

人源抗 TLR4 抗体 IgG 的制备及其中和特性分析

杨瑾¹,唐奇¹,熊四平¹,蔡炳刚²,朱旭辉³,王长军³,汪茂荣²,冯振卿^{1*},朱进^{3*}

(¹南京医科大学病理系,卫生部抗体技术重点实验室,江苏南京 210029;²中国人民解放军第八一医院全军肝病中心,江苏南京 210002;³南京军区军事医学研究所,江苏南京 210002)

[摘要] 目的:构建全人源抗人 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4)抗体轻、重链表达载体,在 293Free style 细胞中表达并纯化,分析该重组全分子抗体的生物学活性。方法:设计引物扩增全人源抗人 TLR4 抗体可变区编码序列,将其分别克隆到真核表达载体 pFUSE-CHIg-hG1 和 pFUSE-CLIg-hl 中,共转染至 293Free style 细胞,表达产物用 protein A 亲和层析柱纯化。应用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)、Western blot、免疫共沉淀、质谱分析及蛋白芯片检测抗体的免疫学特性,并检测该抗体对人单核细胞淋巴瘤 THP1 细胞肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)- α 表达的影响。结果:成功构建全人源抗人 TLR4 抗体真核表达载体,获得的全分子抗 TLR4 抗体保持了与抗原的结合活性,对 THP-1 细胞 TNF- α 表达的抑制率可达 85.7%。结论:重组全人源抗 TLR4 IgG 保持了与 TLR4 的结合特异性,并具有明显的中和作用,对炎症治疗具有潜在的应用价值。

[关键词] Toll 样受体 4;全人源抗体;中和抗体

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)06-777-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150604

Preparation and identification of characteristics of a full human anti-TLR4 IgG

Yang Jin¹,Tang Qi¹,Xiong Siping¹,Cai Binggang²,Zhu Xuhui³,Wang Changjun³,Wang Maorong²,Feng Zhenqing^{1*}, Zhu Jin^{3*}

(¹Department of Pathology,Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health,NJMU,Nanjing 210029;
²Liverish Center,81 Hospital of PLA,Nanjing 210002; ³Huadong Medical Institute of Biotechniques,Nanjing 210002,China)

[Abstract] **Objective:** To construct a full human anti-toll-like receptor 4(TLR4)IgG expression vector,and to express and purify it in 293 free style cells,as well as analyze the biological activity of anti-TLR4 antibody. **Methods:** We designed a primer for amplify mAb variable region. VH and VL gene were cloned into pFUSE-CHIg-hG1 and pFUSE-CLIg-hl expression vectors,respectively,and both transfected into 293 freestyle cells. The IgG was purified by protein A column and the immune specificity of the mAb was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),Western blotting assay,Co-IP,mass spectrometry (MS)and Biacore. Then, the interaction of this antibody with TNF-a expression in THP1 cell was detected. **Results:** The results demonstrated that the full human anti-TLR4 IgG was successfully produced. This mAb effectively recognized TLR4 protein and inhibited the expression of THF-a in THP1 cells with the inhibition rate of 85.7%. **Conclusion:** The reconstructive full human anti-TLR4 IgG could recognize TLR4 protein and has obvious neutralizing effect,and may be potentially utilized for inflammation therapy.

[Key words] TLR4;full human IgG;neutralize mAb

[Acta Univ Med Nanjing,2015,35(06):777-781,786]

Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4)是 Toll 样受体家族的成员之一,是脂多糖(lipopolysac-

charide,LPS)的模式识别受体^[1-2]。TLR4 广泛表达在免疫细胞表面,其中既包括非特异免疫细胞如巨噬细胞、中性粒细胞和肥大细胞,又包括介导特异免疫反应的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞^[3]。TLR4 在内毒素的信号转导通路中起着极其重要的作用,是内毒素发挥生物学效应的关键点和内毒素瀑布效应的

[基金项目] 国家新药创制项目资助(2013ZX09J13110-05B);全军医学科学技术研究计划(08G023)

*通信作者 (Corresponding author),E-mail:fengzhenqing@njmu.edu.cn;zhujin1968@njmu.edu.cn

