

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03806403.0

[51] Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 11 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1283662C

[22] 申请日 2003.3.12 [21] 申请号 03806403.0

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 21 [33] US [31] 60/367,054

[32] 2002. 9. 10 [33] US [31] 60/409,768

[86] 国际申请 PCT/US2003/006155 2003.3.12

[87] 国际公布 WO2003/079750 英 2003.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.20

[71] 专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 J·S·兰卡斯特

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 徐雁漪

权利要求书 2 页 说明书 47 页

[54] 发明名称

拮抗性抗 hFAS 配基人类抗体及其片段

[57] 摘要

本发明公开了特异地与人类 Fas 配基(hFasL)结合的人类抗体,在优选的情况下该人类抗体为重组人类抗体。这些抗体对于 hFasL 具有高亲合性,对 hFasL 解离具有低脱离速率并且在体内和体外中和 Fas 配基活性。本发明的抗体可为全长抗体或其抗原结合部分。本发明的抗体或者抗原结合部分可用于对 Fas 配基活性进行中和,例如,在患有某种失调的患者体内,该失调中 hFas 配基活性具有伤害性。用于表达该重组抗 hFasL 人类抗体的核酸、载体和宿主细胞以及用于合成该重组人类抗体的方法也被本发明涵盖。

1. 一种分离的抗 hFasL 人类抗体或其抗原结合部分，其含有轻链可变区（LCVR）和重链可变区（HCVR），其中 LCVR 含有 SEQ ID NO:2，并且其中 HCVR 含有 SEQ ID NO:10。

2. 一种分离的抗 hFasL 人类抗体或其抗原结合部分，其含有轻链可变区（LCVR）和重链可变区（HCVR），其中 LCVR 含有 SEQ ID NO:2，并且其中 HCVR 含有 SEQ ID NO:18。

3. 权利要求 1 或 2 的分离的抗体，该抗体具有 IgG1 重链恒定区。

4. 权利要求 1 或 2 的分离的抗体，该抗体具有 IgG4 重链恒定区。

5. 权利要求 1 或 2 的分离的抗原结合部分，该抗原结合部分为 Fab 片段。

6. 权利要求 1 或 2 的分离的抗原结合部分，该抗原结合部分为 F(ab')₂ 片段。

7. 权利要求 1 或 2 的分离的抗原结合部分，该抗原结合部分为单链 Fv 片段。

8. 一种分离的核酸分子，其含有一种多核苷酸，该多核苷酸编码权利要求 1-7 中任一项的抗 hFasL 人类抗体或其抗原结合部分。

9. 一种载体，其含有权利要求 8 的核酸分子。

10. 权利要求 9 的载体，其中载体为表达载体。

11. 一种宿主细胞，其含有权利要求 9 或 10 的载体。

12. 一种药物组合物，该药物组合物含有权利要求 1-7 中任一项的抗体或其抗原结合部分以及药学可接受的载体。

13. 权利要求 1-7 中任一项的抗体或其抗原结合部分在制备治疗或预防当中 FasL 活性是有害的失调的药物中的应用。

14. 权利要求 13 的应用，其中失调选自：全身炎症反应综合征、败血症、多器官功能障碍综合征、急性呼吸窘迫综合征、

严重败血症、外伤、移植物对抗宿主疾病、与器官移植相关的器官排斥、多发性硬化、特发性肺纤维变性、骨关节炎、炎症性肠病、Crohn's 病、溃疡性结肠炎、急性心肌梗塞、心肌病、心脏再灌注损伤、糖尿病、癌症、人类免疫缺陷病毒、流感病毒、肝失调，包括但不限于急性病毒性乙肝或丙肝、慢性丙肝病毒、慢性乙肝病毒、酒精性肝炎、肝硬化；以及肾脏失调。

15. 由杂交瘤所产生的人类抗体，所述杂交瘤选自保藏号为 ATCC PTA-4017 的杂交瘤和保藏号为 ATCC PTA-4018 的杂交瘤。

16. 一种药物组合物，该组合物含有权利要求 15 中的分离的人类抗体，以及药学可接受的载体。

拮抗性抗 hFAS 配基人类抗体及其片段

背景技术

- 5 Fas 配基 (“FasL”) 是一种蛋白质, 该蛋白质具有诱导表达 Fas 抗原 (“Fas”) 的细胞的细胞凋亡的活性。表达 Fas 抗原的细胞的细胞凋亡据信是通过 Fas 与 FasL 在细胞表面的结合而诱导的, 导致细胞凋亡信号通过 Fas 抗原传递到细胞。人类、小鼠和大鼠来源的 FasL 的核酸和蛋白质序列披露于美国专利 6,348,334 (在此引为参考) 中。
- 10 人类 Fas 配基 (“hFasL”) 为一种 40kDa 的氨基酸的 II 型膜结合蛋白, 该蛋白属于 TNF 家族。膜结合的 FasL 可通过金属蛋白酶进行切割以产生可溶性 FasL, 该蛋白主要为非共价连接的同三聚体 (Mariani, *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25:2303-7(1995); Kayagaki, *et al.*, *J. Exp. Med.* 182:1777-83(1995); Tanaka, *et al.*, *EMBO* 14(6):1129-35(1995))。可溶性 FasL 与膜结合的 FasL 相比表现出较低的细胞毒性 (Nagata, *Annu. Rev. Genet.* 33:29-55(1999))。
- 15

FasL 主要在被激活的 T 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞上表达, 而 Fas 在多种类型的细胞上表达 (Hanabuchi, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4930-4(1995); Suda, *et al.*, *J. Immunol.* 154:3806-13(1995); Arase, *et al.*, *J. Exp. Med.* 181:1235-8(1995))。Fas-FasL 信号转导通路在通过诱导细胞凋亡对免疫反应的调节中很重要。近来 FasL 据报道为嗜中性细胞的一种强力的化学诱导剂, 这提示了该分子的炎症前功能。该 Fas-FasL 信号转导通路还已经牵涉入了多种疾病的发生, 包括自体免疫疾病、肾脏失调、败血症、病毒性肝炎、HIV、流感和移

20

25 植物抗宿主疾病 (例见, Krammer *et al.*, *Immunol. Rev.* 142:175-91(1994); Nagata and Golstein, *Science* 267:1449-56(1995); Yagita, *et al.*, *Immunol. Rev.* 146:223-39(1995); Elovaara, *et al.*, *Acta Neuropathologica*, 98(4):355-62(1999); Leroy, X. *et al.*, *APMIS*, 109(6):469-73, 2001)。

含有小鼠抗体序列的 hFasL 的抗体, 以及具有人类抗体序列部分的杂合抗体种类, 已经有所描述 (例见, 国际专利出版物 No. WO95/18819 以及美国专利 6,114,507 和 6,348,334 以及 6,096,312, 在

30

此引为参考)。但是,对于杂合抗体(chimeric antibody)的应用仍然存在免疫原性的问题。通过重组 DNA 技术产生人源化抗体提供了不确定的结果,包括具有不可预知的结合亲合性的抗体。美国专利 6,348,334 非描述性地披露了针对 FasL 的抗体,但是,它并没有具体地描述这样的抗体的结构特征。

本文所限定的人类抗体出于多种原因而对于用于人类治疗的非人类抗体和人源化杂合抗体具有优势。一种人类单克隆抗体,即,一种完全为人类的抗体,其在人类体内诱导免疫反应的可能性低于含有非人类部分的抗体。进一步,人类抗体在人体内被视作为“外来”抗体的可能更小。这将导致人类抗体从机体内清除的速度慢于非人类或者部分人类抗体。因此,人类抗体被给药的剂量或者频度可低于非人类或者部分人类抗体。

为使交叉物种反应性的可能降至最低,存在着对抗 FasL 人类抗体的需求,尤其是抗人类 FasL 的人类抗体,该抗体具有对 FasL 的高亲合性结合以及在体外和体内破坏或者拮抗 Fas-FasL 信号转导通路活性的能力。本申请披露了医疗上有用的人类抗体及其抗原结合部分,该抗体针对 hFasL 并且特征在于与 hFasL 多肽的高亲合性结合、缓慢的解离动力学以及对 hFasL 多肽相关的至少一种体外和/或体内活性进行破坏或者拮抗的能力。

²⁰ **发明内容** 本发明提供了分离的抗 hFasL 人类抗体及其抗原结合部分。本发明的抗体特征在于与 hFasL 多肽的高亲合性结合、缓慢的解离动力学以及对 hFasL 多肽相关的至少一种体外和/或体内和/或原位活性进行拮抗的能力。

本发明提供了一种分离的抗 hFasL 人类抗体及其抗原结合部分,它包括至少一种多肽,在优选的情况下包括两种多肽,所述多肽具有选自 SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 和 24 中所示的序列。在一个优选的实施方案中,本发明提供了一种被分离的抗 hFasL 人类抗体及其抗原结合部分,它包括一种轻链可变区域(LCVR),该区域包括一种多肽,该多肽具有 SEQ ID NO:2 所示的序列。在更为优选的实施方案中,本发明提供了一种被分离的抗 hFasL 人类抗体及其抗原结合部分,它包括一种轻链可变区,该区含有一种

具有 SEQ ID NO:2 所示的序列的多肽，并且该抗体或其部分还进一步包括一种重链可变区（HCVR），该区含有一种具有 SEQ ID NO:10 所示的序列的多肽。在另一个优选的实施方案中，本发明提供了一种被分离的抗 hFasL 人类抗体及其抗原结合部分，它包括一种轻链可变区，该区含有一种具有 SEQ ID NO:2 所示的序列的多肽，并且该抗体或其部分还进一步包括一种重链可变区（HCVR），该区含有一种具有 SEQ ID NO:18 所示的序列的多肽。在另一个优选的实施方案中，本发明提供了一种分离的抗 hFasL 人类抗体及其抗原结合部分，它包括至少一种多肽，在优选的情况下至少 2、3、4、5 或者 6 种多肽，这些多肽具有在 SEQ ID NO: 4、6、8、12、14、16、20、22 和 24 中所示的序列，其中所述的多肽在优选的情况下在所述的抗体中处于与本文表 1、2 或者 3 所示相同的 CDR 位置上。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种分离的核酸分子，该核酸分子含有一种多核苷酸，该核苷酸编码一种抗 hFasL 抗体或其抗原结合部分，该抗体及其片段包括至少一种多肽，在优选的情况下包括两种多肽，该多肽具有一种序列，该序列选自 SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 和 24 中所示的序列。在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种被分离的核酸分子，该核酸分子含有一种编码一种抗 hFasL 抗体或其抗原结合部分的多核苷酸，该抗体或其部分含有 SEQ ID NO:2 的序列。在一个更为优选的实施方案中，本发明提供了一种被分离的核酸分子，该核酸分子含有一种编码一种抗 hFasL 抗体或其抗原结合部分的多核苷酸，该抗体或其部分含有 SEQ ID NO:2 和 10 的序列或者含有 SEQ ID NO:2 和 18 的序列。在另一个实施方案中，本发明提供了一种被分离的核酸分子，该核酸分子含有一种编码一种抗 hFasL 抗体或其抗原结合部分的多核苷酸，该抗体或其部分含有至少一种多肽，在优选的情况下至少 2、3、4、5 或者 6 种多肽，这些多肽具有在 SEQ ID NO: 4、6、8、12、14、16、20、22 和 24 中所示的序列，其中所述的多肽在优选的情况下在所述的抗体中处于与本文表 1、2 或者 3 所示相同的 CDR 位置上。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种分离的核酸分子，该核酸分子含有一种多核苷酸，该核苷酸编码一种抗 hFasL 抗体或其抗原

