

[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 00811958.9

[51] Int. Cl.

*C12N 15/19 (2006.01)*

*C12N 5/10 (2006.01)*

*C12N 1/21 (2006.01)*

*C07K 14/705 (2006.01)*

*A61K 38/19 (2006.01)*

*A61K 47/02 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2009年8月12日

[11] 授权公告号 CN 100526463C

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 35/00 (2006.01)*

[22] 申请日 2000.6.26 [21] 申请号 00811958.9

[30] 优先权

[32] 1999.6.28 [33] US [31] 60/141,342

[86] 国际申请 PCT/US2000/017579 2000.6.26

[87] 国际公布 WO2001/000832 英 2001.1.4

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.22

[73] 专利权人 杰南技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 阿维·J·阿什克纳兹

萨拉·希莫威茨 罗伯特·F·凯利

伊菲吉妮亚·库米尼斯

苏珊·勒恩格 马克·奥康奈尔

罗杰·佩 扎拉·沙罗克

劳拉·西蒙斯

[56] 参考文献

WO9723615A1 1997.7.3

WO9725428A1 1997.7.17

WO9701633A1 1997.1.16

审查员 吴汀晨

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书4页 说明书43页 附图15页

[54] 发明名称

利用二价金属离子制备 Apo-2 配体的方法

[57] 摘要

本发明提供了使用二价金属离子制备 Apo-2 配体和 Apo-2 配体的制剂的方法。这类二价金属离子包括锌和钴，它们改进了 Apo-2 配体的三聚体形成和稳定性。还提供了 Apo-2 配体的晶体结构，以及采用寡核苷酸定向诱变鉴定的 Apo-2 配体变体多肽。

1. 一种含有 Apo-2 配体和一或多种二价金属离子的制剂, 其中所述一或多种二价金属离子在制剂中的浓度与该 Apo-2 配体的摩尔比 $< 2$ 。
2. 权利要求 1 的制剂, 其中所述一或多种二价金属离子包括锌或钴。
3. 权利要求 2 的制剂, 其中所述一或多种二价金属离子包括锌。
4. 权利要求 3 的制剂, 其中所述锌选自氯化锌, 醋酸锌, 硫酸锌, 碳酸锌和柠檬酸锌。
5. 权利要求 1 的制剂, 其中所述制剂是可药用的制剂。
6. 权利要求 1 的制剂, 其中所述 Apo-2 配体包括 SEQ ID NO:1 的 114-281 位氨基酸。
7. 权利要求 1 的制剂, 其中所述 Apo-2 配体包括 SEQ ID NO:1 的 1-281 位氨基酸或其具有生物活性的片段或变体。
8. 权利要求 1 的制剂, 其中所述制剂的 pH 为 6-9。
9. 权利要求 8 的制剂, 其中所述制剂的 pH 为 7-7.5。
10. 权利要求 1 的制剂, 其中所述制剂是含水制剂。
11. 权利要求 1 的制剂, 其中所述制剂是冻干制剂。
12. 含有 Apo-2 配体和一或多种二价金属离子的制剂, 其中所述一或多种二价金属离子在制剂中的浓度与该 Apo-2 配体的摩尔比 $\geq 2$ 。
13. 促进 Apo-2 配体三聚体形成的方法, 包括使 Apo-2 配体多肽暴露于有效量的一或多种二价金属离子。
14. 制备 Apo-2 配体的可药用制剂的方法, 包括将 Apo-2 配体、有效量的一或多种二价金属离子、以及可药用的载体混合。
15. 减少二硫键连接的 Apo-2 配体二聚体形成的方法, 包括使 Apo-2 配体多肽暴露于有效量的一或多种二价金属离子。
16. 制备 Apo-2 配体的方法, 包括如下步骤: (a)提供含有可复制的载体的宿主细胞, 所述载体含有编码 Apo-2 配体多肽的核苷酸序列; (b)提供含有有效量的一或多种二价金属离子的培养基; (c)将所述宿主细胞在足以表达 Apo-2 配体的条件下于培养基中培养; (d)从宿主细胞或培养基中回收 Apo-2 配体。
17. 权利要求 16 的方法, 其中所述宿主细胞是大肠杆菌。

18. 权利要求 16 的方法, 其中所述一或多种二价金属离子包括锌。
19. 权利要求 18 的方法, 其中所述的锌包括硫酸锌。
20. 权利要求 16 的方法, 其中所述一或多种二价金属离子包括钴。
21. 权利要求 20 的方法, 其中所述的钴包括氯化钴。
22. 权利要求 18 的方法, 其中培养基中所述锌的浓度为 50-250 $\mu\text{mol}$ 。
23. 权利要求 16 的方法, 其中所述可复制的载体包含编码一或多个 tRNA 分子的核苷酸序列。
24. 权利要求 23 的方法, 其中所述可复制的载体是 pAPAp2-P2RU 载体。
25. 权利要求 16 的方法, 其中所述 Apo-2 配体包含 SEQ ID NO:1 的 114-281 位氨基酸。
26. 权利要求 16 的方法, 其中所述 Apo-2 配体包含 SEQ ID NO:1 的 1-281 位氨基酸或其具有生物活性的片段或变体。
27. 制备 Apo-2 配体的方法, 包括如下步骤: 提供包含含有编码 Apo-2 配体之核苷酸序列的可复制型载体的宿主细胞; (b)提供培养基; (c)在足以表达 Apo-2 配体的条件下在所述培养基中培养宿主细胞; (d)从宿主细胞或培养基中回收 Apo-2 配体; (e)在有效量的一或多种二价金属离子存在下纯化 Apo-2 配体。
28. 权利要求 27 的方法, 其中在步骤(e)中, 所述 Apo-2 配体在一或多种二价金属离子和一种还原剂存在下纯化。
29. 权利要求 27 的方法, 其中所述 Apo-2 配体包含 SEQ ID NO:1 的 114-281 位氨基酸。
30. 权利要求 27 的方法, 其中所述 Apo-2 配体包含 SEQ ID NO:1 的 1-281 位氨基酸或其具有生物活性的片段或变体。
31. 从原核细胞培养中回收 Apo-2 配体的方法, 包括如下步骤: (a)分离已表达在培养的原核宿主细胞中的 Apo-2 配体; (b)将所述分离的 Apo-2 配体与含有一或多种二价金属离子和还原剂的缓冲液接触; (c)回收所述分离的 Apo-2 配体。
32. 权利要求 31 的方法, 其中在步骤(b)中, 所述一或多种二价金属离子选自锌和钴, 所述还原剂选自 DTT 和 BME。
33. 权利要求 31 的方法, 其中在步骤(c)中, 所述 Apo-2 配体的回收是

通过将 Apo-2 配体依次与阳离子层析载体, 羧基磷灰石载体, 疏水层析载体接触而实现的。

34. 权利要求 33 的方法, 其中所述阳离子层析载体选自 SP-Sepharose, CM-Sepharose, 和 Macro-Prep 陶瓷 HS 树脂。

35. 权利要求 33 的方法, 其中所述疏水层析载体选自苯基琼脂糖, 丁基琼脂糖, TSK 树脂和 Toyopearl 树脂。

36. 权利要求 7 的制剂, 其中所述变体包含与天然序列 Apo-2 配体不同且在 SEQ ID NO:1 的残基位置具有如下一或多个氨基酸取代的氨基酸序列: R130A; N134A; L136A; S138A; N140A; N143A; S153A; E155A; R158A; R170A; K179A; R191A; Q193A; E195A; K197D; K201A; N202A; D203A; Y213A; D218A; Y240A; K251A; S259A; D267A; D269A。

37. 权利要求 36 的制剂, 其中所述变体包含与天然序列 Apo-2 配体不同且在 SEQ ID NO:1 的残基位置具有如下一或多个氨基酸取代的氨基酸序列: S141A, K142A, S159A, H264A。

38. 权利要求 37 的制剂, 其中所述变体包含与天然序列 Apo-2 配体不同且在 SEQ ID NO:1 的残基位置具有如下一或多个氨基酸取代的氨基酸序列: R149A; C230S; C230A; Q205A; V207A; Y216A; E236A; Y237A。

39. 权利要求 26 的方法, 其中所述变体包含与天然序列 Apo-2 配体不同且在 SEQ ID NO:1 的残基位置具有如下一或多个氨基酸取代的氨基酸序列: R130A; N134A; L136A; S138A; N140A; N143A; S153A; E155A; R158A; R170A; K179A; R191A; Q193A; E195A; K197D; K201A; N202A; D203A; Y213A; D218A; Y240A; K251A; S259A; D267A; D269A。

40. 权利要求 39 的方法, 其中所述变体包含与天然序列 Apo-2 配体不同且在 SEQ ID NO:1 的残基位置具有如下一或多个氨基酸取代的氨基酸序列: S141A, K142A, S159A, H264A。

41. 权利要求 40 的方法, 其中所述变体包含与天然序列 Apo-2 配体不同且在 SEQ ID NO:1 的残基位置具有如下一或多个氨基酸取代的氨基酸序列: R149A; C230S; C230A; Q205A; V207A; Y216A; E236A; Y237A。

42. 权利要求 30 的方法, 其中所述变体包含与天然序列 Apo-2 配体不同且在 SEQ ID NO:1 的残基位置具有如下一或多个氨基酸取代的氨基酸序列: R130A; N134A; L136A; S138A; N140A; N143A; S153A; E155A;

R158A; R170A; K179A; R191A; Q193A; E195A; K197D; K201A; N202A;  
D203A; Y213A; D218A; Y240A; K251A; S259A; D267A; D269A。

43. 权利要求 42 的方法, 其中所述变体包含与天然序列 Apo-2 配体不同且在 SEQ ID NO:1 的残基位置具有如下一或多个氨基酸取代的氨基酸序列: S141A, K142A, S159A, H264A。

44. 权利要求 43 的方法, 其中所述变体包含与天然序列 Apo-2 配体不同且在 SEQ ID NO:1 的残基位置具有如下一或多个氨基酸取代的氨基酸序列: R149A; C230S; C230A; Q205A; V207A; Y216A; E236A; Y237A。

## 利用二价金属离子制备 Apo-2 配体的方法

### 发明领域

本发明主要涉及使用如锌和钴等二价金属离子制备 Apo-2 配体和 Apo-2 配体的制剂的方法。也提供了这类 Apo-2 配体和具有改进了 Apo-2L 的三聚体形成和稳定性的 Apo-2 配体制剂的应用。本发明还涉及 Apo-2 配体变体，特别是丙氨酸取代型变体。

### 发明背景

对哺乳动物中细胞数量的控制被认为部分取决于细胞增殖和死亡之间的平衡。细胞死亡的形式之一，有时称坏死性细胞死亡，其典型特征为创伤或细胞损伤所致病理形式的细胞死亡。相对比，有另外一种“生理性”的细胞死亡形式，其通常以一种有序或受控形式进展。这种有序的或受控的细胞死亡形式通常指“凋亡”(参见，例如 Barr 等，Bio/Technology, 12:487-493(1994); Steller 等，科学, 267:1445-1449(1995))。凋亡天然发生在许多生理过程中，包括胚胎发育和免疫系统中的克隆选择(Itoh 等，细胞(Cell), 66:233-243(1991))。

多种分子，如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (“TNF- $\alpha$ ”)，肿瘤坏死因子- $\beta$  (“TNF- $\beta$ ”或“淋巴毒素- $\alpha$ ”)，淋巴毒素- $\beta$  (“LT- $\beta$ ”)，CD30 配体，CD27 配体，CD40 配体，OX-40 配体，4-1BB 配体，Apo-1 配体(也称为 Fas 配体或 CD95 配体)，Apo-2 配体(也称 TRAIL, AIM-1 或 AGP-1)，和 Apo-3 配体(也称为 TWEAK)都被证实为细胞因子的肿瘤坏死因子家族的成员(参见例如 Gruss 和 Dower，血液(Blood), 85:3378-3404(1995); Pitti 等，生物学化学杂志(J.Biol.Chem.), 271:12687-12690(1996); Wiley 等，Immunity, 3:673-682(1995); Browning 等，细胞, 72: 847-856(1993); Armitage 等，自然(Nature), 357: 80-82(1992)，1997 年 1 月 16 日公开的 WO97/01633; 1997 年 7 月 17 日公开的 WO 97/25428; 1997 年 12 月 11 日公开的 WO 97/46686; 1997 年

9月18日公开的WO 97/33899; Marster等, *Curr.Biol.*, 8: 525-528(1998); Chicheportiche等, *Biol.Chem.*, 272: 32401-32410(1997)。在这些分子中, 已有报导在凋亡中涉及 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CD30 配体, 4-1BB 配体, Apo-1 配体, Apo-2 配体(TRAL)和 Apo-2 配体(TWEAK)。相信这些 TNF 家族细胞因子介导的对多种细胞应答的诱导是以它们与特异性细胞受体的结合而引发的。已证实约 55-kDa(TNFR1)和 75-kDa(TNFR2)的两种不同的 TNF 受体(Hohman 等, *生物学化学杂志*, 264: 14927-14934(1989)); Brockhaus 等, *美国国家科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.)*, 87: 3127-3131(1990); 1991年3月20日公开的 EP 417563), 已分离并鉴定了对应这两类受体的人和小鼠 cDNA(Loetscher 等, *细胞*, 61: 351(1990); Schall 等, *细胞*, 61:361(1990); Smith 等, *科学*, 248: 1019-1023 (1990); Lewis 等, *美国国家科学院院报*, 88: 2830-2834(1991); Goodwin 等, *分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)*, 11: 3020-3026(1991)。这两种 TNF 受体基因具有广泛的多态性(参见, 例如, Takao 等, *Immunogenetics*, 37: 199-203(1993))。这两种 TNFR 具有同样的细胞表面受体的典型结构, 包括胞外区, 跨膜区, 胞内区。已发现天然状态下这两种受体的胞外部分也可以为可溶性 TNF 结合蛋白(Nophar, Y 等, *EMBO J.*, 9: 3269(1990); 和 Kohno, T 等, *美国国家科学院院报*, 87: 8331(1990))。Hale 等报导了对重组可溶性 TNF 受体的克隆(*J.Cell.Biochem. 增刊 15F*, 1991, p.113(P424))。

1型和2型 TNFR(TNFR1 和 TNFR2)的胞外部分包括4个命名为1到4、以 NH<sub>2</sub> 末端开始的半胱氨酸富含区域(CRD)的重复氨基酸序列形式。每一 CRD 约 40 个氨基酸长, 在高度保守位置包含 4 到 6 个半胱氨酸残基(Schall 等, 出处同上; Loetscher 等, 出处同上; Smith 等, 出处同上; Nophar 等, 出处同上; Kohno 等, 出处同上)。在 TNFR1 中, 4 个 CRD 的大致边界如下: CRD1-氨基酸 14 到约 53; CRD2-约氨基酸 54 到约 97; CRD3-约氨基酸 98 到约 138; CRD4-约氨基酸 139 到约 167。在 TNFR2, CRD1 包括氨基酸 17 到约 54; CRD2-约氨基酸 55 到约 97; CRD3-约氨基酸 98 到约 140; CRD4-约氨基酸 141 到约 179(Banner 等, *细胞*, 73: 431-435(1993))。Banner 等, 出处同上, 还记述了在配体结合中 CRD 的潜在作用。

CRD 相似的重复形式存在于几种其它的细胞表面蛋白中, 包括 p75 神经生长因子受体(NGFR)(Johnson 等, *细胞*, 47: 545(1986); Radeke 等, 自

然, 325: 593(1987)), B 细胞抗原 CD40(Stamenkovic 等, EMBO J., 8: 1403(1989)), T 细胞抗原 OX40(Mallet 等, EMBO J., 9: 1063(1990))和 Fas 抗原(Yonerhara 等, J. Exp. Med., 169: 1747-1756(1989))和 Itoh 等, 细胞, 66: 233-243(1991))CRD 还可见于兔痘病毒及粘液瘤病毒的可溶性 TNFR(sTNFR) 样 T2 蛋白中(Upton 等, Virology, 160:20-29(1987); Smith 等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 176:335(1991)); Upton 等, Virology, 184: 370(1991))。这些序列的最佳排列指示半胱氨酸残基的位置是高度保守的。有时这些受体统称 TNF/NGF 受体超家族成员。最近对于 p75NGFR 的研究表明 CRD1 的缺失(Welcher, A.A.等, 美国国家科学院院报, 88: 159-163(1991))或此区域的 5-氨基酸插入(Yan,H 和 Chao,M.V., 生物学化学杂志, 266: 12099-12104(1991))对 NGF 的结合有很少或没有影响(Yan,H.和 Chao, M.V., 出处同上)。p75 NGFR 在它的 CRD4 和跨膜区之间包括一段约 60 个氨基酸的富含脯氨酸的序列, 其并不参与 NGF 结合(Peetre, C 等, Eur. J. Hematol., 41: 414-419(1988); Seckinger,P 等, 生物学化学杂志, 264: 11966-11973(1989); Yan, H 和 Chao, M.V., 出处同上)。在 TNFR2 中发现了类似的富脯氨酸区, 但在 TNFR1 中没有。