限速步骤,是整个内毒素信号转导通路的枢纽^[4-5]。阻断TLR4对内毒素信号的转导,是控制内毒素生物学效应最为有效的手段^[6-7]。

在先期实验中,本课题组已从库容为 5.76×10^9 的全人源Fab抗体库中筛选出多株高结合活力抗TLR4 Fab,其中1株表现出较高的中和活性。本文通过基因工程和抗体工程技术,制备和表达具有中和活性的全分子人源抗TLR4 IgG,并对表达纯化获得的抗体进行功能鉴定,为进一步探讨其在炎症治疗中的作用奠定了研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

293Free style cell 购自美国 Invitrogen 公司,人单核细胞淋巴瘤 THP-1 细胞株由本实验室保存。

1.1.2 试剂和仪器

293F Expression 培养基、Opti-MEM 培养基、293 Fectin (Invitrogen 公司,美国),限制性内切酶 *Fsp* I (R0135)、*Bmt* I (R0658) (NEB 公司,美国),In-Fusion PCR Cloning Kit (639636, ClonTech 公司,日本),Hitrap Protein A 预装柱(17-0402-01)、抗体亲和力检测芯片 CM5(GE 公司,美国),抗体真核表达载体 pFUSE-CHIg-hG1、pFUSE-CLIg-hL (InvivoGen 公司,美国)。TLR4 重组蛋白为南京军区军事医学研究所赠送,TLR4Fab 为本实验室前期制备。佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate,PMA)、LPS (Sigma 公司,美国),肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)- α ELISA 检测试剂盒(杭州联科生物公司)。蛋白纯化系统(AKTA Purifier 100,GE 公司,美国)。截留分子量 30 000 的超滤离心管(UFC803008,Millipore 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

将抗TLR4 Fab 可变区序列与人类抗体基因组序列数据库(<http://www.imgt.org/>)进行比对,根据同源性,修复抗体核酸序列 FR1 起始处及 FR4 结尾处因抗体库筛选造成的基因突变。根据 Infusion PCR 原理设计抗TLR4抗体的重、轻链 PCR 扩增引物,此引物需要包括表达载体上 15 bp 的碱基以及插入目的片段的至少 15 bp 的碱基,插入目的片段处碱基按照普通引物设计的原则设计。重链 IF-PCR 扩增引物 F:5'-GGTGTCCACTCGCTACAGGTGCAGCTGGTG-3',R:5'-GCCCTTGGTGGATGCTGCA-GAGACAGTGAC-3';轻链 IF-PCR 扩增引物 F:5'-

ACAGACGCTCGCTGCTCCTATGAGCTGACT-3',R:5'-GCCCTTGGTGGATGCTGAGGAGACGGTGAC-3'。

1.2.2 抗TLR4L IgG 重组表达载体的构建及鉴定

分别使用限制性内切酶 *Fsp* I 和 *Bmt* I 酶切消化抗体真核表达载体 pFUSE-CHIg-hG1、pFUSE-CLIg-hL。两种质粒分别包含 IgG1 型人源重链和轻链(λ)恒定区基因序列。以 TLR4L Fab 为模板,使用设计合成的 IF 引物扩增抗体重链和轻链可变区序列,使用 In-Fusion PCR Cloning Kit 将抗体可变区基因 PCR 产物克隆到抗体真核表达质粒中。转化大肠杆菌 DH5 α 后,筛选阳性克隆,酶切鉴定,对鉴定正确的克隆送南京金斯瑞公司测序以确认序列连接正确。

1.2.3 抗TLR4L IgG 的表达和纯化

复苏及培养 293 Free style(293F)细胞,培养条件为:CO₂ 浓度为 8%,细胞摇床转速为 120 r/min,培养温度为 37℃。分别取 250 μ L pFUSE-CHIg-hG1-TLR4LH(200 μ g/mL)和 250 μ L pFUSE-CLIg-hL-TLR4LK(200 μ g/mL)至 2.5 mL Opti-MEM 培养基中;取 200 μ L 的 293 Fectin Transfection Reagent 于 2.8 mL 的 Opti-MEM 培养基中,静置 5 min。将两种混合液混合,轻轻摇晃至均匀,静置 20 min。将 293F 细胞(细胞活力>95%)离心后用 293F Expression Medium 重悬,吸取 9×10^7 个细胞于培养瓶中,用 293F Expression Medium 定容为 94 mL。20 min 后加入 6 mL 的 DNA-293Fectin 混合物。将细胞放在摇床培养箱中培养,120 h 后收集细胞培养上清。