结合部分，该核苷酸含有至少一种多核苷酸，在优选的情况下含有至少两种多核苷酸，该核苷酸具有的序列选自 SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 和 13 所示的序列。在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种分离的核酸分子，该核酸分子含有一种多核苷酸，该核苷酸编码一种抗 hFasL 抗体或其抗原结合部分，该核苷酸具有 SEQ ID NO: 1 所示的序列。在一个更为优选的实施方案中，本发明提供了一种分离的核酸分子，该核酸分子含有一种多核苷酸，该核苷酸编码一种抗 hFasL 抗体或其抗原结合部分，该核酸所包括的一些多核苷酸具有 SEQ ID NO:2 和 10 的序列或者含有 SEQ ID NO:2 和 18 的序列。在一个更为优选的实施方案中，本发明提供了一种分离的核酸分子，该核酸分子含有一种多核苷酸，该核苷酸编码一种抗 hFasL 抗体或其抗原结合部分，该核苷酸含有至少一种多核苷酸，在优选的情况下含有至少 2、3、4、5 或者 6 种多核苷酸，这些核苷酸具有选自 SEQ ID NO: 3、5、7、11、13、15、19、21 和 23 所示的序列，其中所述的多核苷酸编码一种多肽，该多肽在优选的情况下在所述的抗体中处于与本文表 1、2 或者 3 所示相同的 CDR 位置上。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种载体，该优选的情况下为一种重组表达载体，该载体含有本发明的一种多核苷酸。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种宿主细胞，该细胞中被引入了本发明的载体，在优选的情况下该载体为本发明的重组表达载体。

在另一个实施方案中，本发明提供了宿主细胞，在该宿主细胞中本发明的载体完整地或者部分地整合进入了该宿主细胞染色体，在优选的情况下该载体为本发明的重组表达载体。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种合成抗 hFasL 的人类抗体或者其抗原结合部分的方法，该方法包括在培养基中培养本发明的宿主细胞从而使本发明的抗 hFasL 的人类抗体或者其抗原结合部分在该细胞中表达。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种用于制备本发明的多肽，即，制备抗 hFasL 的人类抗体或者其抗原结合部分的方法，该方法包括培养本发明的适当的宿主细胞以及纯化所述的多肽，该宿主细

胞含有本发明的载体，该培养所进行的条件促进了该多肽的表达。预期期(being contemplated)该纯化可从宿主细胞中进行或者从该宿主细胞所生长的培养基中进行，或者从两者中进行。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种用于抑制 hFasL 活性的方法，该方法包括将 hFasL 与本发明一种抗 hFasL 人类抗体相接触(或其抗原结合片段)。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，该组合物含有本发明一种抗 hFasL 的人类抗体或者其抗原结合片段。预期本发明的药物组合物可含有不止一种本发明的抗 hFasL 人类抗体。

10 本发明的药物组合物可进一步含有药学可接受的载体。

本发明还包括一种用于中和 FasL 活性的方法以及一种治疗或者防止失调的方法，在该失调中 FasL 活性是有害的，该方法包括向有需要的治疗对象递送一种医疗有效量的本发明的药物组合物。在优选的实施方案中，FasL 活性有害的失调为全身炎症反应综合征、败血症、多器官功能障碍综合征、急性呼吸窘迫综合征、严重败血症、外伤、移植物对抗宿主疾病、与器官移植相关的器官排斥、多发性硬化、特发性肺纤维变性、骨关节炎、炎症性肠病、Crohn's 病、溃疡性结肠炎、急性心肌梗塞、心肌病、心脏再灌注损伤、糖尿病、癌症(在优选的情况下的癌症类型是以表达或者过表达 FasL 作为规避免疫反应的机制；预期癌症类型包括乳腺癌、恶性黑素瘤、卵巢癌、结肠癌、NSCLC、淋巴瘤和肝细胞恶性肿瘤，但不限于这些)、人类免疫缺陷病毒、流感病毒、肝失调，包括急性病毒性乙肝和丙肝、慢性丙肝病毒、慢性乙肝病毒、酒精性肝炎、肝硬化，但不限于这些，或者肾脏失调，包括慢性肾病、急性肾病和糖尿病性肾病，但不限于这些。

25 在另一个实施方案中，本发明提供了一种人类抗体以及含有该人类抗体的组合物，该抗体和组合物通过杂交瘤而产生，该杂交瘤在美国典型培养物保藏中心，Manassas, Virginia 保藏为 ATCC PTA-4017 或者 ATCC PTA-4018。

本发明并不限于下文所描述的特定实施方案，因为可以作出这些特定实施方案的变体而且仍然属于附上的权利要求的范围。

抗体为一种免疫球蛋白分子，该分子包括四条肽链，两条重(H)

链（全长约 50-70kDa）以及两条轻（L）链（全长约 25kDa）通过二硫键相连接。轻链分为 κ 和 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 和 ϵ ，并且以此将抗体同型定义分别为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。每条重链包括重链可变区（简称 HCVR）和重链恒定区。IgG、IgD 和 IgA 的重链恒定区包括三个结构域（CH1、CH2 和 CH3）；IgM 和 IgE 的重链恒定区包括四个结构域（CH1、CH2、CH3 和 CH4）。每条轻链包括一个轻链可变区（简称 LCVR）和一个轻链恒定区。该轻链恒定区包括一个结构域，CL。该 HCVR 和 LCVR 区域可被再分为超变区域，名为互补决定域（CDR），该区域被较为保守的区域分隔，名为框架区（FR）。每个 HCVR 和 LCVR 包括三个 CDR 和四个 FR，从氨基末端到羧基末端如下排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。各个区域的氨基酸的排定根据众所周知的惯例进行（Kabat, “Sequences of Protein of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991); Chothia, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-17(1987); Chothia, *et al.*, *Nature* 32:878-83(1989))。抗体与特定抗原结合的功能性很大程度上由 CDR 所决定。

本文所使用的术语“抗体”指的是单克隆抗体本身。单克隆抗体可为人类抗体、杂合抗体和/或人源化抗体。单克隆抗体可为人类抗体、杂合抗体和/或人源化抗体的 Fab 片段、Fab' 片段或者 F(ab')₂ 片段。进一步，单克隆抗体可为单链 FV 片段。

本文所使用的术语“人类抗体”为（i）一种完整抗体，（ii）一种基本完整的抗体，（iii）抗体的一个含有抗原结合位点的部分或者（iv）抗体的一部分，该部分含有 Fab 片段、Fab' 片段或者 F(ab')₂，无论所述的抗体是否在人类细胞中产生，这些片段具有可变区和恒定区，这些区域由人类种系的免疫球蛋白区域中的核酸序列信息所编码，或者处于其组合和/或突变形式。术语“人类抗体”还包括一种人类抗体，该抗体经工程处理而呈单链 FV 片段的形式。

含有至少一种人类 Fc、FR 或者 CDR 区域的杂合、人源化或者 CDR 植入抗体并非本文所指的人类抗体。

术语“hFasL”指的是人类 Fas 配基，这是在 Suda, *et al.*, *Cell* 75:1169-78(1993)中所描述的配基的肿瘤坏死因子家族一个成员。

hFasL 的功能在 Krammer *et al.*, *Immunol. Rev.* 142:175-91(1994); Nagata and Golstein, *Science* 267:1449-56(1995)以及 Yagita, *et al.*, *Immunol. Rev.* 146:223-39(1995)中有进一步的描述。术语“Fas 配基”意在包括 hFasL 以及来自其它物种的 hFasL 类似物。术语“hFasL”和“FasL”意在包括通过标准重组表达方法或者商业购得 (Alexis® Biochemicals, 目录号#522-001) 的形式以及合成产生的形式。

术语“可溶”在于 FasL 一起使用时指的是“膜相关”或者“膜结合”形式的 FasL 的一种经切割的形式。可溶的 FasL 描述了含有膜结合 FasL 的胞外结构域的至少一个部分的可溶片段。可溶 FasL 通过金属蛋白酶在 FasL 的胞外结构域的特异性位点进行切割而产生, 生成了一种可溶性分子 (Hohlbaum, *et al.*, *J. Exp. Med.* 191(7):1209-20(2000); Tanaka, *et al.*, *Nat. Med.* 2(3):317-22(1996)和 Kayagaki, *et al.*, *J. Exp. Med.* 182(6):1777-83(1995))。与膜结合形式类似, 可溶性 FasL 能够通过结合 Fas 而诱导细胞凋亡。

短语“生物特征(property)”或者“生物特性(characteristic)”或者术语“活性”或“生物活性”在相关于本发明的抗体或者抗体片段时在本文中可以互换, 并且包括, 表位亲合性和特异性(例如, 结合 hFasL 的抗 hFasL 人类抗体)、在体内或者体外拮抗目的多肽的活性(例如 FasL 生物活性)的能力, 该抗体的体内稳定性以及该抗体的免疫原性特征。但不限于这些。该领域所承认的抗体的其它可鉴定生物特性或者特征包括, 例如, 交联反应性(即, 一般来说与目的多肽的非人类类似物或者与其它蛋白质和组织之间的交联反应性)以及在哺乳类细胞中保持蛋白质的高表达水平的能力。上述这些特征或者特性可使用领域所承认的工艺进行观察或者测量, 这些工艺包括, ELISA、竞争 ELISA、BIAcore®表面等离子共振(surface plasmon resonance)分析、体内和体外中和分析(例如实施例 1、2 和 3)以及使用来自不同来源, 例如人类、灵长类或者根据需要的其它来源的组织进行的免疫组织化学, 但不限于这些。

本文所使用的术语“表位”指的是蛋白质的一部分, 该部分被抗体所结合。“免疫原性表位”被定义为蛋白质的一部分, 当完整的蛋白质是免疫原时该部分引起某种抗原反应。例见, Geysen, *et al.*, *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002(1984)。本文所使用的抗体的“抗原结合部分”指的是抗体的一种区域，当抗体含有该抗原结合部分时，该区域与该抗体所结合的表位进行相互作用或者结合。该抗原结合部分可能不以该全长抗体的方式存在，并且无论其是否仍然同某种表位相结合，它仍被视作为该抗体的抗原结合表位。

术语“抑制”或者“进行抑制”指的是对被抑制的过程或者程度进行中和、拮抗、压制、阻止、限制、减缓、扰乱、制止或者逆转，该过程或者程度包括，例如，某种活性、疾病或者症状，但不限于这些。