除淋巴毒素- $\alpha$ 外, 迄今鉴定的 TNF 家族配体是 II 型跨膜蛋白, 其 C-末端位于胞外。相反, 在 TNF 受体(TNFR)家族中迄今鉴定的大多数受体是 I 型跨膜蛋白。然而在 TNF 配体和受体家族中, 家族成员间的同源性主要在胞外区域(“ECD”)。TNF 家族的几种细胞因子, 包括 TNF- $\alpha$ , Apo-1 配体和 CD40 配体在细胞表面被蛋白水解; 每一种情况下得到的蛋白通常形成同型三聚体分子, 其起可溶性细胞因子的作用。TNF 受体家族的蛋白也通常被蛋白水解而释放出可溶性受体 ECD, 其可作为同源细胞因子的抑制因子。

最近, 已鉴定了 TNFR 家族的其它成员。这些新鉴定的 TNFR 家族成员包括 CAR1, HVEM 和 osteoprotegerin(OPG)(Brojatsch 等, 细胞, 87: 845-855(1996); Montgomery 等, 细胞, 87: 427-436(1996); Marsters 等, 生物学化学杂志, 272: 14029-14032(1997); Simonet 等, 细胞, 89: 309-319(1997))。与其它已知 TNFR-样分子不同, Simonet 等, 出处同上报导 OPG 不包含横跨疏水性跨膜区的序列。OPG 被认为起诱饵受体的作用, 如下所论。



TNF/NGF 受体家族的另一新成员在小鼠中得到鉴定, 此称为 GITR 的受体是‘糖(肾上腺)皮质激素-诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关基因’(Nocentini 等, 美国国家科学院院报, 94: 6216-6221(1997))。小鼠 GITR 受体是 228 个氨基酸的 I 型跨膜蛋白, 其在正常小鼠胸腺, 脾和淋巴结的 T 淋巴细胞中表达。小鼠 GITR 受体的表达通过用抗-CD3 抗体, 伴刀豆球蛋白 A 或佛波醇 12-豆蔻酸 13-乙酸酯活化 T 淋巴细胞而诱导。

在 Marster 等, *Curr.Biol.*, 6:750(1996)中, 研究人员描述了一种叫做 Apo-3 的全长天然序列人多肽, 在其胞外富半胱氨酸重复处显示出与 TNRF 家族的相似性, 象 TNFR1 和 CD95 一样, 它包含一个细胞质死亡区序列(同样参见 Masters 等, *Curr.Biol.*, 6:1669(1996))。其他研究人员称 Apo-3 为 DR3, wsl-1, TRAMP, 和 LARD(Chinnaiyan 等, *科学*, 274: 990(1996); Kitson 等, *自然*, 384:372(1996); Bodmer 等, *Immunity*, 6:79(1997); Screaton 等, 美国国家科学院院报, 94: 4615-4619(1997))。

Pan 等公开了称为“DR4”的另一 TNF 受体家族成员(Pan 等, *科学*, 276: 111-113(1997))。据报导 DR4 包含一个能引发(engage)细胞自杀装置的细胞质死亡区域。Pan 等指出 DR4 被认为是 Apo-2 配体或 TRAIL 配体的受体。

在 Sheridan 等, *科学*, 277: 818-821(1997) 和 Pan 等, *科学*, 277: 815-818(1997)中, 记述了另一被认为是 Apo-2 配体(TRAIL)的受体的分子。这一分子被称为 DR5(也可称为 Apo-2; TRAIL-R2 或 TRICK2 或 KILLER(Screaton 等, *Curr. Biol.*, 7: 693-696(1997); Walczak 等, *EMBO J.*, 16: 5386-5387(1997); Wu 等, *Nature Genetics*, 17: 141-143(1997))。象 DR4 一样, 有报导 DR5 包含一个细胞质死亡区域并且能够传递凋亡的信息。

最近鉴定了另一含死亡区的受体 DR6(Pan 等, *FEBS Letters*, 431: 351-356(1998))。除含有 4 个假定的胞外区域和一个细胞质死亡区域外, DR6 被认为包含一假定的亮氨酸-拉链序列, 该序列与细胞质区的富含脯氨酸的基序相重叠。富含脯氨酸的基序与结合到 src-同族(homology)-3 区域的序列相似, 其被发现存在于许多胞内信号转导分子中。

新近鉴定的另一组 TNFR 家族成员是指“诱饵受体”, 据认为其起抑制因子的作用, 而不是信号转导因子。该组包括 DCR1(也称 TRID, LIT 或 TRAIL-R3)(Pan 等, *科学*, 276: 111-113(1997)); Sheridan 等, *科学*, 277: 818-821(1997); McFarlane 等, *生物学化学杂志*, 272: 25417-25420(1997);

Schnerider 等, FEBS Letters, 416: 329-334(1997); Degli-Esposti 等, J. Exp. Med., 186: 1165-1170(1997); 和 Mongkosapaya 等, J. Immunol., 160: 3-6(1998)) 和 DCR2(也称为 TRUNDD 或 TRAIL-R4)(Marsters 等, Curr. Biol., 7: 1003-1006(1997); Pan 等, FEBS Letters, 424: 41-45(1998); Degli-Esposti 等, Immunity, 7: 813-820(1997)), 这两者都是表面分子, 还有 OPG(Simonet 等, 出处同上)和 DCR3(Pitti 等, 自然, 396: 699-703(1998)), 这两者都是可溶性分泌蛋白。

有关 TNF 家族细胞因子和它们的受体的综述, 参见 Ashkenazi 等, 科学, 281: 1305-1308 (1998); Golstein, Curr.Biol., 7: 750-753 (1997); 和 Gruss 和 Dower, 出处同上。

锌结合位点在涉及不同界面的特定蛋白的蛋白-蛋白相互作用中显示结构上的作用(Feese 等, 美国国家科学院院报, 91: 3544-3548(1994); Somers 等, 自然, 372: 478-481(1994); Raman 等, 细胞, 95: 939-950(1998)), 但具有前述结构性特征的 TNF 家族成员(CD40 配体, TNF- $\alpha$ , 或 TNF- $\beta$ )没有一种可结合金属。已在文献中记述了在配制各种激素, 如人生长激素(hGH)时金属离子如锌的使用(参见, 例如 WO 92/17200, 1992 年 10 月 15 日公开)。在 WO 92/03478(1992 年 3 月 15 日公开)中同样记述了锌与 hGH 对受体的结合有关。Walter 等, Structure, 4: 1453-1463(1996)和 Karpusas 等, 美国国家科学院院报, 94: 11813-11818(1997)中分别报导了在干扰素- $\alpha$ 二聚体和干扰素- $\beta$ 二聚体中锌结合的作用。

本领域已综述了各种金属离子如锌的结构和生物学作用, 参见如 Christianson 等, Advances in Protein Chemistry, 42: 281-355(1991)。

### 发明简述

本发明基于以下发现: 在制备 Apo-2 配体, 或含 Apo-2 配体的制剂的方法和过程中包含入一或多种二价金属离子会导致产量和 Apo-2 配体三聚体稳定性提高。现在认为这样包含一或多种二价金属离子也会通过重组细胞培养中的表达而改进 Apo-2 配体的折叠或 Apo-2L 三聚体的装配。在氧化环境下, Apo-2L 单体上的自由半胱氨酸可以形成分子间二硫键, 产生游离的 Apo-2L 二聚体以及 Apo-2L 三聚体形式中的二硫键连接型 Apo-2L 二聚

体。Apo-2L 二聚体的这种形成可能导致 Apo-2L 的聚结，沉淀，和/或 Apo-2L 失活。在此所述方法和制剂中二价金属离子的存在可以防止此类二硫键的形成。有显示表明在 Apo-2L 三聚体的合成和装配过程中二价金属离子的加入可以进一步改进正确折叠的，同型三聚体式 Apo-2L 的积累和回收。申请人发现与有二硫键连接的 Apo-2L 二聚体相比，Apo-2 配体三聚体的活性高约 10 倍(在哺乳动物癌细胞中的细胞毒活性方面)。

本发明说明书主要涉及 Apo-2 配体，也考虑了二价金属离子在制备或稳定各种其他蛋白的三聚体方面的应用。这些其它蛋白特别包括那些需要形成三聚体以获得生物活性的蛋白，例如，TNF 家族的各成员。

在一个实施方案中，本发明提供使用一或多种二价离子制备 Apo-2 配体的方法。所述方法包括的步骤为：提供含有编码 Apo-2 配体之核酸的可复制型载体的宿主细胞，提供含有一或多种二价金属离子的培养基，在足以表达 Apo-2 配体的条件下在培养基中培养宿主细胞，从宿主细胞或细胞培养液中回收 Apo-2 配体。可选地，在回收或纯化过程中使用一或多种二价金属离子。

在另一实施方案中，本发明提供了包含 Apo-2 配体和一或多种二价金属离子的制剂。该组合物可以是药物学上可接受的可用于如诱导或激发哺乳动物癌细胞凋亡的有效制剂。

本发明的一个进一步的实施方案提供制品和试剂盒，其中包含这类具有一或多种二价金属离子的 Apo-2 配体制剂。所述制品和试剂盒包括一个容器，容器上的标记，容器中的制剂。容器上的标记指示该制剂可用于特定的治疗或非治疗用途。该制剂包含 Apo-2 配体和一或多种二价金属离子。

在另一实施方案中，本发明提供了按照本发明所述方法制备的 Apo-2 配体多肽。这类 Apo-2 配体多肽可能包括图 1(SEQ ID NO: 1)的氨基酸 114-281，图 1(SEQ ID NO: 1)的氨基酸 1-281，以及其具有生物活性的片段或变体。

在又一实施方案中，本发明提供了 Apo-2 配体变体。特别是，本发明提供了在 Apo-2 配体的天然序列(图 1; SEQ ID NO: 1)中包含一或多个氨基酸取代的 Apo-2 配体变体。在下表 1 中提供了包含丙氨酸取代的 Apo-2 配体变体。本发明还提供了编码这类 Apo-2L 配体变体的核酸分子和包含编码 Apo-2L 变体的核酸分子的载体和宿主细胞。

### 附图说明

图 1 表示人 Apo-2 配体 cDNA (SEQ ID NO: 2) 及其衍生的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1)。核苷酸位置 447 (SEQ ID NO: 2 中) 的 “N” 用于指示该核苷酸碱基可能是 “T” 或 “G”。

图 2 提供了 Apo-2L 的晶体结构。图 2A 显示了沿三重轴向的三聚体视图。每一单体都是相同的。有序蛋白结构始于残基 120，残基 131-141 是无序的，残基 195-201 也是如此 (以虚线标记)。包含三个对称相关的半胱氨酸的锌结合位点和溶剂配体表示为实心图像。图 2B 提供了锌结合位点内斜视立体近视图；S $\gamma$ -锌-S $\gamma$  间的角度是 112°，S $\gamma$ -锌-溶剂间的角度是 107°，锌-硫键距离为 2.3 埃，锌-溶剂键距离为 2.3 埃。图 2 (和 5) 用 Molscrip (Kraulis 等, *J. Appl. Cryst.*, 24: 946-950 (1991)) 和 Raster3D (Merritt 等, *Acta Cryst.*, D50: 869-873 (1994)) 程序绘制。图 2C 提供了得自实施例 2 所述实验的结晶学的数据总结。

图 3 显示所选 TNF 家族成员的序列排列，包括：Apo2L (SEQ ID NO: 1)；TNF- $\beta$  (SEQ ID NO: 3)；TNF- $\alpha$  (SEQ ID NO: 4)；CD40L (SEQ ID NO: 5)；FasL (SEQ ID NO: 6)；RANKL (SEQ ID NO: 7)。这些序列上的箭头指示 Apo2L 中的  $\beta$ -链 (strand)。排列的序列上的编号对应图 1 提供的 Apo-2L 序列编号 (SEQ ID NO: 1)。

图 4 提供的生物分析数据显示锌结合位点的功能重要性。在用各种浓度的 Apo-2L (114-228 位) 或经螯合剂处理除去锌的 Apo-2L (114-228 位) 孵育过夜后，用代谢活性的荧光分析确定 SK-MKS-1 细胞生存力。

图 5 显示了在 Apo-2L 的空间填充模型上对突变分析的作图。三聚体方向同图 2。将突变为丙氨酸时生物活性降低 5 倍以上的残基作标记并避光保存。在中度阴影区显示了其它已突变的残基，这些残基中的几个也进行了标记。

图 6 显示了在经处理除去结合锌之前和之后 Apo-2L 的圆二色谱 (114-281 位)。

图 7 显示了在经处理除去锌之前和之后 Apo-2L 的热变性，其通过在 225nm 进行圆二色谱来监控。报导了 2 微摩尔 Apo-2L 溶液的倍增电极电压。

图 8 显示了在使用 AP 启动子的大肠杆菌表达系统中添加  $ZnSO_4$  对可溶性 Apo-2L 产物积累(mg/L)的影响(时间进程)。

图 9 显示了有或没有  $ZnSO_4$  时大肠杆菌表达系统(参见实施例 8)所得细胞裂解液的 MPHS 层析的洗脱图谱。

图 10 显示了在使用 trp 启动子的大肠杆菌表达系统中添加  $ZnSO_4$  对可溶性 Apo-2L 产物积累(mg/L)的影响(时间进程)。

图 11 显示了在使用 AP 启动子的大肠杆菌表达系统中添加  $CoCl_2$  对可溶性 Apo-2L 产物积累(mg/L)的影响(时间进程)。

图 12 显示了 pAPApo2-P2RU 质粒的构建。

图 13 显示了 pAPOK5 质粒的构建。

### 优选实施方案详述

#### 定义

在此所用术语“Apo-2 配体”，“Apo-2L”，和“TRAIL”是指这类多肽序列，其包含图 1 所示氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)的 114-281 位氨基酸残基，还包括 95-281 位残基，92-281 位残基，91-281 位残基，41-281 位残基，15-281 位残基，1-281 位残基，同样还包括上述序列的生物活性片段，以及缺失的，插入的，或取代的变体。在一个实施方案中，该多肽序列包含图 1(SEQ ID NO: 1)的 114-281 残基。可选地，该多肽序列包含图 1(SEQ ID NO: 1)的 92-281 位残基或 91-281 位残基。Apo-2L 多肽可由图 1(SEQ ID NO: 2)表示的天然核苷酸序列编码。可选地，编码 Pro119 残基(图 1; SEQ ID NO: 2)的密码子可以是“CCT”或“CCG”。在另一优选实施方案中，所述片段或变体具有生物学活性且与上述的任一序列有至少 80% 的氨基酸序列同一性，更优选至少 90% 的序列同一性，更进一步优选有至少 95%，96%，97%，98%，99% 的序列同一性。所述定义包含 Apo-2 配体的取代型变体，其中其天然氨基酸中的至少一个被丙氨酸残基取代。优选的取代型变体包括下表 1 中证实的一或多个残基取代。所述定义同样包括自 Apo-2 配体源分离的或通过重组或合成方法制备的天然序列的 Apo-2 配体。本发明的 Apo-2 配体包括在 1997 年 1 月 16 日公开的 WO97/01633 和 1997 年 7 月 17 日公开的 WO97/25428 中称为 Apo-2 配体或 TRAIL 的多肽。通常使用术语“Apo-2

配体”或“Apo-2L”指 Apo-2 配体的形式，其包括所述多肽的单体，二聚体或三聚体形式。在 Apo-2L 序列中所用的氨基酸残基的编号，除特别声明，均依照图 1 中编号(SEQ ID NO: 1)。例如，“D203”或“Asp203”指图 1 (SEQ ID NO: 1)的序列中 203 位的天冬氨酸残基。

术语“Apo-2 配体胞外区域”或“Apo-2 配体 ECD”指 Apo-2 配体的基本上没有跨膜区和细胞质区的形式。通常，ECD 含有不到 1% 的这类跨膜区和细胞质区，优选的，含有不到 0.5% 的这类区域。术语“Apo-2 配体单体”或“Apo-2L 单体”指 Apo-2L 胞外区序列的共价链。

术语“Apo-2 配体二聚体”或“Apo-2L 二聚体”指通过二硫键共价连接的两个 Apo-2L 单体。本发明所用此术语包括游离的二聚体以及 Apo-2L 三聚体形式中的 Apo-2L 二聚体(即与另一 Apo-2 单体结合)。