将收集的细胞培养上清用 0.22 μ m 的滤膜过滤,使用蛋白纯化系统和 Hitrap Protein A 预装柱按标准操作步骤纯化。纯化后收集洗脱液,将蛋白放置截留分子量为 30 000 的超滤离心管中,3 000 r/min 水平离心 30 min,加入 PBS,重复 1 次后收集截留液。使用 0.22 μ m 滤膜过滤浓缩的蛋白,测定浓度后分装,于-70℃保存。

1.2.4 抗TLR4L IgG 特性分析

ELISA 检测:用 2 μ g/mL 的 TLR4 重组蛋白包被 96 孔板,ELISA 检测抗 TLR4L IgG 与重组蛋白结合的量效变化。

免疫共沉淀检测:将 10 μ L THP-1 细胞裂解蛋白与 5 μ g 抗 TLR4L 抗体混合,用 PBS 定容到 300 μ L,放置于 4℃环境共孵育;2 h 后加入 Protein A 免疫磁珠,继续孵育 1 h。离心 10 min 去除上清,用 PBST 漂洗 5 遍后,加入 50 μ L 柠檬酸洗脱液,离心并收集上清,加入 10 μ L Tris-base 中和上清液。采用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定抗 TLR4L IgG 的结合特异性。将

SDS-PAGE 胶中相应位置的蛋白胶切样,送质谱检测。

亲和力检测:使用醋酸钠缓冲液稀释抗 TLR4L 抗体样品至 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后,偶联到 CM5 芯片上。预设偶联水平 1 500 RU。用 pH7.4 的 Running buffer 稀释 mab 系列样品,稀释浓度至 0、5、10、20、40、80 nmol/L。设置进样时间为 180 s,解离时间 10 min,再生缓冲液用 50 mmol/L pH2.2 Gly-HCl。使用 BiacoreX100 检测抗体的亲和力。

1.2.5 抗 TLR4L IgG 对 THP-1 细胞 TNF- α 表达的影响

复苏及培养 THP-1 细胞,培养条件为:5% CO₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ FBS 浓度为 10%。收集 THP-1 细胞,1 000 r/min 离心 10 min,用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养液重悬,细胞计数,调整细胞数至 5×10^5 个/mL,加入 PMA(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每孔 200 μL 接种于 96 孔细胞培养板。24 h 后吸去细胞上清,更换成无血清 RPMI-1640 培养液,每孔 200 μL ,培养箱孵育过夜。吸去细胞培养上清,采用倍比稀释法稀释待测抗 TLR4L 抗体、同组非中和性抗 TLR4K IgG(课题组制备)及对照抗体(非 TLR4 抗原表位),起始浓度为 1 mg/mL,稀释范围为 1:1 至 1:128 倍,各浓度使用 3 个复孔检测。将待测抗体按照每孔 200 μL 加入 96 孔板中,培养箱孵育 2 h。将 LPS 稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,根据最终浓度 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 计算每孔应添加的量(6 μL),添加 LPS 后继续孵育 4 h。收集 96 孔板中的细胞上清,使用 TNF- α 检测试剂盒进行检测。

