

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/11

C07K 14/525

A61K 38/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98809038.4

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1195849C

[22] 申请日 1998.9.11 [21] 申请号 98809038.4

[30] 优先权

[32] 1997. 9. 12 [33] US [31] 60/058,786

[32] 1998. 3. 26 [33] US [31] 60/079,384

[86] 国际申请 PCT/US1998/019191 1998.9.11

[87] 国际公布 WO1999/012965 英 1999.3.18

[85] 进入国家阶段日期 2000.3.10

[71] 专利权人 阿普泰克 R&D 公司

地址 瑞士日内瓦

[72] 发明人 J·茨乔普

审查员 唐 莉

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 1 页 说明书 37 页 附图 6 页

[54] 发明名称 APRIL - 具有生长效应的新的蛋白质

[57] 摘要

APRIL, 肿瘤坏死因子 (TNF) 家族的新成员,
修饰的 APRILs 以及包含它们的药物组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 抗体在制备用于如下用途的药物中的用途，

(a) 抑制肿瘤发生；

(b) 治疗肿瘤；

(c) 治疗癌症；

(d) 操纵免疫系统以治疗免疫性疾病；或

(e) 治疗增生，

其中所述抗体特异性地与 SEQ ID NO: 2 的 APRIL 多肽反应，并干扰 APRIL 多肽和其受体多肽之间的结合。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述抗体用于制备治疗增生的药物。

3. 权利要求 2 的用途，其中所述增生是类风湿性关节炎中的血管翳形成。

4. 权利要求 1 的用途，其中所述抗体用于制备治疗癌症的药物。

5. 权利要求 1 的用途，其中所述抗体用于制备治疗肿瘤的药物。

6. 权利要求 1 的用途，其中所述抗体用于制备抑制肿瘤发生的药物。

7. 权利要求 1 的用途，其中所述抗体用于制备操纵免疫系统以治疗免疫性疾病的药物。

8. 权利要求 1 的用途，其中所述抗体干扰 APRIL 配体多肽和其受体多肽之间的结合。

APRIL-具有生长效应的新的蛋白质

发明背景

本发明涉及是肿瘤坏死因子家族的成员的新的配体和多肽。新的配体命名为“增殖诱导配体”即 April。这些蛋白或它们的受体可具有抗癌和 / 或免疫调节应用。而且, 用这些新配体的基因转染的细胞可用于基因治疗来治疗肿瘤、自身免疫和炎症疾病或遗传病并且阻断这些蛋白的抗体可具有免疫调节应用。

发明背景

肿瘤坏死因子 (TNF) 相关的细胞因子是宿主防御和免疫调节的介质。此家族的成员以锚立在膜上的形式存在, 通过细胞间接触局部发挥作用或者作为能扩散到更远的目标的分泌蛋白存在。受体的平行家族标志着导致靶组织中细胞死亡或细胞的增殖和分化的这些分子的存在。目前, 配体和受体的 TNF 家族至少有 13 个可识别的受体 - 配体对, 包括: TNF:TNF - R; LT - α :TNF - R; LT - α/β :LT - β - R; FasL:Fas; CD40L:CD40;CD30L:CD30; CD27L:CD27; OX40L:OX40 和 4 - 1BBL:4 - 1BB; trance/rankL:Light and Tweak. 即使在最相关的实例中, 尽管氨基酸的相关性约是 50%, 编码这些配体的 DNA 序列仅有约 25 - 30% 的相同。

此细胞因子受体家族的明确的特征是通过两个不同的 TNF 受体的分子克隆首次揭示出的在富含半胱氨酸的细胞外结构域中发现的ⁱ。此基因家族编码带有细胞外配体结合结构域、单个跨膜区和参与激活细胞的功能的胞质区的糖蛋白特征的 I 型跨膜蛋白。富含半胱氨酸的配体结合结构域展示出依赖特殊的家族成员多次重复的紧密结合的二硫键连接的核心结构域。大多数受体有 4 个结构域, 尽管可以少到 3 个或者多到 6 个。

配体 TNF 家族中的蛋白的特征是通常含有几个认为是作为终止转

移序列的赖氨酸或精氨酸残基的一般较短的亲水氨基酸的短的 N- 端序列。下面跟着一个跨膜区和不同长度的将 C- 端受体接合结构域从膜分开的细胞外结构域。此结构域有时被称为“柄”（特征性高级结构）。C- 端结合结构域包含蛋白的主体并且经常但不总是含有糖基化位点。这些基因缺少经典的信号序列，其特征不在于位于细胞外的带有 C 端结构域的 I 型膜蛋白、II 型膜蛋白以及位于胞质内的短的 N- 末端。在某些情况下，如 TNF 和 LT- α ，在特征性高级结构内的裂解在蛋白加工过程中可提早发生并且随后发现配体主要是分泌形式。然而，大部分配体以膜的形式存在，介导定位信号。

这些配体的结构已经由 TNF、LT- α 和 CD40L 的晶体学分析而充分确定。TNF 和淋巴毒素- α (LT- α) 都是在带有“jelly roll”或“Greek key 拓扑结构”的两个反平行 β - 折叠的三明治结构中。C α 和 β 残基之间的均方根偏差是 0.61C，这提示它们在分子拓扑图上的高度相似性。由 CD40L、TNF 和 LT- α 的分子研究呈现出的结构特点是倾向于聚合成寡聚复合物。寡聚结构的本质是在相邻亚基的汇合处形成受体结合位点以产生多价配体。通过 TNF、CD40L 和 LT- α 的晶体结构分析表明它们的四级结构是以三聚体的形式存在。在不同的配体之间保守的许多氨基酸位于支架结构 β - 折叠的序列中。由于这些支架结构的部分在多种家族成员中是保守的，因此在所有这些分子中保留这种基本的三文治结构是可能的。由于亚基构象可能保持相似，四级结构也可维持。

TNF 家族成员最好可描述成控制细胞存活和分化的免疫系统中的总开关。与 TNF 家族的其它主要的锚定在膜上的成员相反，目前只有 TNF 和 LT α 被认为是分泌型细胞因子。尽管 TNF 的膜形式已被鉴定出并且可能具有独特的生物学功能，分泌型 TNF 作为一般警报信号从触发事件的部位向更远的细胞发挥作用。因此，TNF 分泌可扩大事件导致脉管系统内壁已充分描述的改变以及细胞的炎症状态。相反的是，该家族的膜结合成员通过 TNF 型受体仅仅向直接接触的细胞发送信号。例如 T 细胞只向那些通过同源的 TCR 相互作用导致直接接触的 B

细胞提供 CD40 介导的“帮助”。能够诱导细胞死亡的相似的细胞与细胞接触的限制可应用于充分研究的 Fas 系统。

看来可根据 TNF 诱导细胞死亡的能力（表 III），可将 TNF 配体分为三组。首先，TNF、Fas 配体和 TRAIL 可有效地诱导许多细胞系的细胞死亡而且它们的受体大部分可能具有好的典型的死亡结构域。DR-3 (TRAMP/WSL-1) 的配体也可能属于此类型。其次是那些仅在少数细胞类型中触发更弱的死亡信号的配体并且 TWEAK、CD30 配体和 LT α 1 β 2 是这一类型的实例。这组配体如何在缺乏典型的死亡结构域的情况下触发细胞死亡是个令人感兴趣的问题并且这提示有独立的更弱的死亡信号机制存在。最后是那些不能有效地传递死亡信号的成员。可能所有组配体都对某些细胞类型具有抗增殖效应并随后诱导细胞分化如 CD40 (Funakoshi 等, 1994)。

近年来 TNF 家族迅速扩充，包括参与免疫系统调节的至少 11 种不同的信号通路。TWEAK 和 TRAIL 的广泛的表达模式提示此家族中仍有更多的功能变化应揭示。最近这一点在影响劳斯肉瘤病毒和单纯疱疹病毒的复制能力的两个受体的发现中以及 TNF 具有抗病毒能力和痘病毒编码引诱物 TNF 受体的以往观察中已特别地强调 (Brojatsh 等, 1996; Montgomery 等, 1996; Smith, 1994; Vassalli, 1992)。TNF 是败血症休克和恶病质的介质ⁱⁱⁱ，并且参与造血细胞发育的调节^{iv}。作为炎症和抵抗细菌、病毒和寄生虫感染的介质^v，TNF 发挥主要作用并且具有抗肿瘤活性^{vi}。TNF 还与多种自身免疫疾病有关^{vii}。TNF 可由几种细胞产生，包括巨噬细胞、成纤维细胞、T 细胞和自然杀伤细胞^{viii}。TNF 与两种不同的受体结合，每种都通过特异的细胞内信号分子起作用，因此形成 TNF 的不同效应^{ix}。TNF 可以膜结合形式存在，也可作为可溶的分泌型细胞因子存在^x。

LT- α 具有多种与 TNF 相同的活性，即与 TNF 受体结合^{xi}，但是不象 TNF，LT- α 表现为主要由激活的 T 细胞和一些 β -类淋巴细胞肿瘤分泌^{xii}。LT- α 和 LT- β 的异数复合物是与 LT- β 受体结合的膜结合复合物^{xiii}。由于 LT- β 的遗传破坏导致脾脏中 T 和 B 细胞的结构

破坏及淋巴结的缺失, LT 系统 (LTs 和 LT-R) 表现为参与周围淋巴器官的发育^{xiv}。LT- β 系统也参与某些腺癌细胞系的细胞死亡^{xv}。

TNF 家族的另一个成员 Fas-L 主要在活化的 T 细胞上表达^{xvi}。它通过所知的程序性细胞死亡或凋亡的机制诱导具有其受体的细胞包括肿瘤细胞和 HIV-感染的细胞死亡^{xvii}。而且, Fas 或 Fas-L 缺陷可引起淋巴增殖紊乱, 这证实了 Fas 系统在免疫应答调节中的作用^{xviii}。Fas 系统还参与慢性肝炎感染引起的肝脏损伤^{xix}和 HIV 感染的病人的自身免疫^{xx}。Fas 系统还参与 HIV 病人的 T 细胞破坏^{xxi}。此家族中的另一成员 TRAIL 也参与不同来源的多种转化细胞系的死亡。

TNF 家族的另一成员 CD40-L 在 T 细胞上表达并诱导调节具有 CD40 的 B 细胞^{xxiii}。而且, CD40-L 基因的改变引起已知的疾病 X-连锁的高 IgM 综合症^{xxiv}。CD40 系统也参与多种自身免疫性疾病^{xxv}并且已知 CD40-L 具有抗病毒性质^{xxvi}。尽管 CD40 系统参与拯救凋亡的 B 细胞^{xxvii}, 在非免疫细胞中它诱导凋亡^{xxviii}。许多其它的 TNF 家族的淋巴细胞成员也参与共同刺激^{xxix}。

一般地, TNF 家族的成员在控制免疫系统和活化急性宿主防御系统中具有重要调节作用。考虑到目前在操作 TNF 家族的成员用于治疗中获得了进展, 此家族的成员可提供控制疾病的独特的方法是可能的。该家族的某些配体可直接诱导许多转化的细胞如 LT、TNF、Fas 配体和 TRAIL (Nagata, 1997) 的凋亡。Fas 和可能的 TNF 及 CD30 受体的激活能发挥免疫调节功能诱导非转化淋巴细胞死亡 (Amakawa 等, 1996; Nagata, 1997; Sytwu 等, 1996; Zheng 等 1995)。一般而言, 死亡是在位于 TNF 受体胞质一侧的死亡结构域聚集之后触发的。死亡结构域组织引起 Caspase 级联激活的多个信号转导成分集合起来

(Nagata, 1997)。一些受体缺少典型的死亡结构域, 如 LT β 受体和 CD30 (Browning 等, 1996; Lee 等, 1996) 尽管作用更微弱, 但还能诱导细胞死亡。尽管如在 CD30 裸鼠上的研究表明胸腺负选择中起死亡作用一样这种情况不清楚, 这些受体的主要功能是诱导细胞分化而且在某些转化的细胞系中死亡是反常的后果是可能的 (Amakawa 等,

1996)。相反地,需要通过其它通路如 CD40 的信号来维持细胞存活。因此,需要识别和鉴定 TNF 家族成员的其它分子从而提供控制疾病和调控免疫系统的其它方法。

已表明 TNF 家族的某些成员可提供治疗的抗肿瘤利益,例如与 IL-2 结合。(见,例如 U.S 5,425,940)然而,尚不知道用于癌症的完全满意的疗法。组合化疗普遍应用于临床和研究中,如应用抗代谢物、烷化剂、抗生素、一般毒物等。单独或联合施用这些药物以获得对癌症的细胞毒效应、和/或减少或消除抗药细胞的出现,以及降低副作用。