术语“Apo-2 配体三聚体”或“Apo-2L 三聚体”指通过非共价键连接在一起的三个 Apo-2L 单体。

“TNF 家族成员”广义上指与肿瘤坏死因子(TNF)在结构或功能上有一些相似之处的各种多肽。本领域已知并记述了与 TNF 家族多肽相关的某些结构和功能特征，例如，在上述的发明背景部分。这类多肽包括，但不限于本领域称为 TNF- $\alpha$ ，TNF- $\beta$ ，CD40 配体，CD30 配体，CD27 配体，OX-40 配体，4-1BB 配体，Apo-1 配体(也称为 Fas 配体或 CD95 配体)，Apo-2 配体(也称为 TRAIL)，Apo-3 配体(也称为 TWEAK)，APRIL，OPG 配体(也称 RANK 配体，ODF，或 TRANCE)，和 TALL-1(也称 BlyS，BAFF 或 THANK)的那些(参见例如 Gruss 和 Dower，血液，85: 3378-3404(1995); Pitti 等，生物学化学杂志，271: 12687-12690(1996); Wiley 等，Immunity，3: 673-682(1995); Browning 等，细胞，72: 847-856(1993); Armitage 等，自然，357: 80-82(1992)，1997 年 1 月 16 日公开的 WO 97/01633; 1997 年 7 月 17 日公开的 WO 97/25428; Marster 等，Curr.Biol.，8: 525-528(1998); Chicheportiche 等，Biol.Chem.，272: 32401-32410(1997); Hahne 等，J.Exp.Med.，188: 1185-1190(1998); WO98/28426，1998 年 7 月 2 日公开; WO98/46751，1998 年 10 月 22 日公开; WO/98/18921，1998 年 5 月 7 日公开; Moore 等，科学，285: 260-263(1999); Shu 等，J.Leukocyte Biol.，65: 680(1999); Schneider 等，J.Exp.Med.，189: 1747-1756(1999); Mukhopadhyay 等，生物学化学杂志，274: 15978-15981(1999))。

在此所用术语“标记的表位”指包含与“标记多肽”融合的 Apo-2 配体或其一部分的嵌合多肽。标记多肽有充足的残基以提供表位以制备抗该表位的抗体，但是它要足够短，不会干扰 Apo-2 配体的活性。标记多肽也优选是相当独特的，使得抗体基本上不与其它表位交叉反应。合适的标记多肽通常有至少 6 个氨基酸残基，且通常为约 8 到约 50 氨基酸残基(优选约 10-20 个残基)。

术语“二价金属离子”指具有两个正电荷的金属离子。本发明所用二价金属离子包括但不限于锌，钴，镍，镉，镁，锰。这些金属的可利用形式包括盐形式(如药物上可接受的盐形式)，如上述二价金属离子的盐酸盐，乙酸盐，碳酸盐，柠檬酸盐和硫酸盐。本发明所用优选的二价金属离子是锌，更优选其盐形式，硫酸锌。本发明优选所用二价金属离子的浓度或量(如有效量)足以，例如(1)在所需时间内增强 Apo-2L 三聚体的保存稳定性，(2)在重组细胞培养或纯化方法中增强 Apo-2L 三聚体的生产量，(3)增强 Apo-2L 三聚体的溶解性(或减少凝聚)，(4)促进 Apo-2L 三聚体的形成。

“分离，”当用于描述本文公开的各种蛋白时，是指从蛋白的天然环境的成分中鉴定，分离和/或回收的蛋白。其天然环境中的杂质成分是通常可以干扰对该蛋白的诊断或治疗的物质，可能包括酶，激素，及其它蛋白性或非蛋白性溶质。在优选的实施方案中，蛋白可以(1)纯化至足以通过采用转杯式测序仪得到至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度，或(2)纯化至在非还原或还原条件下经 SDS-PAGE 及考马斯兰或优选银染色证实为均质的程度。分离的蛋白包括重组细胞中的原位蛋白，因为 Apo-2 配体天然环境中的至少一种成分不存在。但是通常，需要通过至少一步纯化步骤制备分离的蛋白。

“分离”的 Apo-2 配体核酸分子是从 Apo-2 配体的天然来源中通常与其结合的至少一种杂质核酸分子中鉴定并分离的核酸分子。分离的 Apo-2 配体核酸分子的形式和设定不同于其在天然环境中所见。因此分离得到的 Apo-2 配体核酸分子不同于 Apo-2 配体核酸分子在其天然细胞中的状态。但是分离得到的 Apo-2 配体核酸分子包括通常表达 Apo-2 配体的细胞中的 Apo-2 配体核酸分子，例如在所述细胞中，核酸分子所处染色体位置不同于天然细胞中的。

在此鉴定的序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在比对序

列及必要时引入缺口以获得序列同一性的最大百分比，且不考虑作为序列同一性的部分的任何保守取代时，候选序列中与 Apo-2 配体序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。旨在确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域技术人员所知的能确定用于测定比对所需相应参数的多种途径完成，包括指定能获得对全长比对序列的最大比对所需的算法。为此目的，氨基酸序列同一性百分比可通过使用序列比对的计算机程序 ALIGN-2 得到，该程序由 Genentech, Inc. 授权，其源代码已连同用户手册提交美国版权局，华盛顿特区，20559，在美国版权局注册号码 TXU510087。该程序可从 Genentech, Inc., South San Francisco, CA 公开得到。所有序列比对参数由 ALIGN-2 程序设定，没有改变。

术语“调控序列”指在特定宿主生物中使可操作连接的编码序列表达所必需的 DNA 序列。适于原核生物的调控序列可包括如启动子，任选操纵子序列，和核糖体结合位点。已知真核生物细胞利用启动子，聚腺苷酸化信号和增强子。

当核酸与另一核酸序列所处的位置使它们功能相关时，它们是“可操纵连接的”。例如，前序列或分泌前导序列的 DNA 如果表达为参与其多肽分泌的前蛋白，则其与编码该多肽的 DNA 可操纵相连；启动子或增强子如果影响一个编码序列的转录则与该编码序列可操纵相连；或者核糖体结合位点当位于可促进翻译的位置时其与编码序列可操纵连接。通常，“可操纵连接”意指所连接的 DNA 序列相邻，如果是分泌前导序列，是指是相邻且在阅读状态下。但是，增强子不必相邻。连接可通过在方便的限制位点的连接反应来完成。如果这类位点不存在，按照传统方法使用合成的寡核苷酸衔接体或接头。

本文中的“生物活性的”或“生物活性”意指(a)在体内或体外至少一种哺乳动物癌细胞或感染病毒的细胞中诱导或刺激凋亡的能力；(b)能够形成抗体，即具有免疫原性；或(c)能够结合和/或刺激 Apo-2L 的受体；或(d)保留天然 Apo-2L 多肽的活性。

术语“凋亡”和“凋亡活性”使用其广义，指哺乳动物中有序地或受控形式的细胞死亡，通常伴随着一个或多个特征性细胞变化，包括细胞质浓缩，质膜微绒毛的缺失，细胞核的分节段，染色体 DNA 的降解或线粒体功能的丧失。这种活性可通过，例如细胞活力分析，FACS 分析或 DNA 电



泳来确定和测定。

术语“癌”“癌性的”或“恶性的”是指或描述哺乳动物中通常以失控的细胞生长为特征的生理状态。癌的例子包括但不限于癌(carcinoma), 淋巴瘤, 白血病, 母细胞瘤, 肉瘤。这些癌的更具体的例子包括鳞状细胞癌, 小细胞肺癌, 非小细胞肺癌, 恶性胶质瘤, 胃肠道癌症, 肾癌(renal cancer), 卵巢癌, 肝癌, 结直肠癌, 子宫内膜癌, 肾脏癌(kidney cancer), 前列腺癌, 甲状腺癌, 成神经细胞瘤, 胰腺癌, 多形性成胶质细胞瘤, 子宫颈癌, 胃癌, 膀胱癌, 肝细胞瘤, 乳腺癌, 结肠癌, 头和颈部癌。

术语“治疗”在此是指治愈性治疗和预防性治疗。

术语“哺乳动物”在此是指任何可归类为哺乳动物的动物, 包括人, 牛, 马, 狗和猫。在本发明优选的实施方案中, 哺乳动物是人。

## II. 本发明的组合物和方法

已有文献记述了与 TNF 配体家族相关的新的细胞因子, 本文称之为“Apo-2 配体”。人 Apo-2 配体预计的成熟氨基酸序列包含 281 个氨基酸, 理论分子量约为 32.5kDa。缺乏信号序列和具有内部的疏水区域表明 Apo-2 配体是一种 II 型跨膜蛋白。还有文献记述了可溶性胞外区域 Apo-2 配体多肽。参见, 例如公开于 1997.7.17 的 WO97/25428。还有文献记述了 Apo-2L 取代变体。利用丙氨酸扫描技术证实了多种具有生物活性的取代变体分子。特定的 Apo-2 配体取代变体包括其中至少一个氨基酸被丙氨酸残基取代的那些。这些取代变体被确定为, 例如, “D203A”; “D218A”; “D269A”。使用此命名法确定 Apo-2 配体变体, 它们在 203, 218 和/或 269 位的天冬氨酸残基(使用图 1(SEQ ID NO: 1)中的编号)为丙氨酸残基所取代。可选地, Apo-2 配体变体可能包含下表 1 中引用的一个或多个丙氨酸取代。

本发明也提供了 Apo-2 配体胞外区域的 x-射线晶体结构, 进行了丙氨酸扫描诱变以提供其受体接触区域的图像。所得 Apo-2 配体结构显示为一种同型三聚体蛋白, 其包含一个新的协调 Apo-2 配体三聚体分子三个亚基之间相互作用的二价金属离子(锌)结合位点。

借助 TNF- $\alpha$ 模型通过分子取代确定 Apo-2 配体的 x-射线结构(Eck 等, 生物学化学杂志, 264: 17595-17605(1989)), 精确到 3.9 埃(对于 114-281 位残基形式而言)和 1.3 埃(对于 D218A 变体; 91-281 位形式而言)。象 TNF 家族其它成员一样, Apo-2 配体表现出包含由三个薄卷样(jelly roll)单体形成

的紧凑三聚体形式, 共约 5100 平方埃(每个单体 1700 平方埃)以形成球状三聚体(参见图 2A)。核心 $\beta$ 链的位置相对于 TNF 家族的其它结构性特征性成员, 如 TNF- $\alpha$  (Eck 等, 出处同上; Jones 等, 自然, 338: 225-228(1989)), TNF- $\beta$ (Eck 等, 生物化学杂志, 267: 2119-2122(1992)), 和 CD40L(Karpusas 等, Structure, 3: 1031-1039(1995))是高度保守的, 与 TNF- $\alpha$ 或 TNF- $\beta$ 的核心带相比 r.m.s.d.为 0.8 埃。在所有现在已知的人 TNF 家族成员的序列之间, Apo-2 配体三聚体界面中没有一个残基表现出是绝对保守的; 但是, 保留了这些残基的疏水性化学性质。(参见图 3)。Apo-2 配体三聚体界面中保守的残基集中靠近底部(三聚体的最宽部分)且沿三重轴聚集。在 Cys230 邻近区中靠近 Apo-2 配体三聚体界面的顶部的位置, 结构表现出不同, 在每一结构中 190' s 和 230' s 环的构象是可变的。

与 $\beta$ -支架核心相比, TNF 家族成员之间环和受体结合表面的结构显著不同。Apo-2 配体和 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CD40L 的结构间的一个不同是 A 和 A' 链间的连接。在 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CD40L 中, A 链后接一个紧密的环。在 Apo-2 配体中, 一个 15 个残基的插入部分加长了此环并改变了其构象。此环的第一部分(131-141 位残基)是无序的, 而此环的第二部分(142-154 位残基)在该分子表面从一个单体-单体界面跨到下一个界面(参见图 2A), 其构象类似 CD40L 的 C-末端部分。

申请人惊讶的发现在三聚体界面的顶部附近埋藏着一个新的二价金属离子(锌)结合位点。通过序列分析根据 Cys230 可将 TNF 家族成员分为三组: (1)如 TNF- $\alpha$ 和 Fas 配体等蛋白, 它们在对应于 Cys230 的位置有一个半胱氨酸残基能与相邻环 (Apo-2L 中的 194-203 环)上的另一半胱氨酸形成二硫桥, 从而不与金属离子反应, (2)没有对应于 Cys230 的半胱氨酸的那些蛋白(如 TNF- $\beta$ 和 OPGL), 和(3)只有一个对应于 Cys230 的半胱氨酸残基的那些蛋白。在其它种类中 Apo-2L 和其 ortholog 符合后一标准(即只有 Cys230 的蛋白), 预计它们可在三聚体表面结合二价金属离子。Apo-2 配体中紧接 Cys230 之前的主链的构象与含二硫桥的 TNF 家族成员如 TNF- $\alpha$ 和 CD40L 不同。在 Apo-2 配体中, Cys230 的侧链指向界面而不是相反。

在每一 Apo-2 配体单体中的 Cys230 残基向内指向三聚体轴并调整与内部溶剂分子相连的二价金属离子。此二价金属离子表现出稍微变形的四面体几何形状, 其键和角度与锌结合位点吻合且完全不能接触溶剂(参见图

2B)。使用电感耦合的等离子体原子发射光谱(ICP-AES)(参见实施例 5)确认所结合的金属。在使用 ICP-AES 对 Cd, Co, Zn, Ni, Cu 的定量分析中, 每摩尔 Apo-2 配体三聚体中检测到 0.79 摩尔 Zn 和 0.06 摩尔 Co, 这证明结构中的结合离子是锌, 摩尔比例约为 1: 1 (参见实施例 5)。观察到 Cys230 被丙氨酸取代导致凋亡活性降低>8 倍, 说明此位点的重要性(参见实施例 7)。而且, 通过对螯合剂透析从 Apo-2L 中除去结合的金属会导致 DR5 亲和力和力降低 7 倍, 凋亡活性降低>90 倍(参见实施例 6)。除去 Zn 使半胱氨酸变得易于氧化, 形成二硫键连接的 Apo-2L 二聚体, 其凋亡活性会降低。由于金属结合位点显示出埋藏在 Apo-2L 三聚体结构中且预计不会和受体接触, 该资料显示二价金属离子的结合对保持三聚体结构和 Apo-2L 的稳定性是重要的。

为绘出 Apo-2 配体的受体结合位点, 通过丙氨酸扫描诱变鉴定对于受体结合和生物活性有重要意义的氨基酸残基。(Cunningham 等, 科学, 244: 1081-1085(1989))。在 Arg149, Gln205, Val207, Tyr216, Glu236 或 Tyr237 处的单个丙氨酸取代导致在生物检测中凋亡活性降低 5 倍以上, 并且对受体的亲和力也降低了(参见实施例 3 和 4)。对 Apo-2L 与 DR4, DR5, DcR2 的结合影响最大的是: 在残基 Gln205, Tyr216, Glu236 或 Tyr237 处的丙氨酸取代, 这会导致对全部三种受体的亲和力降低至少 5 倍。所有这些显现出凋亡活性降低的变体同样显示出与 DR4 或 DR5(或两者)的结合受到损害, 这表明凋亡活性需要受体结合。

残基 Asp218 和 Asp269 的丙氨酸取代产生凋亡活性提高的 Apo-2 配体变体。(参见实施例 4)。残基 Asp218 靠近凋亡活性所需残基之一的 Tyr216。与低解像度 Apo-2L 结构(114-281 位的形式)的对比表明 216-220 环的构象没有因 D218A 突变的出现而显著改变。

将该诱变分析的结果绘制为 Apo-2L 三聚体结构, 发现 Apo-2L 上受体结合和生物活性的功能性表位位于由两个单体连接而形成的表面(参见图 5), 近似于 TNF- $\beta$ 。位于单体-单体界面的浅沟形成受体结合位点, 使这两种单体对该结合位点均有贡献。TNF- $\alpha$ 中的残基 Arg32, Tyr87 和 Asp143(对应于 Apo-2L 的 Arg158, Tyr216, Asp267 位残基)同样对 TNF 受体的结合起作用。(Goh 等, 蛋白质工程(Protein Engineering), 4: 785-791(1991))。作为对照, TNF- $\alpha$ 中的残基(对应于 Apo-2L 的 Gln205, Glu236, Tyr237 位残

