



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101247825 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 01

(21) 申请号 200680009970. 1

C12N 15/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 01. 31

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/649, 550 2005. 02. 02 US

US 6113898 A, 2000. 09. 05, 全文.

11/344, 564 2006. 01. 30 US

US 6468532 B1, 2002. 10. 22, 摘要.

审查员 吴立

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2007. 09. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/003577 2006. 01. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02006/083971 EN 2006. 08. 10

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 卡姆利亚·W·亚当斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书68页

C12N 5/00 (2006. 01)

序列表29页 附图36页

(54) 发明名称

DR5 抗体及其用途

(57) 摘要

本发明关注具有改良特性的抗 DR5 抗体、包含此类抗体的组合物、用于制备此类抗体的方法和手段、及其治疗性用途,特别是在癌症的治疗中。

16E2和Apomab 7.3的氨基酸对比

16E2	1	EVQLVDSGGVERKGGSLRLSCAASGFTIDYQHW
Apomab 7.3	1	EVQLVDSGGVERKGGSLRLSCAASGFTFDYAMN
16E2	37	VHQAPGKGLDWVSGINWNGSGTCYADSVKRVITGRNARNSLYQMHSL
Apomab 7.3	37	VHQAPGKGLDWVSGINWNGSGTCYADSVKRVITGRNARNSLYQMHSL
16E2	87	RAEDTAVYICAKILGAGRGWTFDHWGSGTIVTSASSTKGFVFLAEGS
Apomab 7.3	87	RAEDTAVYICAKILGAGRGWTFDHWGSGTIVTSASSTKGFVFLAEGS
16E2	137	KSTGGSTALGCLVNDVFRFVTVGHSISGALTGQWTFQVLSHLSL
Apomab 7.3	137	KSTGGSTALGCLVNDVFRFVTVGHSISGALTGQWTFQVLSHLSL
16E2	187	SSVTVVSSSLGTQYICNVNKKFNTNKKVYKPKSCDVKVCFPCZAP
Apomab 7.3	187	SSVTVVSSSLGTQYICNVNKKFNTNKKVYKPKSCDVKVCFPCZAP
16E2	237	ELLGSGFVFLFPKPKPTLMISRFETVTCVVOVSHEDFVKNNWYDGV
Apomab 7.3	237	ELLGSGFVFLFPKPKPTLMISRFETVTCVVOVSHEDFVKNNWYDGV
16E2	287	EVHNAKTKFRLSQKNTYKPVSVLTVLQKQLNKKVECKVSNKLLPFI
Apomab 7.3	287	EVHNAKTKFRLSQKNTYKPVSVLTVLQKQLNKKVECKVSNKLLPFI
16E2	337	EKTISAKKQPRPQVYTLFPRSEINTNQNQLTCLVNGETPSDLAVENS
Apomab 7.3	337	EKTISAKKQPRPQVYTLFPRSEINTNQNQLTCLVNGETPSDLAVENS
16E2	387	SNQGFENKNTTTPVLDGSGFTLSKLTVDKSKHQQNVFSCVHREAL
Apomab 7.3	387	SNQGFENKNTTTPVLDGSGFTLSKLTVDKSKHQQNVFSCVHREAL
16E2	437	HHHTYQKSLSPGR
Apomab 7.3	437	HHHTYQKSLSPGR

1. 抗 DR5 抗体或其片段,其在 SEQ ID NO:11 和 13 分别所示全长抗体 16E2 的重链和轻链中包含突变,其中所述抗体或抗体片段具有比全长抗体 16E2 更高的对 DR5 的亲合力且能够在癌细胞中激活或刺激凋亡,且所述突变包含

氨基酸序列 SEQ ID NO:11 中选自下组的一组重链突变:(i)N53Q, L102Y;(ii)M34L, N53Q, L102Y;(iii)N53Y, L102Y;(iv)M34L, N53Y, L102Y;(v)G33A, N53Q, L102Y;(vi)M34L, N53Y, L102Y;(vii)G33A, N53Y, L102Y;(viii)T28A, N53Q, L102Y;和 (ix)T28A, N53Y, L102Y;及氨基酸序列 SEQ ID NO:13 中选自下组的一组轻链突变:(i)Q24S, G50K, K51D, N52S, N53E, H95bY;(ii)Q24S, K51A, D92S, S93Y;和 (iii)Q24S, K51A, R91A。

2. 权利要求 1 的抗 DR5 抗体或其片段,其中所述抗体或抗体片段与全长抗体 16E2 结合相同的表位。

3. 权利要求 1 的抗 DR5 抗体或其片段,其还包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11 所示全长 16E2 抗体重链可变区框架中的一或多处突变。

4. 权利要求 3 的抗 DR5 抗体或其片段,其中所述框架突变选自下组:Q6E、V11L、E12V、R13Q、和 K105Q。

5. 权利要求 4 的抗 DR5 抗体或其片段,其包含所有框架突变 Q6E、V11L、E12V、R13Q、和 K105Q。

6. 权利要求 1-5 任一项的抗 DR5 抗体或其片段,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11 中的至少一处突变 G99A 和 R100A。

7. 权利要求 1 的抗 DR5 抗体或其片段,其包含下述突变:序列 SEQ ID NO:11 中的 G33A, N53Q, L102Y 和序列 SEQ ID NO:13 中的 Q24S, K51A, R91A。

8. 权利要求 1 的抗 DR5 抗体或其片段,其包含下述突变:序列 SEQ ID NO:11 中的 G33A, N53Y, L102Y 和序列 SEQ ID NO:13 中的 Q24S, K51A, R91A。

9. 权利要求 1-8 任一项的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述片段选自下组:Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段、双抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

10. 权利要求 9 的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述抗体是单链抗体。

11. 权利要求 9 的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述片段是 Fv 片段。

12. 权利要求 1-11 任一项的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述抗体具有比全长抗体 16E2 更高的抗癌活性。

13. 权利要求 1-12 任一项的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述抗体具有比全长抗体 16E2 更高的效力,该效力是在体外肿瘤杀伤测定法中测定的。

14. 权利要求 1-13 任一项的抗 DR5 抗体或抗体片段,其是嵌合的、人源化的或人的抗体。

15. 权利要求 1-14 任一项的抗 DR5 抗体或抗体片段,其介导抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。

16. 权利要求 1-15 任一项的抗 DR5 抗体或其片段,其是二聚体的形式。

17. 权利要求 1-16 任一项的抗 DR5 抗体或其片段,其与抗人 IgG Fc 区交联。

18. 权利要求 1-17 任一项的抗 DR5 抗体或抗体片段,其与表位标签序列融合。

19. 嵌合分子,其包含与异源氨基酸序列融合的权利要求 1-18 任一项的抗体。

20. 权利要求 19 的嵌合分子,其中所述异源氨基酸序列包括免疫球蛋白序列。

21. 权利要求 20 的嵌合分子,其中所述免疫球蛋白序列是抗人 IgG Fc 区。
22. 权利要求 1-18 任一项的抗 DR5 抗体或抗体片段,其用于治疗。
23. 权利要求 22 的抗 DR5 抗体或抗体片段,其用于治疗癌症。
24. 权利要求 23 的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述癌选自下组:癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。
25. 权利要求 23 的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述癌选自下组:鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、非何杰金氏淋巴瘤、母细胞瘤、胃肠癌、肾癌(renal cancer)、卵巢癌、肝脏癌(liver cancer)、胃癌、膀胱癌、肝癌(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌(kidney cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、及头和颈癌。
26. 权利要求 25 的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述癌症是 NSCLC、非何杰金氏淋巴瘤、结肠直肠癌或胰腺癌。
27. 权利要求 24 的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述癌症是腺癌。
28. 权利要求 27 的抗 DR5 抗体或抗体片段,其中所述腺癌是结肠直肠癌、胰腺癌或转移性腺癌。
29. 分离的核酸,其编码权利要求 1-18 任一项的抗 DR5 抗体或其片段的重链或轻链。
30. 载体,其包含权利要求 29 的核酸。
31. 宿主细胞,其包含权利要求 29 的核酸。
32. 生产权利要求 1-18 任一项的抗 DR5 抗体的方法,包括在 DNA 表达的条件下培养权利要求 31 的宿主细胞。
33. 用于治疗癌症的组合物,其包含权利要求 1-18 任一项的抗 DR5 抗体或其片段,及载体,其中所述癌症为结肠直肠癌、淋巴瘤、胰腺癌或肺癌。
34. 权利要求 33 的组合物,其中所述载体是药学可接受的载体。
35. 权利要求 34 的组合物,还包含另外的抗癌剂。
36. 权利要求 35 的组合物,其中所述另外的抗癌剂是抗体。
37. 权利要求 36 的组合物,其中所述抗体选自下组:另外的抗 DR5 抗体、Rituxan(rituximab) 和抗 VEGF 抗体。
38. 权利要求 35 的组合物,其中所述另外的抗癌剂是化疗剂。
39. 权利要求 38 的组合物,其中所述化疗剂选自下组:CPT-11(伊立替康)、吉西他滨、卡铂、泰素和紫杉醇。
40. 权利要求 35 的组合物,其中所述另外的抗癌剂是包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 114-281 的 Apo2L 配体。
41. 权利要求 1-18 任一项的抗 DR5 抗体或其片段在制备用于诱导凋亡的药物中的用途,所述诱导包括使哺乳动物癌细胞暴露于权利要求 1-18 任一项的抗 DR5 抗体或其片段。
42. 权利要求 41 的用途,其中使所述哺乳动物癌细胞暴露于活化 DR5 的药剂。
43. 权利要求 1-18 任一项的抗 DR5 抗体或其片段在制备用于治疗癌症的药物中的用途,所述治疗包括对哺乳动物受试者施用有效量的权利要求 1-18 任一项的抗 DR5 抗体或其片段,其中所述癌症为结肠直肠癌、淋巴瘤、胰腺癌或肺癌。
44. 权利要求 43 的用途,其中所述哺乳动物受试者是人类受试者。

45. 权利要求 43 或 44 的用途,其中所述癌症选自下组:鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、非何杰金氏淋巴瘤、母细胞瘤、结肠癌、结肠直肠癌、和胰腺癌。

46. 权利要求 45 的用途,其中所述癌症是 NSCLC、结肠直肠癌、非何杰金氏淋巴瘤或胰腺癌。

47. 权利要求 43 或 44 的用途,其中所述癌症是腺癌。

48. 权利要求 47 的用途,其中所述腺癌是结肠直肠癌、胰腺癌或转移性腺癌。

49. 权利要求 43-48 任一项的用途,还包括施用另外的抗癌剂。

50. 用于治疗癌症的试剂盒,包括容器和装在所述容器中的组合物,其中所述组合物包含权利要求 1-18 任一项的抗 DR5 抗体或其片段,其中所述癌症为结肠直肠癌、淋巴瘤、胰腺癌或肺癌。

51. 权利要求 50 的试剂盒,还包括在体外或在体内使用抗 DR5 抗体的说明书。

52. 权利要求 51 的试剂盒,其中所述说明书说明对癌症的治疗。

DR5 抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明主要涉及 DR5 抗体,包括激动性抗体,及使用此类 DR5 抗体的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 本领域已经鉴定了属于肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族的多种配体和受体。在这些配体中有肿瘤坏死因子- α (“TNF- α ”)、肿瘤坏死因子- β (“TNF- β ”或“淋巴毒素- α ”)、淋巴毒素- β (“LT- β ”)、CD30 配体、CD27 配体、CD40 配体、OX-40 配体、4-1BB 配体、LIGHT、Apo-1 配体 (也称作 Fas 配体或 CD95 配体)、Apo-2 配体 (也称作 Apo2L 或 TRAIL)、Apo-3 配体 (也称作 TWEAK)、APRIL、OPG 配体 (也称作 RANK 配体、ODF 或 TRANCE) 和 TALL-1 (也称作 BlyS、BAFF 或 THANK) (参见例如 Ashkenazi, Nature Review, 2:420-430 (2002); Ashkenazi and Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi and Dixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997); Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, pages 377-411; Locksley et al., Cell, 104:487-501 (2001); Gruss and Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Schmid et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 83:1881 (1986); Dealtry et al., Eur. J. Immunol., 17:689 (1987); Pitti et al., J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996); Wiley et al., Immunity, 3:673-682 (1995); Browning et al., Cell, 72:847-856 (1993); Armitage et al., Nature, 357:80-82 (1992); W097/01633, 公开于 1997 年 1 月 16 日; W097/25428, 公开于 1997 年 7 月 17 日; Marsters et al., Curr. Biol., 8:525-528 (1998); Chicheportiche et al., Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997); Hahne et al., J. Exp. Med., 188:1185-1190 (1998); W098/28426, 公开于 1998 年 7 月 2 日; W098/46751, 公开于 1998 年 10 月 22 日; W098/18921, 公开于 1998 年 5 月 7 日; Moore et al., Science, 285:260-263 (1999); Shu et al., J. Leukocyte Biol., 65:680 (1999); Schneider et al., J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999))。

[0004] 由这些 TNF 家族配体介导的多种细胞应答的诱发通常是通过它们与特定细胞受体结合而开始的。有些但非所有 TNF 家族配体结合细胞表面“死亡受体”,并由此诱发多种生物学活动以激活胱天蛋白酶或者执行细胞死亡或凋亡途径的酶 (Salvesen et al., Cell, 91:443-446 (1997))。在迄今为止已经鉴定的 TNF 受体超家族成员中包括 TNFR1、TNFR2、TACI、GITR、CD27、OX-40、CD30、CD40、HVEM、Fas (也称作 Apo-1 或 CD95)、DR4 (也称作 TRAIL-R1)、DR5 (也称作 Apo-2 或 TRAIL-R2)、DcR1、DcR2、护骨蛋白 (OPG)、RANK 和 Apo-3 (也称作 DR3 或 TRAMP) (参见例如 Ashkenazi, Nature Reviews, 2:420-430 (2002); Ashkenazi and Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi and Dixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997); Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, pages 377-411; Locksley et al., Cell, 104:487-501 (2001); Gruss and Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Hohman et al., J. Biol. Chem., 264:14927-14934 (1989); Brockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3127-3131 (1990); EP417, 563, 公开于 1991 年 3 月 20 日; Loetscher et al.,

Cell,61:351(1990);Schall et al., Cell,61:361(1990);Smith et al., Science, 248:1019-1023(1990);Lewis et al., Proc.Natl.Acad.Sci.,88:2830-2834(1991); Goodwin et al., Mol.Cell.Biol.,11:3020-3026(1991);Stamenkovic et al., EMBO J., 8:1403-1410(1989);Mallett et al., EMBO J.,9:1063-1068(1990);Anderson et al., Nature,390:175-179(1997);Chicheportiche et al., J.Biol.Chem.,272:32401-32410 (1997);Pan et al., Science,276:111-113(1997);Pan et al., Science,277: 815-818(1997);Sheridan et al., Science,277:818-821(1997);Degli-Esposti et al., J.Exp.Med.,186:1165-1170(1997);Marsters et al., Curr.Biol.,7:1003-1006(1997); Tsuda et al., BBRC,234:137-142(1997);Nocentini et al., Proc.Natl.Acad.Sci.,94: 6216-6221(1997);vonBulow et al., Science,278:138-141(1997))。

[0005] 大多数这些 TNF 受体家族成员共享细胞表面受体的典型结构,包括胞外区、跨膜区和胞内区,而其它成员则天然发现是缺少跨膜和胞内结构域的可溶性蛋白质。典型 TNFR 的胞外部分包含从 NH₂-末端起始的多个富含半胱氨酸结构域(CRD)的重复氨基酸序列。

[0006] 数年前,将称作 Apo2L 或 TRAIL 的配体鉴定为 TNF 细胞因子家族的成员(参见例如 Wiley et al., Immunity,3:673-682(1995);Pitti et al., J.Biol.Chem.,271: 12697-12690(1996);W097/01633;W097/25428;美国专利 5,763,223,授权于 1998 年 6 月 9 日;美国专利 6,284,236,授权于 2001 年 9 月 4 日)。全长天然序列人 Apo2L/TRAIL 多肽是 281 个氨基酸的 II 型跨膜蛋白质。有些细胞能通过酶促切割多肽的胞外区来生成天然的可溶形式多肽(Mariani et al., J.Cell.Biol.,137:221-229(1997))。对可溶形式 Apo2L/TRAIL 的晶体学研究揭示了与 TNF 和其它相关蛋白质结构类似的同三聚体结构(Hymowitz et al., Molec.Cell,4:563-571(1999);Cha et al., Immunity,11:253-261(1999); Mongkolsapaya et al., Nature Structural Biology,6:1048(1999);Hymowitz et al., Biochemistry,39:633-644(2000))。但是,与其它 TNF 家族成员不同,发现 Apo2L/TRAIL 具有独特的结构特征,即三个半胱氨酸残基(同三聚体中各个亚基的第 230 位)一起与锌原子配位,而且锌结合对于三聚体稳定性和生物学活性来说是重要的(Hymowitz et al.,见上文;Bodmer et al., J.Biol.Chem.,275:20632-20637(2000))。

[0007] 文献中已有报道,Apo2L/TRAIL 可能在免疫系统的调节中起作用,包括自身免疫病,诸如类风湿性关节炎(参见例如 Thomas et al., J.Immunol.,161:2195-2200(1998); Johnsen et al., Cytokine,11:664-672(1999);Griffith et al., J.Exp.Med.,189: 1343-1353(1999);Song et al., J.Exp.Med.,191:1095-1103(2000))。

[0008] 还有报道,可溶形式的 Apo2L/TRAIL 在多种癌细胞中诱导凋亡,包括结肠、肺、乳房、前列腺、膀胱、肾、卵巢和脑肿瘤,以及黑素瘤、白血病和多发性骨髓瘤(参见例如 Wiley et al.,见上文;Pitti et al.,见上文;美国专利 6,030,945,授权于 2000 年 2 月 29 日;美国专利 6,746,668,授权于 2004 年 6 月 8 日;Rieger et al., FEBS Letters,427:124-128(1998);Ashkenazi et al., J.Clin.Invest.,104:155-162(1999); Walczak et al., Nature Med.,5:157-163(1999);Keane et al., Cancer Research, 59:734-741(1999);Mizutani et al., Clin.Cancer Res.,5:2605-2612(1999);Gazitt, Leukemia,13:1817-1824(1999);Yuet al., Cancer Res.,60:2384-2389(2000); Chinnaiyan et al., Proc.Natl.Acad.Sci.,97:1754-1759(2000))。鼠肿瘤模型的体内

研究还表明,单独使用 Apo2L/TRAIL 或者与化疗或放疗联合能发挥实质性的抗肿瘤作用(参见例如 Ashkenazi et al.,见上文;Walzcak et al.,见上文;Gliniak et al.,*Cancer Res.*,59:6153-6158(1999);Chinnaiyan et al.,见上文;Roth et al.,*Biochem.Biophys. Res. Comm.*,265:1999(1999);PCT 申请 US/00/15512;PCT 申请 US/01/23691)。与许多类型的癌细胞相反,大多数正常人细胞类型表现出对某些重组形式 Apo2L/TRAIL 诱导的凋亡有抗性(Ashkenazi et al.,见上文;Walzcak et al.,见上文)。Jo 等人报道,多组氨酸标记的可溶形式 Apo2L/TRAIL 在体外在分离的正常人肝细胞中诱导凋亡,非人源的则不然(Jo et al.,*Nature Med.*,6:564-567(2000);Nagata,*Nature Med.*,6:502-503(2000))。认为,某些重组 Apo2L/TRAIL 制备物在生物化学特性和生物学活性方面对患病细胞和正常细胞可有所不同,这取决于例如标签分子的存在与否、锌含量和三聚体含量百分比(参见 Lawrence et al.,*Nature Med.*,Letter to the Editor,7:383-385(2001);Qin et al.,*Nature Med.*,Letter to the Editor,7:385-386(2001))。

[0009] 已经发现 Apo2L/TRAIL 结合至少五种不同受体。至少两种结合 Apo2L/TRAIL 的受体包含功能性胞质死亡结构域。一种这样的受体称作“DR4”(或称作 TR4 或 TRAIL-R1)(Pan et al.,*Science*,276:111-113(1997);W098/32856,公开于1998年7月30日;W099/37684,公开于1999年7月29日;W000/73349,公开于2000年12月7日;US6,433,147,授权于2002年8月13日;US6,461,823,授权于2002年10月8日;US6,342,383,授权于2002年1月29日)。

[0010] 另一种这样的 Apo2L/TRAIL 受体称作 DR5(或称作 Apo-2、TRAIL-R 或 TRAIL-R2、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2、或 KILLER)(参见例如 Sheridan et al.,*Science*,277:818-821(1997);Pan et al.,*Science*,277:815-818(1997);W098/51793,公开于1998年11月19日;W098/41629,公开于1998年9月24日;Screaton et al.,*Curr.Biol.*,7:693-696(1997);Walczak et al.,*EMBO J.*,16:5386-5387(1997);Wu et al.,*Nature Genetics*,17:141-143(1997);W098/35986,公开于1998年8月20日;EP870,827,公开于1998年10月14日;W098/46643,公开于1998年10月22日;W099/02653,公开于1999年1月21日;W099/09165,公开于1999年2月25日;W099/11791,公开于1999年3月11日;US2002/0072091,公开于2002年8月13日;US2002/0098550,公开于2001年12月7日;US6,313,269,授权于2001年12月6日;US2001/0010924,公开于2001年8月2日;US2003/01255540,公开于2003年7月3日;US2002/0160446,公开于2002年10月31日;US2002/0048785,公开于2002年4月25日;US6,342,369,授权于2002年2月;US6,569,642,授权于2003年5月27日;US6,072,047,授权于2000年6月6日;US6,642,358,授权于2003年11月4日;US6,743,625,授权于2004年6月1日)。像 DR4 一样,DR5 据报道包含其胞外部分中的三个富含半胱氨酸结构域和单个胞质死亡结构域且能够通过配体结合(或者通过结合诸如模拟配体活性的激动性抗体等分子)发出凋亡信号。Apo-2L/TRAIL 和 DR5 之间形成的复合物的晶体结构描述于 Hymowitz et al.,*Molecular Cell*,4:563-571(1999)。

[0011] 配体结合后,DR4 和 DR5 都能经由称作 FADD/Mort1 的含死亡结构域的衔接分子通过募集和活化凋亡起始物胱天蛋白酶-8 而独立引发凋亡(Kischkel et al.,*Immunity*,12:611-620(2000);Sprick et al.,*Immunity*,12:599-609(2000);Bodmer et al.,*Nature*

Cell Biol., 2:241-243(2000))。具体而言, DR5 通过“细胞外在 (cell extrinsic)”途径发出凋亡信号, 它不依赖 p53 肿瘤抑制基因 (Ashkenazi and Dixit, Science 281:1305-8(1998); Ashkenazi, Nat Rev Cancer 2:420-30(2002))。此途径的激活牵涉在活化的受体的胞质死亡结构域处迅速形成诱导死亡的信号复合物 (DISC)。首先, 衔接分子 FADD 通过嗜同性死亡结构域相互作用结合 DR5 (Kischkel et al., supra; Sprick et al., supra; Bodmer et al., supra)。接着, FADD 募集启动凋亡的蛋白酶, 胱天蛋白酶 -8 和胱天蛋白酶 -10, 通过诱导接近 (proximity) 介导它们活化。胱天蛋白酶 -9 和胱天蛋白酶 -10 进行自我装配, 将可溶性活性胱天蛋白酶亚基释放到胞质中, 在此它们装配并切割效应物胱天蛋白酶, 诸如胱天蛋白酶 -3 和胱天蛋白酶 -7。切割导致效应物胱天蛋白酶的活化, 它们执行凋亡 (apoptosis) 细胞程序 (Thomberry and Lazebnik, Science 281:1312-6(1998))。

[0012] Apo2L/TRAIL 据报道还结合那些称作 DcR1、DcR2 和 OPG 的受体, 认为这些受体发挥信号传递的抑制物而非转换器的功能 (参见例如 DCR1 (也称作 TRID、LIT 或 TRAIL-R3) (Pan et al., Science, 276:111-113(1997); Sheridan et al., Science, 277:818-821(1997); McFarlane et al., J. Biol. Chem., 272:25417-25420(1997); Schneider et al., FEBS Letters, 416:329-334(1997); Degli-Esposti et al., J. Exp. Med., 186:1165-1170(1997); Mongkolsapaya et al., J. Immunol., 160:3-6(1998)); DCR2 (也称作 TRUND 或 TRAIL-R4) (Marsters et al., Curr. Biol., 7:1003-1006(1997); Pan et al., FEBS Letters, 424:41-45(1998); Degli-Esposti et al., Immunity, 7:813-820(1997)); 和 OPG (Simonet et al., 见上文))。与 DR4 和 DR5 相反, DcR1 和 DcR2 受体不发出凋亡信号。

[0013] 文献中已经报道了某些与 DR4 和 / 或 DR5 受体结合的抗体。例如, 针对 DR4 受体且在某些哺乳动物细胞中具有激动或凋亡活性的抗 DR4 抗体描述于例如 W099/37684, 公开于 1999 年 7 月 29 日; W000/73349, 公开于 2000 年 7 月 12 日; W003/066661, 公开于 2003 年 8 月 14 日。还可参见例如 Griffith et al., J. Immunol., 162:2597-2605(1999); Chuntharapai et al., J. Immunol., 166:4891-4898(2001); W002/097033, 公开于 2002 年 12 月 2 日; W003/042367, 公开于 2003 年 5 月 22 日; W003/038043, 公开于 2003 年 5 月 8 日; W003/037913, 公开于 2003 年 5 月 8 日。同样已经描述了某些抗 DR5 抗体, 参见例如 W098/51793, 公开于 1998 年 11 月 8 日; Griffith et al., J. Immunol., 162:2597-2605(1999); Ichikawa et al., Nature Med., 7:954-960(2001); Hylander et al., “An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice”, Abstract, 2d International Congress on Monoclonal Antibodies in Cancers, Aug. 29-Sept. 1, 2002, Banff, Alberta, Canada; W003/038043, 公开于 2003 年 5 月 8 日; W003/037913, 公开于 2003 年 5 月 8 日。另外, 已经描述了某些对 DR4 和 DR5 受体都具有交叉反应性的抗体 (参见例如美国专利 6,252,050, 授权于 2001 年 6 月 26 日)。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明提供了 DR5 抗体, 其能够特异性结合人 DR5 和 / 或能够调控与 DR5 和 / 或其配体有关的生物学活性, 特别是凋亡, 因而可用于治疗多种疾病和病理学疾患, 包括癌症或免疫相关疾病。

[0016] 一方面,本发明关注抗 DR5 抗体或其片段,其包含全长抗体 16E2 的重链和 / 或轻链 (分别是 SEQ ID NO :11 和 13) 中的至少一处突变,其中所述抗体或抗体片段显示出至少与抗体 16E2 相同的对 DR5 的亲合力,和 / 或展现出至少与抗体 16E2 相同的生物学活性和 / 或潜能。在一个具体的实施方案中,所述抗体或抗体片段将与全长抗体 16E2 结合基本上相同的表位。在另一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体将展现出比全长抗体 16E2 更高的对 DR5 的亲合力,和 / 或显示出相对于全长抗体 16E2 升高的生物学活性和 / 或升高的潜能。在还有一个实施方案中,本发明的抗 DR5 抗体和抗体片段显示出至少与 W098/51793 中记载的单链 Fc 抗 DR5 抗体 16E2 相同的对 DR5 的亲合力和 / 或展现出至少与 W098/51793 中记载的单链 Fc 抗 DR5 抗体 16E2 相同的生物学活性和 / 或潜能。

[0017] 在一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体包含具有表 1-7 和 9-12 中任一所列至少一处替代的重链和 / 或轻链。

[0018] 在另一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体包含 16E2 抗体重链可变区框架中的一处或多处突变。

[0019] 在还有一个实施方案中,所述 DR5 抗体包含选自下组的框架突变 :Q6E、V11L、E12V、R13Q 和 K105Q。

[0020] 在另一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体包含如下所有框架突变 :Q6E、V11L、E12V、R13Q 和 K105Q。

[0021] 在还有一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体或其片段包含全长抗体 16E2 重链 (SEQ ID NO :11) 中的至少一处突变。

[0022] 在一个不同的实施方案中,所述抗 DR5 抗体或其片段包含选自下组的至少一处突变 :氨基酸序列 SEQ ID NO :11 中的 T28A、G33A、M34L、M34A、M34I、M34S、N53Q、N53Y 和 L102Y。

[0023] 在另一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体或其片段包含氨基酸序列 SEQ ID NO :11 中的 G99A 和 R100A 中的至少一处突变。

[0024] 在还有一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体或其片段包含选自下组的一组突变 :氨基酸序列 SEQ ID NO :11 中的 (i)N53Q, L102Y ;(ii)M34L, N53Q, L102Y ;(iii)N53Y, L102Y ;(iv)M34L, N53Y, L102Y ;(v)G33A, N53Q, L102Y ;(vi)M34L, N53Y, L102Y ;(vii)G33A, N53Q, L102Y ;(viii)G33A, N53Y, L102Y ;(ix)T28A, N53Q, L102Y ;及 (x)T28A, N53Y, L102Y。

[0025] 在另一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体或其片段包含全长 16E2 抗体轻链 (SEQ ID NO :13) 中的至少一处突变。

[0026] 在一个具体的实施方案中,所述轻链是 λ 链。

[0027] 在另一个具体的实施方案中,所述轻链突变在 CDR L1 中。

[0028] 在另一个实施方案中,所述轻链突变选自下组 :氨基酸序列 SEQ ID NO :13 中的 Q24A、Q24S、G25A、D26E、S27A、L28A、R29A、S30A、Y31A、Y31K、Y32H、A33G、S34A 和 S34Y。

[0029] 在还有一个实施方案中,所述轻链突变选自下组 :氨基酸序列 SEQ ID NO :13 中的 (i)Q24S, D26E, Y31K, S34Y ;及 (ii)D26E, Y31K。

[0030] 在一个不同的实施方案中,所述轻链突变在 CDR L2 中。

[0031] 因而,例如,所述突变可选自下组 :氨基酸序列 SEQ ID NO :13 中的 G50A、G50K、G50S、K51D、N52A、N52S、N52L、N52Q、N53A、N53E、N53Q、N53S、P55A 和 S56A。

[0032] 在另一个实施方案中,所述抗体可包含选自下组的一组突变 :氨基酸序列 SEQ ID

NO:13 中的 (i)G50K, K52S, N53E ;(ii)G50S, K51D, N52S, N53E ;(iii)N52S, N53E ;及 (iv) N52Q, N53S。

[0033] 在另一个实施方案中,所述轻链突变在 CDR L3 中。

[0034] 在还有一个实施方案中,所述抗体包含选自下组的至少一处突变:氨基酸序列 SEQ ID NO:13 中的 N89A、N89L、N89Q、R91A、S93A、N95aA、N95aT、N95aQ、H95bA、N95bY、V96A、V97A。

[0035] 或者,所述抗 DR5 抗体可包含选自下组的一组突变:氨基酸序列 SEQ IDNO:13 中的 (i)N89L, R91A, N95aT, H95bY ;及 (ii)N95aT, H95bY。

[0036] 在另一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体包含选自下组的一组轻链突变:氨基酸序列 SEQ ID NO:13 中的 (i)Q24S, G50K, K51D, H95bY ;(ii)Q24S, K51A, D92S, S93Y ;及 (iii) Q24S, K51A, R91A, 而且还可包含选自下组的一组重链突变:氨基酸序列 SEQ ID NO:11 中的 (i)M34L, N53Q, L102Y ;(ii)M34L, N53Y, L102Y ;(iii)G33A, N53Q, L102Y ;(iv)G33A, N53Y, L102Y ;(v)M34L, N53Q, L102Y ;(vi)M34L, N53Y, L103Y ;(vii)G33A, N53Q, L102Y ;(viii) G33A, N53Y, L102Y ;及 (ix)T28A, N53Q, L102Y, 以及任选表 5 所列的一组框架突变。

[0037] 在一个具体的实施方案中,所述抗 DR5 抗体包含如下突变:序列 SEQ IDNO:11 中的 G33A、N53Q、L102Y 及序列 SEQ ID NO:13 中的 Q24S、K51A、R91A, 而且还可包含至少一处框架突变,它可以是例如 SEQ ID NO:11 中的残基 6、11、12、13 和 105 中的至少一个。

[0038] 在一个具体的实施方案中,所述抗 DR5 抗体选自下组:Apomab 1.1、2.1、3.1、4.1、5.1、6.1、7.1、8.1、9.1、1.2、2.2、3.2、4.2、5.2、6.2、7.2、8.2、9.2、1.3、2.3、3.3、4.3、5.3、6.3、7.3、8.3 和 9.3。

[0039] 在一个具体的实施方案中,所述抗 DR5 抗体选自下组:Apomab 5.2、5.3、6.2、6.3、7.2、7.3、8.3 和 25.3。

[0040] 在还有一个具体的实施方案中,所述抗 DR5 抗体是 Apomab 7.3 或 Apomab 8.3, 尤其是 Apomab 7.3。

[0041] 在还有一个实施方案中,所述抗 DR5 抗体是抗体片段,其可以选自下组:Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段、双抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0042] 在其它实施方案中,所述抗体可以是单链抗体。

[0043] 所述抗 DR5 抗体可以例如具有抗癌活性,诸如例如它们可具有在癌细胞中活化或刺激凋亡的能力。所述癌症包括例如癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。

[0044] 癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、非何杰金氏 (non-Hodgkin's) 淋巴瘤、母细胞瘤、胃肠癌、肾癌 (renal cancer)、卵巢癌、肝脏癌 (liver cancer)、胃癌、膀胱癌、肝癌 (hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌 (kidney cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌 (hepatic carcinoma)、及头和颈癌。

[0045] 具体的癌症组包括:肺癌,例如非小细胞肺癌 (NSCLC);或腺癌,可以是例如结肠直肠癌、胰腺癌或转移性腺癌。还包括血液学癌症。

[0046] 嵌合的、人源化的或人的抗体在本文范围内,正如介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的抗体。

[0047] 在一个优选的实施方案中,所述抗 DR5 抗体包括 Apomab 7.3 或 Apomab 8.3, 或其片

段。

[0048] 所述抗体可以是二聚体的形式和 / 或例如与抗人 IgG Fc 区交联的形式。

[0049] 在其它实施方案中,本文中的所述抗 DR5 抗体与表位标签序列融合。

[0050] 另一方面,本发明关注包含本文中的抗 DR5 抗体或抗体片段与异源氨基酸序列相融合的嵌合分子,其中所述异源氨基酸序列可以包括例如免疫球蛋白序列,诸如抗人 IgG Fc 区。

[0051] 又一方面,本发明关注编码本文中的抗 DR5 抗体或抗体片段的分离的核酸分子,包含此类核酸分子的载体,包含此类核酸分子的宿主细胞,及生产本文中的抗体和抗体片段的方法。

[0052] 本发明还涉及组合物,其包含上文所定义的抗 DR5 抗体,及载体。

[0053] 所述载体可以是制药学可接受的载体,而且所述组合物还可包含另外的抗癌剂和 / 或另外的抗 DR5 抗体。

[0054] 又一方面,本发明关注诱导凋亡的方法,包括使哺乳动物癌细胞暴露于上文所定义的抗 DR5 抗体。

[0055] 又一方面,本发明关注治疗癌症的方法,包括对哺乳动物受试者施用有效量的上文所定义的抗 DR5 抗体。

[0056] 在所有方面,所述受试者可以是人类患者,而且所述癌症可以是任何癌症,包括上文所列的癌症。

[0057] 在另外一个方面,本发明关注制品,包括容器和装在所述容器中的组合物,其中所述组合物包含本发明的抗 DR5 抗体。所述制品还可包括在体外或在体内使用抗 DR5 抗体的说明书。在一个优选的实施方案中,所述说明书有关癌症的治疗。

[0058] 附图简述

[0059] 图 1 显示了人 Apo-2 配体 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :2) 及其衍生的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1)。第 447 位核苷酸 (SEQ ID NO :2 中) 处的“N”用于表示该核苷酸碱基可以是“T”或“G”。

[0060] 图 2A-2C 显示了全长人 DR4 受体 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :4) 及其衍生的氨基酸序列 (SEQ ID NO :3)。人 DR4 受体的核苷酸序列和氨基酸序列还报道于 Pan et al., Science, 276 :111 (1997)。

[0061] 图 3A-3C 显示了人 DR5 受体的 411 个氨基酸的序列 (SEQ ID NO :5) 及编码核苷酸序列 (SEQ ID NO :6),公开于 1998 年 11 月 19 日出版的 W098/51793。

[0062] 图 4A-4C 显示了人 DR5 的 440 个氨基酸的序列 (SEQ ID NO :7) 及编码核苷酸序列 (SEQ ID NO :8),还公开于 1998 年 8 月 20 日出版的 W098/35986。

[0063] 图 5 显示了单链抗 DR5 抗体 16E2 (16E2 scFv) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :9)。

[0064] 图 6 显示了单链抗 DR5 抗体 16E2 (16E2 scFv) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :10),其中显示了信号序列及重链和轻链 CDR。

[0065] 图 7 显示了全长 16E2 抗体重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO :11)。

[0066] 图 8 显示了全长 16E2 抗体重链的核苷酸序列 (SEQ ID NO :12)。

[0067] 图 9 显示了全长 16E2 抗体轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO :13)。

[0068] 图 10 显示了全长 16E2 抗体轻链的核苷酸序列 (SEQ ID NO :14)。

[0069] 图 11A 和 B 显示了用于表达免疫球蛋白轻链的质粒 pDR1 的序列 (SEQID NO :15, 5391bp)。pDR1 包含编码无关抗体, 人源化抗 CD3 抗体的轻链, 的序列 (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 :217-225(1992)), 其起始和终止密码子以粗体和下划线标示。

[0070] 图 12A 和 B 显示了用于表达免疫球蛋白重链的质粒 pDR2 的序列 (SEQID NO :16)。pDR2 包含编码无关抗体, 人源化抗 CD3 抗体的重链, 的序列 (Shalaby et al., supra), 其起始和终止密码子以粗体和下划线标示。

[0071] 图 13 显示了 Apomab 7.3 重链核苷酸序列 (SEQ ID NO :17)。

[0072] 图 14 显示了 Apomab 7.3 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO :18)。

[0073] 图 15 显示了 Apomab 7.3 轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO :19)。

[0074] 图 16 显示了 Apomab 7.3 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO :20)。

[0075] 图 17A 和 B 显示了 16E2 和 Apomab 7.3 的重链对比。

[0076] 图 18 显示了 16E2 和 Apomab 7.3 的轻链对比。

[0077] 图 19 是抗 DR5 抗体重链的同源性模型。

[0078] 图 20 是抗 DR5 抗体轻链的同源性模型。

[0079] 图 21 显示了与全长 16E2(型式 1) 抗体相比, 腹膜内 (IP) 单剂 Apomab5.3、6.3 和 8.3 在人结肠癌的 Colo205 异种移植无胸腺裸鼠模型中的抗癌活性。

[0080] 图 22 显示了与全长 16E2(型式 1) 相比, IP 单剂 Apomabs 5.2、6.2、5.3、7.2 和 7.3 在人结肠癌的 Colo205 异种移植无胸腺裸鼠模型中的抗癌活性。

[0081] 图 23 显示了与全长 16E2(型式 1) 相比, IP 单剂 Apomab 5.2、7.3 和 8.3 在人结肠癌的 Colo205 异种移植无胸腺裸鼠模型中的抗癌活性。

[0082] 图 24 显示了与 Apomab 7.3 相比, IP 单剂 Apomab 23.3 和 25.3 在人结肠癌的 Colo205 异种移植无胸腺裸鼠模型中的抗癌活性。

[0083] 图 25 显示了衍生自稳定细胞系较之瞬时细胞系的 Apomab 7.3 在人结肠癌的 Colo205 异种移植无胸腺裸鼠模型中的抗癌活性。

[0084] 图 26 显示了单独的和联合 CPT-11 的 Apomab 7.3 在肺癌的 HCT15 异种移植模型中的抗癌活性。

[0085] 图 27 显示了单独的和联合 CPT-11 的 Apomab 7.3 在人肉瘤的 LS 180 异种移植模型中的抗癌活性。

[0086] 图 28 显示了单独的和联合 RITUXAN® (rituximab) 的 Apomab 7.3 在非何杰金氏淋巴瘤的 BJAB 异种移植 CB17 ICR SCID 小鼠模型中的抗癌活性。

[0087] 图 29 显示了单独的和联合吉西他滨的 Apomab 7.3 在人胰腺腺癌的 BxPC3 异种移植无胸腺裸鼠模型中的抗癌活性。

[0088] 图 30 显示了单独的及联合卡铂和泰素 (taxol) 的 Apomab 7.3 在人肺癌的 H460 异种移植模型的抗癌活性。

[0089] 图 31 显示了单独的及联合卡铂和泰素的 Apomab 7.3 在人肺癌的 H2122 异种移植模型中抗癌活性。

[0090] 图 32 显示了 Apomab 7.3 在人肺癌的 H2122 异种移植模型中的剂量 - 响应曲线。

[0091] 图 33 显示了与 Apomab 7.3 相比, Apomab 23.3 和 25.3 在人结肠癌的 Colo 205 异种移植模型中的抗癌活性。

[0092] 图 34 显示了单独的 Apo2L.0、单独的 Apomab 7.3 和多种组合对裸鼠中 Colo 205 人结肠癌异种移植物的中值肿瘤生长和 Kaplan-Meier 图。

[0093] 图 35 和 36 显示了单独的 Apo2L.0、单独的 Apomab 7.3 和多种组合对无胸腺裸鼠异种移植模型中的 SKMES-1 人非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞的中值肿瘤生长和 Kaplan-Meier 图。

[0094] 图 37 显示了单独的 Apo2L.0、单独的 Apomab 7.3 和多种组合在人 Colo205 结肠癌异种移植模型中的中值肿瘤生长和 Kaplan-Meier 图。

[0095] 优选实施方案的详述

[0096] I. 定义

[0097] 术语“Apo-2 配体”、“Apo-2L”、“Apo2L”、“Apo-2 配体 /TRAIL”和“TRAIL”在本文中可互换使用,指包含图 1 (SEQ ID NO :1) 所示氨基酸序列的氨基酸残基 114-281 (含)、残基 95-281 (含)、残基 92-281 (含)、残基 91-281 (含)、残基 41-281 (含)、残基 39-281 (含)、残基 15-281 (含) 或残基 1-281 (含) 的多肽序列,以及上述序列的生物学活性片段、删除、插入和 / 或替代变体。在一个实施方案中,多肽序列包含图 1 (SEQ ID NO :1) 的残基 114-281。任选的是,多肽序列包含图 1 (SEQ ID NO :1) 的残基 92-281 或残基 91-281。Apo-2L 多肽可以由图 1 (SEQ ID NO :2) 所示天然核苷酸序列编码。任选的是,编码残基 Pro119 (图 1 ;SEQ ID NO :2) 的密码子可以是“CCT”或“CCG”。任选的是,所述片段或变体具有生物学活性,且与任一上述序列具有至少约 80% 的氨基酸序列同一性,或至少约 90% 的序列同一性,或至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性。该定义涵盖 Apo2 配体的替代变体,其中其至少一个天然氨基酸用另一种氨基酸诸如丙氨酸残基替代。该定义还涵盖从 Apo-2 配体来源分离的或者通过重组和 / 或合成方法制备的天然序列 Apo-2 配体。本发明的 Apo-2 配体包括 1997 年 1 月 16 日公开的 W097/01633、1997 年 7 月 17 日公开的 W097/25428、1999 年 7 月 22 日公开的 W099/36535、2001 年 1 月 4 日公开的 W001/00832、2002 年 2 月 7 日公开的 W002/09755、2000 年 12 月 14 日公开的 W000/75191 和 2000 年 2 月 29 日公告的美国专利第 6,030,945 号中披露的称作 Apo-2 配体或 TRAIL 的多肽。这些术语通常用于指 Apo-2 配体的各种形式,包括多肽的单体、二聚体、三聚体、六聚体或更高寡聚体形式。除非另有说明,Apo-2L 序列中提及的所有氨基酸残基编号采用依照图 1 (SEQ ID NO :1) 的编号。

[0098] “Apo-2 配体受体”包括本领域称作“DR4”和“DR5”的受体,其多核苷酸和多肽序列分别显示于图 2A-2C (SEQ ID NO :4 和 3) 和 3A-3C (SEQ ID NO :6 和 5)。Pan 等人描述了称作“DR4”的 TNF 受体家族成员 (Pan et al., Science, 276 :111-113 (1997) ;W098/32856, 公开于 1998 年 7 月 30 日 ;W099/37684, 公开于 1999 年 7 月 29 日 ;W000/73349, 公开于 2000 年 12 月 7 日 ;US6,433,147, 授权于 2002 年 8 月 13 日 ;US6,461,823, 授权于 2002 年 10 月 8 日 ;US6,342,383, 授权于 2002 年 1 月 29 日)。Sheridan 等人 (Science, 277 :818-821 (1997)) 和 Pan 等人 (Science, 277 :815-818 (1997)) 描述了 Apo2L/TRAIL 的另一种受体 (还可参见 W098/51793, 公开于 1998 年 11 月 19 日 ;W098/41629, 公开于 1998 年 9 月 24 日)。此受体称作 DR5 (该受体还可称作 Apo-2、TRAIL-R、TR6、Tango-63、hAP08、TRICK2 或 KILLER ;Screaton et al., Curr. Biol., 7 :693-696 (1997) ;Walczak et al., EMBO J., 16 :5386-5387 (1997) ;Wu et al., Nature Genetics, 17 :141-143 (1997) ;W098/35986, 公开于 1998 年 8 月 20 日 ;EP870,827, 公开于 1998 年 10 月 14 日 ;W098/46643, 公开于 1998 年 10 月 22 日 ;