当与核酸或者蛋白质（例如，抗体）相关使用时的术语“分离的”指的是一种被鉴定并且与至少一种污染物（分别为核酸或者蛋白质）进行分离的核酸序列或者蛋白质，该污染物通常在其天然来源中与之相结合。被分离的核酸或者蛋白质以一种有别于天然情况下的形式或者模式存在。与之对比，未分离的核酸或者蛋白质被发现处于其天然存在下的状态。在优选的情况下，“分离的抗体”基本上不含具有不同的抗原特异性的其它抗体（例如，特异地与 hFas 配基相结合的被分离抗体基本上不含特异地与除 hFas 配基多肽之外的抗原相结合的抗体）。

本文所使用的术语“纯化的”或者“进行纯化”指的是将污染物从目的成分中去除的任何方法的结果，该目的成分的例子如蛋白质或者核酸。该样品中被纯化的成分的百分比由此而有所提高。在一个优选的实施方案中，该抗体应被纯化至（1）根据 Lower 法测定抗体的质量超过 95%，在优选的条件下质量超过 99%，以及（2）根据使用考马斯蓝染色进行的还原或者非还原条件下 SDS-PAGE 达到均一，或者在优选的情况下根据银染达到均一。

术语“Kabat 编号”或者“Kabat 标记”在本文可互换使用。这些该领域所承认的术语指的是一种对氨基酸残基进行编号的系统，这些氨基酸残基比抗体的重链和轻链可变区中的其它氨基酸残基更为可变（即，超变）（Kabat, *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93(1971); Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-

3242(1991))。

一种多核苷酸当它被置于与另一种多核苷酸的功能性关系之中时为“可操作地连接”。例如，用于前序列或者分泌引导物的 DNA 在其被表达作为参与该多肽的分泌的一种前蛋白的情况下被可操作地连接于用于该多肽的 DNA；一种启动子或者增强子在其影响某种编码序列的转录的情况下被功能性地连接于该编码序列。

在缺乏内源免疫球蛋白生产的情况下，能够通过免疫化而产生人类抗体的转基因动物（例如鼠）可在本发明中进行应用。人类种系的免疫球蛋白基因排列向这样的种系突变鼠中的转入将使人类抗体通过抗原激发而产生。例见，Jakobovits, *et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-5(1993); Jakobovits, *et al Nature* 362:255-8(1993); Bruggeman *et al., Year In Immun.* 7:33(1993); *Nature* 148:1547-53(1994), *Nature Biotechnology* 14:826(1996); Gross *et al., Nature* 404:955-9(2000)以及美国专利 5,877,397; 5,874,299; 5,814,318; 5,789,650; 5,770,429; 5,661,016; 5,633,425; 5,625,126; 5,569,825 以及 5,545,806。

人类抗体还可以在噬菌体展示文库中产生（Hoogenboom and Winter, *J. mol. Biol.* 227:381-8(1992)）。Cole 等人以及 Boerner 等人的工艺同样属于可用于人类单克隆抗体制备的工艺（Cole, *et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77(1985); 以及 Boerner, *et al., J. Immunol.* 147:86-95(1991)）。

重组人类抗体也可进行体外突变（或者当使用经过人类 Ig 序列转基因的动物时，进行体内体细胞突变），由此该重组抗体的 HCVR 和 LCVR 区域的氨基酸序列尽管来自于与人类种系 HCVR 和 LCVR 序列相关的序列，但可能在天然情况下并不存在于体内的该人类抗体种系库存之中。

涉及到抗 FasL 抗体的术语“中和”或者“拮抗”或者短语“拮抗（中和）FasL 活性的抗体”或者“对 FasL 进行拮抗（中和）”意指一种抗体或其抗原结合片段，该抗原或其片段与 FasL 进行结合或者接触导致了 FasL 多肽所诱导的某种生物活性的抑制。FasL 生物活性的抑制可通过测量 FasL 生物活性的一种或者多种体内或者体外指征进行测定，这些指征包括，FasL 介导的细胞内信号转导的诱导、

细胞凋亡、嗜中性细胞趋化或者 FasL 受体结合分析中受体结合的抑制，但不限于这些。FasL 生物学活性的这些指征可通过该领域所已知的一种或者多种体外或者体内分析而进行估测。在优选的情况下，一种抗体对 FasL 活性进行拮抗或者中和的能力通过 Fas-FasL 介导的细胞凋亡的抑制而进行估测。

本文中可互换使用的术语“个体”、“对象”和“患者”指的是哺乳动物，该哺乳动物包括，鼠、猿、人类、哺乳类养殖动物、哺乳类竞技动物以及哺乳类宠物，但不限于这些。

本文所使用的术语“ K_{off} ”指的是一种抗体从抗体 / 抗原复合物中解离的分离速率常数。抗 hFasL 人类抗体的解离速率常数 (K_{off}) 可根据实施例 3 的描述通过 BIAcore[®]表面等离子共振进行测定。通常情况下，BIAcore[®]分析对配基(固定化于生物传感器表面的重组 FasL 多肽)与分析物(溶液中的抗体)之间的实时结合作用使用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) 进行测量。SPR 还可以通过对该分析物进行固定化(抗体于生物传感器基质上)而将该配基置于溶液中而进行实施。抗原 / 抗体复合体的低分离速率指的是 10^{-3} 秒⁻¹ 或者更低的 K_{off} ，在优选的情况下为 10^{-4} 秒⁻¹ 或者更低，在更为优选的情况下为 10^{-5} 秒⁻¹ 或者更低。

本文所使用的术语“ K_D ”指的是某种特定的抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。出于本发明的目的， K_D 可根据实施例 3 所示进行测定。与特定的表位结合具有高亲合力和 / 或高亲合性的抗体具有 10^{-7} M 或者更低的 K_D ，优选的情况下 10^{-8} M 或者更低，更为优选的情况下 10^{-9} M 或者更低。

术语“载体”包括一种核酸，该核酸能够转移另一种与其连接的核酸，该术语包括质粒和病毒载体，但不限于这些。特定的载体能够在其所引入的宿主细胞中自行复制，而其它的载体能够通过引入宿主细胞而被整合进入该宿主细胞的基因组并且因此而与该宿主基因组一同进行复制。进一步，特定的载体能够引导与其可操作地连接的基因的表达。本文中这样的载体被称为“重组表达载体”(或者简称“表达载体”)。

术语“宿主细胞”包括个体细胞或者细胞培养物，该细胞或者培

养物可作为或者已经成为本发明的任何重组载体或者被分离多核苷酸的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代，由于天然、偶然或者人为主动地突变和/或变化，这些后代无须与来源的亲本细胞完全一致（在形态学上或者总 DNA 互补性上）。含有本发明的重组载体的宿主细胞还可被称为“重组宿主细胞”。在优选的情况下该宿主细胞为细菌或者哺乳类；如果是哺乳类，该细胞在优选的情况下为 CHO、COS、NSO 或 293 细胞。

本发明涉及到人类单克隆抗体，该抗体特异于 hFasL 多肽、其抗原性片段或者一种 hFasL 活性并且对其中和。所披露的还有抗体重链和/或轻链片段，该片段高度地特异于 hFasL 多肽、其抗原性片段或者表位、或者一种 hFasL 活性并且对其中和，在优选的情况下该活性为 hFasL 与 Fas 的结合。结合 FasL 的高特异性使该抗 hFasL 人类抗体、其抗原结合部分以及具有类似特异性的人类单克隆抗体对于 Fas-FasL 相关疾病具有免疫疗效。

在一个实施方案中，本发明提供了一种被分离的抗 hFasL 人类抗体或其抗原结合片段，该抗体或者片段含有至少一种选自 SEQ ID No.: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 和 24 的氨基酸序列，在优选的情况下含有至少两种。SEQ ID No.: 4、6、8、12、14、16、20、22 和 24 中所示的序列在存在于本发明的抗体之中时被优选地位于表 1、2 和 3 所描述相同的本发明的抗体 CDR 中，并且与 SEQ ID NO:2（对于 SEQ ID NO: 4、6 和 8）、SEQ ID NO:10（对于 SEQ ID NO: 12、14 和 16）和 SEQ ID NO:18（对于 SEQ ID NO: 20、22 和 24）相同地定位。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种被分离的抗 FasL 人类抗体或其抗原结合部分，该抗体与一种可溶性 FasL 多肽进行结合，结合的平衡常数 K_D 为 $2 \times 10^{-7}M$ 或者更低，较为优选的情况下 K_D 为 $2 \times 10^{-8}M$ 或者更低，更为优选的情况下 K_D 为 $2 \times 10^{-9}M$ 或者更低（根据通过固相 BIAcore[®]表面等离子共振在室温下的测定），该抗体与 FasL 多肽以低 K_{off} 速率常数进行解离并且具有拮抗 FasL 多肽活性的能力。

本发明的另一个实施方案供了一种被分离的抗 FasL 人类抗体或

其抗原结合部分, 该抗体在体外中和分析中抑制 FasL 介导的细胞凋亡, 其对膜结合 FasL 的 IC_{50} 为 10nM 或者更低 (或者为 9nM 或更低、7 nM 或更低、6 nM 或更低、或者 5 nM 或更低)、或者对可溶 FasL 的 IC_{50} 为 0.2nM 或更低 (或者为 0.19nM 或更低、0.18nM 或更低、0.17nM 5 或更低或者 0.15nM 或更低)。本发明的该抗原结合部分可单独存在或者存在于 hFasL 人类抗体之中。在一个更为优选的实施方案中, 该被分离的抗 FasL 人类抗体与可溶 FasL 多肽进行结合的平衡解离常数 K_D 为 $1 \times 10^{-7}M$ 或者更低, 较为优选的情况下 K_D 为 $1 \times 10^{-8}M$ 或者更低, 更为优选的情况下 K_D 为 $1 \times 10^{-9}M$ 或者更低 (根据通过固相 10 BIAcore® 表面等离子共振在室温下的测定)。如实施例 1、2 和 3 所述, 符合上述动力学和中和标准的抗 FasL 人类抗体包括 3E1 和 4G11 抗体。

本发明的最为优选的抗 hFasL 人类抗体是在本文中被称作 3E1 的抗体。该 3E1 抗体所具有的 LCVR 和 HCVR 分别含有的多肽具有 SEQ 15 ID NO:2 和 SEQ ID NO:10 所示的序列 (本文表 1 和 3)。编码 3E1 的 LCVR 和 HCVR 示例性的核苷酸序列分别见 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:9。

在另一个实施方案中, 优选的抗 hFasL 人类抗体是在本文中被称作 4G11 的抗体。该 4G11 抗体所具有的 LCVR 和 HCVR 分别含有的 20 多肽具有 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:18 所示的序列 (本文表 2 和 3)。编码 4G11 的 LCVR 和 HCVR 示例性的核苷酸序列分别见 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:17。

