(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1891714 B
(45)授权公告日 2011.06.22

(21)申请号 200610073704.7
(22)申请日 1998.07.07
(30)优先权数据
60/051964 1997.07.07 US
08/898234 1997.07.30 US
(62)分案原申请数据
98808663.8 1998.07.07
(73)专利权人 拉霍拉敏感及免疫学研究所
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 C·F·瓦雷
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 刘玥
(51)Int.Cl.
C07K 14/52(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
G01N 33/567(2006.01)
(56)对比文件
WO 9704658 ,1997.02.13,
审查员 唐慧

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 6 页

(54)发明名称

单纯疱疹病毒进入介体的配体和使用方法

(57)摘要

提供一种疱疹病毒进入介体 HVEM 的新配体(p30)。p30 可用于调节免疫应答并可用于抑制疱疹病毒感染。也提供应用本发明 p30 治疗淋巴细胞疾病患者或患有或怀疑患有疱疹病毒感染的患者的方法。

CN 1891714 B

1. 用于调节 HVEM 介导的细胞反应的体外方法，该方法包括将表达 HVEM 的细胞与 HVEM 调节有效量的 p30 结合剂接触；其中 p30 结合剂是可溶性 HVEM、可溶性 LTβR 或特异性结合 p30 的抗体。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述 p30 结合剂抑制 HVEM 介导的细胞反应。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述 p30 结合剂刺激 HVEM 介导的细胞反应。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述 p30 结合剂是 LTβR。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述 p30 结合剂是结合 p30 的抗体。

6. 用于调节 LTβR 介导的细胞反应的体外方法，该方法包括使表达 LTβR 的细胞与 LTβR 调节有效量的 p30 结合剂接触；其中 p30 结合剂是可溶性 HVEM、可溶性 LTβR 或特异性结合 p30 的抗体。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述 p30 结合剂抑制 LTβR 介导的细胞反应。

8. 权利要求 6 的方法，其中所述 p30 结合剂刺激 LTβR 介导的细胞反应。

9. 权利要求 6 的方法，其中所述 p30 结合剂是 LTβR。

10. 权利要求 6 的方法，其中所述 p30 结合剂是结合 p30 的抗体。

单纯疱疹病毒进入介体的配体和使用方法

[0001] 本申请是申请日为 1998 年 7 月 7 日，申请号为 98808663.8，发明名称为“单纯疱疹病毒进入介体的配体和使用方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明领域

[0003] 本发明一般涉及用于调节免疫应答和病毒感染的化合物和方法，更准确地说本发明涉及一种可用于抑制单纯疱疹病毒感染的多肽。

[0004] 发明背景

[0005] 1 型和 2 型单纯疱疹病毒 (HSV) 引起反复发生从良性到严重的各种程度的感染。在存在有活性的细胞免疫系统的情况下，HSV 表现为从潜伏于神经元到感染皮肤和其它组织。HSV 的 D 糖蛋白 (gD) 是一种位于病毒体包膜中的跨膜蛋白，它通过结合于细胞受体启动感染 [Spear 等 (1993) 载于 :Viral Fusion Mechanisms。Bentz 编辑，CRCpress，Boca Raton]。最近，鉴定了一种 HSV 用于感染的细胞蛋白并命名为 HSV 进入介体 (HVEM) [Montgomery 等 (1996)Cell 87 :427]。HVEM 是具有富含半胱氨酸细胞外域的 1 型跨膜蛋白，它显示与肿瘤坏死因子 (TNF) 相关细胞因子受体具有显著同源性 [Smith 等 (1994)Cell 76 :959 ;Ware 等 (1995) 载于 :Pathways of Cytolysis. Griffiths 和 Tschopp 编辑，Springer-Verlag，Basel]。多数 TNF 超家族成员启动各种细胞反应，所述细胞反应是发动有效炎症和免疫应答所必需的。

[0006] TNF 是 2 型跨膜蛋白 [Pennica 等 (1984)Nature 312 :724]，它被蛋白酶解形成分泌型蛋白 [Black 等 (1997)Nature 385 :729]，而 LTα 缺乏跨膜域 [Gray 等 (1984)Nature 312 :721] 并只限以同三聚体 (该形式 LTα 也称为 TNFβ) 分泌。当以表面蛋白表达时，LTα 与称为 LTβ [Browning 等 (1993)Cell 72 :847] 的 33kDa 蛋白结合 [Androlewicz 等 (1992)J. Biol. Chem. 267 :2542]，LTβ 也是 α1β2 和 α2β1 按一定亚基比例组成的异三聚体形式的 2 型跨膜糖蛋白 [Androlewicz 等，已经引用的上述相同文献 ;Browning 等 (1996)J. Biol. Chem. 271 :8618]。LTα 和 TNF 均与两个受体结合并通过这两个受体发送信号，所述受体是 55-60kDa TNF 受体 (TNFR60 ;CD120a 或 1 型) [Schall 等 (1990)Cell 61 :361 ;Loetscher 等 (1990)Cell 61 :351] 和 75-80kDa TNFR(TNFR80 ;2 型或 CD120b) [Smith 等 (1990)Science 248 :1019]。相反，表面 LTα1β2 复合物特异性地被 LTβ 受体 (LTβR) 识别 [Crowe 等 (1994)Science 264 :707]，所述受体既不结合 LTα 也不结合 TNF[Crowe 等 (1994)Science 264 :707]，而两种 TNFR 均结合 LTα2β1 异三聚体 [Crowe 等 (1994) Science 264 :707 ;Browning 等 (1995)J. Immunol. 154 :33]。

[0007] 小鼠 LTα 和 LTβ 基因遗传缺失已经显示，这两种基因在淋巴结和淋巴集结发育中有作用 [De Togni 等 (1994)Science 264 :703 ;Banks 等 (1995)J. Immunol. 155 :1685]，并且与 TNF 和 TNFR60 一起，也是控制生发中心形成和在成年小鼠免疫应答期间控制免疫球蛋白同种型转换 (例如 IgA 产生) 的重要细胞因子 [Matsumoto 等 (1996)Science271 :1289 ;Mariathasan 等 (1995)J. Inflammation 45 :72]。大多数研究已经指出，LTα1β2/LTβR 是控制这些功能的重要细胞因子 - 受体系统 [Crowe 等 (1994)Science 264 :707 ;Koni 等 (1997)Immunity 5 :491 ;Ettinger 等 (1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :13102 ;

Rennert 等 (1996) J. Exp. Med. 184 :1999]。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明基于一种作为 HVEM 配体起作用的内源多肽的鉴定，先前已知所述内源性多肽只结合 HSV gD。提供称为 p30 的所述配体以及编码 p30 的核酸序列和结合 p30 的抗体。本发明也包括用于鉴定调节 HSV 感染的化合物的方法，以及用于调节淋巴细胞反应的方法。本发明方法可用于治疗例如患有自身免疫性疾病、淋巴系统恶性肿瘤和 HSV 感染的患者。在一个实施方案中，本发明特征性描述了鉴定影响 HVEM 结合剂介导的细胞反应的化合物的方法。本发明还包括鉴定影响 LTbR-p30 介导的细胞反应的化合物的方法。

[0010] 除非另有规定，否则本文所用的所有技术和科学术语与本发明所属领域技术人员普遍理解的含义相同。尽管与本文所述方法类似或相同的方法和材料可用于实施或测试本发明，但是仍然描述合适的方法和材料如下。本文所述所有出版物、专利申请、专利以及其它文献均通过引用结合到本文中。在存在矛盾的情况下，本申请包括定义在内，将予以限定。另外，本文所述材料、方法和实施例仅仅是说明性的而不是限定性的。

[0011] 从以下详细说明、附图以及权利要求书可以显而易见地看到本发明其它特征和优点，例如治疗各种人类疾病。

附图说明

[0012] 图 1A 是一对流式细胞仪频率曲线图，图示 HVEM:Fc 融合蛋白结合到用 PMA（上部曲线）或 PMA 和离子霉素（下部曲线）活化后的 II-23.D7 细胞。

[0013] 图 1B 是一对流式细胞仪频率曲线图，图示 HVEM:Fc 融合蛋白结合到正常人 CD4+（上部曲线）T 细胞和 CD8+（下部曲线）T 细胞。

[0014] 图 1C 是一个线性图，图示 HVEM:Fc 融合蛋白与活化 II-23.D7 细胞的饱和结合。

[0015] 图 2A 是一对图。上图是一个流式仪细胞频率曲线图，图示 LTβR:Fc 融合蛋白竞争 HVEM:Fc 融合蛋白与活化 II-23.D7 细胞的结合。下图是一个线性图，图示 HVEM:Fc 融合蛋白的结合被 LTβR:Fc 融合蛋白剂量依赖性抑制。

[0016] 图 2B 是一对图。上图是一个流式细胞仪频率曲线图，图示 LTα 同三聚体竞争 HVEM:Fc 融合蛋白的结合。下图是一个线性图，图示 HVEM:Fc 融合蛋白的结合被 LTα 同三聚体剂量依赖性抑制。

[0017] 图 3 是一对图。上图是一个流式细胞仪频率曲线图，图示天然存在的 LTα 的 Tyr108Phe 变异体不能竞争 HVEM:Fc 与 II-23.D7 细胞的结合，而下图是图示 LTα 和 LTα (Tyr108Phe) 竞争性结合分析的线性图。

[0018] 图 4A 是一个放射自显影图，得自沉淀物的双向等电聚焦 /SDS-PAGE 凝胶，所述沉淀物通过用 mLTβR:Fc 融合蛋白处理活化 II-23.D7 细胞提取物而获得。

[0019] 图 4B 是从一种沉淀物的双向等电聚焦 /SDS-PAGE 凝胶获得的放射自显影图，所述沉淀物通过用 TNFR60:Fc 融合蛋白处理活化 II-23.D7 细胞提取物而获得。

[0020] 图 4C 是从一种沉淀物的双向等电聚焦 /SDS-PAGE 凝胶获得的放射自显影图，所述沉淀物通过用 HVEM:Fc 融合蛋白处理活化 II-23.D7 细胞提取物而获得。

[0021] 图 5 是一对图。上图是一个流式细胞仪频率曲线，图示 HVEM:Fc 融合蛋白的结合被 HSV gD-1 糖蛋白竞争。下图是一个线性图，图示 HVEM:Fc 融合蛋白的结合被 HSV gD-1

糖蛋白剂量依赖性抑制。

[0022] 图 6 是一对线性图，图示抗 -HVEM 抗体刺激新鲜分离的外周血 T 细胞（上部线性图）和记忆 T 细胞（下部线性图）的剂量依赖性增殖。

[0023] 图 7 是一对图。上图是一个流式细胞仪频率曲线图，图示 HVEM 在 RAJI 类淋巴母细胞上的表达。下图是一个线性图，图示 RAJI 细胞在应答抗 -HVEM 抗体中的剂量依赖性增殖。

[0024] 详细说明

[0025] 涉及抑制含有 TNF 受体 (TNFR) 相关多肽 HVEM 的细胞外域的融合蛋白结合的实验表明，恶性和正常人 T- 细胞均表达 HVEM 的细胞表面配体。竞争性抑制实验表明，所述 HVEM 配体与 LTα β 异三聚体以及 LTα 具有相同的特征，但是它也具有区别于 LTα1β2 和 TNF 的特征。因此，LTα2β1 可能是一种被 HVEM 识别的推定表面配体，需要说明的是 LTα2β1 上的 HVEM 结合位点与 TNFR60 不同。另一方面，HVEM 可能识别一种新的配体。应用生化方法辨别这些可能性。

[0026] 免疫沉淀和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 研究证实，在 T 细胞表面存在 HVEM 的一种新的 30kDa 多肽配体 (p30)，所述多肽配体在抗原性上与 LTβ 和 LTα 均不同。亲和层析纯化和双向电泳表明，p30 物理性质也不同于 LTα 和 LTβ，其分子量为 30kDa 而 pI 约 7-8.5（图 4C）。此外，这些研究表明 p30 也被 LTβR 识别而不被 TNFR 识别。

[0027] 结合抑制实验证实，可溶性 gD-1（得自 HSV-1 的 gD）和 gD-1 突变体 gD-1（Δ290-299t）结合到 HVEM，但是不能结合到 LTβR 或 TNFR60。该结果提示，即使 HVEM 与为 TNFR60 和 LTβR 所识别的配体结合，但 gD-1 已经协同进化为特异性结合 HVEM。此外，所述发现表明，gD-1 是所述淋巴毒素的一种膜锚着病毒因子，并可以在进入或由感染细胞释放 HSV 时调节 HVEM 发送信号的活性。