W099/02653, 公开于 1999 年 1 月 21 日 ;W099/09165, 公开于 1999 年 2 月 25 日 ;W099/11791, 公开于 1999 年 3 月 11 日 ;US2002/0072091, 公开于 2002 年 8 月 13 日 ;US2002/0098550, 公开于 2001 年 12 月 7 日 ;US6, 313, 269, 授权于 2001 年 12 月 6 日 ;US2001/0010924, 公开于 2001 年 8 月 2 日 ;US2003/01255540, 公开于 2003 年 7 月 3 日 ;US2002/0160446, 公开于 2002 年 10 月 31 日 ;US2002/0048785, 公开于 2002 年 4 月 25 日 ;US6, 569, 642, 授权于 2003 年 5 月 27 日 ;US6, 072, 047, 授权于 2000 年 6 月 6 日 ;US6, 642, 358, 授权于 2003 年 11 月 4 日)。如上所述, Apo-2L 的其它受体包括 DcR1、DcR2 和 OPG(参见 Sheridan et al., 见上文 ;Marsters et al., 见上文 ;Simonet et al., 见上文)。术语“Apo-2L 受体”在用于本文时涵盖天然序列受体和受体变体。这些术语涵盖在多种哺乳动物包括人中表达的 Apo-2L 受体。Apo-2L 受体可以是内源表达的, 如在多种人组织谱系中天然发生的, 或者可以通过重组或合成方法表达的。“天然序列 Apo-2L 受体”包括与衍生自自然界的 Apo-2L 受体具有相同氨基酸序列的多肽。因此, 天然序列 Apo-2L 受体可以具有来自任何哺乳动物包括人的天然存在 Apo-2L 受体的氨基酸序列。此类天然序列 Apo-2L 受体可以从自然界分离, 或者可以通过重组或合成手段生产。术语“天然序列 Apo-2L 受体”明确涵盖天然存在的截短或分泌形式的受体(例如含有例如胞外域序列的可溶形式)、天然存在的变体形式(例如可变剪接形式)和天然存在的等位基因变体。受体变体可包括天然序列 Apo-2L 受体的片段或删除突变体。图 3A-3C 显示了 1998 年 11 月 19 日公开的 W098/51793 中披露的 411 个氨基酸的人 DR5 序列。本领域知道人 DR5 的一种转录剪接变体。此 DR5 剪接变体编码图 4A-4C 所示 440 个氨基酸的人 DR5 序列, 及其核苷酸序列 (SEQID NO :7 和 8), 正如 1998 年 8 月 20 日公开的 W098/35986 中所披露的。

[0099] “死亡受体抗体”在用于本文时通常指针对肿瘤坏死因子受体超家族中包含能够发出凋亡信号的死亡结构域的受体的抗体, 此类抗体包括 DR5 抗体和 DR4 抗体。

[0100] “DR5 受体抗体”、“DR5 抗体”或“抗 DR5 抗体”以广义使用, 指结合至少一种形式的 DR5 受体或其胞外域的抗体。任选的是, DR5 抗体与异源序列或分子融合或连接。优选的是, 异源序列容许或帮助抗体形成更高等级或寡聚复合物。任选的是, DR5 抗体结合 DR5 受体但不与任何其它 Apo-2L 受体(例如 DR4、DcR1 或 DcR2) 结合或发生交叉反应。任选的是, 该抗体是 DR5 信号活性的激动剂。术语“抗 DR5 抗体”及其语法等效物明确涵盖实施例中所描述的抗体, 包括但不限于表 11 和 12 中所列出的“Apomab”抗体, 例如 Apomab 1. 1、2. 1、3. 1、4. 1、5. 1、6. 1、7. 1、8. 1、9. 1、1. 2、2. 2、3. 2、4. 2、5. 2、6. 2、7. 2、8. 2、9. 2、1. 3、2. 3、3. 3、4. 3、5. 3、6. 3、7. 3、8. 3 和 9. 3, 优选 Apomab 7. 3。

[0101] 任选的是, 根据 BIAcore 结合测定法的测量, 本发明的 DR5 抗体在约 0. 1nM 到约 20mM 的浓度范围内结合 DR5 受体。任选的是, 根据 BIAcore 结合测定法的测量, 本发明的 DR5 抗体呈现出约 0. 6nM 到约 18mM 的 I_{c50} 值。

[0102] “DR4 受体抗体”、“DR4 抗体”或“抗 DR4 抗体”以广义使用, 指结合至少一种形式的 DR4 受体或其胞外域的抗体。任选的是, DR4 抗体与异源序列或分子融合或连接。优选的是, 异源序列允许或帮助抗体形成更高等级或寡聚复合物。任选的是, DR4 抗体结合 DR4 受体但不与任何其它 Apo-2L 受体(例如 DR5、DcR1 或 DcR2) 结合或发生交叉反应。任选的是, 该抗体是 DR4 信号活性的激动剂。

[0103] 任选的是, 根据 BIAcore 结合测定法的测量, DR4 抗体在约 0. 1nM 到约 20mM 的浓

度范围内结合 DR4 受体。任选的是,根据 BIAcore 结合测定法的测量,本发明的 DR4 抗体呈现出约 0.6nM 到约 18mM 的 I_{c50} 值。

[0104] 术语“激动剂”以最广义使用,包括在体外、原位、或在体内部分或完全增强、刺激、或激活 Apo2L/TRAIL、DR4 或 DR5 的一种或多种生物学活性的任何分子。Apo2L/TRAIL 结合 DR4 或 DR5 的此类生物学活性的例子包括凋亡以及文献中进一步报道的那些。激动剂可以直接或间接方式发挥功能用。例如,激动剂可以在体外、原位、或在体内由于其直接结合 DR4 或 DR5 从而引起受体活化或信号转导的结果发挥功能而部分或完全增强、刺激、或激活 DR4 或 DR5 的一种或多种生物学活性。激动剂还可以在体外、原位、或在体内由于例如刺激另一种效应物分子继而引起 DR4 或 DR5 活化或信号转导的结果间接发挥功能而部分或完全增强、刺激、或激活 DR4 或 DR5 的一种或多种生物学活性。设想了激动剂可作为间接发挥功能来增强或提高 DR4 或 DR5 活化或活性的增强剂分子。例如,激动剂可增强哺乳动物中内源 Apo-2L 的活性。这可通过例如预复合 (pre-complexing) DR4 或 DR5 或者通过稳定各配体与 DR4 或 DR5 受体的复合物 (诸如稳定 Apo-2L 与 DR4 或 DR5 之间形成的天然复合物) 来实现。

[0105] “胞外结构域”或“ECD”指配体或受体基本上不含跨膜结构域和胞质结构域的形式。通常,可溶性 ECD 将具有少于 1% 的此类跨膜结构域和胞质结构域,优选将具有少于 0.5% 的此类结构域。

[0106] 术语“表位标记的”在用于本文时指包含蛋白质诸如 Apo-2 配体或 DR5 受体或其部分或者结合此类配体或受体的抗体且其与“标签多肽”融合的嵌合多肽。标签多肽具有足够残基以提供表位而可制备针对其的抗体,但又足够短使得其不干扰配体或受体的活性。标签多肽优选还是相当独特的,使得其抗体基本上不与其它表位发生交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少 6 个氨基酸残基,通常在约 8 个和约 50 个氨基酸残基之间 (优选在约 10 个和约 20 个残基之间)。

[0107] “分离的”,在用于描述本文中所公开的各种蛋白质时,意指已经鉴定且与 / 由其天然环境的一种成分分开和 / 或回收的蛋白质。其天然环境的污染性成分指通常会干扰该蛋白质的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将蛋白质纯化至 (1) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度,或 (2) 根据使用考马斯蓝或优选银染色的非还原性或还原性条件下的 SDS-PAGE,达到同质。既然 Apo-2 配体天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的蛋白质包括重组细胞内的原位蛋白质。然而,分离的蛋白质通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0108] 关于本文中所鉴定的序列的“百分比 (%) 氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与所比较配体、受体或抗体序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行。本领域技术人员可决定用于测量对比的适宜参数,包括评估对所比较全长序列获得最大对比所需的算法。为了本发明的目的,百分比氨基酸序列同一性值可使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 获得,其由 Genentech 公司编写,其源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局 (US Copyright Office, Washington D. C., 20559),并以美国版权注册号

TXU510087 注册。公众可通过 Genentech 公司 (South San Francisco, CA) 得到 ALIGN-2 程序。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不变。然后相对于较长序列计算百分比氨基酸序列同一性。因此,即使较短序列完全包含在较长序列中,序列同一性也将小于 100%。

[0109] 术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的 DNA 序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0110] 若一段核酸与另一段核酸序列处于功能性相互关系中,则它是“可操作连接”的。例如,若前序列 (presequence) 或分泌前导 (secretory leader) 的 DNA 表达成参与多肽分泌的前蛋白质 (preprotein),则它与多肽的 DNA 可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与该序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的位置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。通常,“可操作连接”意味着相连的 DNA 序列是相邻的,而且在分泌前导的情况下意味着相邻且处于阅读状态。然而,增强子不必相邻。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接反应来实现。如果没有此类位点,那么依照常规实践使用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0111] 术语“多元醇 (polyol)”在用于本文时泛指多羟基醇化合物。多元醇可以是例如任何水溶性聚(亚烷基氧化物)聚合物,而且可具有线性链或分支链。优选的多元醇包括那些在一个或多个羟基位置用化学基团诸如具有 1 至 4 个碳的烷基取代的多元醇。典型的是,多元醇是聚(亚烷基二醇),优选聚(乙二醇)(PEG)。然而,本领域技术人员认识到,其它多元醇诸如聚(丙二醇)和聚乙烯-聚丙二醇共聚物可利用本文中关于 PEG 描述的偶联技术得以采用。多元醇包括本领域众所周知的那些类型以及可公开获得的那些类型,诸如从商业来源获得,诸如 Nektar [®] Corporation。

[0112] 术语“偶联”(conjugate)在本文中依照其最广泛的定义使用,指接合或连接到一起。若分子像接合在一起时那样起作用或运作,则它们是“偶联”的。

[0113] 杂交反应的“严格性”可以由本领域普通技术人员容易的确定,而且通常根据探针长度、洗涤温度和盐浓度凭经验计算。一般而言,较长的探针要求较高的温度以正确退火,而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于当互补链存在于低于其解链温度的环境中时变性 DNA 重新退火的能力。探针和可杂交序列之间的期望同一性程度越高,可使用的相对温度也越高。结果是,推断出较高相对温度将趋向于使反应条件更为严格,而较低温度也就较不严格。关于杂交反应严格性的其它细节和解释,参见 Ausubel 等人,《Current Protocols in Molecular Biology》,Wiley Interscience Publishers,1995。

[0114] “严格条件”或“高严格性条件”,如本文中所定义的,鉴定如下:(1) 采用低离子强度 and 高温进行清洗,例如 0.015M 氯化钠 /0.0015M 柠檬酸钠 /0.1% 十二烷基硫酸钠,于 50℃;(2) 在杂交过程中采用变性剂,诸如甲酰胺,例如 50% (v/v) 甲酰胺及 0.1% 牛血清白蛋白 /0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 /50mM 磷酸钠缓冲液 pH6.5 及 750mM 氯化钠,75mM 柠檬酸钠,于 42℃;或 (3) 采用 50% 甲酰胺,5x SSC (0.75M NaCl, 0.075M 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠 (pH6.8), 0.1% 焦磷酸钠, 5x Denhardt 氏溶液,超声处理的鲑精 DNA (50 μg/ml), 0.1% SDS, 和 10% 硫酸右旋糖苷,于 42℃,及于 42℃ 在 0.2x SSC (氯化钠 / 柠檬酸钠) 和 50% 甲酰胺中清洗,接着于 55℃ 在含 EDTA 的 0.1x SSC 中进行高严格性清洗。

[0115] “中等严格条件”可以如 Sambrook 等人,《Molecular Cloning: A Laboratory

Manual》,New York,Cold Spring Harbor Press,1989 中所述鉴定,包括使用比上文所述较不严格的清洗溶液和杂交条件(例如温度、离子强度和% SDS)。中等严格条件的一个例子是于 37℃在含 20%甲酰胺,5x SSC(150mM NaCl,15mM 柠檬酸三钠),50mM 磷酸钠(pH7.6),5x Denhardt 氏溶液,10%硫酸右旋糖苷,和 20mg/ml 变性剪切的鲑精 DNA 的溶液中温育过夜,接着于约 37-50℃在 1x SSC 中清洗滤膜。技术人员将认识到如何在必要时调整温度、离子强度等以适应诸如探针长度等因素。

[0116] 术语“氨基酸”指所有天然存在的 L- α -氨基酸。此定义意图包括正亮氨酸、鸟氨酸和高半胱氨酸。氨基酸通过单字母或三字母标示鉴别:

[0117] Asp D 天冬氨酸 Ile I 异亮氨酸

[0118] Thr T 苏氨酸 Leu L 亮氨酸

[0119] Ser S 丝氨酸 Tyr Y 酪氨酸

[0120] Glu E 谷氨酸 Phe F 苯丙氨酸

[0121] Pro P 脯氨酸 His H 组氨酸

[0122] Gly G 甘氨酸 Lys K 赖氨酸

[0123] Ala A 丙氨酸 Arg R 精氨酸

[0124] Cys C 半胱氨酸 Trp W 色氨酸

[0125] Val V 缬氨酸 Gln Q 谷氨酰胺

[0126] Met M 甲硫氨酸 Asn N 天冬酰胺

[0127] 在附图中,可采用某些其它单字母或三字母标示来指向和鉴定序列中给定位置处的两种或多种氨基酸或核苷酸。

[0128] 术语“抗体”以最广义使用,明确覆盖单一抗 DR5 单克隆抗体(包括激动性、拮抗性、和中和性或阻断性抗体)及具有多表位特异性的抗 DR5 抗体组合物。“抗体”在用于本文时包括完整免疫球蛋白或抗体分子、多克隆抗体、多特异性抗体(例如由至少两种完整抗体形成的双特异性抗体)、及免疫球蛋白片段(诸如 Fab、F(ab')₂ 或 Fv),只要它们展现出本文中所描述的如何期望的激动性或拮抗性特性。

[0129] 抗体典型的是展现出对特定抗原的结合特异性的蛋白质或多肽。天然抗体通常是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的异四聚体糖蛋白。典型的,每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而二硫键数目在不同免疫球蛋白同种型的重链间有所变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫键。每条重链在一段具有一个可变区(VH),接着是多个恒定区。每条轻链在一端具有一个可变区(VL),另一端是一个恒定区。轻链恒定区与重链第一恒定区排列在一起,而轻链可变区与重链可变区排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面(Chothia et al., J. Mol. Biol., 186: 651-663(1985); Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4592-4596(1985))。根据其恒定区氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体轻链可归入两种截然不同类型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。根据其重链恒定区氨基酸序列,免疫球蛋白可归入不同的类别。有五大类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,其中有些可进一步分为亚类(同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4; IgA1 和 IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0130] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,通常是完整抗体的抗原结合或可变区。抗体

片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；单链抗体分子；及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0131] 术语“可变的”在本文中用于描述可变区中的某些部分在抗体序列间有差异且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，变异性通常不是均匀分布于抗体的整个可变区的。它典型的集中于轻链和重链可变区中称作互补决定区 (CDR) 或高变区的三个区段。可变区中更加高度保守的部分称作框架区 (FR)。天然重链和轻链的可变区各自包含四个 FR，它们大多采取 β -折叠片构象，通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的三个 CDR 连接。每条链中的 CDR 通过 FR 非常接近的保持在一起，并与另一条链的 CDR 一起促成抗体的抗原结合位点的形成（参见 Kabat, E. A. 等人,《Sequences of Proteins of Immunological Interest》, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987）。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应物功能，诸如抗体依赖性细胞毒性中抗体的参与。

[0132] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变外。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原性位点。此外，与典型的包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的常规（多克隆）抗体制备物不同，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

[0133] 单克隆抗体在本文中包括通过抗 DR5 抗体的可变区（包括高变区）与恒定区（例如“人源化”抗体）、或者轻链与抗体、或者来自一个物种的一条链与来自另一物种的一条链的剪接而产生的嵌合的、杂合的和重组的抗体，或是与异源蛋白的融合物，不管物种起源或者免疫球蛋白的类或亚类归属，以及抗体片段（例如 Fab、F(ab')₂ 和 Fv），只要它们展现出期望的生物学活性或特性。参见例如美国专利第 4,816,567 号及 Mage et al., 在《Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications》中, pp. 79-97, Marcel Defcker, Inc. ; New York, 1987。

[0134] 如此，修饰语“单克隆”指示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征，不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如，将依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler and Milstein, Nature 256 : 495 (1975) 记载的杂交瘤方法来制备，或者可通过诸如美国专利第 4,816,567 号中描述的重组 DNA 方法来制备。“单克隆抗体”还可从使用例如 McCafferty et al., Nature, 348 : 552-554 (1990) 中记载的技术产生的噬菌体抗体库分离。

[0135] 非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的特定嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链、或其片段（诸如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合子序列）。在极大程度上，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的互补决定区 (CDR) 残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠或兔的 CDR 残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的 Fv 框架区 (FR) 残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或输入 CDR 或框架序列中都没有找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进和优化抗体的性能。一般而言，人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变区，其中整个或基本上整个 CDR 对应于非人免疫球蛋白的高变环，且整个或基本上整个 FR 是人免疫球蛋白共有序列的 FR。人源化抗体最好还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区 (Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区。

[0136] “人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和 / 或使用本领域已知的或本文所公开的用于生成抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义包括包含至少一条人重链多肽或至少一条人轻链多肽的抗体,例如包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成。在一个实施方案中,人抗体是从噬菌体文库选择的,该噬菌体文库表达人抗体 (Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 14 :309-314(1996) ;Sheets et al., *PNAS(USA)* 95 :6157-6162(1998) ;Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227 :381(1991) ;Marks et al., *J. Mol. Biol.* ,222 :581(1991))。人抗体还可通过将人免疫球蛋白基因组导入内源免疫球蛋白基因已经部分或完全灭活的转基因动物例如小鼠来生成。在受到攻击时,观察到人抗体生成,它在所有方面与在人体中看到的极其相似,包括基因重排、装配和抗体全集。这种方法记载于例如美国专利 5,545,807 ;5,545,806 ;5,569,825 ;5,625,126 ;5,633,425 ;5,661,016,及如下科学出版物 :Marks et al., *Bio/Technology*,10 :779-783(1992) ;Lonberg et al., *Nature*,368 :856-859(1994) ;Morrison, *Nature*,368 :812-13(1994) ;Fishwild et al., *Nature Biotechnology*,14 :845-51(1996) ;Neuberger, *Nature Biotechnology*,14 :826(1996) ;Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* ,13 :65-93(1995)。或者,人抗体可通过生成针对靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞的永生化来制备 (此类 B 淋巴细胞可从个体回收,或者可在体外免疫)。参见例如 Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77(1985) ;Boemer et al., *J. Immunol.* ,147(1) :86-95(1991) ;美国专利第 5,750,373 号。

[0137] 术语“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链的 C- 末端区,它可以通过用木瓜蛋白酶消化完整抗体来产生。Fc 区可以是天然序列 Fc 区或变异 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链 Fc 区的边界可有所变化,然而人 IgG 重链 Fc 区通常定义为从 Cys226 位置附近或 Pro230 位置附近的氨基酸残基至 Fc 区的羧基末端的区段 (本文中依照 Kabat et al., *supra* 的编号系统)。免疫球蛋白的 Fc 区通常包含两个恒定区,CH2 结构域和 CH3 结构域,任选包含 CH4 结构域。

[0138] “Fc 区链”在本文中指 Fc 区的两条多肽链之一。

[0139] 人 IgG Fc 区的“CH2 结构域”(也称为“C_Y2”结构域)通常自约第 231 位氨基酸残基延伸至约第 340 位氨基酸残基。CH2 结构域的独特之处在于它没有与另一结构域紧密配对。而是,有两个 N- 连接的分支的碳水化合物链介于完整天然 IgG 分子的两个 CH2 结构域之间。推测碳水化合物可能提供结构域 - 结构域配对的替代且有助于稳定 CH2 结构域。Burton, *Molec. Immunol.* 22 :161-206(1985)。CH2 结构域在本文中可以是天然序列 CH2 结构域或变异 CH2 结构域。

[0140] “CH3 结构域”包含 Fc 区中 CH2 结构域 C- 末端的一段残基 (即自 IgG 的约第 341 位氨基酸残基至约第 447 位氨基酸残基)。CH3 区在本文中可以是天然序列 CH3 结构域或变异 CH3 结构域 (例如在其一条链中具有引入的“隆起”(protuberance) 而在其另一条链中具有相应引入的“空腔”(cavity) 的 CH3 结构域 ;参见美国专利 5,821,333)。此类变异 CH3 结构域可用于生成本文所述多特异性 (例如双特异性) 抗体。

[0141] “铰链区”通常定义为自人 IgG1 的约 Glu216 或约 Cys226 至约 Pro230 的区段 (Burton, *Molec. Immunol.* 22 :161-206(1985))。其它 IgG 同种型的铰链区可以通过将第一个和最后一个形成重链间 S-S 键的半胱氨酸残基置于相同位置而与 IgG1 序列对比。铰链

区在本文中可以是天然序列铰链区或变异铰链区。变异铰链区的两条多肽链通常每条多肽链保留至少一个半胱氨酸残基,使得变异铰链区的两条多肽链可在两条链之间形成二硫键。本文中优选的铰链区是天然序列人铰链区,例如天然序列人 IgG1 铰链区。

[0142] “功能性 Fc 区”拥有天然序列 Fc 区的至少一种“效应物功能”。例示性“效应物功能”包括 C1q 结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如 B 细胞受体;BCR)下调;等。此类效应物功能通常要求 Fc 区与结合结构域(例如抗体可变区)联合,而且可使用本领域知道的用于评估此类抗体效应物功能的多种测定法来评估。

[0143] “天然序列 Fc 区”包含与自然界中找到的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。“变异 Fc 区”由于至少一处氨基酸修饰而包含与天然序列 Fc 区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。优选的是,变异 Fc 区与天然序列 Fc 区或与亲本多肽的 Fc 区相比具有至少一处氨基酸替代,例如天然序列 Fc 区中或亲本多肽的 Fc 区中约一处至约十处氨基酸替代,优选约一处至约五处氨基酸替代。变异 Fc 区在本文中将优选与天然序列 Fc 区和/或与亲本多肽的 Fc 区拥有至少约 80%序列同一性,最优选至少约 90%序列同一性,更优选至少约 95%序列同一性。

[0144] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指由细胞介导的反应,其中表达 Fc 受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体,随后引起靶细胞溶解。介导 ADCC 的主要细胞, NK 细胞,只表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991) 第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性,可进行体外 ADCC 测定法,诸如美国专利第 5,500,362 或 5,821,337 号中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外,可在体内评估目的分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如 Clynes et al., *PNAS(USA)* 95:652-656(1998)中所披露的。

[0145] “人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行行使效应器功能的白细胞。优选的是,该细胞至少表达 Fc γ RIII 并行行使 ADCC 效应器功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞,优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可以从其天然来源分离,例如血液或 PBMC,如本文中所描述的。

[0146] 术语“Fc 受体”和“FcR”用于描述结合抗体 Fc 区的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外,优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR(γ 受体),包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA(“活化受体”)和 Fc γ RIIB(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,区别主要在于其胞质结构域。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见综述 Da $\acute{e}$ ron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997))。FcR 的综述参见 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991);Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34(1994);de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR,包括那些未来将会鉴定的。该术语还包括新生儿受体, FcRn,它负责将母体 IgG 转移给胎儿

(Guyer et al., J. Immunol. 117 :587(1976) 和 Kim et al., J. Immunol. 24 :249(1994))。

[0147] “补体依赖性细胞毒性”和“CDC”指在存在补体时溶解靶物。补体激活途径是由补体系统第一组分 (C1q) 结合与关联抗原复合的分子 (例如抗体) 起始的。为了评估补体激活, 可进行 CDC 测定法, 例如如 Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202 :163(1996) 中所记载的。

[0148] “亲和力成熟的”抗体指在其一个或多个 CDR 中具有导致抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的一处或多处改变的抗体。优选的亲和力成熟的抗体将具有纳摩尔或甚至皮摩尔水平的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知流程生成。Marks et al., Bio/Technology 10 :779-783(1992) 记载了通过 VH 和 VL 结构域改组的亲和力成熟。下列文献记载了 CDR 和 / 或框架残基的随机诱变 :Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 :3809-3813(1994) ; Schier et al., Gene 169 :147-155(1995) ; Yelton et al., J. Immunol. 155 :1994-2004(1995) ; Jackson et al., J. Immunol. 154(7) :3310-9(1995) ; Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226 :889-896(1992)。

[0149] 术语“免疫特异性”在用于例如“抗体的免疫特异性结合”时指在抗体的抗原结合位点和该抗体所识别的特定抗原之间发生的抗原特异性结合相互作用。

[0150] 为了本发明的目的, “生物学活性”和“期望的生物学活性”指有能力在体内或离体的 (ex vivo) 在至少一种类型的哺乳动物细胞中调控 DR5 活性或 DR5 活化, 包括例如凋亡 (或是激动性或刺激性方式或是拮抗性或阻断性方式), 结合 Apo-2 配体 (TRAIL), 或调控胞内信号途径中一种或多种分子诸如胱天蛋白酶 3、胱天蛋白酶 8、胱天蛋白酶 10 或 FADD 的活化。用于测定此类胞内分子活化的测定法是本领域已知的, 参见例如 Boldin et al., J. Biol. Chem., 270 :7795-7798(1995) ; Peter, Cell Death Differ., 7 :759-760(2000) ; Nagata, Cell, 88 :355-365(1998) ; Ashkenazi et al., Science, 281 :1305-1308(1999)。

[0151] 术语“激动剂”和“激动性”在用于本文时指向或描述能够直接或间接的实质性诱导、促进或增强 DR5 生物学活性或活化的分子。任选的是, “激动剂 DR5 抗体”指具有与 DR5 配体, 称为 Apo-2 配体 (TRAIL), 相当的活性, 或者能够活化 DR5 受体从而导致一种或多种胞内信号途径激活的抗体, 它可以包括胱天蛋白酶 3、胱天蛋白酶 8、胱天蛋白酶 10 或 FADD 的活化。

[0152] 术语“拮抗剂”和“拮抗性”在用于本文时指向或描述能够直接或间接的实质性抵消、降低或抑制 DR5 生物学活性或 DR5 活化的分子。任选的是, 拮抗剂指中和源自 DR5 活化或 DR5 与其配体诸如 Apo-2 配体形成复合物的生物学活性的分子。

[0153] 术语“凋亡”和“凋亡活性”以广义使用, 指哺乳动物中有序或受控形式的细胞死亡, 通常伴随着一种或多种特征性细胞变化, 包括细胞质浓缩、质膜微绒毛丧失、细胞核节段化、染色体 DNA 降解或线粒体功能丧失。可以通过例如细胞生存力测定法、膜联蛋白 V 结合测定法、PARP 测定法、FACS 分析或 DNA 电泳来测定和测量这种活性, 这些都是本领域已知的。任选的是, 通过膜联蛋白 V 或 PARP 测定法来测定凋亡活性。

[0154] 术语“癌症”、“癌性”和“恶性肿瘤”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌, 包括腺癌、淋巴瘤、母细胞瘤、黑素瘤、(神经) 胶质瘤、肉瘤、骨髓瘤 (诸如多发性骨髓瘤) 和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞状细胞癌、胃肠癌、何杰金氏

淋巴瘤和非何杰金氏淋巴瘤、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、(神经)胶质瘤、卵巢癌、肝的癌(liver cancer)诸如肝癌(hepatic carcinoma)和肝瘤(hepatoma)、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾的癌(kidney cancer)诸如肾细胞癌(renal cell carcinoma)和维尔姆斯氏肿瘤(Wilms' tumor)、基底细胞癌、黑素瘤、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、睾丸癌、食道癌、及各种类型的头和颈癌。

[0155] 术语“免疫相关疾病”指哺乳动物中由哺乳动物免疫系统成分引起、介导、或以其它方式促成发病的疾病。还包括刺激或干预免疫应答对疾病发展具有改善作用的疾病。该术语包括自身免疫病、免疫介导的炎性疾病、非免疫介导的炎性疾病、传染病、和免疫缺陷病。可依照本发明治疗的免疫相关和炎性疾病的例子,其中有些是免疫或T细胞介导的,包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、幼年型慢性关节炎、脊椎关节病、系统性硬化(硬皮病)、特发性炎性肌病(皮肌炎、多肌炎)、斯耶格伦氏(Sjogren)综合征、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血(免疫性全血细胞减少症、阵发性夜间血红蛋白尿)、自身免疫性血小板减少症(特发性血小板减少性紫癜、免疫介导的血小板减少症)、甲状腺炎(格雷夫斯氏(Graves)病、桥本氏(Hashimoto)甲状腺炎、幼年型淋巴细胞性甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎)、糖尿病、免疫介导的肾病(肾小球肾炎、肾小管间质性肾炎)、中枢和周围神经系统的脱髓鞘病诸如多发性硬化、特发性脱髓鞘多神经病或格-巴二氏(Guillain-Barré)综合征、和慢性炎性脱髓鞘多神经病、肝胆病诸如传染性肝炎(甲型、乙型、丙型、丁型、戊型和其它非嗜肝病毒肝炎)、自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎、和硬化性胆管炎、炎性和纤维化肺病诸如炎性肠病(溃疡性结肠炎、克罗恩氏(Crohn)病)、麸胶敏感性肠病、和惠普尔氏(Whipple)病、自身免疫性或免疫介导的皮肤病包括大疱性皮肤病、多形红斑和接触性皮炎、银屑病、变应性疾病诸如哮喘、变应性鼻炎、特应性皮炎、食物超敏反应和荨麻疹、肺的免疫学疾病诸如嗜曙红细胞性肺炎、特发性肺纤维化和超敏感性肺炎、移植相关疾病包括移植物排斥和移植物抗宿主疾病。传染病包括AIDS(HIV感染)、甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎、细菌感染、真菌感染、原生动物感染和寄生虫感染。

[0156] “自身免疫病”在本文中以广义、一般意义使用,指哺乳动物中因哺乳动物个体对其自身组织组分的体液或细胞免疫应答而破坏正常或健康组织的病症或疾患。例子包括但不限于红斑狼疮、甲状腺炎、类风湿性关节炎、银屑病、多发性硬化、自身免疫性糖尿病和炎性肠病(IBD)。

[0157] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外和/或在体内抑制细胞生长的化合物或组合物。如此,生长抑制剂可以是显著降低处于S期的细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(处于S期以外的位置)的药剂,诸如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春药类(vincas)(长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine))、TAXOL®、和拓扑异构酶II抑制剂诸如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。那些阻滞G1的药剂也溢出进入S期停滞,例如DNA烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和ara-C。更多信息可参见《The Molecular Basis of Cancer》,

Mendelsohn 和 Israel 编, 第 1 章, 题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, Murakami 等人, WB Saunders, Philadelphia, 1995, 尤其是第 13 页。

[0158] 术语“前体药物”在用于本申请时指与母药 (parent drug) 相比对癌细胞的细胞毒性较小并能够酶促活化或转变为更具活性母药形式的药用活性物质的前体和衍生物形式。参见例如 Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy”, Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 和 Stella et al., “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)。本发明的前体药物包括但不限于含磷酸盐 / 酯前体药物、含硫代磷酸盐 / 酯前体药物、含硫酸盐 / 酯前体药物、含肽前体药物、D-氨基酸修饰前体药物、糖基化前体药物、含 β -内酰胺前体药物、含任选取代苯氧基乙酰胺的前体药物或含任选取代苯乙酰胺的前体药物、可转化为更具活性而无细胞毒性的药物的 5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿苷前体药物。可衍生为本发明使用的前体药物形式的细胞毒性药物的例子包括但不限于下文描述的那些化疗剂。

[0159] 术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞的功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素 (例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu 的放射性同位素)、化疗剂、和毒素诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素, 包括其片段和 / 或变体。

[0160] “化疗剂”指可用于治疗像癌症等疾患的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类 (alkylating agents), 诸如塞替派 (thiotepa) 和环磷酰胺 (cyclophosphamide) (CYTOXANTM); 磺酸烷基酯类 (alkyl sulfonates), 诸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶类 (aziridines), 诸如苯佐替派 (benzodepa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedepa) 和乌瑞替派 (uredepa); 乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine); 番荔枝内酯类 (acetogenin) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成类似物托泊替康 (topotecan)); 苔藓抑素 (bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 隐藻素类 (cryptophycins) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀 (dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlomaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamineoxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀

(fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine)、雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素 (enediynes) (例如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ_1^I 和加利车霉素 ω_1^I (参见例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33: 183-186(1994)); dynemicin 包括 dynemicin A; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (authramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esombicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins)、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨喋呤 (methotrexate) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤 (methotrexate)、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine)、5-FU; 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡萄糖内酯 (aceglatone); 醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defosfamide); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfomithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃坡霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); 二胺硝吡啶 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 2-乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); PSK®; 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西索菲兰 (sizofiran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verrucarin) A、杆孢菌素

(roridin)A 和蛇行菌素 (anguidin)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) (“Ara-C”); 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 塞替派 (thiotepa); 类紫杉醇类 (taxoids), 例如紫杉醇 (paclitaxel) (TAXOL ®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 和多西他基 (doxetaxel) (TAXOTERE ®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 吉西他滨 (gemcitabine); 6- 硫鸟嘌呤 (thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨喋呤 (methotrexate); 铂类似物, 诸如顺铂 (cisplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春碱 (vinblastine); 铂; 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 丝裂霉素 (mitomycin)C; 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine); 长春瑞滨 (vinorelbine); 诺维本 (navelbine); 能灭瘤 (novantrone); 替尼泊苷 (teniposide); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); 希罗达 (xeloda); 伊本膦酸盐 (ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 视黄酸 (retinoic acid); 卡培他滨 (capecitabine); 及任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物。此定义还包括作用为调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂, 诸如抗雌激素类, 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen)、雷洛昔芬 (raloxifene)、抑制芳香酶的 4(5)- 咪唑、4- 羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、那洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和托瑞米芬 (toremifene) (Fareston); 及抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡米特 (bicalutamide)、亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 及任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物。

[0161] 术语“细胞因子”是由一种细胞群释放, 作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子中包括生长激素, 诸如人生长激素、N- 甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素; 甲状旁腺素; 甲状旁腺素; 胰岛素; 胰岛素原; 松弛素; 松弛素原; 糖蛋白激素类, 诸如促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和促黄体激素 (LH); 肝生长因子; 成纤维细胞生长因子; 促乳素; 胎盘催乳素; 肿瘤坏死因子- α 和- β ; 穆勒氏 (Mullerian) 抑制性物质; 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 激活素; 血管内皮生长因子; 整联蛋白; 血小板生成素 (TPO); 神经生长因子, 诸如 NGF- α ; 血小板衍生生长因子; 转化生长因子 (TGF), 诸如 TGF- α 和 TGF- β ; 胰岛素样生长因子-I 和-II; 红细胞生成素 (EPO); 骨诱导因子 (osteoinductive factor); 干扰素, 诸如干扰素- α 、- β 和- γ ; 集落刺激因子 (CSF), 诸如巨噬细胞 CSF (M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞 CSF (GM-CSF) 和粒细胞 CSF (G-CSF); 白介素 (IL), 诸如 IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12; 肿瘤坏死因子, 诸如 TNF- α 或 TNF- β ; 及其它多肽因子, 包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。在用于本文时, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

[0162] 术语“处理”、“治疗”和“疗法”在用于本文时指治疗性处理、预防性处理、和防范性处理。

[0163] 术语“治疗有效量”指在哺乳动物中有效治疗疾病或紊乱的药物量。在癌症的情况下, 药物的治疗有效量可减少癌细胞的数目; 缩小肿瘤的尺寸; 抑制 (即在一定程度上减缓和优选阻止) 癌细胞浸润到周围器官中; 抑制 (即在一定程度上减缓和优选阻止) 肿瘤转

移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减轻一种或多种与病症有关的症状。在药物可阻止生长和/或杀死现有癌细胞的程度上,它可以是抑制细胞的和/或细胞毒性的。对于癌症疗法,可通过例如评估肿瘤负荷或体积、疾病进展时间(TTP)和/或测定响应速率(RR)来测量体内功效。

[0164] 术语“哺乳动物”在用于本文时指归入哺乳类的任何哺乳动物,包括人,高等灵长类、牛、马、犬和猫。在本发明的一个优选实施方案中,哺乳动物指人。

[0165] 术语“客观响应”(objective response)定义为受试者对治疗的完全或部分响应,使用实体瘤响应评估标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST)(J. Nat. Cancer hist. 92(3):205-216(2000))。

[0166] 术语“响应的持续时间”(duration of response)在本文中用于指自最初的响应或部分响应至疾病发展或死亡时的时间。

[0167] 术语“无进展存活”在本文中用于指自治疗第一天至疾病发展或死亡(两者中先发生者)的时间。

[0168] 术语“完全消退(CR)”用于表明连续三次测量的肿瘤体积 $\leq 13.5\text{mm}^3$ 。

[0169] 术语“部分消退(PR)”表明连续三次测量的肿瘤体积 $\leq$ 其第一天体积的50%且这些测量中的一次或多次 $\geq 13.5\text{mm}^3$ 。

[0170] II. 本发明的组合物和方法

[0171] A. DR5 抗体

[0172] 在本发明的一个实施方案中,提供了DR5抗体。例示性抗体包括多克隆的、单克隆的、人源化的、双特异性的和异源偶联的抗体。这些抗体可以是激动剂、拮抗剂或阻断性抗体。

[0173] 1. 多克隆抗体

[0174] 本发明的抗体可包括多克隆抗体。用于制备多克隆抗体的方法是本领域技术人员已知的。多克隆抗体可在哺乳动物中生成,例如通过一次或多次注射免疫剂和根据需要的佐剂。通常,免疫剂和/或佐剂将通过多次皮下或腹膜内注射而注射到哺乳动物中。免疫剂可包括DR5多肽(或DR5 ECD)或其融合蛋白。将免疫剂与已知在所免疫哺乳动物中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的。此类免疫原性蛋白质的例子包括但不限于匙孔蛾血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂。可采用的佐剂的例子包括弗氏完全佐剂和MPL-TDM佐剂(单磷酸基脂质A、合成的海藻糖 dicorynomycolate)。免疫方案可以由本领域技术人员无需过多实验做出选择。然后可以对哺乳动物采血,并对血清测定DR5抗体滴度。根据需要,可对哺乳动物进行加强免疫,直到滴度升高或达到稳定的高浓度(plateau)。

[0175] 2. 单克隆抗体

[0176] 或者,本发明的抗体可以是单克隆抗体。单克隆抗体可使用杂交瘤法制备,诸如Kohler and Milstein, Nature 256:495(1975)所述。在杂交瘤法中,小鼠、仓鼠或其它适宜的宿主动物通常用免疫剂免疫以引发生成或能够生成将特异性结合免疫剂的抗体的淋巴细胞。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。

[0177] 免疫剂将通常包括DR5多肽(或DR5 ECD)或其融合蛋白,诸如DR5ECD-IgG融合蛋白。或者,免疫剂可包括DR5的片段或部分,其中有一个或多个氨基酸参与Apo-2L与DR5

的结合。在一个优选的实施方案中,免疫剂包含与 IgG 序列融合的 DR5 胞外结构域序列。

[0178] 通常,若希望为人起源的细胞,则使用外周血淋巴细胞 (“PBL”),或者,若希望为非人哺乳动物来源的细胞,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后,使用合适的融合剂,诸如聚乙二醇,将淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞 (Goding, *Monoclonal Antibodies :Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103)。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿类、牛和人起源的骨髓瘤细胞。通常,采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可在合适的培养基中培养,所述培养基优选含有抑制未融合的永生化细胞生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT),那么用于杂交瘤的培养基通常将含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷 (“HAT 培养基”),这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。

[0179] 优选的永生化细胞系是那些高效融合、支持选定的抗体生成细胞稳定地高水平地表达抗体、并对诸如 HAT 培养基等培养基敏感的细胞系。更优选的永生化细胞系是鼠源骨髓瘤系,可从例如索尔克研究所细胞分配中心 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA) 和美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) 获得。此类鼠骨髓瘤细胞系的一个例子是 P3X63Ag8U.1 (ATCC CRL1580)。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已有描述 (Kozbor, *J. Immunol.* 133 :3001 (1984) ;Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987) pp. 51-63)。

[0180] 然后可对杂交瘤细胞在其中培养的培养基测定针对 DR5 的单克隆抗体的存在。优选的是,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,诸如放射免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。此类技术和测定法是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson and Pollard, *Anal. Biochem.* 107 :220 (1980) 的 Scatchard 分析来测定。

[0181] 在鉴定得到期望的杂交瘤细胞后,该克隆可通过有限稀释流程进行亚克隆,并通过标准方法进行培养 (Goding, 见上文)。适于这一目的的培养基包括例如 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基或 RPMI-1640 培养基。或者,杂交瘤细胞可在哺乳动物中作为腹水进行体内培养。

[0182] 可通过常规免疫球蛋白纯化流程,诸如例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基或腹水分开或纯化。

[0183] 单克隆抗体还可通过重组 DNA 技术来生成,诸如美国专利 4,816,567 中所述。编码单克隆抗体的 DNA 易于使用常规流程分离和测序 (例如使用能够特异性结合编码单克隆抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞是此类 DNA 的优选来源。一旦分离,可将 DNA 置于表达载体中,然后将该表达载体转染到不另外产生免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中,诸如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。还可以修饰 DNA,例如通过替代,即用人重链和轻链恒定区的编码序列代替同源鼠源序列 (Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81 : 6851 (1984)),或者通过共价接合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列。可以以该方式制备具有本文中抗 DR5 单克隆抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂

合”抗体。

[0184] 通常用此类非免疫球蛋白多肽替代本发明抗体的恒定区,或者用它们替代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变区以产生嵌合二价抗体,其包含对 DR5 具有特异性的一个抗原结合位点和对不同抗原具有特异性的另一抗原结合位点。

[0185] 嵌合或杂合抗体也可在体外使用合成蛋白质化学的已知方法来制备,包括那些涉及交联剂的方法。例如,可使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。适于此目的的试剂的例子包括亚氨基硫醇酯/盐(iminothiolate)和 4-巯基丁酰亚胺酸甲酯(methyl-4-mercaptobutyrimidate)。

[0186] 也可以生成单链 Fv 片段,诸如 Iliades et al., FEBS Letters, 409 : 437-441(1997) 中所述。此类单链片段使用各种接头的偶联记载于 Kortt et al., Protein Engineering, 10 : 423-433(1997)。本领域知道用于重组生产和操作抗体的多种技术。下文更为详细的描述了熟练技术人员通常使用的此类技术的例示性例子。

[0187] (i) 人源化抗体

[0188] 通常,人源化抗体中引入了一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变区。人源化可基本上遵循 Winter 及其同事的方法进行(Jones et al., Nature 321 : 522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332 : 323-327(1988); Verhoeyen et al., Science 239 : 1534-1536(1988)),即用啮齿类 CDR 或 CDR 序列替代人抗体的相应序列。

[0189] 因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体,其中基本上少于整个人可变区用来自非人物种的相应序列替代。在实践中,人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

[0190] 重要的是,抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力及其它有利的生物学特性。为了实现这一目标,依照一种优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,且为本领域技术人员所熟悉。可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像容许分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可从共有和输入序列中选出 FR 残基并进行组合,从而获得期望抗体特征,诸如对靶抗原的亲和力提高。一般而言,CDR 残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

[0191] (ii) 人抗体

[0192] 人单克隆抗体可通过杂交瘤方法生成。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系已有描述,例如 Kozbor, J. Immunol. 133 : 3001(1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York(1987)。

[0193] 现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫时生成抗体完整全集的转基因动物(例如小鼠)。例如,已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击时生成抗体。参见例如 Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 2551-2555(1993); Jakobovits et al., Nature 362 :

255-258(1993)。

[0194] Mendez 等人 (Nature Genetics15 :146-156(1997)) 进一步改进了技术,生成了称为“Xenomouse II”(异种移植物小鼠)的转基因小鼠品系,它在受到抗原攻击时生成高亲和力的完全人的抗体。这是如上所述通过将数百万碱基的人重链和轻链基因座种系整合到内源 J_H 区段有删除的小鼠中而实现的。Xenomouse II 携带 1,020kb 的人重链基因座,包含大约 66 种 V_H 基因、完整的 D_H 和 J_H 区、及三种不同的恒定区 (μ 、 δ 和 α),还携带 800kb 人 κ 基因座,包含 32 种 V _{κ} 基因、J _{κ} 区段和 C _{κ} 基因。这些小鼠中生成的抗体在所有方面与在人体中看到的极其相似,包括基因重排、装配和全集。由于内源 J_H 区段的删除防止了鼠基因座的基因重排,因此人抗体较之内源抗体优先表达。

[0195] 或者,噬菌体展示技术 (McCafferty et al., Nature348 :552-553(1990)) 可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变区 (V) 基因全集生成抗体和抗体片段。依照这种技术,将抗体 V 结构域基因以符合读码框的方式克隆到丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因中,并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状噬菌体颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,以抗体的功能特性为基础进行选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因的选择。如此,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行;有关综述参见例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3 :564-571(1993)。V 基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson et al., Nature352 :624-628(1991) 从衍生自经免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库中分离得到大量不同的抗恶唑酮抗体。可本质上遵循 Marks et al., J. Mol. Biol. 222 :581-597(1991) 或 Griffith et al., EMBO J. 12 :725-734(1993) 所述技术,由未免疫人供体构建 V 基因全集和分离针对大量不同抗原(包括自身抗原)的抗体。在天然免疫应答中,抗体基因以高比率积累突变(体细胞高变)。导入的有些变化将赋予更高亲和力,展示高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞在随后的抗原攻击过程中优先复制和分化。这种天然过程可通过采用称为“链改组”的技术来模拟 (Marks et al., Bio/Technol. 10 :779-783(1992))。在这种方法中,通过噬菌体展示得到的“初始”人抗体的亲和力可通过从未免疫供体得到的 V 结构域基因天然存在的变体(全集)相继替换重链和轻链 V 区基因而提高。此技术得以生成亲和力在 nM 范围中的抗体和抗体片段。Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21 :2265-2266(1993) 记载了用于构建非常大的噬菌体全集(也称为“所有文库的母库”(the mother-of-all libraries)) 的策略。基因改组也可用于从啮齿类抗体衍生人抗体,其中人抗体具有与起始啮齿类抗体相似的亲和力和特异性。依照此方法,它也称为“表位印记”(epitope imprinting),通过噬菌体展示技术得到的啮齿类抗体的重链或轻链 V 结构域基因用人 V 结构域基因全集替换,产生啮齿类-人嵌合物。对抗原进行的选择导致能够恢复功能性抗原结合位点的人可变区的分离,即表位决定(印记, imprint) 配偶体的选择。在重复该过程以替换剩余啮齿类 V 结构域时,得到人抗体(参见 PCT 专利申请 W093/06213, 公开于 1993 年 4 月 1 日)。与传统的通过 CDR 移植进行的啮齿类抗体的人源化不同,此技术提供完全人的抗体,它们不含啮齿类起源的框架或 CDR 残基。