在另一个实施方案中, 本发明提供了一种被分离的抗 FasL 人类抗体 Fab 以及一种抗 FasL 人类抗体 $F(ab')_2$ 片段, 这些片段含有一种 25 HCVR, 该 HCVR 含有一种具有 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列的多肽, 并且这些片段进一步含有一种 LCVR, 对于 3E1 和 4G11 各抗体该 LCVR 均含有一种具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的多肽。在另一个实施方案中, 本发明提供了一种被分离的抗 FasL 人类抗体或其抗原结合部分, 该抗体或者部分含有至少 30 一种多肽, 在优选的情况下至少 2、3、4、5 或者 6 种多肽, 这些多肽具有的氨基酸序列选自 SEQ ID No.: 4、6、8、12、14、16、20、22

和 24。在优选的情况下，SEQ ID:4、12 或者 20 所示的氨基酸序列在存在于本发明的抗体中时位于 CDR1。并且，在优选的情况下 SEQ ID:6、14 或者 22 所示的氨基酸序列在存在于本发明的抗体中时位于 CDR2。优选的实施方案提供了一种被分离的抗 FasL 人类抗体或其抗原结合部分，该抗体或者部分在体外中和分析中抑制可溶性 FasL 所诱导的细胞凋亡，其 IC_{50} 为 0.5nM 或者更低，在优选的情况下约为 0.3 或者更低，更为优选的情况下约为 0.15 或者更低；或者该抗体或部分在体外中和分析中抑制膜结合的 FasL 所诱导的增殖或者细胞凋亡，其 IC_{50} 为 10nM 或更低，在优选的情况下为约 9、8、7、6 或者 5nM 或更低。

在另一个实施方案中，本发明还针对产生本文所描述的抗 FasL 人类抗体的细胞系。产生本发明的单克隆抗体的细胞系的分离可以使用该领域所已知的常规筛选工艺完成。一些产生本发明的抗 FasL 人类抗体的细胞系已被保存于 ATCC（美国典型培养物保藏中心）中。分泌人类 IgG4 κ （来自 HuMab-mouse[®]）3E1 的小鼠杂交瘤被分配以参考号码 ATCC PTA-4017，分泌人类 IgG4 κ （来自 HuMab-mouse[®]）4G11 的小鼠杂交瘤被分配以参考号码 ATCC PTA-4018。本发明最为优选的抗 FasL 人类抗体在至少一个超变区内，更为优选的情况下在至少 2、3、4、5 或者 6 个超变区内，具有与一种或者多种上述 ATCC 保存抗体相同或者基本类似的氨基酸序列。

多种宿主表达系统可被用于表达本发明的抗体，这些宿主表达系统包括原核（细菌）和真核表达系统（例如酵母、杆状病毒、植物、哺乳类和其它动物细胞，转基因动物和杂交瘤细胞），以及噬菌体展示表达系统。适当的细菌表达载体的例子为 pUC119（Sfi），适当的真核表达载体的例子为经弱化的 DHFR 选择系统修饰的 pcDNA3.1 载体。其它的抗体表达系统为该领域所已知并且被考虑入本文。该领域中已知多种适当的哺乳类宿主细胞，包括，COS、CHO、NSO 和 293 细胞，但不限于这些。

本发明的一种抗体可通过在宿主细胞中进行免疫球蛋白轻链和重链基因的重组表达而制备。为对一种抗体进行重组表达，使用一种或者多种重组表达载体转染一种宿主细胞，该载体携带编码该抗体的免

疫球蛋白轻链和重链的 DNA 片段，从而使该轻链和重链在该宿主细胞中表达。在优选的情况下，该重组抗体被分泌进入培养该宿主细胞的培养基，该抗体从中进行回收。标准的重组 DNA 方法被用于获得抗体重链和轻链基因、将这些基因引入重组表达载体并且将这些载体引入宿主细胞。这样的标准重组 DNA 方法的描述例见 Sambrook, Fritsch, and Maniatis (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989); 以及 Boss 等人的美国专利 No.4,816,397。

一种被分离的编码 HCVR 区的 DNA 可通过将编码 HCVR 的 DNA 可操作地连接于编码重链恒定区 (CH1、CH2 和 CH3) 的另一 DNA 分子而被转成全长重链基因。人类重链恒定区基因的序列在该领域中已知。例见 Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, US. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242(1991)。含有这些区域的 DNA 片段可通过标准的 PCR 扩增而获得。该重链恒定区可为 Kabat 所描述的 (上文文献) 一种 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或者 IgD 恒定区以及它们的任何同种变体 (allotypic variant)，但在最为优选的情况下为一种 IgG4 或者 IgG1 恒定区。或者，该抗原结合部分可为 Fab 片段、F(ab')₂ 片段或者单链 Fv 片段 (scFv)。对于 Fab 片段重链基因，该编码 HCVR 的 DNA 可被可操作地连接于另一种仅仅编码一个重链 CH1 恒定区的 DNA 分子。

编码 LCVR 区的一种分离的 DNA 可通过将编码 LCVR 的 DNA 可操作地连接于编码轻链恒定区 CL 的另一 DNA 分子而被转成全长轻链基因 (以及 Fab 轻链基因)。人类轻链恒定区基因的序列在该领域中已知。例见 Kabat 的上文文献。含有这些区域的 DNA 片段可通过标准的 PCR 扩增而获得。该轻链恒定区可为一种 κ 或者 λ 恒定区。

为产生一种 scFv 基因，该编码 HCVR 和 LCVR 的 DNA 片段被可操作地连接于编码弹性连接物的另一片段，例如编码氨基酸序列 (Gly₄-Ser)₃ 的片段，从而使该 HCVR 和 LCVR 序列可被表达成为连续的单链蛋白质，其 LCVR 和 HCVR 区域通过该弹性连接物相连。例见, Bird, *et al.*, *Science* 242:423-6(1988); Huston, *et al.*, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 85:5879-83(1988); McCafferty, *et al.*, *Nature* 348:552-4(1990)。

为表达本发明的抗体，如上所述而获得的编码部分或者全长轻链和 / 或重链的 DNA 被插入于表达载体之中，从而使该基因可操作地连接于转录和翻译控制序列。在该背景中，术语“可操作地连接”指的是一种抗体基因被连接进入一种载体，从而使该载体中的转录和翻译控制序列行使其所被预期的对该抗体基因的转录和翻译进行调控的功能。该表达载体和表达控制序列经选择而适应于所使用的宿主细胞。该抗体轻链基因和该抗体重链基因可被插入不同的载体或者在更典型的情况下两者被插入同一载体。该抗体基因通过标准方法被插入该表达载体。另外，该重组表达载体可编码一种信号肽，该信号肽辅助了该抗 hFasL 人类抗体轻链和 / 或重链从宿主细胞中的表达。该抗 hFasL 人类抗体轻链和 / 或重链基因可被克隆进入该载体中，从而使该信号肽与该抗体链基因的氨基末端进行框架内可操作地连接。该信号肽可为一种免疫球蛋白信号肽或者一种异源信号肽。

除该抗体的重链和 / 或轻链基因之外，本发明的重组表达载体还携带一些调控序列，这些调控序列控制这些抗体链在宿主细胞中的表达。术语“调控序列”意在根据所需包括启动子、增强子以及其它的表达控制元件（例如多腺苷酸化信号），这些序列控制了该抗体链基因的转录和翻译。该表达载体的设计，包括调控基因的选择在内，可根据的因素如：待转化的宿主细胞的选择，所需的蛋白质表达的水平。哺乳细胞表达的优选调控序列包括在哺乳细胞内引导高水平蛋白质表达的病毒元件，例如来自细胞巨化病毒(CMV)、猿猴病毒 40(SV40)、腺病毒（例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)）和多瘤病毒的启动子和 / 或增强子。

除该抗体的重链和 / 或轻链基因以及调控序列之外，本发明的重组表达载体还可携带额外的序列，例如调控该载体在宿主细胞中的复制的序列（例如复制起点）以及一种或者多种选择标记基因。该选择标记基因辅助了被转入了该载体的宿主细胞的选择。例如，在典型情况下该选择标记使被转入了该载体的宿主细胞产生对药物的抗性，该药物如 G418、潮霉素或者氨基甲喋呤。优选的选择标记基因包括二氢

叶酸还原酶 (DHFR) 基因 (用于 DHFR 阴性宿主细胞, 使用氨甲喋呤选择 / 扩增)、*noe* 基因 (用于 G418 选择) 以及在 GS 阴性细胞系中使用谷氨酰胺合成酶 (GS) 进行选择 / 扩增。

对于轻链和 / 或重链的表达, 编码轻链和 / 或重链的表达载体通过标准工艺被转染进入一种宿主细胞, 该工艺的例子如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。尽管本发明的抗体在原核或者真核细胞中表达在理论上都是可能的, 优选的情况下为真核细胞, 最为优选的情况下为哺乳类细胞, 因为这些细胞最有可能组装并且分泌折叠适当并且具有免疫活性的抗体。优选的用于表达本发明的重组抗体的哺乳类宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) (包括 DHFR-CHO 细胞, 描述见 Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20(1980), 使用 DHFR 选择标记进行应用, 例如, 根据 Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.* 159:601-21(1982)的描述)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞以及 SP2/0 细胞。当编码抗体基因的重组表达载体被引入哺乳类宿主细胞时, 通过将培养该宿主细胞而产生该抗体, 该培养的时间足以允许该抗体在该宿主细胞中进行表达, 在较为优选的情况下足以允许该抗体分泌进入该宿主细胞所生长的培养基。使用标准的纯化方法从该宿主细胞和 / 或培养及中回收抗体。

宿主细胞还可以被用于产生完整抗体的部分或者片段, 例如 Fab 片段或者 scFv 分子。应当了解, 对上述方法的改动处于本发明的范围之内。例如, 可能需要使用编码本发明抗体的轻链或者重链 (但不同时编码) 的 DNA 转染宿主细胞。重组 DNA 技术还可被用于除去某些或者所有的编码轻链或重链的 DNA 或同时除去两者。由这样的截短 DNA 分子表达的分子也被本发明的抗体所涵盖。

在用于本发明的抗体的重组表达的一个优选的系统中, 同时编码该抗体重链和该抗体轻链的重组表达载体通过磷酸钙截道德转染而被引入 DHFR-CHO 细胞。在该重组表达载体中, 该抗体重链和轻链基因各自被可操作地连接于增强子 / 启动子调控元件 (例如, 来自 SV40、CMV、腺病毒等等的元件, 例如 CMV 增强子 / AdMLP 启动子调控元件或者一种 SV40 增强子 / AdMLP 启动子调控元件) 以进行该基因的高水平表达。该重组表达载体还携带一种 DHFR 基因,