发明概述

因此,本发明涉及显著地避免了相关领域的局限和缺点引起的一个或多个问题的、被称为 APRIL 的新的多肽。发明者已发现了细胞因子 TNF 家族的新成员并且明确了这种蛋白的人和鼠的氨基酸序列以及编码这些蛋白的 DNA 序列。申请的发明可用来确立用于如下面更为详细讨论的许多疾病和病症的新的诊断和治疗以及获得关于免疫系统及其过程的信息并操纵之。另外,本发明还参与癌中细胞死亡的诱导。

本发明的其它特点和优点将在后面的描述中论及,其中部分从描述中可以看出是明显的或者可通过本发明的实践而了解到。通过所写的描述及其权利要求以及附图中特别指出的组合物和方法可认识和获得本发明的目标和其它优点。

因此,为获取这些或其它优点并与本发明的目的一致,如此处收录并广泛描述的,本发明包括编码 APRIL 的 DNA 序列。具体地,本发明涉及编码人 APRIL 的 DNA 序列 (SEQ. ID. NO. 1)。另外,申请专利的发明涉及这种新的配体的氨基酸序列。人的 APRIL 氨基酸序列见 SEQ. ID. NO. 2 中所示。另外,发明者在此处显示了鼠 APRIL 的 DNA 和氨基酸序列,分别见 SEQ. ID. NOS. 3 和 4 中所示。在其它实施方案中,本发明涉及当与申请专利保护的 DNA 序列或其片段杂交时,与编码此配体的 C 端受体结合结构域的 DNA 序列具有至少 50%同源性的序列和编

码带有 SEQ.ID.NO.1 中确定的序列的 APRIL 或具有相似的生物学活性的蛋白的序列。

本发明的某些实施方案进一步涉及编码其序列与表达控制序列可操作连接的 APRIL 的 DNA 序列。任何合适的表达控制序列可用于申请专利的本发明并且易于由本领域技术人员进行选择。

本发明还包括含有编码 APRIL 或其片段的序列的重组 DNAs 以及将稳定整合的 APRIL 序列导入其基因组或具有游离基因元件的宿主。任何合适的宿主可用于本发明并且易于由本领域技术人员进行选择而无需过多试验。

在其它的实施方案中，本发明涉及包括有培养转化的宿主的步骤的产生基本上纯 APRIL 的方法。又一些其它实施方案中，本发明涉及基本上不含正常有关的动物蛋白的 APRIL。

本发明包括具有 SEQ.ID.NO.2 中确定的氨基酸序列的 APRIL 配体和其片段或同系物。在不同的实施方案中，氨基酸和 / 或 DNA 序列可含有如下面进一步明确的保守插入、缺失和替换或者含有所述序列的片段。

其它实施方案中本发明涉及含有 APRIL、可用于直接触发 APRIL 介导的药理学事件的可溶的构建体。这些事件在刺激生长、治疗癌症、肿瘤或者用于治疗免疫性疾病的免疫系统调节中具有有用的治疗学优点。申请专利的配体的可溶形式可再进行遗传工程操作与容易识别的标记结合，从而有利于鉴定这些配体的受体。

另外，某些实施方案涉及抗 APRIL 的抗体以及它们治疗癌症、肿瘤或操纵免疫系统以治疗免疫性疾病的用途。

本发明的其它实施方案涉及如此处公开并申请专利保护的应用 APRIL 基因的基因治疗方法。

本发明的药物制剂可选择地包括药学上可接受的载体、佐剂、填充剂或其它药物组合物而且可以本领域中已知的多种形式或途径中的任一种给药。

可理解的是前面的一般描述和后面的详细描述都是示范性和说明

性质的并且如申请专利保护的，打算提供本发明的进一步说明。

为更进一步理解本发明，详细说明中包括并引用了附图并且成为其中一部分用来图解说说明本发明的几个实施方案，并且与描述一起用来解释本发明的原理。

附图简述

图的说明

图 1. (A)预测的人 APRIL 氨基酸序列。表示了预测的重组的可溶性 APRIL(sAPRIL)的跨膜区(TM, 框起来的), 潜在的 N-连接的糖基化位点(星号)和 N 末端。(B)APRIL 的细胞外蛋白序列和 TNF 配体家族的某些成员的比较。黑框和阴影框内分别表示了相同的和同源的残基。TNF α , 肿瘤坏死因子 α , LT α , 淋巴毒素 α , FasL, Fas(CD95)配体, TRANCE, RANK 配体。

图 2. APRIL 的表达 (A)用 APRIL cDNA 作为探针的不同的人组织的 Northern 印迹杂交(每泳道 2 μ g polyA⁺RNA)。 (B)不同肿瘤细胞系中的 APRIL mRNA 表达: 早幼粒细胞白血病 HL60; Hela 细胞 S3; 慢性骨髓性白血病 K562; 成淋巴细胞白血病 Molt-4; 伯基特淋巴瘤 Raji; 结肠直肠癌 A459; 黑色素瘤 G361。 (C)四种不同的人肿瘤(T)和正常组织(N)中的 APRIL mRNA 表达。18S rRNA 带表示加样相等。 (D)原发性结肠癌中的 APRIL mRNA 表达。原位杂交显示与正常结肠组织相比, 人结肠癌中 APRIL 信息丰富。结肠肿瘤组织切片和相邻的正常结肠组织与反义 APRIL ³⁵S-标记的 cRNA 杂交, 而且结肠肿瘤组织还与正义 APRIL ³⁵S cRNA 杂交作为对照(负对照)。上面的图是暗视野的显微照片, 下面的图是相对的亮视野的显微照片。

图 3. APRIL 刺激细胞生长。 (A)如加入可溶的 APRIL 24 小时后测定的 Jurkat(人白血病 T 细胞)增殖的剂量依赖增长。对照组是 Fas 配体(FasL)、TWEAK 及无配体(空白对照)(左图, 细胞生存力; 右图, ³H-胸腺嘧啶核苷掺入)。 (B) FLAG-标记的 APRIL 对肿瘤细胞生长的免疫耗竭的影响。FLAG-标记的 APRIL 的增殖效应被抗-FLAG 的抗体中和,

但不被抗 - myc 的抗体中和。(C)APRIL 对 Raji (人伯基特淋巴瘤 B 细胞), A20 细胞 (小鼠 B 淋巴瘤), BJAB (人 B 淋巴瘤), COS (犬上皮细胞), MCF-7 (人乳腺癌), HeLa (人上皮样癌) 和 ME260 (人黑色素瘤) 增殖速度的影响。(D) 胎牛血清浓度对 APRIL 诱导的 Jurkat 细胞增殖的影响。

图 4. APRIL 加速肿瘤生长。(A)APRIL 转染的 NIH-3T3 克隆的鉴定。应用抗 - FLAG 抗体通过 Western 印迹杂交分析不同克隆的 FLAG - APRIL 水平。非特异检测高分子量蛋白, 箭头所指的是 APRIL 蛋白。

(B) 表达 APRIL 的 NIH-3T3 克隆比模拟转染的克隆生长快。(C) 表达 APRIL 的 NIH-3T3 克隆的肿瘤生长增加。给裸鼠皮下注射 NIH-3T3 细胞 (1×10^5 个细胞) 和 APRIL (NIH-AP, 2 个不同的克隆) 转染子 (1×10^6 个细胞) 并监测肿瘤生长。

图 5. 排列人和小鼠 APRIL 氨基酸序列表明两种蛋白之间广泛的一致性。相同的残基用上面的点标记。下划线的残基代表潜在的 N-连接的糖基化位点。开始的蛋氨酸被认为是可能的起始位点, 然而, 更上游的阅读框内蛋氨酸可能是实际起始位点, 例如在人的序列中。

详细描述

现在详细介绍本发明的优选的实施方案。本发明涉及编码人或小鼠 APRIL 的 DNA 序列、片段及其同系物以及用它们转化的宿主中那些 DNA 序列的表达。本发明涉及这些 DNA 序列和他们编码的多肽的应用。另外, 本发明包括 APRIL 或其片段人和小鼠的氨基酸序列以及含有它们或从它们衍生的药物组合物。本发明涉及用 APRIL 刺激细胞生长的方法, 或者, 选择性地, 应用直接抗 APRIL 抗体或 APRIL 受体抑制肿瘤发生的方法。

A. 定义

此处所用的“同源的”指的是相比较的分子序列之间的序列相似性。当相比较的两个序列中的某一位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚基占据时, 如两个 DNA 分子中的某一位置都被腺嘌呤占据, 那么在

那一位置分子是同源的。两序列之间同源性的百分比的函数是两序列共有的匹配或同源位置数目除以相比较的位置数目再乘以 100。例如，如果两序列中 6/10 的位置是匹配的或同源的，那么两序列是 60% 同源。例如，DNA 序列 ATTGCC 和 TATGGC 是 50% 同源。一般地，在两序列进行序列排列对比给出最大同源性时进行比较。

如此处所用的，术语“癌症”指任何肿瘤疾病，包括如细胞疾病，例如肾细胞癌、卡波西肉瘤、慢性白血病、乳腺癌、肉瘤、卵巢癌、直肠癌、咽喉癌、黑色素瘤、结肠癌、膀胱癌、肥大细胞瘤、肺癌、乳房腺癌、咽鳞状细胞癌和胃肠或胃癌。优选地，癌症为白血病、肥大细胞瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、乳房腺癌和咽鳞状细胞癌。

如此处所用的多肽的“纯化制剂”或“基本上纯化的制剂”指的是从它自然产生时带有的其它蛋白质、脂类和核酸分离出的多肽。优选地，多肽也可从用于纯化它的其它物质如抗体、基质等分离。

此处所用的“转化的宿主”指的是包括带有导入其基因组的稳定整合的序列即编码 APRIL 序列的任意宿主。

如此处所用的“治疗”包括任意治疗学上的治疗，如施用治疗剂或物质，如药物。

“基本上纯的核酸”，如基本上纯的 DNA 是满足下面一点或两点的核酸：(1) 不与一个或两个序列如在核酸来源的有机体的自然出现的基因组中直接邻接的编码序列直接邻接的（即一个在 5' 端一个在 3' 端）；或者 (2) 基本上没有在核酸来源的有机体中出现的核酸序列。此术语包括，例如整合入载体如自我复制质粒或病毒或者原核细胞或真核细胞的基因组 DNA 的或者以不依赖于其它 DNA 序列的独立的分子（如 PCR 或限制性内切酶处理产生的 cDNA 或基因组 DNA 片段）存在的重组 DNA。基本上纯的 DNA 还包括是编码 APRIL 的杂合基因的部分的重组 DNA。

在此，术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”可互换使用。

此处所用的“生物学活性”指可直接或间接表现出的体内或体外活性。APRIL 的生物学活性片段可具有，例如与 APRIL 活性位点 70%

的氨基酸同源性，更优选地至少 80% 以及最优选地至少 90% 的同源性。与 APRIL 的一致性 or 同源性在此定义为候选序列中与 SEQ. ID. NOS. 2 或 4 中的 APRIL 残基一致的氨基酸残基的百分比。

此处所用的“配体”一般指 APRIL。除非另有指出，本发明的实践采用本领域技术中细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的传统技术。这些技术的描述见文献。

引言

在此详细描述了 TNF 家族的新成员 APRIL。发明者发现，尽管正常组织中 APRIL 的转录物是低量的，但在几种肿瘤细胞系中以及结肠癌、转移性淋巴瘤和甲状腺肿瘤中检测到高水平的 mRNA。在体外，加入重组 APRIL 刺激了不同细胞系的增殖。而且，相比于模拟转染子，将 APRIL 转染入 NIH-3T3 细胞显著加速了裸鼠的肿瘤生长。APRIL 在体外和体内的表达和对肿瘤细胞的生长刺激效应表明 APRIL 与肿瘤发生有关联。

由于 APRIL 在肿瘤细胞中大量表达并且刺激许多不同肿瘤细胞系的生长，因此看来它在 TNF 家族成员中是独特的。考虑到 APRIL 的明显作用是肿瘤发生，APRIL 的拮抗性抗体或 APRIL 受体将提供癌症治疗的新方法。

B. 本发明的 DNA 序列

如此处所描述的，本发明的一方面特征是包括编码 APRIL 的核苷酸序列如 SEQ. ID. NO. 1 中描述的 DNA 和 / 或这些核酸的等价物的基本上纯的 (重组的) 核酸。此处所用的术语核酸可包括片段和等价物，例如编码功能上等价的肽的序列。等价核苷酸序列可包括由于一个或多个核苷酸替换、添加或缺失如等位基因变异体、突变等而不同的序列以及由于遗传密码简并而与 SEQ. ID. NO:1 中所示的编码 APRIL 的核苷酸不同的序列。

