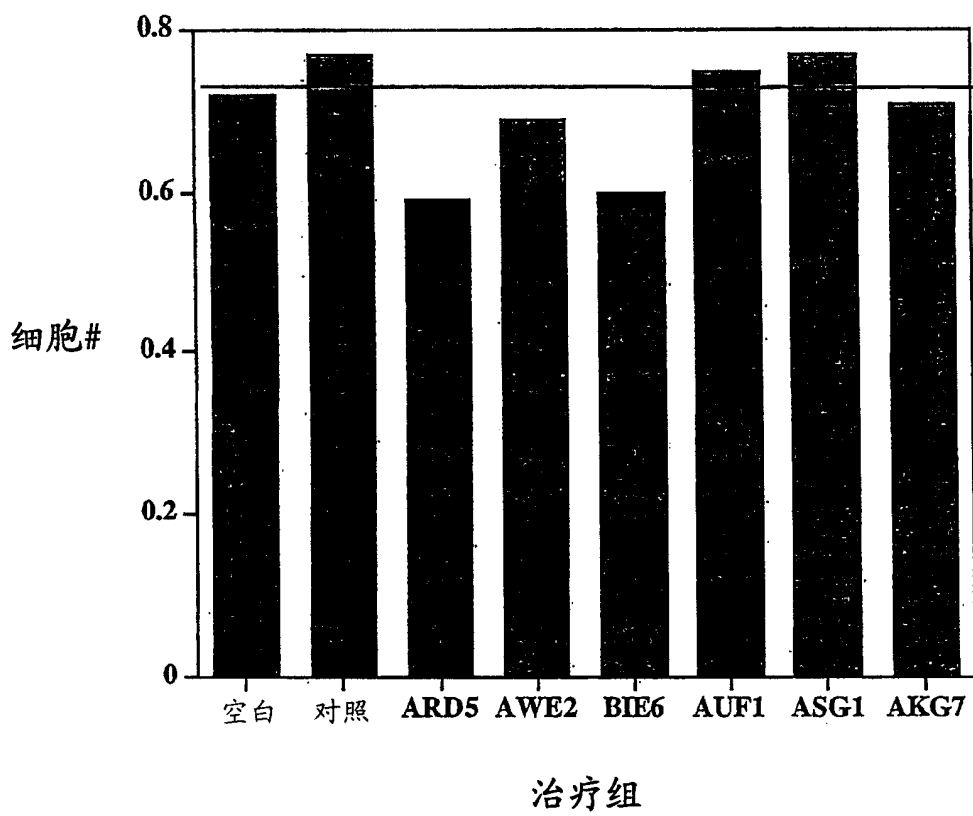


图 13

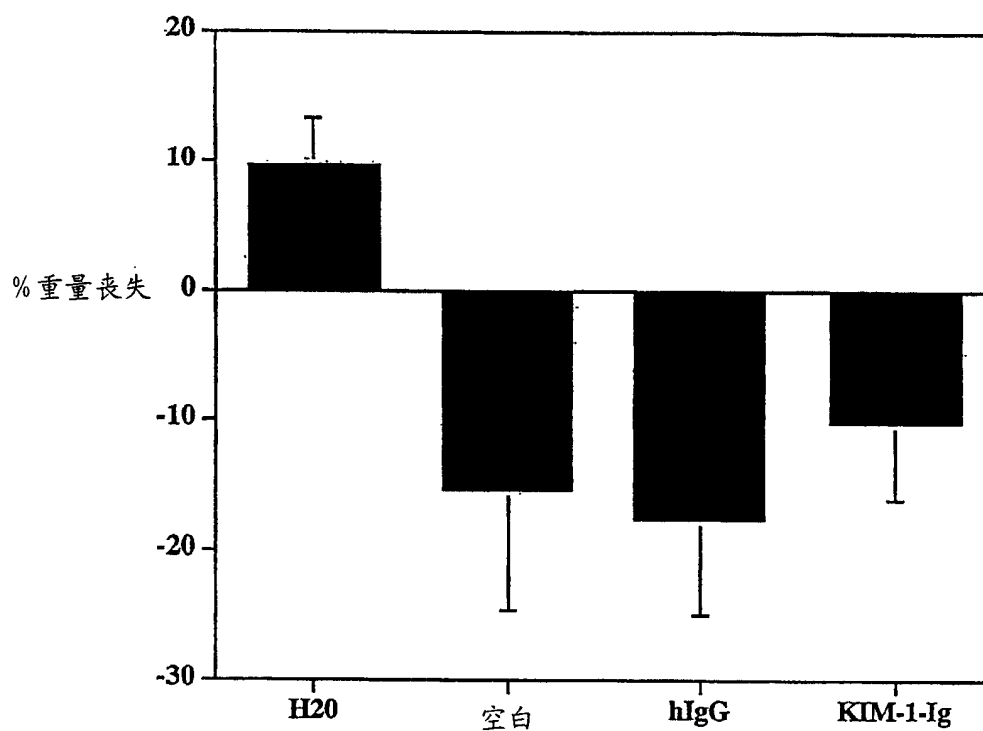


图 14