[0028] 体外细胞培养研究表明，抗 -HVEM 抗体增强处女型 T 细胞和记忆 T 细胞的增殖。类似的实验表明，通过 HVEM 发送信号为 B 细胞提供活化刺激，而没有通过 TNFR 的均衡负向刺激的正向刺激可能是所述 p30 HVEM 配体的独特性质。这些结果表明，所述 HVEM 配体的生理功能可能不同于 TNF 和 LTα1β2。一种 HVEM 的新的 30kDa 配体的鉴定增加了该配体可能引起先前归因于 LTα 或 LTβ 的生理反应的可能性。本文提出的发现加深了对 LT/TNR 细胞因子系统和疱疹病毒的了解，提示了疾病过程中控制这些细胞因子的新手段。

[0029] 综合来看，这些结果表明，含有 HVEM 或 LTβR 的 Fc 融合蛋白将调节 LTα 和 30kDa HVEM 配体 p30 的作用。同样，融合蛋白 HVEM 可以用来鉴定所述受体配体复合物的特异性抑制剂，例如单克隆抗体或肽类或小有机化合物。p30 或 LTα 与 HVEM 相互作用、的或 p30 与 LTβR 相互作用的抑制剂可以用来调节疾病，所述疾病发生非需要的淋巴细胞增殖，包括 T 和 B 淋巴瘤或白血病，或者可以用来调节自身免疫性疾病，例如类风湿性关节炎、胰岛素依赖型糖尿病、多发性硬化、系统性红斑狼疮或重症肌无力。

[0030] 同样，疱疹病毒 gD-1 可以用来抑制 LTα、p30 和 HVEM 以效应分子发送信号参与的免疫反应。LTα 或可溶型的 30kDa HVEM 配体（通过缺失其预期的胞质域和跨膜域而产生的）可以通过阻断疱疹病毒进入细胞靶的能力而以疱疹病毒感染和复发的抑制剂发挥作用。

[0031] 与 TNFR 类一样，HVEM 具有双配体特异性，可结合到 LTα 和截然不同的 30kDa 膜

结合配体 p30。所述 LTα Tyr108Phe 突变与其对 TNFR60 和 TNFR80 作用一样破坏了 HVEM 的结合。TNFR60 不能阻断 HVEM 结合到表面 30kDa 型，表明表面 LTα2β1 不是 HVEM 配体。

[0032] 此外，所述 p30 与 LTα 不同，因为其抗原性明显不同并是细胞结合型的，不像 LTα 只是分泌型。因此，预测所述 HVEM 结合蛋白 (p30) 含有形成跨膜域的一段疏水残基序列，其排列为类似其它 TNF 相关蛋白的 II 型跨膜构型。这并不排除 p30 也可能以其它方式修饰（例如脂质修饰）以允许结合于细胞表面的可能性。此外，该蛋白应该与 LTα 和 LTβ 以及相关细胞因子享有界定该超家族的同源序列区，并含有约 150-160 个残基的 C- 末端细胞外域。

[0033] 本发明人的发现也表明，HVEM 是 LTα 的特异性受体，是一种使其与所述 TNF 结合受体 TNFR60 和 TNFR80 明显区别的特性。该特性容许 HVEM 融合蛋白或类似蛋白特异性拮抗 LTα，而不抑制 TNF 或 LTα1β2 功能。

[0034] 本发明提供大致纯的 p30 多肽。该 p30 多肽的特征为：按还原 SDS-PAGE 测定的预期分子量为 30kDa，而 pI 范围约 7-8.5（图 4C）。p30 以 10 个以下、优选 8 个以下、更优选 6 个以下（例如 3 个、4 个或 5 个）同分异构型存在。所述多肽是细胞结合型即非分泌型，并以其细胞表面型结合 HVEM 和 LTβR。

[0035] 本文使用的术语“大致纯”是指大致不含其它蛋白、脂质、糖类或与其天然结合的其它物质的 p30 多肽。本领域技术人员可以采用蛋白质纯化标准技术纯化 p30。[Protein Purification，Principles andPractice，第二版 (1987)Scopes，Springer Verlag，N.Y.]。所述大致纯多肽将在还原 SDS-PAGE 凝胶上产生一条约 30kDa 的单一主带。

[0036] 本发明包括功能多肽 p30 及其功能片段。本文使用的术语“功能多肽”是指一种具有生物功能或活性的多肽，所述生物功能或活性通过限定的功能检测鉴定并与细胞的特定生物学、形态学或表型改变有关。所述 p30 多肽的“功能片段”包括 p30 片段，只要保留 p30 活性（例如通过结合到 HVEM 或 LTβR 或抑制 HSV 结合到 HVEM 而调节细胞反应）即可。本发明包括具有 p30 生物活性的较小的肽类。本领域技术人员可以用标准方法测定 p30 的功能活性，所述方法例如病毒空斑数降低测定法或包括细胞因子产生测定法的细胞活化测定法。

[0037] 所述 p30 一级氨基酸序列的微小修饰可能导致产生的蛋白与本文所述天然 p30 相比具有大致相同的活性。这类修饰可以是如定点诱变的人为有意的改变或者可以是自发的。由于这些修饰产生的所有这类多肽只要仍然保留 p30 的生物活性，则均包括在本发明中，所述生物活性例如通过结合至 HVEM 和 LTβR 或抑制 HSV 结合到 HVEM 调节细胞反应。此外，缺失一个或一个以上氨基酸也可能导致所产生分子结构的修饰而不明显改变其活性。这可以使得研制具有较广用途的较小活性分子。例如，可以去除 p30 活性不需要的氨基或羧基末端的氨基酸。

[0038] 本发明的 p30 多肽也包括所述多肽序列的保守变异。本文使用的术语“保守变异”指的是一个氨基酸残基被另一个生物特性相似的残基取代。保守变异的实例包括一个疏水性残基（例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸）取代另一个疏水残基，或一个极性残基取代另一个极性残基，例如精氨酸取代赖氨酸、谷氨酸取代天冬氨酸或谷氨酰胺取代天冬酰胺等等。术语“保守变异”也包括用取代氨基酸替代未取代的原氨基酸，只要针对所述取代多肽产生的抗体也与所述未取代多肽发生免疫应答。

[0039] 本发明也提供分离的编码本发明 p30 多肽的核酸序列。本文使用的术语“分离的”包括大致不含其它核酸、蛋白、脂质、糖类或与其天然结合的其它物质的多核苷酸。本发明的多核苷酸序列包括编码 p30 的 DNA、cDNA 和 RNA 序列。当然，编码 p30 全部或部分的所有多核苷酸也包括于本发明中，只要它们编码的多肽具有 p30 活性。这类多核苷酸包天然、合成和有目的人工操作的多核苷酸。例如，由于替代的 RNA 剪接类型或使用可选择的 RNA 转录启动子可以引起部分所述 mRNA 序列的改变。作为另一个实例，对 p30 多核苷酸可以进行定点诱变。p30 多核苷酸序列也包括反义序列。本发明多核苷酸包括遗传密码简并序列。有 20 种天然氨基酸，其中大多数由一个以上密码子确定。因此，所有简并核苷酸序列均包含于本发明中，只要该核苷酸序列编码的 p30 多肽的氨基酸序列功能未变化。另外，本发明也包括其编码的多肽具有 p30 生物活性和具有至少一个可与 p30 多肽发生免疫应答的抗体表位的多核酸序列苷酸。

[0040] 本发明的 p30 核酸包括 (a) 编码天然 p30 的序列和 (b) 在高严格条件下杂交到所述序列的互补物的任何核苷酸序列，例如在 0.5MNaHPO$_4$、7％十二烷基硫酸钠 (SDS)、1Mm EDTA 中于 65℃杂交到滤膜结合的 DNA 并在 0.1X SSC/0.1％ SDS 中于 68℃进行洗涤 [AusubelF.M. 等编辑，(1989)Current Protocols in Molecular Biology，第 I 卷，Green Publishing Associates，Inc. 和 John Wiley&sons，Inc，NewYork]，并且该核苷酸序列编码功能相同的基因产物。本发明也包括序列 (a) 和 (b) 的简并变异体。

[0041] 本发明也包括与前一段中的核苷酸序列 (a) 和 (b) 杂交并因此是所述核苷酸序列 (a) 和 (b) 互补物的核酸分子，优选 DNA 分子。这类杂交条件可以是高严格性的，如上所述，或严格性稍低，例如中度严格条件，诸如在 0.2X SSC/0.1％ SDS 中于 42℃洗涤 [Ausubel 等，已经引用的上述相同文献]。在所述核酸分子是脱氧寡核苷酸 (“oligos”) 的情况下，高严格条件可以是指例如在 6X SSC/0.05％焦磷酸钠中于 37℃ (用于 14 个碱基 oligos)、48℃ (用于 17 个碱基 oligos)、55℃ (用于 20 个碱基 oligos) 和 60℃ (用于 23 个碱基 oligos) 洗涤。这些核酸分子可以编码或以 p30 反义分子发挥作用，所述反义分子可用于例如 p30 调节 (用于 p30 核酸序列的扩增反应和 / 或作为 p30 核酸序列扩增反应中的反义引物)。此外，这类分子可以用作筛选检测方法的组分，例如利用所述方法可以检测 p30 基因的存在与否。

[0042] 除了上述核苷酸序列外，用本领域熟知的分子生物技术而不需要过多的实验，可以鉴定并容易地分离全长 cDNA 或基因组序列。本发明包括这些核酸分子。

[0043] 本发明的 DNA 序列可以用几种方法获得。例如，所述 DNA 可以用本领域熟知的杂交或计算机为基础的技术分离。这些技术包括但不限于 :(a) 基因组或 cDNA 文库与探针杂交以检测同源核苷酸序列 ;(b) 抗体筛选表达文库以检测具有共同结构特征的克隆 DNA 片段 ;(c) 用能够退火与目的 DNA 序列结合的引物对基因组 DNA 或 cDNA 进行聚合酶链反应 (PCR) ;(d) 用计算机对序列数据库检索相似序列 ;(e) 示差筛选扣除 DNA 文库 ;和 (f) 用 T 细胞 cDNA 文库 R 的已表达序列标志 (EST) 进行大规模基因组测序。

[0044] 本发明 p30 多核苷酸最好得自哺乳动物。只要可得到合适探针，则依赖于核酸杂交的筛选方法使得可以从任何生物分离任何基因序列。相应于编码上述蛋白的序列的一部分的寡核苷酸探针可以化学合成。这要求必需知道短的氨基酸序列的寡肽序列。编码所述蛋白的 DNA 序列可以从所述遗传密码推导，然而，必须考虑所述密码的简并性。当所述序列

是简并的时候，可以进行混合加入反应。这包括变性双链 DNA 的异源混合物。对于这种筛选，优选对单链 DNA 或变性双链 DNA 进行杂交。杂交尤其可用于检测得自多种来源的 cDNA 克隆，所述来源中存在极少量的目的多肽相关的 mRNA 序列。换言之，通过使用严格杂交条件以避免非特异性结合，例如通过所述靶 DNA 杂交到混合物中与其完全互补的单一探针，可能容许特异性 cDNA 克隆的放射性自显影 [Wallace 等 (1981)Nucl.Acid Res.，9 :879]。另一方面，扣除文库可用于排除非特异性 cDNA 克隆。

[0045] 当所需多肽氨基酸残基的完整序列不知道时，直接合成 DNA 序列是不可能的，而所选择的方法是合成 cDNA 序列。在用于分离目的 cDNA 序列的标准方法中包括形成质粒或噬菌体携带的 cDNA 文库，所述 cDNA 文库得自于 mRNA 的反转录，所述 mRNA 在高水平基因表达的供体细胞中是丰余的。当与聚合酶链反应技术联合使用时，甚至极少表达的产物也可以克隆。在已知所述多肽相当大部分的氨基酸序列的情况下，产生复制出推测存在于靶 cDNA 中的标记单链或双链 DNA 或 RNA 探针序列，可以用于 DNA/DNA 杂交方法，该杂交方法可以于已经变性为单链形式的 cDNA 克隆拷贝上进行 [Jay 等，(1983)Nucl.Acid Res.，11 ：2325]。通过“反向翻译”经 N- 末端氨基酸测序获得的 p30 多肽的氨基酸序列，可以构建合适的寡核苷酸探针和引物。

[0046] 采用 p30 特异性抗体，可以对例如 λgt11 的 cDNA 表达文库间接筛选具有至少一个表位的 p30 肽类。这类抗体可以多克隆或单克隆性产生并用于检测显示 p30cDNA 存在的表达产物。

[0047] p30 核酸的改变包括基因内突变（例如点突变、无义突变（终止）、错义突变、剪接位点突变和移码突变）和杂合型或纯合型缺失。可以用本领域技术人员已知的标准方法检测这类改变，所述方法包括序列分析、DNA 印迹分析、基于 PCR 的分析（例如多重 PCR、序列标志位点 (STS)）和原位杂交。这类蛋白可以用例如标准 SDS-PAGE 和 / 或免疫沉淀分析和 / 或蛋白质印迹分析进行分析。

