

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/705

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/52 C07K 16/18

C12N 15/12 C12N 5/10

C12N 1/21 G01N 33/567

[21] 申请号 98808663.8

[43]公开日 2000 年 10 月 4 日

[11]公开号 CN 1268953A

[22]申请日 1998.7.7 [21]申请号 98808663.8

[30]优先权

[32]1997.7.7 [33]US[31]60/051,964

[32]1997.7.30 [33]US[31]08/898,234

[86]国际申请 PCT/US98/13897 1998.7.7

[87]国际公布 WO99/02563 英 1999.1.21

[85]进入国家阶段日期 2000.2.28

[71]申请人 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

代理人 谭明胜

权利要求书 4 页 说明书 36 页 附图页数 7 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。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种在大致纯多肽, 其特征为:
 - a) 用还原 SDS-PAGE 测定其分子量为 30kDa;
 - 5 b) pI 约 7-8.5;
 - c) 结合到疱疹病毒进入介体(HVEM)多肽; 和
 - d) 结合到淋巴毒素 β 受体(LT β R)多肽。
2. 一种编码权利要求 1 所述多肽的分离核酸序列。
3. 一种含有权利要求 2 所述核酸序列的表达载体。
- 10 4. 一种含有权利要求 3 所述表达载体的宿主细胞。
5. 一种结合到权利要求 1 所述多肽的抗体。
6. 权利要求 5 的抗体, 其中所述抗体是单克隆抗体。
7. 影响 HVEM-结合剂介导的细胞反应的化合物的鉴定方法, 该方法包括:
 - 15 a) 将所述化合物与 HVEM 多肽或表达 HVEM 多肽的细胞和 HVEM 结合剂在容许所述组分相互作用的条件下温育; 和
 - b) 检测所述化合物对 HVEM 结合剂介导的细胞反应的作用。
8. 权利要求 7 的方法, 其中所述作用是抑制 HVEM 介导的细胞反应。
- 20 9. 权利要求 7 的方法, 其中所述作用是刺激 HVEM 介导的细胞反应。
10. 权利要求 7 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 p30。
11. 权利要求 7 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 gD。
12. 权利要求 7 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是淋巴毒素 α
- 25 (LT α)。
13. 权利要求 7 的方法, 其中所述细胞反应是细胞活化。
14. 权利要求 7 的方法, 其中所述细胞反应是 HSV 内化。
15. 权利要求 7 的方法, 其中所述细胞是淋巴细胞。

16. 影响 LTbR-p30 介导的细胞反应的化合物的鉴定方法, 该方法包括:
 - a) 将所述化合物与 LTβR 多肽或表达 LTβR 多肽的细胞和 p30 在容许所述组分相互作用的条件下温育; 和
 - b) 检测所述化合物对 LTβR-p30 介导的细胞反应的作用。
17. 权利要求 16 的方法, 其中所述作用是抑制 LTβR-p30 介导的细胞反应。
18. 权利要求 16 的方法, 其中所述作用是刺激 LTβR-p30 介导的细胞反应。
19. 权利要求 16 的方法, 其中所述反应是细胞活化。
20. 权利要求 16 的方法, 其中所述细胞是淋巴细胞。
21. 用于调节 HVEM 介导的细胞反应的方法, 该方法包括将表达 HVEM 的细胞与 HVEM 调节有效量的 HVEM 结合剂或 p30 结合剂接触。
22. 权利要求 21 的方法, 其中所述结合剂抑制 HVEM 介导的细胞反应。
23. 权利要求 21 的方法, 其中所述结合剂刺激 HVEM 介导的细胞反应。
24. 权利要求 21 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 gD。
25. 权利要求 21 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 p30。
26. 权利要求 21 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 LTα 的 HVEM 结合肽片段或该肽片段的肽模拟物。
27. 权利要求 26 的方法, 其中所述肽在对应于天然 LTα N 末端的 108 位置的位置包含氨基酸 Tyr。
28. 权利要求 21 的方法, 其中所述 p30 结合剂是 LTbR。
29. 权利要求 21 的方法, 其中所述 p30 结合剂是结合到 p30 的抗体。
30. 权利要求 21 的方法, 其中所述接触在体外进行。

31. 权利要求 21 的方法, 其中所述接触在受治疗者体内进行。
32. 权利要求 31 的方法, 其中所述受治疗者是哺乳动物。
33. 权利要求 31 的方法, 其中所述受治疗者患有 HVEM 相关疾病。
- 5 34. 权利要求 33 的方法, 其中所述受治疗者患有选自自身免疫性疾病、白血病和淋巴瘤的 HVEM 相关疾病。
35. 用于调节 HVEM 介导的细胞反应的方法, 该方法包括使表达 HVEM 的细胞与 HVEM 调节有效量的 HVEM 结合剂或 LTa 结合剂接触。
- 10 36. 权利要求 35 的方法, 其中所述结合剂抑制 HEVM 介导的细胞反应。
37. 权利要求 35 的方法, 其中所述结合剂刺激 HVEM 介导的细胞反应。
38. 权利要求 35 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 gD。
- 15 39. 权利要求 35 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 LTa 的 HVEM 结合肽片段或该肽片段的肽模拟物。
40. 权利要求 39 的方法, 其中所述肽在对应天然 LTa N-末端 108 位置的位置包含氨基酸 Tyr。
41. 权利要求 35 的方法, 其中所述 LTa 结合剂是 HVEM。
- 20 42. 权利要求 35 的方法, 其中所述接合在体外进行。
43. 权利要求 35 的方法, 其中所述接合在受治疗者体内进行。
44. 权利要求 35 的方法, 其中所述受治疗者是哺乳动物。
45. 权利要求 43 的方法, 其中所述受治疗者患有 HVEM 相关疾病。
- 25 46. 权利要求 45 的方法, 其中所述受治疗者患有选自自身免疫性疾病、白血病和淋巴瘤的 HVEM 介导的疾病。
47. 用于调节 LTβR 介导的细胞反应的方法, 该方法包括使表达 LTβR 的细胞与 LTβR 调节有效量的 LTbR 结合剂或 p30 结合剂接触。