该基因允许对细胞的选择，例如，使用氨基喋呤选择 / 扩增对被该载体转染的 CHO 的选择。被选出的转化子宿主细胞经培养以允许该抗体重链和轻链的表达，并且从该培养基中回收完整抗体。标准的分子生物学工艺被用于制备该重组表达载体、转染该宿主细胞、选择转染子、培养该宿主细胞以及从培养基中回收该抗体。本发明的抗体或其抗原结合片段可在一种经人类免疫球蛋白基因的转基因动物中进行表达（例见，Taylor, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 20:6287-95(1992)）。植物细胞也可经过修饰而产生表达本发明的抗体或其抗原结合部分的转基因植物。

10 考虑到前文，本发明的另一个实施方案涉及核酸、载体以及宿主细胞组合物，这些可被用于本发明的抗体以及抗体部分的重组表达。在优选的情况下，本发明提供了分离的核酸，这些核酸含有一种区域，该区域编码 3E1 或者 4G11 的一种或者多种 CDR 并且在更优选的情况下这些 CDR 在被表达蛋白中所存在的 CDR 位点与它们在抗体 3E1
15 和 4G11 中抗体结构内的 CDR 位点相同。在优选的情况下，本发明提供了被分离的核酸，该核酸含有一种区域，该区域编码 3E1 或 4G11 的重链可变区和 / 或 3E1 或 4G11 的轻链可变区。因此，在一个实施方案中，本发明提供了一种被分离的核酸，该核酸编码一种多肽，该多肽含有 SEQ ID NO:16 所示序列的 3E1 重链 CDR3 和 / 或 SEQ ID
20 NO:14 所示序列的重链 CDR2 的抗体重链可变区，以及 / 或者 SEQ ID NO:12 所示序列的 3E1 重链 CDR1。最为优选的情况下，该被分离核酸编码一种多肽，该多肽含有一种抗体重链可变区，其序列如 SEQ ID NO:10 所示（3E1 的全部 HCVR 区）。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种被分离的核酸，该核酸
25 编码一种多肽，该多肽含有序列如 SEQ ID NO: 24 的 4G11 重链 CDR3 和 / 或序列如 SEQ ID NO: 22 的 4G11 重链 CDR2 和 / 或序列如 SEQ ID NO: 20 的 4G11 重链 CDR1 的重链可变区。更为优选的情况下，该被分离的核酸编码一种多肽，该多肽含有一种抗体重链可变区，其序列如 SEQ ID NO:18 所示（4G11 的全部 HCVR 区）。

30 预期，本发明的抗体中存在的重链和 / 或轻链可含有本发明的 CDR 的多种组合，例如 CDR1 和 CDR2；CDR1 和 CDR3；CDR2 和

CDR3 或者 CDR1、CDR2 和 CDR3。(CDR1 具有 SEQ ID NO: 4、12 或者 20 所示的序列; CDR2 具有 SEQ ID NO: 6、14 或者 22 所示的序列; CDR3 具有 SEQ ID NO: 8、16 或者 24 所示的序列)在优选的情况下,当存在于本发明的抗体中时这些 CDR 序列在本发明的
5 抗体中所位于的 CDR 位置与它们在抗体 3E1 或者 4G11 中的位置相同。据设想这些 CDR 可在本发明的其它抗体中的与抗体 3E1 或者 4G11 所不同的链中存在。但是,最优选的情况下当存在于本发明的抗体中时这些 CDR 序列存在的 CDR 位置和链(轻链或重链)与其在抗体 3E1 或 4G11 相同。

10 在另一个实施方案中,本发明提供了一种被分离的核酸,该核酸编码一种抗体体轻链可变区,该可变区含有 SEQ ID No:2 (即, 3E1 或者 4G11 的 LCVR) 的氨基酸序列。尽管熟练的技术人员应会认同,由于遗传密码的简并性其它的核苷酸序列也可编码 SEQ ID No:2 的氨基酸序列,但该核酸在优选的情况下含有 SEQ ID No:1 的核苷酸序列。
15 该核酸可仅仅编码 LCVR 或者还可编码一种抗体轻链恒定区,该区域可操作地连接于该 LCVR。在一个实施方案中,该核酸为一种重组表达载体。

在另一个实施方案中,本发明提供了一种分离的核酸,该核酸编码一种抗体重链可变区,该可变区含有 SEQ ID No:10 的氨基酸序列
20 (即, 3E1 HCVR)。尽管熟练的技术人员应会认同,由于遗传密码的简并性其它的核苷酸序列也可编码 SEQ ID No:10 的氨基酸序列,但该核酸在优选的情况下含有 SEQ ID No:9 的核苷酸序列。该核酸可仅仅编码该 HCVR 或者还可编码,例如,一种轻链恒定区,该区域可操作地连接于该 HCVR。例如,该核酸可含有 IgG4 或者 IgG1 恒
25 定区。在一个实施方案中,该核酸为一种重组表达载体。

在另一个实施方案中,本发明提供了一种分离的核酸,该核酸编码一种抗体重链可变区,该可变区含有 SEQ ID No:18 的氨基酸序列
(即, 4G11 HCVR)。尽管熟练的技术人员应会认同,由于遗传密码的简并性其它的核苷酸序列也可编码 SEQ ID No:18 的氨基酸序
30 列,但该核酸在优选的情况下含有 SEQ ID No:17 的核苷酸序列。该核酸可仅仅编码该 HCVR 或者还可编码一种轻链恒定区,该区域可

操作地连接于该 HCVR。在一个实施方案中，该核酸为一种重组表达载体。

本发明还提供了同时编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体。例如，在一个实施方案中，本发明提供了一种重组表达载体，该载体

5 编码：

a) 一种抗体重链，该重链具有一种可变区，该可变区含有选自 SEQ ID NO:10 和 18 的氨基酸序列，以及

b) 一种抗体轻链，该轻链具有一种可变区，该可变区含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

10 本发明还提供了一些宿主细胞，该宿主细胞中被引入了本发明的一种或者多种重组表达载体。在优选的情况下，该宿主细胞为一种哺乳类宿主细胞，更为优选的情况下该宿主细胞为一种 CHO 细胞、NS0 细胞或者 COS 细胞。更进一步本发明提供了生成本发明的重组人类抗体的方法，该方法通过在适当的培养基中培养本发明的宿主细胞直至生成了本发明的重组人类抗体。该方法可进一步包括从该培养基、

15 该宿主细胞或者同时从两者中分离该重组人类抗体。

一旦被表达，这些完整抗体、它们的二聚体、单独的轻链和重链或者本发明的其它免疫球蛋白形式可根据该领域中的标准程序进行纯化，这些程序包括硫酸铵沉淀、离子交换、亲和、反向、疏水作用柱

20 层析、凝胶电泳等等。对于药学应用，至少约 90%到 95%的基本纯净的免疫球蛋白是优选的，98 到 99%或者更高的均一度最为优选。一经纯化至所需的均一度或者部分达到所需的均一度，根据本文指导该多肽可随后进行医疗或者预防应用。

本发明的抗体或者抗体片段可被引入药物组合物，该组合物适于

25 对医疗对象进行给药。在典型情况下，该药物组合物含有本发明的抗体或者抗体部分以及药学上可接受的稀释剂、载体和 / 或赋形剂。用于给药的药物组合物经设计而适用于被选取的给药模式以及药学上可接受的的稀释剂、载体和 / 或赋形剂，例如被适当使用的分散剂、缓冲液、表面活性剂、防腐剂、增溶剂、等渗试剂、稳定剂等等。

30 含有本发明的抗 hFasL 人类抗体的药物组合物可通过使用标准的给药工艺对哺乳动物进行给药，该哺乳动物具有与 Fas-FasL 相互作

用相关联的病理发生的危险或者表现出该病理，该给药工艺通过静脉内、腹膜内、皮下、经肺部、透皮、肌间、鼻腔内、口内、舌下或者栓剂给药而进行。

本发明的抗体可被引入一种适于进行胃肠外给药的药物组合物。

- 5 通过静脉内或者腹膜内或者皮下注射进行的周边系统（peripheral system）递送较为优选。用于这样的注射的适当载体是简单明了的并且为该领域所知。

10 这些药物组合物在典型的情况下必须无菌并且在制造和储藏条件下稳定。因此，这些药物组合物可在制成制剂后进行灭菌过滤，或者制备成为微生物学可接受。用于静脉内灌注的典型组合物可具有体积达 250mL 的液体，例如无菌的 Ringer's 溶液，并且抗体浓度为 1 到 100mg/mL 或更多。本发明的医疗药物可全部被冷冻或者冻干用于贮藏，并且在使用前在适当的无菌载体中冲释使用。冻干和冲释可导致不同程度的抗体活性损失（例如，使用传统的免疫球蛋白，IgM 抗体易于比 IgG 抗体的活性损失更高）。可调整剂量而进行补偿。一般情况下，介于 6 到 8 之间的 pH 较为优选。

20 FasL 在与多种疾病相关的病理之中起着关键作用，这些疾病涉及到免疫和炎症因子。因此，含有本发明的一种抗 hFasL 人类抗体的药物组合物可被用于治疗或者防止自体免疫和验证疾病，这些疾病包括，全身炎症反应综合征、败血症、多器官功能障碍综合征、急性呼吸窘迫综合征、严重败血症、外伤、移植物对抗宿主疾病、与器官移植相关的器官排斥、多发性硬化、特发性肺纤维变性、骨关节炎、炎症性肠病、Crohn's 病、溃疡性结肠炎、急性心肌梗塞、心肌病、心脏再灌注损伤、糖尿病、癌症（包括，例如，以表达 FasL 作为规避免疫反应的机制的癌症类型，例如乳腺癌、恶性黑素瘤、卵巢癌、结肠癌、NSCLC、淋巴瘤和肝细胞恶性肿瘤，但不限于这些）、人类免疫缺陷病毒、流感病毒、肝失调，包括急性病毒性乙肝和丙肝、慢性丙肝病毒、慢性乙肝病毒、酒精性肝炎、肝硬化，但不限于这些，或者肾脏失调，包括慢性肾病、急性肾病和糖尿病性肾病，但不限于这些。

30 些。

本发明的一种抗 hFasL 对于治疗至少一种前述失调的应用在此也

被考虑在内，这些失调中 FasL 活性是有害的。另外，本发明的一种抗 hFasL 人类抗体对于一些药物的制造的应用也被考虑在内，这些药物用于治疗至少一种前述的失调，这些失调中 FasL 活性是有害的。

本文所使用的术语“治疗”、“进行治疗”等等指的是获得一种
5 所需的药学和/或医疗效果。该效果可为预防性的，其本义为完全或者部分地组织某种疾病或其症状，并且/或者该效果可为治疗性的，其本义为对某种疾病和/或该疾病引起的不良影响的部分或者完全治愈。本文使用的“治疗”涵盖了在哺乳动物中对某种疾病的任何治疗，包括：（a）防止该疾病在对象体内发生，该对象可易患有该疾病但
10 尚未被诊断出患有该疾病；（b）抑制该疾病，即，拦阻该疾病的发展；以及（c）减缓该疾病，即，导致该疾病的退行。