[0048] 本发明也包括含有任何上述 p30 编码序列和 / 或其互补序列（即反义序列）的 DNA 载体和含有任何上述 p30 编码序列的表达载体。表达载体由这样的核酸组成或含有这样的核酸，在所述核酸中编码本发明肽或多肽的多核苷酸序列可操作性连接至启动子或增强子 - 启动子组合物。启动子是转录调节元件，该元件由通常位于转录起始位点前（上游）的 100 个核苷酸中的 DNA 分子区组成。另一个转录调节元件是增强子。增强子提供时间、位置和表达水平方面的特异性。与启动子不一样，只要存在启动子，则当增强子位于距转录位点不同距离时均可以有功能。增强子也可以位于转录起始位点下游。表达载体的编码序列可操作性连接至转录终止区。为了使编码序列置于启动子控制之下，必需使所述肽或多肽翻译读框的翻译起始位点位于所述启动子下游 (3') 的 1 至约 50 个核苷酸范围内。这类调节元件包括但不限于巨细胞病毒 hCMV 立即早期基因、SV40 腺病毒早期启动子或晚期启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 系统、TRC 系统、噬菌体 A 主要操纵基因和启动子区、fd 外被蛋白控制区、3- 磷酸甘油酸激酶启动子、酸性磷酸酶启动子和酵母 α 交配因子启动子。

[0049] 表达载体和它们的构建方法是熟悉本领域人员已知的。合适的载体包括质粒和病毒载体，例如其中包括疱疹病毒、逆转录病毒、金丝雀痘病毒、腺病毒和腺相关病毒。

[0050] 本发明包括用表达载体转染的合适宿主细胞系，所述表达载体含有上述 p30 核酸序列。用于转染的细胞包括但不限于哺乳动物来源的 HEK293 细胞或 Sf9 昆虫细胞，例

如用于表达各种天然或工程改造形式的 p30。细胞用普遍用于本领域的各种方法转染，例如电穿孔法或磷酸钙沉淀法。基因也可以通过用病毒载体例如逆转录病毒转导引入所述细胞。成功转染细胞系用本领域普通技术人员熟悉的合适方法选择，例如采用补充诸如 Geneticin™(G418) 或嘌呤霉素的药物的组织的培养基，例如为此相关的表达载体含有对所述药物的抗性基因。用各种可能的方法（例如流式细胞仪分析），根据 p30 分子的表面表达，筛选成功转染细胞系细胞。

[0051] “宿主细胞”是载体在其中可以增殖并且载体 DNA 表达的细胞。该术语也包括所述宿主细胞的任何子代。当然不可能所有子代都与亲代细胞相同，因为在复制期间可能发生突变。然而，使用术语“宿主细胞”时包括这种子代细胞。

[0052] 特异性识别 p30 氨基酸序列中的抗原表位的抗体也包括于本发明中。这类抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、人抗体、人源化或嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段、$F(ab')_2$ 片段以及任何上述抗体的表位结合片段。

[0053] 本发明抗体可以用于例如治疗自身免疫性疾病和淋巴细胞恶性肿瘤。它们也可以用来检测细胞表面的 p30 表达，并因此可以用作筛选方法的一部分以选择用于特定受治疗者的合适治疗。例如，假若淋巴瘤或白血病患者的肿瘤细胞表达 p30，则抗 p30 抗体或抗 p30 抗体的免疫毒素缀合物可以用于治疗上述病人。这类抗体也可以用于本发明的筛选检测。

[0054] 为了生产本发明抗体，通过注射 p30 多肽或表达 p30 多肽的细胞来免疫宿主动物。另一方面，对应于这些多肽的 p30 特异性区的肽类可以用作免疫原。这类宿主动物可以包括但不限于家兔、小鼠和大鼠。根据宿主种类，可以应用各种佐剂增强免疫应答，所述佐剂包括但不限于弗氏（完全和不完全）佐剂、矿物质凝胶（例如氢氧化铝）、溶血卵磷脂、多聚醇、聚阴离子、肽类、油乳化剂、BCG（卡介苗）和小棒杆菌 (Corynebacterium parvum)。多克隆抗体是得自免疫动物血清的不均一抗体分子群。

[0055] 为了进一步增强免疫原性，所述免疫原可以偶联到载体。这类载体的实例有匙孔娥血蓝蛋白 (KLH) 和牛血清白蛋白 (BSA)。诸如卵清蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白的其它白蛋白也可以用作载体。将肽偶联到载体的方法是本领域熟知的，并包括应用戊二醛、碳二亚胺和马来酰亚胺基苯甲酰基 -N- 羟基丁二酰亚胺酯。

[0056] 本领域一般技术人员不用过多的实验可以容易地确定抗原使用量。所述抗原可以通过多种途径（例如皮下、肌肉、皮内、静脉和腹膜内）给予。给药后在不同时间点采集免疫动物血样品监测多克隆抗体的产生。当达到所需水平抗体时，将动物放血并贮藏血清。

[0057] 单克隆抗体是针对特定抗原的均一抗体群，可以提供用持续培养细胞系产生抗体分子的任何技术获得单克隆抗体。这些技术包括但不限于杂交瘤技术 [Kohler 和 Milstein(1975)Nature256 :495-497 ; 美国专利第 4,376,110 号 ;Howell 和 Lane(1988) Antibodies, A LaboratoryManual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.]、人 B- 细胞杂交瘤技术 [Kosbor 等 (1983)Immunology Today 4 :72 ;Cole 等 (1983)Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80 :2026] 和 EBV 杂交瘤技术 [Cole 等 (1985), MonoclonalAntibodies And Cancer Therapy, Alan R.Liss, Inc.]。这类抗体可以是任何免疫球蛋白类别，包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 及其任何亚类。

[0058] 此外，可以应用开发用于生产“嵌合抗体”的技术 [Morrison 等 (1984)Proc. Natl.Acad.Sci.USA 81 :6851 ;Neuberger 等 (1984)Nature 312 :604 ;Takeda 等 (1985)

Nature314 :452]。这些技术涉及将编码合适抗原特异性的小鼠抗体基因的一部分剪接到编码合适生物活性的人抗体基因的一部分。嵌合抗体是一种其不同部分得自不同动物物种的分子,例如那些具有得自小鼠单克隆抗体可变区和人免疫球蛋白恒定区的分子。这类嵌合抗体也可以例如用含有编码 IgH 的人基因座和 κ 及 λ 轻链基因座的免疫小鼠产生。

[0059] 或者,可以用描述用于生产单链抗体的技术[美国专利第 4,946,778 号;Bird(1988)Science 242 :423 ;Huston 等 (1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85 :5879 ; 和 Ward 等 (1989)Nature 334 :544] 来生产针对 p30 表位的单链抗体。通过氨基酸桥将 Fv 区的重链和轻链片段连接起来产生单链多肽,从而形成单链抗体。它们也可以用重组 DNA 技术很容易地产生。

[0060] 识别特定表位的抗体片段可以用已知技术产生。例如这类片段包括但不限于可以用胃蛋白酶消化所述抗体分子产生的 $F(ab')_2$ 片段和可以用还原所述 $F(ab')_2$ 片段的二硫键产生的 Fab 片段。另一方面,可以构建 Fab 表达文库 [Huse 等 (1989)Science 246 :1275] 以容许快速简便地鉴别具有所需特异性的单克隆 Fab 片段。

[0061] 筛选抗体结合特异性的方法是本领域熟知的。这些方法包括但不限于测试 :(a) 结合到表达细胞表面 p30 的细胞 ;(b) 不能结合到不表达 p30 的细胞 ;(c) 结合到所述 p30 多肽 ;(d) 不能结合到非 p30 的多肽 (例如 TNF、LTα 、LTβ 、Fas 配体、CD40 配体或白蛋白);以及 (e) 特异性抑制肽类结合到 p30,所述肽类对应于 p30 中的目的区,例如涉及结合到 HVEM 或 LTβR 的区。

[0062] 本发明特征性描述了设计用于鉴定化合物的体外系统,所述化合物能够调节通过所述 HVEM 或者 LTβR 受体多肽类介异的细胞反应。“细胞反应”在本文是指细胞活化或 HSV 的细胞内化。这些细胞反应通过 (a)HVEM 与 p30、gD 或 LTα 的相互作用 ;(b)LTβR 与 p30 的相互作用引发。

[0063] 术语“配体”是指以高亲合力及特异的方式结合到受体蛋白以引发功能反应的多肽或化合物。例如本发明的配体包括 p30、gD 或 LTα 。术语“受体”在本文是指当与配体结合时诱导细胞反应的多肽。本发明的受体包括 HVEM 或 LTβR。术语“结合剂”是指以高亲合力及特异方式结合到受体或配体并可以或不可以引发功能反应的多肽或化合物。所述测试化合物可以是一种已知的分离并纯化的候选化合物 (例如合成的小分子)、一种组合文库的成员,或它可以存在于诸如生物体液、组织提取物、亚细胞组分或细胞裂解物的生物样品中。

[0064] 在一个实施方案中,本发明特征性描述了鉴定影响 HVEM 结合剂介导的细胞反应的化合物的检测法。该检测法包括 :(a) 在允许所述组分相互作用的条件下,温育所述化合物与 HVEM 多肽或表达 HVEM 多肽的细胞和一种 HVEM 结合剂 ;和 (b) 测定所述化合物对 HVEM 结合剂介导的细胞反应的影响。本发明中还包括用于鉴定影响 LTbR-p30 介导的细胞反应的化合物的检测法。该检测方法包括 :(a) 在允许所述组分相互作用的条件下,温育所述化合物与 LTβR 多肽或表达 LTβR 多肽的细胞和 p30 ;和 (b) 测定所述化合物对 LTβR-p30 介导的细胞反应的影响。在本发明的检测中,根据调节 HVEM 或 LTβR 与一种配体相互作用介导的细胞活化的能力,或者抑制 HSV 感染易感细胞的能力筛选化合物。

[0065] 本发明特征性描述了细胞反应检测。这些细胞反应检测测定细胞活化或 HSV 对细胞的感染。

[0066] 可以测试试验化合物调节由配体（例如 p30、LTα 或 gD）和适合表达受体（例如 HVEM 或 LTβR）的细胞的亚适剂量刺激物刺激的、所述细胞反应的能力。表达所述“效应者”受体的细胞可以从受治疗者新鲜制得，或它们可以是一种培养的细胞系。所述细胞可以表达内源性编码的受体或表达由转染基因编码的受体。所述配体可以以分离多肽形式加入到所述细胞反应培养物，或通过加入到表达所述配体的细胞培养物而加入到所述细胞反应培养物。所述配体表达细胞可以表达编码该配体的内源基因，或可以表达编码该配体的转染基因。此外，该配体可以表达于细胞表面（p30 或 gD），或者可以是分泌型的（p30、gD 或 LTα）。为了使 p30 或 gD 可以被分泌，编码它的基因需要缺失编码跨膜域的区。

[0067] 细胞活化可以通过例如细胞增殖、从新表达细胞表面活化标记或可溶性因子产生来检测。

[0068] 在一个优选实施方案中，所述细胞是淋巴细胞。在 T 细胞的情况下，可以在存在所述试验化合物、配体和亚适剂量 T 细胞激活剂（例如抗 CD3 抗体、诸如植物血凝素（PHA）的凝集素、或诸如葡萄球菌肠毒素 C(SEC) 的超级抗原）的情况下，培养表达所述受体（HVEM 或 LTβR）的效应 T 细胞。对照是含有以下组分的培养物：(a) 单独的 T 细胞；(b)T 细胞和 T 细胞激活剂、和配体而无试验化合物；(c)T 细胞和 T 细胞激活剂，无配体和无试验化合物；(d)T 细胞和 T 细胞激活剂、无配体而有试验化合物；(e) 有 T 细胞而无 T 细胞激活剂、有配体而无试验化合物；(f) 有 T 细胞而无 T 细胞激活剂、无配体和无试验化合物和 (g) 有 T 细胞而无 T 细胞激活剂、无配体而有试验化合物。根据 ^{3}H- 胸苷渗入的 T 细胞增殖（参见实施例 5）、诱导诸如 CD69 或 CD25 的活化标记或产生诸如白介素 -2(IL-2)、白介素 -4(IL-4) 或干扰素 - γ（IFNγ）的细胞因子，可以检测 T- 细胞活化。

[0069] 在 B 淋巴细胞的情况下，可以进行类似的反应测定。所述 B 细胞激活剂可以是促细胞分裂原，例如美洲商陆促细胞分裂原、葡萄球菌蛋白 A 或抗免疫球蛋白。通过细胞增殖（又用 ^{3}H- 胸苷掺入）或 Ig 分泌测定细胞活化细胞。或者可以测定亚适营养培养基中的 B 细胞存活（参见实施例 5）。

[0070] 试验化合物抑制淋巴细胞活化的能力是这种化合物可以用于治疗主要涉及 T 细胞（例如类风湿性关节炎、胰岛素依赖性糖尿病和多发性硬化）或 T 和 B 细胞（例如系统性红斑狼疮和重症肌无力）的自身免疫性疾病的一个指标。试验化合物刺激淋巴细胞活化的能力是这种化合物可以用于刺激感染性疾病患者、或者处于免疫抑制状态的患者（例如正在进行癌症化疗或放疗）或 AIDS 患者的免疫应答的一个指标。