48. 权利要求 47 的方法, 其中所述结合剂抑制 $LT\beta R$ 介导的细胞反应。
49. 权利要求 47 的方法, 其中所述结合剂刺激 $LT\beta R$ 介导的细胞反应。
- 5 50. 权利要求 47 的方法, 其中所述 $LT\beta R$ 结合剂是 p30。
51. 权利要求 47 的方法。其中所述 p30 结合剂是 $LT\beta R$ 。
52. 权利要求 47 的方法, 其中所述 p30 结合剂是结合到 p30 的抗体。
53. 权利要求 47 的方法, 其中所述接触在体外进行。
- 10 54. 权利要求 47 的方法, 其中所述接触在受治疗者体内进行。
55. 权利要求 54 的方法, 其中所述受治疗者是哺乳动物。
56. 权利要求 54 的方法, 其中所述受治疗者患有 $LT\beta R$ 相关疾病。
57. 权利要求 56 的方法, 其中所述受治疗者患有选自自身免疫性疾病、白血病和淋巴瘤的 $LT\beta R$ 相关疾病。
- 15 58. 用于抑制细胞的疱疹病毒感染(HSV)的方法, 该方法包括使 HSV 感染易感细胞与抑制有效量的 HVEM 结合剂接触, 由此抑制 HSV 感染。
59. 权利要求 58 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 gD。
60. 权利要求 58 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 p30。
- 20 61. 权利要求 58 的方法, 其中所述 HVEM 结合剂是 $LT\alpha$ 的 HVEM 结合肽片段或该肽片段的肽模拟物。
62. 权利要求 61 的方法, 其中所述肽片段在对应于天然 $LT\alpha$ N-末端 108 位置的位置包含氨基酸 Tyr。
63. 权利要求 58 的方法, 其中所述接触在体外进行。
- 25 64. 权利要求 58 的方法, 其中所述接触在受治疗者体内进行。
65. 权利要求 64 的方法, 其中所述受治疗者是哺乳动物。
66. 权利要求 64 的方法, 所述受治疗者是有 HSV 感染风险者或 HSV 感染者。

说明书

单纯疱疹病毒进入介体的配体和使用方法

5

发明领域

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。

10

发明背景

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, CRC press, 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。

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 LT α 缺乏跨膜域[Gray 等(1984) Nature 312: 721]并只限以同三聚体(该形式 LT α 也称为 TNF β)分泌。当以表面蛋白表达时，LT α 与称为 LT β [Browning 等(1993) Cell 72: 847]的 33kDa 蛋白结合[Androlewicz 等(1992) J. Biol. Chem. 267: 2542]，LT β 也是 α 1 β 2 和 α 2 β 1 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]。LT α 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 LT α 1 β 2 复合物特异性地被 LT β 受体(LT β R)识别[Crowe 等(1994) Science 264:707], 所述受体既不结合 LT α 也不结合 TNF [Crowe 等(1994) Science 264:707], 而两种 TNFR 均结合 LT α 2 β 1 异三聚体[Crowe 等(1994) Science 264:707; Browning 等(1995) J. Immunol. 154: 33]。

小鼠 LT α 和 LT β 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) Science 271:1289; Mariathasan 等(1995) J. Inflammation 45:72]。大多数研究已经指出, LT α 1 β 2/LT β R 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]。

发明概述

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 LT β R-p30 介导的细胞反应的化合物的方法。

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。

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

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。

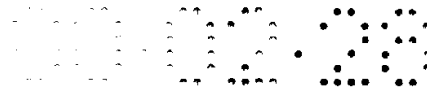
图 1B 是一对流式细胞仪频率曲线图，图示 HVEM:Fc 融合蛋白结合到正常人 CD4⁺ (上部曲线) T 细胞和 CD8⁺ (下部曲线) T 细胞。

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。

图 2A 是一对图。上图是一个流式仪细胞频率曲线图，图示 LT β R: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 LT β R:Fc 融合蛋白剂量依赖性抑制。

图 2B 是一对图。上图是一个流式细胞仪频率曲线图，图示 LT α 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 LT α 同三聚体剂量依赖性抑制。

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 LT α 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 LT α 和 LT α (Tyr108Phe)竞争性结合分析的线性图。

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 mLT β R:Fc 融合蛋白处理活化 II-23.D7 细胞提取物而获得。

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。

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。

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。

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。

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 类淋巴瘤细胞上的表达。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。

详细说明

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 LT α β 异三聚体以及 LT α 具有相同的特征，但是它也具有区别于 LT α 1 β 2 和 TNF 的特征。因此，LT α 2 β 1 可能是一种被 HVEM 识别的推定表面配体，需要说明的是 LT α 2 β 1 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。

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 $LT\beta$ 和 $LT\alpha$ 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 $LT\alpha$ 和 $LT\beta$, 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 $LT\beta R$ 识别而不被 TNFR 识别。

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 ($\Delta 290-299t$)结合到 HVEM, 但是不能结合到 $LT\beta R$ 或 TNFR60。该结果提示, 即使 HVEM 与为 TNFR60 和 $LT\beta R$ 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。

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 $LT\alpha 1\beta 2$ 。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 $LT\alpha$ 或 $LT\beta$ 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。