基)在 TNFR 结合中只起很小的作用。所以,在 TNF- $\alpha$ 中三聚体结构的底部对受体结合起最重要的作用,但在 Apo-2L 中,在三聚体结构顶部也有重要的受体结合残基。在已知结构的 TNF 家族成员中,Apo-2L 的独特性表现在它与其靶受体之间具有更大和更宽的相互作用接触表面。相信优选的 Apo-2L 变体将在对应于 Arg149, Gln205, Val207, Tyr216, Glu236 和/或 Tyr237 的位点含有天然残基(即未突变的)。

\*\*\*\*\*

以下说明书涉及通过培育宿主细胞来生产 Apo-2 配体并从细胞培养中回收多肽的方法,所述宿主细胞已用含有编码 Apo-2 配体的核酸的载体转化或转染。

可从认为具有 Apo-2 配体 mRNA 且将其以可检测水平表达的组织中制备 cDNA 文库,然后从任意这样的 cDNA 文库中得到编码 Apo-2 配体的 DNA。相应地,可从由人组织制备的 cDNA 文库中方便地得到人 Apo-2 配体 DNA,例如 WO97/25428 中记述的人胎盘 cDNA 的噬菌体文库。编码 Apo-2 配体的基因也可从基因组文库获得或通过寡核苷酸合成的方法得到。

可使用设计为鉴定目的基因或其编码蛋白的探针(如 Apo-2 配体的抗体或至少约 20-80 个碱基的寡核苷酸)来筛选文库。用所选探针筛选 cDNA 或基因组文库可按照标准方法进行,如 Sambrook 等,分子克隆:实验室手册(纽约:冷泉港实验室出版,1989)中的方法。分离编码 Apo-2 配体基因的备选方法是采用 PCR 的方法(Sambrook 等,出处同上;Dieffenbach 等,PCR 引物:实验室手册(冷泉港实验室出版,1995))。

Apo-2 配体的氨基酸序列片段或变体的制备方法可以是:在 Apo-2 配体 DNA 中引入适合的核苷酸改变,或合成所要的 Apo-2 配体的多肽。这类片段或变体是在胞内区域,跨膜区域,或胞外区域,或图 1 所示全长度 Apo-2 配体的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)的一或两端上或之内出现残基的插入,取代,和/或缺失。可进行插入,取代,和/或缺失的任意组合以得到最终的构建体,以使最终的构建体具有,例如,本文定义的所需生物活性或凋亡活性。在一优选的实施例中,所述片段或变体与本文鉴定为 Apo-2 配体的胞内区域,跨膜区域,或胞外区域,或全长的序列有至少约 80% 的氨基酸序列同一性,更优选至少约 90% 的序列同一性,更优选至少 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 的同一性。氨基酸改变可能还会改变 Apo-2 配体的转录后加工,

例如改变糖基化位点的数量或位置或改变膜锚着特征。

上述的 Apo-2 配体序列的改变可利用美国专利 5364934 中提出的针对保守和非保守突变的技术和指南进行。这些包括寡核苷酸介导的(定点)诱变, 丙氨酸扫描和 PCR 诱变。

可采用扫描氨基酸分析证实沿着邻近序列的一或多个氨基酸。优选的扫描氨基酸是相对较小的, 中性氨基酸。这类氨基酸包括丙氨酸, 甘氨酸, 丝氨酸和半胱氨酸。在此组中丙氨酸是典型的优选扫描氨基酸, 这是因为它去除了 $\beta$ -C 外的支链, 且较不可能改变变体的主链构象(Cunningham 等, 科学, 244: 1081(1989))。优选丙氨酸也是因为它是最常见的氨基酸。此外, 它频繁出现在埋藏和暴露位置(Creighton, 蛋白质(The Proteins), (W.H.Freeman&Co., NY); Chothia, 分子生物学杂志(J.Mol.Biol.), 150: 1(1976))。

本发明特定的 Apo-2L 变体包括 Apo-2 配体多肽, 所述多肽包含在下表 I 中列出的一或多个丙氨酸取代。这类 Apo-2 配体变体通常包含一个非自然产生的氨基酸序列, 该序列与天然 Apo-2L 氨基酸序列(如图 1: SEQ ID NO: 1 所示的 Apo-2L 全长序列或其成熟形式或其胞外区序列)有至少一或多个氨基酸不同。任选地, Apo-2L 变体中与天然 Apo-2L 相比不同的一或多个氨基酸将包括例如那些在表 1 中列出的氨基酸取代。本发明的 Apo-2L 变体包括可溶性变体, 其含有图 1(SEQ ID NO: 1)的 91-281, 92-281, 95-281 或 114-281 位残基, 并且具有表 1 所列的一或多个氨基酸取代。优选的 Apo-2L 变体包括含有图 1(SEQ ID NO: 1)中 91-281, 92-281, 95-281 或 114-281 位残基, 并且具有表 1 所列增强生物活性, 如受体结合之一或多个氨基酸取代的变体。

同样包括在本发明范围内的 Apo-2 配体序列的改变涉及氨基末端衍生或修饰形式。这类 Apo-2 配体序列包括本发明所述在多肽序列的 N-末端具有蛋氨酸或修饰过的蛋氨酸(如甲酰甲硫氨酰化或其它分段甲硫氨酰化的类别)的任一 Apo-2 配体多肽。

编码天然或变体 Apo-2 配体的核酸(如 cDNA 或基因组 DNA)可插入到复制载体进行进一步克隆(DNA 扩增)或表达。各种载体都是公开可得的。载体组件通常包括, 但不限于, 下列的一或多个: 信号序列, 复制起点, 一或多个标记基因, 增强子元件, 启动子, 转录终止序列, 下面对每一个

进行了记述。可采用的任选信号序列，复制起点，标记基因，增强子元件和转录终止序列为本领域所公知，详述于 WO 97/25428。

表达和克隆载体通常包括，可被宿主有机体识别并与 Apo-2 配体核酸序列可操纵连接的启动子。启动子是不翻译序列，位于结构基因起始密码子的上游(5') (通常在 100 到 1000bp 以内)，可控制特定核酸序列，如与之可操纵连接的 Apo-2 配体核酸序列的转录和翻译。这类启动子典型地分为两类，诱导型和组成型。诱导型启动子响应培养环境中的一些改变，如某种营养成分的存在或缺少，或温度变化而调控 DNA 转录水平的提高。现在为多种潜在的宿主细胞识别的大量的启动子已熟知。通过采用限制酶消化从来源 DNA 取出启动子，然后将分离的启动子序列插入载体，可将这些启动子与 Apo-2 配体操纵连接。天然 Apo-2 配体启动子序列和许多异源启动子都可用于指导 Apo-2 配体 DNA 的扩增和/或表达。

适合原核生物和真核生物宿主所用的启动子为本领域所熟知，WO97/25428 中有详述。

在大肠杆菌中生产可溶性 Apo-2L 的优选方法采用诱导型启动子调节产物的表达。使用可控的，诱导型的启动子可以在诱导产物表达和大量产物积累(至宿主可能不能很好耐受的程度)之前使细胞培养生长到所需密度。

本申请人评价了用于表达 Apo-2L(114-281 位)的三种诱导型启动子系统(T7 聚合酶，trp 和碱性磷酸酶(AP))。采用这三种启动子中每一个都可从收获的细胞团中得到大量可溶性的，具生物活性的 Apo-2L 三聚体。在检测的这三种诱导型启动子系统中优选 AP 启动子，因为它可进行更严格地启动子控制，且在收获的细胞团中得到了更高的细胞密度和滴度。

采用标准连接技术构建包含一或多个上列部件的合适载体。切割，修剪，并重新连接分离的质粒或 DNA 片段为所需的形式以便形成质粒。

为分析确认构建质粒中的正确序列，使用连接混合物转化大肠杆菌 K12 菌株 294(ATCC 31446)，通过氨苄青霉素或四环霉素抗性挑选相应的成功的转化体。制备来自转化体的质粒，通过限制性内切酶消化分析，和/或用本领域所知的标准技术进行测序。(参见，例如 Messing 等，核酸研究(Nucleic Acids Res.)，9: 309(1981)); Maxam 等，酶学方法(Methods in Enzymology)，65: 499(1980))。

可采用用于在哺乳动物细胞中瞬时表达 Apo-2 配体编码 DNA 的表达

载体。通常，瞬时表达涉及使用可在宿主细胞中有效复制的表达载体，使宿主细胞积累该表达载体的许多拷贝，合成高水平的为该表达载体编码的所需多肽(Sambrook 等，出处同上)。包含合适的表达载体和宿主细胞的瞬时表达系统可以便利地对由克隆的 DNA 编码的多肽进行阳性鉴定，同样可以快速筛选具有所要生物或生理性质的多肽。这样，瞬时表达系统特别有用于本发明目的：鉴定具有生物活性的 Apo-2 配体的类似物和变体。

其它适于在重组脊椎动物细胞培养中合成 Apo-2 配体的方法，载体和宿主细胞记述于 Gething 等，自然，293: 620-625(1981); Mantei 等，自然，281: 40-46(1979); EP117060 和 EP117058 中。

适于在本文所述载体中克隆或表达 DNA 的宿主细胞包括原核生物，酵母，或高等真核生物细胞。适于此目的的原核生物包括，但不限于真细菌，如革兰氏阴性或阳性生物，如肠杆菌科如埃希氏菌属，如大肠杆菌，肠杆菌属，欧文氏菌属，克雷伯氏菌属，变形菌属，沙门氏菌属，如鼠伤寒沙门氏菌，沙雷氏菌属，如粘质沙雷氏菌，志贺氏菌属，芽孢杆菌属，如枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌(如 1989 年 4 月 12 日的 DD266710 公开的地衣芽孢杆菌 41P)，假单胞菌属如铜绿假单胞菌，链霉菌属。优选地，宿主细胞分泌蛋白水解酶的量应最小。

本发明优选的宿主细胞是大肠杆菌。大肠杆菌特别适于 Apo-2 配体(114-281 位)的表达，其为小于 20kd 且不需糖基化的多肽。作为生产宿主，大肠杆菌可培养到相对高的细胞密度，且相对高水平地生产异源蛋白。

除原核生物外，真核微生物如丝状真菌或酵母也适于作编码 Apo-2 配体的载体的克隆或表达宿主。适合于糖基化 Apo-2 配体表达的宿主细胞得自多细胞生物。所有这些宿主细胞的例子，包括 CHO 细胞，如 WO97/25428 所述。

用上述生产 Apo-2 配体的表达载体或克隆载体转染并优选转化宿主细胞，所述细胞培养在已经修饰适于诱导启动子，选择转化体，或扩增编码所需序列的基因的培养基中。

转染指表达载体被宿主细胞吸收，而无论是否实际表达了任何编码序列。多种转染方法为普通技术人员所熟知，例如，CaPO<sub>4</sub> 和电穿孔。通常当此载体的作用的任何指示表现在宿主细胞中时就可认定转染成功。

转化意味着将 DNA 引入到生物中，使该 DNA 可作为染色体外元件或

通过染色体整合体而复制。根据所用宿主细胞，采用适于这类细胞的标准技术进行转化。Sambrook 等(出处同上)所述利用了氯化钙的钙处理或电穿孔通常可用于原核生物或其它具有实际的细胞壁屏障的细胞。根癌农杆菌感染可用于特定植物细胞的转化，如 Shaw 等，基因，23: 315(1983)和 1989 年 6 月 29 日公开的 WO89/05859。此外，可如 1991 年 1 月 10 日公开的 WO 91/00358 所述采用超声处理来转染植物。

对于没有这类细胞壁的哺乳动物细胞，可使用 Graham 和 van der Eb, *Virology*, 52: 456-457(1978)所述的磷酸钙沉淀的方法。US4399216 记述了哺乳动物细胞宿主系统转化的各个方面。典型地，可按照 Van Solingen 等, *J.Bact.*, 130: 946(1977)和 Hsiao 等, 美国国家科学院院报, 76: 3829(1979)转化酵母。但也可使用其它将 DNA 引入细胞的方法，如核显微注射，电穿孔，细菌原生质体与完整细胞融合，或聚阳离子，如 polybrene，聚鸟氨酸。对于转化哺乳动物细胞的各种技术，参见 Keown 等, *酶学方法*, 185: 527-537(1990)和 Mansour 等, *自然*, 336: 348-352(1998)。

用于生产 Apo-2 配体的原核生物细胞可培养在适合的培养基中，如 Sambrook 等，出处同上，所述。在下面的实施例中还给出了用于培养大肠杆菌的特殊形式的培养基。用于生产 Apo-2 配体的哺乳动物宿主细胞可培养在多种培养基中。

市售培养基有 Ham' s F10(Sigma)，极限必需培养基(“MEM”，Sigma)，RPMI-1640(Sigma)，Dulbecco' s Modified Eagles' s Medium(“DMEM”，Sigma)。任何这类培养基可在必要时补充激素和/或其它生长因子(如胰岛素，运铁蛋白或表皮生长因子)，盐(如氯化钠，钙，镁和磷酸)，缓冲液(如 HEPES)，核苷(如腺嘌呤和胸腺嘧啶)，抗生素(如遗传霉素™)，痕量元素(定义为无机化合物，通常最终浓度为 $\mu\text{mol}$  级)，以及葡萄糖或等效的能源。任何其它必需的补充物质都按照本领域技术人员所熟知的合适的浓度添加其中。培养条件，如温度，pH 等等都与前面所选用于表达的宿主细胞的条件相同，且对本领域一般技术人员来说是显而易见的。

通常，在哺乳动物细胞生物技术：实践方法，M.Butler，编(IRL 出版，1991)中可找到哺乳动物细胞培养生产能力最大化的原理，方法，和实践技术。



按照本发明，用于宿主细胞培养或发酵的培养基中可加入或包括一或多种二价金属离子。存在于或加入到培养基中的二价金属离子的浓度优选足以提高保存稳定性，提高溶解性，或有助于形成稳定的受一或多个锌离子调节的 Apo-2 配体三聚体。加入的二价金属离子的量部分有赖于培养液中的宿主细胞密度或宿主细胞对这些二价金属离子的潜在敏感性。当培养液中宿主细胞密度较高时，提高二价金属离子的浓度较有利。如果在宿主细胞的产物表达期间或之后加入二价金属离子，可随宿主细胞产物表达的增加而调整或提高二价金属离子浓度。通常认为常用细胞培养基中的痕量的二价金属离子不足以促使稳定三聚体的形成。所以，优选如本文所述进一步添加二价金属离子。

优选在宿主细胞生长阶段将二价金属离子加入到培养基中时，其浓度不会对宿主细胞生长有不利或负面影响。在摇瓶培养中，观察到  $ZnSO_4$  的加入浓度大于 1mM 时会导致宿主细胞密度低。本领域技术人员理解，细菌细胞能与细胞基质形成金属离子复合物有效整合金属离子。如此，在细胞培养液中，优选在细胞生长阶段后(达到所要的宿主细胞密度后)或恰好在宿主细胞的产物表达之前加入所选的二价金属离子。为确保存在足够量的二价金属离子，可能要在产物表达阶段加入额外的二价金属离子。

培养基中二价金属离子的浓度不应超过对宿主细胞有毒害作用的浓度。在本发明使用大肠杆菌为宿主细胞的方法中，优选培养基中二价金属离子浓度不超过约 1mM(优选 $\leq$ 1mM)。更优选所述浓度为约 50-250 $\mu$ mol。最优选这类方法中的二价金属离子是硫酸锌。二价金属离子需要加入的量应使金属离子和 Apo-2 配体三聚体摩尔比为 1: 1。

二价金属离子可以任何可接受的形式加入到细胞培养液。例如，可用水配制金属离子溶液，然后将二价金属离子溶液加入或流加到培养基中。

在本发明的一个实施例中，所选的 Apo-2 配体(114-281 位)在大肠杆菌中表达，且在细胞培养或发酵期间，设定工艺参数使得在培养物约为 40-50gm/L 细胞干重时以约 1.0-3.0mmol/L-min 的氧摄入率进行细胞内各种活动。优选新合成的新生 Apo-2 配体多肽有足够的时间使 Apo-2L 单体进行正确的蛋白折叠和三聚体化。发酵培养的生长阶段优选在 30 $^{\circ}$ C 进行。在产物表达即将出现之前，工艺温度控制点可保持在 30 $^{\circ}$ C 或下移到 25 $^{\circ}$ C 以便随后的发酵。任选地，可能需要提高培养中细胞密度，上述参数也要相应调整(或