尽管本领域技术人员会理解到小鼠的或来自其它物种的编码的 APRIL 与人的具有高度同源性的序列也包含在这里，但对本发明进行

的一般性描述参考的是人的序列。人的蛋白表现出具有 TNF 家族的所有特征，即，II 型膜蛋白的有机构成和将蛋白折叠成 TNF 反平行 β - 折叠结构的序列基序的保守性。

本发明的序列可用于制备一系列 DNA 探针，用于筛选多种天然和合成的 DNA 集合中那些与 APRIL 或其片段或其衍生物密切相关的 DNA 序列的存在。本领域技术人员将认识到此处所介绍的 APRIL 也指的是其生物学活性衍生物、片段或同系物。

本发明的 APRIL 编码 DNA 序列可用于产生在用它们转化的不同的原核和真核宿主中表达的专利的肽。这些肽可用于抗癌和免疫调节应用。一般而言，这包括培养用含有编码 APRIL 的 DNA 分子转化宿主的步骤、该分子与表达控制序列可操作连接。

本发明的 DNA 序列和重组 DNA 分子可用多种宿主/载体组合来表达。例如，有用的载体可包括染色体、非染色体或合成 DNA 序列的区段。本发明的表达载体的特征在于为了控制和调节 DNA 序列的表达，用至少一种可与插入载体的 APRIL DNA 序列可操作连接的表达控制序列。

而且，在每一个表达载体内，可选择不同的位点插入本发明的序列。这些位点通常由切割它们的限制性内切酶命名，而且本领域技术人员已充分认识了这些位点和内切酶。当然可理解的是，本发明中有用的表达载体不需具有用于插入所需 DNA 片段的限制性内切酶位点。而是采用其它方法将片段克隆入载体。表达载体，特别是其位点是选择用于插入选择的 DNA 片段以及与表达控制序列与它可操作连接，是由多种因素来决定的。这些因素包括但不限于，表达蛋白的大小、目的蛋白对宿主细胞酶的蛋白水解降解的易感性、易受特定的内切酶作用的位点数目、被纯化过程中证实难以去除的宿主蛋白污染或与表达的蛋白结合。其它可被考虑的因素包括表达特征如起始和终止密码子相对于载体的位置和其它为本领域技术人员所认识的因素。关于申请专利保护的 DNA 序列的载体和插入位点的选择根据权衡这些因素而确定，不是所有选择对目的应用同等有效。然而，对于本领域技术人员

分析这些参数并选择出根据特殊的应用而定的合适系统是常规工作。

本领域技术人员可方便地对表达控制序列进行适当的修饰以获得高水平的蛋白表达，即通过替换密码子或选择那些被特定的有机体优选利用的特殊氨基酸的密码子以便使蛋白水解降到最低或者改变糖基化组成。同样，可将半胱氨酸换成其它氨基酸以使产生、重折叠或稳定问题简单化。

因此，不是所有宿主/表达载体组合在表达本发明的 DNA 序列中等效发挥作用。然而，本领域技术人员可对宿主/表达载体组合进行具体选择。可考虑的因素包括，例如宿主与载体的相容性，对 DNA 序列编码的蛋白对宿主的毒性、回收目的蛋白的容易程度、DNA 序列和与其可操作连接的表达控制序列的表达特征、目的蛋白的生物安全性、耗费和折叠、形式或其它必需的表达后修饰。

由用本发明的序列转化的宿主产生的 APRIL 以及根据本发明的处理纯化的天然 APRIL 或者从申请专利保护的氨基酸序列产生的 APRIL 可用于抗癌、抗肿瘤和免疫调节的多种组合物和方法中。它们也可用于在其它疾病的治疗和方法中。

本发明还涉及在此公开的 DNA 序列用于在异常条件下，即基因治疗情况下表达 APRIL 的用途。另外，在对于某些应用合适的启动子的引导下，APRIL 也可在肿瘤细胞中表达。这种表达可增强抗肿瘤免疫应答或直接影响肿瘤的存活。通过改变局部免疫应答，APRIL 还可能影响移植器官的存活。这种情况下，移植物本身或周围的细胞可被编码 APRIL 的工程基因修饰。

本发明的另一方面涉及“抗原”疗法中编码任何 APRIL 的分离的核酸的用途。如此处所用的，“反义”治疗是指给予或原位产生在细胞环境下，与细胞 mRNA 和 / 或编码目标 APRIL 序列的 DNA 特异性杂交的寡核苷酸或其衍生物，以便抑制编码的蛋白的表达，即通过抑制转录和 / 或翻译。可通过经典的碱基对互补性结合或者例如，就与 DNA 双螺旋结合而言是通过与双螺旋大沟间的特异的相互作用。一般地，“反义”疗法指本领域普遍采用的一系列技术并包括依赖于与寡核苷

酸序列特异结合的任何疗法。

本发明的反义构建体可作为如表达质粒运送，当其移入细胞时，产生与编码 APRIL 的细胞 mRNA 的至少一部分互补的 RNA。选择性地，反义构建体可以是在体内产生的寡核苷酸探针。这些寡核苷酸探针是优选修饰的对内源核酸酶有抗性的寡核苷酸，因此在体内是稳定的。用作反义寡核苷酸的代表性核酸分子是 DNA 的磷酰胺化合物磷酰胺化合物、磷硫醇盐和甲基磷酸酯类似物（见如 5,176,996；5,264,564；和 5,256,775）。另外，反义疗法中有用的寡聚体的一般方法已有评论，具体地在此引用作为参考的有 Van Der Krol 等，(1988) 生物技术 6:958 - 976；和 Stein 等 (1988) 癌症研究 48:2659 - 2668。

C. APRIL 和其氨基酸序列

如上面讨论的 APRIL 是 TNF 家族的成员。APRIL 蛋白、片段或其同系物可能具有广泛的如下文中更详细讨论的治疗和诊断应用。

尽管 APRIL 精确的三维结构不清楚，预测其作为 TNF 家族的成员，可能具有本家族的其他成员共有的某些结构特征。

申请专利保护的 APRIL 序列与人 TNF 家族的其它成员的对比揭示了大量的结构相似性。在细胞外结构域，所有蛋白都具有几个序列保守区。APRIL 的细胞外结构域整个序列的同源性表现出：与 FasL 的同源性最高（21% 氨基酸一致）、与 TNF α （20%）、与 LT- β （18%）、然后是 TRAIL、TWEAK 和 TRANCE（15%）。图 2。

本发明的新的多肽与一种尚未被鉴定的受体发生特异性相互作用。然而，在此公开的肽和方法使与 APRIL 或其片段特异地相互作用的受体的鉴定成为可能。

某些实施方案中申请专利的发明包括来源于能与其受体结合的 APRIL。可以几种方法产生 APRIL 片段如重组、PCR、蛋白水解消化或化学合成方法。可通过从编码多肽的核酸分子的一端或两端去除一个或多个核苷酸产生多肽的内部或末端片段。表达诱变处理的 DNA 产生多肽片段。

也可采用本领域已知的技术如传统的 Merrifield 固相 f-moc 或

t-boc 化学合成法合成多肽片段。例如, 可将本发明的肽和 DNA 序列任意分为没有片段重叠的所需长度的片段或者分为所需长度的重叠片段。下文中更详细地描述了这些方法。

D. 产生 APRIL 的可溶形式

APRIL 的可溶形式通常能有效地发出信号并因此可作为目前模拟天然膜形式的药物应用。可能此处申请专利保护的 APRIL 天然就是作为可溶的细胞因子分泌的, 然而, 如果不是这样, 可对基因再操作基因来迫使分泌。为产生 APRIL 的可溶的分泌形式, 可以在 DNA 水平去除 N-末端跨膜区和特征性高级结构区的某部分并且将它们换成允许在选择的表达系统中有效地蛋白水解切割的 I 型或 II 型前导序列。技术人员可改变分泌表达构建体中保留的特征性高级结构的数量以优化受体结合性质和分泌效率。例如, 可制备含有所有可能的特征性高级结构长度的构建体即 N-端截体以便产生从氨基酸 81 到 139 的蛋白质。由这种类型分析可产生最理想长度的特征性高级结构序列。

E. 与 APRIL 反应的抗体的产生

发明还包括与 APRIL 或其受体特异性反应的抗体。可采用常规方案制备抗蛋白/抗肽的抗血清或单克隆抗体(见例如, 抗体: 实验室手册, Harlow 和 Lane 编辑(冷泉港出版社:1988)。可用肽的免疫原性形式免疫哺乳动物如小鼠、仓鼠或家兔。将免疫原性赋予蛋白或肽的技术包括与载体结合或本领域熟知的其它技术。

可在存在佐剂的情况下施用 APRIL 的免疫原性部分或其受体。可通过检测血浆或血清中的抗体效价来监测免疫进程。将免疫原作为抗原利用常规的 ELLSA 或其它免疫分析方法来评估抗体的水平。

优选的实施方案中, 本主题抗体对 APRIL 的抗原决定簇或其受体, 如 SEQ. ID. NO. :2 的多肽抗原决定簇或者密切相关的人或非人哺乳动物同系物(如 70, 80 或 90% 同源的, 更优选地至少 95% 同源的)具有免疫特异反应性。本发明的又一更优选的实施方案中, 抗 APRIL 或抗 APRIL 受体抗体与蛋白如与 SEQ. ID. NO. 2 的同源性小于 80%; 优选地小于 90% 并且最优选地小于 95% 的蛋白没有明显的交叉反应(即特异

地反应)。“无明显交叉反应”意味着抗体与非同源蛋白的结合亲和性小于与 SEQ. ID. NO. 2 蛋白的结合亲和性的 10%，更优选地小于 5%以及甚至更优选地小于 1%。

此处所用的术语抗体用来包括也与 APRIL 或其受体发生特异反应的抗体片段。可采用传统的技术使抗体片段化并且按上面所描述的与用于完整抗体相同的方式筛选片段进行应用。例如，可通过用胃蛋白酶处理抗体来产生 $F(ab')_2$ 片段。可处理得到的 $F(ab')_2$ 片段还原二硫键产生 Fab' 片段。本发明的抗体还包括具有抗 APRIL 或抗 APRIL 受体活性的生物特异性和嵌合分子。因此，APRIL 和其受体的单克隆和多克隆抗体 (Ab) 以及抗体片段如 Fab' 和 $F(ab')_2$ 可用来阻断 APRIL 和其各自的受体的作用。

也可利用常规的重组 DNA 技术制备多种形式的抗体(具体地在此引用作为参考，Winter 和 Milstein, 自然 349:293 - 299(1991))。例如，可将来自动物抗体的抗原结合区与人的恒定区连接来构建嵌合抗体(如 Cabilly 等, 美国 4,816,567, 在此引用作为参考)。当用于人的临床治疗时，嵌合抗体可降低由动物抗体引发的所观察到的免疫原性反应。

另外，可合成识别 APRIL 或其受体的重组的“人源化抗体”。人源化抗体是含有大部分人 IgG 序列的插入了负责特异抗原结合结构域的嵌合体。用目的抗原免疫动物、分离相应的抗体并且去除负责特异抗原结合的可变区序列。将动物来源的抗原结合结构域克隆入抗原结合结构域已被缺失的人抗体基因的合适位置。人源化抗体最大限度地减少了人抗体中异源的(即种间)序列的应用，并且，因此引发受试患者免疫应答的可能性小。

也可通过制备含有从不同类型的免疫球蛋白分离的可变区和人恒定区(CH1, CH2, CH3)的嵌合或人源化抗体来实现不同类型的重组抗体的构建。例如，可通过将抗原结合位点克隆入携带人的链恒定区的载体中重组产生具有增加的抗原结合位点效价的抗体(Arulanandam 等, J. Exp. Med. 177:1439 - 1450(1993)，在此引用作为参考)。

另外，可通过改变抗原结合位点附近的氨基酸残基采用常规的重组 DNA 技术改变重组抗体与其抗原的结合亲和性。可通过以分子模拟为基础的诱变来增加人源化抗体的抗原结合亲和性(Queen 等，美国国家科学院院报 86:10029-33(1989)，在此引用作为参考)。

F. 类似物的产生：改变的 DNA 和肽序列的产生

APRIL 类似物与天然存在的配体在氨基酸序列上有所不同，或者不涉及序列的其它方面有所不同，或者两者都不相同。非序列修饰包括 APRIL 在体内或体外的化学衍生作用。非序列修饰包括但不限于乙酰化、甲基化、磷酸化、羧基化或糖基化改变。

优选的类似物包括 APRIL 或其生物学活性片段，它的序列通过一个或多个保守的氨基酸替换或者不消除 APRIL 生物学活性的一个或多个非保守氨基酸替换、缺失或插入而与 SEQ. ID. NO. 2 所给的序列不同。保守替换典型地包括一个氨基酸被另一个有相似特征的氨基酸替换，如下面各组替换：缬氨酸，甘氨酸；甘氨酸，丙氨酸；缬氨酸，异亮氨酸，亮氨酸；天冬氨酸，谷氨酸；天冬酰胺，谷氨酰胺；丝氨酸，苏氨酸；赖氨酸，精氨酸；和苯丙氨酸，酪氨酸。