综合来看, 这些结果表明, 含有 HVEM 或 $LT\beta R$ 的 Fc 融合蛋白将调节 $LT\alpha$ 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有机化合物。p30 或 $LT\alpha$ 与 HVEM 相互作用、的或 p30 与 $LT\beta R$ 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。

同样，疱疹病毒 gD-1 可以用来抑制 LT α 、p30 和 HVEM 以效应分子发送信号参与的免疫反应。LT α 或可溶型的 30 kDa 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。

与 TNFR 类一样，HVEM 具有双配体特异性，可结合到 LT α 和截然不同的 30 kDa 膜结合配体 p30。所述 LT α 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 30 kDa 型，表明表面 LT α 2 β 1 不是 HVEM 配体。

此外，所述 p30 与 LT α 不同，因为其抗原性明显不同并是细胞结合型的，不像 LT α 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 LT α 和 LT β 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。

本发明人的发现也表明，HVEM 是 LT α 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 LT α ，而不抑制 TNF 或 LT α 1 β 2 功能。

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 30 kDa，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 LT β R。

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 and Practice, 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 30 kDa 的单一主带。

5 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 LT β R 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。

15 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 LT β R 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。

25 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

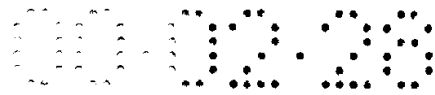


基酸替代未取代的原氨基酸，只要针对所述取代多肽产生的抗体也与所述未取代多肽发生免疫应答。

5 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
10 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。
15 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核苷酸。

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 0.5M NaHPO₄、7%十二烷基硫酸钠(SDS)、1Mm EDTA 中于 65℃杂交到滤
20 膜结合的 DNA 并在 0.1X SSC/0.1% SDS 中于 68℃进行洗涤[Ausubel F.M.等编辑，(1989) Current Protocols in Molecular Biology, 第 I 卷, Green Publishing Associates, Inc.和 John Wiley & sons, Inc, New York], 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。

25 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 0.2 X SSC/0.1% SDS 中于 42℃洗涤[Ausubel 等，已经



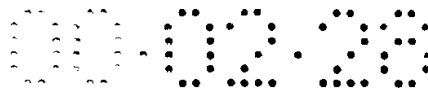
发明肽或多肽的多核苷酸序列可操作性连接至启动子或增强子-启动子组合物。启动子是转录调节元件，该元件由通常位于转录起始位点前(上游)的 100 个核苷酸中的 DNA 分子区组成。另一个转录调节元件是增强子。增强子提供时间、位置和表达水平方面的特异性。

5 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
10 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。

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
15 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。

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
20 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
25 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。

“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



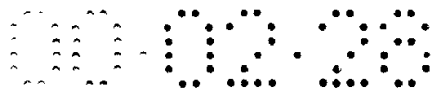
介导的细胞反应的影响。在本发明的检测中,根据调节 HVEM 或 LT β R 与一种配体相互作用介导的细胞活化的能力,或者抑制 HSV 感染易感细胞的能力筛选化合物。

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。

可以测试试验化合物调节由配体(例如 p30、LT α 或 gD)和适合表达受体(例如 HVEM 或 LT β R)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 LT α)。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。

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。

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 LT β R)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



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。

5 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。

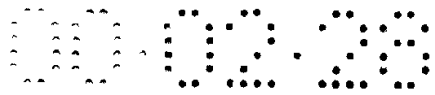
10 诸如 HVEM、LT β R、p30、gD 或 LT α 的多肽类可以用本领域技术人员熟知的方法从生物来源纯化[Protein Purification, Principles and Practice, 第二版(1987) Scopes, Springer Verlag, N.Y.]. 它们也可以采用本领域熟知技术、通过重组 DNA 技术以其天然、截短、融合或嵌合蛋白形式产生。这些方法包括例如体外重组 DNA 技术、合成技术
15 和体内遗传重组。参见例如描述于 Sambrook 等(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring 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。
20

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
25 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

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]。

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、Held、COS、MDCK、293、3T3 和 WI38。

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



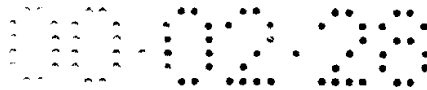
所述配体与所述受体相互作用启动的细胞反应。调节可能导致抑制或活化所述细胞反应。可以预先用上述筛选分析，测试特定受体-配体对的特定结合剂的这些可选择特性。

5 关于受体结合剂，HVEM 结合剂包括可溶性 gD、可溶性 p30 或 LT α 肽片段，优选在对应于天然 LT α N-末端 108 位的位置含有氨基酸 Tyr 的肽片段。LT β R 结合剂是可溶性 p30。

关于配体结合剂，p30 结合剂包括可溶性 HVEM、可溶性 LT β R 或特异性结合到 p30 的抗体。LT α 结合剂是可溶性 HVEM。

10 可以体外进行接触，例如将结合剂加入到表达 HVEM 或 LT β R 的细胞(例如淋巴细胞)培养物，所述细胞用 HVEMA 配体(p30、LT α 或 gD)或 LT β R 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%，
15 优选高于 50%，更优选高于 80%，最优选高于 95%的所需量。

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
20 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 LT β R-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
25 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