[0071] 在阻止 HSV 感染的试验化合物的检测中，所述试验化合物可以加至 HSV 易感细胞和 HSV 的培养物中。病毒感染的容许细胞系包括人真皮成纤维细胞、用引起激活的物质（例如抗 CD3 抗体或植物血凝素）处埋后的外周血淋巴细胞和转化细胞系（例如 Held 细胞）。用本领技术人员已知的许多方法检测病毒的产生，所述方法包括病毒空斑检测法、用 ELISA 或用含有像 β- 半乳糖苷酶的指示基因产物的重组病毒检测的特定病毒蛋白的产生，β- 半乳糖苷酶是一种很容易用比色法检测的酶 [Montgomery 等，已经引用的上述相同文献]。

[0072] 试验化合物抑制 HSV 对细胞感染的能力是这种化合物可以用于治疗 HSV 感染的患者的一个指标。

[0073] 为了测试化合物是否通过结合相关受体 - 配体对中的任一成员而影响细胞反应

功能，可以用本领熟知的检测法测试其结合可溶形式的受体或配体的能力，所述检测法例如 ELISA、蛋白质印迹或放射免疫检测法。此外，为了测试是否试验化合物结合到受体或配体引起它们相互结合的抑制，可以测试所述试验化合物抑制可溶形式的所述受体和配体结合的能力。这些检测法的实例有竞争性 ELISA、竞争性蛋白质印迹和竞争性放射免疫检测法。

[0074] 用于本发明筛选分析的肽和多肽类可以通过各种途径获得。较小的肽类（长度小于 50 个氨基酸）可以用标准化学方法简便地合成。某些多肽（例如抗体）可以购自商业来源。在不能市场购得的情况下，抗体可以按如上所述方法生产。可检测的标记抗体可以购自商业市场来源或很容易地由本领域技术人员制得。

[0075] 诸如 HVEM、LTβR、p30、gD 或 LTα 的多肽类可以用本领域技术人员熟知的方法从生物来源纯化 [Protein Purification, Principles andPractice, 第二版 (1987)Scopes, Springer Verlag, N.Y.]。它们也可以采用本领域熟知技术、通过重组 DNA 技术以其天然、截短、融合或嵌合蛋白形式产生。这些方法包括例如体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。参见例如描述于 Sambrook 等 (1989)MolecularCloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y. ;和 Ausubel 等，引用的上述相同文献的技术。另一方面，编码所述蛋白的 RNA 可以化学合成。参见例如描述于 Oligonucleotide Synthesis, (1984) Gait, M.J. 编辑，IRL Press, Oxford 的技术，该文献通过引用结合于本文中。

[0076] 多种宿主－表达载体系统可以用来表达所述核苷酸序列。当所述肽或多肽是可溶的时候，可以从以下回收 :(a) 培养物，即当所述肽或多肽不能分泌的情况下从宿主细胞获得的培养物回收，或 (b) 当所述肽或多肽由细胞分泌的情况下从所述培养液回收。所述表达系统也包括工程宿主细胞，该细胞原位表达所述多肽，即锚着在所述细胞膜上的多肽。采用合适的去污剂和脂微胶粒和本领域技术人员熟知的方法，可以完成从这种表达系统纯化或富集该多肽。另一方面，这类工程宿主细胞本身可以用于不仅对保持所述蛋白的结构和功能特征而且对评估生物活性也是重要的情况。

[0077] 可以用于本发明目的的表达系统包括但不限于 :用含有所述核苷酸序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的微生物，例如细菌（例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌）;用重组酵母表达载体转化的酵母 ;用重组病毒表达载体（杆状病毒）感染的昆虫细胞 ;用重组病毒表达载体（例如花椰菜花叶病毒，CaMV ;烟草花叶病毒，TMV) 感染的植物细胞系统，或用重组质粒表达载体转化的植物细胞系统 ;或带有含得自哺乳动物细胞基因组的启动子（例如金属硫蛋白启动子）或得自哺乳动物病毒的启动子的重组表达构建物的哺乳动物细胞（例如 COS、CHO、BHK、293、3T3)。

[0078] 在细菌系统中，许多表达载体可以根据预定要表达基因产物的用途而便利地进行选择。例如当要生产大量这种蛋白用于例如产生针对这种蛋白的抗体时，可能需要指导表达高水平、容易纯化的融合蛋白产物的载体。这类载体包括但不限于大肠杆菌表达载体 pUR278[Ruther 等 (1983)EMBO J. 2 :1791]，在该载体中所述编码序列可以独自连接入载体中具有 lacZ 编码区的框内，从而使得产生融合蛋白 ;pIN 载体 [Inouye 和 Inouye(1985) Nucleic Acids Res. 13 :3101 ;Van Heeke 和 Schuster(1989)J.Biol.Chem. 264 :5503] ;等等。pGEX 载体也可以用来以具有谷胱苷肽 S- 转移酶 (GST) 的融合蛋白表达外源多肽。一般来说，这类融合蛋白是可溶的，并可通过吸附到谷胱苷肽－琼脂糖珠后、在存在游离谷胱

苷肽的情况下洗脱，从而简便地从裂解细胞纯化。设计 pGEX 载体，使其含有凝血酶或因子 Xa 蛋白酶切割位点，从而使得所述克隆靶基因产物可以从所述 GST 部分释放出来。当然，用于所述筛选检测的多肽可以是天然形式多肽或含有该多肽的融合蛋白。所述融合蛋白的非相关部分可以是例如免疫球蛋白 G 的 Fc 部分、六组氨酸或 GST。

[0079] 在哺乳动物宿主细胞中，可以应用许多基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况下，所述目的核苷酸序列可以连接到腺病毒转录 / 翻译控制复合物，例如晚期启动子和三联前导序列。然后这种嵌合基因可以通过体外或体内重组插入腺病毒基因组。插入所述病毒基因组的非必需区（例如区 E1 或 E3）将产生重组病毒，该重组病毒是能活的，并能够在所感染宿主中表达所述基因产物［参见例如 Logan 和 Shenk(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :3655］。对于有效翻译所插入的核苷酸序列也需要特定的起始信号。这些信号包括所述 ATG 起始密码子和相邻的序列。在包含其自身起始密码子和相邻序列的一个完整基因或 cDNA 插入所述合适表达载体的情况下，可以不需要另外的翻译控制信号。然而，在仅有所述编码序列的某一部分插入时，必须提供可能包括 ATG 起始密码子的外源性翻译控制信号。此外，所述起始密码子必须与所需编码序列阅读框同相，以保证所述完整插入序列的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是各种天然和合成来源。表达效率可以因包含合适转录增强子元件、转录终止子等而增强［Bittner 等 (1987)Methods in Enzymol. 153 :516］。

[0080] 另外，可以选择调节所述插入序列的表达或以所需特定方式修饰并加工所述基因产物的宿主细胞株。蛋白产物的这类修饰（例如糖基化）和加工（例如切割）可能对该蛋白的功能是重要的。可以选择合适细胞系或宿主系统，以保证所表达外源蛋白的正确修饰和加工。哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、VERO、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3 和 WI38。

[0081] 对于长期、高产率生产重组蛋白，优选稳定的表达。例如可以工程改造稳定表达上述序列的细胞系。不用含有病毒复制起点的表达载体，而用合适表达控制元件（例如启动子、增强子序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等）控制的 DNA 和选择标记转化宿主细胞。引入所述外源 DNA 后，可以让工程细胞在滋养培养基中生长 1-2 天，然后将其转移到选择培养基。所述重组质粒中的选择标记赋予对所述选择的抗性，并容许细胞稳定地将所述质粒整合入其染色体并生长成转化灶 (focus)，然后克隆所述转化灶并扩增为细胞系。该方法可以有利地用来工程改造表达所述基因产物的细胞系。这种工程细胞系可以特别用于影响所述基因产物内源性活性的化合物的筛选和评价。

[0082] 通过采用特异性地结合到所表达融合蛋白的一种抗体和某一部分可以很容易地纯化融合蛋白。例如 Janknecht 等［(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :8972］描述的系统便于表达于人细胞系的非变性融合蛋白的简便纯化。在该系统中，所述目的基因亚克隆入牛痘重组质粒，使得所述基因的可读框翻译时融合到六个组氨酸残基组成的氨基末端标记。将用重组痘苗病毒感染的细胞的提取物加样到 Ni^{2+} 氮川乙酸 - 琼糖柱上，而组氨酸标记蛋白用含咪唑缓冲液选择性洗脱。需要时，所述组氨酸标记可以用合适的酶选择性地切割。

[0083] 嵌合蛋白也可以用本领域已知的方法衍生。这些方法包括将编码特定蛋白的基因的一部分剪接到得自一个或多个编码不同蛋白的基因的一个或多个部分。嵌合多肽是一种其中不同部分得自不同蛋白的分子。例如，一种嵌合蛋白可以含有一个 HVEM 功能域和另一

个 LTβR 功能域。

[0084] 本发明提供通过使表达受体多肽 HVEM 的细胞与一种 HVEM 结合剂接触提供来调节 HVEM 介导的细胞反应的方法。另一方面，通过使 HVEM 配体与配体结合剂接触，从而调节 HVEM 介导的细胞反应。这类配体包括 p30、LTα 或 gD。一般而言，p30 表达于细胞表面，LTα 是分泌型的，而 gD 表达于 HSV 病毒体上或 HSV 感染的细胞表面。术语“细胞反应”在本文又指细胞活化或所述细胞内化 HSV。本发明也特征性描述了通过使表达 LTβR 的细胞或表达 LTβR 配体 p30 的细胞与结合到 HVEM 或 p30 的结合剂接触、从而调节 LTβR 介导的细胞反应的方法。

[0085] 作为用于本文的术语“接触”是指将所述受体或配体暴露于受体调节有效量的所述结合剂，从而使得所述结合剂可以有效调节通过所述配体与所述受体相互作用启动的细胞反应。调节可能导致抑制或活化所述细胞反应。可以预先用上述筛选分析，测试特定受体－配体对的特定结合剂的这些可选择特性。

[0086] 关于受体结合剂，HVEM 结合剂包括可溶性 gD、可溶性 p30 或 LTα 肽片段，优选在对应于天然 LTαN- 末端 108 位的位置含有氨基酸 Tyr 的肽片段。LTβR 结合剂是可溶性 p30。

[0087] 关于配体结合剂，p30 结合剂包括可溶性 HVEM、可溶性 LTβR 或特异性结合到 p30 的抗体。LTα 结合剂是可溶性 HVEM。

[0088] 可以体外进行接触，例如将结合剂加入到表达 HVEM 或 LTβR 的细胞（例如淋巴细胞）培养物，所述细胞用 HVEMA 配体 (p30、LTα 或 gD) 或 LTβR 配体 p30 进行活化。也可以将结合剂加入到例如暴露于 HSV 病毒体表面或 HSV 感染的细胞表面的 gD 的 HVEM 表达细胞培养物。可以预先采用上述筛选方法测试所述结合剂调节这些细胞反应的能力。所述结合剂可以以分离多肽或用含有结合剂编码核酸分子的表达载体转染的细胞加入。在这些体外方法中，结合剂的“受体调节有效量”是指调节细胞活化或 HSV 感染使其的高于 20％，优选高于 50％，更优选高于 80％，最优选高于 95％的所需量。

[0089] 接触可以在受治疗者体内进行。所述受治疗者可以是诸如类风湿性关节炎、胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化、系统性红斑狼疮或重症肌无力的自身免疫性疾病、淋巴细胞(T 或 B 细胞）恶性肿瘤、HSV 感染、非 HSV 微生物感染或免疫抑制性疾病的患病哺乳动物，优选病人。抑制 HVEM-p30 或 LTβR-p30 介导的细胞反应，可能有利于自身免疫性疾病或淋巴恶性肿瘤的患者，因为它可以阻止 T 细胞增殖（如类风湿性关节炎、胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化、系统性红斑狼疮或重症肌无力和 T 细胞恶性肿瘤中的 T 细胞增殖）和 B 细胞增殖（如系统性红斑狼疮、重症肌无力和 B 细胞恶性肿瘤中的 B 细胞增殖）。抑制 HVEM-gD 介导的细胞反应（即 HSV 内化）可用于治疗 HSV 感染患者，因为它可阻止存在于细胞外空间的表达 gD 的 HSV 病毒体内化所介导的病毒扩散，或阻止来自在其表面表达 gD 的 HSV 感染细胞的病毒扩散。刺激 HVEM-p30 或 LTβR-p30 介导的细胞反应，可用于治疗非 HSVA 感染患者或免疫抑制受治疗者（例如进行癌症而非淋巴恶性肿瘤放疗和／或化疗的患者）或 AIDS 患者，因为可刺激 T 和 B 细胞增殖。人们自然应该避免因为在 HSV 感染患者中采用刺激 HVEM-p30 介导的细胞反应的结合剂，因为这种结合剂也可以增强 HVEM-gD 细胞反应并由此加速 HSV 病毒的扩散。然而，预先采用上述筛选分析测试相关结合剂的这种活性。同样，这些刺激性结合剂不可以用于淋巴恶性肿瘤，因为它们可能促进所述肿瘤细胞生长。