[0196] 正如下文详细讨论的,本发明的抗体可任选包括抗体单体、抗体二聚体、以及抗体的多价形式。本领域技术人员可通过本领域已知技术并使用本文中的 DR5 抗体来构建此类二聚体或多价形式。用于制备单价抗体的方法也是本领域众所周知的。例如,一种方法涉

及免疫球蛋白轻链和经修饰重链的重组表达。重链通常在 Fc 区中的任意点截短以防止重链交联。或者,相关半胱氨酸残基用另一种氨基酸残基替代或删除以防止交联。

[0197] (iii) 双特异性抗体

[0198] 双特异性抗体指对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆,优选人或人源化抗体。在本案中,一种结合特异性是对 DR5 受体,另一种是对任何其它抗原,优选对另一种受体或受体亚基。例如,特异性结合 DR5 受体和另一种凋亡 / 信号受体的双特异性抗体在本发明的范围内。

[0199] 用于生成双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上,双特异性抗体的重组生成基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达,其中两种重链具有不同的特异性 (Millstein and Cuello, Nature 305 :537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤 (四源杂交瘤 (quadroma)) 生成十种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦且产物产率低。1993 年 5 月 13 日公开的 W093/08829 及 Traunecker et al., EMBO 10 :3655-3659 (1991) 中披露了类似的流程。

[0200] 依照一种不同的且更优选的方法,将具有期望结合特异性 (抗体-抗原结合位点) 的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合优选使用包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区。优选在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区 (CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物及,如果需要,免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体,并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽片段的相互比例提供了极大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率没有特别意义时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个表达载体。在该方法的一个优选实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对 (提供第二结合特异性) 构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径,因此发现这种不对称结构便于将期望的双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法披露于 1994 年 3 月 3 日公开的 PCR 申请 W094/04690。

[0201] 关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如 Suresh et al., Methods in Enzymology 121 :210 (1986)。

[0202] (iv) 异源偶联抗体

[0203] 异源偶联抗体也在本发明的范围之内。异源偶联抗体由两种共价连接的抗体构成。此类抗体建议例如用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞 (美国专利 4,676,980) 及用于治疗 HIV 感染 (PCT 申请 W091/00360 和 W092/200373 ;EP03089)。异源偶联抗体可使用任何方便的交联方法来生成。合适的交联剂是本领域众所周知的,连同许多交联技术一起披露于美国专利 4,676,980。

[0204] (v) 抗体片段

[0205] 在某些实施方案中,抗 DR5 抗体 (包括鼠的、人的和人源化的抗体,及抗体变体) 是抗体片段。已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段 (参见例如 Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24 :

107-117(1992);Brennan et al., Science229:81(1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如,可直接从大肠杆菌回收 Fab' -SH 片段并化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., Bio/Technology10:163-167(1992))。在另一个实施方案中, F(ab')₂ 片段是使用亮氨酸拉链 GCN4 形成的,以促进 F(ab')₂ 分子的装配。依照另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养物分离 Fv、Fab 或 F(ab')₂ 片段。用于生成抗体片段的多种技术对熟练从业人员将是显而易见的。例如,可使用木瓜蛋白酶进行消化。木瓜蛋白酶消化的例子记载于 94 年 12 月 22 日公开的 W094/29348 和美国专利 4,342,566。用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称作 Fab 片段,各自具有一个抗原结合位点,及一个残余 Fc 片段。胃蛋白酶处理产生一个 F(ab')₂ 片段,它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

[0206] 抗体消化中产生的 Fab 片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区 (CH₁)。Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于重链 CH₁ 结构域的羧基末端增加了少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab' -SH 是本文中对其中恒定区半胱氨酸残基携带游离硫醇基的 Fab' 的称谓。F(ab')₂ 抗体片段最初是作为在 Fab' 片段之间有铰链半胱氨酸的成对 Fab' 片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0207] (vi) 抗体的氨基酸序列变体

[0208] 抗 DR5 抗体的氨基酸序列变体通过将适宜的核苷酸变化引入抗 DR5 抗体 DNA 或者通过肽合成来制备。此类变体包括例如本文实施例中抗 DR5 抗体氨基酸序列内的残基删除和 / 或插入和 / 或替代。只要最终的构建物具有期望特性,可进行删除、插入和替代的任意组合以获得最终的构建物。氨基酸变化还可改变人源化或变异抗 DR5 抗体的翻译后加工,诸如改变糖基化位点的数目或位置。

[0209] 可用于鉴定抗 DR5 抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的一种方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如 Cunningham and Wells, Science244:1081-1085(1989) 所述。这里,鉴定了一个残基或一组靶残基 (例如带电荷的残基,诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸),并用中性或带负电荷的氨基酸 (最优选丙氨酸或聚丙氨酸) 替代,以影响氨基酸与 DR5 抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体,推敲出那些对替代展现出功能敏感性的氨基酸位置。如此,虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但是突变本身的性质不需要预先决定。例如,为了分析在给定位点处的突变的后果,在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变,并对所表达的抗 DR5 抗体变体筛选期望活性。

[0210] 氨基酸序列插入包括氨基和 / 或羧基末端的融合,长度范围从一个残基至包含上百个或更多残基的多肽,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N- 末端甲硫氨酰残基的抗 DR5 抗体或与表位标签融合的抗体。抗 DR5 抗体分子的其它插入变体包括在抗 DR5 抗体的 N- 或 C- 末端融合的酶或提高抗体血清半衰期的多肽或多元醇。

[0211] 另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在抗 DR5 抗体分子中有至少一个氨基酸残基去除并在它的位置插入不同残基。最感兴趣进行替代诱变的位点包括高变区,但也设想了 FR 改变。保守替代在表 1 中显示在标题“优选替代”下。如果此类替代导致生物学活性的改变,那么可以引入表 1 中称为“例示替代”的更实质性改变,或如下文中关于氨基酸

种类的进一步描述,并筛选产物。

[0212] 表 1

[0213]

原始残基	例示替代	优选替代
Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn(N)	Gln ;His ;Asp ;Lys ;Arg	Gln
Asp(D)	Glu ;Asn	Glu
Cys(C)	Ser ;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn ;Glu	Asn
Glu(E)	Asp ;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg
Ile(I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe ;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;Ile ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Ile
Lys(K)	Arg ;Gln ;Asn	Arg
Met(M)	Leu ;Phe ;Ile	Leu
Phe(F)	Leu ;Val ;Ile ;Ala ;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr ;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp ;Phe ;Thr ;Ser	Phe
Val(V)	Ile ;Leu ;Met ;Phe ;Ala ;正亮氨酸	Leu

[0214] 对抗体生物学特性的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来完成:(a) 替代区域的多肽主链的结构,例如作为折叠片或螺旋构象,(b) 靶位点处

分子的电荷或疏水性,或(c)侧链的体积。基于共同的侧链特性,可将天然存在残基如下分组:

[0215] (1) 疏水性的:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0216] (2) 中性、亲水性的:Cys、Ser、Thr;

[0217] (3) 酸性的:Asp、Glu;

[0218] (4) 碱性的:Asn、Gln、His、Lys、Arg;

[0219] (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;及

[0220] (6) 芳香族的:Trp、Tyr、Phe。

[0221] 非保守替代将需要用这些类别之一中的一个成员替换另一个类别的。

[0222] 任何不涉及保持人源化或变异抗 DR5 抗体正确构象的半胱氨酸残基也可替代,通常用丝氨酸,以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反,可向抗体中添加半胱氨酸键以改善其稳定性(特别是当抗体是抗体片段诸如 Fv 片段时)。

[0223] 特别优选的一类替代变体涉及替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。产生此类替代变体的一种便利方法是使用噬菌体展示的亲和力成熟。简单的说,将数个高变区位点(例如 6-7 个位点)突变,在每个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上,作为与每个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物。然后如本文所公开的根据其生物学活性(例如结合亲和力)对噬菌体展示的变体进行筛选。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者/另外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构,以鉴定抗体和人 DR5 之间的接触点可能是有益的。此类接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生此类变体,如本文所述对该组变体进行筛选,可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

[0224] (vii) 抗体的糖基化变体

[0225] 抗体在其恒定区中的保守位置发生糖基化(Jefferis and Lund, Chem. Immunol. 65:111-128(1997);Wright and Morrison, TibTECH15:26-32(1997))。免疫球蛋白的寡糖侧链影响蛋白质的功能(Boyd et al., Mol. Immunol. 32:1311-1318(1996); Wittwe and Howard, Biochem. 29:4175-4180(1990)),及糖蛋白各部分间的分子内相互作用,它可影响糖蛋白的构象和所呈现的三维表面(Hefferris and Lund, supra;Wyss and Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416(1996))。寡糖还可用来使给定糖蛋白靶向基于特定识别结构的某些分子。例如,已有报道,在无半乳糖基化 IgG 中,寡糖模块从 CH2 之间的空间伸出,末端 N-乙酰葡萄糖胺残基得以结合甘露糖结合蛋白(Malhotra et al., Nature Med. 1:237-243(1995))。用糖肽酶除去中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中所生成的 CAMPATH-1H(一种识别人淋巴细胞 CDw52 抗原的重组人源化鼠单克隆 IgG1 抗体)上的寡糖导致补体介导的细胞溶解(CMCL)完全降低(Boyd et al., Mol. Immunol. 32:1311-1318(1996)),而用神经氨酸酶选择性消除唾液酸残基不导致 DMCL 的丧失。还有报道,抗体的糖基化影响抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。具体而言,有报道说,其中 β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III(GnTIII)(催化等分 GlcNAc 形成的糖基转移酶)的表达受四环素调控的 CHO 细胞具有改良的 ADCC 活性(Umana et al., Mature Biotech. 17:

176-180(1999))。

[0226] 抗体的糖基化变体指其中抗体的糖基化样式发生改变的变体。改变意味着删除抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块,向抗体中添加一个或多个碳水化合物模块,改变糖基化(糖基化样式)的组成、糖基化的程度、等。糖基化变体可以通过例如在编码抗体的核酸序列中消除、改变和/或添加一个或多个糖基化位点来制备。

[0227] 抗体的糖基化典型的或是 N- 连接的或是 O- 连接的。N- 连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸)是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。如此,多肽中这两种三肽序列任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O- 连接的糖基化指将糖类 N- 乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用 5- 羟脯氨酸或 5- 羟赖氨酸。

[0228] 向抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利的完成(用于 N- 连接的糖基化位点)。所述改变还可通过向初始抗体的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于 O- 连接的糖基化位点)。

[0229] 编码抗 DR5 抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域知道的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况中),或者通过对早期制备的变体或非变体型式的抗 DR5 抗体进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0230] 还可以在不改变潜在核苷酸序列的前提下改变抗体的糖基化(包括糖基化样式)。糖基化很大程度上取决于用于表达抗体的宿主细胞。由于用于表达作为潜在治疗剂的重组糖蛋白例如抗体的细胞类型很少是天然细胞,因此可预期抗体的糖基化样式将有显著变异(参见例如 Hse et al., J. Biol. Chem. 272 :9062-9070(1997))。在宿主细胞的选择之外,在抗体的重组生成过程中影响糖基化的因素包括生长模式、培养基配方、培养密度、氧合作用(oxygenation)、pH、纯化方案、诸如此类。已经提出多种方法用于改变在特定宿主生物体中实现的糖基化样式,包括导入或过表达涉及寡糖生成的某些酶(美国专利 5,047,335 ;5,510,261 和 5,278,299)。糖基化或某些类型的糖基化可从糖蛋白中酶促清除,例如使用内切糖苷酶 H(Endo H)。另外,可对重组宿主细胞进行遗传工程改组,例如使其在加工某些类型的多糖方面缺陷。这些和类似的技术是本领域众所周知的。

[0231] 抗体的糖基化结构可通过碳水化合物分析的常规技术容易的分析,包括凝集素层析、NMR、质谱、HPLC、GPC、单糖成分分析、序贯酶促消化和 HPAEC-PAD,它利用高 pH 阴离子交换层析根据电荷来分离寡糖。为分析目的释放寡糖的方法也是知道的,包括但不限于酶促处理(常常使用肽 -N- 糖苷酶 F/ 内切 - β - 半乳糖苷酶进行)、使用强碱环境的消除以释放主要是 O- 连接结构、及使用无水肼的化学方法以释放 N- 和 O- 连接寡糖二者。

[0232] (viii) 例示性抗体

[0233] 本文中公开的发明有许多例示性实施方案。下文描述了本发明的多个典型实施方案。提供下面的实施方案只是出于例示目的,并非意图以任何方式限制本发明的范围。

[0234] 如下文实施例中所述,已经鉴定了许多抗 DR5 抗体。在一个实施方案中,本发明的 DR5 抗体将具有与本文中明确公开的任何抗 DR5 抗体相同的生物学特征。

[0235] 术语“生物学特征”用于指单克隆抗体的体外和/或体内活性或特性,诸如特异性

结合 DR5 或者阻断、诱导或增强 DR5 活化（或 DR5 相关活性）的能力。DR5 抗体的特性和活性在下文实施例中有进一步描述。

[0236] 任选的是，本发明的单克隆抗体将具有与抗体 16E2 或表 11-13 中所列任何抗体相同的生物学特征，和 / 或与抗体 16E2 或表 11-13 中所列任何抗体，特别是 Apomab 7.3 或 Apomab 8.3 结合相同表位。这可通过进行多种测定法来测定，诸如本文和实施例中所述。例如，为了测定某单克隆抗体是否具有与本文中明确提到的 DR5 抗体相同的特异性，可在竞争性结合测定法或凋亡诱导测定法中比较其活性，诸如下文实施例中所述的测定法。另外，特定抗 DR5 抗体所结合的表位可通过 DR5 和所讨论抗体间复合物的结晶学研究来测定。

[0237] 如此，Apomab 7.3 的 Fab 片段和 DR5 的胞外结构域间复合物的 X 射线结晶学研究显示出 Apomab 7.3 结合与 DR5 受体上 Apo2L/TRAIL 的结合位点交叠但不同的 DR5 表位。

[0238] 人的、嵌合的、杂合的或重组的抗 DR5 抗体（以及例如本文所述双抗体或三抗体）可包括具有全长重链和轻链的抗体，或其片段，诸如 Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv 片段、所述轻链或重链的单体或二聚体、其中所述重链或轻链通过接头分子相连的单链 Fv、或者所述轻链或重链的可变区（或高变区）与其它类型的抗体结构域联合的单链 Fv。

[0239] 如本文所述，DR5 抗体将任选具有一项或多项期望的生物学活性或特性。此类 DR5 抗体可包括但不限于嵌合的、人源化的、人的和亲和力成熟的抗体。如上所述，DR5 抗体可使用多种技术构建或改组以实现这些期望活性或特性。在一个实施方案中，DR5 抗体将具有至少 10^5M^{-1} 的 DR5 受体结合亲和力，优选至少在 10^6M^{-1} 至 10^7M^{-1} 的范围内，更优选至少在 10^8M^{-1} 至 10^{12}M^{-1} 的范围内，甚至更优选至少在 10^9M^{-1} 至 10^{12}M^{-1} 的范围内。无需过多实验，DR5 抗体的结合亲和力可依照本领域已知的技术通过测试 DR5 抗体来测定，包括 Scatchard 分析（参见 Munson et al., supra）。

[0240] 在另一个实施方案中，本发明的 DR5 可结合 DR5 上与 Apo-2L 所结合的表位相同的表位，或者结合 DR5 上与 Apo-2L 所结合的表位重合或交叠的表位，像例如称为 Apomab 7.3 的抗体。DR5 抗体还可以这样一种方式相互作用，以致于产生防止 Apo-2 配体结合 DR5 的空间构象。如上所述，本发明 DR5 抗体的表位结合特性可使用本领域已知技术来测定。例如，可在体外测定法中测试 DR5 抗体，诸如竞争性抑制测定法，以测定 DR5 抗体阻断或抑制 Apo-2L 结合 DR5 的能力。任选的是，可在竞争性抑制测定法中测试 DR5 抗体以测定 DR5 抗体抑制 Apo-2L 多肽结合 DR5-IgG 构建物或表达 DR5 的细胞的能力。任选的是，DR5 抗体将能够将 Apo-2L 与 DR5 的结合阻断或抑制至少 50%，优选至少 75%，甚至更优选至少 90%，这可例如在使用可溶形式 Apo-2 配体 (TRAIL)（诸如 Pitti et al., J. Biol. Chem., supra 中记载的胞外结构域序列第 114-281 位，也称为 Apo2L.0）和 DR5 ECD-IgG 的体外竞争性抑制测定法中测定。DR5 抗体的表位结合特性还可使用测试 DR5 抗体阻断 Apo-2L 诱导的凋亡的能力的体外测定法或通过结晶学研究来测定。

[0241] 在又一个实施方案中，DR5 抗体将包括具有与 Apo-2 配体 (TRAIL) 相当的活性的激动性抗体。优选的是，此类激动性 DR5 抗体将在至少一种类型的癌或肿瘤细胞系或者原发性肿瘤中诱导凋亡。激动性 DR5 抗体的凋亡活性可使用已知的体外或体内测定法来测定。多种此类体外和体内测定法的例子是本领域众所周知的。在体外，凋亡活性可使用已知技术来测定，诸如膜联蛋白 V 结合。在体内，凋亡活性可通过例如测量肿瘤负荷或体积的缩小来测定。

[0242] 如上所述,本文中所公开的抗体具有许多特性,包括调控某些生理学相互作用和/或过程的能力。如下文实施例所示,本文中所公开的抗体能够诱导 DR5 介导的凋亡,而且在癌症的多种鼠异种移植物模型中显示出有力的抗肿瘤特性。在本发明的一个具体实施方案中,抗体的激动性活性通过将抗体与抗人 IgG Fc 交联而得到增强。在本发明的一个优选实施方案中,这种增强的凋亡与 Apo-2L 的凋亡活性相当。

[0243] 本发明的其它实施方案包括这样的本文中所公开的抗 DR5 受体抗体,它与选自下组的一种或多种非蛋白质性质的聚合物相连:聚乙二醇、聚丙二醇和聚氧化烯(polyoxyalkylene)。在一个备选的实施方案中,本文中所公开的抗 DR5 受体抗体与细胞毒剂或酶相连。在还有一个实施方案中,本文中所公开的抗 DR5 受体抗体与放射性同位素、荧光化合物或化学发光化合物相连。任选的是,本文中所公开的抗 DR5 受体抗体是糖基化的或者未糖基化的。

[0244] 如下文详细讨论的,本发明的抗体可用于调控生理学过程的多种方法。本发明的一个这样的实施方案包括在哺乳动物细胞中诱导凋亡的方法,包括使表达 DR5 受体的哺乳动物细胞暴露于治疗有效量的分离的抗 DR5 受体单克隆抗体,包括结合图 3A-3C(411 个氨基酸)或图 4A-4C(440 个氨基酸)所示 DR5 受体尤其是其胞外结构域的抗体。在此类方法中,所述哺乳动物细胞通常是癌细胞。在优选的实施方案中,这些方法中所使用的抗 DR5 受体抗体是下文实施例中所描述的 Apomab 抗体,诸如 Apomab 7.3 或 Apomab8.3 抗体。

[0245] 本发明的还有一个实施方案是在哺乳动物细胞中诱导凋亡的方法,包括使表达 DR5 受体的哺乳动物细胞暴露于治疗有效量的分离的抗 DR5 受体单克隆抗体,包括结合如上定义的 DR5 受体或其胞外结构域的抗体。

[0246] 3 三链抗体

[0247] 三链抗体(triobody)也在本发明的范围内。此类抗体记载于例如 Iliades et al., supra 和 Kortt et al., supra。

[0248] 4. 其它修饰

[0249] 本文中设想了 DR5 抗体的其它修饰。本发明的抗体可通过将抗体与细胞毒剂(像毒素分子)或前体药物活化酶偶联来修饰,所述前体药物活化酶将前体药物(例如肽基化剂,参见 W081/01145)转变为活性抗癌药。参见例如 W088/07378 和美国专利第 4,975,278 号。这种技术也称为“依赖抗体的酶介导的前体药物疗法”(ADEPT)。

[0250] 可用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶组分包括能够以这样一种方式作用于前体药物从而将其转变为更有活性的细胞毒性形式的任何酶。可用于本发明方法的酶包括但不限于可将含磷酸盐/酯的前体药物转变为游离药物的碱性磷酸酶;可将含硫酸盐/酯的前体药物转变为游离药物的芳基硫酸酯酶;可将无毒 5-氟胞嘧啶转变为抗癌药 5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;可将含肽的前体药物转变为游离药物的蛋白酶,诸如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(诸如组织蛋白酶 B 和 L);胰天蛋白酶,诸如胰天蛋白酶-3;可转化含 D-氨基酸替代的前体药物的 D-丙氨酰羧肽酶;可将糖基化前体药物转变为游离药物的碳水化合物切割酶,诸如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶;可将用 β -内酰胺衍生的药物转变为游离药物的 β -内酰胺酶;及可将在其氨基氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转变成游离药物的青霉素酰胺酶,诸如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者,可使用具有酶活性的抗体,本领域也称作“抗体酶(abzymes)”,将本

发明的前体药物转变为游离活性药物（参见例如 Massey, Nature 328 :457-458 (1987)）。可如本文所述制备抗体-酶偶联物,用于将抗体酶投递至肿瘤细胞群。

[0251] 可通过本领域众所周知的技术将酶与抗体共价结合,诸如使用异双功能交联剂。或者,可使用本领域众所周知的重组 DNA 技术构建包含与本发明酶的至少功能活性部分连接的本发明抗体的至少抗原结合区的融合蛋白（参见例如 Neuberger et al., Nature 312 : 604-608 (1984)）。

[0252] 设想了更多的抗体修饰。例如,可将抗体与多种非蛋白质性质聚合物中的一种连接,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。还可将抗体包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中（例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊）、在胶状药物传递系统中（例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第 16 版,Osol, A. 编,1980。为了延长抗体的血清半衰期,可以如例如美国专利第 5,739,277 号中所述将补救受体结合表位掺入抗体（尤其是抗体片段）。在用于本文时,术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子（例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄）的 Fc 区中负责延长 IgG 分子体内血清半衰期的表位。

[0253] 本文公开的抗 DR5 抗体还可配制成免疫脂质体。可通过本领域知道的方法来制备包含抗体的脂质体,诸如 Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4030 (1980); 美国专利第 4,485,045 号和第 4,544,545 号中所记载的。美国专利第 5,013,556 号中公开了循环时间延长的脂质体。特别有用的脂质体可用含有磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物通过反相蒸发法生成。将脂质体挤过具有限定孔径的滤器,以产生具有期望直径的脂质体。可如 Martin et al., J. Biol. Chem. 257 :286-288 (1982) 中所记载的,将本发明抗体的 Fab' 片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联。任选在脂质体中包含化疗剂（诸如多柔比星）。参见 Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81 (19) :1484 (1989)。

[0254] 本发明的抗体包括“交联”DR5 抗体。术语“交联”在用于本文时指至少两个 IgG 分子结合到一起以形成一个（或单一）分子。DR5 抗体可使用多种连接分子来交联,优选的是,DR5 抗体是使用抗 IgG 分子、补体、化学修饰或分子工程而交联的。本领域技术人员应当领会,一旦抗体结合细胞表面膜,补体对抗体分子具有相对较高的亲和力。因此,认为补体可作为交联分子用于连接细胞表面膜所结合的两个或多个抗 DR5 抗体。

[0255] 5. 重组方法

[0256] 本发明还提供了编码本文所述 DR5 抗体的分离核酸、包含所述核酸的载体和宿主细胞、及用于生成所述抗体的重组技术。

[0257] 为了重组生成抗体,分离编码它的核酸,并插入可复制载体,用于进一步克隆 (DNA 扩增) 或表达。可以使用常规流程容易地分离编码抗体的 DNA 并测序（例如使用能够与编码抗体的基因特异性结合的寡核苷酸探针）。可以获得许多载体。载体构件通常包括但不限于下列一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

[0258] 本文中的方法包括用于生成嵌合的和重组的抗 DR5 抗体的方法,包括如下步骤:提供包含编码抗 DR5 抗体轻链或重链（或者轻链和重链二者）的 DNA 序列的载体;用所述载

体转染或转化宿主细胞；并在足以生成重组抗 DR5 抗体产物的条件下培养所述宿主细胞。

[0259] (i) 信号序列构件

[0260] 本发明的抗 DR5 抗体不仅可以直接重组生产，而且可以作为与异源多肽的融合多肽，所述异源多肽优选是在成熟蛋白质或多肽的 N- 末端处具有特异性切割位点的信号序列或其它多肽。所选异源信号序列优选是受到宿主细胞识别并加工（即受到信号肽酶切割）的。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞，用例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp-或热稳定肠毒素 II 前导序列的原核信号序列取代所述信号序列。为了酵母分泌，可以用例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列（包括糖酵母属和克鲁维氏酵母属 α 因子前导序列）、或酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母葡萄糖淀粉酶前导序列、或 W090/13646 中所述信号取代天然信号序列。在哺乳动物细胞表达中，可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列，例如单纯疱疹 gD 信号。

[0261] 将此类前体区的 DNA 连接到编码抗体的 DNA 的读码框中。

[0262] (ii) 复制起点构件

[0263] 表达和克隆载体都包含能够使载体在一种或多种选择的宿主细胞中复制的核酸序列。一般来说，在克隆载体中，这种序列为能够使载体不依赖于宿主染色体 DNA 而复制的序列，包括复制起点或自主复制序列。众所周知多种细菌、酵母、和病毒的此类序列。来自质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌，2 μ 质粒起点适合于酵母，而各种病毒起点（SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV、或 BPV）可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。通常，哺乳动物表达载体不需要复制起点构件（SV40 起点通常可能只因含有早期启动子才使用）。

[0264] (iii) 选择基因构件

[0265] 表达和克隆载体可包含选择基因，也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质：(a) 赋予抗生素或其它毒素抗性，例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤、或四环素；(b) 补足营养缺陷；或 (c) 提供不能由复合培养基获得的关键营养物，例如编码芽孢杆菌 D- 丙氨酸消旋酶的基因。

[0266] 选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质，因而幸免于选择方案。此类显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0267] 适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个例子是能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择标志，诸如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 -I 和 -II 优选灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0268] 例如，首先通过将所有转化子在含有甲氨蝶呤 (Mtx)，DHFR 的一种竞争性拮抗剂，的培养基中进行培养来鉴定经 DHFR 选择基因转化的细胞。在采用野生型 DHFR 时，适宜的宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。

[0269] 或者，可以通过在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷抗生素例如卡那霉素、新霉素、或 G418 的培养基中培养细胞来选择经编码抗 DR5 抗体、野生型 DHFR 蛋白质、和另一种选择标志诸如氨基糖苷 3' - 磷酸转移酶 (APH) 的 DNA 序列转化或共转化的宿主细胞（特别是包含内源 DHFR 的野生型宿主）。参阅美国专利 4,965,199。

[0270] 适用于酵母的选择基因因为存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因 (Stinchcomb et

al., 1979, Nature 282 :39)。trp1 基因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株, 例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1 提供了选择标志。Jones, 1977, Genetics 85 :12. 酵母宿主细胞基因组中存在 trp1 损害随之提供了用于通过在不存在色氨酸下生长来检测转化的有效环境。类似的, 用携带 Leu2 基因的已知质粒补足 Leu2 缺陷型酵母菌株 (ATCC20,622 或 38,626)。

[0271] 此外, 衍生自 1.6 μ m 环状质粒 pKD1 的载体可用于转化克鲁维氏酵母属酵母。或者, 报导了用于在乳酸克鲁维氏酵母中大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8 :135。还披露了适用于通过克鲁维氏酵母属的工业菌株分泌成熟重组人血清蛋白的稳定多拷贝表达载体。Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9 : 968-975。

[0272] (iv) 启动子构件

[0273] 表达和克隆载体通常包含受到宿主生物体识别的启动子, 且它与抗体核酸可操作连接。适用于原核宿主的启动子包括 PhoA 启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸 (trp) 启动子系统、和杂合启动子诸如 tac 启动子。然而, 其它已知的细菌启动子也是合适的。用于细菌系统的启动子还将包含与编码抗 DR5 抗体的 DNA 可操作连接的 Shine-Dalgarno (S. D.) 序列。

[0274] 已知真核细胞的启动子序列。事实上, 所有真核基因都具有富含 AT 区, 位于起始转录的位点上游大约 25 至 30 个碱基处。在许多基因的转录起点上游 70 至 80 个碱基处发现的另一种序列是 CNCAAT 区, 其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3' 端是 AATAAA 序列, 它可能是向编码序列的 3' 端添加聚腺苷酸尾的信号。所有这些序列合适的插入真核表达载体中。

[0275] 适用于酵母宿主的启动子序列的实例包括 3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子, 诸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶、和葡糖激酶。

[0276] 作为具有由生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步描述于 EP73,657。酵母增强子也可以有利的与酵母启动子联用。

[0277] 在哺乳动物宿主细胞中由载体转录抗 DR5 抗体受到例如由病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒 (诸如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和最优选的猿猴病毒 40 (SV40) 基因组、由异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子、及由热休克启动子获得的启动子的控制, 倘若此类启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0278] 方便的以 SV40 限制性片段的形式获得 SV40 病毒的早期和晚期启动子, 该片段还包含 SV40 病毒复制起点。方便的以 HindIII E 限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利 4,419,446 中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统。美国专利 4,601,978 中描述了该系统的一种改良。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素 cDNA 还可参阅 Reyes et al., 1982, Nature 297 :598-601。或者, 可以使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动

子。

[0279] (v) 增强子元件构件

[0280] 常常通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码本发明抗 DR5 抗体的 DNA 的转录。已知来自哺乳动物基因（球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、 α -胎蛋白和胰岛素）的许多增强子序列。然而，通常使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括 SV40 复制起点晚期一侧的增强子（bp100-270）、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参阅 Yaniv, 1982, Nature 297:17-18。增强子可以剪接到载体中，位于抗体编码序列的 5' 或 3' 位置，但是优选位于启动子的 5' 位点。

[0281] (vi) 转录终止构件

[0282] 用于真核宿主细胞（酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人、或来自其它多细胞生物体的有核细胞）的表达载体还将包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。此类序列通常可以由真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5' 端和偶尔的 3' 端获得。这些区域包含在编码多价抗体的 mRNA 的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参阅 W094/11026 及其中公开的表达载体。

[0283] (vii) 宿主细胞的选择和转化

[0284] 适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞是上文描述的原核生物、酵母、或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌，诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体，例如肠杆菌科，诸如埃希氏菌属 (*Escherichia*) 例如大肠埃希氏菌 (*E. coli*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 例如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、和志贺氏菌属 (*Shigella*)，以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*) 诸如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD266,710 中公开的地衣芽孢杆菌 41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 诸如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC31,446)，尽管其它菌株诸如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC31,537)、和大肠杆菌 W3110 (ATCC27,325) 也是合适的。这些例子只是例示而非限制。

[0285] 除了原核生物以外，真核微生物，诸如丝状真菌或酵母也是编码 DR5 抗体的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或常用的面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。然而，通常可获得许多其它属、种、和菌株且可用于本发明，诸如粟酒裂殖糖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主诸如例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC16,045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC24,178)、*K. waltii* (ATCC56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilarum*) (ATCC36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*)、和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*)；亚罗酵母属 (*Yarrowia*) (EP402,226)；巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP183,070)；假丝酵母属 (*Candida*)；瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP244,234)；粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)；许旺酵母属 (*Schwanniomyces*) 诸如许旺酵母 (*Schwanniomyces*)

occidentalis);和丝状真菌诸如例如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*)、和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0286] 适用于表达糖基化抗体的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞,它们来自诸如草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (毛虫)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (蚊子)、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* (蚊子)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (果蝇)、和家蚕 *Bombyx mori* 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染,例如苜蓿尺蠖 *Autographa californica* NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株,而且此类病毒可依照本发明用作本文的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。

[0287] 还可利用棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0288] 然后,脊椎动物细胞得到广泛关注,而且培养(组织培养)中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7, ATCCC RL1651);人胚肾系(293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36:59);幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216));小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251);猴肾细胞(CV1, ATCCCCL70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL34);牛鼠(buffalorat)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL75);人肝细胞(Hep G2, HB8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT060562, ATCC CCL51);TRI 细胞(Mather et al., 1982, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68);MRC5 细胞;FS4 细胞;人肝癌系(Hep G2);和骨髓瘤或淋巴瘤细胞(例如 Y0、J558L、P3 和 NS0 细胞)(参见美国专利 5,807,715)。

[0289] 将宿主细胞用上述用于抗体生成的表达或克隆载体转化,并在为了诱导启动子、选择转化子、或扩增编码期望序列的基因而恰当改良的常规营养培养基中培养。

[0290] (viii) 培养宿主细胞

[0291] 可以在多种培养基中培养用于生成本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外,可以使用下列文献中描述的任何培养基作为宿主细胞的培养基;Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58:44;Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102:255;美国专利 4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或 5,122,469;W090/03430;W087/00195;或美国专利复审 30,985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素、运铁蛋白、或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁、和磷酸盐)、缓冲剂(诸如 HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如 GENTAMYCIN™ 药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适当浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件诸如温度、pH 等即先前为表达而选择用于宿主细胞的,这对于普通技术人员而言是显然的。

[0292] (ix) 纯化

[0293] 在使用重组技术时,可以在细胞内、在周质空间中生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,通过例如离心或超滤清除宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter et al.,1992,Bio/Technology10:163-167 描述了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的流程。简单的说,在存在乙酸钠 (pH3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 时使细胞糊融化约 30 分钟。可以通过离心除去细胞碎片。如果将抗体分泌到培养基中,那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器,例如 AMICON 或 MILLIPORE PELLICON 超滤单元浓缩来自此类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括蛋白酶抑制剂诸如 PMSF 来抑制蛋白水解,而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

[0294] 可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析、和亲和层析来纯化由细胞制备的抗体组合物,优选的纯化技术是亲和层析。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体 (Lindmark et al.,1983,J. Immunol. Meth. 62:1-13)。蛋白 G 推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss et al.,1986,EMBO J. 5:1567-1575)。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能够获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。对于包含 C_H3 结构域的抗体而言,可使用 Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker,Phillipsburg,NJ) 进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术诸如离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土上的层析、肝素 SEPHAROSE™ 上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀。

[0295] B. DR5 抗体的用途

[0296] 本发明的 DR5 抗体具有多种效用。

[0297] 已知 DR5 介导凋亡信号。尽管数种类型的正常细胞表达 DR5,但是经由此受体的凋亡信号似乎主要局限于肿瘤细胞,它们在受到癌基因诸如 MYC 或 RAS 转化的背景下变得对死亡受体介导的凋亡更加易感 (Wang et al.,Cancer Cell 5:501-12(2004);Nesterov et al.,Cancer Res. 64:3922-7(2004))。DR5 频繁的由人癌细胞系以及原发瘤表达。如此,抗 DR5 抗体可用于癌症的诊断和治疗。例如,DR5 激动性抗体可用于在哺乳动物包括人中治疗癌症的方法。在这些方法中,对哺乳动物施用单独的或联合其它治疗剂或技术的 DR5 抗体,优选激动性抗体。所述癌症可以是任何类型的表达 DR5 的癌症,包括实体瘤,特别是在接受现有疗法时肿瘤更加进展 (progression) 或没有有效的已知疗法的晚期或转移性实体瘤。癌症的具体类型包括但不限于结肠直肠癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、非何杰金氏 (Hodgkin) 淋巴瘤 (NHL)、成胶质细胞瘤或黑素瘤,优选结肠直肠癌、NSCLC 或 NHL。

[0298] 另外,DR5 抗体可用于哺乳动物包括人中其它 DR5 相关病理学疾患的诊断和治疗,诸如免疫相关疾病。

[0299] 哺乳动物中本文所述各种病理学疾患的诊断可以由熟练从业人员进行。本领域可以得到得以例如诊断或检测哺乳动物中的癌症或免疫相关疾病的诊断技术。例如,癌症可以通过如下技术来鉴定,包括但不限于触诊、血液分析、X 射线、NMR、诸如此类。

[0300] 免疫相关疾病也可以容易的鉴定。

[0301] 在系统性红斑狼疮中,疾病的主要介质是生成对自身蛋白质 / 组织的自身反应性抗体及随后发生的免疫介导的炎症。多个器官和系统在临床上受到影响,包括肾、肺、肌肉骨骼系统、粘膜皮肤、眼、中枢神经系统、心血管系统、胃肠道、骨髓和血液。

[0302] 类风湿性关节炎 (RA) 是一种慢性系统性自身免疫性炎性疾病,主要累及多个关节的滑膜,由此导致对关节软骨的损伤。发病机制依赖 T 淋巴细胞,而且与类风湿因子,针对自身 IgG 的自身抗体的生成有关,由此导致免疫复合物的形成,它在关节液和血液中达到高水平。关节中的这些复合物可诱发显著的淋巴细胞和单核细胞浸润到滑膜中及随后显著的滑膜变化;关节腔 / 液受到类似细胞的浸润及添加许多嗜中性粒细胞。受影响的组织主要是关节,常常是对称样式。然而,关节外疾病也存在两种主要形式。一种形式是形成关节外损伤,伴有正在进行的渐进性关节病和肺纤维化、血管炎和皮肤溃疡的典型损伤。关节外疾病的第二种形式是所谓的费尔提氏 (Felty) 综合征,它发生在 RA 病程晚期,有时在关节病已经沉寂后,且涉及出现嗜中性粒细胞减少症、血小板减少症和脾肿大。这可伴随着多个器官中的血管炎及梗塞、皮肤溃疡和坏疽的形成。患者还常常在受影响关节上面的皮下组织中形成类风湿性结节;晚期的结节具有由混合的炎性细胞浸润物包围的坏死中心。可在 RA 中出现的其它表现包括:心包炎、胸膜炎、冠状动脉炎、伴有肺纤维化的间质性肺炎、干燥性角膜结膜炎和类风湿性结节。

[0303] 青少年慢性关节炎是一种慢性特发性炎性疾病,常常开始于 16 岁之前。其表型与 RA 有些相似;类风湿因子阳性的一些患者归入青少年类风湿性关节炎。疾病细分为三种主要类别:少数关节的、多关节的和系统性的。关节炎可以是严重的,通常是破坏性的,并导致关节僵硬和生长迟缓。其它表现可包括慢性前葡萄膜炎和系统性淀粉样变。

[0304] 脊柱关节病是具有有一些普遍临床特征且普遍与 HLA-B27 基因产物表达有关的一组病症。这些病症包括:强直性脊柱炎、莱特尔氏 (Reiter) 综合征 (反应性关节炎)、与炎性肠病有关的关节炎、与银屑病相关的脊椎炎、幼发型脊柱关节病及无差别 (undifferentiated) 脊柱关节病。区别性特征包括具有或没有脊椎炎的骶髂关节炎;炎性不对称关节炎;与 HLA-B27 有关 (血清学上定义的 MHC I 型 HLA-B 基因座的等位基因);眼的炎症;及没有与其它类风湿性疾病有关的自身抗体。对于诱发疾病来说关键的最相关细胞是 CD8+T 淋巴细胞,靶向由 MHC I 型分子呈递的抗原的细胞。CD8+T 细胞可与 MHC I 型等位基因 HLA-B27 反应,就像它是由 MHC I 型分子表达的外源肽。已有假设,HLA-B27 的表位可能模拟细菌或其它微生物的抗原性表位,因此诱导 CD8+T 细胞应答。

[0305] 系统性硬化 (硬皮病) 的病因学未知。疾病的特点是皮肤硬化;这可能是由活性炎性过程诱导的。硬皮病可以是局部的或系统性的;血管损伤是普遍的,而且微血管系统中的内皮细胞损伤是系统性硬化发展中的早期且重要的事件;血管损伤可能由免疫介导。皮肤损伤中存在单核细胞浸润物及在许多患者中存在抗核抗体暗示免疫学基础。ICAM-1 常常在皮肤损伤中成纤维细胞的细胞表面上调,说明 T 细胞与这些细胞相互作用可能在疾病的发病机理中起作用。累及的其它器官包括:胃肠道:平滑肌萎缩和纤维化,导致异常蠕动 / 运动;肾:同中心内皮下内膜增生 (concentric subendothelial intimal proliferation), 影响小弓形和叶间动脉,从而降低肾皮质血流,导致蛋白尿、氮血症和高血压;骨骼肌:萎缩、间质性纤维化、炎症;肺:间质性肺炎和间质性纤维化;及心:收缩带坏死、疤痕化 / 纤维化。

[0306] 特发性炎性肌病,包括皮肌炎、多肌炎和其它,是导致肌肉软弱的未知病因的慢性肌肉炎性病症。肌肉损伤/发炎常常是对称的和渐进的。自身抗体与大多数形式有关。这些肌炎特异性自身抗体针对并抑制涉及蛋白质合成的成分、蛋白质和 RNA 的功能。

[0307] 斯耶格伦氏 (Sjögren) 综合征是由免疫介导的炎症及随后泪腺和唾液腺功能破坏引起的。该病可能与炎性结缔组织疾病有关或伴随着炎性结缔组织疾病。该病与针对 Ro 和 La 抗原的自身抗体生成有关,这两种抗原都是小 RNA-蛋白质复合物。损害导致干燥性角膜结膜炎、口干燥、及其它表现或关联,包括胆汁性肝硬化、外周或感觉神经病、和可触知的紫癜。

[0308] 系统性血管炎包括这样的疾病,其中原发性损伤是炎症,后续对血管的损伤导致由受影响血管供应的组织缺血/坏死/变性,且在有些情况中最终导致终端器官功能障碍。血管炎病还可作为其它免疫-炎症介导疾病诸如类风湿性关节炎、系统性硬化等的继发损伤或后遗症发生,特别是在还与免疫复合物形成有关的疾病中。原发性系统性血管炎组中的疾病包括:系统性坏死性血管炎;结节性多动脉炎、过敏性血管炎和肉芽肿病、多脉管炎;韦格纳氏 (Wegener) 肉芽肿病;淋巴瘤样肉芽肿病;和巨细胞性动脉炎。各种各样的血管炎病包括:粘膜与皮肤淋巴结综合征 (MLNS 或川崎氏 (Kawasaki) 病)、分离的 CNS 血管炎、贝切特氏 (Behet) 病、血栓闭塞性血管炎 (伯格氏 (Buerger) 病) 和皮肤坏死性小静脉炎。所列大多数类型的血管炎的发病机理认为主要是由于免疫球蛋白复合物在血管壁中沉积及随后经 ADCC、补体活化或者两者诱导的炎性应答。

[0309] 结节病 (sarcoidosis) 是病因学未知,特征在于几乎机体任何组织中都存在上皮样肉芽肿的疾患;最常见的是累及肺。发病机理涉及患病部位持续存在活化的巨噬细胞和淋巴样细胞及随后由这些细胞类型释放局部和系统性活性产物而导致的慢性后遗症。

[0310] 自身免疫性溶血性贫血,包括自身免疫性溶血性贫血、免疫性全血细胞减少症和阵发性夜间血红蛋白尿,是由于生成与红细胞 (和在有些情况中以及其它血细胞,包括血小板) 表面表达的抗原反应的抗体的结果,是经补体介导的溶解和/或 ADCC/Fc 受体介导的机制去除那些抗体包被细胞的反映。

[0311] 在自身免疫性血小板减少症,包括血小板减少性紫癜,和其它临床背景中免疫介导的血小板减少症中,由于抗体或补体附着于血小板及随后经补体溶解、ADCC 或 Fc 受体介导的机制去除而发生血小板破坏/去除。

[0312] 甲状腺炎,包括格雷夫斯氏 (Graves) 病、桥本氏 (Hashimoto) 甲状腺炎、青少年淋巴细胞性甲状腺炎和萎缩性甲状腺炎,是由于针对甲状腺抗原的自身免疫应答及产生与存在于甲状腺中且通常对甲状腺特异的蛋白质反应的抗体。现有的实验模型包括自发性模型:大鼠 (BUF 和 BB 大鼠) 和鸡 (肥胖鸡品系);可诱导模型:用甲状腺球蛋白、甲状腺微粒体抗原 (甲状腺过氧化物酶) 免疫动物。

[0313] I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病是胰岛 β 细胞的自身免疫性破坏;该破坏由自身抗体和自身反应性 T 细胞介导。胰岛素或胰岛素受体的抗体也可产生胰岛素不响应的表型。

[0314] 免疫介导的肾病,包括肾小球肾炎和肾小管间质性肾炎,是由于抗体或 T 淋巴细胞介导的对肾组织的损伤,或是直接由于生成针对肾抗原的自身反应性抗体或 T 细胞,或是间接由于针对其它非肾抗原具有反应性的抗体和/或免疫复合物在肾中沉积。因此,导致

免疫复合物形成的其它免疫介导的疾病也可作为间接后遗症诱导免疫介导的肾病。直接和间接的免疫机制都导致炎症应答,它在肾组织中产生 / 诱导损伤形成,导致器官功能受损,在有些情况中发展成肾衰竭。体液和细胞两种免疫机制都可涉及损伤的发病机理。

[0315] 中枢和周围神经系统的脱髓鞘病,包括多发性硬化;特发性脱髓鞘多神经病或格-巴二氏 (Guillain-Barré) 综合征;和慢性炎性脱髓鞘多神经病,认为具有自身免疫基础,而且由于对少突胶质细胞或对髓磷脂直接造成损害而导致神经脱髓鞘。在 MS 中,有证据表明该病的诱导和发展依赖 T 淋巴细胞。多发性硬化是依赖 T 淋巴细胞的脱髓鞘病,而且具有复发-缓解过程或漫长的渐进过程。病因未知;然而,病毒感染、遗传恶病质、环境和自身免疫性都会起作用。损伤含有主要由 T 淋巴细胞介导的浸润物、小胶质细胞和浸润的巨噬细胞;CD4+T 淋巴细胞是损伤处的主要细胞类型。少突胶质细胞死亡和随后脱髓鞘的机理未知,但是可能是由 T 淋巴细胞驱动的。