表 1
保守性氨基酸置换

对于氨基酸	代码	以下列任一者置换:
丙氨酸	A	D-Ala, Gly, β -Ala, L-Cys, D-Cys
精氨酸	R	D-Arg, Lys, D-Lys, 高-Arg, D-高-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
天冬酰胺	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
天冬氨酸	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
半胱氨酸	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
谷氨酰胺	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
谷氨酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
甘氨酸	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, -Ala, Acp
异亮氨酸	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
亮氨酸	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met

赖氨酸	K	D-Lys, Arg, D-Arg, 高-arg, D- 高 -Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
甲硫氨酸	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
苯丙氨酸	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-多巴, His, D-His, Trp, D-Trp, 反式-3, 4 or 5-苯基脯氨酸, cis-3, 4. or 5-苯基脯氨酸
脯氨酸	P	D-Pro, L-l- 噻唑烷 -4-羧酸, D-或L-l-噻唑烷 -4-羧酸
丝氨酸	S	D-Ser, Thr, D-Thr, 别-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
苏氨酸	T	D-Thr, Ser, D-Ser, 别-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
酪氨酸	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-多巴, His, D-His
缬氨酸	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

用于诱变的有用的方法包括下文详细描述 PCR 诱变和饱和诱变。也可通过合成一组简并寡核苷酸序列产生随机的氨基酸序列变异体文库。

- PCR 诱变

PCR 诱变中, 降低 Taq 聚合酶保真性可用来将随机突变导入 DNA 克隆的片段 (Leung 等, 1989, 技术 1:11 - 15)。这是导入随机突变的很有效且相对迅速的方法。在降低用 Taq DNA 聚合酶合成 DNA 的保真性的条件下, 如采用比率为 5 的 dGTP/dATP 并向 PCR 反应中加入 Mn^{2+} , 用聚合酶链式反应 (PCR) 可扩增要诱变的 DNA 结构域。可将扩增的 DNA 片段集合插入合适的克隆载体以提供随机突变体文库。

- 饱和诱变

饱和诱变可使大量单个碱基替换快速导入克隆的 DNA 片段 (Mayers 等, 1985, 科学 229:242)。此技术包括产生突变如通过对单链 DNA 进行化学处理或照射射线, 并合成互补 DNA 链。可通过调节处理的程度来调节突变频率而且可获得基本上所有可能的碱基替换。由于此方法不涉及对突变体片段的遗传选择, 可获得中性替换以及通过 DNA 随机诱变制备的改变蛋白功能的替换。点突变的分布不偏向保守序列元件。

- 简并寡核苷酸

也可从一组简并寡核苷酸序列产生同系物文库。在 DNA 自动合成仪中进行简并序列的化学合成并且随后将合成的基因与合适的表达载体连接。本领域已知简并寡核苷酸的合成^{xxx}。这些技术已用于其它蛋白的定向进化^{xxxi}。

非随机或定向诱变技术可用来提供特异结构域中的特异序列或者突变。采用这些技术产生的变异体包括如蛋白的已知氨基酸序列残基的缺失、插入或替换。可对突变位点进行个别或一系列的修饰, 如通过 (1) 首先用保守氨基酸替换然后根据取得的结果用更基本的选择替换, 2) 缺失靶残基, 或者 3) 邻近所处位点插入相同或不同类型的残基, 或者联合 1 - 3 项。

- 丙氨酸扫描诱变

丙氨酸扫描诱变是用来鉴定目的蛋白的某些残基或结构域是诱变的优选位置或区域的有用的方法, Cunningham 和 Wells(科学 244:1081-1085, 1989), 具体地在此引用作为参考。丙氨酸扫描中, 用中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)识别并替换残基或目标残基的基团(如带电荷的残基如 Arg、Asp、His、Lys 和 Glu)。氨基酸替换可影响氨基酸与细胞内或细胞外的周围的水环境的相互作用。然后通过为或者为替换位点导入更多的或其它变异体来精选那些表现出对替换功能性敏感的结构域。因此, 尽管导入氨基酸序列变异的位点是预定的, 但是突变性质本身不需预定。例如, 为优化在所给位点突变的表现, 可在目标密码子或结构域进行丙氨酸扫描或随机诱变并且筛选表达的目的蛋白亚基变异体以得到所需活性的最理想的组合。

- 寡核苷酸介导的诱变

寡核苷酸介导的诱变是制备 DNA 替换、缺失和插入变异体的有用的方法, 见如 Adelman 等, (DNA 2:183, 1983)在此引用作为参考。简而言之, 可通过将编码突变的寡核苷酸与含有目的蛋白的未改变或天然 DNA 序列的质粒或噬菌体的单链形式的 DNA 模板杂交改变目标 DNA。杂交之后, 用 DNA 聚合酶合成与寡核苷酸引物结合的模板的完整的第二条互补链, 并在目的蛋白的 DNA 中编码所选择的改变。一般地, 应用了长度至少为 25 个核苷酸的寡核苷酸。最理想的寡核苷酸含有 12-15 个在编码突变的核苷酸两侧与模板完全互补的核苷酸。这保证了寡核苷酸将与单链 DNA 模板分子适当地杂交。采用本领域所知的技术如此处引用作为参考的、Crea 等描述的(美国国家科学院院报 75:5765[1978])可方便地合成寡核苷酸。

- 盒式诱变

制备变异体的另外一种方法, 盒式诱变, 是根据此处引用作为参考的 Wells 等(基因, 34:315[1985])描述的技术。起始物质可以是包含要突变的蛋白亚基 DNA 的质粒(或其它载体)。鉴定要突变的蛋白亚

基 DNA 中的密码子。在鉴定的突变位点两侧必须有特殊的限制性内切酶位点。如果不存在这种限制性位点, 采用上面描述的寡核苷酸介导的诱变方法在目的蛋白亚基 DNA 的合适位置将其导入来产生限制性位点。在限制性位点已导入质粒之后, 在这些位点切割质粒并使之线性化。采用常规方法合成编码位于限制性位点之间的 DNA 序列同时含有所需突变的双链寡核苷酸。分别合成两条链然后用常规技术使它们杂交。此双链寡核苷酸被称为盒。设计盒具有与线性化质粒的末端类似的 3' 端和 5' 端, 以便盒能与质粒直接连接。现在该质粒含有突变的蛋白亚基 DNA 序列。

- 组合诱变

也可用组合诱变产生突变体。如, 优选地为促使最高同源性可能, 对比了一组同系物或其它相关蛋白的氨基酸序列。可选择所有在对比序列的指定位置出现的氨基酸产生一组简并组合序列。变异体的多样化文库是在核酸水平通过组合诱变产生的, 而且由多样化基因文库编码。例如, 可将合成的寡核苷酸混合物酶促连接到基因序列中以便这组潜在的简并序列表达为各个肽或者选择性地、含有这组简并序列的一组更大的融合蛋白。

本领域已知用于筛选产生的突变基因产物的多种技术。用于筛选大的基因文库的技术通常包括将基因文库克隆入可复制的表达载体, 用得到的载体文库转化合适的细胞, 在目的活性如, 此实例中是与 APRIL 或其受体结合检测促使编码其产物被检测的基因的载体相对容易分离。下文描述的每一种技术都可接受用于筛选产生的大量序列的高生产率分析, 如随机诱变技术。

本发明还提供申请专利保护的多肽或它们的受体的蛋白结合结构域的还原作用, 来产生模拟的如肽或非肽试剂。这些肽模拟物能破坏 APRIL 与其各自的受体结合。可鉴定参与受体多肽或下游胞内蛋白的分子识别的 APRIL 关键残基并用来产生竞争性或非竞争性抑制 APRIL 与受体结合的 APRIL 或其受体来源的肽模拟物。(见, 例如“人乳头瘤病毒蛋白与成视网膜细胞瘤基因蛋白结合的肽抑制剂”欧洲专利申

请 EP - 412, 762A 和 EP - B31, 080A), 具体地在此引用作为参考。

通过制备可获得的纯化和重组 APRIL, 本发明提供用来筛选是正常细胞功能, 此实例中是 APRIL 或其受体的激动剂或是拮抗剂的候选药物的分析法。在一个实施方案中, 该分析评价了化合物调节 APRIL 与受体之间的结合的能力。多种分析形式可满足需要并且, 根据本发明, 可被本领域技术人员理解。

在许多检验化合物和天然提取物文库的药物筛选程序中, 为在给定的时间期限内鉴定的化合物最多需用高生产率分析法。在无细胞系统如用纯化或半纯化蛋白衍生的, 进行的分析常被称为“初级”筛选, 这是因为它们的产生使得分子目标中由试验化合物介导的变化迅速发展和相对容易的检测成为可能。而且, 在体外系统中, 一般可忽略试验化合物的细胞毒性和/或生物可获得性, 而将分析法主要集中在作为在与其它蛋白的结合亲和性的改变中显著的药物对分子目标的作用或者分子目标的酶促性质的变化上。

分离与 APRIL 结合的受体

TNF 家族的配体可用于鉴定和克隆受体。用所描述的 APRIL 序列, 可将组成受体结合序列的细胞外结构域的 5' 端与标记序列融合然后加上能使 APRIL 在许多表达系统的任一种中都可分泌的前导序列。Browning 等(1996) (JBC271, 8618 - 8626) 描述了这种技术的一个例子, 其中的 LT- β 配体是以这种形式分泌的。VCAM 前导序列与带有 LT- β 细胞外结构域的短 myc 肽标记结合。VCAM 序列被用来迫使正常地与膜结合的 LT- β 分子分泌。分泌的蛋白在 N-末端保留了 myc 标记这不影响它与受体结合的能力。这样的分泌蛋白可在瞬时转染的 Cos 细胞或者相似的系统如 EBNA 来源的载体、昆虫细胞/杆状病毒、picchia 等中表达。未纯化的细胞上清液可用作已标记配体的来源。

可将表达受体的细胞暴露于已标记配体中来进行鉴定。在用抗-myc 肽抗体 (9E10) 标记 myc 标记随后用藻红蛋白标记 (或类似的标记) 抗-小鼠免疫球蛋白的 FACS 实验中鉴定具有结合的配体的细胞。可方便地鉴定出 FACS 阳性细胞并将其作为编码受体的 RNA 来源。然后

通过常规技术从此 RNA 制备表达文库并分成集合。将克隆集合转染入合适的宿主细胞并且在给酶标抗小鼠 Ig 试剂如半乳糖苷酶、碱性磷酸酶或萤光素酶标记的抗体标记上结合的 myc 肽标签之后通过显微镜检查鉴定已标记的配体与受体阳性转染细胞的结合。一旦有阳性集合鉴定出，降低集合的大小直到鉴定出编码 cDNA 的受体。可用小鼠或人 APRIL 实施此方法，因为可能更方便地产生受体。

G. 治疗方法和药物组合物。

本发明用于治疗癌症的方法包括给予患病者优选哺乳动物宿主如狗、猫或人含有能干扰 APRIL 与其受体相结合的阻滞剂的有效量的申请专利保护的组合物。这些阻滞剂包括但不限于可溶的 APRIL、抗 APRIL 抗体、抗 APRIL 受体抗体或其生物活性片段。另外，可通过使 APRIL 突变同时维持其阻滞 APRIL 与其受体结合的能力来制备 APRIL 的抑制形式。阻滞剂可优选含有可按照本领域已知的方法构建的受体 IG 融合蛋白。

本发明的方法可用于治疗所有癌症，包括但不限于细胞疾病如，例如肾细胞癌、卡波西肉瘤、慢性白血病、乳癌、肉瘤、孵巢癌、直肠癌、咽喉癌、黑色素瘤、结肠癌、膀胱癌、胞大细胞瘤、肺癌、乳房腺癌、咽鳞状细胞癌和胃肠或胃癌。另外，这些阻滞剂可用于治疗那些不被认为是肿瘤的增殖性疾病即细胞过度增殖(增殖)如，例如硬皮病、类风湿关节炎的血管翳形成、外科手术后瘢痕和肺、肝脏和子宫纤维化。

本发明的药物组合物可包含治疗有效量的 APRIL 或其受体、或其片段、或其模拟物并且可选择性地包含药学上可接受的载体。因此，通过施用本发明药学上有效量的化合物或其药学上可接受的盐或衍生物，本发明提供治疗癌症的方法以及刺激、或某些情况下抑制免疫系统或其部分的方法。当然应理解的是本发明的组合物和方法可与其它多种疗法联合应用。