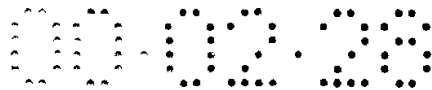


体内化所介导的病毒扩散，或阻止来自在其表面表达 gD 的 HSV 感染细胞的病毒扩散。刺激 HVEM-p30 或 LT β R-p30 介导的细胞反应，可用于治疗非 HSVA 感染患者或免疫抑制受治疗者(例如进行癌症而非淋巴恶性肿瘤放疗和/或化疗的患者)或 AIDS 患者，因为可刺激 T 和 B 细胞增殖。人们自然应该避免因为在 HSV 感染患者中采用刺激 HVEM-p30 介导的细胞反应的结合剂，因为这种结合剂也可以增强 HVEM-gD 细胞反应并由此加速 HSV 病毒的扩散。然而，预先采用上述筛选分析测试相关结合剂的这种活性。同样，这些刺激性结合剂不可以用于淋巴恶性肿瘤，因为它们可能促进所述肿瘤细胞生长。

用于体内调节细胞反应的结合剂包括天然形式的 HVEM、LT β R、p30、gD 和 LT α 。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 LT α 并调节 HVEM-LT α 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 LT α 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。

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。

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



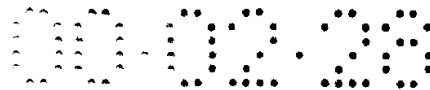
末端加入封闭剂进行修饰，以有利于相关多肽或肽在体内的存在。这可以用于肽末端易于被蛋白酶降解(一点点切下)的情况。这类封闭剂可以包括但不限于其它相关或不相关的、可以连接至待给予多肽或肽的氨基和/或羧基末端残基的肽序列。这可以在所述肽或多肽合成期间化学性进行或通过重组 DNA 技术进行。另一方面，诸如本领域一般技术人员已知的焦谷氨酸或其它分子的封闭剂可以连接至所述氨基或羧基末端残基、或用不同部分取代的氨基末端的氨基或羧基端的羧基。同样，所述结合剂可以在给予前共价或非共价地与药学上可接受的“载体”蛋白偶联。

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。

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。

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。

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 CD4 T 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 V β)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。

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。

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。

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。

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. Med. 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。

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。

当相关结合剂通常结合到细胞膜(HVEM、LT β R、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。

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。

以下实施例的目的是说明本发明而不是限制本发明。

实施例

材料

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 LT β R:Fc [Crowe 等(1994)

是也具有使其不同于 LT α 1 β 2 和 TNF 的特征。因此, LT α 2 β 1 可能是被 HVEM:Fc 识别的推定表面配体,需要说明的是 LT α 2 β 1 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。

5

实施例 3. HVEM 配体的生化特性

方法

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、³⁵S-甲硫氨酸和 ³⁵S-半胱氨酸各 250 μ Ci、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、150 mM NaCl 与亮抑蛋白酶肽和抑蛋白酶肽(浓度为 10 μ g/ml)、PMSF (1mM)和碘乙酰胺 (20mM)。该提取物用人 IgG (10 μ g)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(10 μ g/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。

按上一段所述制备的细胞提取物首先用针对 LT α 或 LT β 的小鼠 IgG 或单克隆抗体 10 μ g 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。

HVEM 配体 p30 的纯化 用 PMA (100ng/ml)或 PMA 和离子霉素 (1 μ g/ml)活化 II-23.D7 细胞 2.5 小时,接着按以上两段所述用 ³⁵S-甲硫氨酸和 ³⁵S-半胱氨酸进行标记。细胞提取物用人 IgG (5 μ g)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 LT α 。然后将 HVEM:Fc

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 ($\Delta 290-299$)相同。按实施例 1 所述, 用梯度浓度的 gD-1 或 gD-1($\Delta 290-299$)竞争 HVEM:Fc 结合到活化 II-23.D7 细胞。

5 结果

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 ($\Delta 290-299t$)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 ($\Delta 290-299t$)不能抑制 LT β R: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 LT β R 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。

实施例 5. HVEM 的连接导致淋巴细胞活化

方法

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($1\mu\text{g/ml}$)的 PMA。3 天后用 β -闪烁计数检测 ^3H -胸苷掺入 DNA 的量, 从而检测细胞增殖。

新鲜分离的外周血淋巴细胞用 $5\mu\text{g/ml}$ 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($1.5\mu\text{g/ml}$)的抗-CD3 (OKT3)抗体再刺激。3 天后如上所述检测增殖。

B 细胞流式细胞仪分析 人类淋巴母细胞 RAJI 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。

- 5 **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。

结果

- 10 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 ³H-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
15 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。

- 20 先前已经表明, LT α 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 类淋巴瘤母细胞细胞系上(图 7A)。抗-HVEM 抗体当加入到含有 2%血清的
25 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 ³H-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)。LT α 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 LT α 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。

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。



序列表

(1) 一般资料:

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

5 (ii) 发明名称: 单纯疱疹病毒进入介体的配体和使用方法

(iii) 序列数: 4

(iv) 通信地址:

- 10 (A) 收信人: Fish & Richardson P.C.
(B) 街道: 4225 Executive Square, Suite 1400
(C) 城市: La Jolla
(D) 州: CA
(E) 国家: 美国
15 (F) 邮政编码(ZIP): 92037

(V) 计算机可读形式:

- (A) 媒体类型: 软盘
(B) 计算机: IBM 兼容机
20 (C) 操作系统: Windows 95
(D) 软件: FastSEQ for Windows Version 2.0b

(vii) 在先申请数据:

- (A) 申请号: 60/051,964
25 (B) 申请日: 1997 年 7 月 7 日

(vii) 在先申请数据:

- (C) 申请号: 08/898,234
30 (D) 申请日: 1997 年 7 月 30 日

(viii) 代理律师/代理人资料:

- (A) 姓名: Haile, Lisa A.
(B) 注册号: 38,347
35 (C) 参考/档案号: 07246/022WO1

(ix) 电信资料:

- (A) 电话: 619/678-5070
40 (B) 电传: 619/678-5099

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 顺序特征:

- (A) 长度: 29 个碱基对
(B) 类型: 核酸
45 (C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 引物

50 (xi) 顺序描述: SEQ ID NO:1



CGGAGATCTG AGTTCATCCT GCTAGCTGG

29

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

5

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 31 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

10

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 引物

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO:2

15

ATAGGATCCC TTGGTCTGGT GCTGACATTC C

31

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

20

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 29 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

25

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 引物

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO:3

30

GACGTCAGAT CTTCCACCT TTCCTCCTA

29

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

35

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 29 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

40

(ii) 分子类型: 引物

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO:4

45

GAACAGAGAT CTCATTGCTC CTGGCTCTG

29

说明书附图

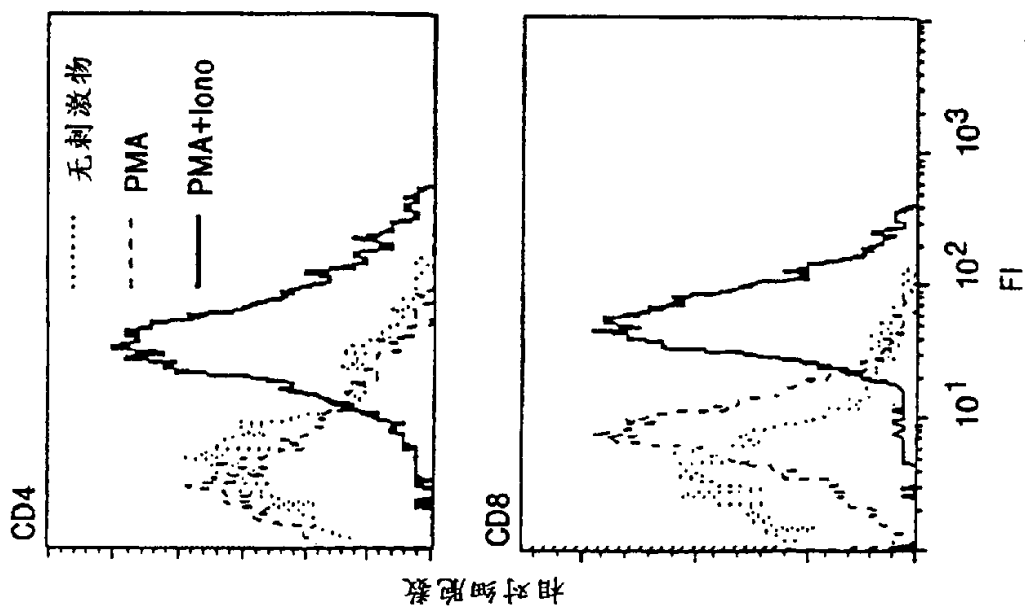


图 1B

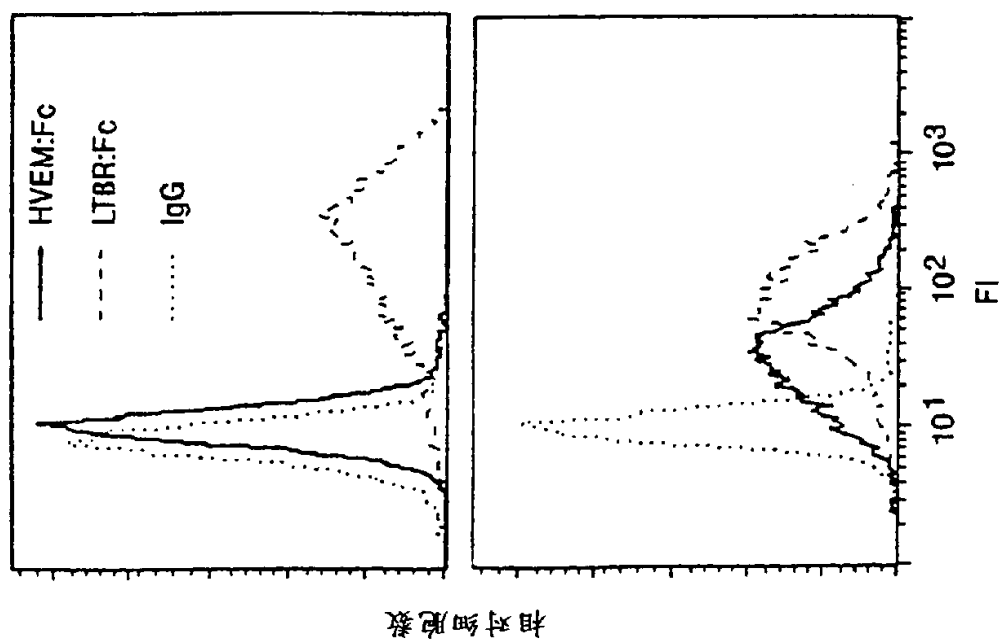


图 1A

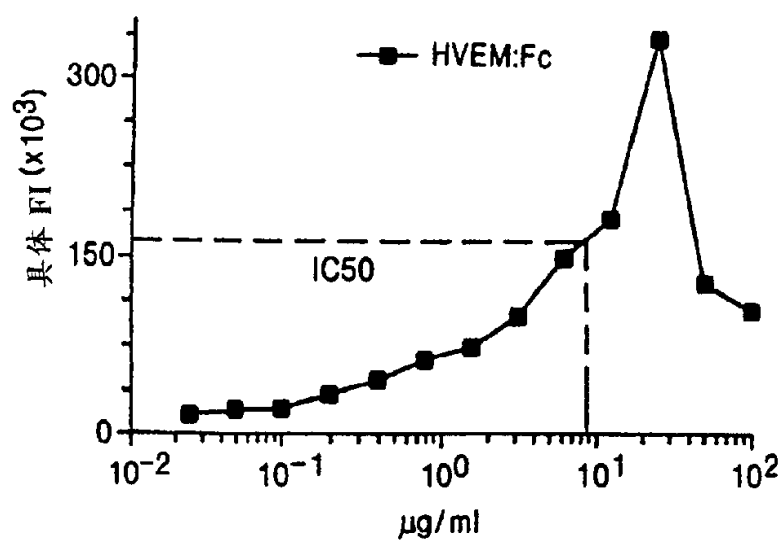


图 1C

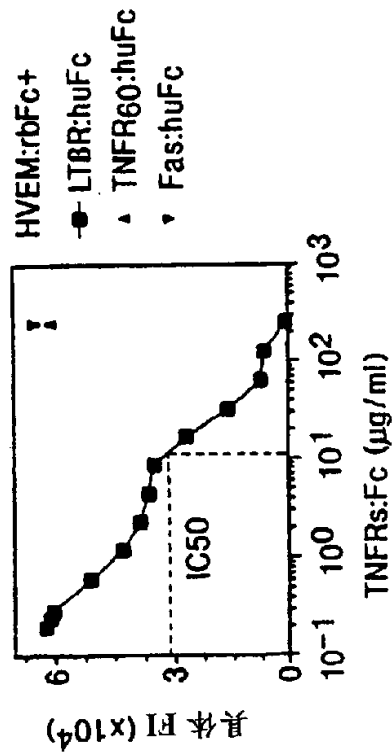
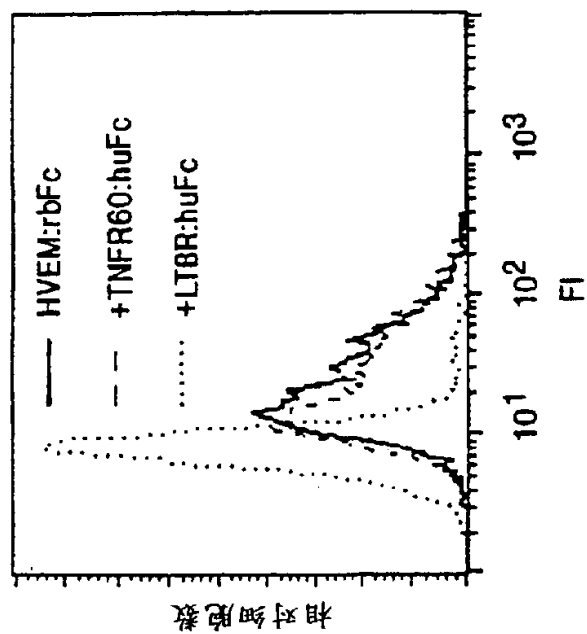


图 2A

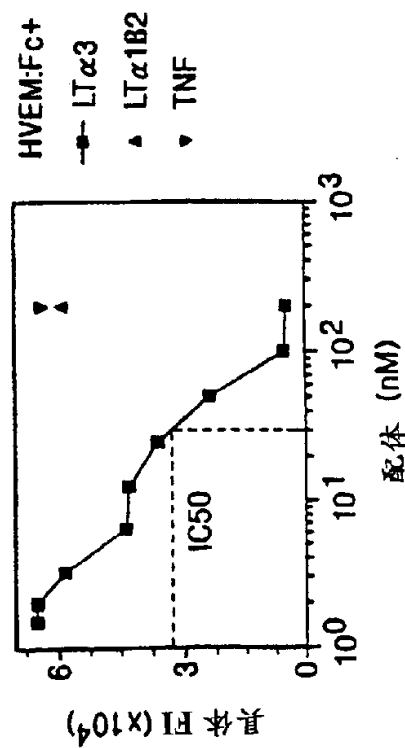
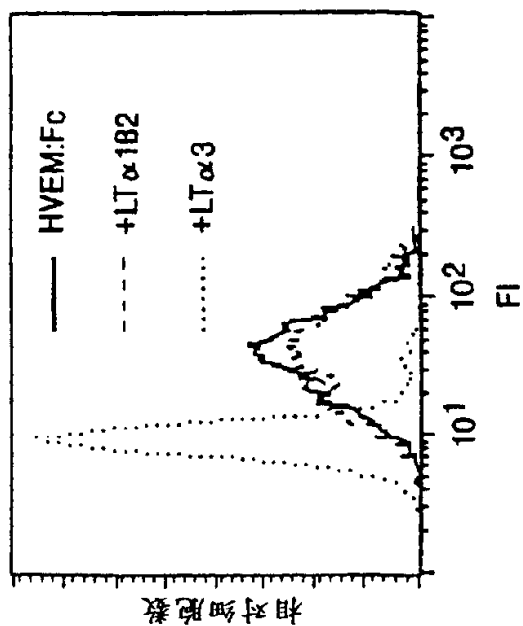