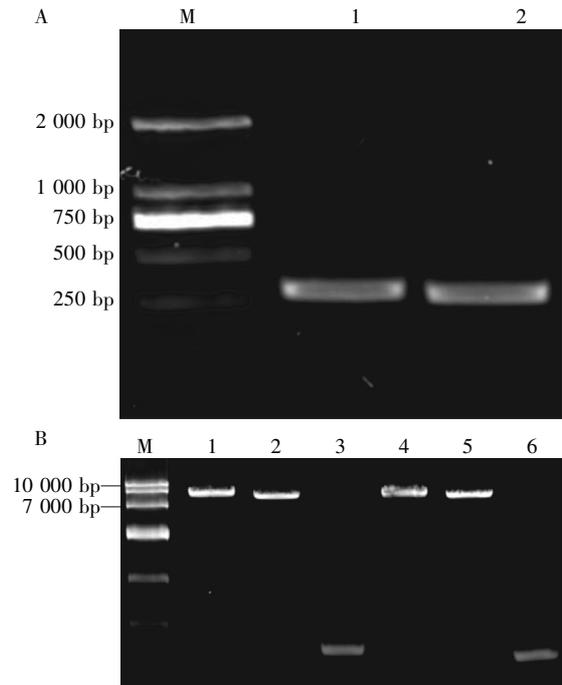
1.3 统计学方法

实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 Stata 8.0 软件对资料进行分析。实验组与对照抗体组及实验组与 TLR4K IgG 组之间抑制率的比较采用卡方检验,实验组各抗体浓度下 TNF- α 的吸光度值与对照组 TNF- α 吸光度值的比较采用 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组抗 TLR4L IgG 重链及轻链表达质粒的构建及鉴定

采用 PCR 分别扩增出长度 389 bp 的 VH 基因和 325 bp 的 VL 基因(图 1A),使用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,之后分别加入经限制性内切酶处理、线性化的 pFUSE-CHIg-hG1 和 pFUSE-CLIg-hL 质粒,使用 In-fusion PCR 试剂盒,完成质粒重组(图 1B)。重组后的质粒转入 DH5 α 后,挑选阳性克隆送公司测序,证实与设计序列完全相同。

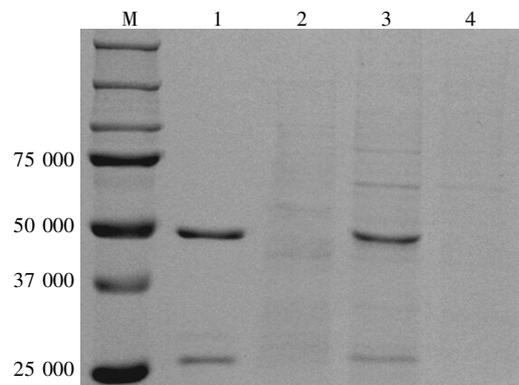


A: TLR4L Fab VH、VL 扩增产物。M: DL2000 Marker; 1: H 链; 2: L 链。B: TLR4L VH、VL 与线性化质粒通过 Infusion PCR 重组。M: DL10000 Marker; 1: pFUSE-CHIg-hG1 质粒 + TLR4L VH; 2: pFUSE-CHIg-hG1 质粒; 3: TLR4L VH; 4: pFUSE-CLIg-hL 质粒 + TLR4L VL; 5: pFUSE-CLIg-hL 质粒; 6: TLR4L VL。

图 1 重组抗 TLR4L IgG 重链及轻链表达质粒的构建及鉴定
Figure 1 Construction and identification of the recombinant expression plasmids with TLR4L VH/VL

2.2 抗 TLR4L IgG 的表达和纯化

使用 293Free style Expression System 真核表达抗 TLR4L IgG,于转染后 120 h 收集细胞培养上清,使用 AKTA 蛋白纯化系统和 Protein A 亲和层析柱纯化抗体(图 2)。纯化后的抗体采用超滤的方法进行缓冲液置换,并测定浓度。将抗体用 0.22 μm 滤膜过滤,定容至 2 mg/mL 后分装, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。



M: 蛋白 Marker; 1: 纯化后的抗体; 2: 流穿液; 3: 纯化前的细胞上清; 4: 未转染的 293F 细胞上清。

图 2 真核表达并纯化的抗 TLR4L 抗体的 SDS-PAGE 检测
Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified antibody

2.3 抗 TLR4L IgG 效价的检测

用 2 μg/mL 的 TLR4 重组蛋白包被 96 孔板,用间接 ELISA 法检测抗 TLR4L IgG 的效价。结果显示,抗 TLR4L IgG 与重组 TLR4 蛋白可特异性结合,具有较好的量效关系,在抗体浓度为 7.8 ng/μL 时,仍可较好地识别 TLR4 抗原表位(图 3)。