[0090] 用于体内调节细胞反应的结合剂包括天然形式的 HVEM、LTβR、p30、gD 和 LTα。这些结合剂可以用上述方法生产。对 p30 的抗体也包括于其中。也可以采用得自 LTα 并调节 HVEM-LTα 相互作用的肽类。这类肽含有少于 205 个，优选少于 100 个，更优选少于 50 个而最优选少于 20 个氨基酸。例如它们可以含有 5、8、12、15 或者 18 个氨基酸。这种肽类在对应于天然 LTα N- 末端的氨基酸残基 108 位优选含有残基 Tyr 或其保守取代物。

[0091] 作为结合剂也包括上述肽类的肽模拟物 (peptidomimetic)。肽模拟化合物是具有基于选定多肽三维结构的三维结构（即“肽基元”）的合成化合物。所述肽基元赋予所述肽模拟物化合物以调节细胞反应的活性，该活性与衍生所述肽模拟物的肽的活性相同或更高。肽模拟化合物可以具有增强其治疗用途的其它特性，所述特性例如亲合性和 / 或亲合力更高以及生物半衰期延长。本发明的肽模拟物通常具有这样一条主链，该主链的部分或完全为非肽结构，但是具有与所述肽模拟物所基于的肽中的所述氨基酸残基的侧基相同的侧基。几种类型的化学键例如酯键、硫酯键、硫代酰胺键、倒酰胺 (retroamide) 键、还原羰基键、二亚甲基键和酮亚甲基键是本领域已知的，一般用于在构建蛋白酶抗性肽模拟物中取代肽键。

[0092] 多肽和肽结合剂可以通过在其氨基和羧基末端的一个末端或两个末端加入封闭剂进行修饰，以有利于相关多肽或肽在体内的存在。这可以用于肽末端易于被蛋白酶降解（一点点切下）的情况。这类封闭剂可以包括但不限于其它相关或不相关的、可以连接至待给予多肽或肽的氨基和 / 或羧基末端残基的肽序列。这可以在所述肽或多肽合成期间化学性进行或通过重组 DNA 技术进行。另一方面，诸如本领域一般技术人员已知的焦谷氨酸或其它分子的封闭剂可以连接至所述氨基或羧基末端残基、或用不同部分取代的氨基末端的氨基或羧基端的羧基。同样，所述结合剂可以在给予前共价或非共价地与药学上可接受的“载体”蛋白偶联。

[0093] 体内传递包括给予受治疗者所述结合剂本身、或编码该结合剂的核酸、或编码该结合剂的表达载体或用该载体转染或转导的细胞。

[0094] 采用大致与下述用于传递至人受治疗者方法相同的技术，可以将结合剂传递至哺乳动物细胞。合适哺乳动物的实例包括但不限于人、除人以外的灵长类动物、马、牛、羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔和山羊。

[0095] 一种结合剂可以以其非修饰状态、溶解于合适生理溶液（例如生理盐水）传递至患者的细胞。当然，最好这些肽类选择性靶向相关组织和细胞类型。可以通过例如局部注射或移植，使所述肽类直接与受影响的器官或组织接触而达到该目的。因此，在诸如类风湿性关节炎或胰岛素依赖性糖尿病的自身免疫性疾病中，所述肽类可以分别直接导入受影响的关节或胰腺，或优选导入其中发生主动自身免疫反应的引流淋巴组织。

[0096] 或者，可以在已经加入相关细胞（例如 T 细胞或 B 细胞）上受体的配体或针对这些细胞表达的细胞表面标记的抗体的脂质体中，传递所述结合剂。因此，所述 CD4T 细胞表面标记的特异性抗体可以将含有所述抗 -CD4 抗体和相关结合剂的脂质体导向 $CD4^+$T 细胞。该方法可以用于自身免疫性疾病和 HSV 感染。在已经确定显性病理 T 细胞克隆表达的 T 细胞受体 (TCR) 的自身免疫性疾病中，可以使用所述相关 TCR 组分（例如 Vβ）的特异性抗体。后一种方法代表一种理想形式的免疫治疗，在该治疗中病理效应细胞被特异性靶向抑制，而作为整体的免疫系统和靶器官细胞保持不妥协。

[0097] 在淋巴瘤或白血病患者中，最好将抗增殖结合剂导向癌细胞。所述肽类可以例如在外科手术切除所述肿瘤后，直接注入所述淋巴瘤部位周围的组织，以便抑制残余肿瘤细胞的生长。可以用原位注射上述结合剂到所述肿瘤而治疗该肿瘤，从而取代外科手术。也可以使用上述脂质体方法。在这种情况下，可以利用针对肿瘤特异性抗原 (TSA) 或肿瘤相关抗原 (TAA) 的特异性抗体。

[0098] 医学领域众所周知的是，用于任何一个患者的剂量取决于多种因素以及待给予的特定化合物、给药的时间和给药途径以及同时给予的其它药物。本发明结合剂的剂量各不相同，但是当静脉给予时其剂量大约为 0.01mg-10mg/ml 血液体积。给药途径和剂量是药理学家和内科医生所熟知的。除了上述给药途径外，给药途径包括但不限于腹膜内、肌肉、肺内、透粘膜、皮下和静脉内给予。

[0099] 体内基因疗法需要将基因构建物直接传递入所述患者，优选将其靶向目的细胞或目的组织。例如，在外科手术去除原发肿瘤后，用含编码抗增殖结合剂的反转录病毒载体的组合物处理所述肿瘤附近组织，从而靶向治疗残余细胞。或者，可以原位直接注射所述载体到肿瘤，从而取代外科手术治疗原发肿瘤。可以静脉注射传递所述载体，从而使该载体到达原发肿瘤部位远侧的恶性肿瘤细胞。同样，直接注射载体，可以达到自身免疫攻击下的靶组织。例如可以使用稳定转染主要增殖细胞的反转录病毒，达到靶向肿瘤细胞或活化淋巴细胞。

[0100] 利用由通过静电力或共价力连接至聚 L- 赖氨酸的质粒或其它载体组成的分子缀合物，也可以达到组织特异性靶向作用。聚 L- 赖氨酸结合至可以结合到肿瘤细胞上受体的配体 [Cristiano 等 (1995) J. Mol. Med 73 :479]。同样，上述类型的肿瘤及细胞特异性抗体可以结合到载体，而由此将其靶向淋巴性肿瘤或诸如 T 淋巴细胞的细胞。后者可以用于自身免疫性疾病和 HSV 感染。诱导相对肿瘤特异性表达的启动子可以用来获得更高水平的靶向作用。用于自身免疫性或移植患者的组织特异性启动子包括例如诱导型 IL-2[Thompson 等 (1992) Mol. Cell. Biol. 12 :1043]、IL-4[Todd 等 (1993) J. Exp. Me d. 177 :1663] 和 γ- 干扰素 [Penix 等 (1993) J. Exp. Med. 178 :483]T 细胞靶向启动子。这类诱导型启动子在活化 T 细胞选择性表达中具有非常宝贵的附加优势。这种活化 T 细胞群包括理想的免疫治疗模式在自身免疫疾病患者中选择性抑制的效应细胞。

[0101] 载体也可以通过单独掺入或者与上述细胞特异性抗体共掺入脂质体或其它传递载体而进行传递。

[0102] 当相关结合剂通常结合到细胞膜 (HVEM、LTβR、p30 或 gD) 时，从包含于表达载体的核酸去除编码结合剂跨膜域的核酸区。

[0103] DNA 或转染细胞可以在药学上可接受的载体中给予。药学上可接受的载体是适合给予人的生物相容性载体，例如生理盐水。治疗有效量是能够在受治疗动物中产生希望的医疗结果的本发明 DNA 的量。医学领域众所周知的是，给予任何一个患者的剂量取决于许多因素，包括患者的体型大小、体表面积、年龄、待给予的特定化合物、性别、给药时间和给药途径、一般健康情况和同时给予的其它药物。剂量是可变的，但是，DNA 静脉给药的优选剂量为 10^6-10^{12} 拷贝的所述 DNA 分子。需要时可以重复给予该剂量。

[0104] 以下实施例的目的是说明本发明而不是限制本发明。

[0105] 实施例

[0106] 材料

[0107] 前面已经描述了构建、表达和纯化用人 IgG1 的 Fc 区和 Fas:Fc 的配体结合域[Brunner 等 (1995)Nature 373 :441]、TNFR60[Crowe 等 (1994)J.Immunol.Methods 168 :79] 和人 LTβR:Fc[Crowe 等 (1994)Science 264 :707] 形成的二价嵌合蛋白。采用正向引物 5'-CGGAGATCTGAGTTCATCCTGCTAGCTGG-3'(SEQ ID NO :1) 和反向引物 5'-ATAGGATCCCTTGGTCTGGTGCTGACATTCC-3'(SEQID NO :2),采用 Taq DNA 聚合酶由 pBEC10DNA 扩增编码 1-K184 的序列,经 PCR 产生 HVEM 的细胞外区段。所扩增的 HVEM 产物符合读框地连接入含有人 Fc IgG1 的杆状病毒载体 pVL1392(Pharmingen)。在 CHO 细胞产生具有兔 IgG1 的 Fc 区的 HVEM:Fc 类似构建物,纯化并用作免疫原以产生兔抗 HVEM 抗体。采用 Taq DNA 聚合酶与正向引物 5'-GACGTCAGATCTTCCCACCTTTCCTCCTA-3'(SEQ ID NO :3) 和反向引物 5'-GAACAGAGATCTCATTGCTCCTGGCTCTG-3'(SEQ ID NO :4),通过PCR由编码所述细胞外域氨基酸残基 1-Met221 的小鼠 LTβR(mLTβR)DNA 片段 [Force 等 (1996)J.Immunol.1995.1 155 :5280] 构建 LTβR:Fc。采用上述重组杆状病毒 [Crowe 等 (1994)J.Immunol.Methods 168 :79],在昆虫细胞中产生 LTα 和 Ltα Tyr108Phe。重组可溶性 LTα1β2[Browning 等 (1995),前面已经引用的上述相同文献]、TNF[Browning 和 Ribolini(1989)J.Immunol.143 :1859] 和针对 LTα (BF7) 和 LTβ (C37、B9 和 B27) 的单克隆抗体 [Browning 等 (1995),前面已经引用的上述相同文献] 由 Jeffrey Browning(Biogen, Inc.) 惠赠。所述免疫沉淀抗 LTα 抗体 (克隆 9B9) 得自 Boehringer Mannheim。在 BALB/c 小鼠腹水中产生抗 CD3(OKT3) 并以 1μg/ml 蛋白使用。如先前详述 [Nicola 等 (1996)J.Virol.6 :3815],在杆状病毒中产生纯化的重组 HSV gD 蛋白和突变体。FITC- 抗 -CD4 和 CD8 抗体得自 Becton-Dickenson。

[0108] 实施例 1.HVEM 配体在 T 细胞上的表达

[0109] 方法

[0110] HVEM 与 II.23.D7 细胞的结合 II-23.D7 细胞系是人 CD4+T 细胞杂交瘤 [Ware 等 (1986)Lymphokine Res.5 :313],并维持培养于含有 10％胎牛血清 (FBS) 和抗生素的 RPMI1640 培养基。II-23D7 细胞用乙酸肉豆蔻佛波醇 (PMA)(100ng/ml) 或 PMA(100ng/ml) 和离子霉素 (1μg/ml) 于 37℃活化 4 小时。该细胞在含有 5μg/ml 的 HVEM:Fc、LTβR:Fc 或人 IgG 的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS)(补充 10％胎牛血清和 0.1％ NaN_3) 中洗涤并于 4℃温育 30 分钟,然后用缀合藻红蛋白的羊抗人 IgG(抗 -huIg-PE) 染色。染色细胞用流式细胞仪 (FACSCaliber,Becton-Dickenson) 分析。每个频率曲线图表示 10^4 个事件。

[0111] HVEM 与正常人 T 细胞的结合 采用 Ficoll-Hypaque 从正常供体获得的外周血单核细胞,用抗 CD3 抗体在含有 IL-2 的培养液中活化 5 天。细胞用 PMA 或 PMA 和离子霉素再刺激 4 小时,然后用 FITC-CD4 或 FITC-CD8 和如上所述的用抗 -huIgG-PE 检测的 HVEM:Fc 双重染色。具有补偿作用的 FITC 荧光用来门控 CD4 和 CD8T 细胞亚群。