可将组合物制成制剂，用于多种给药途径，包括全身、体表或局

部给药。对于全身给药，注射给药是优选的，包括肌肉内、静脉内、腹膜内和皮下注射，本发明的组合物可制成液体溶液，优选地配制在生理相容性缓冲液如 Hank's 液或 Ringer's 液。另外，组合物也可制成固体形式并且，选择性地在使用之前立即再溶解或悬浮。本发明中也包括冻干形式。

组合物可口服或经粘膜或皮肤方式给药。用经粘膜或经皮肤给药时，制剂中应用了适合于要透过的屏障的渗透剂。本领域所知的这些渗透剂包括，例如用于经粘膜给药的有胆盐、梭链孢酸衍生物和去污剂。经粘膜给药可通过鼻腔喷雾剂或应用栓剂。用于口服给药，可将组合物制成传统的口服给药形式如胶囊、片剂和补药。用于体表给药，如本领域已知的，可将本发明的组合物制成软膏、油膏、凝胶或乳剂。

给药剂量和服药规则由癌症类型、患者和患者的病史而定。剂量必须对癌症的治疗、抑制或改变癌症进程有效。给药可以单次给药或多次给药。如果采用多次给药，按优选的，给药的频率取决于，例如宿主和癌症的类型、所给剂量等。对于某些类型的癌症或癌症谱系，每日给药是有效的，而对于其它的，每隔一天或每隔两天给药是有效的。一次或整个治疗过程所给的活性化合物的量取决于许多因素。例如，受治对象的年龄和大小、所治疾病的严重度和病程、给药方式和剂型以及治疗医生的判断。然而，有效剂量可以为约 0.005 - 约 5mg/kg/天，优选约 0.05 - 约 0.5mg/kg/天。最有效的剂量是引起无肿瘤外观或者肿瘤完全退化并且对患者无毒的。本领域技术人员将认识到同样有用的更低和更高的剂量。

根据本发明的基因构建体也可用作基因治疗方案的一部分来运送编码 APRIL 的对抗或拮抗形式的核酸。

APRIL 的表达构建体可在任何生物学上有效的载体如能够在体内有效地运送 APRIL 基因给细胞的任何制剂或组合物中给药。方法包括将基因插入能直接转染细胞的病毒载体、或者借助于如脂质体或胞内载体运送质粒 DNA、以及直接注射基因构建体。优选病毒载体转化方法。

基因治疗构建体的药物制剂可主要含有可接受的稀释剂中的基因运送系统或者可含有基因运送载体包埋在其中的缓释基质。选择性地, 在完整的基因运送系统可从重组的细胞完整地产生的地方如逆转录病毒载体, 药物制剂可含有产生基因运送系统的一个或多个细胞。

除了用于治疗, 本发明的寡聚体可用作诊断试剂来检测与它们特异性结合的目标 DNA、RNA 或氨基酸序列的存在与否。在其它方面, 申请专利的本发明可用来评价化学个体与 APRIL 或其片段相互作用如结合或物理联合的能力。方法包括使化学个体与 APRIL 相互接触并且评价化学个体与 APRIL 相互作用的能力。另外, APRIL 可用在评价天然产生的 APRIL 或 APRIL 受体以及评价与 APRIL 受体联合或结合的化学个体的方法中。理想的是, 利用标记的 APRIL 版本来方便与其受体结合的 APRIL 或受体阳性细胞的检测, 如, 例如筛选能阻断 APRIL 配体 - APRIL 受体相互作用的试剂的目的。另外, 可利用具有增高的生长速度的 APRIL 转染的细胞系作用根据用来筛选阻断 APRIL 活性的分子的验证法。

在某些方面, 申请专利的发明特点是用于评价化学个体调节 APRIL 和其相应的受体之间的相互作用的能力的方法。此方法包括, 在两者能在其中相互作用的条件下结合 APRIL 受体和 APRIL, 加入要评价的化学个体并检测复合物的形成或溶解。可进一步在体外评价这些调节试剂如能在无细胞系统中检验其活性并且然后选择性地给细胞或动物应用此化合物并评价其作用。

I. 实施例

实施例 1

APRIL 的 Northern 印迹分析显示 APRIL 表达微弱并且仅在少数组织表达(图 2A)。前列腺中发现 2.1Kb 和 2.4Kb 的两种转录物, 而 PBLs 显示出 1.8Kb 的更短的转录物。采用 Human Multiple Tissue Northern Blots I 和 II(Clontech # 7760 - 1 和 #7759 - 1)、Human Cancer Cell Line MTN Blot (Clontech #7757 - 1)和 Human Tumor Panel Blot V(Invitrogen D3500 - 01)进行 Northern 印迹分析。于 62℃在

ExpressHyb 杂交液 (Clontech #8015-1) 中温育膜至少 1 小时。利用 APRIL 的细胞外结构域的相应 cDNA 为模板合成随机引物 cDNA 探针 (Boehringer Mannheim)。以 1.5×10^6 cpm/ml 浓度将热变性的 cDNA 探针加入新鲜的 ExpressHyb 中。膜在 62°C 杂交 12-24 小时, 在含有 0.05% SDS 的 $2\times\text{SSC}$ 中洗三次并且于 -70°C 曝光。APRIL 的 Northern 印迹分析显示 APRIL 表达微弱并且仅限于少数组织。在前列腺中发现了 2.1Kb 和 2.4Kb 的两种转录物, 而 PBLs 显示出更短的 1.8Kb 的转录物。

更长的曝光时间显示出 2.1kb 的 APRIL mRNA 在结肠、脾脏和胰腺中 (未显示资料)。APRIL mRNA 的有限分布与目前可获得的 EST 数据库中的 cDNA 克隆的来源一致。鉴定的 23 个克隆中只有两个来源于正常组织 (怀孕子宫、胰岛)。值得注意的是, 存在于 cDNA 文库中的 ETS-克隆的剩余者 (21 个克隆, 91%) 产生于肿瘤或肿瘤来源的细胞系 (卵巢肿瘤, 11 个; 前列腺肿瘤 3 个; Gessler Wilms 肿瘤, 1 个; 结肠癌, 1 个; 子宫内膜肿瘤, 1 个; 甲状旁腺肿瘤, 1 个; 胰腺肿瘤, 1 个; T 细胞淋巴瘤, 1 个; LNCAP 腺瘤来源细胞系, 1 个)。这促使我们检验表达 APRIL mRNA 的转化细胞系 (图 2B) 而且所有细胞系的确强烈表达 APRIL 的 2.1kb 转录物。

在结肠直肠癌 SW480、伯基特淋巴瘤 Raji 和黑色素瘤 G361 中检测到最高的 APRIL 特异信号。为证明此发现, 测定了几种肿瘤中 APRIL mRNA 的表达水平并将其与正常组织相比较。在甲状腺癌和淋巴瘤中检测到大量的 APRIL mRNA, 而在相应的正常组织中, 仅发现微弱的或者无杂交信号 (图 2C)。在 Northern 印迹杂交分析的两种其它肿瘤 (肾上腺和腮腺肿瘤) 中, APRIL mRNA 水平未升高。然而, 原位杂交展示了与正常结肠组织相比, 人结肠腺癌中有大量 APRIL 信息 (图 2D)。

为探讨 APRIL 的可能活性, 在 293 细胞中表达了包含氨基酸 110-250 的 APRIL 的可溶细胞外结构域 (sAPRIL) 的重组形式 (9)。应用一侧有 EcoRI 位点的特异 5' 正向引物 (5' - CCAGCCTCATCTCCTTTCTTGC -

3') 和一侧有 XbaI 位点的特异 3' 反向引物 (5' - TCACAGTTTCACAAACCCCAGG - 3') 从 EST- 克隆扩增全长 APRIL 基因。用 EcoRI/XbaI 剪切扩增的片段并将其克隆入 pCRIII 的修饰版本 (Invitrogen), 框内带有 N- 端 Flag 肽 (15)。用分别含有 PstI 和 XbaI 位点的两个引物 (5' - AAACAGAAGAAGCAGCACTCTG - 3') 和 (5' - TCACAGTTTCACAAACCCCAGG - 3') 产生 APRIL 的可溶形式 (sAPRIL) 并且随后将其克隆入含有用于在真核细胞中进行蛋白分泌的 HA 信号和 N- 末端 Flag 表位的修饰的 pCRIII 载体 (15)。

实施例 2

肿瘤细胞和组织中 APRIL 的广泛表达提示 APRIL 可能与肿瘤生长相关, 因此将不同的肿瘤细胞系与纯化的重组 Flag 标记的 sAPRIL 进行温育 (10)。人胚胎 293T 细胞、人白血病 Jurkat T- 细胞、人伯基特淋巴瘤 B- 细胞 Raji 和黑色素瘤细胞系的生长如前所述 (16, 17)。本文中提到的其它细胞系保藏于美国典型培养物保藏中心 (Rockville, Maryland) 并由其描述。所有细胞系在补充有 10% 胎牛血清的 RPMI 或 DMEM 培养基中培养。

最近描述了人 FasL 细胞外结构域 (残基 103 - 281) 和 TRAIL 的细胞外结构域 (残基 95 - 281) 的 Flag- 标记的版本 (15)。Flag- 标记的可溶的人 TWEAK (残基 141 - 284) 在 293 细胞中产生 (P. S. 准备中未印刷的原稿)。从 Kodak International Biotechnologies 获得抗-Flag 抗体 M2。当根据加入配体 24 小时后活细胞数目的增加 (近似 50%) 检测时, 观察到在 APRIL 存在时 Jurkat T 淋巴瘤细胞增殖的增加呈剂量依赖效应 (图 3A)。细胞增殖的测定是通过以每孔 50,000 个细胞在 100 μ l 的培养基中与指定浓度的重组 APRIL、TWEAK、TRAIL、FasL 温育细胞并且在 24hr 后按照制造商的说明应用 Celltiter 96AQ 增殖测定法 (Promega) 测定活细胞数目或者用 ^3H - 胸腺嘧啶核苷掺入进行测定。应用与琼脂糖偶联的抗-Flag 用于免疫耗竭 Flag- APRIL。

细胞增殖的增长不依赖于共同刺激信号如抗-CD3 抗体或其它细

胞因子。如所预期的，向 Jurkat 细胞中加同样产生的和纯化的 FasL 减少了活细胞的数目，而 TWEAK 没有此效应。细胞数目增加与 APRIL 处理的细胞中 ^3H -胸腺嘧啶核苷掺入的增高(40%)有关(图 3A)。用抗-FLAG 抗体，而不是抗-myc 抗体进行的 FLAG-标记的含有 APRIL 的条件培养基产生的免疫耗竭降低了增殖效应(图 3B)，这表明这种增殖效应是特异的并且是由于 APRIL。增殖速度的增高也可见于某些 B 淋巴瘤(人 Raji、小鼠 A20 细胞，但不是人 BJAB)和上皮来源的细胞系如 COS 和 HeLa 以及黑色素瘤(图 3C)。乳腺癌细胞 MCF-7 没有反应。当胎牛血清由 10%降到 1%时，对 Jurkat 细胞的作用更明显(图 3D)。

重组 sAPRIL 的集合物形式可能解释在相当高的浓度才可检测到 sAPRIL 的增殖效应。因此，用全长人 APRIL 转染 NIH-3T3 细胞(12)并获得几个 APRIL-表达克隆(图 4A)。用磷酸钙转染方法和包含全长 FLAG-标记的 APRIL 的 pCRIII 表达载体建立了 NIH-3T3 APRIL 克隆。在还原条件下，有 SDS 存在时，在 12%聚丙烯酰胺凝胶上对每泳道约 2×10^6 个细胞的细胞蛋白进行电泳分离并随后将其转移到硝酸纤维素膜上。用 $5 \mu\text{g/ml}$ 的大鼠单克隆抗-Flag 抗体 M2(Kodak International Biotechnologies)进行 Flag-标记的 APRIL 的免疫印迹分析。用亲和纯化的抗-过氧化物酶结合的驴抗-小鼠抗体(Dianova, Hamburg, Germany)、随后用 ECL 系统(Amersham)进行化学发光反应来检测第一抗体。

令人感兴趣的是，APRIL 转染子比模拟转染子增殖得快(图 4B)。推论 APRIL-转染的 NIH-3T3 细胞也可能具有体内生长优势。当将野生型或模拟转染的 NIH-3T3 细胞注射给裸鼠时，5-6 周后观察到小的可触摸肿瘤(13)。相反，用 APRIL 稳定转染的两个 NIH-3T3 细胞克隆都在仅仅 3-4 周时诱发肿瘤。六周后，由于高度的肿瘤负担不得不处死小鼠(图 4C)。将 NIH/3T3 成纤维细胞(美国典型培养物保藏中心，Rockville, Maryland)和不同的转染子(1×10^5 个)细胞悬浮于 $50 \mu\text{l}$ PBS 中并将其皮下注射到 BALB/c 裸鼠(Harlan, Zeist, Netherlands)体侧。每三天测量一次肿瘤大小。小鼠是同龄的(每组 3 只动物)。