提高)。例如，提高培养中细胞密度以提高单位体积产量可能是有利的。如果需要，本领域技术人员能通过常规技术递增细胞密度并且递增上述的参数。

可直接测定样品中 Apo-2L 的表达，例如采用合适的标记探针，根据本文提供的序列通过常规 Southern 印迹，定量 mRNA 的转录的 Northern 印迹(Thomas, 美国国家科学院院报, 77: 5201-5205(1980)), 斑点印迹(DNA 分析), 或原位杂交等方法。可使用多种标记, 最常用的是放射性同位素, 具体是  $^{32}\text{P}$ 。但是也可采用其它方法, 如利用生物素修饰的核苷酸以引入多核苷酸。然后生物素成为结合抗生物素蛋白或抗体的位点, 后者可用多种标记, 如放射性核苷酸, 荧光剂或酶标记。替代地, 可使用能识别特定的双链体(duplex), 包括 DNA 双链体, RNA 双链体, 和 DNA-RNA 杂合双链体或 DNA-蛋白双链体的抗体。抗体可被标记且可在所述双链体与某一表面结合处进行检测, 从而根据表面双链体的形成检测到与该双链体结合的抗体。

或者可通过免疫学方法检测基因表达, 如通过细胞或组织切片的免疫组织化学染色, 细胞培养液或体液的成分分析, 直接定量基因产物的表达。采用免疫组织化学染色技术, 制备细胞样品的典型方法为脱水和固定, 然后与特异性针对所结合的基因产物的标记抗体反应, 其中所述标记是通常可目测检测的, 如酶标记, 荧光标记, 发光标记等。

免疫组织化学染色和/或样品液分析所用抗体可以是单克隆的或多克隆的, 可在任何哺乳动物中制备。抗体制备成针对天然 Apo-2 配体多肽或针对基于本文所述 DNA 序列的合成肽或针对与 Apo-2 配体 DNA 融合并编码特异性抗体表位的外源序列的抗体较为方便。

尽管 Apo-2 配体当没有分泌信号而直接产生时也可从宿主细胞裂解液回收, 优选从培养液作为分泌型多肽回收。如果 Apo-2 配体是膜结合型, 可使用合适的清洗剂(如 Triton-X100)从膜释放, 或可通过酶解释放其胞外区。

当 Apo-2 配体产生于重组细胞而不是一种人类细胞中时, 该 Apo-2 配体不含人源蛋白或多肽。但是, 通常从重组细胞蛋白或多肽中回收或纯化 Apo-2 配体以得到基本均质的 Apo-2 配体制品是必需的。第一步, 离心培养液或裂解液以除去颗粒状细胞碎片。然后从可溶性杂质蛋白和多肽中纯

化 Apo-2 配体, 下面的步骤可作为纯化步骤举例: 在离子交换柱上分级分离; 乙醇沉淀; 反相 HPLC; 硅或阳离子交换树脂如 DEAE 或 CM 层析; 层析聚焦; SDS-PAGE; 硫酸铵沉淀; 采用如 Sephadex G-75 的凝胶过滤; 渗滤和蛋白 A Sephrose 柱除去杂质如 IgG。在一优选的实施例中, 可采用亲和层析分离 Apo-2 配体。以与天然 Apo-2 配体相同的方式回收发生了残基缺失, 插入或取代的 Apo-2 配体片段或变体, 并考虑由所述变异引起性质的任何实质性变化。例如, 制备 Apo-2 配体与另一蛋白或多肽, 例如细菌或病毒抗原的融合体利于纯化; 可用含有所述抗原的抗体的免疫亲和柱吸附该融合多肽。

蛋白酶抑制因子如苯甲基磺酰氟(PMSF)可用于纯化过程中抑制蛋白水解性降解, 还可使用抗生素预防外来杂质的生长。本领域技术人员会理解适于天然 Apo-2 配体的纯化方法可能需要进行改动以适应重组细胞培养中表达的 Apo-2 配体或其变体的特性的改变。

在任何这类纯化过程中, 可能需要将回收的 Apo-2 配体暴露于二价金属离子溶液或含有一或多种二价金属离子的纯化材料(如层析介质或载体)。在一优选的实施例中, 在 Apo-2 配体的纯化或回收过程中使用二价金属离子和/或还原剂任选地, 在 Apo-2L 的回收或纯化期间, 二价金属离子和还原剂, 如 DTT 或 BME 都可使用。认为在回收或纯化过程中使用二价金属离子有助于 Apo-2L 三聚体的稳定性或保持细胞培养过程中形成的 Apo-2L 三聚体。

从原核生物宿主细胞(最优选从细菌宿主细胞)回收和纯化所表达的 Apo-2L 的优选方法包括如下步骤: (a)从大肠杆菌细胞提取 Apo-2L(胞内型); (b)在含二价金属离子和/或还原剂的缓冲液中稳定正确折叠的 Apo-2L; (c)通过依次使用阳离子交换剂, 羟基磷灰石和疏水作用层析纯化 Apo-2L, 和(d)从每一这类层析载体上用含二价金属离子和/或还原剂的缓冲液选择性洗脱 Apo-2L。此类方法中所用二价金属离子和还原剂可包括硫酸锌, 氯化锌, 硫酸钴, DTT 和 BME, 更优选硫酸锌或 DTT。下面的实施例 8 更为详尽地记述了此回收和纯化方法。

如上所述, 除 Apo-2 配体外, 本发明的这类方法还适用于各种其它蛋白, 所述蛋白的三聚体形式具有改进的活性或需要蛋白的三聚体化以具有活性。

\*\*\*\*\*

本发明也提供了含有 Apo-2 配体和一或多种二价金属离子的制剂。相信这类制剂特别适用于保存(和维持 Apo-2 配体的三聚体化), 以及用于治疗性给药。优选的制剂包含 Apo-2 配体和锌或钴。更优选地, 制剂将包含 Apo-2 配体和锌或钴溶液, 其中所述金属与蛋白的摩尔比小于 2X。如果需要水性的悬浮液, 制剂中二价金属离子对蛋白的摩尔比大于 2X。采用硫酸锌, 申请人发现 Apo-2 配体(114-281 位)沉淀并在制剂中硫酸锌浓度约为 100mM 时形成水性悬浮液。本领域技术人员会理解摩尔比大于 2X 时, 制剂中二价金属离子浓度会在较高范围, 此时该金属会对制剂有害或不能作为治疗用制剂。

可采用已知技术制备所述制剂。例如, 可通过凝胶过滤柱上的缓冲液交换来制备 Apo-2 配体制剂。

通常, 在制剂中采用合适量的可药用盐以使该制剂为等渗。可药用载体的例子包括生理盐水, Ringer' s 溶液和葡萄糖溶液。优选制剂的 pH 约为 6-9, 更优选约 7-7.5。优选地, 所选 pH 可确保维持锌与 Apo-2 配体结合。如果 pH 太高或太低, 锌不能保持与 Apo-2 配体的结合, 结果会形成 Apo-2 配体的二聚体形式。本领域技术人员知道, 某些载体可能更优选依赖于, 例如, 给药途径以及 Apo-2 配体和二价金属离子的浓度。

Apo-2L 的药用组合物的制备可以是具有合适纯度的所需 Apo-2 配体分子与任意的可药用载体, 赋形剂, 或稳定剂混合(Remington' s 药用科学, 16<sup>th</sup> 版, Oslo, A 编(1980)), 制成冻干制剂, 水溶液或水性悬浮液。可接受的载体, 赋形剂或稳定剂优选在所用剂量和浓度下对接受者无毒, 它们包括缓冲液如 Tris, HEPES, PIPES, 磷酸, 柠檬酸和其它有机酸; 抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸; 防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化乙烷双胺; 苯扎氯胺, 氯化苄乙氧铵; 酚, 丁醇或苄醇; 对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间-甲酚); 低分子量(小于 10 个残基)多肽; 蛋白如血清白蛋白, 明胶, 或免疫球蛋白; 亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸如甘氨酸, 谷氨酰胺, 天冬酰胺, 组氨酸, 精氨酸, 或赖氨酸; 单糖, 二糖, 其它碳水化合物化合物包括葡萄糖, 甘露糖或糊精; 糖类如蔗糖, 甘露醇, 海藻糖或山梨糖醇; 成盐反离子如钠; 和/或非离子表面活性剂如 TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

其它这类载体包括离子交换剂，矾土，硬脂酸铝，卵磷脂，血清蛋白，如人血清白蛋白，缓冲物质如甘氨酸，山梨酸，山梨酸钾，饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物，水，盐或电解质如硫酸鱼精蛋白，磷酸氢二钠，磷酸氢钾，氯化钠，硅胶，三硅酸镁，聚乙烯吡咯烷酮，和基于纤维素的物质。局部用药的载体或基于凝胶的载体包括多糖如羧甲基纤维素钠或甲基纤维素钠，聚乙烯吡咯烷酮，聚丙烯酸酯，聚氧乙烯-聚氧丙烯-嵌段共聚物，聚乙二醇，木蜡醇。对所有给药而言，适合用常规的延效型制剂。这类剂型包括，例如微胶囊，纳米胶囊(nano-capsules)，脂质体，药膏，吸入剂型，喷鼻剂型(nose spray)，舌下片剂和控释制剂。

制剂中 Apo-2 配体的有效剂量可根据经验确定，这类确定可由本领域技术人员完成。现认为 Apo-2 配体的有效剂量为每天约  $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $100\text{mg}/\text{kg}$  体重或更多。剂量的种间缩放比例可以按本领域已知方式进行，如 Mordenti 等, *Pharmaceut.Res.*, 8: 1351(1991)中所述。本领域技术人员理解 Apo-2 配体给药剂量将根据，例如要接受 Apo-2 配体的哺乳动物，给药途径，和给哺乳动物的其它药物或治疗的不同而不同。

用于体内给药的 Apo-2L 必须是无菌的。这可以在冻干和重新调配之前或之后通过除菌滤膜过滤而轻易实现。全身性给药的 Apo-2 配体通常以冻干或溶液形式保存。冻干形式的 Apo-2 配体通常与其它成分一起配制，临用时再用适当稀释剂重建。Apo-2 配体的液体制剂可以是无菌，澄清，无色未加防腐剂的溶液，盛放于一次剂量的小瓶中用于皮下注射。

治疗用 Apo-2 配体制剂通常存放于有无菌出入口的容器中，例如，静脉注射液袋或带有能通过皮下注射针穿刺的塞子的小瓶。制剂优选通过多次的静脉(i.v.)，皮下(s.c.)，肌肉(i.m.)注射或输注给药，或作为适用于鼻内或肺内输送的气溶胶而给药(肺内输送参见例如 EP257956)。

Apo-2 配体也可以以控释制剂形式给药。控释制剂的适当实例包括含有所述蛋白的固态疏水聚合物的半通透性基质，所述基质为具有一定形状制品，如膜或微胶囊。控释基质实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟乙基-异丁烯酸酯)(如 Langer 等, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277(1981)和 Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105(1982)所述)或聚(乙烯醇)，聚交酯(US3,773,919, EP58481)，L-谷氨酸与 $\gamma$ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物(Sidman 等, *Biopolymers*, 22: 547-556(1983))，不可降解的乙烯乙酸乙酯(Langer 等，出处同上)，可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 Lupron Depot(由乳酸-羟基乙

酸共聚物和醋酸亮丙瑞林(leuprolide)组成的可注射的微球体), 以及聚 D-(-)-3-羟丁酸(EP133988)。

本发明所述 Apo-2 配体及其制剂可用于许多治疗和非治疗用途。其中有治疗多种癌症(如上)和病毒性病症的方法。这类治疗和非治疗用途如 WO97/25428 和 WO97/01633 中所述。

包含可用于上述疾病的诊断或治疗的 Apo-2 配体的一种生产制品, 如试剂盒包括至少一个容器和一个标签。适当的容器有瓶子, 小瓶, 注射器和试管等。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。该容器可内含一种能有效诊断或治疗目标疾病的 Apo-2L 制剂, 并具有无菌出入口(例如该容器可以是静脉注射液袋或带有能通过皮下注射针穿刺的塞子的小瓶)。容器表面的或所附的标签将指明所述制剂可用于诊断或治疗所选疾病。所述制品还可包含第二个容器, 该容器中含有可药用缓冲液, 如磷酸盐缓冲液, Ringer's 溶液和葡萄糖溶液。还可包括具有商业需要以及符合用户需要的材料, 包括其它缓冲液, 稀释剂, 滤器, 针头, 注射器和用于指导使用的包装插页。所述制品还可包含带有上述另一活性制剂的第二个或第三个容器。

下面的实施例只用于举例说明, 不应视为对本发明的限制。

本发明中引用的所有发明和文献都全文引入作为参考。

### 实施例

实施例中所指市售试剂除非特别指明, 都按照生产商手册使用。按照 ATCC 保藏号码在下列实施例和说明书全文中定义的细胞来源是美国典型培养物保藏中心, Manassas, Virginia。

#### 实施例 1

##### Apo-2L 变体的表达和纯化

通过对质粒(pAPOK5)(参见图 13)进行寡核苷酸指导的诱变来构建 Apo-2L 的丙氨酸取代变体(Kunkel 等, 美国国家科学院院报, 82: 488-492(1985)); Kunkel, 酶学方法, 154: 367-382(1987)), 所述质粒设计为可在 *trp* 启动子控制下于大肠杆菌细胞内表达 Apo-2L 的 91-281 位氨基酸。借助 PCR 构建 pAPOK5 以便将 Apo-2L cDNA(编码 91-281 位残基) 克隆进带有 *trp* 启动子的质粒 pS1162。用该突变质粒转化的大肠杆菌菌株 294 在 37°C 下 250ml M9 加 100 $\mu$ m ZnSO<sub>4</sub> 的培养基中培养到对数期中期, 加入 25 $\mu$ g /mL  $\beta$ -吡啶丙烯酸诱导表达, 然后将培养物于 30°C 下培养过夜。通过离心收获细胞并冷冻。

在 6 倍体积 0.1M Tris-HCl pH8, 0.2M NaCl, 5mM DTT, 1mM EDTA 中匀浆上述细胞团, 在加入有镍的 hiTRAT 螯合柱(Pharmacia)上通过 IMAC 从可溶性级分分离 Apo-2L。Apo-2L 对固定化的金属有弱亲和性, 可用低浓度的咪唑洗脱。在 SP hiTRAP 柱(Pharmacia)上通过阳离子交换层析进行最后的纯化。测定吸光度并以  $e_{280}$  为  $1.4 \text{ mg}^{-1}\text{ml}\cdot\text{cm}^{-1}$  来确定纯化 Apo-2L 变体的浓度。

表 1 中列出了通过寡核苷酸指导的诱变证实的 Apo-2L 变体。

表 1

Apo-2L 变体的受体结合和凋亡活性<sup>a</sup>

比例(变体/野生型)

变体	DR4-IgG $K_D$	DR5-IgG $K_D$	DcR2-IgG $K_D$	凋亡 $ED_{50}$
$\Delta$ zinc	6.3	6.6	11.2	90.0
R130A	3	2.7	1.3	1.9
N134A	1.0	0.8	1.0	1.5
L136A	3.3	1.5	1.4	0.8
S138A	2.1	1.3	2.2	1.2
N140A	1.4	1.9	0.9	1.1
S141A	2.3	1.3	2.4	1.3
K142A	2.6	1.9	2.7	2.0
N143A	2.1	2.0	1.3	1.5
R149A	1.8	2.2	1.6	3.5
S153A	2.3	1.2	2.1	0.9
E155A	1.6	2	1.4	2.5
R158A	2.4	1.3	6.5	1.4
S159A	4.7	2.2	3.4	0.9
R170A	1.1	2.2	0.6	0.9
K179A	0.9	0.9	1.1	2.0
R191A	7.8	3.9	3.2	2.2
Q193A	1.7	1.1	1.2	2.2
E195A	4.6	1.4	2.6	0.8
K197D	2	2.1	2.9	1.1
K201A	4.3	2.7	10	2.5
N202A	2.5	2.5	1.9	3.2
D203A	1.5	1.1	0.6	0.5
Q205A	13.1	6.3	10.8	690
V207A	2.2	2.8	2.1	5.6
Y213A	1.3	1	1.5	1.2
Y216A	14.5	8.9	9.0	320
D218A	1.3	1.9	1.1	0.3
C230S	4.1	7.1	6.7	8.0
E236A	6.0	9.8	8.4	10.8
Y237A	7.3	5.0	48	8.3
Y240A	1.8	0.8	1.8	1.1
K251A	1.9	2	2.4	0.8
S259A	4.3	2.0	1.4	3.3
H264A	1.9	2.0	1.4	3.1
D267A	5.7	1.9	5.5	1.11
D269A	1.7	0.5	0.9	0.2

<sup>a</sup>所示数值代表了变体对野生型的比例。对野生型 Apo-2L(91-281 位残基)而言, DR4-IgG, DR5-IgG, DcR2-IgG 的 Kd 值是  $0.8\pm 0.3\text{nM}$ ,  $0.9\pm 0.4\text{nM}$ ,  $0.3\pm 0.2\text{nM}$ 。在凋亡试验中野生型 Apo-2L(91-281 位残基)的  $ED_{50}$  为  $24\pm 3.1\text{ng/mL}$ , 而 Apo-2L 的 114-281 位形式的活性稍微高一些,  $ED_{50}$  为  $16.0\pm 3.6\text{ng/mL}$ 。只有与野生型的值相比两倍的改变才认为是显著的。