[0112] 受体结合 如上所述,通过温育梯度浓度的 HVEM:Fc 或对照 IgG 与活化 II-23.D7 细胞,测定受体结合。在阳性事件的荧光值高于正常 IgG 荧光值 98％的情况下,通过计算荧光强度＝(平均荧光通道 (meanfluorescent channel))(阳性荧光事件％) 来确定受体结合。具体的荧光强度为减去对照 IgG 值后的荧光强度。

[0113] 结果

[0114] 为了测试 HVEM 的推定配体,构建含有 HVEM 细胞外域和人 IgGFc 区的融合蛋白

(HVEM:Fc)。用流式细胞仪,检测在用钙离子载体、离子霉素和 PMA 而不是单独用 PMA 活化后,HVEM:Fc 结合到人 CD4+T 细胞杂交瘤 II.23.D7[Ware 等 (1986),前面已经引用的相同文献]的特异性结合(图 1A)。也检测得自人外周血的 T 淋巴细胞上的特异性 HVEM:Fc 结合(图 1B)。这些发现表明,恶性肿瘤 T 细胞和正常 T 细胞均表达 HVEM 的细胞表面配体。于~20nM 处获得 HVEM:Fc 与 II.23.D7 细胞的半最大结合(图 1C)。PMA 也诱导 II.23.D7 细胞系表达 LTα 和 LTβ 以及 TNF[Ware 等 (1992)J.Immunol.149:3881]。

[0115] 实施例 2.HVEM 配体的结合特性

[0116] 方法

[0117] LTβR:Fc 结合的竞争 活化的 II-23.D7 细胞(如实施例 1 所述的 PMA 和离子霉素)与 LTβR:Fc 或 TNFR60:Fc(100μg/ml) 于 4℃预温育 30 分钟。然后加入 HVEM:Fc- 兔 (2μg/ml),温育 30 分钟,所述细胞用羊抗兔 IgG-PE 染色以检测 HVEM:Fc- 兔。兔 IgG 用来测定背景染色。用梯度浓度的上述 LTβR:Fc、TNFR60、Fas:Fc 或 IgG 竞争 HVEM:Fc 与活化 II-23.D7 的结合。

[0118] LTα 同三聚体结合的竞争 活化 II.23.D7 细胞,并将 HVEM:Fc 与重组 LTα 或 LTα1β2 于 4℃预温育 30 分钟。将该混合物加到活化 II-23.D7 细胞,然后用抗 -huIgG-PE 染色。用 HVEM:Fc+LTα 染色的荧光与用正常 IgG 的背景相同。

[0119] 结果

[0120] 为了检测 HVEM 是否可以结合到 TNF 或 LTα β 复合物,采用含有兔 IgG Fc 的 HVEM:Fc 构建物,将 LTβR:Fc 和 TNFR:Fc 用作 HVEM:Fc 结合到用 PMA 和离子霉素活化的 II-23.D7 细胞的竞争性抑制剂 (Montgomery 等,已经引用的上述相同文献)。所述 LTβR:Fc 和 HVEM:Fc(人 IgG1 的 Fc) 而不是 TNFR60:Fc,竞争 HVEM:Fc(兔)的结合(图 2A)。此外,两个相关受体融合蛋白 Fas:Fc 和 TNFR80:Fc 都不竞争 HVEM:Fc 的结合。然而,意想不到的是,所述 LTα 同三聚体而不是 TNF 或 LTα1β2,竞争 HVEM:Fc 结合(图 2B)。在 108 位置的酪氨酸 (Tyr) 被苯丙氨酸 (Phe) 取代的 LTα 的 TNFR60 结合突变体 [Goh 等 (1991)Protein Eng.4:785] 不产生竞争(图 3)。这些结果表明,所推定的 HVEM 配体具有与 LTα β 异三聚体和 LTα 相同的特征,但是也具有使其不同于 LTα1β2 和 TNF 的特征。因此,LTα2β1 可能是被 HVEM:Fc 识别的推定表面配体,需要说明的是 LTα2β1 上的 HVEM 结合位点不同于 TNFR60。或者,HVEM:Fc 可能识别一种新的配体。一种生化方法可以用来辨别这些可能性。

[0121] 实施例 3.HVEM 配体的生化特性

[0122] 方法

[0123] SDS-PAGE 分析用 PMA 或 PMA 和离子霉素(同实施例 1) 活化 II-23.D7 细胞 2.5 小时,用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤两次,用半胱氨酸 - 甲硫氨酸缺乏的 RPMI 洗涤一次,然后重悬浮于含 10% 透析 FBS、^{35}S- 甲硫氨酸和 ^{35}S- 半胱氨酸各 250μCi、以及活化剂的该培养基中 1.5 小时。收获所述培养物上清液,所述细胞用缓冲液裂解,所述缓冲液含有 2% NP40、HEPES pH7.0、20mM EDTA、150mM NaCl 与亮抑蛋白酶肽和抑蛋白酶肽(浓度为 10μg/ml)、PMSF(1mM) 和碘乙酰胺 (20mM)。该提取物用人 IgG(10μg) 预清洗,其中需指出的是该 IgG 是抗 -LT 抗体和 G 蛋白珠。然后将所述受体 :Fc 融合蛋白 (10μg/ml) 加入到该样品中,用 G 蛋白珠沉淀。通过还原 SDS-PAGE 和磷图象(象素范围 6-200) 分析标记蛋白。

[0124] 按上一段所述制备的细胞提取物首先用针对 LTα 或 LTβ 的小鼠 IgG 或单克隆抗

体 10μg 预清洗，然后将 HVEM:Fc 加入到沉淀配体中。结合到 HVEM:Fc 的蛋白然后通过还原 SDS-PAGE 分离并用图象检测。

[0125] HVEM 配体 p30 的纯化用 PMA(100ng/ml) 或 PMA 和离子霉素 (1μg/ml) 活化 II-23.D7 细胞 2.5 小时，接着按以上两段所述用 ^{35}S- 甲硫氨酸和 ^{35}S- 半胱氨酸进行标记。细胞提取物用人 IgG(5μg) 和 G 蛋白珠预清洗，以去除非特异性结合蛋白。然后通过用 TNFR60:Fc 和 G 蛋白珠处理所述提取物，去除提取物中的 LTα。然后将 HVEM:Fc 和 G 蛋白珠加入到所述提取物中并温育。在各种情况下，洗涤所述珠子三次，以去除非结合部分中的污染蛋白。所述珠子在含 8M 尿素的缓冲液中洗脱，然后用等电聚焦（用 pI 为 5-7(50％)、3-10(40％)、2-11(10％) 安福灵混合物形成梯度）在第一相中分析，还原 SDS-PAGE(15％凝胶）进行第二相分析。

[0126] 通过与用 LTβR:Fc 或 TNFR60:Fc 纯化的样品比较，监测 HVEM:Fc 纯化的 p30。从用 PMA 刺激的 II-23.D7 细胞分离的 LTβR:Fc 纯化蛋白 LTα1β2 示于图 4A，而结合到用来从所述提取物去除 LTα 的结合至 TNFR60:Fc 的蛋白示于图 4B。如上所述用 HVEM:Fc 纯化的 p30 示于图 4C。

[0127] 示于每一凝胶第一道的是 ^{14}C 标记的分子量标记，而第二道是仅在第二相迁移的受体 :Fc 结合蛋白。

[0128] 结果

[0129] 在用 PMA 活化后，由 II23.D7 细胞分泌 LTα [Ware 等 (1992)，已经引用的上述相同文献 ;Crowe 等 (1994)Science 264 :707]。SDS-PAGE 所示，HVEM:Fc 和 TNFR:Fc 沉淀得自用 PMA 和离子霉素刺激的 II-23.D7 细胞的分泌型 LTα。由于糖基化异质性，使得 LTα 在一定分子量范围内迁移 [Browning 等 (1991)，已经引用的上述相同文献]。TNFR60:Fc 而不是 HVEM:Fc，也沉淀 TNF(17kDa)，由此证实了上述竞争研究的结果。正如所预测的一样，LTβR:Fc 不结合任何分泌型蛋白，但是沉淀得自 PMA 活化 II-23.D7 细胞的去污剂提取物的 LTβ (33kDa) 和 LTα (23-25kDa) 复合物。然而，当所述刺激物包括离子霉素和 PMA 时，LTβR:Fc 沉淀 30kDa 的主带以及 33kDa 的少量 LTβ 和 23-25kDa 的少量 LTα。TNFR60:Fc 沉淀与所述 LTα 前体相同大小的 23kDa 蛋白。相比之下，HVEM:Fc 沉淀 30kDa 和 23kDa 蛋白两种蛋白。阻断抗 LTβ 单克隆抗体的三种不同受体在加入 HVEM:Fc 之前不能从所述提取物去除所述 30kDa 蛋白，表明所述 p30 蛋白与 LTβ 无抗原相关性。然而，抗 -LTα 抗体从所述提取物消除 23kDa 带，显示其与 LTα 的相关性。LTα 抗体不能预消除所述 30kDa 和 23kDa 带，证实这些蛋白相互无关，不象 LTα 和 LTβ 可以形成异三聚体 [Androlewicz 等，已经引用的上述相同文献]。

[0130] 通过亲合层析从 II-23.D7 细胞纯化 p30。使用连续的 TNFR60:Fc 和 HVEM:Fc 步骤，使得通过 TNFR60 从所述提取物去除 LTα，并由此不干扰 p30 结合到 HVEM:Fc。结合 HVEM:Fc、TNFR60:Fc 或鼠 LTβR:Fc 的蛋白的双向 (2D) 电泳表明，p30 与 LTα 和 LTβ 相比具有显著不同的电荷质量比。LTβR:Fc 沉淀的 LTα1β2 复合物中的 LTβ 是酸性的，它具有 4 个不同电荷异构体、pI 范围为 5-6.5，可检测到酸性形式质量的增加（图 4A)。LTα 作为与 LTβ 的复合物或作为结合到 TNFR60 的 LTα 同三聚体（图 4B) 具有 pI 范围为 7-8.5 的 7 种不同异构体 ;所述 23kDa LTα 前体具有最碱性的 pI(＞或＝ 9)。无信号序列的 LTα 的 pI 为 8.9。这些结果是糖基化加合物的特征，并与以前关于 LTα 和 LTβ 公开的研

究完全一致 [Browning 等 (1991)，已经引用的上述相同文献]。相反，p30 迁移为一个宽带 (pI7-8.5)，该宽带在较低强度下分离为三条带 (图 4C)。p30 质量无可辨别改变的电荷异质性，可能是诸如加入磷酸或磷脂类的翻译后修饰的结果。这些结果清楚地证明，HVEM 结合具有 pI7-8.5 的异构体、一种 30kDa 新的细胞表面蛋白 (称为 p30 或 HVEM 配体)，该表面蛋白抗原性和物理特性与 LTβ 明显不同。该 HVEM 配体也被 LTβR:Fc 识别，但是不被 TNFR 识别。

[0131] 实施例 4. HSVgD 包膜糖蛋白与内源性 HVEM 配体 (p30) 竞争与 HVEM:Fc 的结合

[0132] 方法

[0133] HVEM:Fc(2μg/ml) 与 gD-1(250μg/ml) 或 gD-1(Δ290-299)(100μg/ml) 于 4℃预温育 30 分钟，然后加到 PMA 和离子霉素活化的 II-23.D7 细胞 (同实施例 1)。用 huIgG 检测背景染色，而背景染色与 HVEM:Fc+gD-1(Δ290-299) 相同。按实施例 1 所述，用梯度浓度的 gD-1 或 gD-1(Δ290-299) 竞争 HVEM:Fc 结合到活化 II-23.D7 细胞。

[0134] 结果

[0135] HSV gD-1 蛋白结合到 HVEM，提示 HSV gD 可能以 HVEM 细胞配体的拮抗剂发挥作用的可能性。可溶型 gD-1 和与 HVEM 结合增强的 gD 突变体 gD-1(Δ290-299t) 均有效阻断 HVEM 结合到活化 II-23.D7 细胞表面 (图 5A)。所述 gD-1 蛋白的有效抑制浓度与其和 HVEM 的亲合力有关 (图 5B)。gD-1(Δ290-299t) 不能抑制 LTβR:Fc 或 TNFR60:Fc 结合到 PMA 或 PMA/ 离子霉素活化的 II-23.D7 细胞，表明所述 HVEM:gD-1 间的相互作用是高度特异性的。该结果提示，即使 HVEM 结合到由 TNFR60 和 LTβR 识别的配体，gD-1 也已经协同进化为特异性结合 HVEM。这些结果表明，gD-1 是所述淋巴毒素的膜锚着病毒因子，并在 HSV 进入所述感染细胞或从所述感染细胞释放期间可以调节 HVEM 发送信号的活性。