图 2B

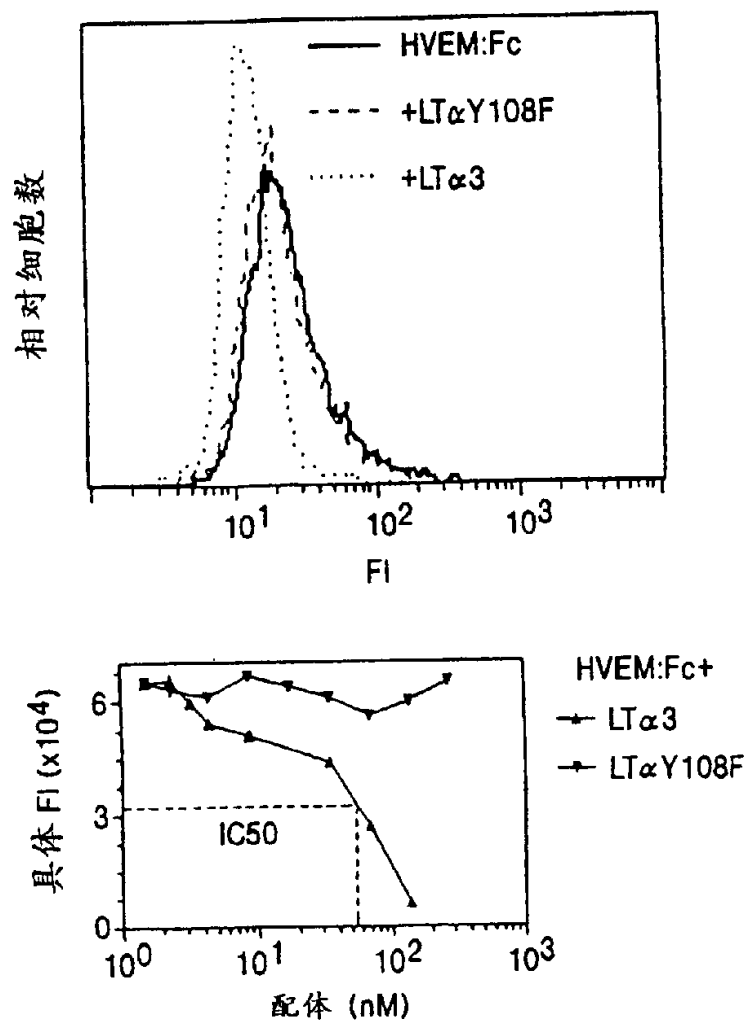


图 3

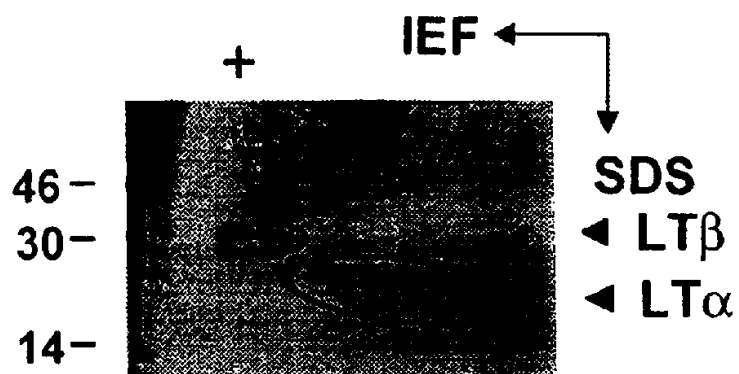


图 4A

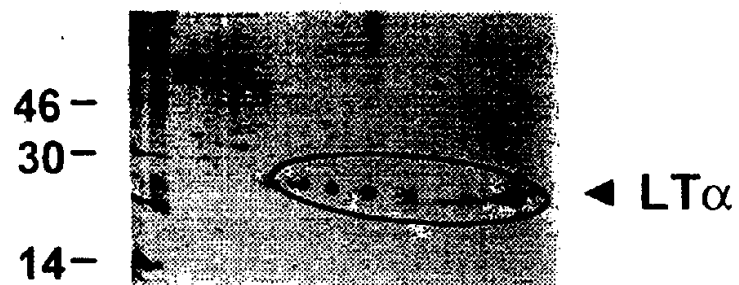


图 4B

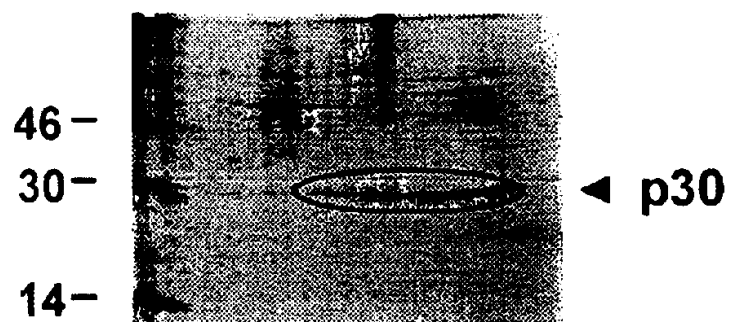


图 4C