[0316] 炎性和纤维化肺病,包括嗜嗜红细胞性肺炎;特发性肺纤维化和超敏性肺炎,可能涉及不受调控的免疫-发炎应答。抑制该应答将具有治疗益处。

[0317] 自身免疫或免疫介导的皮肤病,包括大疱性皮肤病、多形性红斑和接触性皮炎,由自身抗体介导,其发生依赖 T 淋巴细胞。

[0318] 银屑病是 T 淋巴细胞介导的炎症性疾病。损伤含有 T 淋巴细胞、巨噬细胞和抗原加工细胞,及一些嗜中性粒细胞的浸润物。

[0319] 变应性疾病,包括哮喘;变应性鼻炎;特应性皮炎;食物超敏性;和荨麻疹,它们是 T 淋巴细胞依赖的。这些疾病主要由 T 淋巴细胞诱导的炎症、IgE 介导的炎症或二者组合介导。

[0320] 移植相关疾病,包括移植排斥和移植物抗宿主病 (GVHD),依赖 T 淋巴细胞;抑制 T 淋巴细胞功能具有改善作用。

[0321] 其中通过干预免疫和 / 或炎症应答有益的其它疾病有传染病,包括但不限于病毒感染(包括但不限于 AIDS、甲型、乙型、丙型、丁型、戊型肝炎)、细菌感染、真菌感染、及原生动物和寄生虫感染(刺激 MLR 的分子(或衍生物 / 激动剂)可在治疗上用于增强对传染因子的免疫应答);免疫缺陷病(刺激 MLR 的分子 / 衍生物 / 激动剂可在治疗上用于增强对遗传性、获得性、感染诱发的(如在 HIV 感染中)或医源性(即如源自化疗)免疫缺陷的疾患的免疫应答);和瘤形成。

[0322] 抗体优选在载体,优选药学可接受载体中施用于哺乳动物。合适的载体及其配制剂记载于《Remington's Pharmaceutical Sciences》中,第 16 版,1980,Mack Publishing Co., Oslo 等人编。典型的是,在配制剂中使用适宜量的药学可接受盐使得配制剂等渗。载体的例子包括盐水、林格氏 (Ringer) 溶液和右旋糖溶液。溶液的 pH 优选约 5 至约 8,更优选约 7 至约 7.5。其它载体包括持续释放制剂,诸如含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质是定型产品的形式,例如薄膜、脂质体或微胶囊。对本领域技术人员显而易见的是,根据例如施用路径和所施用抗体的浓度,某些载体可能是更优选的。

[0323] 抗体可通过注射(例如静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、intraportal)施用于哺乳动物,或者通过确保以有效形式投递至血流的其它方法诸如灌注。抗体还可通过隔离灌注(isolated perfusion)技术来施用,诸如隔离组织灌注,以发挥局部治疗效果。局部或静脉内注射是优选的。

[0324] 施用抗体的有效剂量和时间表可凭经验确定,做出此类决定在本领域技术范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的抗体剂量将取决于例如将接受抗体的哺乳动物、施用路径、所用抗体的具体类型及施用于哺乳动物的其它药物。选择抗体适宜剂量的指导见关于抗体治疗性用途的文献,例如《Handbook of Monoclonal Antibodies》,Ferrone 等人编,Noges Publications, Park Ridge, NJ, 1985, 第 22 章,第 303-357 页;Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365-389。抗体单独使用的典型日剂量可在每天约 1 μ g/kg 体重至多达 100mg/kg 体重的范围内或更多,这取决于上述因素。

[0325] 抗体可以与有效量的一种或多种其它治疗剂联合施用于哺乳动物。在癌症的治疗中,尤其如此,因为许多肿瘤通过 p53 肿瘤抑制基因的灭活获得了对化疗或放疗的抗性。由于 DR5 以不依赖 p53 的方式刺激凋亡,因此预期它在临床上不仅可作为单一药剂使用,而且还可联合其它类型的癌症治疗,诸如例如化疗(化疗剂)、放疗、免疫佐剂(immunoadjuvant)、生长抑制剂、细胞毒剂、和/或细胞因子。还可采用已知在哺乳动物细胞中诱导凋亡的其它药剂,此类药剂包括 TNF- α 、TNF- β 、CD30 配体、4-1BB 配体和 Apo-2 配体,以及能诱导凋亡的其它抗体。所述一种或多种其它疗法可包括治疗性抗体(DR5 抗体以外的),此类抗体可包括抗 Her 受体抗体(诸如 HERCEPTIN[®] (trastuzumab), Genentech, Inc.)、抗 VEGF 抗体、抗 CD20 抗体(诸如 RITUXAN[®] (rituximab), Genentech, Inc.) 和针对 Apo-2 配体的其它受体的抗体诸如抗 DR4 抗体或针对其它 TNF 受体家族成员的抗体诸如 ENBREL[®] (etanercept) (Immunex)。

[0326] 本发明所设想的化疗包括本领域已知的且可获得的化学物质或药物,诸如多柔比星(Doxorubicin)、5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil)、依托泊苷(etoposide)、喜树碱(camptothecin)、亚叶酸(Leucovorin)、阿糖胞苷(Cytosine arabinoside)、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、塞替派(Thiotepa)、白消安(Busulfan)、Cytosin、泰素(Taxol)、甲氨喋呤(Methotrexate)、顺铂(Cisplatin)、美法仑(Melphalan)、长春碱(Vinblastine)和卡铂(Carboplatin)。此类化疗的制备和剂量给药时间表可依照制造商的说明书使用,或者由熟练从业人员凭经验决定。此类化疗的制备和剂量给药时间表还记载于《Chemotherapy Service》, M. C. Perry 编, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)。

[0327] 化疗优选在药学可接受载体中施用,诸如那些上文所描述的。化疗的施用模式可以与 DR5 抗体所采用的相同,或者它可以经不同模式施用于哺乳动物。例如,可对哺乳动物注射 DR5 抗体和口服施用化疗。

[0328] 放疗可依照本领域常用的和熟练技术人员知道的方案施用于哺乳动物。此类疗法可包括铯、铱、碘或钴照射。放疗可以是全身照射,或者可以是局部针对身体中或身体上的特定部位或组织。典型的是,放疗在约 1 周至约 2 周的一段时期以脉冲方式施用。然而,放疗可以在更长时间的一段时期施用。任选的是,放疗可以以单剂或连续的多剂施用。

[0329] 抗体可以与一种或多种其它治疗剂顺序或同时施用。抗体和治疗剂的量取决于例如所用药物的类型、所治疗的病理学疾患、及施用的时间表和路径,但是通常低于各自单独使用时的量。

[0330] 对哺乳动物施用抗体后,可以以熟练从业人员众所周知的多种方式监测哺乳动物

的生理学状况。

[0331] 设想了拮抗性或阻断性 DR5 抗体可用于治疗。例如,可将 DR5 抗体施用于哺乳动物(诸如上文所述)以阻断 DR5 受体结合 Apo-2L,由此提高 Apo-2L 疗法期间所施用 Apo-2L 的生物利用度以在癌细胞中诱导凋亡。

[0332] 本发明 DR5 抗体的治疗效果可在体外测定法中和使用体内动物模型来检验。多种众所周知的动物模型可用于进一步理解本文中所鉴定的 DR5 抗体在例如癌症或免疫相关疾病的形成和发病机理中的作用,及测试候选治疗剂的功效。此类模型的体内本质使得它们特别能预报在人类患者中的响应。

[0333] 免疫相关疾病的动物模型包括非重组的和重组的(转基因的)两种动物。非重组动物模型包括例如啮齿类,例如鼠模型。此类模型可使用标准技术,例如皮下注射、尾静脉注射、脾植入、腹膜内植入和肾囊下的植入,通过将细胞导入同基因小鼠来生成。

[0334] 例如移植物抗宿主病的动物模型是已知的。移植物抗宿主病在将有免疫能力的细胞移植到免疫遏制或耐受患者中时发生。供体细胞识别并应答宿主抗原。应答可从危及生命的严重炎症至腹泻和体重减轻的轻微病例变化。移植物抗宿主病模型提供了评估针对 MHC 抗原和次要移植物抗原的 T 细胞反应性的手段。一种合适的流程详细记载于《Current Protocols in Immunology》,单元 4.3。

[0335] 皮肤同种异体移植物排斥的动物模型是测试 T 细胞介导体内组织破坏的手段,它指示和测量其在抗病毒和肿瘤免疫中的作用。最常用的和公认的模型使用鼠尾部皮肤移植物。重复实验证明皮肤同种异体移植物排斥是由 T 细胞、辅助 T 细胞和杀伤效应 T 细胞而非抗体介导的。Auchincloss, H. Jr. and Sachs, D. H., 《Fundamental Immunology》,第 2 版, W. E. Paul 编, Raven Press, NY, 1989, 889-992。一种合适的流程详细记载于《Current Protocols in Immunology》,单元 4.4。可用于测试本发明组合物的其它移植物排斥模型有异基因心脏移植模型,记载于 Tanabe, M. et al., Transplantation, 58:23(1994) 及 Tinubu, S. A. et al., J. Immunol., 4330-4338(1994)。

[0336] 迟发型超敏感性的动物模型同样提供了细胞介导的免疫功能的测定法。迟发型超敏感性反应是 T 细胞介导的体内免疫应答,特征为在抗原攻击后一段时间流逝后才达到峰值的炎症。这些反应也在组织特异性自身免疫病中发生,诸如多发性硬化(MS)和实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE, MS 的一种模型)。一种合适的流程详细记载于《Current Protocols in Immunology》,单元 4.5。

[0337] 关节炎的动物模型是胶原诱发的关节炎。此模型共享人自身免疫性类风湿性关节炎的临床、组织学和免疫学特征,是人自身免疫性关节炎的公认模型。小鼠和大鼠模型的特征为滑膜炎、软骨和软骨下骨的侵蚀。本发明的 DR5 抗体可使用《Current Protocols in Immunology》,见上文,单元 15.5 中记载的方案来测试针对自身免疫性关节炎的活性。还可参见使用 Issekutz, A. C. et al., Immunology, 88:569(1996) 中记载的 CD18 和 VLA-4 整联蛋白的单克隆抗体的模型。

[0338] 已经记载了一种哮喘模型,其中通过用卵清蛋白使动物敏化,然后用通过气雾剂投递的相同蛋白质对动物攻击而诱导抗原诱发的气道高反应性、肺嗜曙红细胞增多和炎症。几种动物模型(豚鼠、大鼠、非人灵长类)在用气雾剂抗原攻击后显示与人的特性性哮喘相似的症状。鼠模型具有人哮喘的许多特征。测试本发明组合物在治疗哮喘中的活

性和效力的合适方法记载于 Wolyniec, W. W. et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 18 : 777 (1998) 及其引用的参考文献。

[0339] 另外,本发明的 DR5 抗体可在银屑病样疾病的动物模型上测试。本发明的 DR5 抗体可在 Schon, M. P. et al., *Nat. Med.*, 3 :183 (1997) 记载的 scid/scid 小鼠模型中测试,其中小鼠展示与银屑病类似的组织病理学皮肤损伤。另一种合适的模型是如 Nickoloff, B. J. et al., *Am. J. Path.*, 146 :580 (1995) 所述制备的人皮肤 /scid 小鼠嵌合体。

[0340] 众所周知用于测试候选治疗性组合物的安全性和抗癌活性的多种动物模型。这些动物模型包括将人肿瘤异种移植到无胸腺裸鼠和 / 或 scid/scid 小鼠中,或者遗传鼠肿瘤模型 (genetic murine tumor model) 诸如 p53 敲除小鼠。

[0341] 重组 (转基因) 动物模型可使用用于生成转基因动物的标准技术通过将本文中所鉴定的分子的编码部分导入目的动物的基因组来改造。可充当转基因操作对象的动物包括但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠、绵羊、山羊、猪和非人灵长类,例如狒狒、黑猩猩和猴,诸如猕猴。本领域已知的用于将转基因导入此类动物的技术包括原核显微注射 (pronucleic microinjection) (Hoppe and Wanger, 美国专利第 4,873,191 号); 逆转录病毒介导的基因转移进入种系 (例如 Van der Putten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 :6148-615 (1985)); 胚胎干细胞中的基因寻靶 (Thompson et al., *Cell*, 56 : 313-321 (1989)); 胚胎电穿孔 (Lo, *Mol. Cell. Biol.*, 3 :1803-1814 (1983)); 精子介导的基因转移 (Lavitrano et al., *Cell*, 57 :717-73 (1989))。综述参见例如美国专利第 4,736,866 号。

[0342] 为了本发明的目的,转基因动物包括那些只在其部分细胞中携带转基因的动物 (“镶嵌动物”)。转基因可作为单一转基因或者串联物例如头-头或头-尾串联物整合。还可能如下将转基因选择性导入特定细胞类型,例如 Lasko et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 :6232-636 (1992) 的技术。

[0343] 转基因在转基因动物中的表达可通过标准技术来监测。例如, Southern 印迹分析或 PCR 扩增可用于验证转基因的整合。然后可使用诸如原位杂交、Northern 印迹分析、PCR 或免疫细胞化学的技术分析 mRNA 表达水平。动物可进一步检验免疫病病理学的征候,例如通过组织学检验以测定免疫细胞进入特定组织的浸润或者癌性或恶性组织的存在。

[0344] 或者,可构建“敲除”动物,它由于编码本文中所鉴定的多肽的内源基因和导入动物胚胎细胞的改变的编码该同样的多肽的基因组 DNA 之间的同源重组而具有缺陷的或改变的编码该多肽的基因。例如,编码特定多肽的 cDNA 可依照已建立的技术用于克隆编码该多肽的基因组 DNA。可以将编码特定多肽的基因组 DNA 的一部分删除或用另一基因替换,诸如可用于监测整合的、编码可选择标志的基因。通常,载体中包含数千碱基未改变的侧翼 DNA (5' 和 3' 末端都有) (关于同源重组载体的描述参见例如 Thomas and Capecchi, *Cell*, 51 :503 (1987))。将载体导入胚胎干细胞系 (例如通过电穿孔),并选择其中所导入 DNA 与内源 DNA 发生同源重组的细胞 (参见例如 Li et al., *Cell*, 69 :915 (1992))。然后将所选细胞注射到动物 (例如小鼠或大鼠) 的胚泡中以形成聚集嵌合体 (参见例如 Bradley, 在《Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells :A Practical Approach》中, E. J. Robertson 编, IRL, Oxford, 1987, 第 113-152 页)。然后可将嵌合胚植入合适的假孕雌性代孕动物,并使胚胎足月产生“敲除”动物。在其生殖细胞中包含同源重组 DNA 的后代可

通过标准技术鉴定,并用于繁殖其中动物的所有细胞都包含同源重组 DNA 的动物。敲除动物可以在例如由于缺乏该多肽而具有抵御某些病理状况的能力和形成病理状况方面表征。

[0345] 在本发明的另一个实施方案中,提供了在诊断测定法中使用抗体的方法。例如,可以在诊断测定法中使用抗体来检测 DR5 在特定细胞和组织中的表达或过表达。可以使用本领域已知的多种诊断测定技术,诸如体内成像测定法、体外竞争性结合测定法、直接或间接三明治测定法和免疫沉淀测定法,以异相或同相 (heterogeneous or homogeneous phase) 进行 (Zola, Monoclonal Antibodies :A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158)。诊断测定法中所使用的抗体可以用可检测模块 (moiety) 标记。可检测模块应当能够直接或间接产生可检测信号。例如,可检测模块可以是放射性同位素,诸如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I ; 荧光或化学发光化合物,诸如异硫氰酸荧光素、罗丹明或荧光素;或酶,诸如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。可以采用本领域知道的用于将抗体与可检测模块偶联的任何方法,包括下列文献中所记载的那些方法: Hunter et al., Nature 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth. 40: 219-230 (1981); Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30: 407-412 (1982)。

[0346] DR5 抗体还可用于从重组细胞培养物或天然来源亲和纯化 DR5。在该过程中,使用本领域众所周知的方法将针对 DR5 的抗体固定化在合适的支持物上,诸如 Sephadex 树脂或滤纸。接着使固定化抗体接触含有待纯化 DR5 的样品,然后用合适的溶剂清洗支持物,所述溶剂将会基本上清除样品中除 DR5 以外的所有物质,而 DR5 结合到固定化抗体上。最后,用另一种合适的溶剂清洗支持物,所述溶剂将会从抗体上释放 DR5。

[0347] 在本发明的另一个实施方案,提供了制品和试剂盒,其中包含可用于治疗病理学疾患或者检测或纯化 DR5 抗体的物质。制品包括带有标签的容器。合适的容器包括例如药瓶、药管和试管。容器可以用各种材料制成,诸如玻璃或塑料。容器中装有含活性剂的组合物,所述活性剂有效治疗病理学疾患或者检测或纯化 DR5。组合物中的活性剂是 DR5 抗体,优选包括对 DR5 特异的单克隆抗体。容器上的标签指示该组合物用于治疗病理学疾患或者检测或纯化 DR5,而且还可以指示体内或体外使用的用法,诸如上文所述那些。

[0348] 本发明的试剂盒包括上文所述容器和装有缓冲剂的第二容器。它还可以包括商业和用户立场上所需的其它物质,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头、注射器和印有使用说明书的包装插页。

[0349] 提供下文实施例仅仅为了例示目的,而非意图以任何方式限制本发明的范围。

[0350] 在此完整收入本说明书中所引用的所有参考专利和文献作为参考。

[0351] 实施例

[0352] 除另有说明外,实施例中提及的商品化试剂依照制造商的说明书使用。下文实施例和整篇说明书中以 ATCC 编号鉴别的那些细胞的来源是美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia)。本文中公开的许多试剂和方案在 W099/37684、W000/73349、W098/32856、W098/51793 和 W099/64461 中有进一步讨论,在此完整收入其内容作为参考。

[0353] 实施例 1: 抗 DR5 抗体变体的设计和测试

[0354] 抗 DR5 抗体 16E2 衍生自来自人抗体噬菌体展示库的 scFv, 而且已经记载于 1998 年 11 月 19 日公开的 W098/51793 (见实施例 14)。scFv16E2 的核苷酸和氨基酸序列分别显

示于图 5(SEQ ID NO:9) 和图 6(SEQ ED NO:10)。在图 6 中,鉴定了信号序列及重链和轻链 CDR 区(CDR1、CDR2 和 CDR3 区标有下划线)。

[0355] 材料和方法

[0356] 全长抗 DR5 抗体 16E2 的构建

[0357] 下文所述实施例需要全长 IgG。因此,将 16E2 的可变区克隆到先前记载的 pRK 载体中,该载体适于全长 IgG1 抗体的哺乳动物细胞表达(Gorman et al., DNA Prot. Eng. Tech. 2: 3-10(1990))。16E2 可变区的氨基酸序列与 Kabat 数据库(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, NIH, 5th edition) 的比较指出,16E2 的轻链可变区(VL) 衍生自人 λ 轻链基因家族。因此,首先将 16E2 的可变区亚克隆到含有 λ 恒定区的载体中。设计 PCR 引物以添加限制酶位点 SfiI 和 MscI,然后用这两种酶消化扩增得到的可变区。将此片段插入经过类似消化的包含 λ 恒定区的载体。因为此载体是为了在大肠杆菌中表达 Fab 而设计的,对于 IgG 表达,再次 PCR 扩增完整轻链编码区,所用引物在编码区的 5' 端添加限制性位点 AgeI,在 3' 端添加限制性位点 HindIII。然后,将此 AgeI-HindIII 片段插入经过类似消化的载体 pDR1(Clontech)。质粒 pDR1 的完整序列显示于图 11(SEQ ID NO:15)。

[0358] 对于型式 1 的重链,PCR 扩增 scFv16E2 的重链可变区(VH),所用引物设计成在所述结构域的 5' 端添加 PvuII 位点,在 3' 端添加 ApaI 位点。然后将此片段克隆到载体 pDR2(Clontech) 的 PvuII/ApaI 位点,用于表达完整重链(VH-CH1-CH2-CH3 结构域)。质粒 pDR2 的完整序列显示于图 12(SEQ ID NO:16)。

[0359] 全长抗体 16E2 重链和轻链的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 7-10(SEQ ID NO: 11-14)。具体而言,图 7 和 8(SEQ ID NO:11 和 12) 显示了全长 16E2 重链的氨基酸和核苷酸序列,图 9 和 10(SEQ ID NO:13 和 14) 显示了全长 16E2 轻链的氨基酸和核苷酸序列。全长 16E2 抗体的重链和轻链在下文中将称为“型式 1”。

[0360] IgG 变体的构建

[0361] 使用定点诱变(Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492(1985)) 分别对轻链或重链构建变体。将编码轻链型式 1 的质粒 pDR1 或编码重链型式 1 的 pDR2 转化到大肠杆菌菌株 CJ236(BioRad, Joyce and Grindley, J. Bacteriol. 158:636-643(1984)) 中,用于制备含脱氧尿苷的单链 DNA 模板。将诱变反应的等分试样转化到大肠杆菌菌株 XL-1 Blue(Stratagene, San Diego, CA) 中,用于纯化双链 DNA。对于每种变体,使用 ABI377x1 或 ABI3730x1 自动化 DNA 测序仪(Perkin-Elmer Corp.),对编码轻链或重链的 DNA 完整测序。

[0362] 对于每种 IgG 变体,通过将表达轻链的质粒和表达重链的质粒共转染到经腺病毒转化的人胚肾细胞系 293(Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-74, (1977)) 中,进行瞬时转染。简而言之,将 293 细胞在转染前那天分瓶(split),并在含血清培养基中涂布(plate)。次日,连同 pAdVantage™ DNA(Promega, Madison, WI) 一起,从轻链和重链的双链 DNA 制备磷酸钙沉淀物,并逐滴加到板中。将细胞于 37℃ 温育过夜,然后用 PBS 清洗并在无血清培养基中培养 4 天,此时收获条件培养液。使用蛋白 A-Sepharose CL-4B 从培养物上清液纯化抗体,缓冲液交换到 10mM 琥珀酸钠,140mM NaCl, pH6.0 中,并使用 Centricon-10(Amicon) 浓缩。通过测量 280nm 处的吸光度或通过定量氨基酸分析来测定蛋白质浓度。

[0363] 电化学发光 DR5 结合测定法

[0364] 以液相竞争性 ELISA 形式测定抗 DR5 抗体的相对结合。DR5-Fc 融合蛋白使用生物素-X-NHS (Research Organics, Cleveland, OH) 生物素化, 标准抗体 (或是型式 1 或是 Apomab 7.3) 用 ORI-TAG NHS 酯 (IGEN International, Gaithersburg, MD) 依照制造商的说明书标记。为了进行结合测定法, 将测试抗体样品在测定缓冲液 (PBS, pH7.4, 含 0.5% BSA 和 0.5% Tween-20) 中连续稀释。将等体积 (各 25 μ l) 的抗体样品 (浓度范围 50,000–0.85ng/ml)、ORI-TAG 标准抗体 (150ng/ml) 和生物素化的人 DR5-Fc (15ng/ml) 加到 96 孔聚丙烯板中, 于室温在轻轻摇动下温育 1.5 小时。然后添加链霉亲和素磁珠 (IGEN International) (25 μ l/孔), 将板如上再温育 30 分钟。添加测定缓冲液至每孔终体积 250 μ l, 使用 ORIGIN M384 仪器 (IGEN International) 对板读数。使用样品曲线的四参数拟合 (four parameter fit) 计算 IC₅₀ 值。

[0365] 生物测定法: 肿瘤细胞生长抑制 / 杀伤

[0366] 在体外肿瘤细胞杀伤测定法中测定每种抗体变体的表观效力。在含 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基中培养 Colo205 人结肠癌细胞系。在装有培养基的 96 孔组织培养板中进行标准品 (或是型式 1 或是 Apomab 7.3) 和样品的 2 倍连续稀释, 所述培养基中含有或不含 10 μ g/ml 浓度的交联抗体 (抗人 Fc, 山羊亲和纯化的 F(ab')₂)。然后将细胞 (20,000/孔) 加到板中。将板于 37°C 温育总共 48 小时。温育的最后 3 个小时向孔中加入 Alamar Blue。使用荧光计对荧光读数, 激发为 530nm, 发射为 590nm。使用四参数曲线拟合程序分析数据。

[0367] 结果

[0368] 此项工作的总体目标是开发具有改良的生化特性和改良的功效且不损害安全性的抗 DR5 抗体。

[0369] 使用了数种方法来实现期望的改进, 包括 DR5 重链和轻链中的氨基酸替代以改进化学稳定性或热稳定性; 折叠; CDR 残基的丙氨酸扫描以确定哪些残基对于结合或折叠可能是重要的, 因此可以为了提高亲和力而改变; 及使用噬菌体展示 CDR 库来鉴定具有改进的亲力的克隆。还对框架区中的变化研究了它们对免疫原性和生物学活性的可能影响。

[0370] 使用同源性模型 (图 19 和 20) 来帮助选择许多这些改变。

[0371] 重链变体

[0372] 系列 1

[0373] 型式 2 的重链包含相对于型式 1 的 5 处改变。这些改变 (Q6E、V11L、E12V、R13Q 和 K105Q) 位于可变区的框架中, 是为了使框架更接近人 V_HIII 共有序列而添加的。表 1 显示了首先构建的变体, 它们在重链 CDR 中有改变。这些突变体的 ssDNA 模板是型式 2。第 102 位 Leu 变成 Tyr 是为了改进包装 (packing), 及由此提高稳定性。与此改变相结合, Asn53 变成 Gln 或 Tyr 是为了消除潜在的脱酰胺位点。Met34 变成 Leu 是为了消除潜在的氧化位点。将这些重链变体与最初的轻链一起表达, 产生型式 20–23 (表 1)。包含三处突变 M34L、N53Q 和 L102Y 及型式 2 中的框架改变的重链此后称为 “tripleheavy one” 或 TH1, 而包含三处突变 M34L、N53Y 和 L102Y 及型式 2 的框架的重链类似地称为 TH2。

[0374] 表 1: 重链 CDR 变体

[0375]

型式 ^a	替代	IC50 变体 IC50v1 ^b	有交联的 生物测定 活性 ^c	无交联的 生物测定 活性 ^d
20	N53Q, L102Y	0.11	0.24	*
21	M34L, N53Q, L102Y	0.42	0.54	< 1
22	N53Y, L102Y	0.08	1.30	微弱的
23	M34L, N53Y, L102Y	0.28	4.47	无

[0376] a 模板 :型式 2

[0377] bOrigen[®] 竞争性人 DR5 结合测定法

[0378] c 肿瘤细胞抑制测定法

[0379] d 肿瘤细胞抑制测定法

[0380] 由于添加 M34L 突变后结合和体外细胞杀伤活性有损失 (即 v21 与 v20 相比, v23 与 v22 相比, 表 1), 使用重链型式 20 作为模板, 在重链 CDR1 中进行了一系列另外的突变, 用丙氨酸或通过扫描 Kabat 数据库得出的其它残基替代。将这些重链与型式 1 的轻链一起表达。表 2 显示了这些型式的突变的氨基酸、得到的相对于 v1 的结合、及生物测定法数据。Gly33 变成 Ala 提高结合并提高效力。包含三处突变 G33A、N53Q 和 L102Y 的此重链称为 TH3。同样, 构建了包含 G33A、N53Y 和 L102Y 的 TH4。Thr28 变成 Ala 与 v1 相比也提高活性, 包含 T28A、N53Q 和 L102Y 的重链称为 TH9。表 5 总结了 TH1、TH2、TH3、TH4 和 TH9 中的 CDR 改变。这 5 种重链在与轻链组合 (见下文) 共表达后进行了进一步研究。

[0381] 表 2 :CDR H1 中的变体

[0382]

型式 ^a	突变	IC50 突变体 IC50v1 ^b	有交联的 生物测定 活性 ^c	无交联的 生物测定 活性 ^d
111	G26A	0.11	0.42	无
	F27A	ND	ND	ND
112	T28A	0.19	0.8	与 v1 相同
127	F29A	7.6	无	
55	D30A	2.2	ND	ND
54	D308	2.1	ND	ND

57	D31A	> 10	ND	ND
56	D31S	4.3	ND	ND
113	Y32A	1.65	> 100	无
58	G33A	0.1	0.097	微弱的
59	M34A	0.8	3.49	微弱的
49	M34I	1.2	14.6	无
50	M34S	1.0	13.8	无
	S35H	ND	ND	ND
130	S35A	ND	ND	ND

[0383] a 所有变体的模板都是型式 20

[0384] bOrigen[®] 竞争性人 DR5 结合测定法

[0385] c 肿瘤细胞抑制测定法

[0386] d 肿瘤细胞抑制测定法

[0387] 丙氨酸扫描 CDR H2 和 CDR H3

[0388] 为了进一步阐明重链 CDR2 和 CDR3 中每个氨基酸的贡献,通过用丙氨酸替代这些残基中的每一个构建了突变体。使用重链型式 1 作为模板,用编码丙氨酸替代的合成寡核苷酸进行定点诱变。将这些重链与型式 1 轻链一起表达。表 3 和 4 中显示了所得抗体的表观亲和力和效力的变化。Gly99Ala 和 Arg100Ala 都提高活性,因此这些改变可用于构建重链的另外的组合突变体。

[0389] 表 3 :CDR H2 的丙氨酸扫描

[0390]

型式 ^a	突变	相对于 v1 的结合比率 ^b	有交联的生物测定活性 ^c	无交联的生物测定活性 ^d
139	G50A	3.55	1.91	无
140	I51A	ND	ND	ND
141	N52A	2.42	ND	ND
	W52aA	ND	ND	ND
142	N53A	ND	0.19	微弱的

160	G54A	1.49	ND	ND
151	G55A	1.0	0.86	低了超过 100 倍
143	S56A	1.1	0.81	约等于 v1
144	T57A	1.2	0.54	低了超过 100 倍
152	G58A	0.55	1.24	低了约 5 倍
153	Y59A	2.22	3.42	无
154	A60A	0.55	0.49	低了超过 100 倍
158	D61A	0.725	ND	ND
155	S62A	0.65	0.73	低了超过 100 倍
156	V63A	0.041	ND	低了约 3 倍
159	K64A	ND	ND	ND
	G65A	ND	ND	ND

[0391] a 模板 :型式 1

[0392] bOrigen[®] 竞争性人 DR5 结合测定法

[0393] c 肿瘤细胞抑制测定法

[0394] d 肿瘤细胞抑制测定法

[0395] 表 4 :CDR H3 中的丙氨酸突变体

[0396]

型式 ^a	突变	相对于 v1 的结合比率 ^b	有交联的生物测定活性 ^c	无交联的生物测定活性 ^d
108	K102A	1.82	> 10	无
109	I95A	8.38	无	无
(1040)	L96A	ND	ND	ND
126	G97A	8.52	无	无
110	Y98A	24.2	无	无
128	G99A	0.09	0.43	高了约 8 倍

129	R100A	0.47	0.128	高了约 4 倍
116	G100aA	2.84	无	无
117	W100bA	Na	无	无
118	Y100cA	10.85	无	无
119	F100dA	Na	无	无
120	D101A	1.83	~ 1	无

[0397] a 模板 : 型式 1

[0398] b0rigen [®] 竞争性人 DR5 结合测定法

[0399] c 肿瘤细胞抑制测定法

[0400] d 肿瘤细胞抑制测定法

[0401] 系列 2

[0402] 构建了与型式 TH1、TH2、TH3 和 TH4 使用相同 CDR 的第 2 系列重链, 其中框架残基 E6、L11、V12、Q13 和 Q105 回复成在型式 1 中发现的氨基酸, 即 Q6、V11、E12、R13 和 K105。这些重链称为 TH5、TH6、TH7 和 TH8 (见表 5)。

[0403] 表 5 : 在所有 CDR 环中有突变的重链变体

[0404]

重链组合	CDR H1 中的突变	CDR H2 中的突变	CDR H3 中的突变	6、11、12、13、105 处的框架残基
TH1	M34L	N53Q	L102Y	E, L, V, Q, Q
TH2	M34L	N53Y	L102Y	E, L, V, Q, Q
TH3	G33A	N53Q	L102Y	E, L, V, Q, Q
TH4	G33A	N53Y	L102Y	E, L, V, Q, Q
TH5	M34L	N53Q	L102Y	Q, V, E, R, K
TH6	M34L	N53Y	L102Y	Q, V, E, R, K
TH7	G33A	N53Q	L102Y	Q, V, E, R, K
TH8	G33A	N53Y	L102Y	Q, V, E, R, K
TH9	T28A	N53Q	L102Y	E, L, V, Q, Q

[0405] 轻链变体

[0406] 轻链 CDR 的丙氨酸扫描

[0407] 为了更好的理解轻链 CDR 残基对结合和生物学活性的贡献,使用定点诱变将每个氨基酸变成丙氨酸。将每一种轻链变体与重链型式 1 (V1) 组合,用于如上所述的 IgG 的瞬时表达。表 6 总结了轻链 CDR 丙氨酸扫描的结果。有趣的是,与许多其它抗体相反,CDR L1 似乎在抗原结合中发挥重要作用。此轻链是 λ 链,图 20 所示模型说明 CDR1 能形成 α 螺旋。更能容忍 L2 和 L3 中的残基用丙氨酸替代,除了 CDR2 中的 G50A,它消除结合。相反,有些丙氨酸替代,尤其是 R91A 和 K51A,提高结合和生物活性。

[0408] 表 6 :轻链丙氨酸扫描突变体

[0409]

型式 ^a	位置	突变	结合 ^b	生物测定 ^c	生物测定 ^d
89	CDRL1	Q24A	1.22	0.87	*
40	CDRL1	G25A	2.54	ND	ND
90	CDRL1	D26A	0.76	0.88	无
41	CDRL1	S27A	2.36	2.79	微弱的
42	CDRL1	L28A	> 100	ND	ND
46	CDRL1	R29A	3.0	ND	ND
38	CDRL1	S30A	2.35	5.51	N/A
39	CDRL1	Y31A	> 10	ND	ND
47	CDRL1	A33G	6.4	ND	ND
43	CDRL1	S34A	1.54	3.23	微弱的
64	CDRL2	G50A	> 1000	ND	ND
65	CDRL2	K51A	0.4	0.027	***
93	CDRL2	N52A	3.12	ND	ND
94	CDRL2	N53A	7.54	ND	ND
95	CDRL2	R54A	0.89	0.87	*
107	CDRL2	P55A	0.95	1.35	微弱的
163	CDRL2	S56A	1.9	ND	ND
72	CDRL3	N89A	3.1	Na	无

73	CDRL3	S90A	0.9	0.91	1.0
74	CDRL3	R91A	0.5	0.098	****
164	CDRL3	D92A	0.22	ND	ND
137	CDRL3	S93A	2.51	0.85	微弱的
138	CDRL3	S94A	0.31	0.15	微弱的
165	CDRL3	G95A	0.06	ND	ND
71	CDRL3	N95aA	1.0	1.17	ND
(1024)	CDRL3	H95bA	ND	ND	ND
166	CDRL3	V96A	1.34	ND	ND
167	CDRL3	V97A	1.05	ND	ND

[0410] a 模板 : 型式 1

[0411] bOrigen[®] 竞争性人 DR5 结合测定法

[0412] c 肿瘤细胞抑制测定法

[0413] d 肿瘤细胞抑制测定法

[0414] 基因家族残基交换 (Gene family residue swap)

[0415] 使用第二种类型的定向突变体来研究轻链。在此方法中,将模型中表现为位于环的任一侧、因此可能发挥支持作用而非直接涉及抗原结合的 CDR 残基交换成其它密切相关 λ 基因家族中对应位置的残基。也将这些突变体与 v1 重链一起表达,表 7 中总结了结果。在 CDR L2 中, G50K、K51D 的组合在结合和生物活性两个方面都产生显著改进,包含四处突变 G50K、K51D、N52S、N53E 的组合也相对于 v1 有所改进。不能耐受 (tolerate) 同一区域中只牵涉一处残基替代的其它更保守的改变。

[0416] 表 7 : 基于相关基因家族序列的轻链变体

[0417]

型式 ^a	位置	突变	结合 ^b	生物测定 ^c	生物测定 ^d
25	CDRL1	Q24S, D26E, Y31K, S34Y	11.7	ND	ND
24		D2GE, Y31K	> 100	ND	ND
51		S34Y	> 100	ND	ND
44		Q24S	0.96	1.23	微弱的

45		Y31K	> 1000	ND	ND
106		Y32H	5. 1	1. 71	无
26	CDRL2	G50K, K51D, N52S, N53E	0. 33	0. 071	1
27		G50S, KS1D, N52S	0. 92	0. 29	微弱的
91		G50K, K52S, N53E	14. 71	ND	ND
92		G50K, K51D	0. 09	0. 43	***
28		N52L	6. 88	ND	ND
125		G50S, KS1D, N52S, N53E	1. 99	1. 0	ND
32		N52Q	5. 28	ND	ND
33		NS3Q	4. 48	ND	ND
61		N52S, N53E	> 100	ND	ND
62		N52S	1. 1	1. 1	无
63		N52Q, N53S	> 10	ND	ND
60	CDRL3	N89L, R91A, N95aT, H95bY	> 100	ND	ND
52		N95aT, H95bY	2. 3	ND	ND
30		N95aQ	1. 65	7. 3	微弱的
31		N89Q	> 1000	ND	ND
29		H95bY	1. 68	2. 14	微弱的
66		H95bR	0. 7	0. 97	1. 0
67		N95aK	1. 0	0. 44	1. 0

[0418] a 模板 :型式 1

[0419] bOrigen[®] 竞争性人 DR5 结合测定法

[0420] c 肿瘤细胞抑制测定法

[0421] d 肿瘤细胞抑制测定法

[0422] 用噬菌体抗体库进行的亲和力选择

[0423] 对每个 CDR, L1、L2 和 L3, 分别构建噬菌体展示库并选择对 DR5-Ig 的亲和力提高

的克隆。对模型（图 20）的检查指出 CDR 中的哪些残基有可能是暴露的，选择这些残基进行随机化。将型式 1 的完整 λ 轻链和 VH 结构域克隆到噬菌体展示载体 pSI602 中，参见 Vajdos et al., J.Mol.Biol. 320 :415-428 (2002)，进一步描述于 Sidhu et al., Curr. Opin.Biotechnol. 11 :610-616 (2002)。文库构建中使用 Kunkel 诱变。将 v1 噬菌粒转化到大肠杆菌菌株 CJ236 中，用于制备单链 DNA，并使用在为随机化选择的每个位点包含 TAA 密码子的寡核苷酸来产生文库模板。然后使用利用简并密码子 NNS（其中 N 是 G、A、T 和 C 的等比混合物，S 是 G 和 C 的等比混合物）的寡聚物来构建文库。CDRL1 使用终止模板寡聚物 CA945 和文库寡聚物 CA946 来突变。CDRL2 使用终止模板寡聚物 CA947 和文库寡聚物 CA948 来突变。CDRL3 使用终止模板寡聚物 CA949 和文库寡聚物 CA950 来突变。表 8 中总结了文库构建。

[0424] 表 8

[0425]

寡聚物编号	区	目的	序列
CA945	CDRL1	终止模板	CAT GCC AAG GAG ACT AAC TCA GAT AAT ATT AAG CTA GCT GGT ACC AGC (SEQ ID NO :21)
CA946	CDRL1	随机化	CAT GCC AAG GAG ACN NSC TCA GAN NST ATN NSG CTA GCT GGT ACC AGC (SEQ ID NO :22)
CA947	CDRL2	终止模板	GTC ATC TAT GGT AAA TAA TAA CGG CCG TCT GGC ATC CCA GAC CG (SEQ ID NO :23)
CA948	CDRL2	随机化	CTT GTC ATC TAT GGT AAA NNS NNS NNS CCG TCT GGC ATC CCA GAC CG (SEQ ID NO :24)
CA949	CDRL3	终止模板	GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG TAA TAA TAA GGC TAA CAT GTG GTA TTC GGC GGA GG (SEQ ID NO :25)
CA950	CDRL3	随机化	GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG NNS NNS NNS GGC NNS CAT GTG GTA TTC GGC GGA GG (SEQ ID NO :26)

[0426] 将随机诱变反应的产物电穿孔到 XL1-Blue 大肠杆菌细胞 (Stratagene) 中，通过与 M13K07 辅助噬菌体一起培养 14-16 小时来扩增。通过连续稀释和涂板来评估库容量 (library size)，假设将最初的转化物涂布到羧苄青霉素板上且是 1.9×10^9 至 2.2×10^9 个克隆。

[0427] 将文库以液相使用生物素化的 DR5-Ig (Genentech) 淘选 4 轮。将大约 10^{11} 个噬菌

体用 1ml PBS 中的 3% 脱脂奶粉, 0.2% Tween 溶液 (噬菌体封闭液) 在旋转轮上于室温封闭 1 小时。将 DR4-IG 和 CD4-IG 各自以 1 微摩尔加到封闭液中以降低非特异性结合。然后第一轮以 100nM 加入生物素化的抗原, 容许结合进行 2 小时。在后续轮次的淘选中, 抗原浓度降至 10、5 和 1 纳摩尔。

[0428] 为了捕捉结合抗原的噬菌体, 将包被有链霉亲和素的磁珠 (Dyna1) 首先用噬菌体封闭液清洗 3 次, 然后用 1ml 噬菌体封闭液于室温封闭 1 小时。将磁珠用磁体集中并加到抗原-噬菌体溶液中达 15 分钟。然后用磁珠将磁珠-抗原-噬菌体复合物拉出溶液。然后将这些磁珠用噬菌体封闭液清洗 3 次, 用 PBS-Tween (0.02% Tween) 清洗 3 次, 并用 PBS 清洗 1 次。通过用 100 μ l 0.1M HCl 浸泡 10 分钟从磁珠上洗脱噬菌体, 并用 NaOH 中和。将洗脱的噬菌体用于感染 XL1 Blue 大肠杆菌, 如上所述繁殖供后续轮次。每一轮提高清洗的严格性。

[0429] 对来自每个文库的克隆测序。对于 L1 文库, 只得到野生型序列, 支持此 CDR 对于抗原结合或抗体构象是重要的想法, 潜在螺旋中可容忍极少数突变。对于 L2 中的文库, 没有找到共有序列, 说明多种 CDRL2 序列对于结合 DR5 是可接受的。对于 L3 文库, 数种序列出现多次, 使用寡聚物指导的诱变将这些序列移植到全长轻链载体上。再次在 293 细胞中表达 IgG, 使用重链型式 1 进行共转染。表 9 描述了表达全长抗体的 L3 序列及结合和生物测定法的结果。掺入型式 69 和 70 的两种所测序列产生与型式 1 相比结合和生物活性提高的抗体。

[0430] 表 9: 衍生自噬菌体文库的轻链 CDR3 的蛋白质序列

[0431]

型式 ^a	CDR L3 序列	相对于 v1 的结合比率 ^b	有交联的生物测定活性 ^c	无交联的生物测定活性 ^d
68	NSRDSSGSHVV	1.3	0.973	1.0
69	NSRSYSGNHVV	0.1	0.143	****
70	NSRSSSGSHVV	0.2	0.152	***

[0432] a 模板: 型式 1

[0433] bOrigen[®] 竞争性人 DR5 结合测定法

[0434] c 肿瘤细胞抑制测定法

[0435] d 肿瘤细胞抑制测定法

[0436] 组合轻链

[0437] 如上所述, 鉴定了每个轻链 CDR 中独自提高体外结合和肿瘤细胞杀伤的突变。然后组合这些突变以产生数种每个 CDR 中有改进的轻链。这些“triple light1”等称为 TL1、TL2 和 TL3, 描述于表 10。如此, TL1 包含型式 44 中鉴定的 L1 突变、型式 26 中鉴定的 L2 突变和型式 29 中鉴定的 L3 突变的组合。同样, TL2 包含来自型式 44 的 L1 突变、来自 v65 的 L2 突变和来自 v69 的 L3 突变的组合, TL3 包含来自 v44 的 L1、来自 v65 的 L2 和来自 v74 的 L3 的组合。

[0438] 表 10 :轻链组合中的突变

[0439]

轻链组合	突变, CDRL1	突变, CDRL2	突变, CDRL3
TL1	Q24S	G50K, K51D, N52S, N53E	H95bY
TL2	Q24S	K51A	D92S, S93Y
TL3	Q24S	K51A	R91A

[0440] 表 11 :Apomab 命名法

[0441]

轻链 :	TL1	TL2	TL3
重链			
TH1	Apomab 1. 1	Apomab 1. 2	Apomab 1. 3
TH2	Apomab 2. 1	Apomab 2. 2	Apomab 2. 3
TH3	Apomab 3. 1	Apomab 3. 2	Apomab 3. 3
TH4	Apomab 4. 1	Apomab 4. 2	Apomab 4. 3
TH5	Apomab 5. 1	Apomab 5. 2	Apomab 5. 3
TH6	Apomab 6. 1	Apomab 6. 2	Apomab 6. 3
TH7	Apomab 7. 1	Apomab 7. 2	Apomab 7. 3
TH8	Apomab 8. 1	Apomab 8. 2	Apomab 8. 3
TH9	Apomab 9. 1	Apomab 9. 2	Apomab 9. 3

[0442] 表 12 中显示了其它 Apomab 抗体

[0443]

Apomab 型式	第 6、11、12、13 和 102 位处的框架氨基酸序列	对 DR5 的结合, 相对于 Apomab 7. 3	效力, 相对于 Apomab 7. 3, 有交联	生物测定活性, 有交联
7. 3*	Q VER K	1. 00	1	ND
3. 3**	E LVQ Q	2. 50	0. 53	无

18.3	E LVQ K	0.51	0.75	无
24.3	E VER Q	0.80	1	无
25.3	Q LVQ K	0.77	1	低了约 3 倍
26.3	Q VER Q	0.53	1	低了约 6 倍
27.3	E VER K	1.90	1.2	无
28.3	Q LER K	0.48	0.94	低了约 5 倍
29.3	Q LEQ K	0.52	1.2	低了约 7 倍
30.3	Q WQ K	0.78	0.66	高了约 3 倍
36.3	Q VVR K	0.66	ND	ND
37.3	Q VEN K	0.84	ND	ND
38.3	Q LVR K	0.47	ND	ND
18.2	E LVQ K	0.11	0.16	无
24.2	E VER Q	0.14	0.18	无
25.2	Q LVQ K	0.10	0.13	高了约 32 倍
26.2	Q VER Q	0.14	0.22	高了约 10 倍
27.2	E VER K	0.10	0.15	无