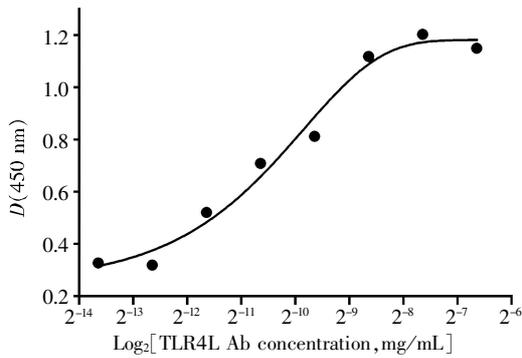
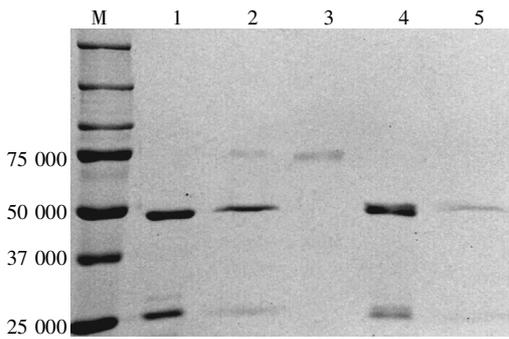


图 3 ELISA 检测全分子抗 TLR4 抗体与 TLR4 重组蛋白的结合活性

Figure 3 ELISA of anti-TLR4 antibody to rhTLR4

2.4 抗 TLR4L IgG 的免疫共沉淀和蛋白质谱分析

抗 TLR4L 抗体与激活态的 THP-1 细胞裂解蛋白免疫共沉淀后,将 SDS-PAGE 检测的 50 000 处的蛋白条带送质谱检测分析(图 4)。采用 SWISS-PROT 数据库和 MASCOT 查询软件分析,结果显示该抗体结合的蛋白为 TLR4(图 5)。



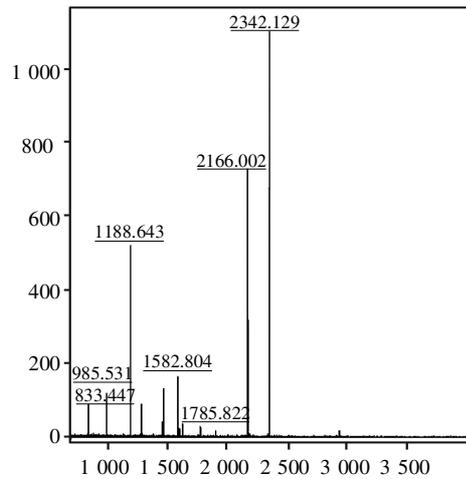
M: 蛋白 Marker; 1: 抗 TLR4L 抗体; 2: 抗 TLR4L 抗体+THP-1 细胞裂解蛋白; 3: 重组人 TLR4 抗原; 4: 对照抗体+THP-1 细胞裂解蛋白; 5: 对照抗体。

图 4 抗 TLR4L 抗体的免疫共沉淀检测

Figure 4 Immunoprecipitation analysis of anti-TLR4L antibody

2.5 抗 TLR4L IgG 的亲合力检测

根据抗 TLR4L IgG 的等电点以及 BiacoreX100 蛋白亲合力检测要求优化偶联条件,选择醋酸钠稀释抗 TLR4L IgG 样品,使用 CM5 芯片测试抗体。经检测抗 TLR4L IgG 的亲合力 KD 为 7.380×10^{-10} (图 6)。