实施例 3

分离与 APRIL 结合的受体

TNF 家族的配体可用来鉴定和克隆受体。用所需的 APRIL 序列, 可使组成受体结合序列的 APRIL 的胞外结构域与标记序列融合, 并且加上前导序列使得在任意表达系统中都可分泌 APRIL。此技术的一个例子由 Browning 等描述, (1996) (JBC271, 8618-8626), 其中 LT- β 配体以这种方式分泌。VCAM 前导序列与后面带有 LT- β 的细胞外结构域的短的 myc 肽标记结合。VCAM 序列用于使正常膜结合 LT- β 分子分泌。分泌的蛋白保留不影响其与受体结合的能力的位于 N-末端的 myc 标记。这样的分泌蛋白可在瞬时转染的 Cos 细胞或相似系统如 EBNA 来源的载体、昆虫细胞/杆状病毒、picchia 等中表达。未纯化的细胞上清液可用作标记配体的来源。

表达受体的细胞可通过将其暴露于标记配体而得到鉴定。在 FACS 实验中, 用抗-myc 肽抗体 (9E10) 来标记 myc 标记然后用藻红蛋白 (或相似标记) 标记的抗小鼠免疫球蛋白鉴定带有结合配体的细胞。FACS 阳性细胞可方便地得以鉴定并可作为编码受体的 RNA 来源。然后通过常规技术从此 RNA 制备表达文库并分成集合。将克隆的集合转染进入合适的宿主细胞并通过显微镜检查来确定标记配体与受体阳性转染细胞的结合, 然后用酶标抗小鼠 Ig 试剂即半乳糖苷酶、碱性磷酸酶或荧光素酶标记抗体标记结合的 myc 肽标记。一旦鉴定出阳性集合, 应减少集合大小直到鉴定出编码 cDNA 的受体。可用小鼠或人 APRIL 实行此方法, 可更方便地得到受体。

对本领域技术人员明显的是在不离开本发明的精神和范围的情况下, 本发明的 APRIL、组合物和方法可进行多种修饰和改变。因此, 如果这些修饰和改变是在所附的权利要求书及它们的等价物范围之内, 则本发明将包括它们。

- i. Smith 等 1990; Kohno 等 1990; Loetscher 等 1990; Schall 等 1990.
- ii. See Jones 等, 1989; Eck 等, 1992.
- iii. K. Tracey, 肿瘤坏死因子。该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p255(1992)); A. Waage, 肿瘤坏死因子。该分子及它们在药物中表现出的作用 B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p 275(1992).
- iv. G. D. Roodman, 肿瘤坏死因子。该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p 117(1992).
- v. A. Nakane, 肿瘤坏死因子。该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p 285(1992); I. A. Clark 等, 肿瘤坏死因子, 该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p303(1992); G. E. Grau 等, 肿瘤坏死因子。该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p303(1992); G. E. Grau 等, 肿瘤坏死因子。该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p329(1992); P-F. Piguet, 肿瘤坏死因子。该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p 341(1992); G. H. Wong 等, 肿瘤坏死因子, 该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p 371(1992).
- vi. S. Malik, 肿瘤坏死因子。该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY. p 407(1992).
- vii. D. A. Fox, 美国医学杂志 , 99, 82(1995).
- viii. D. Goeddel 等, Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. , 51, 597(1986); G. Trinchieri, 肿瘤坏死因子。该分子及它们在药物中表现出的作用, B. Beutler(Ed.), Raven Press, NY, p 515(1992).
- ix. L. A. Tartaglia 等, 美国国家科学院院报, 88, 9292(1991); L. A. Tartaglia 和 D. V. Goeddel, 今日免疫学, 13, 151(1992).
- x. B. Luettig 等, 免疫学杂志 , 143, 4034(1989); M. Kriegler 等, 细胞, 53, 45(1988).
- xi. C. F. Ware 等, 在细胞溶解通路中 G. M. Griffiths 和 J.

Tschopp(Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p 175-218(1995).

xii. N. Paul 等, *Ann, Rev. Immunol.* , 6, 407(1988).

xiii. P. D. Crowe 等, *科学*, 264, 707(1994). (J. Browning 等, *细胞*, 72, 847(1993); J. Browning *免疫学杂志* , 154, 33(1995).

xiv. P. De Togni 等, *科学*, 264, 703(1993); T. A. Banks 等, *免疫学杂志* . , 155, 1685(1995).

xv. J. Browning 和 A. Ribolini, *免疫学杂志* . , 143, 1859(1989); J. Browning 等, *实验医学杂志*, 183, 867(1996).

xvi. T. Suda 等, *免疫学杂志* , 154, 3806(1995)(T. Suda 等, *免疫学杂志* . , 154, 3806(1995).

xvii. B. C. Trauth 等, *科学*, 245, 301(1989); S. Yonehara 等, *实验医学杂志*, 169, 1747(1989); S. Nagata 和 P. Goldstein, *科学*, 267, 1449(1995); M. H. Falk 等, *血液*, 79, 3300(1992).

xviii. F. Rieux-Laucat 等, *科学*, 268, 1347(1995); T. Takahashi 等, *细胞*, 76, 969(1994); R. Watanabe-Fukunaga 等, *自然*, 356, 314(1992).

xix. P. R. Galle 等, *实验医学杂志*, 182, 1223(1995).

xx. F. Silvestris 等, *临床免疫病理学*, 75, 197(1995).

xxi. P. D. Katsikis 等, *实验医学杂志*, 181, 2029(1995); A. D. Badley 等, *病毒学杂志*, 70, 199(1996).

xxii. S. Wiley 等, *免疫*, 3, 673(1995).

xxiii. J. F. Gauchat 等, *FEBS Lett.* , 315, 259(1993); S. Funakoshi 等, *血液*, 83, 2787(1994).

xxiv. R. C. Allen 等, *科学*, 259, 990(1993).

xxv. L. Biancone 等, *kidney-Int.* 48, 458(1995); C. Mohan 等, *免疫学杂志*, 154, 1470(1995).

xxvi. J. Ruby 等, *自然 Medicine*, 1, 437(1995).

xxvii. Z. Wang 等, *免疫学杂志*, 155, 3722(1995); A. M. Cleary 等, *免疫学杂志*, 155, 3329(1995).

xxviii. S. Hess 和 H. Engelman, *实验医学杂志*, 183, 159(1996).

xxix. R. G. Goodwin 等, *细胞*, 73, 447(1993); Goodwin 等, *欧洲免*

疫学杂志, 23, 2631(1993); C. A. Smith 等, 细胞, 73, 1349(1993).

xxx. 见例如, Narang, SA(1983)四面体 39: 3; Itakura 等(1981)重组 DNA, 第三届克利福兰专题讨论会大分子会刊 ed. AG Walton, Smsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura 等(1984)生物化学年鉴 53: 323; Itakura 等(1984)科学 198: 1056; Ike 等(1983)核酸研究 11: 477.

xxxi. 见例如, Scott 等(1990)科学 249: 386-390; Roberts 等(1992)89: 2429-2433; Devlin 等(1990)科学 249: 404-406; Cwirla 等(1990)87: 6378-6382; 及美国专利号 5, 223, 409, 5, 198, 346 和 5, 096, 815.

33. M. T. Abreu-Martin, A. Vidrich, D. H. Lynch 和 S. R. Targan. 对 HT-29 细胞中应答 TNF- α 和 Fas 配体连接的凋亡和 IL-8 分泌的不同诱导, 免疫学杂志 155: 4147-4154, 1995.

34. K. Agematsu, T. Kobata, F. -C. Yang, T. Nakazawa, K. Fukushima, M. Kitahara, T. Mori, K. Sugita, C. Morimoto 和 A. Komiyama. CD27/CD70 的相互作用直接驱动 B 细胞 IgG 和 IgM 的合成. 欧洲免疫学杂志. 25: 2825-2829, 1995.

35. R. Amakawa, A. Hakem, T. M. Kundig, T. Matsuyama, J. J. L. Simard, E. Timms, A. Wakeham, H. -W. Mittrucker, H. Griesser, H. Takimoto, R. Schmits, A. Shahinian, P. S. Ohashi, J. M. Penninger 和 T. W. Mak. 在患何杰金氏抗原 CD30 缺陷的小鼠中 T 细胞的损伤的负选择细胞 84: 551-562, 1996.

36. J. -L. Bodmer, K. Burens, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, M. Thome, T. Bornand, M. Hahne, M. Schroeter, K. Becker, A. Wilson, L. E. French, J. L. Browning, H. R. MacDonald, 和 J. Tschopp. TRAMP, 序列与肿瘤坏死因子受体 1 和 Fas(apo-1/CD95)具有同源性的新的介导凋亡的受体, 免疫 1: 79-88, 1997.

37. J. Brojatsch, J. Naughton, M. M. Rolls, K. Ziegler 和 J. A. T. Young. TNFR 相关的蛋白 Carl 是具有细胞致病作用的禽类白血病病毒的细胞受体并介导凋亡, 细胞 87: 845-855, 1996.

38. J. L. Browning. M. J. Androlewicz 和 C. F. Ware. 淋巴毒素和相关的 33-KDa 的糖蛋白在活化的人 T 细胞杂交瘤表面上表达, 免疫

学杂志. 147: 1230-7, 1991.

39. J. L. Browning, K. Miatkowski, D. A. Griffiths, P. R. Bourdon, C. Hession, C. M. Ambrose 和 W. Meier. 人淋巴毒素 α 和 β 的可溶性重组异源三聚体复合物的性质和制备, 生物化学杂志 271: 8618-26, 1996.

40. J. E. Castro, J. A. Listman, B. A. Jacobson, Y. Wang, P. A. Lopez, S. Ju, P. W. Finn 和 D. L. Perkins. 在胸腺细胞的负选择中的凋亡的 Fas 调节, 免疫 5: 617-627, 1996.

41. C. -Y. A. Chen 和 A. -B. Shyu. 富含 AU 的元件: 在 mRNA 降解中的性质和重要性. 生物科学进展 20: 465-470. 1995.

42. Y. Chicheportiche, C. Ody 和 P. Vassalli. 存在于造血组织中的与促红细胞生成素 mRNA 有一相同的短核苷酸序列的新的 4KbmRNA 在鼠巨噬细胞中的鉴定. Biochim. Biophys. Res. Comm. 209: 1076-1081, 1995.

43. A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, G. -L. Yu, R. H. Lyons, M. Garg, D. R. Duan, L. Xing, R. Gentz, J. Ni 和 V. M. Dixit 通过与 TNFR - 1 和 CD95 相关, 含有死亡结构域的受体 DR₃ 进行的信号转导. 科学 274: 990-992, 1996.

44. P. DeTogni 等淋巴毒素缺陷的小鼠的周围淋巴器官的不正常发育. 科学 264: 703-7, 1994.

45. M. A. DeBenedette, N. R. Chu, K. E. Pollok, J. Hurtako, W. F. Wade, B. S. Kwon 和 T. H. Watts. 4-1BB 配体在 T 淋巴细胞生长的共同刺激中的作用及其通过 cAMP 在 M12B 淋巴瘤上的正调节. 实验医学杂志 181: 985-992, 1995.

46. M. Degli-Esposti, T. Davis-Smith, W. S. Din, P. J. Smolak, R. G. Gookwin 和 C. A. Smith. 通过交联引起的淋巴毒素 β 受体的活化在 A375 人黑色素瘤细胞中诱导趋化因子产生和生长阻抑. 免疫学杂志. 158: 1756-1762, 1997.

47. T. M. Foy, A. Aruffo, J. Bajorath, J. E. Buhlmann 和 R. J. Noelle 通过 CD40 及其配体 gp39 进行的免疫调节 Ann. Rev. Immunol. 14: 591-617, 1996.

48. H. J. Gruss, N. Boiani, D. E. Williams, R. J. Armitage, C. A. Smith 和 R. G. Goodwin. 在表达 CD - 30 的细胞和淋巴瘤细胞系上的 CD30 配体的多效性. 血液 83: 2045-56, 1994.

49. H. J. Gruss and S. K. Dower. 肿瘤坏死因子配体超家族: 与恶性淋巴瘤的病理学相关. 血液 85: 3378-404, 1995.

50. J. Kitson, T. Raven, Y. -P. Jiang, D. V. Goeddel, K. M. Giles, K. -T. Pun, C. J. Grinham, R. Brown 和 S. N. Farrow. 介导凋亡的含有死亡结构域的受体. 自然 384: 372-375, 1996.

51. S. Y. Lee, C. G. Park 和 Y. Choi. 通过与肿瘤坏死因子受体相关因子相关联的 CD30 胞质结构域介导的 T 细胞杂交瘤的 T 细胞受体依赖的细胞死亡. 实验医学杂志 183: 669-674, 1996.