[0444] * 框架与型式 1 相同

[0445] ** 框架与人共有 VH-III 相同

[0446] Apomab 表达

[0447] 在衍生出 triple 重链和 triple 轻链后,通过 293 细胞中 3 种轻链中的每一种与 9 种重链中的每一种的共转染产生了 9×3 栅格 (grid) 的组合抗体,并如上所述纯化所得抗体。使用这些 Apomab 的体外研究指出数种型式在生物测定法中相当有效。因此,制备适于体内小鼠肿瘤模型研究的材料。

[0448] Apomab 回收和纯化

[0449] 用于从收获的细胞培养物流体 (HCCF) 回收和纯化 Apomab 抗体的方法描述如下:

[0450] Prosep 蛋白 A 层析 - 将由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生的收获的细胞培养物流体 (HCCF) 用 1.5M Tris 碱将 pH 调至 7.0,加载到用 25mM NaCl/25mM Tris/5mM EDTA, pH7.5 平衡的 Prosep 蛋白 A 柱 (Millipore, USA) 上。通过用平衡缓冲液清洗,接着用平衡缓冲液中的 0.5M TMAC 清洗第二遍,再接着用平衡缓冲液清洗第三遍,使不结合的蛋白质流过并

清除。使用 0.1M 乙酸的阶梯洗脱 (step elution) 将 Apomab 抗体从蛋白 A 柱上洗脱下来。通过 A280 监测柱洗脱液。合并 Apomab 抗体峰。

[0451] SP-Sepharose Fast Flow (速流) 层析 - 将来自 Prosep 蛋白 A 的 Apomab 抗体的合并液用 1.5M Tris 碱将 pH 调至 5.5, 然后加载到用 25mM MOPS pH7.1 平衡的 SP-Sepharose Fast Flow 柱 (Amersham Pharmacia, Sweden) 上。加载样品后, 将柱用平衡缓冲液清洗至 A280 达到基线。通过使用 12 倍柱体积的平衡缓冲液 pH8 中的 0-0.2M NaCl 线性梯度, 将 Apomab 抗体从柱上洗脱下来。通过 A280 监测柱洗脱液。收集级分并合并根据 SEC-HPLC 分析的测定含有正确折叠的 Apomab 抗体的那些级分。

[0452] Q-Sepharose Fast Flow 层析 - 然后将 SP-Sepharose 级分合并液加载到用 50mM NaCl/25mM Tris 缓冲液 pH8 平衡的 Q-Sepharose FF 柱 (Amershampharmacia, Sweden) 上。用平衡缓冲液清洗柱子, 收集柱洗脱液中的 Apomab 抗体。

[0453] UF/DF 配制 - 在分子量截留值约 10,000 道尔顿的膜上, 通过超滤来浓缩 Q-Sepharose 合并液。然后将浓缩后的 Q Sepharose FF 合并液对 10 倍体积的 10mM 组氨酸/8% 蔗糖, pH6 渗滤。用 10% 聚山梨醇酯 20 调节 (condition) 渗滤后的 Q Sepharose 合并液至聚山梨醇酯 20 的终浓度达到 0.02%。将配制好的散装液 (bulk) 经无菌 0.22 μ m 滤器过滤, 贮存于 2-8°C 或 -70°C。通过 SDS-PAGE、SEC-HPLC 和氨基酸序列分析测定 Apomab 抗体的最终纯度。

[0454] 测序在 ABI3700 或 ABI3730 Applied Biosystems 测序仪上进行。测序层析图使用 Sequencer (GeneCodes, Ann Arbor, MT) 序列分析软件进行分析。

[0455] 测试 Apomab 的体外活性

[0456] 在开始 Apomab 的体内研究前, 对每个批次如上所述测试体外活性。这些结果显示于表 13。

[0457] 表 13 : Apomab 的体外活性

[0458]

Apomab 型式	表观亲和力相对于型式 1(v1) 提高的倍数	有交联的, 表观效力相对于型式 1(v1) 提高的倍数	无交联的, 相对于型式 1(v1) 的表观效力
1.1	11.30	24	无
1.2	52.10	14	无
1.3	13.10	6.5	无
2.1	12.80	5.5	无
2.2	9.60	3	无
2.3	29.00	6.5	无
3.1	15.00	14	无

3.2	29.20	22	无
3.3	15.00	8	无
4.1	25.70	11	无
4.2	23.10	6	无
4.3	10.30	12	无
5.2	26.90	22	高了约 8 倍
5.3	2.80	10	低了约 2.4 倍
6.2	31.60	6	高了约 2 倍
6.3	1.50	4	低了约 4 倍
7.2	31.20	22	高了约 5 倍
7.3	4.30	16	低了约 2 倍
8.2	28.60	9	非常微弱的
8.3	8.30	11	低了约 8 倍
9.1	21.90	36	无
9.2	29.90	48	无
9.3	10.00	ND	无

[0459] 实施例 2 :在 Colo205 人结肠癌异种移植物模型和结肠直肠癌的其它异种移植物模型中评估 Apomab 的抗肿瘤活性

[0460] 此实施例和后续实施例中所使用的常用缩写如下 :

[0461] CR 完全消退 (complete regression)

[0462] PR 部分消退 (partial regression)

[0463] MTD 最大耐受剂量 (maximum tolerated dose)

[0464] MTV 中值肿瘤体积 (median tumor volume)

[0465] NTR 非治疗相关死亡 (non-treatment related death)

[0466] LTTFs 长期无肿瘤存活者 (long-term tumor-free survivor)

[0467] PBS 磷酸盐缓冲盐水 (phosphate-buffered saline)

[0468] q3dx4 每 3 天 1 次,共 4 剂 (once every three days for a total of four doses)

[0469] qdx1 第 1 天给 1 剂 (one dose given on Day1)

- [0470] qdx5 每天 1 次,持续 5 天 (once daily for five days)
- [0471] TFS 无肿瘤存活者 (tumor-free survivor)
- [0472] TR 治疗相关死亡 (treatment related death)
- [0473] TTE 至终点的时间 (time to endpoint)
- [0474] T-C 接受治疗的动物和对照动物之间中值 TTE 值的差异,以天计
- [0475] TGD 中瘤生长延迟 (tumor growth delay); T-C; 接受治疗的组与对照
- [0476] 组相比中值 TTE 的增加通常表述成%对照
- [0477] Time to 2xVo 倍增时间 (doubling time, (DT)); 肿瘤体积加倍所花费的时间
- [0478] $\text{LogCellKill} = \log_{10}(V_{\text{前}}/V_{\text{后}})$, 治疗时实际肿瘤体积 $\log_{10}(V_{\text{前}})$ 和 $\log_{10}(V_{\text{后}})$ 之间的差异 (Chenevert et al., Clin. Cancer Res. 3:1457-1466 (1997))
- [0479] 给 6-8 周龄雌性无胸腺裸鼠 (Charles River Laboratories) 每只小鼠在右背侧部皮下接种 0.2ml 体积中的 5×10^6 个 Colo205 细胞。给所有小鼠打耳签 (ear-tag) 以供鉴别。一旦肿瘤体积达到约 100-200mm³, 将携瘤 Colo205 小鼠随机分组并施行治疗。
- [0480] 治疗方案是腹膜内单剂及数剂媒介 (vehicle) 对照、或标准品和测试抗体, 3mg/kg/ 小鼠或 10mg/kg/ 小鼠。在有些情况中, 将来自媒介和 10mg/kg 组的 3 或 4 只小鼠安乐死, 在治疗后 5 分钟、24 小时或 48 小时收集血清和肿瘤, 供血清药物浓度和肿瘤组织学研究。在剩余的小鼠中, 肿瘤测量在前 2 周每周进行两次, 然后另外 4 周, 每周一次。
- [0481] 在 Colo205 异种移植无胸腺裸鼠模型中得到的结果显示于图 21-25。
- [0482] 图 21 显示了 Apomab 5.3、6.3 和 8.3 每一种在测试的所有剂量在降低平均肿瘤体积方面都高度有效, 而且它们的功效与抗体 16E2 型式 1 基本上相同。
- [0483] 在 Colo205 异种移植无胸腺裸鼠模型中测试了腹膜内单剂 Apomab 5.2、6.2、5.3、7.2 和 7.3 的功效, 结果显示于图 22。测试的所有 Apomab 在降低肿瘤体积方面高度有效, 而且它们的功效与抗体 16B2 型式 1 基本上相同。
- [0484] 类似的, 图 23 所示结果显示了 Apomab 5.2、7.3 和 8.3 在结肠直肠癌的这个模型中在降低肿瘤体积方面有效。在此实验中, Apomab 和 16E2 以 1mg/kg 和 3mg/kg 的剂量施用, 但其它方面的治疗如上所述。Apomab 7.3 和 8.3 的功效特别显著, 而且在 20 天的测试期间不显示任何逆转。
- [0485] 如图 24 所示, 在 Colo205 异种移植物模型中, Apomab 7.3 的抗癌活性远远超越 Apomab 23.3 和 25.3 的活性。
- [0486] 图 25 显示了比较衍生自稳定的和瞬时的细胞系的 Apomab 7.3 在 Colo205 小鼠异种移植物模型中的抗肿瘤活性的测定结果。简而言之, 如上所述, 给 6-8 周龄雌性无胸腺裸鼠每只小鼠在右背侧部皮下接种 0.2ml 体积中的 5×10^6 个 Colo205 细胞。剂量显示于图中。图 25 中的数据显示分别衍生自稳定的和瞬时的细胞系的 Apomab 7.3 在 Colo205 小鼠异种移植物模型中同等有效。
- [0487] 图 26 显示了测试 Apomab 7.3 (10mg/kg 剂量) 作为单一疗法 (monotherapy) 或与 80mg/kg CPT-11 (伊立替康 (irinotecan), 用于治疗结肠直肠癌的一种已知药物) 的联合疗法 (combination therapy) 在结肠直肠癌的 HCT15 异种移植物模型中的抗癌活性的实验结果。所示结果证明, 尽管 Apomab 7.3 和 CPT-11 在单独施用都是有效的, 两种联合显示出卓越的效果, 超越 Apomab 7.3 和 CPT-11 二者作为单一疗法施用的活性。

[0488] 在携带肉瘤 LS180 异种移植物、用 Apomab 7.3 联合 CPT-11 (伊立替康) 治疗的裸鼠中进行的代表性实验的结果显示于图 27。再次,发现联合疗法优于施用 Apomab 7.3 或 CPT-11 中任一作为单一药剂,而且差异在统计学上是显著的(第 2 张小图)。所比较的所有对 Tukey-Kramer $P < 0.05$ 。

[0489] 实施例 3:在非何杰金氏淋巴瘤的 BJAB 异种移植物模型中评估 Apomab 7.3 的抗癌活性

[0490] 在非何杰金氏淋巴瘤的 BJAB 异种移植物模型中评估单独的和联合 RITUXAN® (rituximab, Genentech, Inc.) (4mg/kg, q1 wk) 的 Apomab 7.3 (10mg/kg q1 wk) 的抗癌活性。因为已知淋巴瘤细胞在 SCID 小鼠中生长更好,所以在此项研究中使用 6-8 周龄 SCID 小鼠 (Charles River Laboratory)。治疗参数和结果显示于图 28。Apomab 7.3 和 RITUXAN® 在联合施用显示出协同活性 (synergistic activity)。

[0491] 实施例 4:在人胰腺腺癌的 BxPC3 异种移植物模型中评估 Apomab 7.3 的抗癌活性

[0492] 在雌性无胸腺裸鼠 (Charles River Laboratory) 中的人胰腺腺癌的 BxPC3 异种移植物模型中调查单独的和联合吉西他滨 (gemcitabine) (160mg/kg, 腹膜内) 的 Apomab 7.3 (10mg/kg, 静脉内) 的抗癌活性。治疗参数和结果显示于图 29。数据显示作为单一疗法施用的 Apomab 7.3 的抗癌活性远远优于吉西他滨的功效。Apomab 7.3 和吉西他滨的联合施用导致功效的进一步提高。

[0493] 实施例 5:在人肺癌的 H460 异种移植物模型中评估单独的及联合卡铂和泰素的 Apomab 7.3 的抗癌活性

[0494] 相对于媒介对照及卡铂和泰素的组合,评估单独的及联合卡铂和泰素的 Apomab 7.3 (10mg/kg, 1x wk, 腹膜内) 的抗癌活性。给 60 只雌性无胸腺裸鼠 (Charles River Laboratory) 每只小鼠在右背侧部皮下接种 0.2ml 体积中的 5×10^6 个 H460 细胞。给所有小鼠打耳签以供鉴别。容许肿瘤达到平均肿瘤体积 100-200mm³ 并如图 30 所示治疗。简而言之,将小鼠分成四组。第 1 组是媒介治疗对照组 (10mM 组氨酸, 8% 蔗糖, 0.02% Tween20 pH6)。第 2 组用 Apomab 7.3 治疗, 10mg/kg/ 小鼠剂量, 腹膜内, 每周 1 次, 持续 2 周。第 3 组施用卡铂 (carboplatin) (100mg/kg/ 小鼠, 腹膜内, 第 0 天单剂)+ 泰素 (taxol) (6.25mg/kg/ 小鼠, 皮下, 连续 5 天每天一次, 持续 2 周)。第 4 组接受 Apomab 7.3 (10mg/kg/ 小鼠剂量, 腹膜内, 每周 1 次, 持续 2 周)+ 卡铂 (100mg/kg/ 小鼠, 腹膜内, 第 0 天单剂)+ 泰素 (6.25mg/kg/ 小鼠, 皮下, 连续 5 天每天一次, 持续 2 周)。作为单一疗法施用的 Apomab 7.3 的抗癌活性与卡铂+泰素组合的抗癌活性相当。Apomab 7.3+卡铂+泰素的联合施用优于其它治疗模态。

[0495] 实施例 6:在人肺癌的 H2122 异种移植物模型中评估单独的及联合卡铂和泰素的 Apomab 7.3 的抗癌活性

[0496] 在此项研究中,给雌性无胸腺裸鼠 (Charles River Laboratory, 每组 10 只小鼠) 每只小鼠在右背侧部皮下接种 0.2ml 体积中的 5×10^6 个 H2122 细胞。给所有小鼠打耳签以供鉴别。容许肿瘤达到平均肿瘤体积 100-200mm³, 随机分成四组 (每组 6 只小鼠), 并如图 31 所示治疗。第 1 组是媒介治疗对照组 (10mM 组氨酸, 8% 蔗糖, 0.02% Tween20 pH6)。第 2 组施用卡铂 (100mg/kg/ 小鼠, 腹膜内, 第 0 天单剂)+ 泰素 (6.25mg/kg/ 小鼠, 皮下, 连续 5 天每天一次, 持续 2 周)。第 3 组接受 Apomab 7.3 (10mg/kg/ 小鼠剂量, 腹膜内, 每周

1 次,持续 2 周)。第 4 组接受 Apomab 7.3(10mg/kg/ 小鼠剂量,腹膜内,每周 1 次,持续 2 周)+卡铂(100mg/kg/ 小鼠,腹膜内,第 0 天单剂)+泰素(6.25mg/kg/ 小鼠,皮下,连续 5 天每天一次,持续 2 周)。如图 31 所示,卡铂+泰素组合不显示相对于媒介治疗对照组的显著抗癌活性。完全相反,作为单一疗法施用的 Apomab 7.3 显示出显著的抗肿瘤活性。用 Apomab 7.3 治疗的所有 6 只小鼠在 70 天治疗期间显示出完全响应(CR)而没有任何逆转。在用 Apomab 7.3+卡铂+泰素组合治疗的组中发现相同的活性。

[0497] 为了测定 Apomab 7.3 在此模型中的最大有效剂量,给 6-8 周龄雌性无胸腺裸鼠(Charles River Laboratory) 每只小鼠在右背侧部皮下接种 0.2ml 体积中的 5×10^6 个 H2122 细胞。给所有小鼠打耳签以供鉴别。容许肿瘤达到平均肿瘤体积 100-200mm³,随机分组(每组 13 只小鼠),并如下所述治疗。将排除在治疗组以外的任何小鼠安乐死。

[0498] A 组是媒介治疗对照组(0.5M 琥珀酸精氨酸,20mM Tris,0.02% Tween20,pH7.2)。媒介腹膜内施用,每周 5 次,持续 1 周。B 组施用 Apomab 7.3,1mg/kg/ 小鼠,静脉内,单剂。C 组施用 Apomab 7.3,3mg/kg/ 小鼠,静脉内,单剂。D 组施用 Apomab 7.3,10mg/kg/ 小鼠,静脉内,单剂。首次治疗后 48 小时,将来自 B 组、C 组和 D 组的 3 只小鼠安乐死,如下收集它们的肿瘤。将一个肿瘤保存在 10%福尔马林中供组织学研究。将一个肿瘤在液氮中冷冻供 RNA 研究。将一个肿瘤在液氮中冷冻供 Western 印迹。肿瘤测量头 2 周每周进行两次,然后每周一次,持续 4 周。在 6 周结束时或者直到肿瘤体积达到约 800-1000mm³,将所有剩余小鼠安乐死。图 32 第一张小图所示剂量-响应曲线指出 Apomab 7.3 在测试的所有剂量都是有效的,但是 3mg/kg 和 10mg/kg 剂量显示出相对于 1mg/kg 剂量的明显(distinct)(尽管不是统计学显著的)改善。所比较的所有对 Tukey-Kramer $P < 0.05$ (见图 32 第二张小图)。

[0499] 实施例 7:在人结肠直肠癌的 Colo205 异种移植物模型中评估 Apomabs23.3、25.3 和 7.3 的抗癌活性

[0500] 在此项研究中,给雌性无胸腺裸鼠(Charles River Laboratory) 每只小鼠在右背侧部皮下接种 0.2ml 体积中的 5×10^6 个 Colo205 细胞。给所有小鼠打耳签以供鉴别。容许肿瘤达到平均肿瘤体积 100-200mm³,随机分成七组(每组 10 只小鼠),并如图 33 所示治疗。第 1 组是媒介治疗对照组(10mM 组氨酸,8%蔗糖,0.02% Tween20 pH6)。第 2 组施用单剂 3mg/kg/ 小鼠静脉内 Apomab 7.3。第 3 组施用单剂 10mg/kg/ 小鼠静脉内 Apomab 7.3。第 4 组施用单剂 3mg/kg/ 小鼠静脉内 Apomab 23.3。第 5 组施用单剂 10mg/kg/ 小鼠静脉内 Apomab 23.3。第 6 组施用单剂 3mg/kg/ 小鼠静脉内 Apomab 25.3。第 7 组施用单剂 10mg/kg/ 小鼠静脉内 Apomab 25.3。治疗后 24 小时对所有小鼠称重。肿瘤测量头 2 周每周进行两次,然后每周一次,持续 4 周。6 周后或者肿瘤体积达到 $> 1000\text{mm}^3$ 时,将小鼠处死。

[0501] 结果显示于图 33。如 25 天的数据所示,Apomab 7.3 和 Apomab 25.3 在此模型中都显示出显著的抗癌活性。

[0502] 实施例 8:评估单克隆抗体 Apomab 7.3 针对裸鼠中 Colo205 人结肠癌异种移植物的抗癌活性

[0503] 动物

[0504] 雌性无胸腺裸鼠(nu/nu,Harlan) 在研究的第 1 天时是 11 或 12 周龄。给动物随意喂养水和 NIH31 Modified and Irradiated Lab Diet ® (改良和照射实验室饮食),其含

有 18.0%粗蛋白质,5.0%粗脂肪,5.0%粗纤维。将小鼠收养在静态微型隔离装置 (static microisolator) 中的 irradiated ALPHA-Dri[®] bed-o'-cobs[®] Laboratory Animal Bedding(实验室动物草垫)上,12 小时光照循环,21-22℃,40-60%湿度。

[0505] 肿瘤植入

[0506] 异种移植物源自培养的 Colo205 人接触癌细胞。将肿瘤细胞在补充有 10%热灭活胎牛血清,100U/mL 青霉素 G 钠,100 μg/mL 硫酸链霉素,0.25 μg/mL 两性霉素 B,25 μg/mL 庆大霉素,2mM 谷氨酰胺,1mM 丙酮酸钠,10mM HEPES 和 0.075%碳酸氢钠的 RPMI-1640 中培养至对数中期。在增湿培养箱中于 37℃在 5% CO₂ 和 95%空气的环境中在组织培养瓶中维持细胞培养物。在植入肿瘤细胞那天,收获 Colo205 细胞,并以 5×10⁶ 细胞/mL 的浓度重悬于 PBS 中的 50% Matrigel 基质 (BD Biosciences)。每只测试小鼠接受 1×10⁶ 个 Colo205 细胞,皮下植入右侧,当平均尺寸达到 100-300mm³ 时监测肿瘤的生长情况。13 天后,称为研究的第 1 天,各个肿瘤的体积在 126-288mm³ 的范围内,将动物分成六组,每组由平均肿瘤体积 188mm³ 的 10 只小鼠组成。

[0507] 测试材料和治疗

[0508] 在剂量给药期间将测试材料置于冰上,随后将剂量给药溶液贮存于 4℃。在媒介对照组 (第 1 组) 中,小鼠接受媒介,腹膜内施用,每天一次,持续 5 天,接着休息 2 天,然后每天一次,再持续 5 天。在测试组 (第 2-4 组) 中,动物用 Apo2L.0 配体 (60mg/kg,腹膜内,5/2/5 时间表)、Apomab 7.3 (3mg/kg,静脉内,第 1 和 8 天) 和抗 VEGF 鼠单克隆抗体 B20-4.1 (10mg/kg,腹膜内,第 1 和 8 天)。第 5 和 6 组分别接受 B20-4.1 与 Apo2L.0 的组合和 B20-4.1 与 Apomab 7.3 的组合。每剂以 0.2mL 每 20g 体重 (10mL/kg) 的体积投递,根据动物体重按比例决定。

[0509] 终点

[0510] 使用卡尺 (caliper) 每周两次测量肿瘤。当动物的肿瘤体积达到 2000mm³ 或者在第 68 天结束研究时,取先发生者,将每只动物安乐死。由于未达到 2000mm³ 尺寸的肿瘤数目,为肿瘤生长延迟研究选择 1000mm³ 的终点 (endpoint) 肿瘤体积。由如下方程式计算每只小鼠的至终点的时间 (TTE) :

$$[0511] \quad TTE(\text{天}) = [\log_{10}(\text{终点体积, mm}^3) - b] / m$$

[0512] 其中 b 和 m 分别是通过转化肿瘤生长数据集的 log 值的线性回归得到的直线的截距和斜率。此数据集包含超过研究终点体积的第一次观测结果和恰在终点体积前的三次连续观测结果。对未达到终点的动物指派 TTE 值,等于研究的最后一天。对遭受治疗相关死亡或由于转移遭受非治疗相关死亡的动物指派 TTE 值,等于死亡那天。遭受非治疗相关死亡或原因未知的死亡的动物排除在 TTE 计算之外。

[0513] 治疗成果通过肿瘤生长延迟 (TGD) 来评估,它定义为治疗组与对照组相比中值至终点的时间 (TTE) 的增长:

$$[0514] \quad TGD = T - C,$$

[0515] 以天计,或者表述成相对于对照组中值 TTE 的百分比:

$$[0516] \quad \% TGD = (T - C) / C \times 100,$$

[0517] 其中

$$[0518] \quad T = \text{治疗组的中值 TTE},$$

[0519] C = 对照组的中值 TTE。

[0520] 治疗可引起动物中肿瘤的部分消退 (PR) 或完全消退 (CR)。在 PR 响应中, 研究期间的连续三次测量的肿瘤体积是其第 1 天体积的 50% 或以下, 而且这三次测量中的一次或多次等于或大于 13.5mm^3 。在 CR 响应中, 研究期间的这三次测量中的一次或多次肿瘤体积小于 13.5mm^3 。在研究结束时具有 CR 响应的动物另外归入无肿瘤存活者 (TFS)。监测并记录消退响应 (Regression response)。

[0521] 取样

[0522] 在终点时从每组中的动物采集肿瘤样品。恰在取样前通过颈脱位法将这些动物安乐死。采集每组三只动物的肿瘤, 切成两半, 并保存于 10% 中性缓冲的福尔马林中, 室温 12-24 小时。

[0523] 统计学和图形分析

[0524] 使用 Logrank 检验来分析治疗组和对照组 TTE 值间差异的显著性。在 $P = 0.05$ 的显著性水平进行双尾统计学分析 (two-tailed statistical analysis), 认为 $0.01 \leq P \leq 0.05$ 的结果是显著的, $P < 0.01$ 的结果是高度显著的。

[0525] 中值肿瘤生长曲线将组中值肿瘤体积 (group median tumor volume) 显示为时间的函数。当动物由于肿瘤尺寸而退出研究时, 将为该动物记录的最终肿瘤体积包括在用于计算后续时间点的组中值肿瘤体积的数据内。绘制 Kaplan-Meier 曲线图将研究中剩余动物的百分比显示为时间的函数。这些曲线图使用与 Logrank 检验相同的数据集。

[0526] 结果

[0527] 图 34 显示了此项研究中每组的组中值肿瘤生长曲线 (上图) 和 Kaplan-Meier 曲线图 (下图)。媒介治疗对照小鼠的中值 TTE 是 10.0 天, 其中 1 个肿瘤 (总共 10 个) 未达到 1000mm^3 的终点肿瘤体积。在第 1 和 8 天以 10mg/kg 腹膜内施用 B20-4.1, 产生适度的 19.9 天 (113%) TGD, 它在统计学上是不显著的。Apo2L.0 和 Apomab 7.3 单一疗法对 Colo205 是有效的, 分别产生 28.4 天 (190%) 和 53.0 天 (355%) 的肿瘤生长延迟。对 Apo2L.0 或 Apomab 7.3 中任一添加 B20-4.1 在 TGD 或消退响应方面不提高治疗功效。

[0528] 实施例 9: 评估作为单一疗法的及联合卡铂加紫杉醇的单克隆抗体 Apomab7.3 针对 SKMES-1 人 NSCLC 的抗癌活性

[0529] 测试作为单一疗法的及联合卡铂加紫杉醇 (paclitaxel) 的 Apo2L.0 配体和 Apomab 7.3 针对 SKMES-1 人 NSCLC 的体内抗肿瘤活性。

[0530] 动物

[0531] 雌性无胸腺裸鼠 (nu/nu, Harlan) 在研究的第 1 天时是 9-10 周龄, 体重 17.4-25.4g。给动物随意喂养水和 NIH31 Modified and Irradiated Lab Diet® (改良和照射实验室饮食), 其含有 18.0% 粗蛋白质, 5.0% 粗脂肪, 5.0% 粗纤维。将小鼠收养在静态微型隔离装置 (static microisolator) 中的 irradiated ALPHA-Dri® bed-o' cobs® Laboratory Animal Bedding (实验室动物草垫) 上, 12 小时光照循环, $21-22^\circ\text{C}$, 40-60% 湿度。

[0532] 肿瘤植入

[0533] 异种移植物源自培养的 SKMES-1 肺肿瘤, 其通过在 PRC 连续移植来维持。每只测试小鼠接受 1mm^3 SKMES-1 肿瘤碎片, 皮下植入右侧, 并监测肿瘤的生长情况。13 天后, 称为

研究的第 1 天,各个肿瘤的体积在 $63\text{--}144\text{mm}^3$ 的范围内,将动物分成六组,其中四组各由 10 只小鼠组成,两组各由 9 只小鼠组成。平均肿瘤体积为 $93\text{--}95\text{mm}^3$ 。

[0534] 测试材料和治疗

[0535] 所有测试材料以 0.1mL 每 20g 体重 (5mL/kg) 为剂量给药准备就绪,在收到时贮存于 -80°C 。在剂量给药的第一天将测试材料融化,在剂量给药期间置于冰上,随后贮存于 4°C 。卡铂 (PARAPLATIN® 注射液, Bristol Myers Squibb) 用水 (D5W) 中的 5% 右旋糖稀释,以产生每 10g 体重 (10mL/kg) 0.2mL 体积的期望剂量。紫杉醇 (Natural Pharmaceuticals, Inc.) 在剂量给药的每一天用 D5W 从 10X 储液稀释,以产生媒介,其由 90% D5W 中的 5% 乙醇和 5% 克列莫佛 (Cremophor) EL 组成 (5% EC 媒介),使得期望剂量在每 20g 体重 0.1mL 投递。

[0536] 第 1 组 (媒介对照 (vehicle control)) 小鼠接受媒介,腹膜内施用,每天一次,持续 5 天 (i. p. qdx5),充当肿瘤生长对照。第 2 和 3 组的小鼠分别接受 Apo2L. 0 (60mg/kg, 皮下, qdx5) 和 Apomab 7. 3 (10mg/kg, 静脉内, qdx1) 的单一疗法。第 4 组的小鼠接受卡铂 (100mg/kg, 腹膜内, qdx1) 加紫杉醇 (6. 25mg/kg, 皮下, qdx5) 组合。第 5 和 6 组的小鼠分别接受卡铂加紫杉醇与 Apo2L 或 Apomab 7. 3 的组合。每一剂以前一节所述体积施用,根据动物体重按比例决定。

[0537] 终点,取样和统计学分析

[0538] 如前面实施例 8 中所述决定终点,进行取样和统计学分析。

[0539] 结果

[0540] 图 35 和 36 分别显示了用 Apo2L. 0 和 Apomab 7. 3 治疗的组的组中值肿瘤生长曲线和 Kaplan-Meier 曲线图。

[0541] 所有媒介治疗对照小鼠的肿瘤生长至 1500mm^3 的终点体积,中值 TTE 为 18. 9 天。因此,此 45 天研究中可实现的最大 TGD 是 26. 1 天 (138%)。对照组的中值肿瘤生长曲线和 Kaplan-Meier 曲线图包括在图 35 和 36 的上图和下图中。

[0542] 对于 Apo2L. 0 治疗组 (第 2 组),中值 TTE 是 22. 9 天,对应于 4. 0 天 (21%) TGD 和统计学不显著的活性。图 28 (上图) 指出第 2 组的中值肿瘤体积在治疗期间缩小,然后快速肿瘤生长恢复。

[0543] 第 3 组的中值 TTE 是 2. 0 天,对应于 7. 1 天 (38%) TGD 和统计学高度显著的活性 ($P = 0. 005$)。没有消退响应的记录,所有肿瘤达到 1500mm^3 的终点体积。第 3 组的中值肿瘤生长曲线显示出肿瘤生长相对于对照的初始延迟。

[0544] 用卡铂加紫杉醇治疗的第 4 组小鼠的中值 TTE 是 26. 5 天,对应于 7. 6 天 (40%) TGF 和统计学显著的活性 ($P = 0. 01$)。第 4 组的所有肿瘤生长至 1500mm^3 终点体积,没有消退响应的记录。第 4 组小鼠的中值肿瘤生长曲线指出肿瘤生长相对于对照小鼠的适度延迟 (modest delay) (见图 35 和 36,上图)。

[0545] Apo2L. 0、卡铂和紫杉醇三联组合的治疗产生 32. 7 天的中值 TTE,对应于 13. 9 天 (73%) TGD 和相对于第 1 组统计学高度显著的活性 ($P = 0. 002$)。此三联组合的 32. 7 天中值 TTE 比 Apo2L. 0 单一疗法组的 22. 9 天中值 TTE 或化疗对照组的 16. 5 天中值 TTE 长,但是根据 Logrank 分析,该差异未达到统计学显著性。尽管缺乏统计学显著性,中值肿瘤生长曲线指出第 5 组的联合治疗与 Apo2L. 0 单一疗法或卡铂加紫杉醇化疗相比有更大活性 (见

图 28, 上图)。

[0546] Apomab 7.3、卡铂和紫杉醇的三联组合的治疗(第6组)导致3/10 TR死亡,因此,这组不能评估 TGD。然而,中值肿瘤生长曲线指出第6组的联合治疗与 Apomab 7.3 单一疗法或卡铂加紫杉醇化疗相比有更大活性(见图 37, 上图)。

[0547] 结论

[0548] 尽管此实验有较高死亡率,数据说明 Apo2L.0 和 Apomab 7.3 中任一可对卡铂和紫杉醇的治疗增加抗肿瘤效果。

[0549] 实施例 10:在人 Colo205 癌异种移植物模型中评估作为单一疗法的及联合抗 VEGF 抗体的单克隆抗体 Apomab 7.3 的抗癌活性

[0550] 动物

[0551] 雌性无胸腺裸鼠(nu/nu, Harlan)在研究的第1天是7-8周龄。给动物随意喂养水和 NIH31 Modified and Irradiated Lab Diet®(改良和照射实验室饮食),其含有 18.0%粗蛋白质,5.0%粗脂肪,5.0%粗纤维。将小鼠收养在静态微型隔离装置(static microisolator)中的 irradiated ALPHA-Dri® bed-o'-cobs® Laboratory Animal Bedding(实验室动物草垫)上,12 小时光照循环,21-22℃,40-60%湿度。

[0552] 肿瘤细胞培养

[0553] 人 Colo205 结肠癌细胞在含有 100U/mL 青霉素 G 钠,100 μg/mL 硫酸链霉素,0.25 μg/mL 两性霉素 B 和 25 μg/mL 庆大霉素的 RPMI1640 培养基中培养。培养基补充有 10%热灭活胎牛血清,2mM 谷氨酰胺和 1mM 碳酸氢钠。肿瘤细胞在组织培养瓶中在增湿培养箱中于 37℃在 5% CO₂ 和 95%空气的环境中培养。

[0554] 体内植入

[0555] 在对数期生长过程中收获用于植入的人 Colo205 癌细胞,并以 5×10⁶ 细胞/mL 重悬于 50% Matrigel 中。每只小鼠在右侧皮下注射 1×10⁶ 个细胞(0.2mL 细胞悬浮液)。每周两次监测肿瘤,当它们的体积达到 100-300mm³ 时每天监测一次。在研究的第1天,将动物分成治疗组,肿瘤体积 108.0-220.5mm³,组平均肿瘤体积 149.8mm³。可估算肿瘤重量,1mg 相当于 1mm³ 肿瘤体积。

[0556] 测试材料和治疗

[0557] 提供测试材料以进行剂量给药。将剂量给药溶液贮存于 4℃。

[0558] 将小鼠分成六组,每组十只小鼠。所有治疗都是腹膜内(i.p.)施用的。

[0559] Apo2L.0 及其媒介各自在第1-5天每天施用一次(qdx5)。Apomab 7.3 和鼠抗 VEGF 抗体抗 G6(anti-G6)各在第1天给药一次(qdx1)。对照第1组小鼠用 Apo2L.0 的媒介治疗。第2组接受 Apo2L.0 单一疗法,60mg/kg。第3组接受 Apomab 7.3 单一疗法,3mg/kg。第4组接受 BY4 单一疗法,5mg/kg。第5和6组分别接受 60mg/kg 的 Apo2L.0 和 3mg/kg 的 Apomab 7.3,各联合 5mg/kg 的抗 G6。在所有组中,0.2mL/20g 小鼠的剂量给药体积根据每只动物的体重按比例决定。

[0560] 终点,取样和统计学分析

[0561] 如前面实施例 8 中所述决定终点,进行取样和统计学分析。

[0562] 结果

[0563] 结果显示于图 37,其中上图中的曲线显示组中值肿瘤体积相对于时间的图示,下

图中的 Kaplan-Meier 曲线图显示各组剩余可评估动物百分比相对于时间的图示。

[0564] 对照第 1 组小鼠接受 Apo2L.0 媒介,充当所有治疗组的对照。所有 10 只小鼠中的肿瘤生长至 1500mm³ 终点体积,中值 TTE 为 20.8 天。因此,此 61 天研究中的最大可能 TGD 为 193%。

[0565] 第 2 组接受 Apo2L.0 单一疗法,60mg/kg。这种治疗相对于媒介对照组产生高度显著的抗肿瘤活性 ($P < 0.001$),中值 TTE 为 53.6 天。此中值 TTE 对应于 32.8 天 T-C 和 158% TGD。5 只小鼠在第 61 天的中值肿瘤体积为 1,210mm³。记录了 1 例 LTTFS。

[0566] 第 3 组接受 Apomab 7.3 单一疗法,3mg/kg。这种治疗产生高度显著的活性 ($P < 0.001$),最大可能 TGD 为 193%,MTV(6) 为 776mm³。记录到 1 例 LTTFS、1 例瞬时 CR 响应和 3 例 FR 响应。

[0567] 第 4 组接受抗 G6 单一疗法,5mg/kg。这种治疗产生高度显著的活性 ($P < 0.01$),TGF 为 86%,MTV(3) 为 1,224mm³。没有记录到消退响应。

[0568] 第 5 组接受 60mg/kg 的 Apo2L.0 与 5mg/kg 的抗 G6 的组合。这种联合治疗产生 138% TGD。抗肿瘤活性相对于媒介治疗高度显著 ($P < 0.001$),但相对于两种单一疗法不显著。在第 5 组中,MTV(3) 为 1,080mm³,记录到 1 例 PR 响应。

[0569] 第 6 组接受 3mg/kg 的 Apomab 7.3 和 5mg/kg 的抗 G6 的联合治疗。这种治疗产生 193% 的最大可能 TGD。抗肿瘤活性相对于媒介治疗是高度显著的 ($P < 0.001$),相对于抗 G6 单一疗法是显著的,但相对于 Apomab 7.3 单一疗法是不显著的。在第 6 组中,MTV(8) 为 208mm³,记录到 5 例 PR 响应。

[0570] 结论

[0571] 肿瘤对 3mg/kg qdx1 Apomab 7.3 的单一疗法(第 3 组)有强响应。这种治疗相对于媒介对照组产生高度显著的活性,最大可能 TGD 为 193%。在存活至第 61 天、MTV 为 776mm³ 的 6 只小鼠中,5 只动物发生了肿瘤消退。这种单一疗法产生 1 例 LTTFS、1 例瞬时 CR 响应和 3 例 PR 响应。中值肿瘤体积直到第 15 天后才增长(图 37)。

[0572] Apomab 7.3 和鼠抗 VEGF 抗体抗 G6 的联合疗法产生比用单独的 Apomab 7.3 或抗 G6 所观察到的活性更强的活性。这种联合治疗产生 8 只 61 天存活者,产生了研究的最低 MTV,为 208mm³。中值肿瘤生长曲线显示肿瘤缩小或停滞直至第 33 天,随后的肿瘤生长也很慢(图 37)。这种联合治疗产生比抗 G6 单一疗法显著更强的活性,但与 Apomab 7.3 单一疗法的结果没有显著差异。另外,这种联合治疗产生 5 例 PR 响应,而用 Apomab 7.3 单一疗法获得的 5 例消退响应包括 1 例瞬时 CR 和 1 例 LTTFS。

[0573] 所有疗法都得到很好的耐受。在研究中没有观察到体重减轻或其它明显毒性。

[0574] 总之,Apomab 7.3/ 抗 G6 联合疗法比相应单一疗法的治疗产生更多的 61 天存活者和更低的 MTV。然而,Apomab 7.3/ 抗 G6 联合不产生治愈活性(curative activity),而这在 Apomab 7.3 单一疗法中观察到了。

序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (GENENTECH, INC.)

ADAMS, CAMELLI A W.

<120>DR5 抗体及其用途

<130>39766-0164

<140> 待指定

<141> 同此

<150>US 60/649, 550

<151>2005-02-02

<160>29

<170>Fa stSEQ for Windows Ver s ion 4.0

<210>1

<211>281

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>1

Met	Ala	Met	Met	Glu	Val	Gln	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Gln	Thr	Cys
1				5					10					15	
Val	Leu	Ile	Val	Ile	Phe	Thr	Val	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Cys	Val	Ala
			20					25					30		
Val	Thr	Tyr	Val	Tyr	Phe	Thr	Asn	Glu	Leu	Lys	Gln	Met	Gln	Asp	Lys
		35					40					45			
Tyr	Ser	Lys	Ser	Gly	Ile	Ala	Cys	Phe	Leu	Lys	Glu	Asp	Asp	Ser	Tyr
	50					55					60				
Trp	Asp	Pro	Asn	Asp	Glu	Glu	Ser	Met	Asn	Ser	Pro	Cys	Trp	Gln	Val
65					70					75				80	
Lys	Trp	Gln	Leu	Arg	Gln	Leu	Val	Arg	Lys	Met	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser
			85						90					95	
Glu	Glu	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Glu	Lys	Gln	Gln	Asn	Ile	Ser	Pro
			100						105					110	

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 115 120 125
 Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 130 135 140
 Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 165 170 175
 His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
 180 185 190
 Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 195 200 205
 Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 210 215 220
 Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 245 250 255
 Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 260 265 270
 Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 275 280

<210>2

<211>1042

<212>DNA

<213> 人类

<220>

<221>mi_sc_feature

<222>447

<223>n = t 或 g

<400>2

ttctcact gactataaaa gaatagagaa ggaagggctt cagtgaccgg ctgcctgget 60
 gacttacage agtcagactc tgacaggatc atggctatga tggagggtcca ggggggaccc 120
 agcctgggac agacctgcgt gctgatcgtg atcttcacag tgctcctgca gtctctctgt 180
 gtggctgtaa cttacgtgta ctttaccac gagctgaagc agatgcagga caagtactcc 240
 aaaagtggca ttgcttggtt cttaaaagaa gatgacagtt attgggaccc caatgacgaa 300
 gagagtatga acagccctg ctggcaagtc aagtggcaac tccgtcagct cgttagaaag 360

```

atgattttga gaacctctga ggaaaccatt tctacagttc aagaaaagca acaaaatatt 420
tctcccctag tgagagaaag aggtccncag agagtagcag ctcacataac tgggaccaga 480
ggaagaagca acacattgtc ttctccaaac tccaagaatg aaaaggctct gggccgcaaa 540
ataaactcct gggaatcatt aaggagtggg cattcattcc tgagcaactt gcacttgagg 600
aatggtgaac tggtcatecca tgaaaaaggg ttttactaca tctattcecca aacatacttt 660
cgatttcagg aggaaataaa agaaaacaca aagaacgaca aacaaatggt ccaatatatt 720
tacaaataca caagttatcc tgaccctata ttgttgatga aaagtgctag aaatagttgt 780
tggtctaaag atgcagaata tggactctat tccatctatc aagggggaat atttgagctt 840
aaggaaaatg acagaatttt tgtttctgta acaaatgagc acttgataga catggaccat 900
gaagccagtt ttttcggggc ctttttagtt ggctaactga cctggaaaga aaaagcaata 960
acctcaaagt gactattcag ttttcaggat gatacactat gaagatgttt caaaaaatct 1020
gaccaaaaca aacaaacaga aa 1042

```

<210>3

<211>468

<212>PRT

<213> 人类

<400>3

```

Met Ala Pro Pro Pro Ala Arg Val His Leu Gly Ala Phe Leu Ala Val
  1              5              10              15
Thr Pro Asn Pro Gly Ser Ala Ala Ser Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala
      20              25              30
Thr Pro Ser Lys Val Trp Gly Ser Ser Ala Gly Arg Ile Glu Pro Arg
      35              40              45
Gly Gly Gly Arg Gly Ala Leu Pro Thr Ser Met Gly Gln His Gly Pro
      50              55              60
Ser Ala Arg Ala Arg Ala Gly Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Arg
      65              70              75              80
Glu Ala Ser Pro Arg Leu Arg Val His Lys Thr Phe Lys Phe Val Val
      85              90              95
Val Gly Val Leu Leu Gln Val Val Pro Ser Ser Ala Ala Thr Ile Lys
      100             105             110
Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu
      115             120             125
Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly Ser His Arg Ser Glu Arg Pro Gly Ala
      130             135             140
Cys Asn Arg Cys Thr Glu Gly Val Gly Tyr Thr Asn Ala Ser Asn Asn
      145             150             155             160

```

Leu Phe Ala Cys Leu Pro Cys Thr Ala Cys Lys Ser Asp Glu Glu Glu		
165	170	175
Arg Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Ala Cys Gln Cys Lys Pro		
180	185	190
Gly Thr Phe Arg Asn Asp Asn Ser Ala Glu Met Cys Arg Lys Cys Ser		
195	200	205
Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Lys Asp Cys Thr Pro Trp		
210	215	220
Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Asn Gly His Asn Ile		
225	230	235
Trp Val Ile Leu Val Val Thr Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Val Ala		
245	250	255
Val Leu Ile Val Cys Cys Cys Ile Gly Ser Gly Cys Gly Gly Asp Pro		
260	265	270
Lys Cys Met Asp Arg Val Cys Phe Trp Arg Leu Gly Leu Leu Arg Gly		
275	280	285
Pro Gly Ala Glu Asp Asn Ala His Asn Glu Ile Leu Ser Asn Ala Asp		
290	295	300
Ser Leu Ser Thr Phe Val Ser Glu Gln Gln Met Glu Ser Gln Glu Pro		
305	310	315
Ala Asp Leu Thr Gly Val Thr Val Gln Ser Pro Gly Glu Ala Gln Cys		
325	330	335
Leu Leu Gly Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu		
340	345	350
Val Pro Ala Asn Gly Ala Asp Pro Thr Glu Thr Leu Met Leu Phe Phe		
355	360	365
Asp Lys Phe Ala Asn Ile Val Pro Phe Asp Ser Trp Asp Gln Leu Met		
370	375	380
Arg Gln Leu Asp Leu Thr Lys Asn Glu Ile Asp Val Val Arg Ala Gly		
385	390	395
Thr Ala Gly Pro Gly Asp Ala Leu Tyr Ala Met Leu Met Lys Trp Val		
405	410	415
Asn Lys Thr Gly Arg Asn Ala Ser Ile His Thr Leu Leu Asp Ala Leu		
420	425	430
Glu Arg Met Glu Glu Arg His Ala Lys Glu Lys Ile Gln Asp Leu Leu		
435	440	445
Val Asp Ser Gly Lys Phe Ile Tyr Leu Glu Asp Gly Thr Phe Ser Ala		
450	455	460
Val Ser Leu Glu		