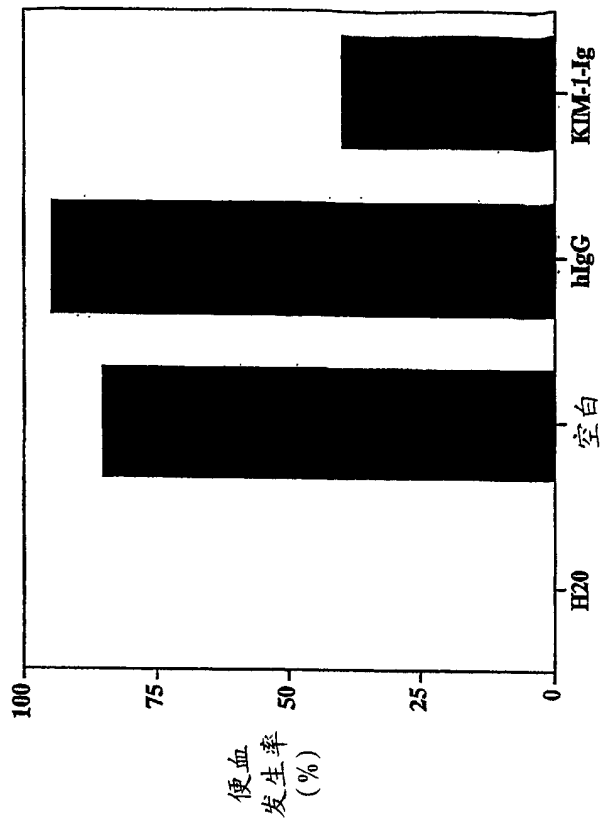


图 15B

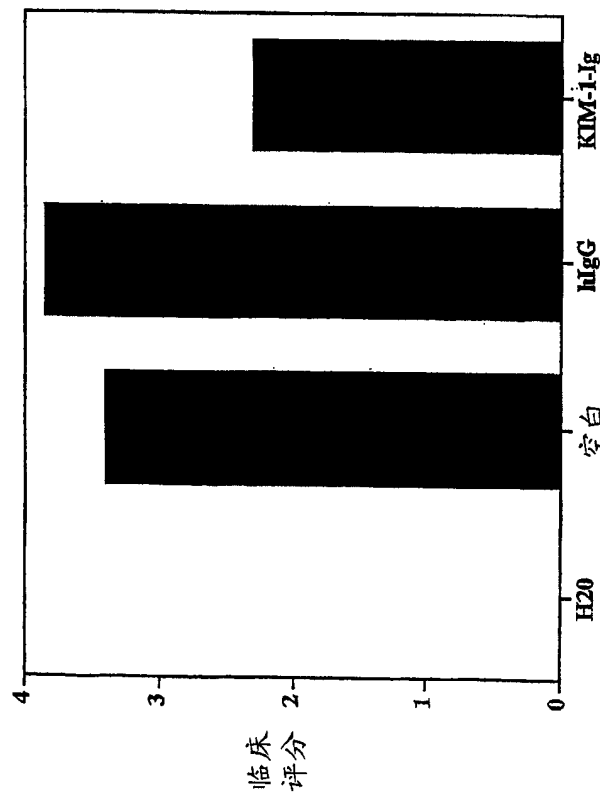


图 15A