本发明的一种药物组合物在优选的情况下为一种“医疗有效量”或者“预防有效量”的本发明抗体。“医疗有效量”指的是一种量，该量在剂量上对于在必需的时间中获得所需的医疗结果是有效的。该
15 抗体的医疗有效量可根据一些因素而变化，例如疾病状况、年龄、性别以及该个体的体重以及该抗体或者抗体部分在该个体中产生所需反应的能力。医疗有效量的该抗体或者抗原结合片段的任何毒性或者有害效应被医疗有利效应所胜出。“预防有效量”指的是一种量，该量在剂量上对于在必需的时间中获得所需的预防结果是有效的。在典型
20 的情况下，由于预防有效剂量在该疾病之前或者该疾病的早期症状下用于该对象，该预防有效量应低于医疗有效量。

剂量法可经调节以提供最佳的所需反应（例如，医疗或者预防反应）。例如，可以一旦药块进行给药、几个分离的剂量可在一定期间进行给药或者该剂量可根据该治疗状况的突发情况进行精按比例
25 降低或者提高。

假如本发明的抗体具有结合 hFasL 的能力，它们可被用于检测 FasL 多肽（例如，在生物样品中，例如血清或血浆），该检测使用传统方法进行，例如酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)或者组织免疫组织化学。本发明提供了一种方法以用于在生物样品中
30 检测 FasL，该方法包括将生物样品与本发明的抗体或者抗体部分进行接触并且在该样品中对与 hFasL 结合抗体（或抗体部分）或者未与

hFasL 结合的抗体（或抗体部分）进行检测。该抗体被直接或者间接地标记以可检测的物质以辅助对结合或者未结合抗体的检测。适当的可检测物质包括多种酶、互补（prosthetic）家族、荧光物质、发光物质以及放射活性物质。适当的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或者乙酰胆碱转移酶；适当的互补家族的例子包括链亲合素 / 生物素以及亲合素 / 生物素，适当的荧光物质的例子包括伞形酮、荧光素、异氰酸荧光素、罗丹明、dichlorotriazinylamine fluorescein、丹磺酰氯或者藻红蛋白；发光材料的例子包括发光氨；放射活性物质的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

10 在生物液体中可通过竞争免疫分析对 FasL 进行分析，该竞争免疫分析利用经可检测物质标记的 FasL 标准以及未标记的抗 hFasL 人类抗体而进行。在该分析中，该生物样品、经标记的 FasL 标准以及该抗 hFasL 人类抗体进行了组合并且测定与未标记的抗体相结合的经标记的 FasL 标准的量。样品中的 FasL 量与抗 hFasL 人类抗体所结合

15 的经标记的 FasL 标准的量成反比。

本发明的抗 hFasL 抗体可被用于 FasL 表达的诊断分析。可以使用该领域中已知的多种诊断分析工艺，例如竞争结合分析、直接或间接 ELISA 三文治分析以及在异质或者均质相中进行的免疫沉淀分析。例见，Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC

20 Press, Inc. (1987) pp. 147-158。在该分析中使用的抗体可标记以可检测基团。该可检测基团应当能够直接或者间接地产生可检测信号。例如，该可检测基团可为放射性同位素，例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或者 ^{125}I ，一种荧光或者化学发光化合物（例如异氰酸荧光素、罗丹明或者荧光素），或者一种酶（例如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或者辣根过氧化物酶）。

25 可以使用该领域中已知的用于该抗体与可检测基团进行连接的方法。

具体实施方式

实施例 1：使用 Jurkat 分析以可溶性 hFasL 进行的功能活性测定

FasL / 加强剂基质被制备成 4 $\times$ 浓度。1 $\times$ 基质在 Jurkat 细胞分析

30 培养基（DMEM: F-12 (3:1)，10% FBS，20mM HEPES 以及 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素）中含有 50ng/ml 重组人类可溶 FasL (Alexis[®] Biochemicals,

目录号#522-001)以及1 μ g/ml抗FLAG M2小鼠单克隆抗体(加强剂; Sigma Chemical Co., 目录号F-3165)。1 $\times$ 基质被用作为“100%细胞凋亡”参照。无FasL或加强剂的Jurkat细胞培养基被用作为“0%细胞凋亡”参照。

- 5 将该基质在室温下保温1小时。对于各个测定,25 μ l的4 $\times$ 加强Fas配基基质或者参照样品被加入一个96孔板的各个孔中。随后,25 μ l的抑制剂样品(3E1或者4G11抗hFasL抗体)或者参照样品被加入至各个孔中。这一添加将所有样品和基质稀释至原来的一半浓度。在室温下将样品保温45到60分钟。随后,在10⁶细胞/ml溶液的浓度
- 10 下将50 μ l的Jurkat细胞加入至各个孔中。这一添加产生了1 $\times$ 加强FasL,原浓度四分之一的样品以及5 $\times$ 10⁴Jurkat细胞/孔。在5%的二氧化碳下将该平板在37 $^{\circ}$ C下保温3个小时。将WST-1细胞增殖试剂(Roche, 目录号#1 644 807)以10 μ l/孔的浓度加入。在5%的二氧化碳下将该平板在37 $^{\circ}$ C下再度保温约合18个小时。随后在一台分光光度读板仪以450nm的最佳的波长进行读板。结果表明,两种抗hFasL
- 15 人类抗体3E1和4G11均在该分析中有效于对可溶性FasL介导的细胞凋亡的中和。

实施例2: 使用膜结合的FasL进行的CHO-K1/Jurkat分析

- 20 Del.huFasL是不可切割版本hFasL,稳定表达它的CHO-K1细胞系经加工处理以对抗体3E1和4G11阻断膜结合的FasL活性的能力进行分析。该细胞系表达表面层的FasL,它在与Jurkat细胞进行共培养时诱导了Jurkat的细胞凋亡。

- 使用DMEM:F-12(3:1),5%FBS,40 μ g/ml L-脯氨酸(Sigma),
- 25 50 μ g/ml庆大霉素(Sigma)以及600 μ g/ml G418进行粘附CHO-1细胞培养基的制备。对于各个测定,在96孔板的每个孔中加入约合10⁴个CHO-K1细胞(Del.huFasL或者亲代CHO-K1)。在5%的二氧化碳下将该细胞在37 $^{\circ}$ C下保温过夜。除去该培养基,并且将100 μ l的各种抑制剂样品(3E1或者4G11抗体;涵盖了一定浓度范围的一系列稀释度)或者参照(培养基)加入至各个孔中。在5%的二氧化碳
- 30 下将该细胞在37 $^{\circ}$ C下保温1小时。向各个孔中加入十微升的WST-1

细胞增殖试剂。在 5%的二氧化碳下将该细胞在 37℃下再度保温 4 小时。随后在一台分光光度读板仪以 450nm 的最佳的波长进行读板。结果表明，两种抗 hFasL 人类抗体 3E1 和 4G11 均在该分析中有效于对膜结合的 FasL 所介导的细胞凋亡进行阻断。

5

实施例 3: 单克隆抗体的亲合性测量

使用 BIAcore®2000 设备测量了多种抗 hFasL 抗体对于重组人类可溶 FasL (Alexis® Biochemicals, 目录号#522-001) 的亲合性。该 BIAcore®利用了表面等离子共振的光学特征来检测葡聚糖生物传感器基质中的相互作用分子的蛋白质浓度的变化。除非另外指明，所有的试剂和材料均购自 BIAcore® AB (Uppsala, Sweden)。所有的测量均在室温下进行。样品被溶解于 HBS-EP 缓冲液中 (150mM 氯化钠, 3mM EDTA, 0.005%(w/v)表面活性剂 P-20 以及 10mM HEPES, pH 7.4)。500 反应单位 (RU) 水平的山羊抗人类的 Fc 抗体通过使用氨基结合试剂盒被固定化于 B1 传感器芯片的腔室 1 和 2。

rhs FasL 的结合通过使用多分析循环进行评估。各个循环以 50μl/分钟的流速进行实施，并且由以下的步骤组成：注射 10μL 1μg/ml 的抗 hFasL3E1、注射 240μL 的 rhs FasL (开始为 100nM 并且对各个循环使用两倍系列稀释)随后进行 20 分钟的解离、以及使用 50μl 10mM 的甘氨酸盐酸盐，pH1.5 进行再生 (regeneration)。在 BIAevaluation 软件中使用 “Langmuir 1:1 with mass transport” 结合模型对各个循环的结合和解离速度进行评估。

实施例 4: 使用重组可溶 Fas 配基进行的 HepG2 细胞凋亡分析

使用 HepG2 (肝细胞瘤; ATCC #HB-8065) 细胞系来估测抗体 3E1 和 4G11 对重组可溶 FasL 的中和。使用 DMEM: F-12 (3:1), 10% FBS, 20mM HEPES 以及 50μg/ml 庆大霉素制备细胞培养基。对于各个测定，在 200μl 培养基中将 HepG2 细胞在经多聚 D-赖氨酸包埋的 96 孔板上进行培养，其浓度为 1×10^4 细胞 / 孔。在 5%的二氧化碳下将该细胞在 37℃下保温过夜。除去该培养基，代之以含有 60μg/ml 的博来霉素硫酸盐 (Sigma Chemical, 目录号#B8416) 的 100μl 培养基。

使用加湿箱对这些平板进行过夜保温。

- 在分析基质中制备人类 FasL-FLAG 的贮存溶液(终浓度为 50ng/ml FasL 以及 1 μ g/ml 抗 FLAG 加强剂,从而形成加强的 FasL)。向部分贮存溶液中加入抗 FasL 抗体以制备含有抑制剂的加强 FasL 基质。在
- 5 室温下保温各个溶液一小时。对于 100%细胞凋亡参照样品,将 50 μ l/孔的加强 FasL 溶液加入至已经在孔内的含有博来霉素的培养基中。对于抑制剂样品,将 100 μ l/孔的加强 FasL 加抗体溶液加入至已经在孔内的含有博来霉素的培养基中。在 5%的二氧化碳下将这些平板在 37 $^{\circ}$ C 下保温过夜。
- 10 制备一对一稀释的 WST-1 细胞增殖试剂和基质。二十微升的稀释 WST-1 被加入至各孔中。在 5%的二氧化碳下将该平板在 37 $^{\circ}$ C 下再度保温过夜。随后在一台分光光度读板仪以 450nm 的最佳的波长进行读板。结果表明,随着抗体浓度的降低细胞凋亡有所增加。

15 实施例 5: 重链和轻链抗原结合区的克隆和测序

使用以下的方案对中和性人类 mAb 3E1 的重链和轻链的可变区进行克隆和测序。

- 使用试剂盒提供的 Micro-Fast Track 方案 (Invitrogen) 从 2×10^6 杂交瘤细胞中制备 mRNA。使用 cDNA Cycle 试剂盒 (Invitrogen) 从
- 20 200 μ l mRNA 的乙醇沉淀物中制备 cDNA,通过在 4 $^{\circ}$ C 下以 14,000rpm 旋转等份的 mRNA 30 分钟,随后使用 70%的乙醇洗涤沉淀物而制备该沉淀物。将经空气干燥的沉淀重新悬浮于 11.5 μ l 的无菌水中,根据试剂盒的说明制备 cDNA。使用乙醇沉淀 cDNA,随后重悬浮于 30 μ l 水中以用于 PCR。