465

<210>4

<2 川>2152

<212>DNA

<213> 人类

<400>4

```

ttcgggcacg agggcaggat ggcgccacca ccagctagag tacatctagg tgcgttcctg 60
gcagtgactc cgaatcccgg gagcgccagc agtgggacag aggcagccgc ggccacaccc 120
agcaaagtgt ggggctcttc cgcggggagg attgaaccac gaggcggggg ccgaggagcg 180
ctccctacct ccatgggaca gcacggaccc agtgcgccggg cccgggcagg gcgcgcccc 240
ggaccagggc cggcgcggga agccagccct cggtccggg tccacaagac cttcaagttt 300
gtcgtcgtcg gggctctgct gcaggtcgta cctagctcag ctgcaacat caaacttcat 360
gatcaatcaa ttggcacaca gcaatgggaa catagccctt tgggagagtt gtgtccacca 420
ggatctcata gatcagaacg tcctggagcc tgtaaccggg gcacagaggg tgtgggttac 480
accaatgctt ccaacaattt gtttgcttgc ctccatgta cagcttgtaa atcagatgaa 540
gaagagagaa gtccctgcac cacgaccagg aacacagcat gtcagtgcaa accaggaaact 600
ttccggaatg acaattctgc tgagatgtgc cggaagtgca gcacagggtg cccagagggg 660
atgggtcaagg tcaaggattg tacgccctgg agtgacatcg agtgtgtcca caaagaatca 720
ggcaatggac ataatatatg ggtgattttg gttgtgactt tggttgttcc gttgctgttg 780
gtggctgtgc tgattgtctg ttgttgcatc ggctcagggt gtggagggga cccaagtgc 840
atggacaggg tgtgtttctg gcgcttgggt ctctacgag ggcctggggc tgaggacaat 900
gtcacaacg agattctgag caacgcagac tcgctgtcca ctttcgtctc tgagcagcaa 960
atggaaagcc aggagccggc agatttgaca ggtgtcactg tacagtcccc aggggaggca 1020
cagtgtctgc tgggaccggc agaagctgaa gggctctcaga ggaggaggct gctggttcca 1080
gcaaatggtg ctgacccac tgagactctg atgctgttct ttgacaagtt tgcaaacatc 1140
gtgccctttg actcctggga ccagctcatg aggcagctgg acctcacgaa aatgagatc 1200
gatgtggtca gagctggtac agcaggccca ggggatgcct tgtatgcaat gctgatgaaa 1260
tgggtcaaca aaactggacg gaacgcctcg atccacaccc tgctggatgc cttggagagg 1320
atggaagaga gacatgcaaa agagaagatt caggacctct tgggtggactc tggaaagttc 1380
atctacttag aagatggcac aggtctctgcc gtgtccttgg agtgaaagac tctttttacc 1440
agaggtttcc tcttaggtgt taggagttaa tacatattag gttttttttt tttttaacat 1500
gtatacaaag taaattctta gccacgtgta ttggctcctg cctgtaatcc catcactttg 1560
ggaggctgac gccgggtgat ccacttgagg tccgaagtgc caagaccagc cctgaaccaa 1620
catcgtggaa atgcccgtct tttaaaaaa aatacaaaaa attcaactgg aatgtgcatg 1680
gtgtgtgcca tcatttctc ggctaactac gggaggctcg aggccaggag aatccacttg 1740
aaccacacga aggacagtgt agactgcaga ttgcaccact gcactccag cctgggaaca 1800
cagagcaaga ctctgtctca agataaaata aaataaactt gaaagaatta ttgcccgact 1860

```

gaggetcaca tgccaaagga aaatctgggtt ctccccctgag ctggcctccg tgtgtttcct 1920
 tatcatgggtg gtcaattgga ggtgttaatt tgaatggatt aaggaacacc tagaacactg 1980
 gtaaggcatt atttctggga cattatttct gggcatgtct tcgagggtgt ttccagaggg 2040
 gattggcatg cgategggtg gactgagtgg aaaagacctt cccttaattt ggggggggcac 2100
 cgtccgacag actgggggagc aagatagaag aaaacaaaaa aaaaaaaaaa aa 2152

<210>5

<211>411

<212>PRT

<213> 人类

<220>

<221> 变体

<222>410

<223>Xaa = Leu 或 Met

<400>5

Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys
 1 5 10 15
 Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Leu
 20 25 30
 Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu
 35 40 45
 Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln
 50 55 60
 Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
 65 70 75 80
 Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser
 85 90 95
 Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe
 100 105 110
 Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro
 115 120 125
 Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe
 130 135 140
 Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys
 145 150 155 160
 Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
 165 170 175

Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala		
180	185	190
Ala Val Val Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp		
195	200	205
Lys Lys Val Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly		
210	215	220
Asp Pro Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp		
225	230	235
Asn Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro		
245	250	255
Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn		
260	265	270
Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala		
275	280	285
Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp		
290	295	300
Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val		
305	310	315
Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp		
325	330	335
Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr		
340	345	350
Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala		
355	360	365
Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu		
370	375	380
Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met		
385	390	395
Tyr Leu Glu Gly Asn Ala Asp Ser Ala Xaa Ser		
405	410	

<210>6

<211>1799

<212>DNA

<213> 人类

<400>6

```

cccacgcgtc cgcataaatc agcacgcggc cggagaaccc cgcaatctct gcgcccacaa 60
aatacaccca cgatgccccg tctacttttaa gggctgaaac ccacgggcct gagagactat 120

```

aagagcggttc cctaccgcca tggaacaacg gggacagaac gccccggccg cttcgggggc 180
ccggaagagg cacggcccag gacccaggga ggcgcgggga gccaggcctg ggctccgggt 240
ccccaagacc cttgtgctcg ttgtcgccgc ggtcctgctg ttgggtctcag ctgagtctgc 300
tctgatcacc caacaagacc tagctcccca gcagagagcg gccccacaac aaaagaggtc 360
cagccccctca gagggattgt gtccacctgg acaccatata tcagaagacg gtagagattg 420
catctcctgc aaatatggac aggactatag cactcactgg aatgacctcc ttttctgctt 480
gcgctgcacc aggtgtgatt caggtgaagt ggagctaagt ccctgcacca cgaccagaaa 540
cacagtgtgt cagtgcgaag aaggcacctt ccgggaagaa gattctcctg agatgtgccg 600
gaagtgccgc acaggggtgc ccagagggat ggtcaaggtc ggtgattgta caccctggag 660
tgacatcgaa tgtgtccaca aagaatcagg catcatcata ggagtcacag ttgcagccgt 720
agtcttgatt gtggctgtgt ttgtttgcaa gtctttactg tggaagaaag tccttcctta 780
cctgaaaggc atctgctcag gtgggtgggt ggacctgag cgtgtggaca gaagctcaca 840
acgacctggg gctgaggaca atgtcctcaa tgagatcgtg agtatcttgc agcccacca 900
ggtccctgag caggaaatgg aagtccagga gccagcagag ccaacagggt tcaacatggt 960
gtccccggg gagtcagagc atctgctgga accggcagaa gctgaaaggc ctcagaggag 1020
gaggctgctg gttccagcaa atgaaggatga tccactgag actctgagac agtgcttcga 1080
tgactttgca gacttggtgc cctttgactc ctgggagccg ctcatgagga agttgggcct 1140
catggacaat gagataaagg tggctaaagc tgaggcagcg ggccacaggg acaccttgta 1200
cacgatgctg ataaagtggg tcaacaaaac cgggcgagat gcctctgtcc acacctgct 1260
ggatgccttg gagacgctgg gagagagact tgccaagcag aagattgagg accacttggt 1320
gagctctgga aagttcatgt atctagaagg taatgcagac tctgccwtgt cctaagtgtg 1380
attctcttca ggaagtgaga ccttccctgg ttacaccttt ttctggaaaa agcccaactg 1440
gactccagtc agtaggaaag tgccacaatt gtcacatgac cggtactgga agaaactctc 1500
ccatccaaca tcaccagtg gatggaacat cctgtaactt ttcactgcac ttggcattat 1560
ttttataagc tgaatgtgat aataaggaca ctatggaaat gtctggatca ttccgtttgt 1620
gcgtactttg agatttggtt tgggatgtca ttgttttcac agcacttttt taccctaagt 1680
taaagtcttt atttatttat ttgggttaca ttgtaagatc catctacaaa aaaaaaaaaa 1740
aaaaaaaaag ggcggccgcg actctagagt cgacctgcag aagcttggcc gccatggcc 1799

<210>7

<211>440

<212>PRT

<213> 人类

<400>7

Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys

1

5

10

15

Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro

20

25

30

Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu		
35	40	45
Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln		
50	55	60
Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu		
65	70	75
80		
Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser		
85	90	95
Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe		
100	105	110
Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro		
115	120	125
Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe		
130	135	140
Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys		
145	150	155
160		
Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile		
165	170	175
Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro		
180	185	190
Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro		
195	200	205
Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val		
210	215	220
Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val		
225	230	235
240		
Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu		
245	250	255
Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu		
260	265	270
Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu		
275	280	285
Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser		
290	295	300
Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser		
305	310	315
320		
Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu		
325	330	335
Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp		

340	345	350
Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile		
355	360	365
Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr		
370	375	380
Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His		
385	390	395
Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln		
405	410	415
Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu		
420	425	430
Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser		
435	440	

<210>8

<211>1323

<212>DNA

<213> 人类

<400>8

```

atggaacaac ggggacagaa cgccccggcc gcttcggggg cccggaaaag gcacggccca 60
ggaccagagg aggcgcgggg agccaggcct gggctccggg tccccaaagac ctttgtgctc 120
gttgctgccg cggctctgct gttggtctca gctgagtctg ctctgatcac ccaacaagac 180
ctagctcccc agcagagagt ggccccacaa caaaagaggt ccagccccctc agagggattg 240
tgtccacctg gacaccatat ctcagaagac ggtagagatt gcatctcctg caaatatgga 300
caggactata gcactcactg gaatgacctc cttttctgct tgcgctgcac cagggtgat 360
tcaggtgaag tggagctaag tccctgcacc acgaccagaa acacagtgtg tcagtgcgaa 420
gaaggcacct tccgggaaga agattctcct gagatgtgcc ggaagtgccg cacagggtgt 480
cccagaggga tggtaaggt cggtgattgt acaccctgga gtgacatcga atgtgtccac 540
aaagaatcag gtacaaagca cagtggggaa gccccagctg tggaggagac ggtgacctcc 600
agcccaggga ctctgcctc tccctgttct ctctcaggca tcatcatagg agtcacagtt 660
gcagccgtag tcttgattgt ggctgtgttt gtttgcaagt ctttactgtg gaagaaagtc 720
cttcttacc tgaaaggcat ctgctcaggt ggtggtgggg accctgagcg tgtggacaga 780
agctcacaac gacctggggc tgaggacaat gtcctcaatg agatcgtgag tatcttgag 840
cccaccaggg tccctgagca ggaaatggaa gtccaggagc cagcagagcc aacaggtgtc 900
aacatgttgt cccccgggga gtcagagcat ctgctggaac cggcagaagc tgaaaggtct 960
cagaggagga ggctgctggg tccagcaaat gaaggtgatc cactgagac tctgagacag 1020
tgcttcgatg actttgcaga cttggtgccc ttgactcct gggagccgct catgaggaag 1080
ttgggcctca tggacaatga gataaagggt gctaaagctg aggcagcggg ccacagggac 1140

```

accttgtaca cgatgctgat aaagtgggtc aacaaaaccg ggcgagatgc ctctgtccac	1200
accctgctgg atgccttgga gacgctggga gagagacttg ccaagcagaa gattgaggac	1260
cacttgttga gctctggaaa gttcatgtat ctagaaggta atgcagactc tgccatgtcc	1320
taa	1323

<210>9

<211>930

<212>DNA

<213> 人类

<400>9

atgaccatga ttacgccaag ctttggagcc ttttttttgg agattttcaa cgtgaaaaaa	60
ttattattcg caattccttt agttgttcc tttctatgcgg cccagccggc catggccgag	120
gtgcagctgg tgcagtctgg gggaggtgtg gaacggccgg gggggtcct gagactctcc	180
tgtgcagcct ctggattcac ctttgatgat tatggcatga gctgggtccg ccaagctcca	240
gggaaggggc tggagtgggt ctctgggtatt aattggaatg gtggtagcac aggatatgca	300
gactctgtga agggccgagt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg	360
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aatcctgggt	420
gccggacggg gctgggtactt cgatctctgg gggaagggga ccacggtcac cgtctcgagt	480
ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggcagc ggcggtggcg gatcgctctga gctgactcag	540
gaccctgctg tgtctgtggc cttgggacag acagtcagga tcacatgcca aggagacagc	600
ctcagaagct attatgcaag ctggtaccag cagaagccag gacaggcccc tgtacttgct	660
atctatggta aaaacaaccg gccctcaggg atcccagacc gattctcttg ctccagctca	720
ggaaacacag cttecttgac catcactggg gctcaggcgg aagatgaggc tgactattac	780
tgtaactccc gggacagcag tggtaacat gtggtattcg gcggagggac caagctgacc	840
gtcctaggtg cggccgcaca tcatcatcac catcacgggg ccgcagaaca aaaactcatc	900
tcagaagagg atctgaatgg ggccgcatag	930

<210>10

<211>309

<212>PRT

<213> 人类

<400>10

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Phe Gly Ala Phe Phe Leu Glu Ile Phe	
1 5 10 15	
Asn Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr	
20 25 30	
Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly	

35	40	45
Gly Val Glu Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser		
50	55	60
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro		
65	70	75
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser		
85	90	95
Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp		
100	105	110
Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu		
115	120	125
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ile Leu Gly Ala Gly Arg Gly		
130	135	140
Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
145	150	155
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser		
165	170	175
Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val		
180	185	190
Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp		
195	200	205
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys		
210	215	220
Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser		
225	230	235
Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu		
245	250	255
Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val		
260	265	270
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His		
275	280	285
His His His His Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp		
290	295	300
Leu Asn Gly Ala Ala		
305		

<210>11

<211>451

<212>PRT

<213> 人类

<400>11

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Glu Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ile Leu Gly Ala Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210>12

<211>1353

<212>DNA

<213> 人类

<400>12

gaagttcagc tgggtgcagtc tgggggaggt gtggaacggc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggttag cacaggatat 180
 gcagactctg tgaagggccg agtcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaatcctg 300
 ggtgccggac ggggctggta cttcgatctc tgggggaagg ggaccacggc caccgtctcg 360
 agtgcctcca ccaagggcc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccageggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actcctcag cagcgtgggt actgtgccct ctagcagctt gggcacccag 600

```

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgaggaa 1080
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggettcta tcccagcgac 1140
atgcccgtag agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctgca caaccactac 1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

```

<210>13

<211>213

<212>PRT

<213> 人类

<400>13

```

Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
1           5           10           15
Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
20          25          30
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly
35          40          45
Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
50          55          60
Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp
65          70          75          80
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val
85          90          95
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
100         105         110
Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
115         120         125
Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
130         135         140
Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val

```

145	150	155	160
Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser			
	165	170	175
Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr			
	180	185	190
Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala			
	195	200	205
Pro Thr Glu Cys Ser			
210			

<210>14

<211>639

<212>DNA

<213> 人类

<400>14

```

tctgagctga ctcaggaccc tgctgtgtct gtggccttgg gacagacagt caggatcaca 60
tgccaaggag acagcctcag aagctattat gcaagctggg accagcagaa gccaggacag 120
gccctgtac ttgtcatcta tggtaaaaac aaccggccct cagggatccc agaccgattc 180
tctggctcca gctcaggaaa cacagcttcc ttgacatca ctggggctca ggcggaagat 240
gaggctgact attactgtaa ctcccgggac agcagtggta accatgtggg attcggcgga 300
gggaccaagc tgaccgtcct tggccaacct aaggctgcac catctgtcac cctcttcccg 360
ccatcttctg aggagttgca agctaacaaa gccactcttg tgtgcctgat cagtgacttc 420
tatcccggag cggtcacagt agcgtggaag gcgtagtagt cccccgtaaa ggctggcgctc 480
gagacgacta ccccttcgaa gcagagcaac aacaaatacg ccgccagcag ctacctgtcg 540
ctgacccag aacagtggaa gagccacaaa agctactcct gccaaagtcac ccatgagggc 600
tcgaccgtcg aaaagaccgt cgccccgaca gagtgttct 639

```

<210>15

<211>5391

<212>DNA

<213> 人类

<400>15

```

ttcagactcg cccgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca 60
ttagttcata gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tgccccgcct 120
ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta 180
acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac 240
ttggcagtag atcaagtgtg tcatatgccg agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg 300

```

aaatggccccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag	360
tacatctacg tattagtcac cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat	420
gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga ttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat	480
gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc	540
ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt	600
ttagtgaacc gtcagatgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccatagaaga	660
caccgggacc gatccagcct ccgcggccgg gaacgggtgca ttggaacgcg gattccccgt	720
gccaaagatg acgtaagtac cgcctataga gtctataggc ccaccccctt ggcttcgtta	780
gaacgcggct acaattaata cataacctta tgtatcatac acatacgatt taggtgacac	840
tatagaataa catccacttt gcctttctct ccacaggtgt ccactcccag gtccaactgc	900
acctcggttc tategattga attccacat gggatggtea tgtatcatcc tttttctagt	960
agcaactgca actggagtac attcagatat ccagatgacc cagtccccga gctccctgtc	1020
cgcctctgtg ggcgataggg tcaccatcac ctgccgtgcc agtcaggaca tccgtaatta	1080
tttgaactgg tatcaacaga aaccaggaaa agctccgaaa ctactgattt actatacctc	1140
ccgcctggag tctggagtcc cttctcgctt ctctggttct ggttctggga cggattacac	1200
tctgaccatc agtagtctgc aaccggagga cttcgcaact tattactgtc agcaaggtaa	1260
tactctgccg tggacgttcg gacagggcac caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc	1320
accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt	1380
tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa	1440
cgcctccaa tegggttaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac	1500
ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta	1560
cgcctgcgaa gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg	1620
agagtgttaa gcttggccgc catggcccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia	1680
ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagtgt	1740
tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcgatcggg aattaattcg	1800
gcgcagcacc atggcctgaa ataacctctg aaagaggaaac ttgggttaggt accttctgag	1860
gcggaaagaa ccagctgttg aatgtgtgtc agttaggggtg tggaaagtcc ccaggctccc	1920
cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaaagt	1980
ccccaggctc ccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca	2040
tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc	2100
cgccecatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg	2160
agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc aaaaagctgt	2220
taacagcttg gcactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac	2280
ccaacttaat cgccttgcag cacatcccc cttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc	2340
ccgcaccgat cgccttccc aacagttgcg tagcctgaat ggcgaaatggc gcctgatgcg	2400
gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc atacgtcaaa gcaaccatag	2460
tacgcgccct gtagcggcgc attaaagcgc gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc	2520
gtacacttg ccagcgcct agcgcgcgt cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc	2580
acgttcgccg gctttcccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt	2640

agtgttttac	ggcacctcga	ccccaaaaa	cttgatttgg	gtgatggttc	acgtagtggg	2700
ccatcgccct	gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtcacagtt	ctttaatagt	2760
ggactcttgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cgggctattc	ttttgattta	2820
taagggattt	tgccgatttc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	2880
aacgcgaatt	ttaacaaaat	attaacgttt	acaattttat	ggtgcactct	cagtacaatc	2940
tgtcttgatg	ccgcatagtt	aagccaactc	cgctatcgct	acgtgactgg	gtcatggctg	3000
cgccccgaca	cccgccaca	cccgtgacg	cgccctgacg	ggcttgtctg	ctccccgcat	3060
ccgcttacag	acaagctgtg	accgtctccg	ggagctgcat	gtgtcagagg	ttttcaccgt	3120
catcaccgaa	acgcgcgagg	cagtattctt	gaagacgaaa	gggcctcgtg	atacgcctat	3180
ttttataggt	taatgtcatg	ataataatgg	tttcttagac	gtcagggtggc	acttttcggg	3240
gaaatgtgcg	cggaaccctt	atttgtttat	ttttctaaat	acattcaaat	atgtatccgc	3300
tcatgagaca	ataaccctga	taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	3360
ttcaacattt	ccgtgtcgcc	cttattccct	tttttgcggc	attttgcctt	cctgtttttg	3420
ctcaccgaga	aacgctgggtg	aaagtaaaag	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	3480
gttacatcga	actggatctc	aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	3540
gttttccaat	gatgagcact	tttaaagttc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtgatg	3600
acgccgggca	agagcaactc	ggtcgccgca	tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	3660
actcaccagt	cacagaaaag	catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	3720
ctgccataac	catgagtgat	aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	3780
cgaaggagct	aaccgctttt	ttgcacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	3840
gggaaccgga	gctgaatgaa	gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgccagcag	3900
caatggcaac	aacgttgcgc	aaactattaa	ctggcgaaact	acttactcta	gcttcccggc	3960
aacaattaat	agactggatg	gaggcggata	aagttgcagg	accacttctg	cgctcggccc	4020
ttccggctgg	ctggtttatt	gctgataaat	ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggta	4080
tcattgcagc	actggggcca	gatggtaagc	cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	4140
ggagtcaggc	aactatggat	gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	4200
ttaagcattg	gtaactgtca	gaccaagtgt	actcatatat	acttttagatt	gatttaaaac	4260
ttcattttta	atttaaaagg	atctaggtga	agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaaa	4320
tcccttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaaag	atcaaaggat	4380
cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	4440
taccagecgt	ggtttgtttg	ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	4500
gcttcagcag	agcgcagata	caaataactg	tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	4560
acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	acctcgctct	gctaatacctg	ttaccagtgg	4620
ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	ccgggttggg	ctcaagacga	tagttaccgg	4680
ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	4740
cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	gtgagcattg	agaaaagcgc	acgtttcccg	4800
aaggggagaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	gcggcagggt	cggaacagga	gagcgcacga	4860
gggagcttcc	aggggggaaac	gcctgggtatc	tttatagctc	tgctcgggtt	cgccacctct	4920
gacttgagcg	tcgattttttg	tgatgctcgt	cagggggggcg	gagcctatgg	aaaaacgcca	4980

gcaacgcggc ctttttacgg ttccctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc 5040
 ctgcgttate ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataacc 5100
 ctgcgcgcag ccgaacgacc gagegcagcg agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc 5160
 caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatccagc tggcacgaca 5220
 ggtttcccgga ctggaaagcg ggcagtgage gcaacgcaat taatgtgagt tacctcactc 5280
 attaggcacc ccagccttta cactttatgc ttcgggctcg tatgttgtgt ggaattgtga 5340
 gcggataaca atttcacaca ggaaacagct atgacatga ttacgaatta a 5391

<210>16

<211>6135

<212>DNA

<213> 人类

<400>16

attcgagctc gcccgcacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc 60
 attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc 120
 tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt 180
 aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tattttacggt aaactgcccc 240
 cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg 300
 taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca 360
 gtacatctac gtattagtca tcgctattac catgggtgat cggttttggc agtacatcaa 420
 tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa 480
 tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc 540
 ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctcg 600
 tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag 660
 acaccgggac cgatccagcc tccgcggcgc ggaacgggtgc attggaacgc ggattccccg 720
 tgccaagagt gacgtaagta ccgcctatag agtctatagg cccaccccct tggttcggt 780
 agaacgcggc tacaattaat acataacctt atgtatcata cacatacgat ttaggtgaca 840
 ctatagaata acatccactt tgcccttctc tccacaggtg tccactccca ggtccaactg 900
 cactcgggtt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcatc ctttttctag 960
 tagcaactgc aactggagta cattcagaag ttcagctggt ggagtctggc ggtggcctgg 1020
 tgcagccagg gggctcactc cgtttgcct gtgcagcttc tggctactcc ttaccggct 1080
 acactatgaa ctgggtgcgt caggccccag gtaaggcctt ggaatgggtt gcaactgatta 1140
 atccttataa aggtgttact acctatgccg atagcgtcaa gggccgtttc actataagcg 1200
 tagataaate caaaaacaca gcctacctgc aaatgaacag cctgcgtgct gaggacactg 1260
 ccgtctatta ttgtgctaga agcggatact acggcgatag cgactggtat tttgacgtct 1320
 ggggtcaagg aaccctggtc accgtctcct cggcctccac caagggcccc tgggtcttcc 1380
 ccctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctgggtca 1440
 aggactactt ccccgaaacg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg 1500

tgcacacctt	cccggctgtc	ctacagtcct	caggactcta	ctccctcagc	agcgtggtga	1560
ctgtgccctc	tagcagcttg	ggcaccacaga	cctacatctg	caacgtgaat	cacaagccca	1620
gcaacaccaa	ggtggacaag	aaagttgagc	ccaaatcttg	tgacaaaact	cacacatgcc	1680
caccgtgccc	agcacctgaa	ctcctggggg	gaccgtcagt	cttcctcttc	cccccaaac	1740
ccaaggacac	cctcatgate	tcccggaccc	ctgaggtcac	atgcgtggtg	gtggacgtga	1800
gccacgaaga	ccctgaggte	aagtccaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcataatg	1860
ccaagacaaa	gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtggtc	agcgtcctca	1920
ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaaggte	tccaacaaag	1980
ccctcccagc	cccctcagag	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	cgagaaccac	2040
aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggaag	agatgaccaa	gaaccaggte	agcctgacct	2100
gcctggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tgcctgtgga	gtgggagagc	aatgggcagc	2160
cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccg	tgtctggactc	cgacggctcc	ttcttctctt	2220
acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	tcatgctccg	2280
tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	tctccgggta	2340
aatgagtgcg	acggccctag	agtcgacctg	cagaagcttg	gccgccatgg	cccaacttgt	2400
ttattgcagc	ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	2460
catttttttc	actgcattct	agttgtgggt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	2520
tctggatcga	tcgggaatta	attcggcgca	gcaccatggc	ctgaaataac	ctctgaaaga	2580
ggaacttggt	taggtacctt	ctgaggcgga	aagaaccatc	tgtggaatgt	gtgtcagtta	2640
gggtgtggaa	agtccccagg	ctcccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcattctaat	2700
tagtcagcaa	ccaggtgtgg	aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	2760
atgcatctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	ctccgcccct	cccgccccta	2820
actccgcca	gttccgcca	ttctccgccc	catggctgac	taattttttt	tatttatgca	2880
gaggccgagg	ccgcctcggc	ctctgagcta	ttccagaagt	agtgaggagg	cttttttgga	2940
ggcctaggct	tttgcaaaaa	gctgttaaca	gcttggcact	ggccgtcggt	ttacaacgtc	3000
gtgactggga	aaaccctggc	gttaccacaac	ttaatcgctt	tgcagcacat	cccccttcg	3060
ccagttggcg	taatagcgaa	gaggcccgcg	ccgatcgccc	ttcccaacag	ttgcgtagcc	3120
tgaatggcga	atggcgcttg	atgcggtatt	ttctccttac	gcattctgtc	ggtatttcac	3180
accgcatacg	tcaaagcaac	catagtcagc	gccctgtagc	ggcgcattaa	gcgcggcggg	3240
tgtggtgggt	acgcgcagcg	tgaccgttac	acttgccagc	gccctagcgc	ccgtcccttt	3300
cgttttcttc	ccttctcttc	tcgccacgtt	cgccggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	3360
ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgacccca	aaaaacttga	3420
tttgggtgat	ggttcacgta	gtgggccatc	gccctgatag	acggtttttc	gccctttgac	3480
gttggagtcc	acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	cactcaaccc	3540
tatctcgggc	tattcttttg	atttataagg	gattttgccg	atttcggcct	attggttaaa	3600
aaatgagctg	atttaacaaa	aatttaacgc	gaattttaac	aaaatattaa	cgtttacaat	3660
tttatggtgc	actctcagta	caatctgctc	tgatgccgca	tagttaagcc	aactccgcta	3720
tcgctacgtg	actgggtcat	ggctgcgccc	cgacacccgc	caacacccgc	tgacgcgccc	3780
tgacgggctt	gtctgtctcc	ggcatccgct	tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccggggagc	3840

tgcatgtgtc	agagggttttc	accgtcatca	ccgaaacgcg	cgaggcagta	ttcttgaaga	3900
cgaaagggcc	tctgtatacg	cctattttta	taggttaatg	tcatgataat	aatggtttct	3960
tagacgtcag	gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	4020
taaatacatt	caaatatgta	tccgtcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	4080
tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	4140
gcggcatttt	gccttccgtg	ttttgtctac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	4200
gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaaactgg	atctcaacag	cggttaagatc	4260
cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	4320
tgtggcgcgg	tattatcccg	tgatgacgcc	gggcaagagc	aactcggctcg	ccgcatacac	4380
tattctcaga	atgacttggg	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	4440
atgacagtaa	gagaattatg	cagtgtctgcc	ataacatga	gtgataacac	tgcggccaac	4500
ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaag	gagctaaccg	ctttttttgca	caacatgggg	4560
gatcatgtaa	ctcgccttga	tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	4620
gagcgtgaca	ccacgatgcc	agcagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	4680
gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	4740
gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttccg	gctggctggg	ttattgctga	taaatctgga	4800
gccggtgagc	gtgggtctcg	cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	4860
cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	4920
atcgtgaga	taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	4980
tatatacttt	agattgattt	aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	5040
ctttttgata	atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	5100
gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	5160
tgcttgcaaa	caaaaaaacc	accgttacca	gcggtgggtt	gtttgccgga	tcaagagcta	5220
ccaactcttt	tccgaaggt	aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	5280
ctagtgtagc	cgtagttagg	ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	5340
gctctgctaa	tcctgttacc	agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	5400
ttggactcaa	gacgatagtt	accggataag	gcgcagcggt	cgggctgaac	ggggggttcg	5460
tgcacacagc	ccagcttggg	gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	5520
cattgagaaa	gcgccacgct	tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggatatcc	ggtaagcggc	5580
agggtcggaa	caggagagcg	cacgagggag	cttcaggggg	gaaacgcctg	gtatctttat	5640
agtcctgtcg	ggtttcgcca	cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	5700
gggcggagcc	tatggaaaaa	cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	5760
tggccttttg	ctcacatgtt	ctttcctgcg	ttatccccctg	attctgtgga	taaccgtatt	5820
accgcctttg	agtgagctga	taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcgagtca	5880
gtgagcgagg	aagcggaaga	gcgccaata	cgaaaccgcg	ctctccccgc	gcgttggccg	5940
attcattaat	ccaactggca	cgacagggtt	cccgaactgga	aagcggggcag	tgagcgcaac	6000
gcaattaatg	tgagttacct	cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgettccg	6060
gctcgtatgt	tgtgtggaat	tgtgagcgga	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	6120
catgattacg	aatta					6135

<210>17

<211>1353

<212>DNA

<213> 人类

<400>17

```

gaagttcagc  tgggtgcagtc  tgggggaggt  gtggaacggc  cggggggggtc  cctgagactc  60
tcctgtgcag  cctctggatt  cacctttgat  gattatgcca  tgagctgggt  ccgccaagct  120
ccagggaagg  ggctggagtg  ggtctctggt  atcaattggc  aggggtggtag  cacaggatat  180
gcagactctg  tgaagggccg  agtcaccatc  tccagagaca  acgccaagaa  ctccctgtat  240
ctgcaaatga  acagcctgag  agccgaggac  acggccgtat  attactgtgc  gaaaatcctg  300
ggtgccggac  ggggctggta  cttegattac  tgggggaagg  ggaccacggc  caccgtctcg  360
agtgcctcca  ccaagggcc  atcggtcttc  cccctggcac  cctcctccaa  gagcacctct  420
gggggcacag  cgccctggg  ctgcctggtc  aaggactact  tccccgaacc  ggtgacggtg  480
tcgtggaact  caggcgccct  gaccagcggc  gtgcacacct  tcccggctgt  cctacagtcc  540
tcaggactct  actccctcag  cagcgtgggt  actgtgccct  ctagcagctt  gggcacccag  600
acctacatct  gcaacgtgaa  tcacaagccc  agcaacacca  aggtggacaa  gaaagttgag  660
cccaaattct  gtgacaaaac  tcacacatgc  ccaccgtgcc  cagcacctga  actcctgggg  720
ggaccgtcag  tcttctcttt  cccccaaaa  cccaaggaca  cctcatgat  ctcccgacc  780
cctgaggtca  catgcgtggt  ggtggacgtg  agccacgaag  accctgaggt  caagttcaac  840
tggtacgtgg  acggcgtgga  ggtgcataat  gccaaagaaa  agccgcggga  ggagcagtac  900
aacagcacgt  accgtgtggt  cagcgtcctc  accgtcctgc  accaggactg  gctgaatggc  960
aaggagtaca  agtgcaaggt  ctccaacaaa  gccctcccag  ccccatcga  gaaaaccatc  1020
tccaaagcca  aagggcagcc  ccgagaacca  caggtgtaca  ccctgcccc  atcccgggaa  1080
gagatgacca  agaaccaggt  cagcctgacc  tgcctgggtc  aaggcttcta  tcccagcgac  1140
atgccgtgg  agtgggagag  caatgggcag  ccggagaaca  actacaagac  cacgcctccc  1200
gtgctggact  ccgacggctc  cttcttcttc  tacagcaagc  tcaccgtgga  caagagcagg  1260
tggcagcagg  ggaacgtctt  ctcatgtccc  gtgatgcatg  aggctctgca  caaccactac  1320
acgcagaaga  gcctctccct  gtctccgggt  aaa  1353

```

<210>18

<211>451

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400>18

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Glu Arg Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Gln Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ile Leu Gly Ala Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
305	310	315	320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
	370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	435	440	445
Pro Gly Lys			
450			

<210>19

<211>639

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400>19

tctgagctga ctcaggaccc tgctgtgtct gtggccttgg gacagacagt caggatcaca	60
tgctcaggag acagcctcag aagctattat gcaagctggg accagcagaa gccaggacag	120
gcccctgtac ttgtcatcta tgggtgcaaac aacaggcctt cagggatccc agaccgattc	180
tctggctcca gctcaggaaa cacagcttcc ttgaccatca ctggggctca ggcggaagat	240
gaggctgact attactgtaa ctccgcggac agcagtggta accatgtggg attcggcgga	300
gggaccaage tgaccgtcct tggccaacct aaggctgcac catctgtcac cctcttcccg	360
ccatcttctg aggagttgca agctaacaaa gccactcttg tgtgcctgat cagtgaactc	420
tatcccgag cggtcacagt agcgtggaag gcggatagct cccccgtaaa ggctggcgtc	480
gagacgacta ccccttcgaa gcagagcaac aacaaatacg ccgccagcag ctacctgtcg	540

ctgaccccag aacagtggaa gagccacaaa agctactcct gccaaagtcac ccatgagggc 600
tcgaccgtcg aaaagaccgt cgccccgaca gagtgttct 639

<210>20

<211>213

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400>20

Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	Thr
1				5				10					15		
Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ser
			20					25					30		
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Gly
			35					40					45		
Ala	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser
			50					55				60			
Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp
65						70				75				80	
Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	His	Val
						85				90				95	
Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala
						100				105				110	
Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala
						115				120				125	
Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala
						130				135				140	
Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val
145						150				155				160	
Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser
						165				170				175	
Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Lys	Ser	Tyr
						180				185				190	
Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala
						195				200				205	
Pro	Thr	Glu	Cys	Ser											

210

<210>21

<211>48

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400>21

catgccaaagg agactaactc agataatatt aagctagctg gtaccagc

48

<210>22

<211>48

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221>mi_sc_feature

<222>15, 16, 24, 25, 30, 31

<223>n = A, T, C 和 G

<220>

<221>mi_sc_feature

<222>17, 26, 32

<223>s = G 和 C

<400>22

catgccaaagg agacnnsctc agannstatn nsgctagctg gtaccagc

48

<210>23

<211>44

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400>23

gtcatctatg gtaaataata acggccgtct ggcattcccag accg

44

<210>24

<211>47

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221>mi_sc_feature

<222>19, 20, 22, 23, 25, 26

<223>n = A, T, C 或 G

<220>

<221>mi_sc_feature

<222>21, 24, 27

<223>s = G 和 C

<400>24

cttgtcatct atggtaaann snnsnnsccg tctggcatcc cagaccg

47

<210>25

<211>59

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400>25

gctgactatt actgtaactc ccgtaataa taaggctaac atgtggtatt cggcggagg

59

<210>26

<211>59

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221>mi_sc_feature

<222>25,26,28,29,31,32,37,38

<223>n = A, T, C 或 G

<220>

<221>mi_sc_feature

<222>27,30,33,39

<223>s = G 和 C

<400>26

gctgactatt actgtaactc ccggnnsnns nnsggcennsc atgtggtatt cggcggagg 59

<210>27

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400>27

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ser His Val Val

1

5

10

<210>28

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400>28

Asn Ser Arg Ser Tyr Ser Gly Asn His Val Val

1

5

10

<210>29

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400>29

Asn Ser Arg Ser Ser Ser Gly Ser His Val Val

1

5

10

1 TTTCCTCACTGACTATAAAAGAATAGAGAAGGAAGGGCTTCAGTGACCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC
91 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGGACCCAGCCTGGGACAGACCTGCGTGCTGATCGTGATCTTCACAGTGCTCCTGCAGTCTCTCTGT
1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
181 GTGGCTGTAACCTACGTGTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAAGTACTCCAAAAGTGGCATTGCTTGTCTTAAAGAA
31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAAGAGATATGAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGCTCGTTAGAAAG
61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCAAGAAAAGCAACAAAATATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAGAAGTCCNCAG
91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCAGAGGAAGAAGCAACACATTTGTCTTCTCCAACTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAA
121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
541 ATAAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTTCATTCCTGAGCAACTTGCACTTGAGGAATGGTGAAGTGGTCATCCATGAAAAGGG
151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly
631 TTTTACTACATCTATTCCCAAACATACTTTTCGATTTTCAGGAGGAAATAAAAGAAAACACAAAGAACGACAAACAAATGGTCCAATATATT
181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
721 TACAATACACAAGTTATCCTGACCTATATTGTTGATGAAAAGTGCTAGAAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAATATGGACTCTAT
211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
811 TCCATCTATCAAGGGGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTGTCTGTAACAAATGAGCATTGATAGACATGGACCAT
241 SerIleTyrGlnGlyGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
901 GAAGCCAGTTTTTTTCGGGGCCTTTTGTAGTTGGCTAACTGACCTGGAAAGAAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTTCAGGAT
271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp
991 GATACACTATGAAGATGTTTCAAAAAATCTGACCAAAACAAACAAACAGAAA

图 1

```

      10              30              50
TTCGGGCACGAGGGCAGGATGGCGCCACCACGCTAGAGTACATCTAGGTGCGTTCCTG
      70              90              110
      M A P P P A R V H I G A F L
GCAGTGACTCCGAATCCCGGGAGCGCAGCGAGTGGGACAGAGGCAGCCGGGCCACACCC
      130              150              170
A V T P N P G S A A S G T E A A A A T P
AGCAAAGTGTGGGGCTCTTCCGCGGGGAGGATTGAACCACGAGGCGGGGGCCGAGGAGCG
      190              210              230
S K V W G S S A G R I E P R G G G R G A
CTCCCTACCTCCATGGGACAGCACGGACCCAGTGCCCGGGCCCGGGCAGGGCGGCCCCCA
      250              270              290
L P T S M G Q H G P S A R A R A G R A P
GGACCCAGGCCGCGCGGGAAGCCAGCCCTCGGCTCCGGGTCCACAAGACCTTCAAGTTT
      310              330              350
G P R P A R E A S P R L R V H K T F K F
GTCGTGTCGGGGTCCTGCTGCAGGTCGTACCTAGCTCAGCTGCAACCATCAAACCTTCAT
      370              390              410
V V V G V L L Q V V P S S A A T I K L H
GATCAATCAATTGGCACACAGCAATGGGAACATAGCCCTTTGGGAGAGTTGTGTCCACCA
      430              450              470
D Q S I G T Q Q W E H S P L G E L C P P
GGATCTCATAGATCAGAACGTCTCGAGCCTGTAACCGGTGCACAGAGGGTGTGGGTTAC
      490              510              530
G S H R S E R P G A C N R C T E G V G Y
ACCAATGCTTCCAACAATTTGTTTGCTTGCCCTCCCATGTACAGCTTGTAATCAGATGAA
      550              570              590
T N A S N N L F A C L P C T A C K S D E
GAAGAGAGAAGTCCCTGCACCACGACCAGGAACACAGCATGTGTCAGTGCAAACCAGGAACT
      610              630              650
E E R S P C T T T R N T A C Q C K P G T
TTCCGGAATGACAATTCTGCTGAGATGTGCCGGAAGTGCAGCACAGGGTGCCCCAGAGGG
      670              690              710
F R N D N S A E M C R K C S T G C P R G
ATGGTCAAGGTCAAGGATTGTACGCCCTGGAGTGACATCGAGTGTGTCCACAAAGAATCA
      730              750              770
M V K V K D C T P W S D I E G V H K E S
GGCAATGGACATAATATATGGGTGATTTGGTTGTGACTTTGGTTGTTCCGTTGCTGTTG
      790              810              830
G N G H N I W V I L V V T L V V P L L L
*****
GTGGCTGTGCTGATTGTCTGTTGTTGCATCGGCTCAGGTTGTGGAGGGGACCCCAAGTGC
      850              870              890
V A V L I V C C C I G S G C G G D P K C
*****

```

图 2A

```

      850      870      890
ATGGACAGGGTGTGTTTCTGGCGCTTGGGTCTCCTACGAGGGCCTGGGGCTGAGGACAAT
M D R V C F W R L G L L R G P G A E D N
      910      930      950
GCTCACAACGAGATTCTGAGCAACGCAGACTCGCTGTCCACTTTGCTCTCTGAGCAGCAA
A H N E I L S N A D S L S T F V S E Q Q
      970      990      1010
ATGGAAGCCAGGAGCCGGCAGATTTGACAGGTGTCACTGTACAGTCCCAGGGGAGGCA
M E S Q E P A D L T G V T V Q S P G E A
      1030      1050      1070
CAGTGTCTGCTGGGACCGGCAGAAGCTGAAGGGTCTCAGAGGAGGAGGCTGCTGTTCCA
Q C L L G P A E A E G S Q R R L L V P
      1090      1110      1130
GCAAATGGTGTGCTGACCCACTGAGACTCTGATGCTGTTCTTTGACAAGTTTGCAAACATC
A N G A D P T E T L M L F F D K F A N I
      1150      1170      1190
GTGCCCTTTGACTCCTGGGACCGCTCATGAGGCAGCTGGACCTCAGGAAAAATGAGATC
V P F D S W D Q L M R Q L D L T K N E I
      1210      1230      1250
GATGTGGTCAGAGCTGGTACAGCAGGCCAGGGGATGCCTTGATGCAATGCTGATGAAA
D V V R A G T A G P G D A L Y A M L M K
      1270      1290      1310
TGGGTCAACAAACTGGACGGAACGCTCGATCCACACCCTGCTGGATGCCTTGGAGAGG
W V N K T G R N A S I H T L L D A L E R
      1330      1350      1370
ATGGAAGAGAGACATGCAAAAGAGAAGATTCAGGACCTCTTGGTGGACTCTGAAAAGTTC
M E E R H A K E K I Q D L L V D S G K F
      1390      1410      1430
ATCTACTTAGAAGATGGCACAGGCTCTGCCGTGTCCTTGGAGTGAAAGACTCTTTTACC
I Y L E D G T F S A V S L E
      1450      1470      1490
AGAGGTTTCTCCTTAGGTGTTAGGAGTTAATACATATTAGGTTTTTTTTTTTAAACAT
      1510      1530      1550
GTATACAAAGTAAATCTTAGCCACGTGTATTGGCTCCTGCCTGTAATCCCATCACTTTG
      1570      1590      1610
GGAGGCTGACGCCGGTGGATCCACTTGAGGTCCGAAGTTCCAAGACCAGCCCTGAACCAA
      1630      1650      1670
CATCGTGGAAATGCCCGTCTTTTACAAAAAATACCAAAAATTCAACTGGAATGTGCATG

```

图 2B

```

1690      1710      1730
GTGTGTGCCATCATTTCTCGGCTAACTACGGGAGGTCTGAGGCCAGGAGAATCCACTTG
1750      1770      1790
AACCCACGAAGGACAGTGTAGACTGCAGATTGCACCACTGCACTCCAGCCTGGGAACA
1810      1830      1850
CAGAGCAAGACTCTGTCTCAAGATAAAATAAACTTGAAGAATTATTGCCCGACT
1870      1890      1910
GAGGCTCACATGCCAAAGGAAAACTGGTTCTCCCTGAGCTGGCCTCCGTGTGTTTCTT
1930      1950      1970
TATCATGGTGGTCAATTGGAGGTGTTAATTTGAATGGATTAAGGAACCTAGAACACTG
1990      2010      2030
GTAAGGCATTATTTCTGGGACATTATTTCTGGGCATGTCTTGGAGGGTGTTCAGAGGG
2050      2070      2090
GATTGGCATGCGATCGGTGGACTGAGTGGAAAAGACCTACCCTTAATTTGGGGGGGCAC
2110      2130      2150
CGTCCGACAGACTGGGGAGCAAGATAGAAGAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2C