Protein sequence coverage: 16%

Matched peptides shown in **bold red**.

```
1 EPCVEVVPNI TYQCMELNFY KIPDNLFFST KNLDLSFNPL RHLGSYSFFS
51 FPELQVLDLS RCEIQTIEDG AYQSLSHLST LILTGNPIQS LALGAFSGLS
101 SLQKLVAVET NLALENFPI GHLKTLKELN VAHNLIQSFK LPEYFSNLTN
151 LEHLDLSSNK IQSIYCTDLR VLHQMPLLNL SLDLSLNPMN FIQPGAFKEI
201 RLHKLTLRNN FDSLNVMTC IQGLAGLEVH RLVLGEPRNE GNLEKFDKSA
251 LEGLCNLTIE EFRLAYLDY LDDIIDLFNC LTNVSSFSLV SVTIERVKDF
301 SYNFGWQHLE LVNCKFGQFP TLKLSLKRRL TFIENKGGNA FSEVDLPSLE
351 FIDLRSRNGLS FRGCCSQSDF GTISLKYLDL SFNGVITMSS NFLGLEQLEH
401 LDFQHSNLKQ MSEFSVFLSL RNLIYLDISH THTRVAFNGI ENGLSSLEVL
451 KMAGNSFQEN FLPDIFTELRL NLTFLDLSQC QLEQLSPATF NSLSSLQVLN
501 MSHNNFSLD TFPYKCLNSL QVLDYSLNHI MTSKKQELQH FPSSLAFLNL
551 TQNDFACTCE HQSFLQWIKD QRQLLVEVER MECATPSDKQ GMPVLSLNIT
601 CQMNK
```

图 5 抗 TLR4L 抗体的质谱鉴定

Figure 5 Mass spectrum of anti-TLR4L antibody

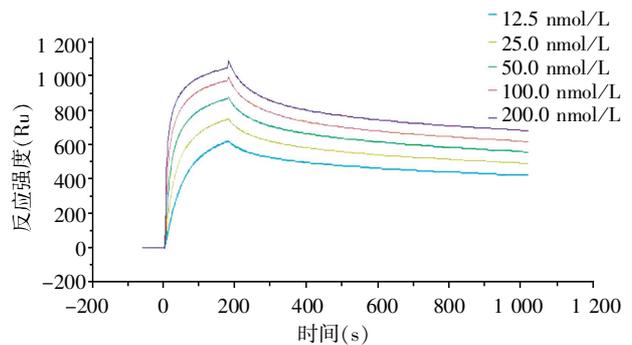
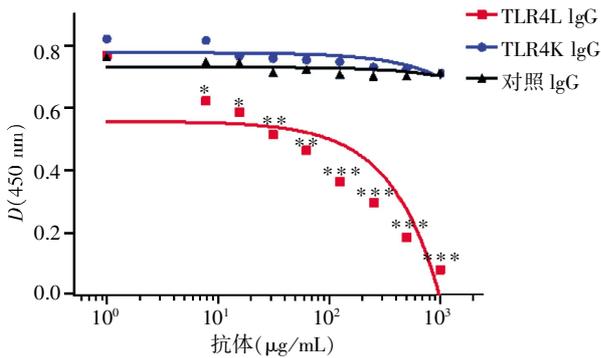


图 6 Biacore T100 检测抗 TLR4L 抗体亲和力结果

Figure 6 Affinity of anti-TLR4L antibody tested by Biacore T100

2.6 抗 TLR4L IgG 对 THP-1 细胞 TNF-α 表达的影响

ELISA 检测结果显示,用抗 TLR4L IgG 与 PMA 刺激之后的 THP-1 细胞共培养,再加入 LPS 后,细胞表达 TNF-α 受到明显抑制,当抗体浓度为 1 mg/mL 时,对 THP-1 细胞 TNF-α 表达的抑制率可达 85.7%,与同组非中和性抗 TLR4K IgG 及对照抗体比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且随着抗体浓度的增加,抗 TLR4L 抗体对 THP-1 细胞 TNF-α 蛋白表达的抑制作用增强(图 7)。



红色曲线: 抗 TLR4L 抗体对 TNF- α 分泌的影响; 蓝色曲线: 抗 TLR4K 抗体对 TNF- α 分泌的影响; 黑色曲线: 对照 IgG 抗体对 TNF- α 分泌的影响。与对照 IgG 抗体组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 7 THP-1 细胞上清中 TNF- α 检测结果