- 25 使用位于该轻链和重链可变区的 5'末端的简并引物配以位于恒定区的 3'引物来配置 PCR 反应。每 50 μ l 反应物使用了 1 μ l cDNA。根据 *Pfu* I 的使用而进行 20 个循环的该反应。通过在 2%的琼脂糖凝胶上以每个反应 5 μ l 进行电泳来检查 PCR 产物。使用 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒 (Invitrogen) 对阳性反应物克隆。对来自阳性克隆
- 30 的微制备物进行测序并且对产出性基因重排进行分析。来自独立的 PCR 产物以及多个克隆的测序的结果显示了本发明的序列

实施例 6: 原代大鼠肝细胞分析

细胞凋亡在肝中毒损伤 (toxic liver damage)、急性肝衰竭 (fulminant liver failure)、肝细胞恶性肿瘤、免疫介导的肝病以及病毒性肝炎 (Kanzler and Galle, *Seminars Cancer Biol.* 10(3):173-84(2000)) 中起着在一定的作用。先前研究已经证明原代人类肝细胞对于 FasL 所诱导的细胞凋亡是敏感的。较易获得的大鼠原代肝细胞业已显示这些细胞对于 hFasL 所诱导的细胞凋亡同样敏感。该分析系统被用于展示大鼠肝细胞的死亡和凋亡酶激活受到抗 hFasL 人类单克隆抗体 3E1 和 4G11 的抑制, 该激活是 Fas-FasL 作用所诱导的细胞内信号转导的指示迹象。

购买 matrigel 中的大鼠原代肝细胞, 该细胞以 7×10^5 细胞 / 孔处于 12 孔平板中 (In Vitro Technologies, 目录号 #M00717MG)。将这些细胞在以下条件下保温 4 或者 24 小时: (1) 未经刺激, (2) 经人类 FasL 刺激, (3) 经 hFasL 刺激加上对 FasL 的抑制 (使用 3E1 和 4G11 抗体) 或者 (4) 经 hFasL 刺激加上凋亡酶 3 抑制。根据两种分析方法对这些细胞进行分析: (a) 乳酸脱氢酶分析, 以及 (b) 凋亡酶 3/8 分析, 分别在实施例 6a 和 6b 中例示。从细胞中释放的乳酸脱氢酶通过任何方法均显示了细胞的死亡。凋亡酶 3 和 / 或 8 从细胞中的释放显示了 Fas-FasL 介导的细胞凋亡。

实施例 6a: 乳酸脱氢酶分析

乳酸脱氢酶 LD-L20 试剂 (Sigma Chemical, 目录 #228-20) 是乳酸和 NAD 的一种混合物, 该混合物用于乳酸脱氢酶活性的定量、动力学分析。乳酸脱氢酶催化了乳酸氧化成为丙酮酸同时还还原了 NAD。NADH 的形成导致了 $\lambda 340\text{nm}$ 的吸光度的提高。 $\lambda 340\text{nm}$ 的吸光度提高的速度正比于样品中的 LD 活性。

在一个 96 孔板中, $10\mu\text{l}$ 处于细胞培养基中的样品与 $200\mu\text{l}$ 的预热 LD-L 试剂进行混合。将该平板置于一台 37°C 的读板仪中进行 60 秒钟的保温, 在三个时间点读取 $\lambda 340\text{nm}$ 的吸光度: 0、30、60 秒。从最终的吸光度读值 (时间点 60 秒) 中减去初始的吸光度读值 (时

间点 0 秒) 以获得 Δ 吸光度 / 秒。该 Δ 吸光度 / 秒根据试剂供应商所提供的算法而转换成为 LD 活性 (U/L)。结果显示, 抗体的存在显著地降低了乳酸脱氢酶从细胞中的释放, 提示了细胞死亡的减少。

5 实施例 6b: 凋亡酶 3/8 分析

ApoAlert 凋亡酶(capase)荧光分析试剂盒 (Clonetech, 目录号 #K2026-2) 被用于检测特异性的凋亡酶 (3、8 或 9/6) 活性, 这些酶在细胞凋亡过程的不同阶段表现出活性。与地物偶联的 7-氨基-4-三氯甲基香豆素 (AFC) 受到该样品中的适当凋亡酶的蛋白酶裂解, 并且游离的 AFC 在 $\lambda 505\text{nm}$ 下发出荧光。

10 在一个 96 孔板中, $50\mu\text{L}$ 的细胞裂解物与 $50\mu\text{L}$ 的反应缓冲液和 $5\mu\text{L}$ 的凋亡酶-3 或者凋亡酶-8 底物进行混合。该混合物在 37°C 保温 1 个小时, 并且以 $\lambda 400\text{nm}$ 激发 / $\lambda 505\text{nm}$ 发射在荧光读板仪中进行读取。来自细胞凋亡样品中的发射光被用于与未诱导参照和抑制参照进行对比, 实现了对蛋白酶活性增加的测定。结果显示凋亡酶 3/8 激活在含有 FasL 加抗 hFasL 抗体的样品中被完全抑制。

实施例 7: 使用具有上调的天然 FasL 的 Jurkat 细胞的功能活性

20 以针对 T 细胞受体 CD3 复合物的固定化抗体对 Jurkat T 细胞的刺激诱导了天然 FasL 的细胞激活和上调。随即发生了激活所诱导的细胞死亡, 这可通过估测细胞存活或者活性凋亡酶 3 的活性来进行直接测量。该系统被用于测定抗 FasL 抗体 (3E1 被使用, 尽管据设想 4G11 或者本发明的其它抗体也可使用) 阻断细胞死亡的能力。

25 非组织培养的 96 孔平底板被使用抗人类 CD3 抗体 ($50\mu\text{L}/\text{孔}$, $1\mu\text{g}/\text{ml}$, 含于 PBS 中) 在 4°C 下进行过夜包埋。Jurkat T 细胞被单独加入孔中 ($50,000$ 细胞 / 孔) 或者与抑制剂 (抗体 3E1) 或者参照 IgG_4 一同在不同浓度下 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$ 到 $5\text{ng}/\text{ml}$, 终体积为 $100\mu\text{L}$, 含于 Jurkat 分析培养基中) 被加入, 并且在 5% 的二氧化碳中 37°C 下保温 24 小时。随后加入 WST-1 试剂 (例如, 可来自 Panvera) ($10\mu\text{L}/\text{孔}$) 并且将平板再度保温 24 小时。在一台荧光分光读板仪上以 450nm 读取平板。WST-1 被用于测量存活细胞数。结果显示该分析中使用的抗 hFasL

抗体在本分析中对于中和天然 FasL 介导的细胞凋亡是有效的。

或者，如上所述以抗人类 CD3 抗体包埋 24 孔板（非组织培养）。Jurkat T 细胞随后被单独加入孔中（200,000 细胞 / 孔）或者与抑制剂或者参照抗体一同被加入（终体积 400 μ l）并且在 5%的二氧化碳中 37 $^{\circ}$ C 下保温 24 或者 48 小时。收集细胞并进行洗涤。将细胞进行渗透化处理（Cytoperm/Cytofix Pharmingen #554722）并且使用抗活性凋亡酶 3-FITC 抗体（harmingen #559341）进行染色，并且在流式细胞仪上估测细胞染色。结果显示该抗 hFasL 抗体在抑制凋亡酶 3 激活中是有效的（凋亡酶 3 活性导致了细胞凋亡）。

10

实施例 8: 抗 FasL 抗体抑制 HIV 感染的人类 T 细胞的细胞凋亡

在免疫反应受刺激之前，外周血 T 细胞通常是静息的。但是，HIV 感染的患者的外周 T 细胞表现出激活的表型，该表型包括表面 Fas 的上调和 FasL 的诱导。预期这种表面 Fas-FasL 相互作用引起了多种外周的非 HIV 感染的 T 细胞通过细胞凋亡而损失。为研究抗 FasL 抗体是否可阻断这种细胞死亡而进行了以下的实验。

通过使用 Ficoll-Hypaque 从感染了 HIV 的患者的全血中纯化外周血单核细胞（PBMC）。以 700,000 细胞 / 孔将这些细胞加入 24 孔板中的培养基内，这些细胞被单独加入或者与 PHA（5 μ g/ml）以及重组 IL-2（50U/ml）一起被加入，这样可进一步激活该细胞。这些细胞与抗 FasL 抗体（2 μ g/ml 到 200ng/ml，终体积 500 μ l）一起或者在不含该抗体的情况下进行保温。将平板在 5%的二氧化碳中 37 $^{\circ}$ C 下保温 24 或者 72 小时。随后收集细胞、洗涤并且与抗 CD-PE 抗体一起保温。随后再度洗涤细胞、进行渗透化处理并且使用抗活性凋亡酶 3-FITC 抗体进行染色，并且在流式细胞仪上估测细胞染色。结果显示该抗 hFasL 抗体对于降低凋亡酶 3 的激活以及降低由此在 CD4 阳性和 CD4 阴性的外周血淋巴中产生的细胞凋亡是有效的。

30

表 1. 3E1 重链可变区 DNA 和氨基酸序列

	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
1	CAGGTGCAGC TGGTGCAGTC TGGAGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGGCCTC GTCCACGTCG ACCACGTCAG ACCTCGACTC CACTTCTTCG GACCCCGGAG
	CDR1
	V K V S C K A S G Y I F I R H G
51	AGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA CATCTTTATC AGACATGGTA TCACTTCCAG AGGACGTTCC GAAGACCAAT GTAGAAATAG TCTGTACCAT
	I T W V R Q A P G Q G L E W M G W
101	TCACCTGGGT GCGACAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGATGG AGTGGACCCA CGCTGTCCGG GGACCTGTTC CCGAACTCAC CTACCCTACC
	CDR2
	I N A Y N G N T N Y A Q K V Q G R
151	ATCAACGCTT ACAATGGTAA CACAACTAT GCACAGAAGG TCCAGGGCAG TAGTTGCGAA TGTACCATT GTGTTTGATA CGTGTCTTCC AGGTCCCCTC
	V T M T T D K S T S T A Y M E L
201	AGTCACCATG ACCACAGACA AATCCACGAG CACAGCCTAC ATGGAGCTGA TCAGTGGTAC TGGTGTCTGT TTAGGTGCTC GTGTCGGATG TACCTCGACT
	R S L R S D D A A V Y Y C A R E T
251	GGAGCCTGAG ATCTGACGAC GCGGCCGTGT ATTATTGTGC GAGAGAGACT CCTCGGACTC TAGACTGCTG CGCCGGCACA TAATAACACG CTCTCTCTGA
	CDR3
	M V R G V P L D Y W G Q G T L V T
301	ATGGTTCGGG GAGTTCCCCT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC TACCAAGCCC CTCAAGGGGA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG
	V S S A S T K G P S V F P L A
351	CGTCTCCTCA GCTTCCACCA AGGGCCCATC AGTCTTCCCC CTGGCG GCAGAGGAGT CGAAGGTGGT TCCCGGGTAG TCAGAAGGGG GACCGC