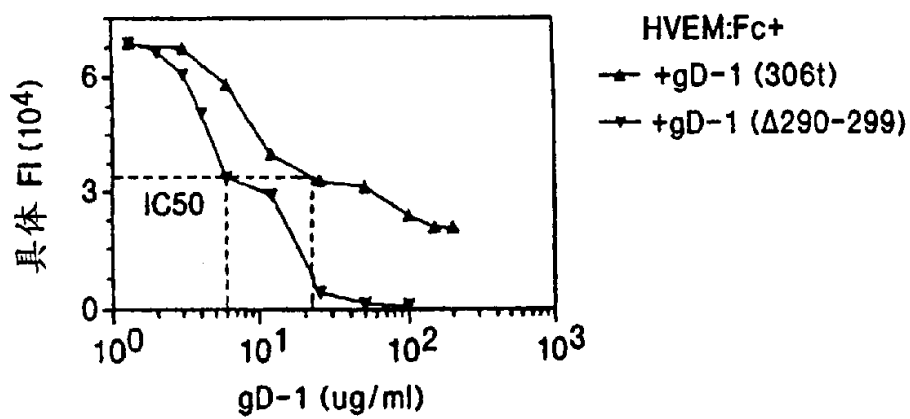
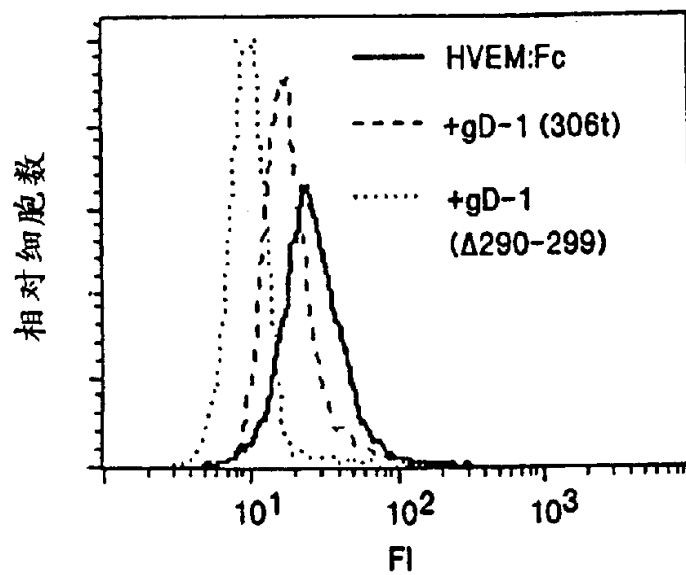
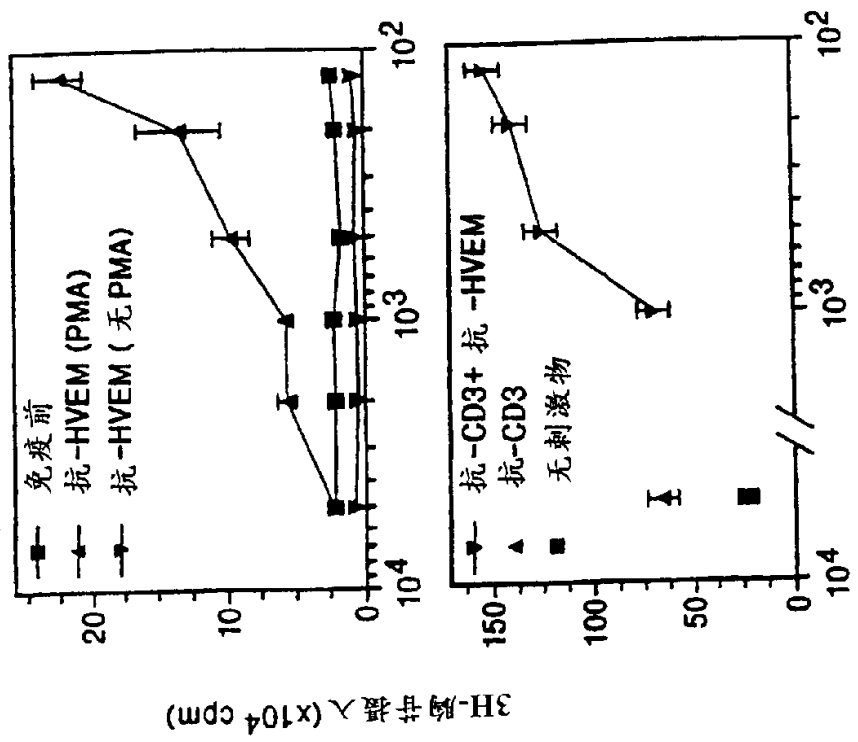


图 3



抗-HVEM 稀释度 ($1/x$)

图 6

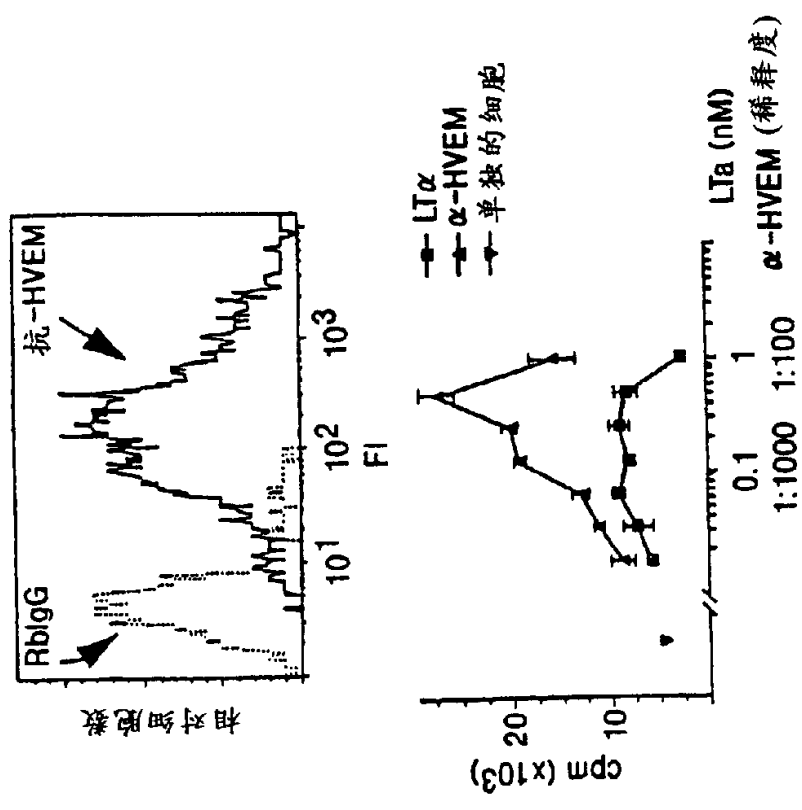


图 7