## 实施例 2

### Apo-2L 的结晶学分析

20°C 下 Apo-2L 的晶体(114-281 位残基)在位于一孔 50% peg 2K MME 溶液之上的 70 $\mu\text{L}$  静止液滴(sitting drop)中生长, 该液滴中含有 40 $\mu\text{L}$  蛋白(浓度 2.6mg/mL, 在 20mM Tris, pH8.0 中), 20 $\mu\text{L}$  50mM Tris pH8.0, 10 $\mu\text{L}$  8% peg 2K MME, 所述晶体属于空间群 P63, 其中在不对称单位中具有两个单体, 晶胞常数  $a=72.5$ ,  $c=140$  埃并在室温下衍射为 3.9 埃。D218A 变体的晶体(参见实施例 1)4°C 下在位于一孔 32% MPD 溶液之上的 14 $\mu\text{L}$  静止液滴中生长, 该液滴中含有 4 $\mu\text{L}$  4% MPD 和 10 $\mu\text{L}$  蛋白(1.7mg/ml, 在 20mM Tris, pH7.5 中), 所述晶体属于空间群 R32, 其中每个不对称单位有一个单体, 晶胞参数 66.4,  $c=197.7$  埃, -180°C 经 synchrotron radiation 衍射为 1.3 埃。在装备有 MAR 检测器并具有 DENZO/SCALEPACK 的 Rigaku 旋转阳极 X-射线发生器上测定 Apo-2L(114-281 位残基)衍射为 3.9 埃和 D218A 变体衍射为 1.9 埃的数据组(Otwinowski 等, Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing (eds.Sawyer 等), pp.56-62 Daresbury Laboratory, Daresbury, England, 1993)。在 Argonne National Labs 的高级光子源(Advanced Photon Source)上测定 D218A 变体的 1.3 埃数据组。用 HKL2000/SCALEPACK 处理且 Rsym 为 6.4% (在 1.35-1.30shell 中 34%), 具有 100% 完整性和 12 倍冗余度,  $I/\langle I \rangle=12.4$ 。

采用 Amore 程序借助基于 TNF- $\alpha$ (pdb 编码 1TNF)的模式通过分子堆放解释天然 Apo-2L 结构(Acta Cryst. D50: 760-763(1994)), 并采用严格 2 倍非晶体学约束使之精细化(Brunger, X-PLOR: 版本 3.1, Yale Press, New Haven 1987), 直到  $R_{\text{free}}$  为 35%。用 Refmac 和 SHELXL 将该结构针对 1.9 埃数据组精细化直到  $R_{\text{free}}$  为 25%, 并最终对 1.3 埃数据进行精细化(Sheldrick 等, 酶学方法, pp.319-343, Academic Press, San Diego 1997) 直到  $R_{\text{free}}$  为 22% 且  $R_{\text{factor}}$  为 20%, 其具有较好几何形状(rmsd 键 0.011 埃, rmsd 角度 1.7°)。



所有的残基都在 Ramachandran 图中允许的区域。在精细化过程中，在三聚体轴上对称相关的 Cys230 之间可观察到一个 28 sigma 的电子密度峰值。此密度以锌离子作模型，用 B-系数精细化为 10。据认为在三聚体轴上的氯分子作为锌的第四个配体而存在。最终的模型由带有 170 个溶剂分子和一个锌离子和一个氯离子的 120-130, 142-194, 203-281 位残基组成。91-119, 131-141 和 195-202 位残基为无序状态。几种晶体的 N-末端测序证实 N-末端是完整的，而起始物质的质谱分析表明其为全长。

图 2C 总结了结晶学数据。

### 实施例 3

#### Apo-2L 变体的受体结合亲和性的确定

通过在 Pharmacia BIAcore 1000 上进行的表面等离子体激元共振 (SPR) 测量法测定 Apo-2L 变体 (参见表 1) 与固相受体免疫粘附素结合的解离常数 (Kd)。

分别依照 1998 年 11 月 19 日公开的 WO98/51793 和 1999 年 3 月 9 日公开的 WO99/10484 所述制备 DR5-IgG (也称为 Apo-2-IgG) 和 DcR2-IgG 受体免疫粘附素。如下制备 DR4-IgG。将成熟 DR4 ECD 序列 (1-218 位氨基酸; Pan 等, 出处同上) 克隆至 pCMV-1 Flag 载体 (Kodak) 中 Flag 信号序列下游, 并如前所述 (Aruffo 等, 细胞, 61: 1303-1313 (1990)) 与人免疫球蛋白 G1 重链的 CH1、绞链区和 Fc 区融合。如 Ashkenazi 等, 美国国家科学院院报, 88: 10535-10539 (1991) 所述, 免疫粘附素通过瞬时转染至人 293 细胞中而表达, 然后采用蛋白 A 亲和层析从细胞上清中纯化。

采用胺耦合化学 (amine coupling chemistry) (Pharmacia Biosensor) 使受体免疫粘附素蛋白与传感器芯片表面在 1000-2000 共振单位的水平上耦合。记录在 15.6nM 到 500nM 的浓度范围以 2 倍增长的 Apo-2L 结合的传感图谱 (Sensorgrams)。通过非线性回归分析确定动力学常数, 并用于计算结合常数。

所得结果显示于表 1 中。

### 实施例 4

#### Apo-2L 变体的体外凋亡活性

用测定细胞通过荧光染料代谢转化后的生存力的生物试验确定 Apo-2L 变体的凋亡活性。在含有 0.1% BSA 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco) 中配制

Apo-2L(114-281 位)或 Apo-2L 变体(参见表 1)的 2 倍系列稀释液, 将每种稀释液 50 $\mu$ L 移入 96 孔 Falcon 组织培养微板的单个孔中。以  $2 \times 10^4$  个细胞/孔的密度加入 50 $\mu$ L SKMES-1 人肺癌细胞(ATCC HTB58)(在 RPMI-1640, 0.1% BSA 中)。混合物 37 $^{\circ}$ C 下孵育 24 小时。20 小时时, 加入 25 $\mu$ L alamar Blue(AccuMed, Inc., Westlake, Ohio)。通过在 530nm 激发后测定 590nm 处的相对荧光而确定细胞数。通过使用一种 4 参数吻合法来分析这些数据, 以便计算 ED<sub>50</sub>, 它是在细胞生存力上减少了 50% 的 Apo-2L 浓度。

在残基 Arg149, Gln205, Val207, Tyr216, Glu236, Tyr237 处的单个丙氨酸取代导致在所述生物试验中凋亡活性下降 5 倍以上, 并且表现出对 DR4, DR5, DcR2 的亲和力降低(表 1)。Apo-2L 对这些受体的结合受 Gln205, Tyr216, Glu236, Tyr237 处的丙氨酸取代的影响最大, 所有这些取代都会导致对所有三种受体的亲和力降低至少 5 倍。所有表现出凋亡活性降低的 Apo-2L 变体同样表现出与 DR4 或 DR5(或两者)的结合受到损害, 这表明所述生物学效应需要受体结合。Asp218 或 Asp269 的丙氨酸取代导致凋亡活性提高 2 倍以上。值得注意的是大多数丙氨酸取代对 DR4 和 DR5 结合有相似的影响, 唯一的例外是 Gln193, Glu195, Ser259, His264, Asp267 的突变, 所有这些突变都对 DR4 结合有大于 5 倍的影响(亲和力降低), 但对 DR4-结合的影响却很小或几乎可以忽略。DcR2-结合的变化倾向于与 DR4 结合的效应平行。减小的凋亡活性显示出与降低的 DR5 结合最密切相关, 表明 SK-MES 应答 Apo-2L 给药时死亡信号的传递需要 DR5。

### 实施例 5

#### 元素分析和定量分析确定 Apo-2L 的金属含量

采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)进行 Apo-2L 的元素分析。为此, 使用配制在 20mM Tris, pH7.5 中的 2mg/mL Apo-2L 溶液(按照 WO97/25428 公开的方法在大肠杆菌中生产的 114-281 位残基; 按照在此所述方法在发酵或纯化过程中不加入额外量的二价金属离子)。确定样品和制剂缓冲液的一部分中 Cd, Co, Zn, Ni, Cu 的含量。

表 II

样品	Cd	Co	Zn	Ni	Cu
缓冲液	-0.058	-0.090	-0.098	-0.098	-0.082
Apo-2L	-0.058	0.199	1.712	-0.108	-0.075

与 Apo-2L 结合的金属是 Zn 和 Co(表 II)。理论摩尔比为每摩尔 Apo-2L 三聚体 0.79 摩尔 Zn 和每摩尔 Apo-2L 三聚体 0.06 摩尔 Co。这些数据表明每个 Apo-2L 三聚体有一个锌结合位点。此 Apo-2L 制品中 85% 的所述位点被金属占据。

### 实施例 6

#### 使用螯合剂从 Apo-2L 除去结合锌所造成的影响

用螯合剂处理 Apo-2L(114-281 位)样品除去结合锌。样品首先对 1000 倍体积的 50mM EDTA 透析,换液 2 次,然后对 1000 倍体积的 2mM 1,10-菲罗啉透析,换液 2 次,最后对 1000 倍体积的无金属的 20mM Tris pH7.5 透析。在样品进行螯合处理之前和之后检测其受体结合,金属含量和凋亡活性。受体结合按照实施例 3 所述测定,金属含量用 ICP-AES 测定,凋亡活性按照实施例 4 所述测定。ICP-AES 显示,透析步骤除去了结合锌。此处理后,受体亲和力显著减少(表 I)并且凋亡活性降低 90 倍(图 4)。

在 AVIV 仪(Lakewood, NJ) 202 型分光偏振仪上记录圆二色谱(circular dichroic spectra)。光谱从 250nm 扫描到 200nm,其中步长 0.5nm,平均时间 5 秒,长方形石英比色皿光路长度 1cm。含 PBS 的溶液中蛋白浓度为 2 $\mu$ M。如图 6 所示, Apo-2L(114-281 位)发出具有高含量 $\beta$ -折叠的蛋白的典型 CD 光谱。结合锌的去除导致二色峰的强度降低,这表明 $\beta$ -折叠的含量减少了。

圆二色性用于监测锌的去除对 Apo-2L(114-281 位)热稳定性的影响。这些实验也采用 1cm 长方形石英比色皿和 2 $\mu$ M 的蛋白浓度。当样品从 30 $^{\circ}$ C 加热到 100 $^{\circ}$ C 时监测 225nm 处圆二色性。每增长 2 $^{\circ}$ C,使样品在该温度下平衡 1 分钟后测定一次。记录椭圆率(CD)和倍增电极电压,随倍增电极电压的温度依赖性在图 7 中绘出。倍增电极电压正比于样品吸收度。通过加热样品导致的倍增电极电压的增长反应出蛋白的聚集。倍增电极电压的增长伴随着 225nm 处椭圆率的减少指示的二极结构的丧失。这些数据表明 Apo-2L(114-281 位)通过热变性聚集,此转化的中点( $T_m$ )在约 75 $^{\circ}$ C 处。结合锌的去除导致热变性的  $T_m$  大大降低到约 54 $^{\circ}$ C。这些数据表明结合锌是维持 Apo-2L 同型三聚体的结构和稳定性必需的。

### 实施例 7

#### 通过突变去除 Apo-2L 的锌结合位点所造成的影响

如实施例 1 所述通过寡核苷酸定点诱变将 Apo-2L(91-281 位)的 Cys230

用 Ala 或 Ser 取代。然后按照实施例 1 所述使该变体蛋白表达并纯化。如表 1 所示, Apo-2L(91-281 位)的 C230A 和 C230S 突变体的受体结合亲和力减小, 凋亡活性大大降低。由于 Apo-2L 的 x-射线结构表明 Cys230 是一个被掩盖的残基, 不太可能在复合体形成中直接接触受体, 这些数据提示 Cys230 的突变通过改变 Apo-2L 同型三聚体的结构或稳定性而间接影响其活性。

### 实施例 8

#### 添加 Zn 改进了可溶性 Apo-2L 产物的积累和回收

##### A. 受碱性磷酸酶启动子调控的 Apo-2L(114-281 位残基)表达

pAPAp2-P2RU(参见图 12)编码 Apo-2L(114-281 位残基)以及由 *pro2* 和 *argU* 编码的 tRNA 的共表达。基于 pBR322 的质粒(Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43: 77-90(1978))pAPAp2-P2RU 用于在大肠杆菌中生产 Apo-2L。Apo-2L 表达所需的转录和翻译序列由碱性磷酸酶启动子和所述 *trp* Shine-Dalgarno 提供, 如对质粒 pHGH1 所述(Chang 等, 基因, 55: 189-196(1987))。Apo-2L(114-281 位残基)的编码序列位于启动子和 Shine-Dalgarno 序列的下游, 它前面有起始蛋氨酸。该编码序列包含编码 Apo-2L (图 1)中 114-281 位残基的核苷酸(见图 1), 但其中编码 Pro119 残基的密码子已由“CCT”变为“CCG”, 从而能消除潜在的二级结构。编码从  $\lambda$  到转录终止子的序列(Scholtissek 等, 核酸研究, 15: 3185(1987))接在 Apo-2L 编码序列之后。此质粒还包括用于表达 *pro2*(Komine 等, 分子生物学杂志, 212: 579-598(1990))和 *argU/dnaY*(Garcia 等, 细胞, 45: 453-459(1986))的 tRNA 的序列。这些基因可从大肠杆菌 w3110 通过 PCR 克隆并置于所述从  $\lambda$  到转录终止子的序列的下游。此质粒赋予生产宿主以四环素抗性和氨苄青霉素抗性。

菌株 43E7(大肠杆菌 W3110 *fhuA(tonA)phoA*  $\Delta$ (*argF-lac*)*ptr3 degP kanS ompT ilvG*+)用作共表达 Apo-2L 和 tRNA 的生产宿主。采用标准方法制备 43E7 感受态细胞并用 pAPAp2-P2RU 转化。从含 20 $\mu$ g/ml 四环素的 LB 板 (LB+Tet20)上挑出转化体, 划线纯化, 在含 20 $\mu$ g/ml 四环素的 LB 肉汤中, 在 30 $^{\circ}$ C 的摇床/培养箱中生长, 然后-80 $^{\circ}$ C 下保藏在 DMSO 中。

将新鲜解冻的培养原液小瓶接种在无菌培养基上, 制备摇瓶接种物。培养基中包含相应抗生素, 以便提供选择性压力来确保质粒的维持。摇瓶培养基组成见表 III。使瓶中培养物在约 30 $^{\circ}$ C(28 $^{\circ}$ C-32 $^{\circ}$ C)振荡培养 14-18 小

时。然后用该培养物接种生产发酵罐。接种量为培养基起始体积的 0.1% - 10%。

表 III 摇瓶培养基的组成

成分	量/升
四环素	4-20 mg
胰蛋白胨	8-12 g
酵母提取物	4-6 g
氯化钠	8-12 g
磷酸钠, 作为 pH7 溶液加入	4-6 mmol

采用表 IV 中给出的生产培养基进行 Apo-2L 的生产。在约 30°C (28°C-32°C) 下进行发酵过程, pH 控制在约 7.0 (6.5-7.5)。设置通气速率和搅拌速度使得培养基中通有足够的氧。在磷酸盐耗场所诱发的产物表达开始时, 工艺温度从 30°C 变为 25°C。在整个发酵过程中, 根据计算机的运算向细胞培养物中补加葡萄糖以便在保证通气条件的同时满足对碳源的需求。

在发酵过程中分两批添加  $ZnSO_4$ 。一批恰好在诱导产物表达之前加入。第二批约在生产期中点加入。在此实施例中, 所述添加发生在培养物的光学密度  $OD_{550}$  约为 80-120 和接种后约 28 小时时。加入足够量的 100mM  $ZnSO_4$  以使每批加入金属离子的浓度为约 50-100 $\mu$ mol (终浓度)。

发酵可以进行约 34-45 小时, 然后从培养液中回收细胞团用于随后的产物回收分析。

表 IV AP 启动子表达系统的生产培养基的组成

成分	量/升
四环素	4-20 mg
葡萄糖 <sup>a</sup>	10-250 g
硫酸铵 <sup>a</sup>	2-8 g
磷酸二氢钠, 二水合物 <sup>a</sup>	1-5 g
磷酸氢二钾 <sup>a</sup>	1-5 g
磷酸二氢钾 <sup>a</sup>	0-5 g
柠檬酸钠, 二水合物 <sup>a</sup>	0.5-5 g
氯化钾	0-5 g
硫酸镁, 七水合物 <sup>a</sup>	1.0-10 g
消泡剂	0-5 ml
氯化铁, 六水合物 <sup>a</sup>	20-200 mg