表 2. 4G11 重链可变区 DNA 和氨基酸序列

	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
1	CAGGTGCAGC TGGTGCAGTC TGGAGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGGCCTC GTCCACGTCG ACCACGTCAG ACCTCGACTC CACTTCTTCG GACCCCGAG
	CDR1
	V K V S C K A S G Y I F I S H G
51	AGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGTTA CATCTTTATC AGTCATGGTA TCACTTCCAG AGGACGTTCC GAAGACCAAT GTAGAAATAG TCAGTACCAT
	I S W V R Q A P G Q G L E W M G W
101	TCAGTTGGGT GCGACAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGATGG AGTCAACCCA CGCTGTCCGG GGACCTGTTC CCGAACTCAC CTACCCTACC
	CDR2
	I N A Y S G N T N Y A Q K L Q G R
151	ATCAACGCTT ACAGTGGTAA CACAACTAT GCACAGAAGC TCCAGGGCAG TAGTTGCGAA TGTCAACATT GTGTTTGATA CGTGTCTTCG AGGTCCCGTC
	V T M T T D R S T S T A Y M E L
201	AGTCACCATG ACCACAGACA GATCCACGAG CACAGCCTAC ATGGAGCTGA TCAGTGGTAC TGGTGTCTGT CTAGGTGCTC GTGTCGGATG TACCTCGACT
	R S L R S D D T A V Y Y C A R E T
251	GGAGCCTGAG ATCTGACGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGAGACT CCTCGGACTC TAGACTGCTG TGCCGGCACA TAATGACACG CTCTCTCTGA
	CDR3
	M V R G V P C D Y W G Q G T L V T
301	ATGGTTCGGG GAGTTCCTTG TGACTIONG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC TACCAAGCCC CTCAAGGGAC ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG
	V S S A S T K G P S V F P L A
351	CGTCTCCTCA GCTTCCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC CTGGCG GCAGAGGAGT CGAAGGTGGT TCCCGGGTAG GCAGAAGGGG GACCGC

表 3. 3E1 和 4G11 轻链可变区 DNA 和氨基酸序列

	E I V L T Q S P G T L S L S P G E
1	GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA CTTTAACACA ACTGCGTCAG AGGTCCGTGG GACAGAAACA GAGGTCCCCT
	CDR1
	R A T L S C R A S Q S V S S S Y
51	AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TTCTCGGTGG GAGAGGACGT CCCGGTCAGT CTCACAATCG TCGTCGATGA
	L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y
101	TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT ATCGGACCAT GGTCTGCTTT GGACCGGTCC GAGGGTCCGA GGAGTAGATA
	CDR2
	G A S S R A T G I P D R F S G S G
151	GGTGCAATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG CCACGTAGGT CGTCCCGGTG ACCGTAGGGT CTGTCCAAGT CACCGTCACC
	S G T D F T L T I S R L E P E D
201	GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT CAGACCCTGT CTGAAGTGAG AGTGGTAGTC GTCTGACCTC GGACTTCTAA
	CDR3
	F A V Y Y C Q Q Y G S S P W T F G
251	TTGCAGTGTA TTACTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCCTG GACGTTCCGGC AACGTCACAT AATGACAGTC GTCATACCAT CGAGTGGCAC CTGCAAGCCG
	Q G T K V E I K R T V A A P S V F
301	CAAGGGACCA AGGTGGAAAT CAAACGAAC GTGGCTGCAC CATCTGTCTT GTTCCCTGGT TCCACCTTTA GTTTGCTTGA CACCGACGTG GTAGACAGAA
	I F P
351	CATCTTCCCG GTAGAAGGGC

序列表

SEQ ID NO:1→编码 3E1 或 4G11 轻链可变区的多核苷酸序列

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC
TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT
CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGT
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTAC
TGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGGACGTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACT
GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG

SEQ ID NO:2→编码 3E1 或 4G11 轻链可变区的氨基酸序列

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP

5

SEQ ID NO:3→编码 3E1 或 4G11 轻链 CDR1 的多核苷酸序列

AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCC

SEQ ID NO:4→编码 3E1 或 4G11 轻链 CDR1 的氨基酸序列

RASQSVSSSYLA

10 SEQ ID NO:5→编码 3E1 或 4G11 轻链 CDR2 的多核苷酸序列

GGTGCATCCAGCAGGGCCACT

SEQ ID NO:6→编码 3E1 或 4G11 轻链 CDR2 的氨基酸序列

GASSRAT

SEQ ID NO:7→编码 3E1 或 4G11 轻链 CDR3 的多核苷酸序列

CAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGGACG

15

SEQ ID NO:8→编码 3E1 或 4G11 轻链 CDR3 的氨基酸序列

QQYGSSPWT

SEQ ID NO:9→编码 3E1 重链可变区的多核苷酸序列

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC
AAGGCTTCTGGTTACATCTTTATCAGACATGGTATCACCTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGG
CTTGAGTGGATGGGATGGATCAACGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGC
AGAGTCACCATGACCACAGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCT
GACGACGCGGCCGTGATTATTGTGCGAGAGAGACTATGGTTCGGGGAGTCCCCCTTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGTTCCACCAAGGGCCATCAGTCTTCCCCCTGGCG

20 SEQ ID NO:10→编码 3E1 重链可变区的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFIRHGITWVRQAPGQGLEWMGWINAYNGNTNYAQKVQG
RVTMTTDKSTSTAYMELRSLRSDDAVYYCARETMVRGVPLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA

SEQ ID NO:11→编码 3E1 重链 CDR1 的多核苷酸序列

AGACATGGTATCACC

SEQ ID NO:12→编码 3E1 重链 CDR1 的氨基酸序列

RHGIT

5 SEQ ID NO:13→编码 3E1 重链 CDR2 的多核苷酸序列

TGGATCAACGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGC

SEQ ID NO:14→编码 3E1 重链 CDR2 的氨基酸序列

WINAYNGNTNYAQKVQG

SEQ ID NO:15→编码 3E1 重链 CDR3 的多核苷酸序列

GAGACTATGGTTCGGGGAGTTCCCCTTGACTAC

10

SEQ ID NO:16→编码 3E1 重链 CDR3 的氨基酸序列

ETMVRGVPLDY

SEQ ID NO:17→编码 4G11 重链可变区的多核苷酸序列

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC
AAGGCTTCTGGTTACATCTTTATCAGTCATGGTATCAGTTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGG
CTTGAGTGGATGGGATGGATCAACGCTTACAGTGGTAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGC
AGAGTCACCATGACCACAGACAGATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCT
GACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGACTATGGTTCGGGGAGTTCCCTGTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCTGGCG

15 SEQ ID NO:18→编码 4G11 重链可变区的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFISHGISWVRQAPGQGLEWMGWINAYSGNTNYAQKLQG
RVTMTTDRSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARETMVRGVPCDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA

SEQ ID NO:19→编码 4G11 重链 CDR1 的多核苷酸序列

AGTCATGGTATCAGT

SEQ ID NO:20→编码 4G11 重链 CDR1 的氨基酸序列

SHGIS

20

SEQ ID NO:21→编码 4G11 重链 CDR2 的多核苷酸序列

TGGATCAACGCTTACAGTGGTAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGC

SEQ ID NO:22→编码 4G11 重链 CDR2 的氨基酸序列

WINAYSGNTNYAQLQG

SEQ ID NO:23→编码 4G11 重链 CDR3 的多核苷酸序列

GAGACTATGGTTCGGGGAGTCCCTGTGACTAC

SEQ ID NO:24→编码 4G11 重链 CDR3 的氨基酸序列

ETMVRGVPCDY

5

序列表

<110> Eli Lilly and Company

<120> 拮抗性抗 hFAS 配基人类抗体及其片段

<130> X15450

<160> 24

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<223>

<400> 1

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg 288
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cga act gtg gct 336
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg 360
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 115 120

<210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
115 120

<210> 3
<211> 36
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(36)
<223>

<400> 3
agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc tac tta gcc 36
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 4
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(21)

<223>

<400> 5

ggt gca tcc agc agg gcc act

21

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1

5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1

5

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 7

cag cag tat ggt agc tca ccg tgg acg

27

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1

5

<210> 9

<211> 396

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(396)

<223>

<400> 9

cag gtg cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac atc ttt atc aga cat 96

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Arg His

20

25

30

ggt atc acc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

Gly Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

gga tgg atc aac gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag gtc 192

Gly Trp Ile Asn Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Val

50

55

60

cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aaa tcc acg agc aca gcc tac 240

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac gcg gcc gtg tat tat tgt 288

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

gcg aga gag act atg gtt cgg gga gtt ccc ctt gac tac tgg ggc cag 336

Ala Arg Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct tcc acc aag ggc cca tca gtc 384
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

ttc ccc ctg gcg 396
 Phe Pro Leu Ala
 130

<210> 10
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Arg His
 20 25 30

Gly Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Val
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala
130

<210> 11
<211> 15
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(15)
<223>

<400> 11
aga cat ggt atc acc 15
Arg His Gly Ile Thr
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

Arg His Gly Ile Thr
1 5

<210> 13
<211> 51
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(51)

<223>

<400> 13

```
tgg atc aac gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag gtc cag      48
Trp Ile Asn Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Val Gln
1           5           10           15
```

ggc

51

Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

```
Trp Ile Asn Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Val Gln
1           5           10           15
```

Gly

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 15

```
gag act atg gtt cgg gga gtt ccc ctt gac tac      33
Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Leu Asp Tyr
1           5           10
```

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 16

Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(396)
 <223>

<400> 17
 cag gtg cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac atc ttt atc agt cat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Ser His
 20 25 30
 ggt atc agt tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga tgg atc aac gct tac agt ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc 192
 Gly Trp Ile Asn Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aga tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gag act atg gtt cgg gga gtt ccc tgt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Arg Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Cys Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct tcc acc aag ggc cca tcc gtc 384
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

ttc ccc ctg gcg 396
Phe Pro Leu Ala
130

<210> 18

<211> 132

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Ser His
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Cys Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala
 130

<210> 19
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(15)
 <223>

<400> 19
 agt cat ggt atc agt
 Ser His Gly Ile Ser
 1 5

15

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 20

Ser His Gly Ile Ser
 1 5

<210> 21
<211> 51
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(51)
<223>

<400> 21
tgg atc aac gct tac agt ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc cag 48
Trp Ile Asn Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

ggc 51
Gly

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 22

Trp Ile Asn Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)

<223>

<400> 23

gag act atg gtt cgg gga gtt ccc tgt gac tac

Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Cys Asp Tyr

1 5 10

33

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Glu Thr Met Val Arg Gly Val Pro Cys Asp Tyr

1 5 10