[0136] 实施例 5. HVEM 的连接导致淋巴细胞活化

[0137] 方法

[0138] T 细胞活化 新鲜分离的外周血淋巴细胞在培养基中温育，所述培养基含有梯度稀释的兔抗 -HVEM 或免疫前血清 [Montgomery 等，已经引用的上述相同文献] 和亚有丝分裂剂量 (1μg/ml) 的 PMA。3 天后用 β- 闪烁计数检测 ^{3}H- 胸苷掺入 DNA 的量，从而检测细胞增殖。

[0139] 新鲜分离的外周血淋巴细胞用 5μg/ml 的植物血凝素 (PHA) 活化，并在含有 IL-2 的培养基中培养。17 天后，所述细胞用梯度稀释的抗 -HVEM 抗血清和亚有丝分裂浓度 (1.5μg/ml) 的抗 -CD3(OKT3) 抗体再刺激。3 天后如上所述检测增殖。

[0140] B 细胞流式细胞仪分析 人类淋巴母细胞 RJI 细胞通过与抗 -HVEM 抗血清 (1 ： 100 稀释) 或对照兔 IgG 于 4℃温育进行流式细胞仪分析，并用与藻红蛋白缀合的羊抗 - 兔 IgG 染色。每个频率曲线图分析了 10^{4} 个细胞。

[0141] B 细胞活化 将 RAJI 细胞转移到含有 2% FBS 的培养基中 24 小时，然后在存在所示稀释度的兔抗 -HVEM 抗体或单独培养液的情况下温育 3 天。如上所述检测细胞增殖。

[0142] 结果

[0143] HVEM 表达于静息 CD4+T 细胞上，提示它在免疫应答起始期期间可以作为细胞增殖的协同刺激分子起作用。在亚适浓度的 PMA 下，抗 -HVEM 抗体促进增强的外周血淋巴细胞的增殖，所述增殖增强通过由 3 天后培养物中检测到的 ^{3}H- 胸苷摄取增加显示 (图 6A)。通

过用 PHA 活化后持续培养 10-17 天产生的记忆淋巴细胞，也在亚适浓度的抗 -CD3 抗体下用抗 -HVEM 抗体再活化（图 6B）。该结果表明，HVEM 在免疫应答的效应期发挥作用。因为抗体模拟 TNF 相关配体的作用 [Engelmann 等 (1990)J.Biol.Chem.265 :14497]，所以这些结果显示，所述细胞结合的 30kDa HVEM 配体可以作为 T 细胞的增殖诱导信号起作用。

[0144] 先前已经表明，LTα 刺激包括 EB 病毒转化细胞系在内的 B 淋巴细胞的生长增强活性 [Abken 等 (1992)J.Immunol.149 :2785 ;Estrov 等 (1993)J.Exp.Med.177 :76 ;Kehrl 等 (1987)Science 238 :1144 ;Gibbons 等 (1994)Eur.J.Immunol.24 :1879]。HVEM 也表达于 B 类淋巴母细胞细胞系上（图 7A）。抗 -HVEM 抗体当加入到含有 2％血清的培养液中的 RAJI B 细胞系的培养物中时，以剂量依赖形式刺激 ^{3}H- 胸苷的摄入，表明 HVEM 可以发送信号，维持低血清中的 B 细胞活力（图 7B）。LTα 在该检测中显示 2-3 倍的刺激效应。以负性生长因子存在的 TNFR60 和 TNFR80 可以导致对 LTα 的低反应。抗 -HVEM 抗体的正向作用可能是所述 p30 HVEM 配体的一种独特性质。

[0145] 尽管参考现有优选实施方案已经描述了本发明，但是应该理解的是可以进行各种修改而未离开本发明精神。因此，只由以下权利要求书限定本发明。

[0146] 序列表

[0147] (1) 一般资料 :

[0148] (i) 申请人 :La Jolla Institute for Allergy and Immunology

[0149] (ii) 发明名称 :单纯疱疹病毒进入介体的配体和使用方法

[0150] (iii) 序列数 :4

[0151] (iV) 通信地址 :

[0152] (A) 收信人 :Fish&Richardson P.C.

[0153] (B) 街道 :4225 Executive Square, Suite 1400

[0154] (C) 城市 :La Jolla

[0155] (D) 州 :CA

[0156] (E) 国家 :美国

[0157] (F) 邮政编码 (ZIP) :92037

[0158] (V) 计算机可读形式 :

[0159] (A) 媒体类型 :软盘

[0160] (B) 计算机 :IBM 兼容机

[0161] (C) 操作系统 :Windows 95

[0162] (D) 软件 :FastSEQ for Windows Version 2.0b

[0163] (vii) 在先申请数据 :

[0164] (A) 申请号 :60/051,964

[0165] (B) 申请日 :1997 年 7 月 7 日

[0166] (vii) 在先申请数据 :

[0167] (C) 申请号 :08/898,234

[0168] (D) 申请日 :1997 年 7 月 30 日

[0169] (viii) 代理律师 / 代理人资料 :

[0170] (A) 姓名 :Haile, Lisa A.

[0171] (B) 注册号 :38,347

[0172] (C) 参考 / 档案号 :07246/022WO1

[0173] (ix) 电信资料 :

[0174] (A) 电话 :619/678-5070

[0175] (B) 电传 :619/678-5099

[0176] (2)SEQ ID NO :1 的信息 :

[0177] (i) 顺序特征 :

[0178] (A) 长度 :29 个碱基对

[0179] (B) 类型 :核酸

[0180] (C) 链型 :单链

[0181] (D) 拓扑结构 :线性

[0182] (ii) 分子类型 :引物

[0183] (xi) 顺序描述 :SEQ ID NO :1

[0184] CGGAGATCTG AGTTCATCCT GCTAGCTGG 29

[0185] (2)SEQ ID No :2 的信息 :

[0186] (i) 顺序特征 :

[0187] (A) 长度 :31 个碱基对

[0188] (B) 类型 :核酸

[0189] (C) 链型 :单链

[0190] (D) 拓扑结构 :线性

[0191] (ii) 分子类型 :引物

[0192] (xi) 顺序描述 :SEQ ID NO :2

[0193] ATAGGATCCC TTGGTCTGGT GCTGACATTC C 31

[0194] (2)SEQ ID NO :3 的信息 :

[0195] (i) 顺序特征 :

[0196] (A) 长度 :29 个碱基对

[0197] (B) 类型 :核酸

[0198] (C) 链型 :单链

[0199] (D) 拓扑结构 :线性

[0200] (ii) 分子类型 :引物

[0201] (xi) 顺序描述 :SEQ ID NO :3

[0202] GACGTCAGAT CTTCCCACCT TTCCTCCTA 29

[0203] (2)SEQ ID NO :4 的信息 :

[0204] (i) 顺序特征 :

[0205] (A) 长度 :29 个碱基对

[0206] (B) 类型 :核酸

[0207] (C) 链型 :单链

[0208] (D) 拓扑结构 :线性

[0209] (ii) 分子类型 :引物

[0210] (xi) 顺序描述 :SEQ ID NO :4

[0211] GAACAGAGAT CTCATTGCTC CTGGCTCTG 29

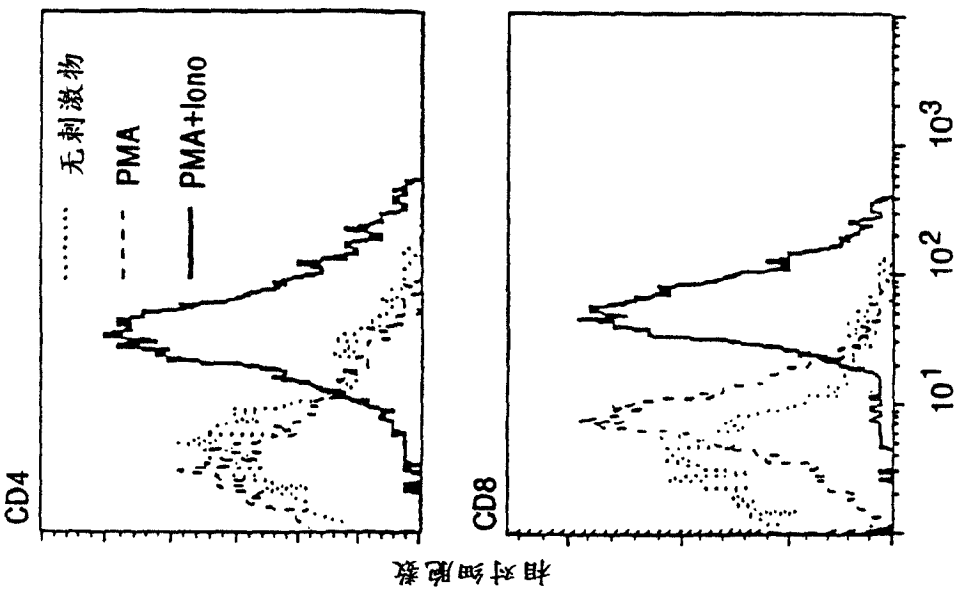

CD4
CD8
无刺激物
PMA
PMA+Iono
相对细胞数
FI
10^1
10^2
10^3

图 1B

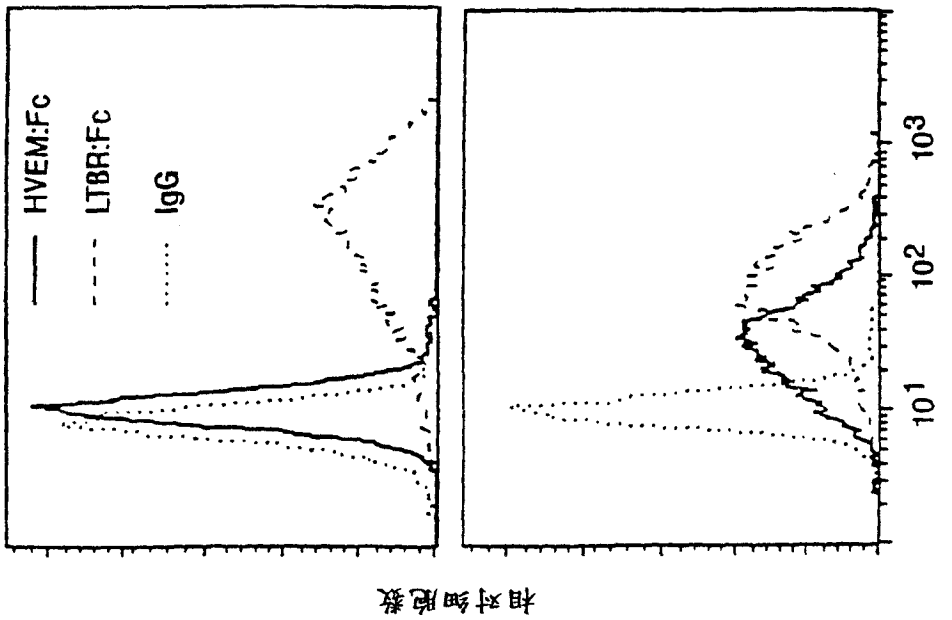

HVEM:Fc
LTBR:Fc
IgG
相对细胞数
FI
10^1
10^2
10^3

图 1A

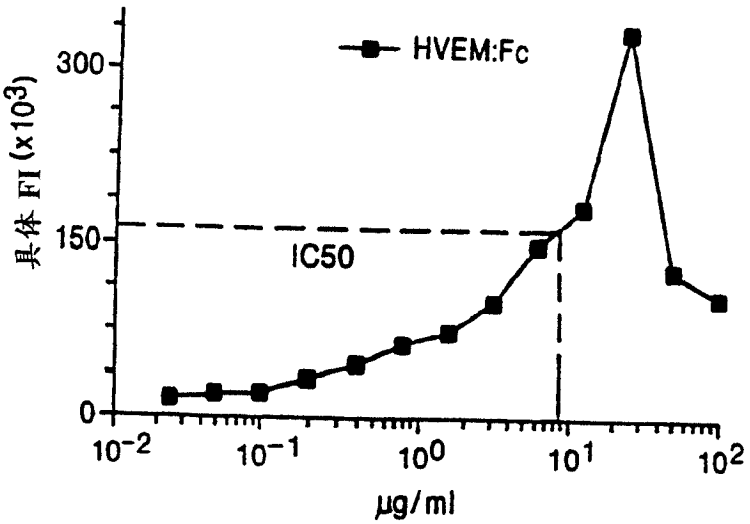
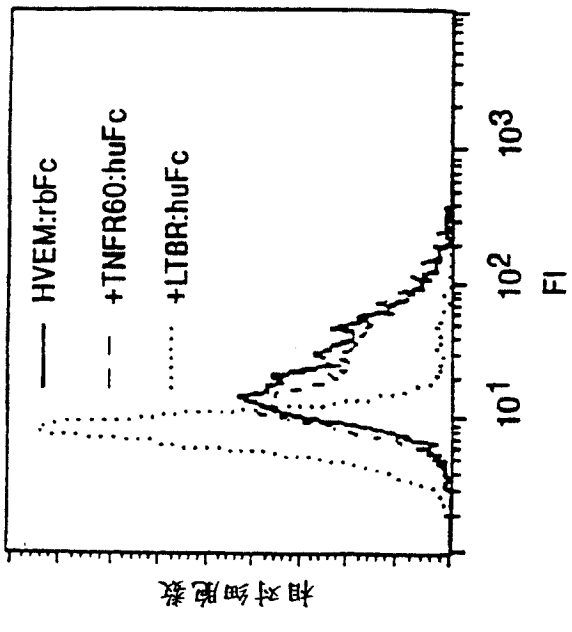
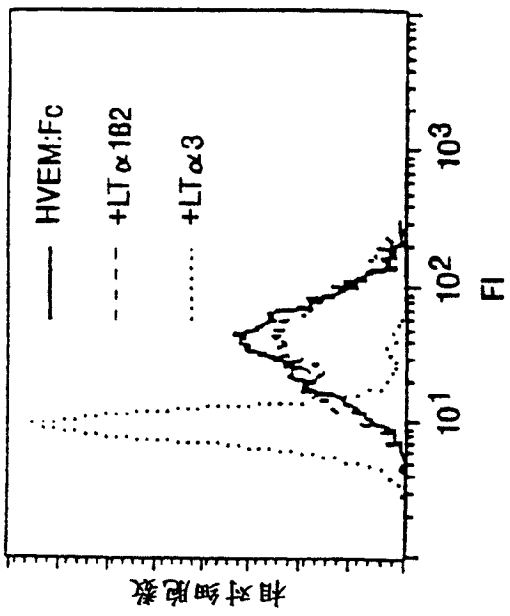