52. R. I. Montgomery, M. S. Warner, B. J. Lum 和 P. G. Spear 单纯疱疹病毒 I 通过 TNF/NGF 受体家庭的新成员的介导进入细胞. 细胞 87: 427-436, 1996.

53. S. Nagata. 由死亡因子介导的凋亡. 细胞 88: 355-365, 1997.

54. R. M. Pitti, S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore 和 A. Ashkenazi. 通过肿瘤坏死因子细胞因子家族的新成员 Apo-2 配体进行的凋亡诱导. 生物化学杂志 J. Bid. chem. 1996.

55. C. A. Smith, T. Farrah 和 R. G. Goodwin. 细胞和病毒蛋白的 TNF 受体超家族: 活化、共同刺激和死亡. 细胞 76: 959-62, 1994.

56. G. L. Smith. 避免宿主应答感染的病毒策略. 微生物学进展. 3: 81-88, 1994.

57. E. Strueber 和 W. Strober. 经 OX40 - DX40L 的 T 细胞 - B 细胞相互作用是 T 细胞不依赖的体液免疫应答所必需的. 实验医学杂志 183: 979-989, 1996.

58. H. -K. Sytwu, R. S. Liblau 和 H. O. McDevitt. Fas/Apo-1(CD95) 和 TNF 在 T 细胞受体转基因小鼠中的抗原诱导的程序性细胞死亡中的作用. 免疫 5: 17-30, 1996.

59. P. Vassalli. 肿瘤坏死因子的病理生理学 Ann. Rev. Immunol. 10: 411-452, 1992.

60. L. Zheng, G. Fisher, R. E. Miller, J. Peschon, D. H. Lynch 和 M. J. Lenardo.通过肿瘤坏死因子在成熟的 T 细胞中进行的凋亡诱导。自然 377: 348-351, 1995.

SEQ ID NO: 1

```

1  GGTACGAGGC TTCCTAGAGG GACTGGAACC TAATTCTCCT GAGGCTGAGG
51  GAGGGTGGAG GGTCTCAAGG CAACGCTGGC CCCACGACGG AGTGCCAGGA
101  GACTAACAG TACCCTTAGC TTGCTTTCCT CCTCCCTCCT TTTTATTTTC
151  AAGTTCCTTT TTATTTCTCC TTGCGTAACA ACCTTCTTCC CTTCTGCACC
201  ACTGCCCCGTA CCCTTACCCG CCCC GCCACC TCCTTGCTAC CCCACTCTTG
251  AAACCACAGC TGTGCGCAGG GTCCCCAGCT CATGCCAGCC TCATCTCCTT
301  TCTTGCTAGC CCCC AAAGGG CCTCCAGGCA ACATGGGGGG CCCAGTCAGA
351  GAGCCGGCAC TCTCAGTTGC CCTCTGTTG AGTTGGGGGG CAGCTCTGGG
401  GGCCGTGGCT TGTGCCATGG CTCTGCTGAC CCAACAAACA GAGCTGCAGA
451  GCCTCAGGAG AGAGGTGAGC CGGCTGCAGG GGACAGGAGG CCCTCCCAG
501  AATGGGGAAG GGTATCCCTG GCAGAGTCTC CCGGAGCAGA GTTCCGATGC
551  CCTGGAAGCC TGGGAGAATG GGGAGAGATC CCGGAAAAGG GAGCAGTGC
601  TCACCCAAAA ACAGAAGAAG CAGCACTCTG TCCTGCACCT GGTTCCTATT
651  AACGCCACCT CCAAGGATGA CTCCGATGTG ACAGAGGTGA TGTGGCAACC
701  AGCTCTTAGG CGTGGGAGAG GCCTACAGGC CCAAGGATAT GGTGTCCGAA
751  TCCAGGATGC TGGAGTTTAT CTGCTGTATA GCCAGGTCCT GTTTCAGAC
801  GTGACTTTCA CCATGGGTCA GGTGGTGTCT CGAGAAGGCC AAGGAAGGCA
851  GGAGACTCTA TTCCGATGTA TAAGAAGTAT GCCCTCCAC CCGGACCGGG
901  CCTACAACAG CTGCTATAGC GCAGGTGTCT TCCATTTACA CCAAGGGGAT
951  ATTCTGAGTG TCATAATTCC CCGGGCAAGG GCGAACTTA ACCTCTCTCC
1001  ACATGGAACC TTCCTGGGGT TTGTGAACT GTGATTGTGT TATAAAAAGT
1051  GGCTCCCAGC TTGGAAGACC AGGGTGGGT CATACTGGAGACAGCCAAGA
1101  GCTGAGTATA TAAAGGAGAG GGAATGTGCA GGAACAGAGGCATCTTCTG
1151  GTTTTGGCTC CCCGTTCTC ACTTTCCCT TTTCATTCCC ACCCCCTAGA
1201  CTTTGATTTT ACGGATATCT TGCTTCTGTT CCCCATGGAG CTCCGAATTC
1251  TTGCGTGTGT GTAGATGAGG GGCGGGGAC GGGCGCCAGG CATTGTTTCA
1301  ACCTGGTCGG GGCCCACTGG AAGCATCCAG AACAGCACCA CCATCTTA

```

SEQ ID NO: 2

```

1  MPASSPFLA PKGPPGNMGG PVREPALSA LWLSWGAALG AVACAMALLT
51  QQTELQSLRR EVSRLQGTGG PSQNGEGYPW QSLPEQSSDA LEAWENGERS
101  RKRRAVLTQK QKKQHSLVHL VPINATSKDD SDVTEVMWQP ALRRGRGLQA
151  QGYGVRIQDA GYLLYSQVL FQDVTFTMGQ VVSREGQGRQ ETLFRICRSM
201  PSHPDRAVNS CYSAGVFHLH QGDILSVIIP RARAKLNLSP HGTFLGFVKL

```

SEQ ID NO: 3

```

1  GAATTCGGCA CGAGGCTCCA GGCCACATGG GGGGCTCAGT CAGAGAGCCA
51  GCCCTTTTCGG TTGCTCTTTG GTTGAGTTGG GGGGCAGTTC TGGGGGCTGT
101  GACTTGTGCT GTCGCACTAC TGATCCAACA GACAGAGCTG CAAAGCCTAA
151  GGCGGGAGGT GAGCCGGCTG CAGCGGAGTG GAGGGCCTTC CCAGAAGCAG
201  GGAGAGCGCC CATGGCAGAG CCTCTGGGAG CAGAGTCCTG ATGTCCTGGA
251  AGCCTGGAAG GATGGGGCGA AATCTCGGAG AAGGAGAGCA GTACTACCC
301  AGAAGCACAA GAAGAAGCAC TCAGTCCTGC ATCTTGTTCC AGTTAACATT
351  ACCTCCAAGG ACTCTGACGT GACAGAGGTG ATGTGGCAAC CAGTACTTAG
401  GCGTGGGAGA GGCCCTGGAG GCCCAGGGAG ACATTGTACG AGTCTGGGAC
451  ACTGGAATTT ATCTGCTCTA TAGTCAGGTC CTGTTTCATG ATGTGACTTT
501  CACAATGGGT CAGGTGGTAT CTCGGGAAGG ACAAGGGAGA AGAGAACTC
551  TATTCCGATG TATCAGAAGT ATGCCTTCTG ATCCTGACCG TGCCTACAAT
601  AGCTGCTACA GTGCAGGTGT CTTTCATTTA CATCAAGGGG ATATTATCAC
651  TGTCAAAATT CCACGGGCAA ACGCAAACT TAGCCTTTCT CCGCATGGAA
701  CATTCCTGGG GTTTGTGAAA CTATGATTGT TATAAAGGGG GTGGGGATTT
751  CCCATTCCAA AACTGGCTA GACAAAGGAC AAGGAACGGT CAAGAACAGC
801  TCTCCATGGC TTTGCCTTGA CTGTTGTTCC TCCCTTTGCC TTTCCCGCTC
851  CCACTATCTG GGCTTTGACT CCATGGATAT TAAAAAGTA GAATATTTTG
901  TGTTTATCTC CCAAAA

```

SEQ ID NO: 4

```
1  MGGSVREPAL  SVALWLSWGA  VLGAVTCAVA  LLIQQTELQS  LRREVSRLQR
51  SGGPSQKQGE  RPWQSLWEQS  PDVLEAWKDG  AKSRRRRRAVL  TQKHKKKHSV
101 LHLVPVNITS  KDSDVTEVMW  QPVLRRGRGP  GGQGDIVRVW  DTGIYLLYSQ
151 VLFHDVTFTM  GQVVSREGQG  RRETLFRCIR  SMPSDPDRAV  NSCYSAGVFH
201 LHQGDIITVK  IPRANAKLSL  SPHGTF LGFV  KL
```

A

TM

1

MPASSPFTLLAPKGPQNGGVPREPALSVAWMSAGALGAVACMAAUIT 50

QOTELQSLRREVSRLLQGTGQPSQNGEGYHAQSLPEQSSDALEWENGERS 100

RKRRAVLTQKQKQHSVHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRGRGLQA 150

QGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFIMQQWSREQQGRQETLFCIRSM 200

PSHPDRAVNSCYSAGVFHLHQGDILLSVIIIPRARAKNLNSPHGTFLGFVKL 250

B

APRIL 117 VILHVPINATSKDDS.....DVTEVMQDPA.LRRRGVQA....QGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFIMQQWSREQQGRQETLFCIRSM.....FTMGGV

TNfa 89 VAHVANPQAEQ.....QONLR...RNNALANGVELRNDQATVPSEGIAYLLYSQVLEKGCQCPS.....THVLLTHT

LT 3 64 AHHLDOPSKQNS.....LLARAN...TDRAFDQDGFSLNNSUNVPTSGIYFVSQVFSGKAYSPKATSSFTYCAHEV

FASL 146 VAHLTQKSNRSMP.....DEBEDT..YGVULSGVKY.KGCAVNETGIAYFYSKVAFERGQSCN.....NIPESKV

TRAIL 123 AHHFTGRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSMESSR.SCHSFUSNLHL.RKGBLVHEKGFYIYSQVTFERFQEIK.....ENTKNDJON