Figure 7 ELISA of TNF- α in supernatant of THP-1 cells

3 讨论

目前对内毒素血症的治疗尚缺乏特效药物,临床上多采用综合处理措施如使用抗生素,清洁肠道,改善肠道内环境以减少内毒素的产生与吸收^[9-10];通过血浆净化技术清除血液中的内毒素,但效果不理想^[11]。近年来有研究提出通过阻断内毒素的信号转导通路以减轻其产生的炎症效应,如研制 LPS 拮抗剂以及促炎症细胞因子的拮抗剂(IL-1Ra、可溶性 TNF 受体)等,有望对内毒素血症的治疗有所帮助。有研究报道预先应用 IC14,一种抗 CD14 抗体能明显降低 LPS 引起的发热、临床症状和白细胞升高,抑制 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的产生^[12-13]。

TLR4 属于 I 型跨膜受体蛋白,TLR4 对配体的识别需要其他蛋白的协同作用。LPS 在体内与细胞膜上的 CD14 受体结合,形成 LPS-LBP-CD14 复合物,与 TLR4 结合并在 MD-2 的辅助下激发细胞应答^[6]。由细菌释放入血的 LPS 或 LPS-LBP-CD14 复合物的形式活化 TLR4 的信号转导,或直接与 TLR4 的附属蛋白 MD2 结合,在这些分子的辅助下激活 TLR4^[7]。TLR4 的 TIR 区招募胞浆内的接头蛋白 MyD88,与 IL-1 受体相关激酶的死亡结构域相互作用,导致 IRAK 的自主磷酸化。然后通过一系列酶生化反应激活 NF- κ B 和 AP-1,导致炎症因子和黏附分子等的大量表达,形成一系列炎症反应^[8]。

TLR4 在内毒素的信号转导通路中具有极其重要的作用。阻断 TLR4 对内毒素信号的转导,是控制内毒素生物学效应最为有效的手段。本研究先期实验从构建的大容量、全人源噬菌体抗体库中筛选出针对 TLR4 的抗体片段 Fab,并对其功能进行了初

步鉴定。实验结果显示,抗体片段 Fab 能够特异性结合 TLR4 蛋白分子,抑制炎症细胞的增殖。小分子抗体片段 Fab 的优点是分子量小,穿透力较强,易于穿过血脑屏障,进入组织细胞。但由于 Fab 缺乏 Fc 段,其亲和活性明显降低。以 Fab 为基础构建全分子 IgG,除能够特异性识别相应的抗原表位外,还具有一系列重要的生物学效应功能,如中和作用、调理作用、补体依赖的细胞毒作用、抗体依赖的细胞毒作用等^[14]。IgG Fc 段还可以与新生 Fc 受体相互结合,增加稳定性,进一步延长其半衰期^[15]。因此,以小分子抗体片段 Fab 为模版构建全分子抗体 IgG,可克服 Fab 片段的多种缺点及不足,充分发挥单抗药物的优点。此类抗体药物的研发已成为今后肿瘤靶向治疗及单抗药物研发的趋势^[16]。

本研究制备的全人源抗 TLR4L IgG,其检测结果表明有较好的特异性、敏感性以及亲和力,并且在细胞水平证实其可影响 THP-1 炎症细胞中 TNF- α 的表达,为进一步将治疗性抗 TLR4 基因工程抗体应用于感染和感染性休克的治疗提供了研究基础。

[参考文献]

- [1] Peri F, Piazza M, Calabrese V, et al. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules [J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(5): 1390-1395
- [2] Ohto U, Fukase K, Miyake K, et al. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(19): 7421-7426
- [3] Kutikhin AG. Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer [J]. *Hum Immunol*, 2011, 72(2): 193-206
- [4] Fang H, Liu A, Sun J, et al. Granulocyte colony stimulating factor induces lipopolysaccharide (LPS) sensitization via upregulation of LPS binding protein in rat [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56654
- [5] Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 387
- [6] Tsukamoto H, Ihara H, Ito R, et al. MD-2-dependent human Toll-like receptor 4 monoclonal antibodies detect extracellular association of Toll-like receptor 4 with extrinsic soluble MD-2 on the cell surface [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(1): 31-36
- [7] Roger T, Froidevaux C, Le RD, et al. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like re-