图 1C


HVEM:rbFc
+TNFR60:huFc
+LTBR:huFc
相对细胞数
FI
10^1
10^2
10^3

HVEM:rbFc+
LTBR:huFc
TNFR60:huFc
Fas:huFc
IC50
TNFRs:Fc (μg/ml)
10^{-1}
10^0
10^1
10^2
10^3
0
3
6
具体 FI (x10^4)

图 2A


HVEM:Fc
+LTα1B2
+LTα3
相对细胞数
FI
10^1
10^2
10^3

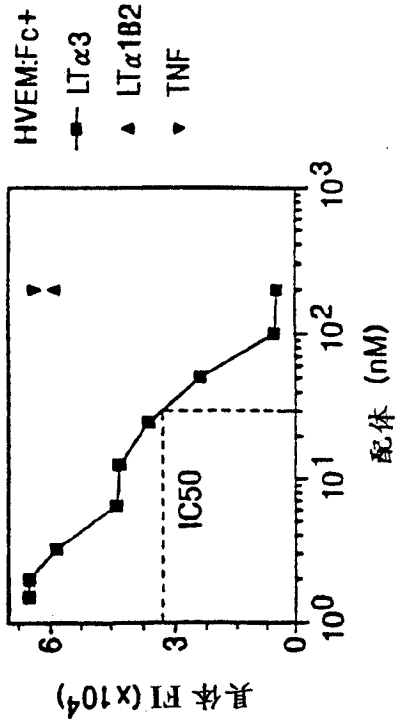

HVEM:Fc+
LTα3
LTα1B2
TNF
IC50
配体 (nM)
10^0
10^1
10^2
10^3
0
3
6
具体 FI (x10^4)

图 2B

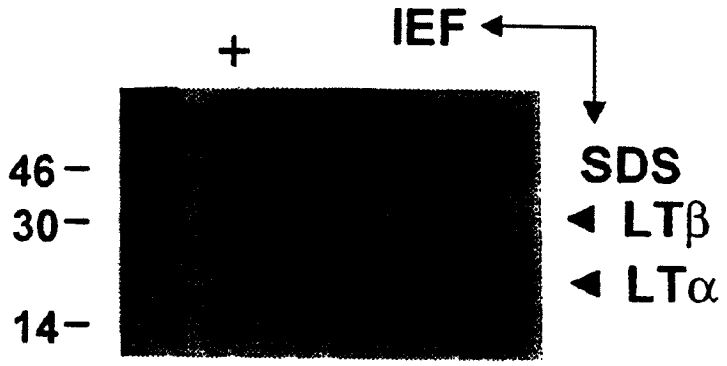


图 4A



图 4B

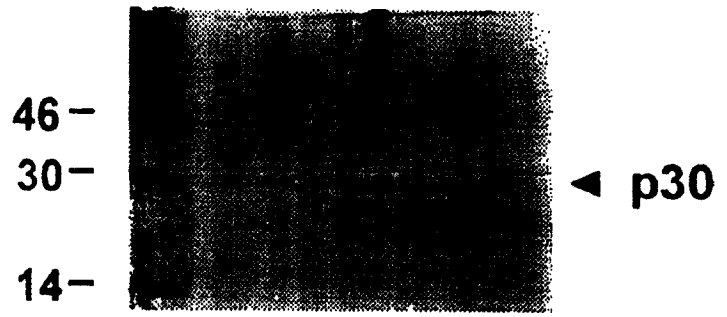


图 4C

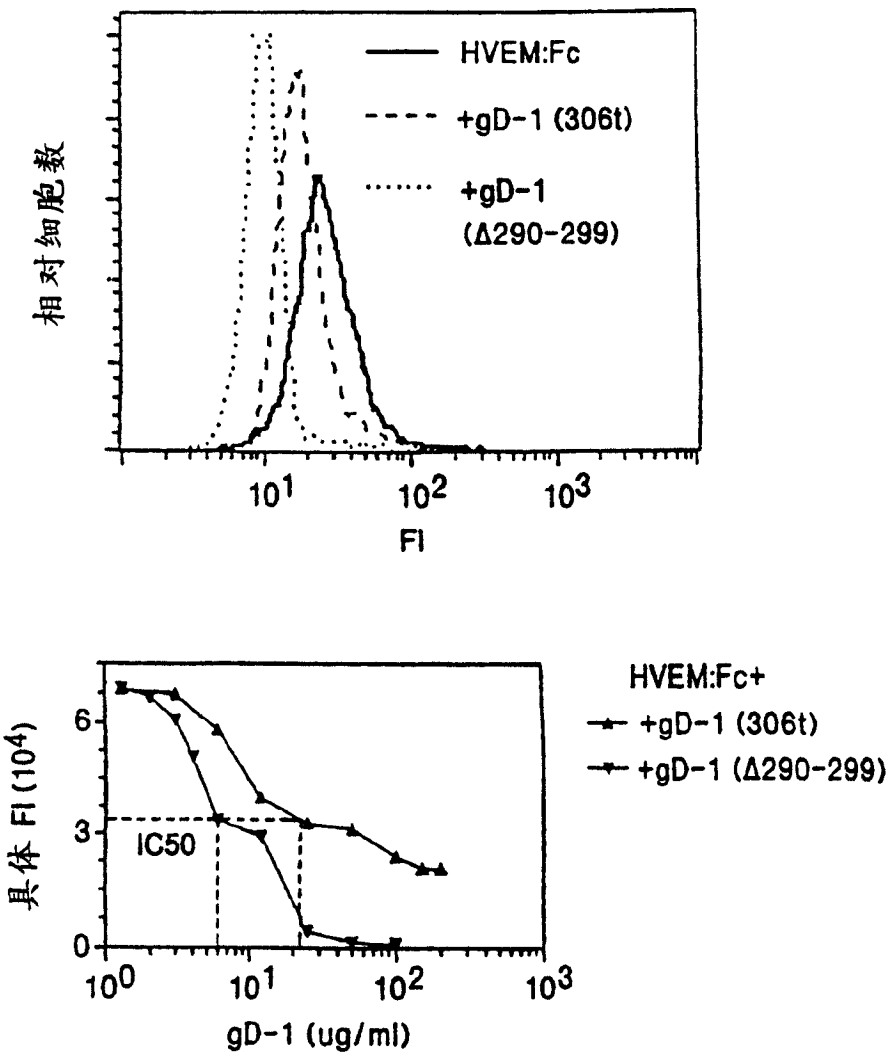

HVEM:Fc
+gD-1 (306t)
+gD-1
(Δ290-299)
相对细胞数
10^1
10^2
10^3
FI
HVEM:Fc+
+gD-1 (306t)
+gD-1 (Δ290-299)
具体 FI (10^4)
6
3
0
IC50
10^0
10^1
10^2
10^3
gD-1 (ug/ml)

图 5

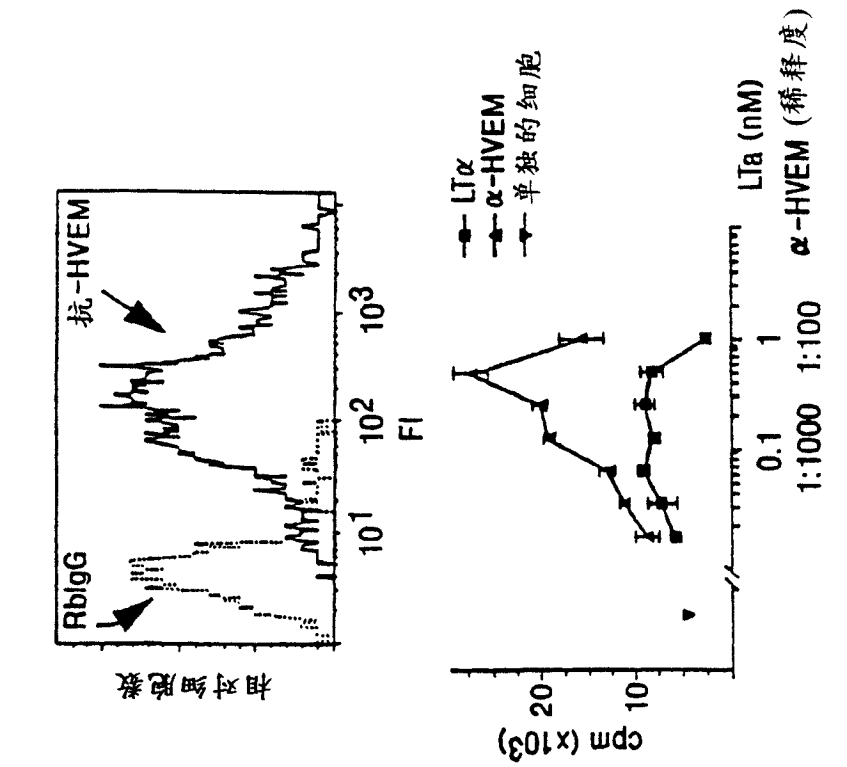

相对细胞数
RbIgG
抗-HVEM
10^1
10^2
10^3
FI
cpm (x10³)
20
10
LTα
α-HVEM
单独的细胞
0.1
1
1:1000
1:100
LTa (nM)
α-HVEM (稀释度)

图 7

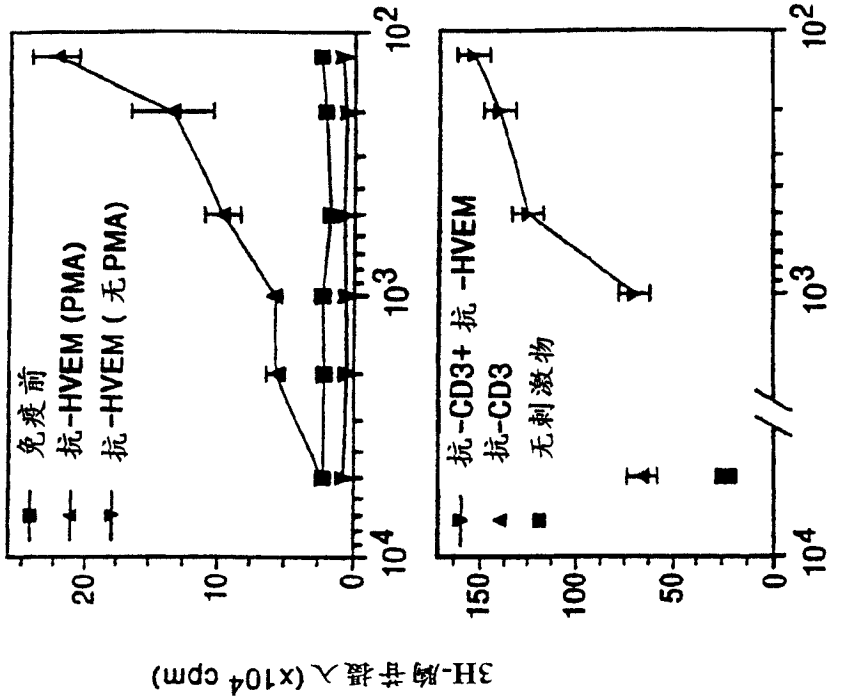

3H-胸苷摄入 (x10⁴ cpm)
免疫前
抗-HVEM (PMA)
抗-HVEM (无 PMA)
抗-CD3+ 抗 -HVEM
抗-CD3
无刺激物
150
100
50
0
20
10
10^2
10^3
10^4
抗-HVEM 稀释度 (1/x)

图 6