```

1 CCCACGCGTC CGCATAAATC AGCACGCGGC CGGAGAACCC CGCAATCTCT GCGCCACAA AATACACCGA CGATGCCCGA TCTACTTTAA GGGCTGAAAC
GGGTGCCGAG GCGTATTTAG TCGTGCGCGG GCCTCTTGGG GCGTTAGAGA CCGGGTGT TTATGTGGCT GCTACGGGCT AGATGAAATT CCCGACTTTG
101 CCACGGGCCT GAGAGACTAT AAGAGCGTTC CCTACCGCCA TGAACAACG GGGACAGAAC GCCCGGCGC CTTCGGGGC CCGGAAAAG CACGGCCAG
GGTGCCCGGA CTCTCTGATA TTCTGCAAG GATGGCGGT ACCTGTGTGC CCTGTCTTG CCGGGCGGC GAAGCCCCG GGCCTTTTC GTGCCGGTC
1 M etGluGlnAr gGlyGlnAsn AlaProAla laSerGlyAl aArgLysArg HisGlyProGly
201 GACCCAGGGA GGC GCGGGGA GCCAGGCTG GCCTCCGGT CCCCAGACC CTGTGCTCG TTGTGCGCG GGTCTGCTG TTGCTCTAG CTGAGTCTGC
CTGGGTCCCT CCGCGCCCT CCGTCCGGAC CCGAGGCCA GGGTTCTGG GAACACGAGC AACAGCGCG CAGGACGAC AACCAGATC GACTCAGACG
22 ProArgGl uAlaArgGly AlaArgProG lyLeuArgVa lProLysThr LeuValLeuV alValAlaAl aValLeuLeu LeuValSerA ladluSerAla
301 TCTGATCACC CAACAAGACC TAGTCCCCA GCAGAGAGCG GCCCACAAC AAAAGAGTC CAGCCCTCA GAGGATGTG GTCCACCTGG ACACCATATC
AGACTAGTGG GTGTCTCGG ATCAGGGGT CGTCTCTCG CCGGGTGTG TTTCTCCAG GTCGGGAGT CTCCCTAACA CAGGTGGACC TGTGGTATAG
55 LeuIleThr GlnGlnAspL euAlaProGl nGlnArgAla AlaProGlnG lnLysArgSe rSerProSer GluGlyLeuC ysProProGl yHisHisIle
401 TCAGAAGACG GTAGAGATTG CATCTCTGC AAATATGGAC AGGACTATAG CACTCACTGG AATGACCTCC TTTCTGCTT GCGCTGCACC AGGTGTGATT
AGTCTTCTGC CATCTCTAAC GTAGAGGACG TTTATACCTG TCCTGATATC GTGAGTGACC TTACTGGAGG AAAAGACGAA CCGACCTGG TCCACACTAA
88 SerGluAspG lyArgAspCy sIleSerCys LysTyrGlyG lnAspTyrSe rThrHisTrp AsnAspLeuL euPheCysLe uArgCysThr ArgCysAspSer
501 CAGGTGAAGT GGAGCTAAGT CCCTGCACCA CGACCAGAAA CACAGTGTGT CAGTGCAGAG AAGGCACCTT CCGGGAAGAA GATTCTCTG AGATGTGCCG
GTCCACTTCA CCTCGATTCA GGGACGTGGT GCTGGTCTTT GTGTACACA GTCACGCTTC TTCCGTGGA GGCCTTCTT CTAAGAGGAC TCTACACGGC
122 GlyGluVa lGluLeuSer ProCysThrT hrThrArgAs nThrValCys GlnCysGluG luGlyThrPh eArgGluGlu AspSerProG luMetCysArg
601 GAAGTGCCGC ACAGGTGTG CCAGAGGAT GGTCAAGGTC GGTGATTGTA CACCTCGAG TGACATCGAA TGTGTCCACA AAGAATCAGG CATCATCATA
CTTCACGGCG TGTCCACAG GGTCTCCCTA CCAGTCCAG CCACTAACAT GTGGGACCTC ACTGTAGCTT ACACAGGTGT TTCTTAGTCC GTAGTAGTAT
155 LysCysArg ThrGlyCysP roArgGlyMe tValLysVal GlyAspCysT hrProTrpSe rAspIleGlu CysValHisL ysGluSerGl yIleIleIle
701 GGAGTCACAG TTGCAGCCGT AGTCTTGATT GTGGCTGTGT TTGTTTGCA GTCTTTACTG TGAAGAAAG TCCTTCCTTA CCTGAAAGGC ATCTGCTCAG
CCTCAGTGTG AACGTCGGCA TCAGAACTAA CACGACACA AACAAACGTT CAGAAATGAC ACCTTCTTTC AGGAAGGAAT GGAATTTCCG TAGACGAGTC
188 GlyValThrV alAlaAlaVa lValLeuIle ValAlaValP heValCysLy sSerLeuLeu TrpLysLysV alLeuProTy rLeuLysGly IleCysSerGly

```

图 3A

801 GTGGTGGTGG GGACCCCTGAG CGTGTGGACA GAAGCTCACA ACGACCTGGG GCTGAGGACA ATGTCTCTCA TGAGATCGTG AGTATCTTGC AGCCACCCCA
 CACCACCACC CCTGGGACTC GCACACCTGT CTTCGAGTGT TGCTGSACCC CGACTCCTGT TACAGGAGTT ACTCTAGCAC TCATAGAACG TGGGTGGGT
 222 GlyGlyGly yAspProGlu ArgValAspA rgSerSerGln nArgProGly AlaGluAspA snValLeuAs nGluIleVal SerIleLeuG InProThrGln
 901 GGTCCCTGAG CAGGAAATGG AAGTCCAGGA GCCAGCAGAG CCAACAGGTG TCAACATGTT GTCCCCCGGG GAGTCAGAGC ATCTGCTGGA ACCGGCAGAA
 CCAGGGACTC GTCCCTTACC TTCAGGTCCT CGGTCTCTC GGTGTGCCAC AGTTGTACAA CAGGGGGCCC CTCAGTCTCG TAGACGACCT TGGCCGTCTT
 255 ValProGlu GlnGluMetG luValGlnGln uProAlaGlu ProThrGlyV aAlaMetLe uSerProGly GluSerGluH isLeuLeuGln uProAlaGlu
 1001 GCTGAAAGGT CTCAGAGGAG GAGGCTGCTG GTTCCAGCAA ATGAAGGTGA TCCCACTGAG ACTCTGAGAC AGTGCTTCGA TGACTTTGCA GACTTGGTGC
 CGACTTTCCA GAGTCTCCTC CTCGACGAC CAAGGTCTGT TACTTCCACT AGGTGACTC TGAGACTCTG TCACGAAGCT ACTGAAACGT CTGAACCACG
 288 AlaGluArgS erGlnArgAr gArgLeuLeu ValProAlaA snGluGlyAs pProThrGlu ThrLeuArgG InCysPheAs pAspPheAla AspLeuValPro
 1101 CCTTTGACTC CTGGGAGCCG CTCATGAGGA AGTTGGGCTT CATGOACAAT GAGATAAAGG TGGCTAAAGC TGAGGCAGCG GGGCAGAGG ACACCTTGTA
 GGAAACTGAG GACCTCTGGC GAGTACTCCT TCAACCCGGA GTACCTGTTA CTCTATTTC ACCGATTTCG ACTCCGTCCG CCGGTGTCCC TGTGGAACAT
 322 PheAspSe rTrpGluPro LeuMetArgL ysLeuGlyLe uMetAspAsn GluIleLysV aAlaLysAl aGluAlaAla GlyHisArgA spThrLeuTyr
 1201 CACGATGCTG ATAAAGTGGG TCAACAAAAC CGGGCAGAT GCTCTGTGCC ACACCTGCTT GATGCTCTG GAGACGCTGG GAGAGAGACT TGCCAAGCAG
 GTGCTACGAC TATTTCACCC AGTTGTTTTG GCCCGCTCTA CGGAGACAGG TGTGGGACGA CCTACGGAAC CTCTGCGACC CTCTCTCTGA ACGGTTCGTC
 355 ThrMetLeu ileLysTrpV aAlaLysTh rGlyArgAsp AlaSerValH isThrLeuLe uAspAlaLeu GluThrLeuG lyGluArgLe uAlaLysGln
 1301 AAGATTGAGG ACCACTTGTT GAGCTCTGGA AAGTTCATGT ATCTAGAAGG TAATGCAGAC TCTGCCWTGT CCTAAGTGTG ATTCTCTTCA GGAAGTGAGA
 TTCTAAGTCC TGGTGAACAA CTCGAGACCT TTCAAGTACA TAGATCTTCC ATTACGCTG AGACGGAACA GGATTACAC TAAGAGAAGT CCTTCACTCT
 388 LysIleGluA sphHisLeuLe uSerSerGly LysPheMetT yrLeuGluGln yAsnAlaAsp SerAlaXaaS erOC*
 1401 CCTTCCCTGG TTTACCTTTT TTCTGGAAAA AGCCCAACTG GACTCCAGTC AGTAGGAAGG TGCCACAATT GTCACATGAC CGGTACTGGA AGAAACTCTC
 GGAAGGGACC AAATGGAAAA AAGACCTTTT TCGGGTTGAC CTGAGGTGAG TCATCCTTTC ACGGTGTAA CAGTGTACTG GCCATGACCT TCTTTGAGAG
 1501 CCATCCAACA TCACCCAGTG GATGGAACAT CCTGTAACCT TTCACTGCAC TTGGCATTTT TTTTATAAGC TGAATGTGAT AATAAGGACA CTATGGAAAT
 GGTAGGTGT AGTGGGTAC CTACCTTGTA GGACATTGAA AAGTGACGTG AACCGTAATA AAAATATTCG ACTTACACTA TTATTCCTGT GATACCTTTA

图 3B

1601 GTCTGGATCA TTCCGTTTGT GCGTACTTTG AGATTGGTTT TGGGATGTCA TTGTTTTAC AGCACTTTT TATCCTAATG TAAATGCTTT ATTTATTTAT
 CAGACCTAGT AAGGCAACAA CGCATGAAAC TCTAAACCAA ACCCTACAGT AACAAAAGTG TCGTGAAAA ATAGGATTAC ATTTACGAAA TAAATAATA
 1701 TTGGGCTACA TTGTAAGATC CATCTACAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GGCGGCGCG ACTCTAGAGT CGACCTGCAG AAGCTTGGCC GCCATGGCC
 AACCCGATGT AACATTCFAG GTAGATGTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTC CCGCCGCGC TGAGATCTCA GCTGGACGTC TTCGAACCGG CGGTACCGG

图 3C

ATG GAA CAA CGG GGA CAG AAC GCC CCG GCC GCT TCG GGG GCC CGG AAA	48
Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys	
1 5 10 15	
AGG CAC GGC CCA GGA CCC AGG GAG GCG CGG GGA GCC AGG CCT GGG CCC	96
Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro	
20 25 30	
CGG GTC CCC AAG ACC CTT GTG CTC GTT GTC GCC GCG GTC CTG CTG TTG	144
Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu	
35 40 45	
GTC TCA GCT GAG TCT GCT CTG ATC ACC CAA CAA GAC CTA GCT CCC CAG	192
Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln	
50 55 60	
CAG AGA GCG GCC CCA CAA CAA AAG AGG TCC AGC CCC TCA GAG GGA TTG	240
Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu	
65 70 75 80	
TGT CCA CCT GGA CAC CAT ATC TCA GAA GAC GGT AGA GAT TGC ATC TCC	288
Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser	
85 90 95	
TGC AAA TAT GGA CAG GAC TAT AGC ACT CAC TGG AAT GAC CTC CTT TTC	336
Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe	
100 105 110	

图 4A

TGC TTG CGC TGC ACC AGG TGT GAT TCA GGT GAA GTG GAG CTA AGT CCG	384
Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro	
115 120 125	
TGC ACC ACG ACC AGA AAC ACA GTG TGT CAG TGC GAA GAA GCC ACC TTC	432
Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe	
130 135 140	
CGG GAA GAA GAT TCT CCT GAG ATG TGC CGG AAG TGC CGC ACA GGG TGT	480
Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys	
145 150 155 160	
CCC AGA GGG ATG GTC AAG GTC GGT GAT TGT ACA CCC TGG AGT GAC ATC	528
Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile	
165 170 175	
GAA TGT GTC CAC AAA GAA TCA GGT ACA AAG CAC AGT GGG GAA GCC CCA	576
Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro	
180 185 190	
GCT GTG GAG GAG ACG GTG ACC TCC AGC CCA GGG ACT CCT GCC TCT CCC	624
Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro	
195 200 205	
TGT TCT CTC TCA GGC ATC ATC ATA GGA GTC ACA GTT GCA GCC GTA GTC	672
Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val	
210 215 220	
TTG ATT GTG GCT GTG TTT GTT TGC AAG TCT TTA CTG TGG AAG AAA GTC	720
Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val	
225 230 235 240	
CTT CCT TAC CTG AAA GGC ATC TGC TCA GGT GGT GGT GGG GAC CCT GAG	768
Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu	
245 250 255	
CGT GTG GAC AGA AGC TCA CAA CGA CCT GGG GCT GAG GAC AAT GTC CTC	816
Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu	
260 265 270	
AAT GAG ATC GTG AGT ATC TTG CAG CCC ACC CAG GTC CCT GAG CAG GAA	864
Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu	
275 280 285	
ATG GAA GTC CAG GAG CCA GCA GAG CCA ACA GGT GTC AAC ATG TTG TCC	912
Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser	
290 295 300	
CCC GGG GAG TCA GAG CAT CTG CTG GAA CCG GCA GAA GCT GAA AGG TCT	960
Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser	
305 310 315 320	
CAG AGG AGG AGG CTG CTG GTT CCA GCA AAT GAA GGT GAT CCC ACT GAG	1008
Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu	
325 330 335	
ACT CTG AGA CAG TGC TTC GAT GAC TTT GCA GAC TTG GTG CCC TTT GAC	1056
Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp	
340 345 350	

图 4B

TCC	TGG	GAG	CCG	CTC	ATG	AGG	AAG	TTG	GGC	CTC	ATG	GAC	AAT	GAG	ATA	1104
Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Met	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Met	Asp	Asn	Glu	Ile	
	355						360					365				
AAG	GTG	GCT	AAA	GCT	GAG	GCA	GCG	GGC	CAC	AGG	GAC	ACC	TTG	TAC	ACG	1152
Lys	Val	Ala	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Arg	Asp	Thr	Leu	Tyr	Thr	
	370					375				380						
ATG	CTG	ATA	AAG	TGG	GTC	AAC	AAA	ACC	GGG	CGA	GAT	GCC	TCT	GTC	CAC	1200
Met	Leu	Ile	Lys	Trp	Val	Asn	Lys	Thr	Gly	Arg	Asp	Ala	Ser	Val	His	
	385				390				395					400		
ACC	CTG	CTG	GAT	GCC	TTG	GAG	ACG	CTG	GGA	GAG	AGA	CTT	GCC	AAG	CAG	1248
Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys	Gln	
			405					410					415			
AAG	ATT	GAG	GAC	CAC	TTG	TTG	AGC	TCT	GGA	AAG	TTC	ATG	TAT	CTA	GAA	1296
Lys	Ile	Glu	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Phe	Met	Tyr	Leu	Glu	
		420					425						430			
GGT	AAT	GCA	GAC	TCT	GCC	ATG	TCC	TAA								1323
Gly	Asn	Ala	Asp	Ser	Ala	Met	Ser	*								
	435					440										

图 4C

ATGACCATGA	TTACGCCAAG	CTTTGGAGCC	TTTTTTTTTG	AGATTTTCAA	50
CGTGAAAAA	TTATTATTCT	CAATTCCTTT	AGTTGTTTCT	TTCTATGCGG	100
CCCAGCCGGC	CATGGCCGAG	GTGCAGCTGG	TGCAGTCTGG	GGGAGGTGTG	150
GACCGGCCGG	GGGGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTGCAGCCT	CTGGATTAC	200
CTTTGATGAT	TATGGCATGA	GCTGGGTCCG	CCAAGCTCCA	GGGAAGGGGC	250
TGGAGTGGGT	CTCTGGTATT	AATTGGAATG	GTGGTAGCAC	AGGATATGCA	300
GACTCTGTGA	AGGGCCGAGT	CACCATCTCC	AGAGACAACG	CCAAGAACTC	350
CCTGTATCTG	CAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCCGTATATT	400
ACTGTGCGAA	AATCCTGGGT	GCCGGACGGG	GCTGGTACTT	CGATCTCTGG	450
GGGAAGGGGA	CCACGGTCAC	CGTCTCGAGT	GGTGGAGGCG	GTTCAGGCGG	500
AGGTGGCAGC	GGCGGTGGCG	GATCGTCTGA	GCTGACTCAG	GACCTTGCTG	550
TGTCTGTGGC	CTTGGGACAG	ACAGTCAGGA	TCACATGCCA	AGGAGACAGC	600
CTCAGAAGCT	ATTATGCAAG	CTGGTACCAG	CAGAAGCCAG	GACAGGCCCC	650
TGTACTTGTC	ATCTATGGTA	AAAACAACCG	GCCCTCAGGG	ATCCCAGACC	700
GATTCTCTGG	CTCCAGCTCA	GGAAACACAG	CTTCCTTGAC	CATCACTGGG	750
GCTCAGGCGG	AAGATGAGGC	TGACTATTAC	TGTAACCTCCC	GGGACAGCAG	800
TGGTAACCAT	GTGGTATTCT	GCGGAGGGAC	CAAGCTGACC	GTCTAGGGTG	850
CGGCCGCACA	TCATCATCAC	CATCACGGGG	CCGCAGAAC	AAAACATCAT	900
TCAGAAGAGG	ATCTGAATGG	GCCTGCATAG			930

图 5

Apo-2.16E2.his 信号 重链
 1 MTMITPSFGAFFLEIFNVKLLFAIPLVVPFYAAQPAMAEVQLVQSGGGV

 Apo-2.16E2.his 51 ERPGGSLRLSCAASGFTFDDYGM^{CDR1}SWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGY^{CDR2}

 Apo-2.16E2.his 101 DSVKGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIL^{CDR3}----GAGRGWY

 Apo-2.16E2.his 147 F-DLWGKGTFTVTVSSGGGSGGGGSGGGGS-SELTDPAVSVALGQTVRI 轻链

 Apo-2.16E2.his 195 TCQGD^{CDR1}SLR---SYIASWYQQKPGQAPVLTIVYGN^{CDR2}NRPSGIPDRFSGSSSG

 Apo-2.16E2.his 242 NTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVLGAAAHHHH^{CDR3}

 Apo-2.16E2.his 292 HGAAEQKLISEEDLNGAA

图 6

EVQLVQSGGGVERP
 ADSVKGRVTISRDN
 SASTKGPSVFPLAP
 SGLYSLSSVVTVP
 GPSVFLFPPKPKD
 NSTYRVVSVLTVL
 EMTKNQVSLTCLV
 WQQGNVFSCVMH
 EVQLVQSGGGVERP
 ADSVKGRVTISRDN
 SASTKGPSVFPLAP
 SGLYSLSSVVTVP
 GPSVFLFPPKPKD
 NSTYRVVSVLTVL
 EMTKNQVSLTCLV
 WQQGNVFSCVMH

<451 残基，0 终止；分子量：49089.42

图 7

ss.16E2.Heavy.txt
GAAGTTCAGCTGGTGCACTCTGGGGGAGGTGTGGAACGGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCC
TTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGT
AGCACAGGATATGCACTCTGTGAAGGGCCGAGTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAAC
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATTAATCTGTGCGAAAATCCTGGGTGCCGGACGGGGCTGGTACTTCGATCTCTGGGGG
AAGGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCAAGCGGCCCTGGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAAGTGTGCTCTAGCAGC
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAACTTTGT
GACAAACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAATCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAG
GACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
GTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA!

AGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATC
CCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGAGTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

图 8

SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLTIVYKNNRPSGIPDRF
SGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVLGPKAAPSVTLFP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLS
LTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

<213 残基，0终止；分子量：22583.95

图 9

ss.16E2.light.txt
TCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGC
TATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATC
CCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCTTACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTAT
TACTGTAACTCCCGGGACAGCAGTGGAACCATGTGGTATTGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTGGCCAACCTAAGGCT
GCACCATCTGTACCCCTCTTCCGCCATCTTCTGAGGAGTTGCAAGCTAACAAAGCCACTCTTGTGTGCTGATCAGTGACTTC
TATCCCGGAGCGGTACAGTAGCGTGGAAGGCGGATAGCTCCCCGTAAAGGCTGGCGTCGAGACGACTACCCCTTCGAAGCAG
AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGTGCTGACCCCAAGACAGTGGAAAGAGCCACAAAAGCTACTCCTGCCAAGTC
ACCCATGAGGGCTCGACCGTCGAAAAGACCGTCGCCCCGACAGAGTGTCT

图 10

TTGAGCTCGCCCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
TTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT
GGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCAC
TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAG
TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAAT
GGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCAGCGGGGATTCCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAAT
GGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCC
CCATTGACGCAAAATGGCGGTAGGCGGTACGCGTGGGAGSTCTATATAAGCAGAGCTCGT
TTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGA
CACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCGCCGT
GCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCTATAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCGTTA
GAACGGCGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACAC
TATAGAATAACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAACTGC
ACCTCGGTTCTATCGATTGAATCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGT
AGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTC
CCATTGACGCAAAATGGCGGTAGGCGGTACCATCACTGCCGTGCCAGTCAGGACATCCGTAAAT
TTTGAATGGTATCAACAGAAACAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTACTATACCTC
CCGCTGGAGTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGGACGGATTACAC
TCTGACCATCAGTAGTCTGCAACCGGAGGACTTCGCAACTTATTACTGTGAGCAAGGTAA
TACTCTGCGTGGAGCTTCGGACAGGSCACCAAGGTGGAGATCAACGAACTGTGGCTGC
ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGGCTCTGT
TGTTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA
CGCCCTCCAATCGGGTAATCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC
CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA
CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
AGAGTGTAAAGCTTGGCCGCCATGGCCCACTTGTTTATTGACAGCTTATAATGGTTACAA
ATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTG
TGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGATCGGGAATTAATTG
GCGCAGCACCATGGCCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAGGTACCTCTGAG
GCGGAAAGAACAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCGAGGCTCCC
CAGCAGGCAGAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACAGGTGTGGAAAGT
CCCCAGGCTCCCGAGCAGGCAGAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA
TAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCCTCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCCATTCTC
CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTG
AGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTGT
TAACAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTACACAGTCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTAC
CCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC
CCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGTAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCG
GTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAG
TACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC
GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCCGCTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCC
ACGTTCCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTT
AGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTGGGTGATGGTTACCGTAGTGGG
CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGT
GGACTCTTGTTCAAAACCTGGAAACACACTCAACCCATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTA
TAAGGGATTTTCCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAATTT
AACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACCTCTCAGTACAATC
TGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTGATGGCTG
CGCCCCGACACCGCCAACACCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCAT
CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGT
CATCACGAAACGCGCGAGGCAGTATCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTAT

图 11A

TTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGG
GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC
TCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTA
TTCACACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTCGCGCATTTTGCCCTCCTGTTTGTG
CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
GTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAC
GTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGATG
ACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGT
ACTCACAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTG
CTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTCTGACAACGATCGGAGGAC
CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACAACATGGGGGATCATGTAACGCGCTTGATCGTT
GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGGATGCCAGCAG
CAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAATCTACTTACTCTAGCTTCCCGGC
AACATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC
TTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTA
TGATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG
GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGTGCCTCACTGA
TTAAGCATTTGGTAACTGTGAGCAAGTTTACTCATATACTTTAGATTGATTTAAAC
TTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAA
TCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCGCG
TACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTG
GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGAGCGGTAGTTAGGCCACC
ACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG
CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG
ATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTGCTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAA
CGACCTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCG
AAGGGAGAAAGCGGACAGSTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGA
GGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCT
GACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCA
GCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTC
CTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCG
CTCGCCGAGCCGAACGACGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCC
CAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATCCAGCTGGCAGACA
GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACCTCACTC
ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTAA

图 11B

ATTCGAGCTCGCCCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
ATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAATGGCCCGCC
TGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
AACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAATGCCCCA
CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG
TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTAGTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCAATGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTGGCAGTACATCAA
TGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAA
TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCTGAACAACCTCCGC
CCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
TTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACCTCCATAGAAG
ACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCAATTGGAACGCGGATTCCCGG
TGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCCAACCCCTTGGCTTCGTT
AGAATGGCGGTACAAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTGAGTGA
CTATAGAATAAACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAATG
CACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTCAATCATCTTTTCTAG
TAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGAAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGG
TGACGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTGACGCTTCTGGCTACTCCTTTACCGGCT
ACACTTGAACCTGGGTGCGTCAGGCCCCAGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCACTGATTA
ATCCTTATAAAGGTGTACTACCTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCG
TAGATAAATCCAAAACACAGCCTACCTGCAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTG
CCGCTCTATTATTGTGCTAGAAGCGGATACACTACGGCGATAGCGACTGGTATTTTACGCTCT
GGGGTCAAGGAACCTGGTCAACGCTCTCCTCGGCCCTCCACCAAGGGGCCATCGGCTCTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGC
TGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC
CACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAC
CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCACGAAGACCTTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCA
CCGTCTGACACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAGTGAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT
GCCTGGTCAAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACCTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTA
AATGAGTGGCAGCGGCCCTAGAGTGGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGT
TTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAG
CATTTTTTTCACTGCATTTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATG
TCTGGATCGATCGGGAATTAATTCGGCGCAGCACCATTGGCCTGAAATAACCTCTGAAAGA
GGAACCTTGGTTAGGTACCTTCTGAGGCGGAAAGAACCATCTGTGGAATGTGTGTCAGTTA
GGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAGCATGCATCTCAAT
TAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAGC
ATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTA
ACTCCGCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCA
GAGGCCGAGGCCGCCCTCGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGA
GGCCTAGGCTTTTGA AAAAGCTGTTAACAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCG
CCAGTTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGTAGCC
TGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTAC
ACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCGCGGG

图 12A

TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT
CGCTTTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCG
GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGA
TTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC
GTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGGAACAACACTCAACCC
TATCTCGGGCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAA
AAATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATTAACGTTTACAAT
TTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAACTCCGCTA
TCGCTACGTGACTGGGTCTAGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCC
TGACGGGCTTGCTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGC
TGCATGTGTGAGAGTTTTCACCGCTCATCACCAGAAACGCGCGAGGCAGTATTCTTGAAGA
CGAAAGGGCCTCGTGATACGCTATTTTATAGGTTAATGTCTGATAAATAATGGTTTCT
TAGACGTGAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTC
TAAATACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATA
TATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGCTGTGCGCCTTATTCCTTTT
GCGGCATTTTGCTTCCTGTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT
GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATC
CTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA
TGTGGCGCGGTATTATCCCGTGATGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGATACAC
TATTCTCAGAAAGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGC
ATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAAC
TTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACACAACATGGGG
GATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGAC
GAGCGTGACACACGATGCCAGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACGSGC
GAACACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATTAAGTT
GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA
GCCGCTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG
ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGAGACCAAGTTTACTCA
TATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATC
CTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC
TGCTTGCAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTA
CCAACCTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCCTT
CTAGTGTAAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC
GCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCG
TGACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAG
CATTGAGAAAGGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGC
AGGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCTGATCTTTAT
AGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGG
GGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGCCCTTTTGC
TGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTTCCGTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATT
ACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCGAGCGGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCG
ATTCAATTAATCCAACTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAAC
GCAATTAATGTGAGTTACCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG
GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAACAGCTATGAC
CATGATTACGAATTA

图 12B

ss.Apomab7.3.heavy.txt
 GAAGTTCAGCTGGTGCACTCTGGGGGAGGTGTGGAACGGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACCC
 TTTGATGATTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATCAATTGGCAGGGTGGT
 AGCACAGGATATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGAGTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAAC
 AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATCCTGGGTGCCGGACGGGGCTGGTACTTCGATTACTGGGGG
 AAGGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACC
 AGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTGGTGAAGTGTGCCCTCTAGCAGC
 TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
 GACAAAATCACAATGCCCACCGTGGCCAGCACCTGAATCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAGAACCCCAAG
 GACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTGCAG
 GTCCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA!
 AGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCTGCCCCATC
 CCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
 GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCAGCCTCCCGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

图 13

EVQLVQSGGVERPQGSRLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGINWQGGSTGY
 ADSVKGRVTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKILGAGRGWYFDYWGKGTITVTS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

<451 残基, 0 终止; 分子量: 49167.50

图 14

ss.Apomab7.3.light.txt
 TCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCTCAGGAGACAGCCTCAGAAGC
 TATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTATCTATGGTGCAAACAACAGGCCTTCAGGGATC
 CCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTAT
 TACTGTAACTCCGCGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTCCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTGGCCAACCTAAGGCT
 GCACCATCTGTACCCTCTTCCCGCATCTTCTGAGGAGTTGCAAGCTAACAAAGCCACTTGTGTGCCTGATCAGTGACTTC
 TATCCCGAGCGGTACAGTAGCGTGAAGGCGGATAGCTCCCCGTAAAGGCTGGCGTCGAGACGACTACCCCTTCGAAGCAG
 AGCAACAACAATAACGCCGCCAGCAGCTACCTGTCGCTGACCCAGAACAGTGAAGAGCCACAAAAGCTACTCTGCCAAGTC
 ACCCATGAGGGCTCGACCGTCGAAAAGACCGTCGCCCGACAGAGTGTCT

图 15

SELTQDPAVSVALGQTVRITCSGDSLRSYASWYQQKPGQAPVLYYGANNRPSGIPDRF
SGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSADSSGNHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYYAASSYLS
LTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

<213 残基，0 终止；分子量：22400.70

图 16

16E2和Apomab7.3的重链对比

16E2	1 EVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSW
	*
Apomab7.3	1 EVQLVQSGGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSW
16E2	37 VRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRVTISRDNAKNSLYLQMNSL
	*
Apomab7.3	37 VRQAPGKGLEWVSGINWQGGSTGYADSVKGRVTISRDNAKNSLYLQMNSL
16E2	87 RAEDTAVYYCAKILGAGRGWYFDLWGKGTITVSSASTKGPSVFPLAPSS
	*
Apomab7.3	87 RAEDTAVYYCAKILGAGRGWYFDYWGKGTITVSSASTKGPSVFPLAPSS
16E2	137 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
Apomab7.3	137 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
16E2	187 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
Apomab7.3	187 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
16E2	237 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
Apomab7.3	237 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
16E2	287 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
Apomab7.3	287 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

图 17A

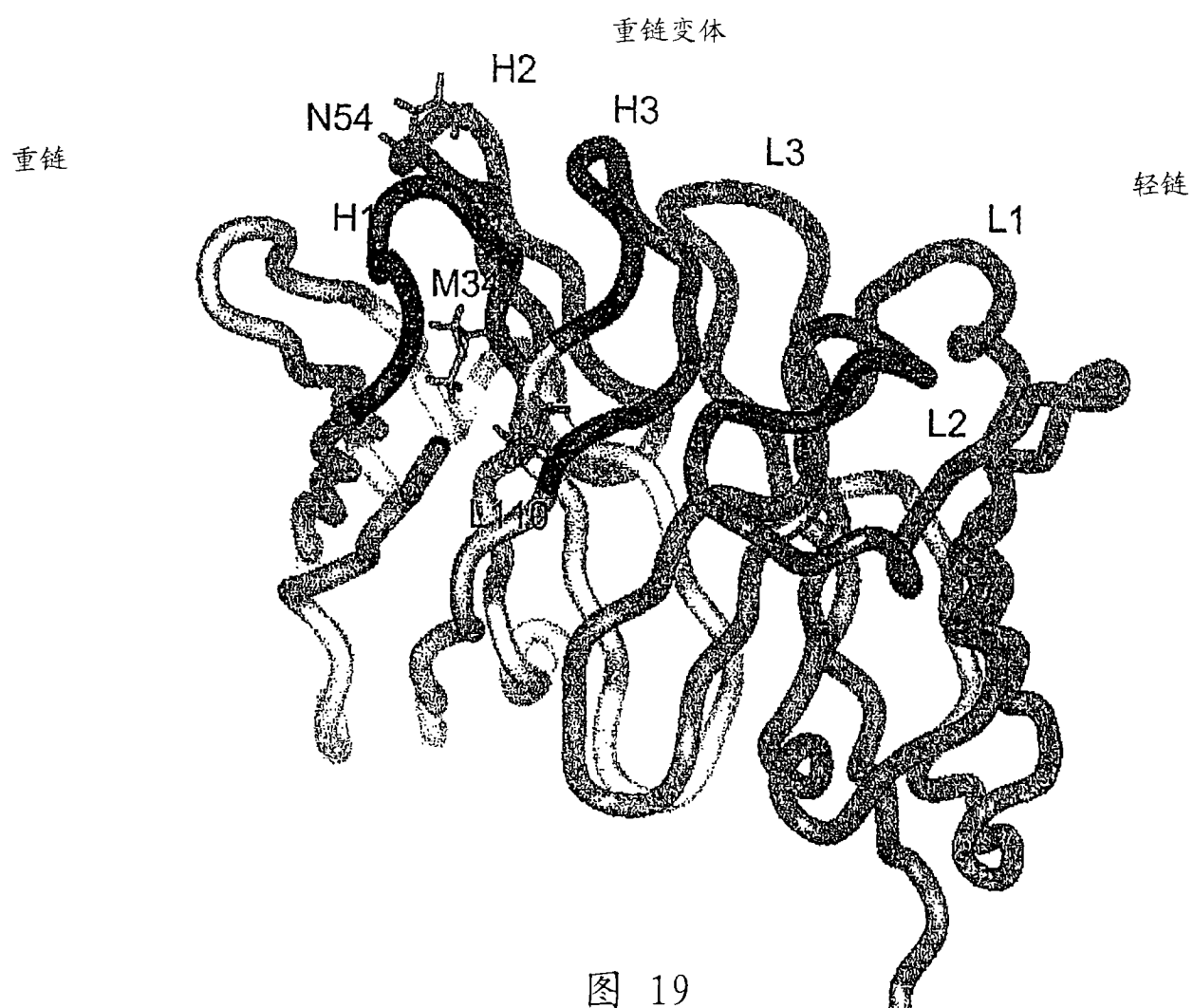
16E2	337 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
Apomab7.3	337 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
16E2	387 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
Apomab7.3	387 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
16E2.huIgG1	437 HNHYTQKSLSLSPGK
Apomab7.3	437 HNHYTQKSLSLSPGK

图 17B

16E2和Apomab7.3的轻链对比

16E2	1 SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKN
	*
Apomab7.3	1 SELTQDPAVSVALGQTVRITCSGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGAN
	*
16E2	51 NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGG
	*
Apomab7.3	51 NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSADSSGNHVVFGG
16E2	101 GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK
Apomab7.3	101 GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK
16E2	151 ADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG
Apomab7.3	151 ADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEG
16E2	201 STVEKTVAPTECS
Apomab7.3	201 STVEKTVAPTECS

图 18



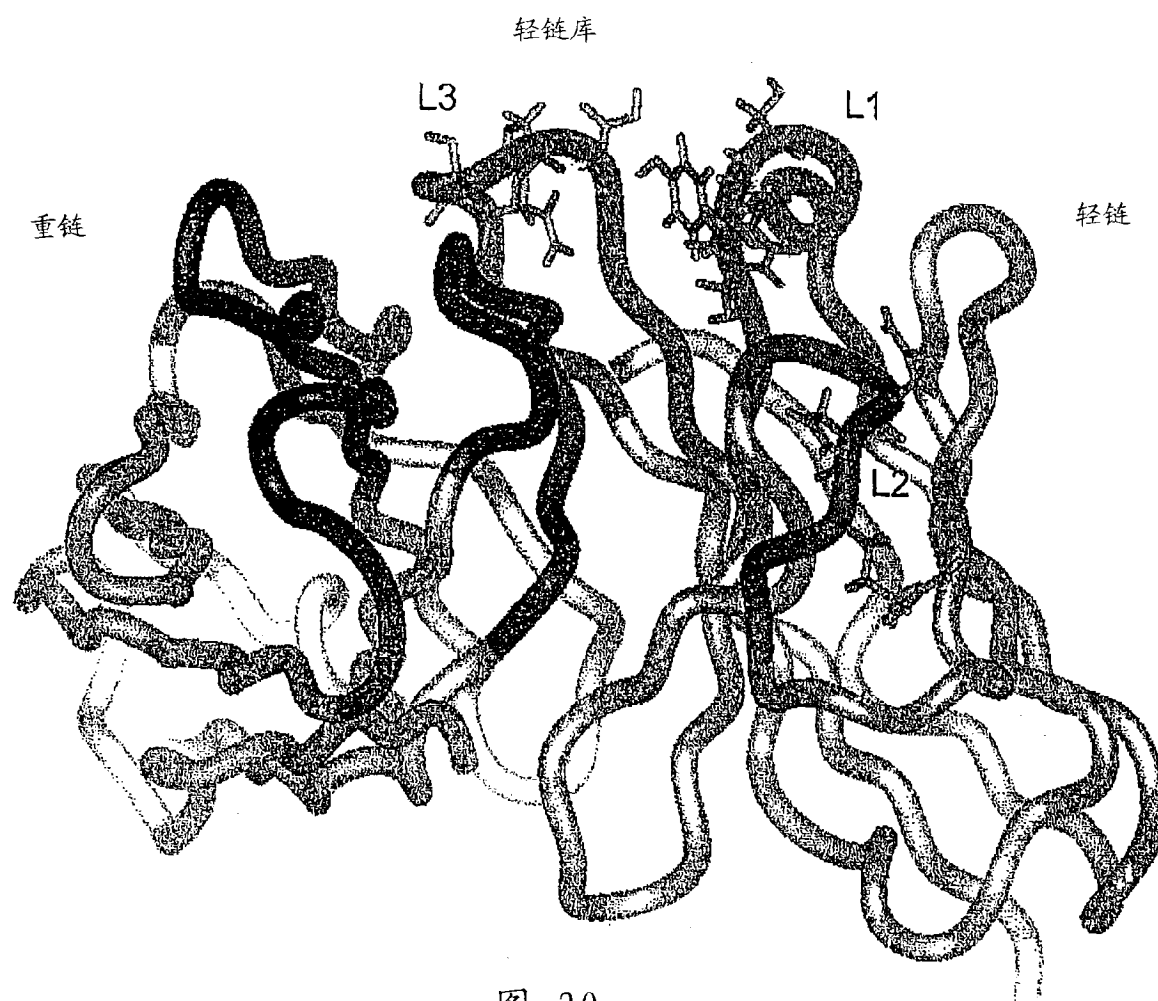


图 20

IP单剂Apomab5.3、6.3和8.3与16E2型式1在
Colo205异种移植无胸腺裸鼠模型中进行比较

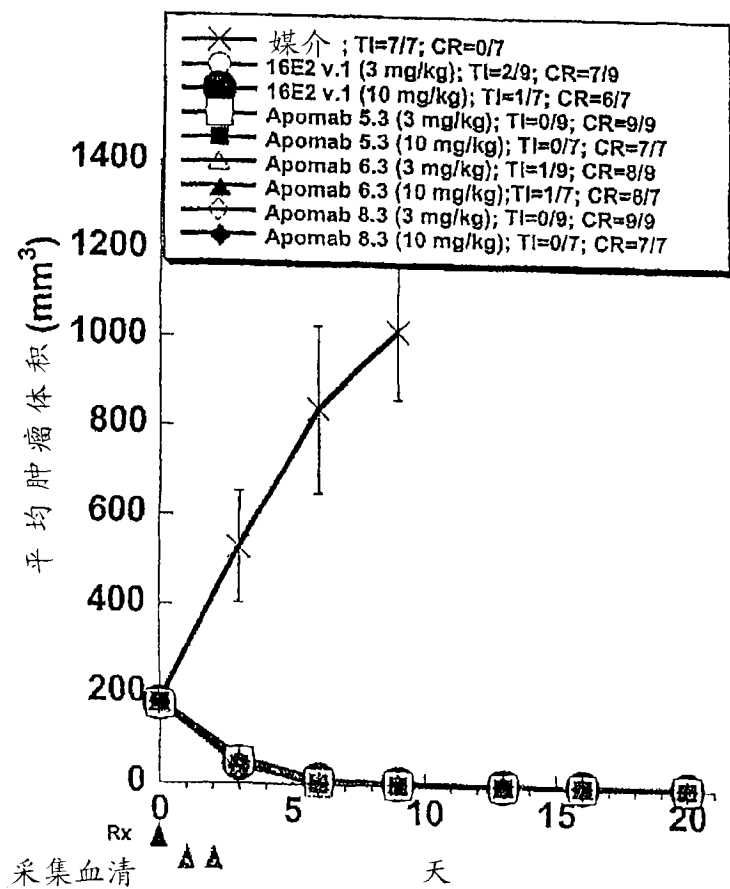


图 21

IP单剂Apomab 5.2、6.2、5.3、7.2和7.3与16E2型式1在
Colo205异种移植物无胸腺裸鼠模型中进行比较

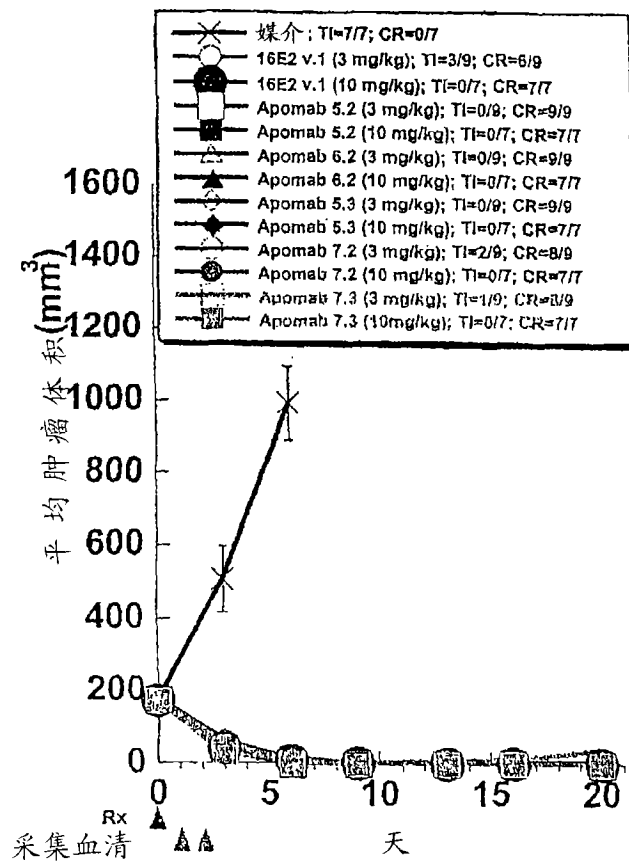


图 22

IP单剂Apomab5.2、7.3和8.3与16E2型式1在
Colo205异种移植物无胸腺裸鼠模型中进行比较

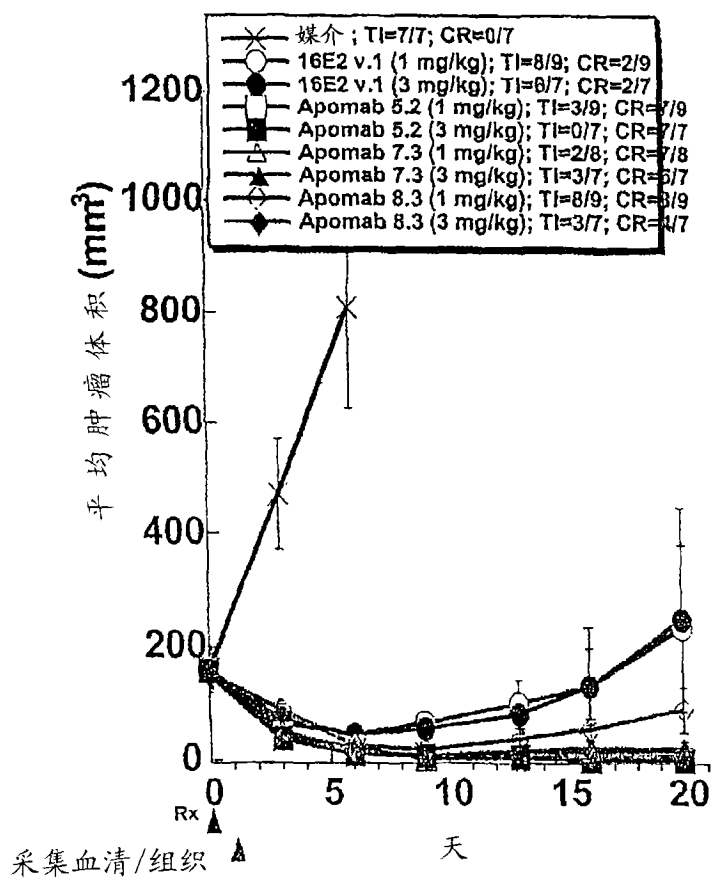


图 23

Apomab突变体23.3和25.3与Apomab7.3在
Colo205异种移植物模型中进行比较

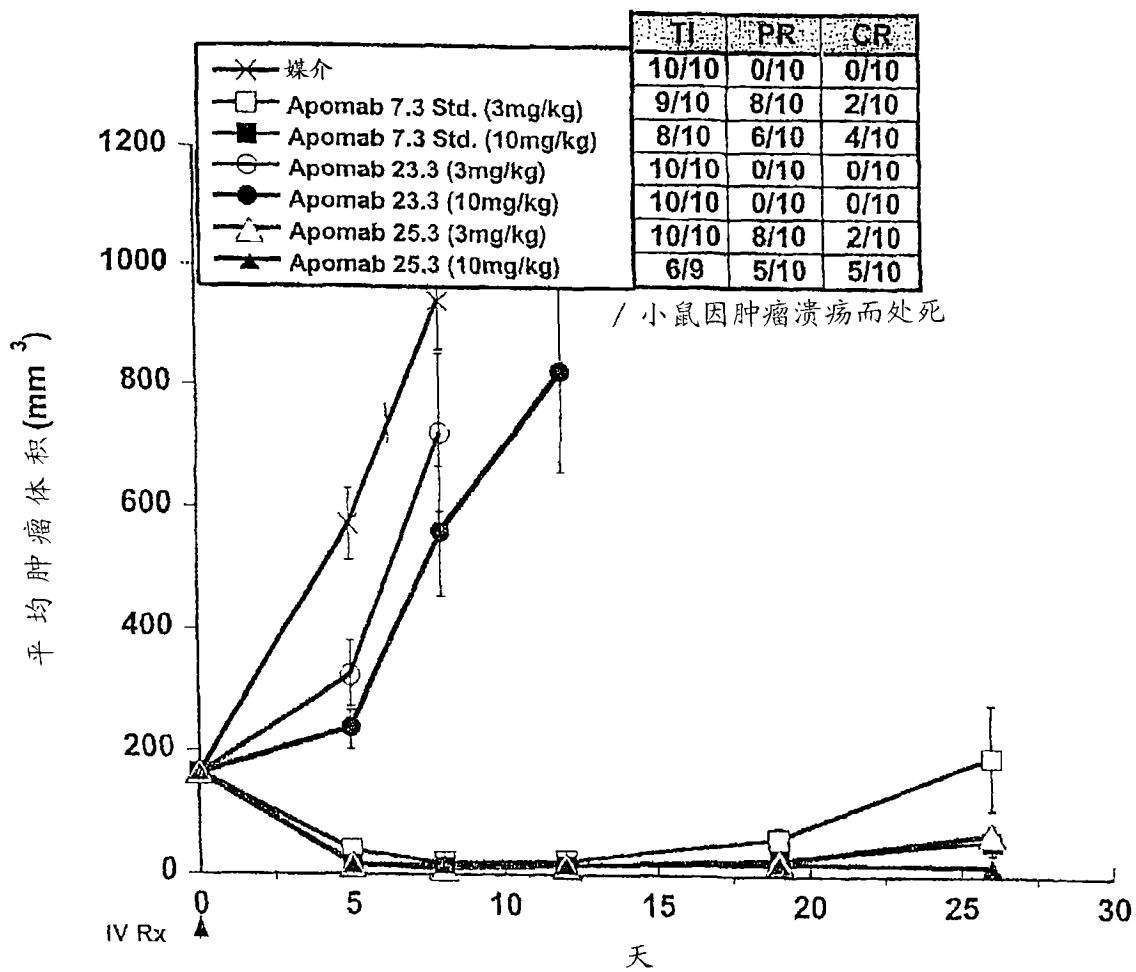
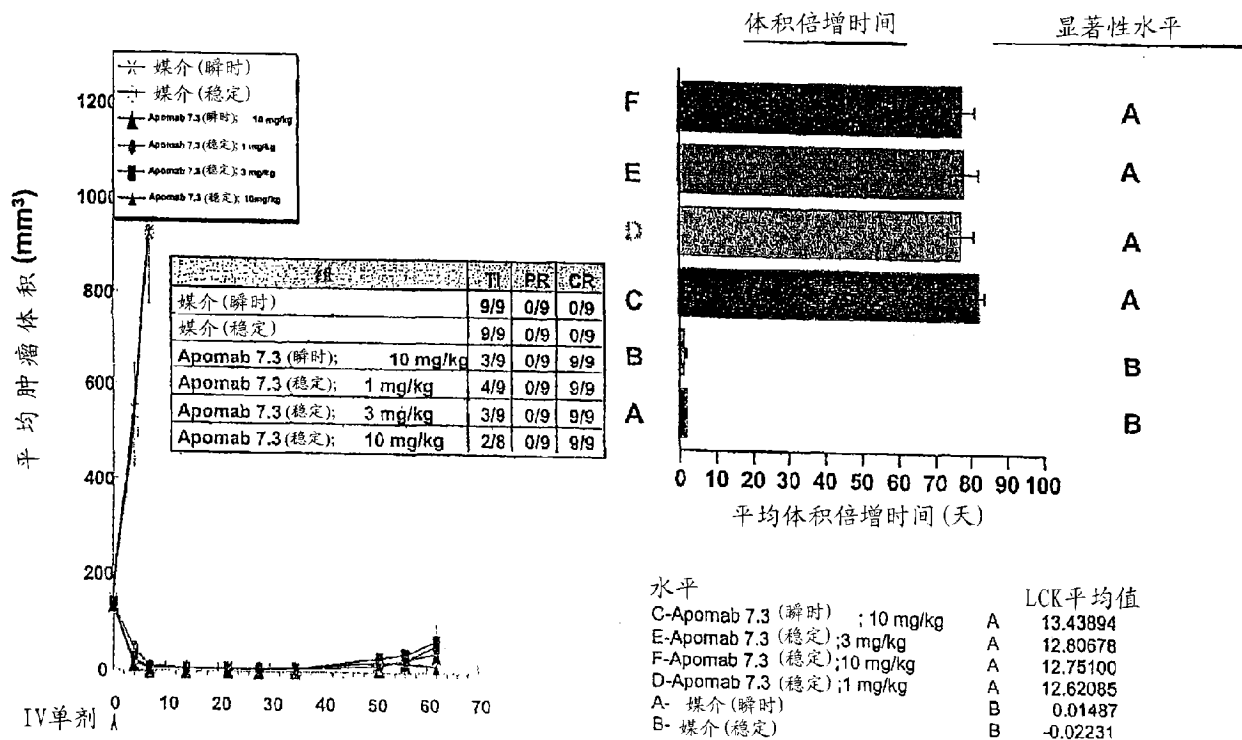


图 24

衍生自稳定细胞系较之瞬时细胞系的Apomab 7.3在裸鼠中的Colo205异种移植瘤
中进行比较



与不同字母有关的水平有显著差异
所有各对的比较: Tukey-Kramer $P < 0.05$

图 25

单独的联合CPT-11 (80mg/kg) 的Apomab 7.3 (10mg/kg) 对HCT15异种植物

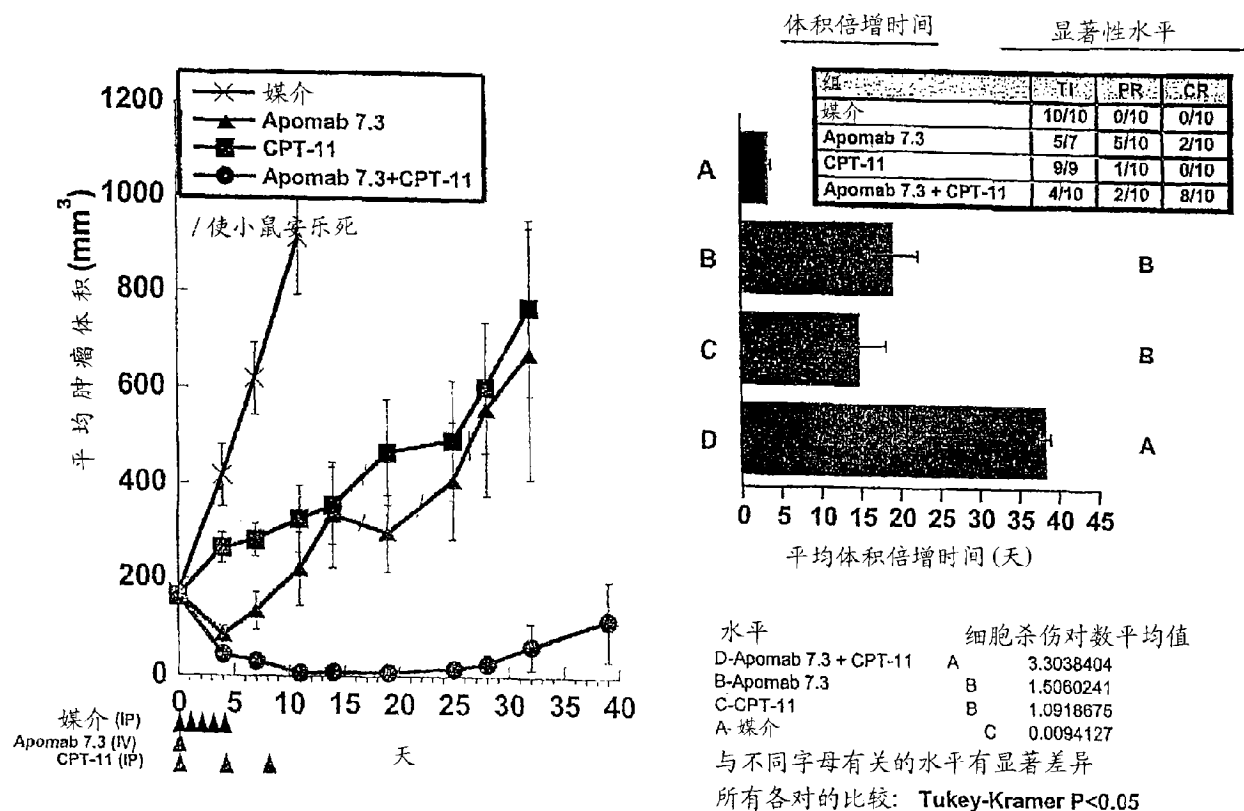


图 26

单独的和联合CPT-11 (80mg/kg) 的Apomab 7.3 (10mg/kg) 对LS180异种植物

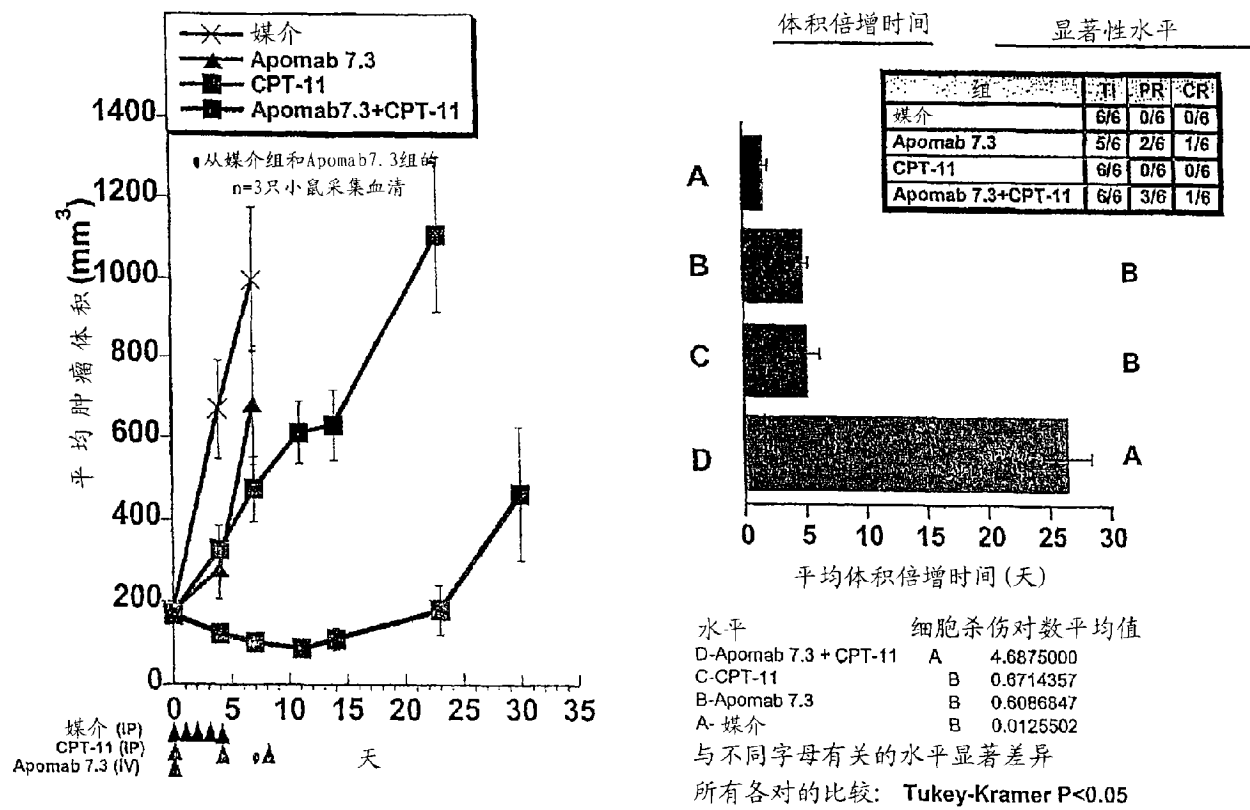


图 27

单独的和联合Rituxan (4mg/kg; q1wk) 的Apomab7.3 (10mg/kg; q1wk)
对BJAB异种植物CB17ICR SCID小鼠模型

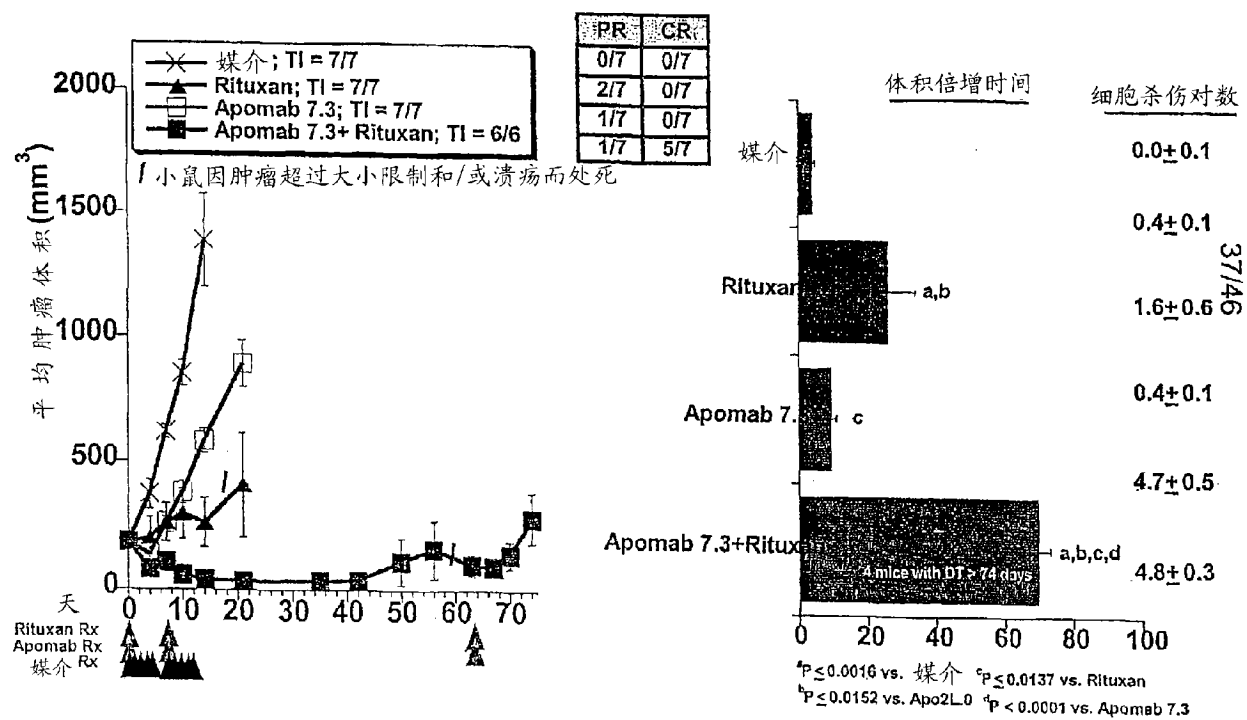


图 28

单独的和联合吉西他滨 (160mg/kg; IP) 的 Apomab 7.3 (10mg/kg; IV)
对无胸腺裸鼠中的 BxPC3 异种移植瘤

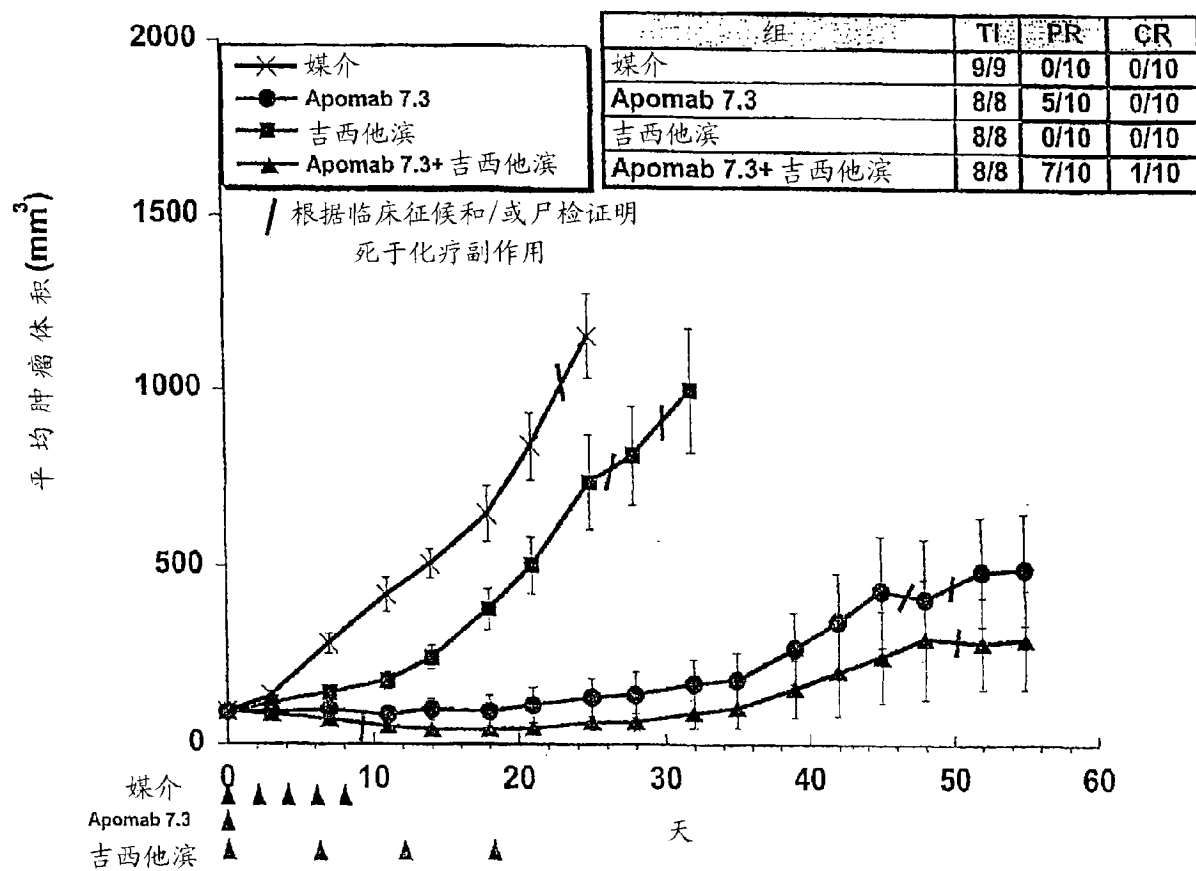


图 29

单独的及联合卡铂(100mg/kg/小鼠; Ix; IP)和泰素(6.25mg/kg/小鼠; 5x/周; SQ)的Apomab 7.3 (10mg/kg/小鼠; Ix/周; IP)对H460异性移植植物模型

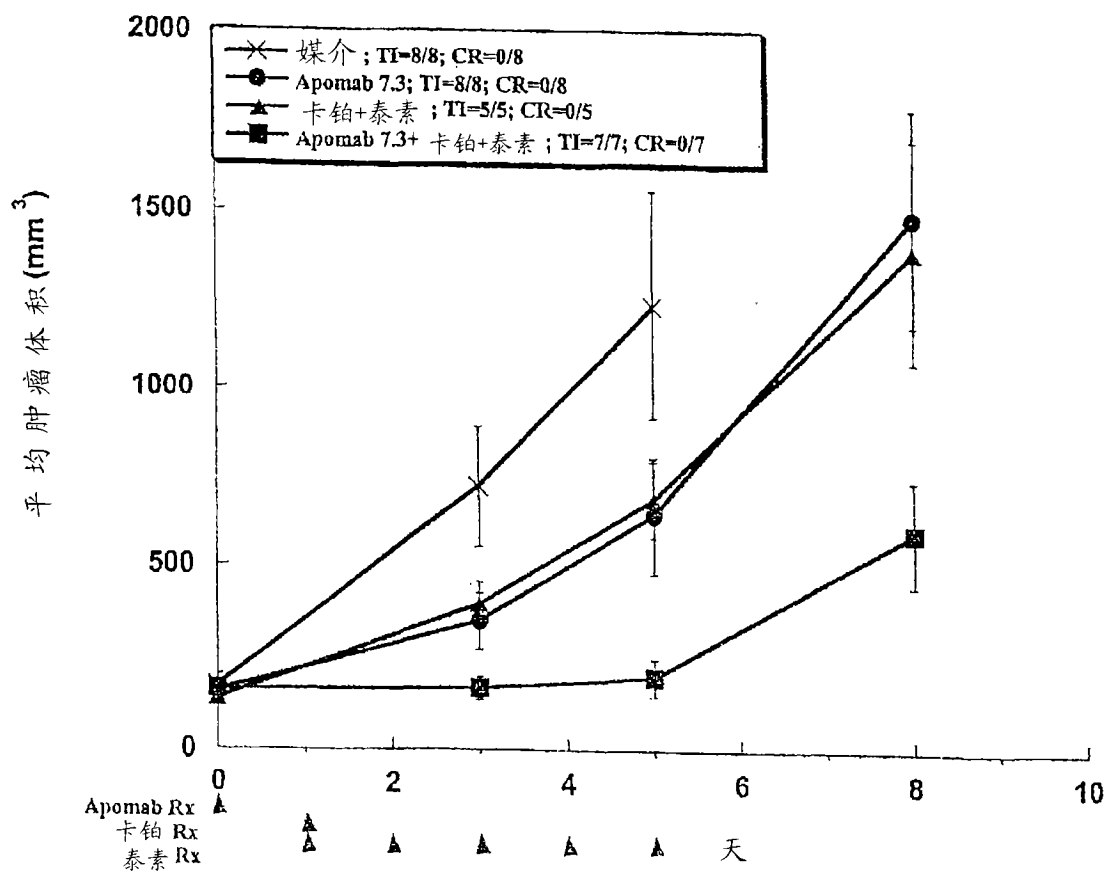


图 30

单独的及联合卡铂(100mg/kg/小鼠; 1x)和泰素(6.25mg/kg; 5x/周)
的Apomab 7.3 (10mg/kg; q1wk) 在H2122异种移植模型中

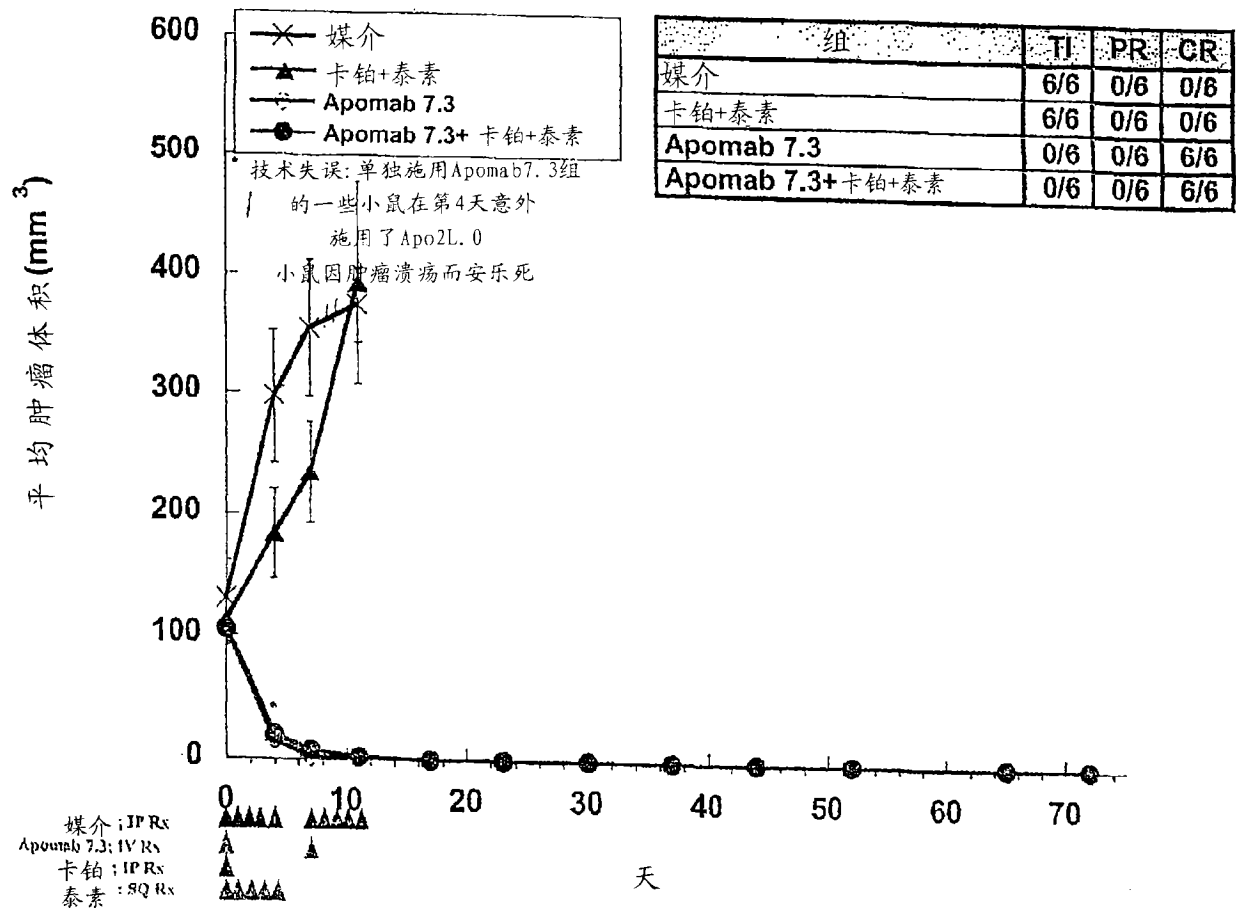


图 31

Apomab 7.3对H2122的剂量响应

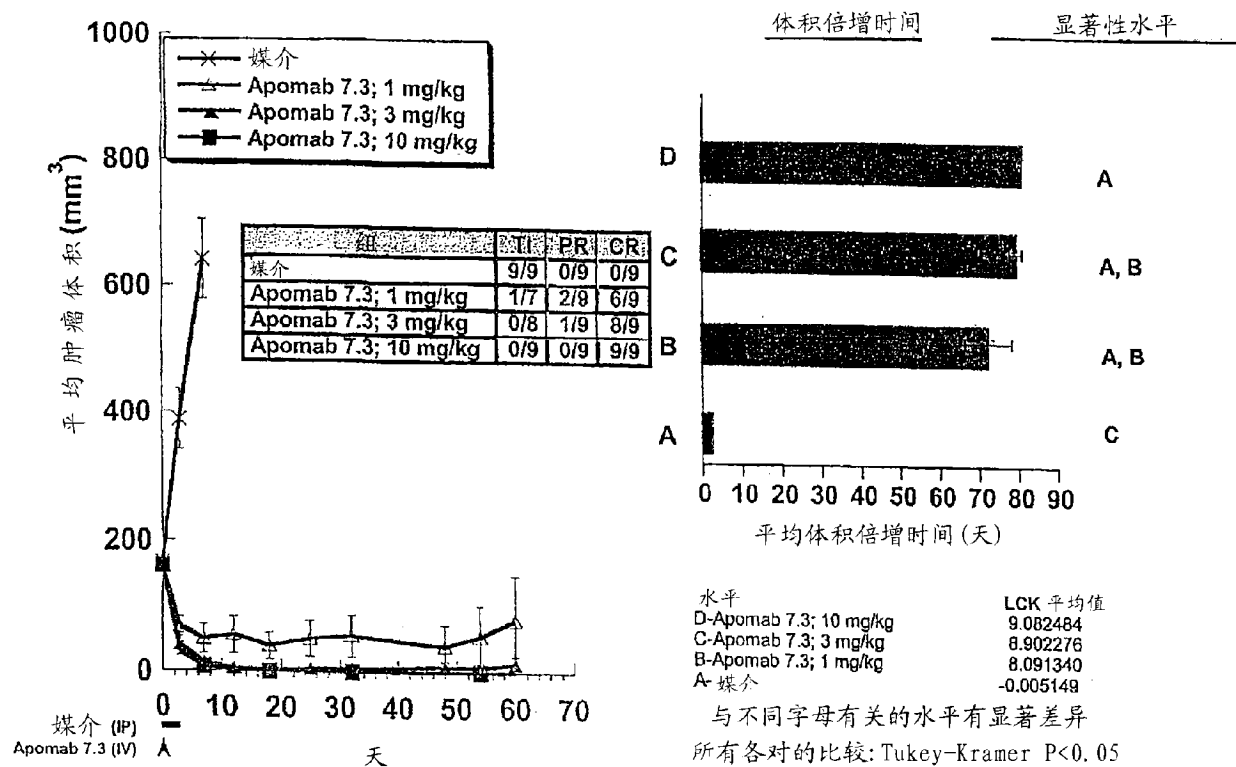


图 32

与Apomab7.3相比, Apomab突变体23.3和25.3在Colo205异种移植物模型中

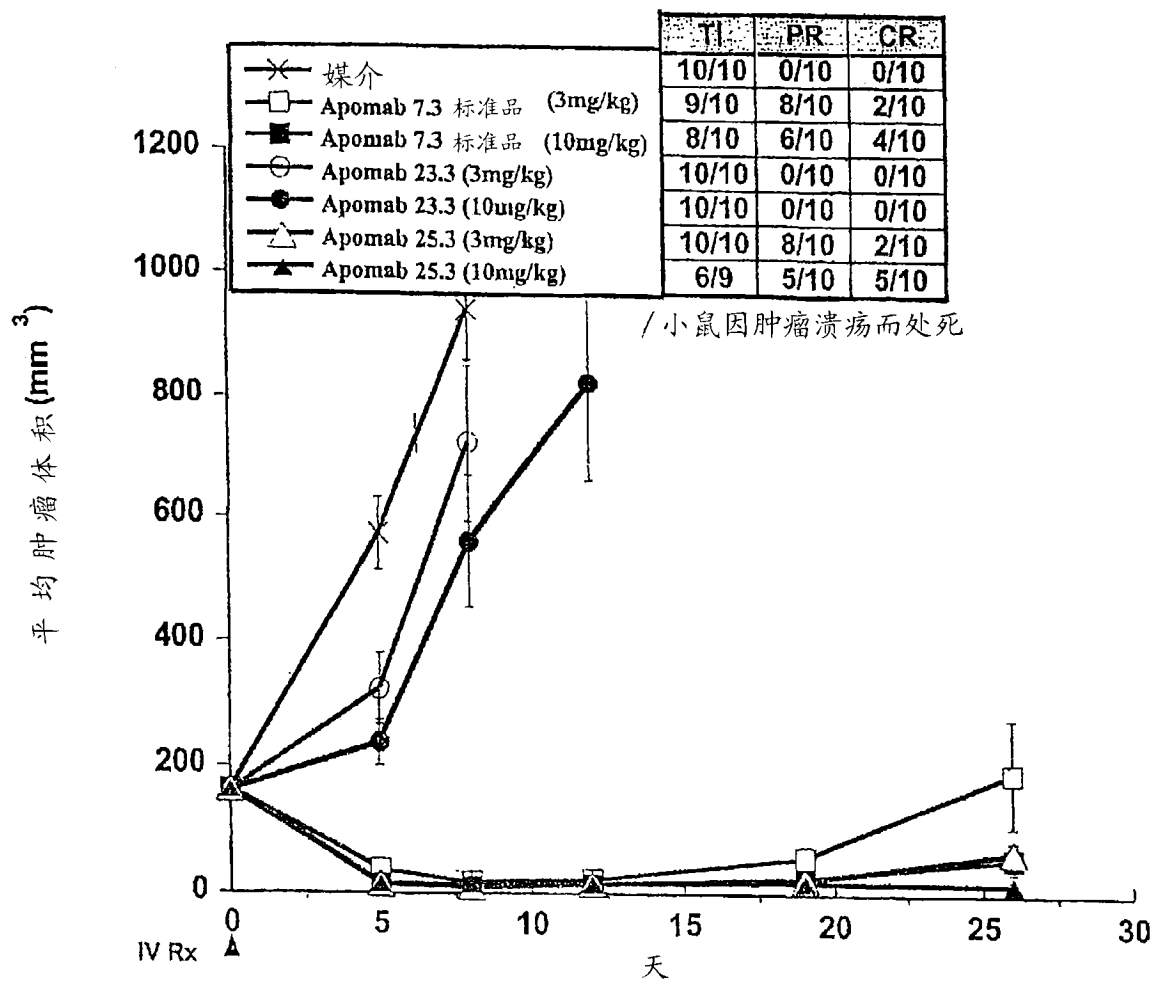


图 33

colo205-e203研究中的各组的中值肿瘤生长和Kaplan-Meier图 34

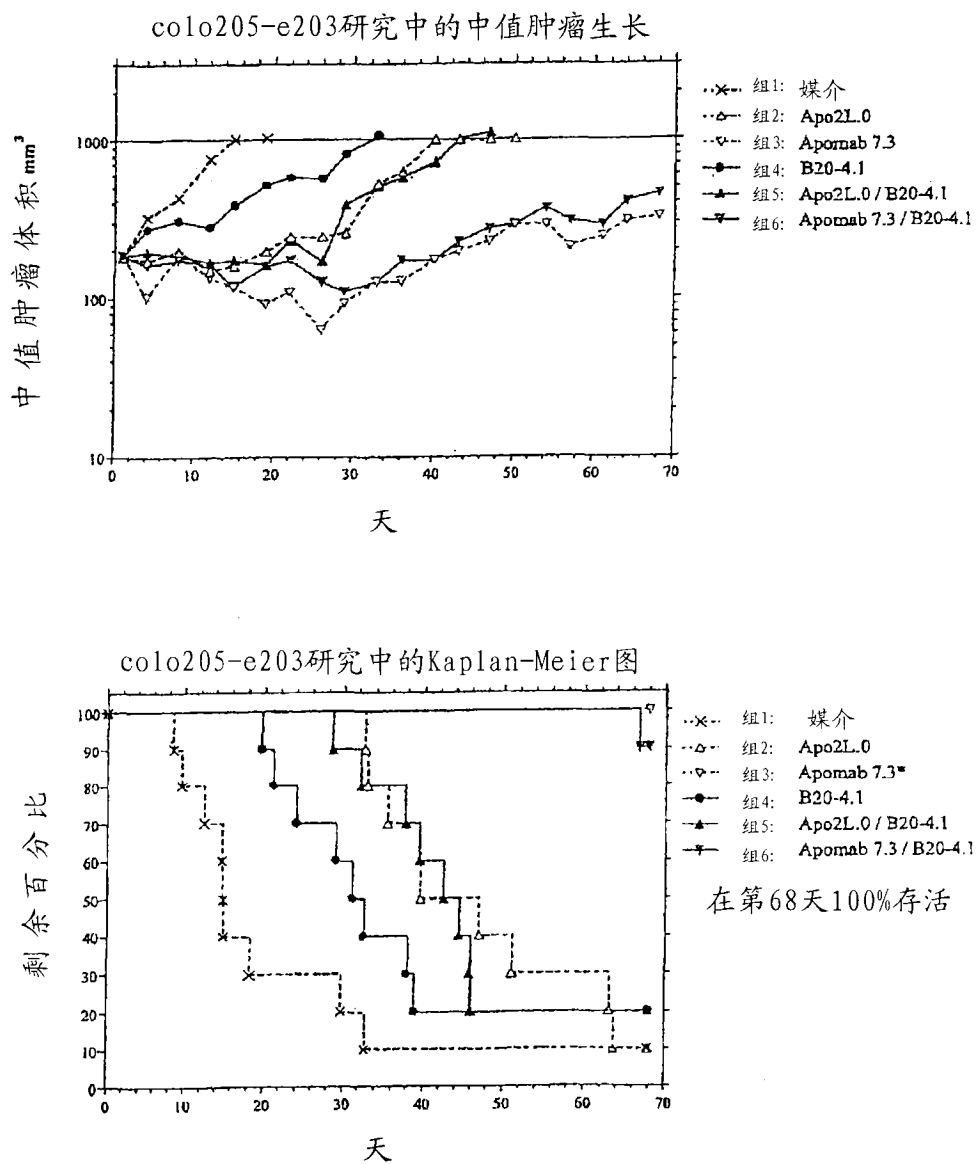


图 34

SKMES-e209研究中用单独的及联合卡铂和紫杉醇的Apo2L.0治疗的组的组中值肿瘤生长和Kaplan-Meier图

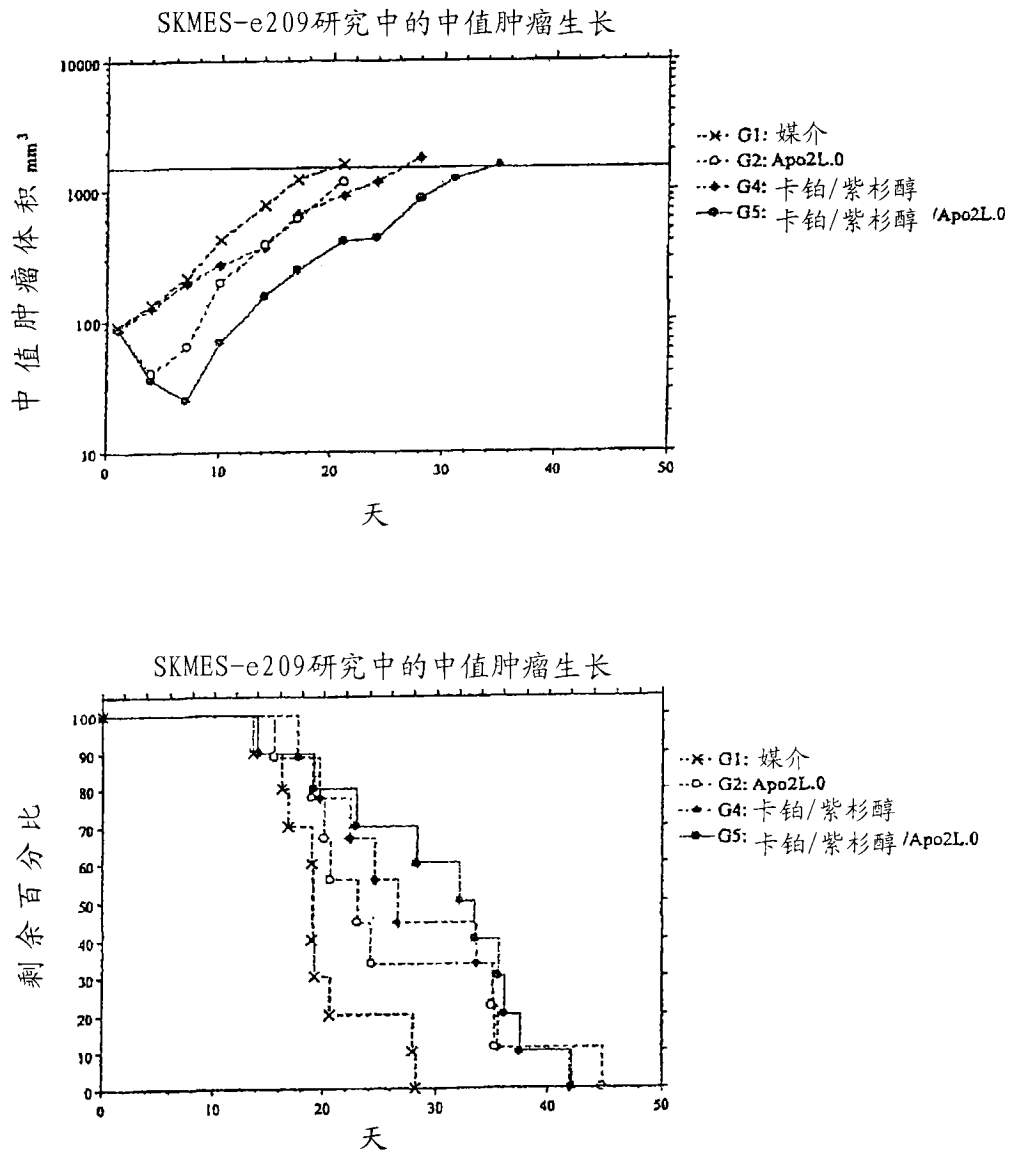


图 35

SKMES-e209研究中用单独的及联合卡铂和紫杉醇的Apomab7.3治疗的
组的组中值肿瘤生长和Kaplan-Meier图

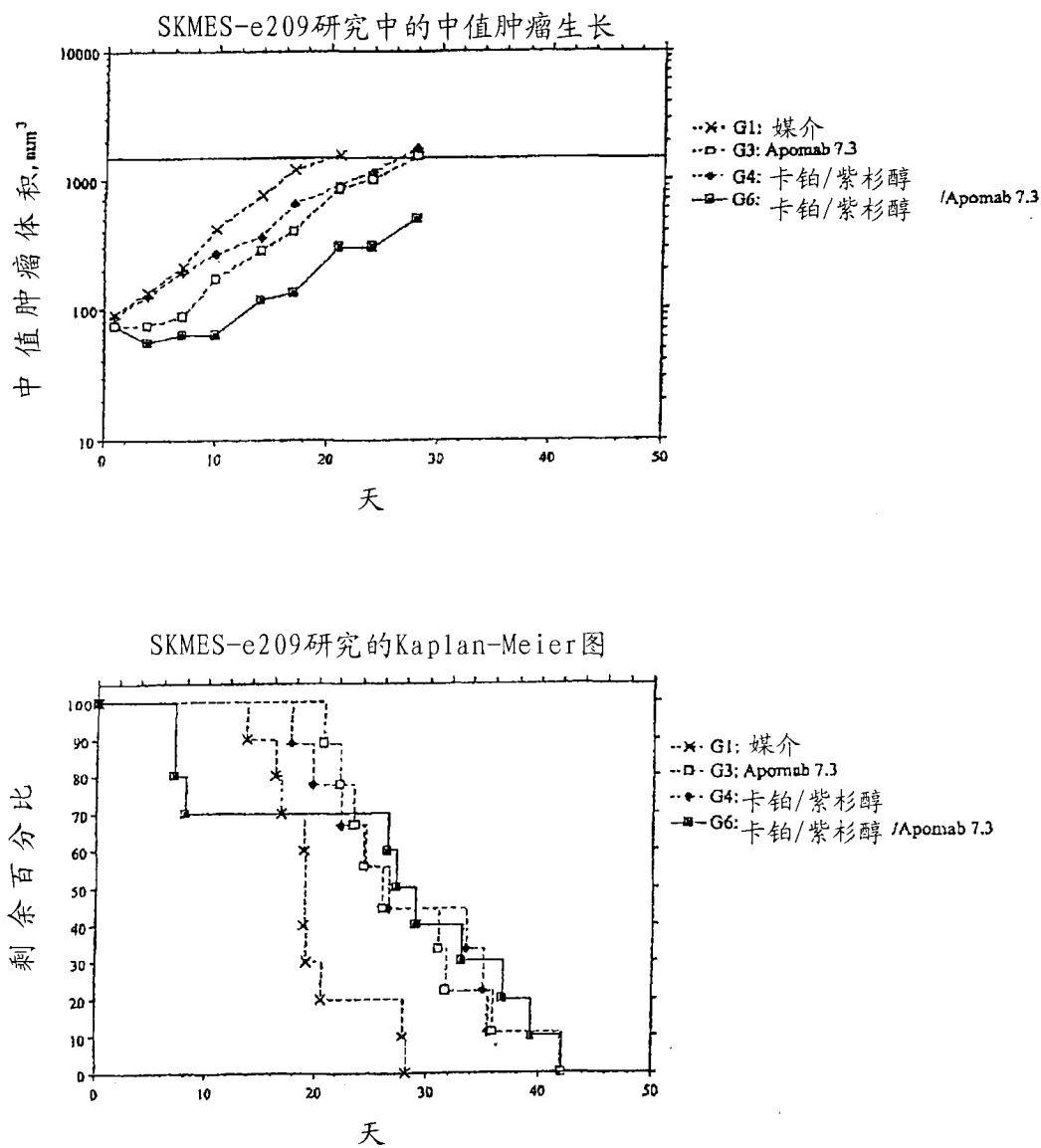


图 36

Colo205-e23研究中用BY2、BY3或BY4治疗的小鼠的组中值肿瘤生长曲线
和Kaplan-Meier图

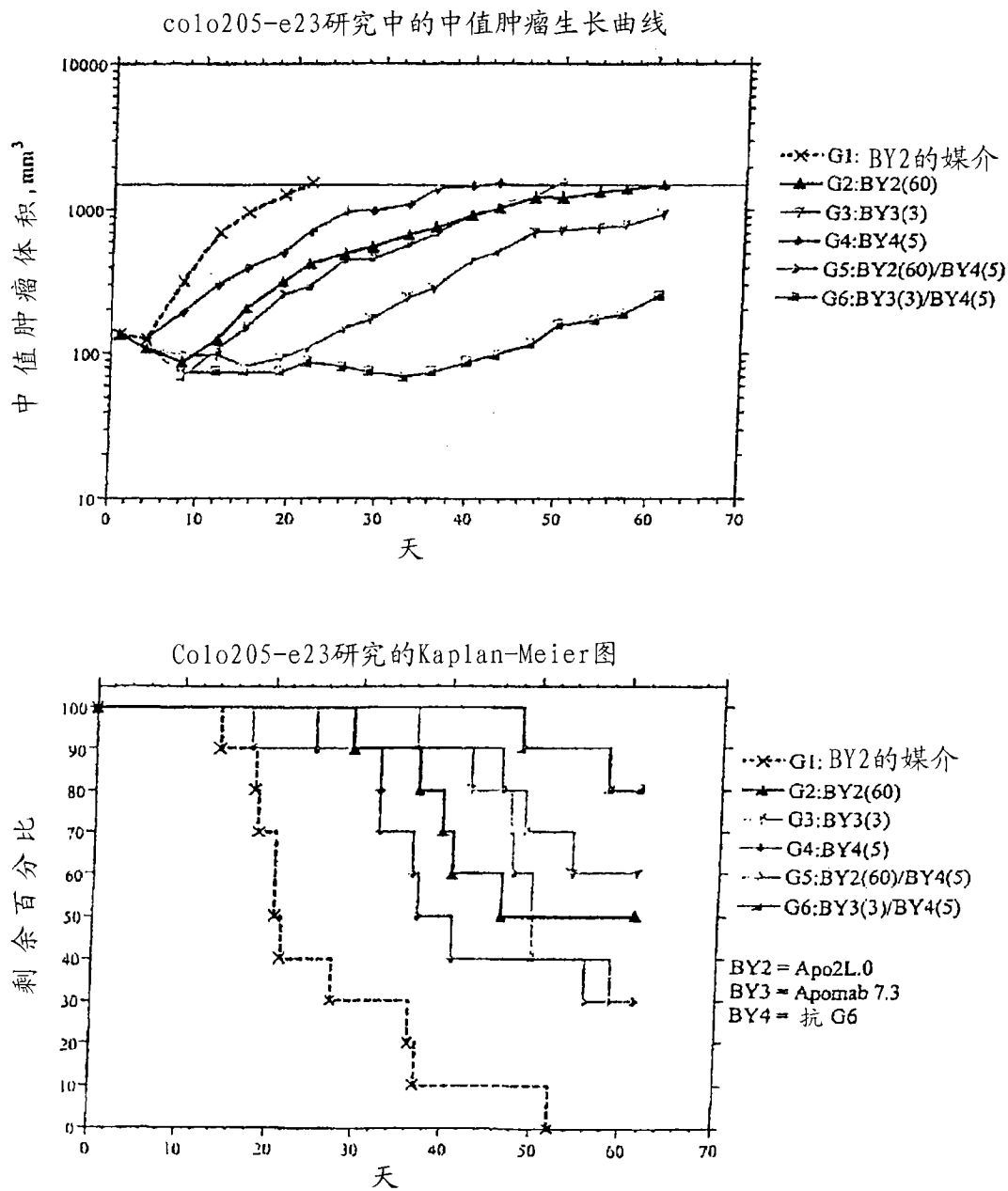


图 37