硫酸锌, 七水合物 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
氯化钴, 六水合物 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
钼酸钠, 二水合物 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
硫酸铜, 五水合物 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
硼酸 <sup>a</sup>	0.2-20 mg
硫酸锰, 一水合物	0.2-20 mg
酪蛋白水解物 <sup>a</sup>	5-25 g
酵母提取物 <sup>a</sup>	5-25 g

<sup>a</sup> 这些成分的一部分可在发酵过程中补加至培养物中。可根据需要添加氨水以控制 pH。

在发酵的不同时间对培养液取样。将 1ml 培养液样品稀释到细胞密度为 20 OD<sub>550</sub>, 离心收集细胞, 所得细胞沉淀于 -20℃ 保存以备分析。将细胞沉淀解冻并重悬在 0.5ml 提取缓冲液(50mM HEPES, pH8.0, 50mM EDTA 和 0.2mg/ml 鸡蛋白溶菌酶)中, 通过机械破碎从细胞质中释放产物。离心去除细胞裂解液中的固体, 然后将澄清的裂解液上样至 Dionex ProPac IEX HPLC 柱以便定量三聚体。HPLC 分析通过以 25mM 磷酸缓冲液(pH7.5)中 1M NaCl 的 5%-22% 梯度按 0.5ml/min 的流速洗脱 25 分钟, 而将产物与大肠杆菌杂质蛋白分开。

使冻存的细胞团解冻并重悬在提取缓冲液(100mM HEPES 缓冲液, pH8.0, 50mM EDTA, 5mM DTT)中。使该细胞悬液多次通过机械匀浆器而从胞质空间释放出 Apo-2L 产物, 添加 0.2% PEI(终浓度)并离心除去固体。用 H<sub>2</sub>O 将澄清的裂解液 1:1 稀释, pH 调为 7.2, 然后上样至已用 3-4 倍柱体积的 50mM HEPES /0.05% Triton /1mM DTT pH7.2 预平衡的 MPHS 柱 (BioRad)。用 2-3 倍柱体积的平衡缓冲液洗一次, 再用含 0.1M NaCl 的平衡缓冲液洗第二次, 然后用平衡缓冲液中 0.1M-0.8M 的 NaCl 梯度以 6 倍柱体积将 Apo-2L 蛋白从 MPHS 柱上洗脱。收集洗脱级分, 分析, 汇集有关级分并保存在 4-8℃。

对发酵过程中 Apo-2L 积累的分析表明, ZnSO<sub>4</sub> 的加入不会显著影响细胞生长。培养液中磷酸盐耗竭时 Apo-2L 开始产生, 这一般在接种的约 15-25 小时后。图 8 显示了可溶性 Apo-2L 三聚体的积累经 IEX HPLC 方法测得的时间变化图谱。添加了 ZnSO<sub>4</sub> 的培养液与无 ZnSO<sub>4</sub> 的对照培养液相比, 其细胞裂解液样品中产物浓度较高。

对最初捕获步骤(涉及 IEX 层析)(图 9)中产物回收的分析显示了, 在添加或不添加  $ZnSO_4$  的发酵条件下所得细胞裂解液经 MPHS 层析的洗脱图谱。在最初的过柱和洗柱步骤后, 分出了 A 和 B 两个主要峰。通过 SDS-PAGE 分析, 这两个峰主要由 Apo-2L 组成。

从这两个峰制备纯化物质并分析其生物活性和稳定性。研究结果表明, 峰 A 汇集的 Apo-2L 产物更为稳定, 峰 B 的产物时间长了会凝聚。为使不稳定性最小, 不再对峰 B 的产物进行回收。通过对每个峰以下代表积分面积的轮廓的计量来估计峰 A 对峰 B 的比例。表 V 所列结果显示, 当峰 A 从无  $ZnSO_4$  的情况下平均约为 45% 到添加  $ZnSO_4$  的情况下达到约 80% 时 Apo-2L 的百分比变化, 即在可回收的集合中 Apo-2L 产量显著提高。

表 V

试验编号	加 $ZnSO_4$	层析规模	峰 A %	峰 B %
SAPO2-113	否	$0.66 \times 15.5\text{cm}$	41.6	58.4
LAPO2-4	否	$4.4 \times 41.5\text{cm}$	50.4	49.6
SAPO2-138	是	$0.66 \times 17.0\text{cm}$	78.8	21.2

#### B. trp 启动子调控的 Apo-2L(氨基酸残基 114-281)表达

PS1346. Apo 2L.0 质粒的构建: 将编码 Apo-2L 中 114-281 位残基的 DNA (前面有一个起始蛋氨酸密码子) 插入到 pS1346 质粒载体。pS1346 质粒衍生自 pHGH207-1(DeBoer 等, 启动子: 结构和功能, Praeger, 纽约, pp.462-481(1982)) 并且在 Apo-2L 编码序列的下游含有从  $\lambda$  到转录终止子( $\lambda$ -to transcriptional terminator)的序列(Scholtissek 等, 核酸研究, 15: 3185 (1987))。

采用菌株 54C2(大肠杆菌 W3110 *fhuA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP laclq*) 作为表达 Apo-2L(氨基酸残基 114-281)的生产宿主, 其中该配体的表达受 *trp* 启动子调控。采用标准方法制备 54C2 的感受态细胞并用 pS1346. Apo2L.0 转化。从含  $20\mu\text{g}/\text{ml}$  四环素的 LB 平板(LB+Tet20)挑出转化体, 划线纯化, 在  $30^\circ\text{C}$  的摇床/培养箱中含  $20\mu\text{g}/\text{ml}$  四环素的 LB 培养基上生长, 然后  $-80^\circ\text{C}$  下保藏在 DMSO 中。

用生产菌株 54C2/pS1346.Apo2L.0 在类似于上述 AP 启动子表达系统的发酵参数下进行实验, 不同在于培养基组成略有调整(表 VI)、添加诱导物吲哚 3-丙烯酸(IAA)、和工艺的耗时不同。在最初的培养基中加入色氨酸以便在生长的最初阶段抑制启动子的活性。当培养液的细胞密度达到约 30

OD<sub>550</sub> 时使温度从 30℃ 变为 25℃。当培养液的细胞密度达到约 55 OD<sub>550</sub> 时加入诱导物。在添加了 ZnSO<sub>4</sub> 的实验中, 于细胞密度达 25 OD<sub>550</sub> 和接种后 24 小时添加 ZnSO<sub>4</sub> 至终浓度约 50-100μM。在添加诱导物的 6 小时后收获细胞并保存在-20℃到-80℃。

表 VI

在 AP 启动子表达系统的生产培养基中  
应 trp 启动子表达系统的需要进行的添加

成分	量/L
L-异亮氨酸	0.5-1 g
色氨酸	0.1-5 g

trp 启动子系统的细胞达到 40-60 OD<sub>550</sub> 后生长放缓。在添加 IAA 进行诱导之前有显著的 Apo-2 配体渗漏表达, 这可能导致细胞生长出现问题。对添加或不添加 ZnSO<sub>4</sub> 的情况下的细胞生长图谱进行比较。图 10 显示了可溶性 Apo-2L 三聚体的积累经 IEX HPLC 方法测得的时间变化图谱。在添加了 ZnSO<sub>4</sub> 的试验中, 可溶性 Apo-2L 的积累持续增加, 并在细胞裂解物样品中获得较高产物浓度。

#### C. 采用二价金属离子/DTT 从大肠杆菌中回收和纯化 Apo-2L(氨基酸残基 114-281)

可采用下列方法从大肠杆菌中回收和纯化 Apo-2L。首先, 如下进行细胞的匀浆和提取。将冷冻收获的大肠杆菌细胞悬浮在 6 倍体积的提取液中(100mM HEPES/5mM DTT(或 5mM ZnSO<sub>4</sub> 而不是 DTT), pH8.0), 或将整个细胞培养液用 5mM DTT(或 5mM ZnSO<sub>4</sub> 而不是 DTT), pH8.0 调整。悬浮液 2-8℃ 下充分混合 1 小时, 然后在匀浆器(Gaulin corporation, Everett, MA)中匀浆。破碎细胞的悬浮液在 0.2% PEI 中絮凝 1-2 小时, 用 BTPX205(Alfa Laval Separation AB, 瑞典)连续加料离心机离心, 深层过滤澄清。

提取后, 如下纯化 Apo-2L。澄清的细胞悬浮液(提取液)用等体积 H<sub>2</sub>O /0.1% Triton-100 调理, 使 pH 达到 7.2, 然后进行 Macro-Prep ceramic High S (MP-HS)层析。将调整好的提取液上柱至已用 50mM HEPES/0.05% Triton-100/1mM DTT(或 100 μm ZnSO<sub>4</sub>), pH7.2 平衡的 MP-HS 阳离子交换柱(Bio-Rad, Hercules, CA)(前两个步骤可用 SP-Sepharose Fast Flow(Amersham Pharmacia, 瑞典)代替)。未结合的蛋白流过层析柱, 被平衡缓冲液洗出, 直至达到 A280 的基线水平。用 3 倍柱体积的 0.1M NaCl/平衡缓冲液洗柱。



用 8 倍体积的平衡缓冲液中 0.1-0.8M 的 NaCl 线性梯度洗脱 Apo-2L。收集级分，并将那些经 SDS-PAGE 或 SEC-HPLC 测定含有正确折叠的 Apo-2L 的级分汇集在一起。

将从 MP-HS 柱汇集的 Apo-2L 上样至已在 50mM HEPES/1mM DTT(或 100  $\mu$  M ZnSO<sub>4</sub>), pH7.2 中平衡的 Macro-Prep 羟基磷灰石层析柱(Bio-Rad, Hercules, CA)(可用 SP-Sepharose Fast Flow 代替 Macro-Prep 羟基磷灰石层析柱)。上样后，用平衡缓冲液洗柱以达到 A280 的基线水平。用平衡缓冲液中 0.15M 磷酸钠的等梯度从层析柱中洗脱 Apo-2L。

MP-HA 汇集液用等体积的 1.0 M 硫酸铵/50 mM Tris/1mM DTT(或 100  $\mu$  M 硫酸锌), pH7.5 配制，上样至已在 0.5M 硫酸铵/50 mM Tris/1mM DTT(或 100  $\mu$  M 硫酸锌), pH7.5 中平衡的 Phenyl-Sepharose FF(Amersham Pharmacia, 瑞典)(可使用 0.6M 硫酸钠代替 0.5M 硫酸铵)。用平衡缓冲液洗柱，从洗脱液中收集 Apo-2L。

然后通过超滤和 G25 凝胶过滤(Amersham Pharmacia, 瑞典)层析来配制 Apo-2L。将来自 phenyl-Sepharose 的汇集液用 TFF 超滤膜(Millipore, Bedford, MA)浓缩，并在 G25 凝胶过滤柱上用 20mM Tris/8% 海藻糖, pH7.5 配制。(或者，所述物质可通过渗滤配制)。通过 SDS-PAGE, SEC-HPLC 和氨基酸序列分析确定 Apo-2L 的最终纯度。

### 实施例 9

#### 添加氯化钴改善了可溶性 Apo-2 配体的产物积累和回收

#### 碱性磷酸酶启动子调控的 Apo-2L(氨基酸残基 114-281)表达

采用与实施例 8 中所用相同的生产菌株，培养基组成，发酵条件和样品分析来研究添加非锌的金属离子，即氯化钴，对 Apo-2L(氨基酸残基 114-281)产物积累的影响。用 100mM CoCl<sub>2</sub> 水溶液替代 100mM ZnSO<sub>4</sub>，添加足够量使两次添加的终浓度达到 50-100 $\mu$ M。

图 11 显示了添加 CoCl<sub>2</sub> 对发酵过程中可溶性 Apo-2L 产物积累的好处。如 ZnSO<sub>4</sub> 添加实验一样，用 IEX HPLC 分析方法检测到了可溶性 Apo-2L 产物的较高积累率，但显著程度不及。此数据说明，添加某些金属离子通常可改进可溶性 Apo-2L 的积累，还可使已装配好的 Apo-2L 三聚体保持稳定。

### 实施例 10

#### 各种金属离子对 Apo-2L 制剂的影响

进行体外试验,即将 50 $\mu$ l Apo-2L(114-281 位)与 5mM 金属盐(见表 VII; 金属对蛋白的摩尔比为 100:1)在 20mM Tris, 8% 海藻糖, 0.01% Tween 20, pH7.5 的制剂中 5 $^{\circ}$ C 保温 24 小时。然后用实施例 4 所述 SK-MES 试验评价样品的凋亡活性。

EC50(或导致细胞 50% 死亡的 Apo-2L 浓度)见表 VII(单位 ng/ml)。如表 VII 所示, 向培养液中添加乙酸锌和硫酸锌可增强 Apo-2L 活性。

表 VII

所添加的金属	生物试验中的 EC50
对照	19.0 $\pm$ 1.9(n=3)
醋酸锰	19.8
氯化锰	19.9
醋酸铁	32.5
醋酸钴	25.9
氯化钴	17.9
硫酸钴	16.7
醋酸镍	18.7
醋酸铜	844
氯化铜	984
硫酸铜	774
醋酸银	20
醋酸锌	12.3
氯化锌	17.2
硫酸锌(100:1)	9.3 $\pm$ 1.2 (n=3)
(10:1)	10.0 $\pm$ 0 (n=2)
(1:1)	11.5 $\pm$ 0.7 (n=2)

### 实施例 11

#### 锌离子对 Apo-2 配体制剂稳定性的影响

如实施例 8B 所述, 纯化步骤中第一步使用 MPHS 阳离子交换柱产生两个峰, A 和 B。为检查这两个峰的保存稳定性, 将 Apo-2L(114-281 位)从大肠杆菌表达产物(采用带有 trp 启动子的 pS1346.ApoL.0 质粒)中提取, 并通过 MPHS 阳离子交换柱纯化。MPHS 峰 A 进一步通过 MP-羟基磷灰石和 Phenyl-Sepharose FF 纯化, 然后用 G-25 凝胶过滤柱配制。MPHS 峰 B 通过 MP-羟基磷灰石、Phenyl-Sepharose FF、和 Ni-NTA Superflow 纯化, 然后在

G-25 凝胶过滤柱上用 20mM Tris, 8% 海藻糖, 0.01% Tween 20, pH7.5 配制。将样品无菌灌入 3cc 玻璃小瓶中, 并用聚四氟乙烯(Teflon)涂布的 greybutyl 塞子密封。纯化并配制好的峰 A 和峰 B 的保存稳定性在表 VIII 所列的时间(周(“wk”)或月(“mo”))和温度(°C)下评价。

表 VIII

峰 A	SDS-SEC % M	SDS-SEC % D	SEC % 回收	SEC % 三聚体	RP % 主 体	EC50
1wk,-70°C	ND	ND		98.60	78.10	
1wk, 37°C	ND	ND	96.7	98.2	73.60	
2mo,-70°C	88.85	7.50		93.93	74.52	
2mo,30°C	84.90	10.58	65.07	94.03	53.98	
6mo,-70°C	93.00	5.80			ND	11.1
6mo,5°C	87.00	9.44	100		ND	14.8
6mo,30°C	80.00	8.68	76		ND	67.8

峰 B	SDS-SEC % M	SDS-SEC % D	SEC % 回收	SEC % 三 聚体	RP % 主体	
1wk,-70°C	ND	ND		98.70	75.3	
1wk,37°C	ND	ND	101.1	98.3	61.4	
2mo,-70°C	94.03	3.79		90.00	65.77	
2mo,30°C	94.12	4.54	46.07	94.12	32.185	
6mo,-70°C	82.00	11.25			ND	10.3
6mo,5°C	73.50	17.00	92		ND	12.6
6mo,30°C	47.00	23.20	38		ND	死亡

表 VIII 显示了单体的百分比(%M)和二聚体的百分比(%D); “ND”指未测的数值。在第 0 天时, 峰 A 所含二聚体和其它杂质比峰 B 略少。如表 VIII 所示, 峰 B 更为热不稳定, 因为在 30°C 的沉淀更多(比在 2 个月的时间点多约 40%)。即使在 5°C, 峰 B 形成二聚体的倾向性约为峰 A 的 2 倍。对峰 A 和 B 的生物分析指示这两种物质除了稳定性不同, 其它生物化学特性相同。据认为峰 B 稳定性较低可能与不当的(三聚体)装配或较低的锌含量有关(峰 A 中锌对蛋白的摩尔比为 0.83, 峰 B 的为 0.7)。

## 序列表

<110> 杰南技术公司 (Genentech, Inc.)