TWEAK 143 AHHYEVHPRPQDGAQGV.....DGTVSQWEKARINSSSPRYNR..QIGEFIVTRAGIAYLQVAFDEGRAVY..LKLDLNDGV

TRANCE 164 FHLTINATDIPSGSH.....KVSLSQVYHD..RQWGRISNMTF.SNGKLVNQDGFYLYRNICFHHIETSGDLATEYDQWYV

APRIL 182 VSREGOG...RQETLFCIRSM.....SHPRAYNSCYSAGVFHLHQGDILLSVIIIPRARAKNLNSPHGTFLGFVKL

TNfa 157 SRIAVS...OTKMAISAIKSPQRETPEGAEPWYERYLGGVQJERQDRUSAEIWRPDYQDFAESGQVREGIAG

LT 3 136 QLFSSQ...BFHUPDASSQKV.....YPGLOEPMHLHSNIGAFQLVQDQDSHTDQIPHAVLSP.STVFEGBAL

FASL 212 YHNSRQ...QDAMMEGKMS.....YCTTQOMWARSYLGAVFNLTSADHLVYNVSELSIVAFEE.SQTEFGJML

TRAIL 189 VQYIYKQTSVEDPFLJUKSARNS.....QWSDAEYGLYSTYCGGIPERKNDRIEVSUTNEHLQMDH.EASFEGBEV

TWEAK 223 ALRCLEE...FSATAASSLP.....QLRLCOVSQLAURGSSSRRTLTPWAHCKAAP.FLTXYGLFOV

TRANCE 242 TKTSIKI...BSHTEKGGSTK.....YMSGNSEFHFYSTNVGGFENRSGEESISEISNPSILQDPDQ.DATVEGAENV

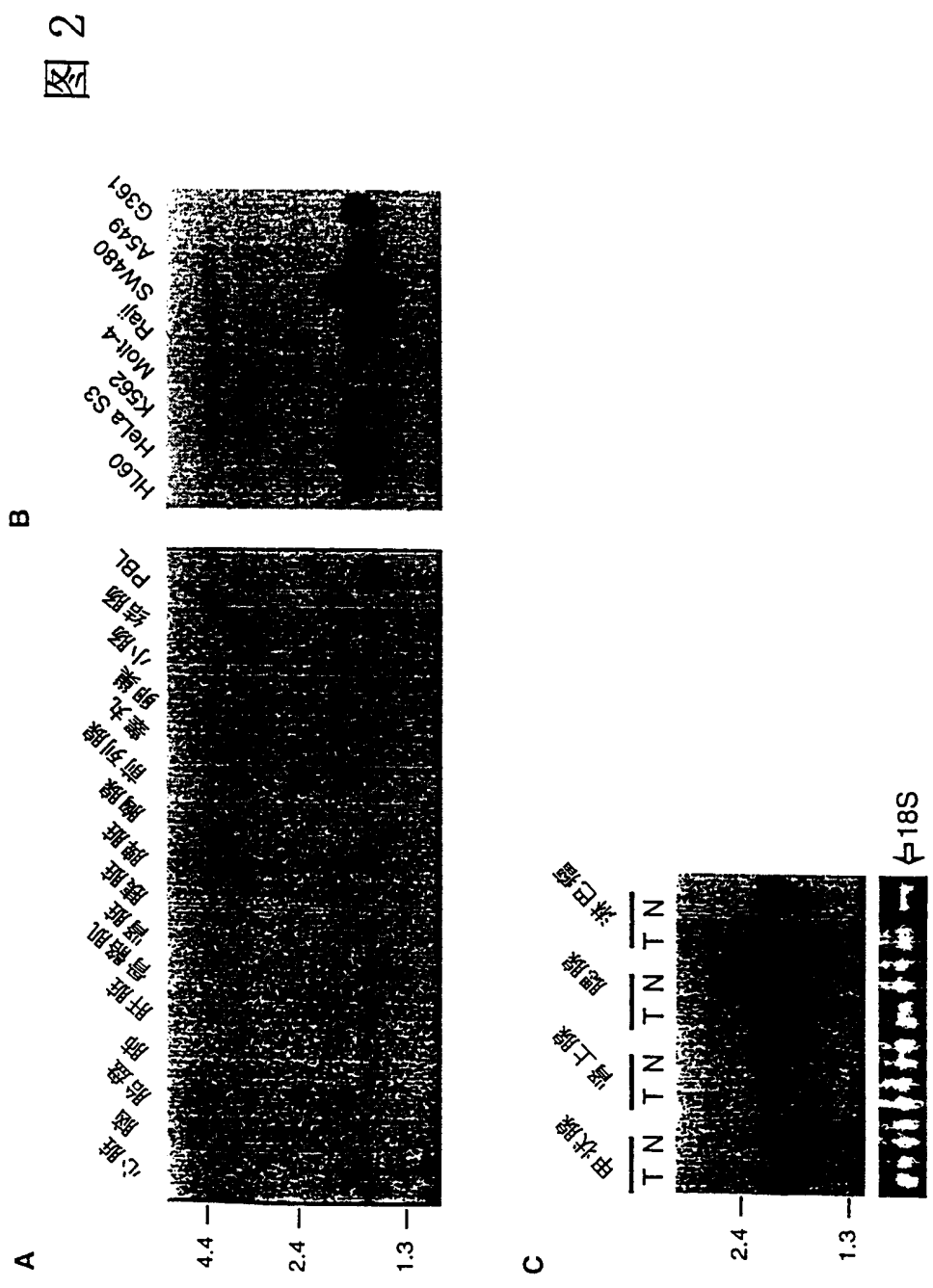


图 2

图 2

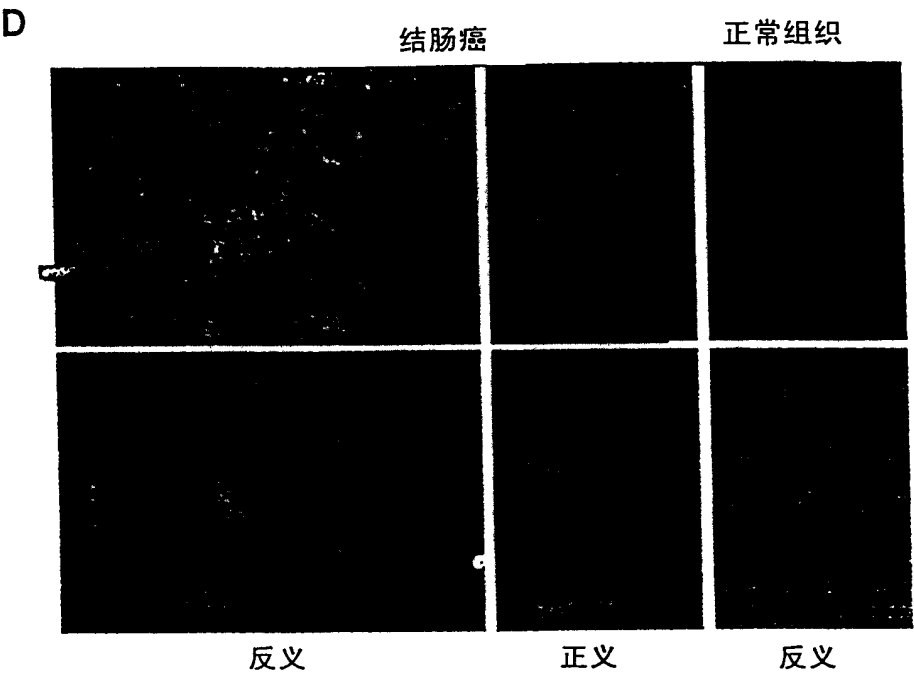


图 3

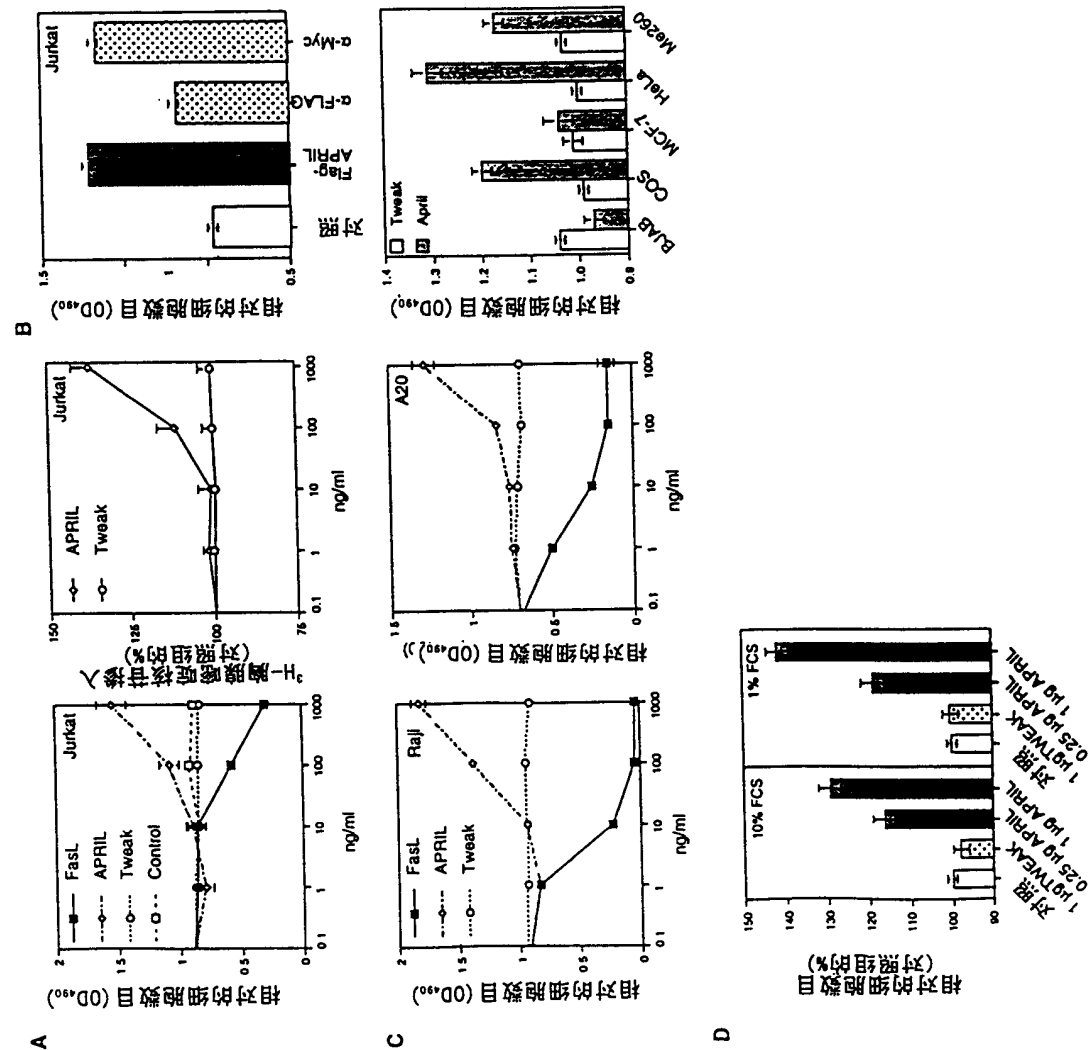


图 4

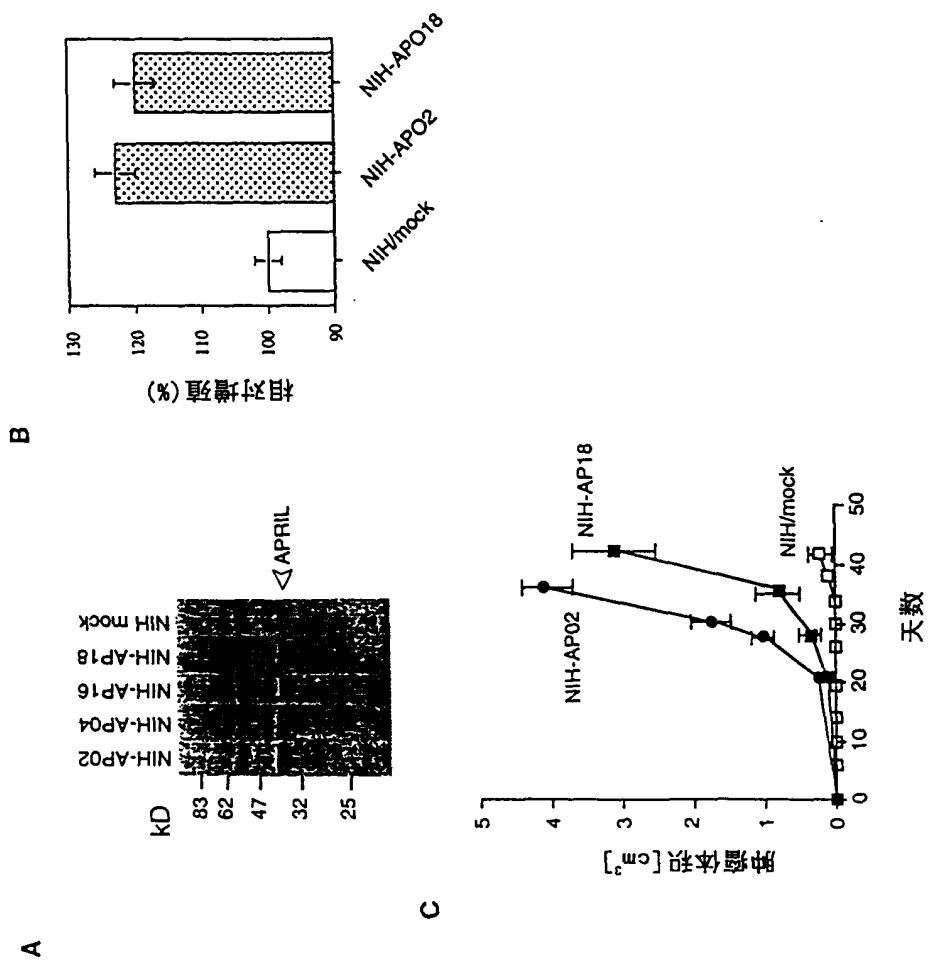


图 5

人和小鼠 APRIL 的比较

```

hAPRIL      .....
mAPRIL      MGGPVPREPALSVALWLSWGAALGAVACAMALLT
             MGGSVREPALSVALWLSWGAVLGAVTCAVALLI
             .....
hAPRIL      QQTELQSLRREVSRLQGTGGPSQNGEGYPWQSLPEQSSDALEAWENGERS
mAPRIL      QQTELQTLRREVSRLQRSGGPSQKQGERPWQSLWEQSPDVLEAWKDGAKS
             .....
hAPRIL      RKRRAVLTQKQKKQHSLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQA
mAPRIL      RRRRAVLTQKHKKKHSLHLVPVNITSKD-SDVTEVMWQPVLLRRGRGLEA
             .....
hAPRIL      QGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFR CIRSM
mAPRIL      QGDIVRVWDTGIYLLYSQVLFHDVTFTMGQVVSREGQGRRET LFR CIRSM
             .....
hAPRIL      PSHPDRAYN SCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHGTFLGFVKL
mAPRIL      PSDPDRAYN SCYSAGVFHLHQGDIITVKIPRANA KLNLSPHGTFLGFVKL

```