<120> 利用二价金属离子制备 Apo-2 配体的方法

<130> P1761R1PCT

<140> PCT/US00/17579

<141> 2000-06-26

<150> US 60/141,342

<151> 1999-06-28

<160> 7

<210> 1

<211> 281

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

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



gaagccagtt ttttcggggc ctttttagtt ggctaactga cctggaaaga 950  
 aaaagcaata acctcaaagt gactattcag ttttcaggat gatacactat 1000  
 gaagatgttt caaaaaatct gaccaaaaca aacaaacaga aa 1042

<210> 3

<211> 144

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

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

<210> 4

<211> 147

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 4

Lys	Pro	Val	Ala	His	Val	Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln
1				5					10					15
Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly
				20					25					30
Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu
				35					40					45
Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro
				50					55					60
Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile	Ser	Arg	Ile	Ala	Val
				65					70					75

Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro  
80 85 90

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr  
95 100 105

Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp  
110 115 120

Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala  
125 130 135

Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu  
140 145

<210> 5

<211> 141

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr  
1 5 10 15

Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn  
20 25 30

Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg  
35 40 45

Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn  
50 55 60

Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu  
65 70 75

Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn  
80 85 90

Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu  
95 100 105

Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn  
110 115 120

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser  
125 130 135

Phe Gly Leu Leu Lys Leu  
140

<210> 6

<211> 137

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 6

Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met  
1 5 10 15

Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly  
20 25 30

Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu  
35 40 45

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn  
50 55 60

Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr  
65 70 75

Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys  
80 85 90

Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val  
95 100 105

Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu  
110 115 120

Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu  
125 130 135

Tyr Lys

<210> 7

<211> 152

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 7

Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro Ser  
1 5 10 15

Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly  
20 25 30

Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile  
35 40 45

Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe  
50 55 60

Arg His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln  
65 70 75

Leu Met Val Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser  
80 85 90

His Thr Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn  
95 100 105

Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys  
110 115 120

Leu Arg Ser Gly Glu Glu Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser  
125 130 135

Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys  
140 145 150

Val Arg



1 TTTCCCTCACTGACTATAAAGAAATAGAGAGAAGGAGGGCTTCAGTGACCCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC  
 91 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGACCCAGCCTGGGACAGACCTGGCTGATCGTGATCTTCCACAGTGCCTCCTGCAGTCTCTCTGT  
 1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys  
 181 GTGGCTGTAACCTTACGTGTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATGCAGGACCAAGTACTCCAAAAGTGGCATTGGCTTGTTCCTTAAAAGAA  
 31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu  
 271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAGAGTATGAACAGCCCTTGCTGGCAAGTCAAGTGGCCAACCTCCGTCAGCTCGTTAGAAAG  
 61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys  
 361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCAAGAAAAGCAACAATAATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAAGAGGTCCNCAG  
 91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln  
 451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCAGGAGAAGCAACATTTCTTCCAAACTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAA  
 121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys  
 541 ATA AACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTCATCTGAGCAACTTGAGGAATGGTGAACCTGGTCAATCCATGAAAAAGGG  
 151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly  
 631 TTTTACTACATCTATTCCCAACATACTTTTCGATTTTCAGGAGGAAATAAAGAAAACACAAAGAACGACAAAACAATGGTCCAATATATT  
 181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle  
 721 TACAAAATACACAAGTTATCCTGACCCCTATATTGTTGATGAAAAGTGCTAGAAAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAATATGGACTCTAT  
 211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr  
 811 TCCATCTATCAAGGGGGAATATTTGAGCCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTTGTTTCTGTAACAAAATGAGCACCTTGATAGACATGGACCAT  
 241 SerIleTyrGlnGlyGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis  
 901 GAAGCCAGTTTTTCGGGGCCTTTTAGTTGGCTAAC TGACCTGGAAAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTTTCAGGAT  
 271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp  
 991 GATACACTATGAAGATGTTTCAAAAAAATCTGACCAAAAACAACAAACAGAAA

图 1

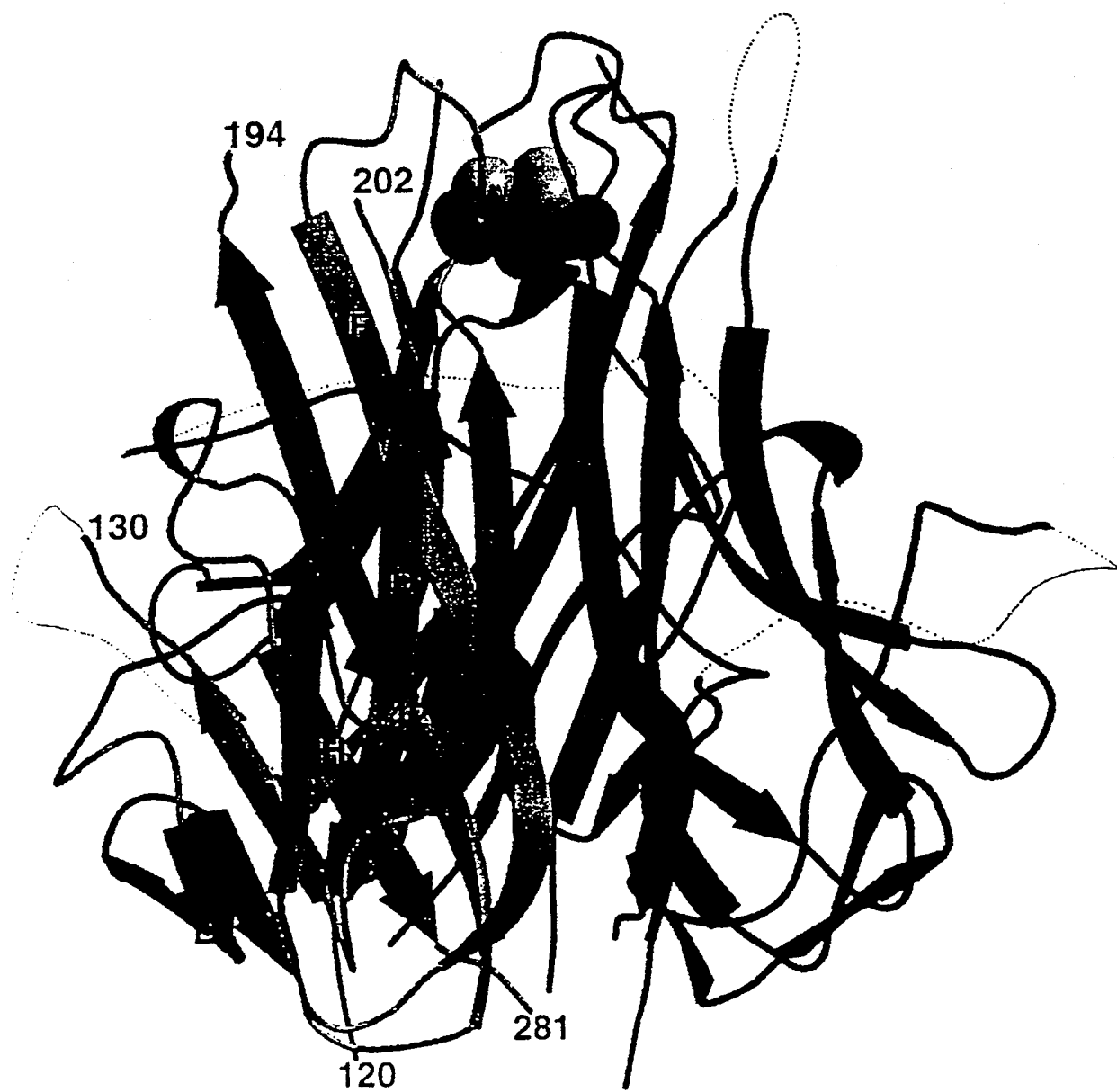


图 2A



图 2B

结晶学数据			
	<u>ApC-2L(114-281)</u>	<u>ApO-2L(91-281) D218A</u>	<u>ApC-2L(91-281) D218A</u>
晶体			
空间群	P6 <sub>3</sub>	R32	R32
晶胞 (Å)	a=72.5 c=140	a=66.4 c=197.6	a=66.4 c=197.7
分辨率 (Å)	3.9	1.9	1.3
范围 (%)	94 (96)	93 (99)	100 (100)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	5.9	10.1	12.4
# unique (hkl)	3589	12680	41840
冗余度	4.9	4.3	12.1
R <sub>symm</sub> (%)	15.4 (34)	6.2 (27)	6.4 (34)
# ASU中的启动子	2	1	1
精细结构			
R <sub>cryst</sub> (%)	33.8	20	
R <sub>free</sub> (%)	27.6	22	
rmsd 键 (Å)	0.009	0.015	0.007
rmsd 角 (°)	1.79	2.0	1.41
平均B-值	--	14	14
# 水分子	0	170	

$R_{\text{symm}} = \sum_h \sum_i (I_{hi} - \langle I_h \rangle) / \sum_h I_h$ , 其中  $I_h$  是取 Bragg 指数  $h$  时,  $i$  次观察对称相关反射(symmetry-related reflections)的平均结构系数强度。

$R_{\text{cryst}} = (\sum_h \sum_i ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||) / \sum |F_{\text{obs}}|$ , 其中  $F_{\text{obs}}$  和  $F_{\text{calc}}$  是结构系数振幅(amplitude)的测量值和计算值。

$R_{\text{free}} = \sum_{(hkl) \in \tau} ||F_{\text{obs}}(hkl)| - k|F_{\text{calc}}(hkl)|| / \sum_{(hkl) \in \tau} |F_{\text{obs}}(hkl)|$ , 其中在精细步骤中省去了  $\tau$  集反射。计算  $R_{\text{free}}$  时  $\tau$  集中包括上述数据的 10%, 在精细步骤中则不包括。括号内的值为最高分辨率界值(shell)。

图 2C

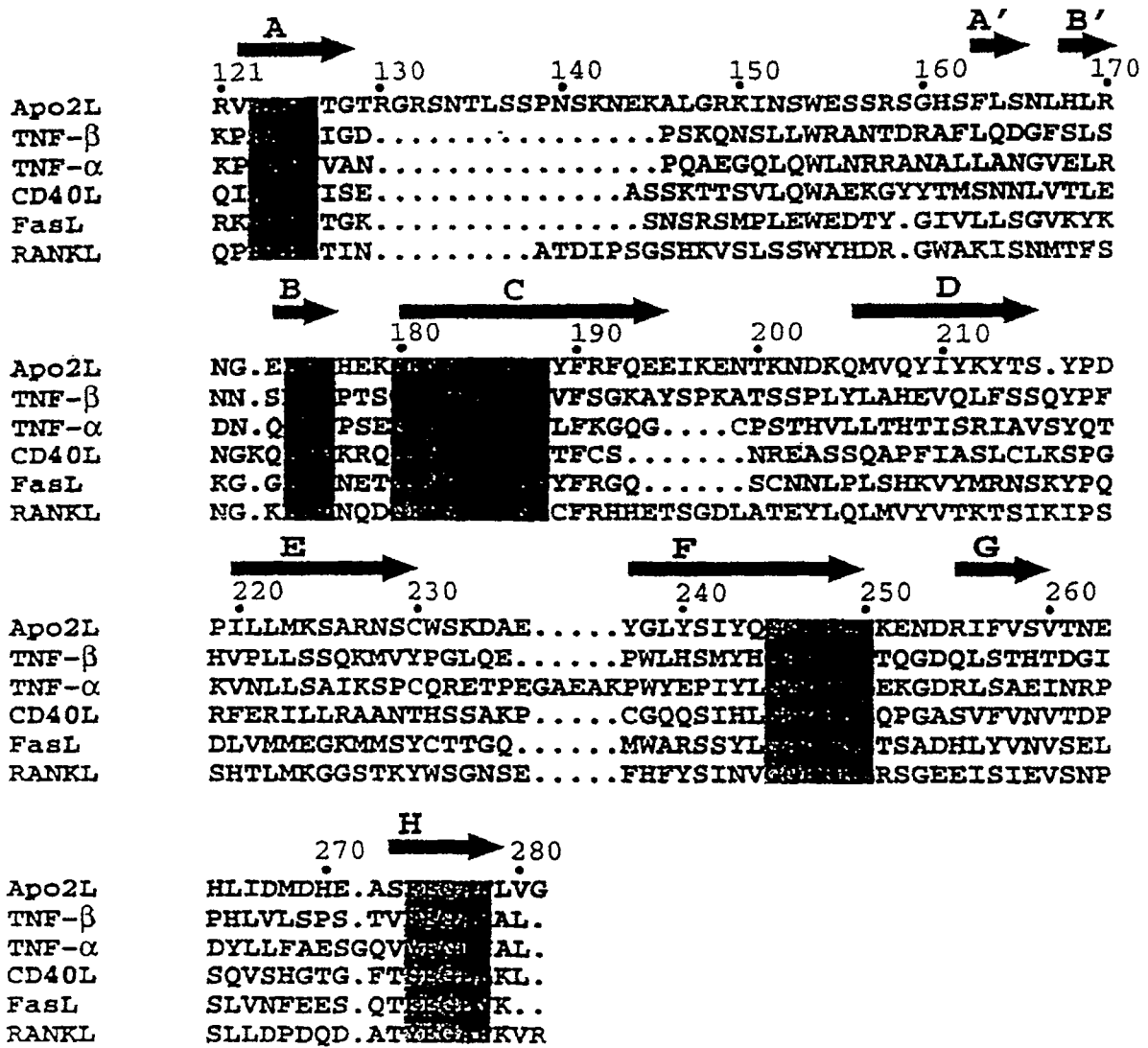


图 3

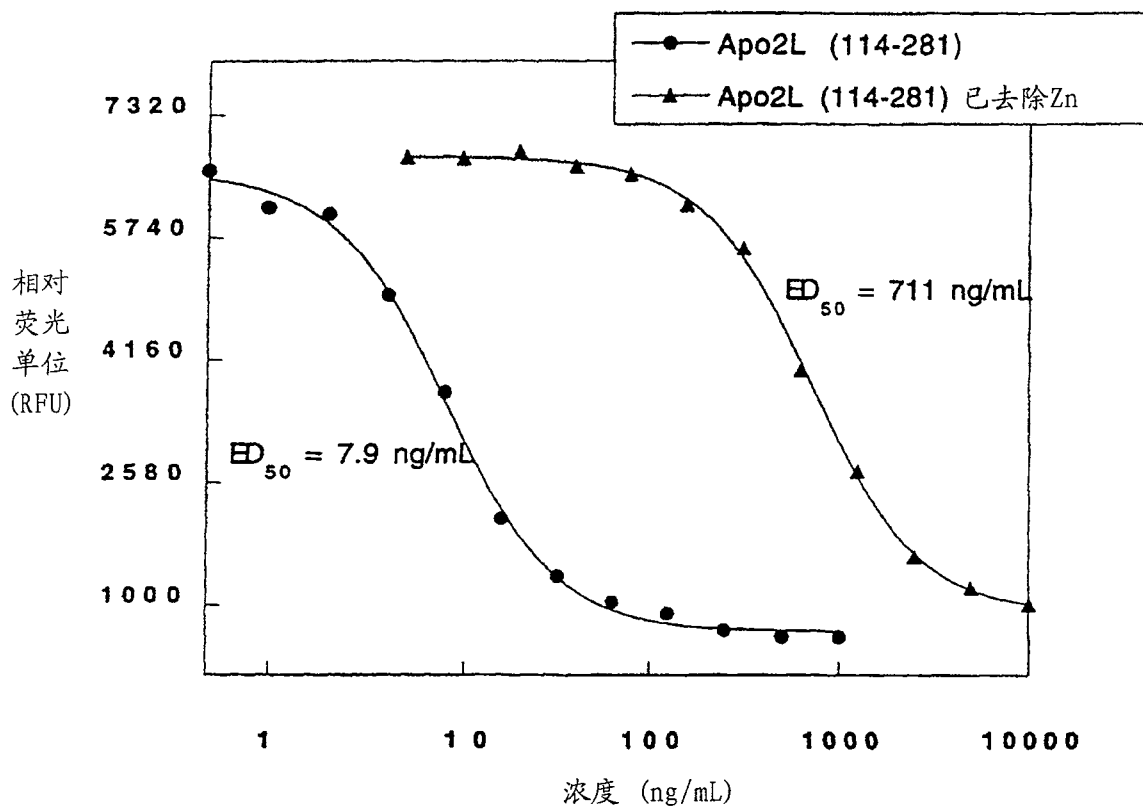


图 4

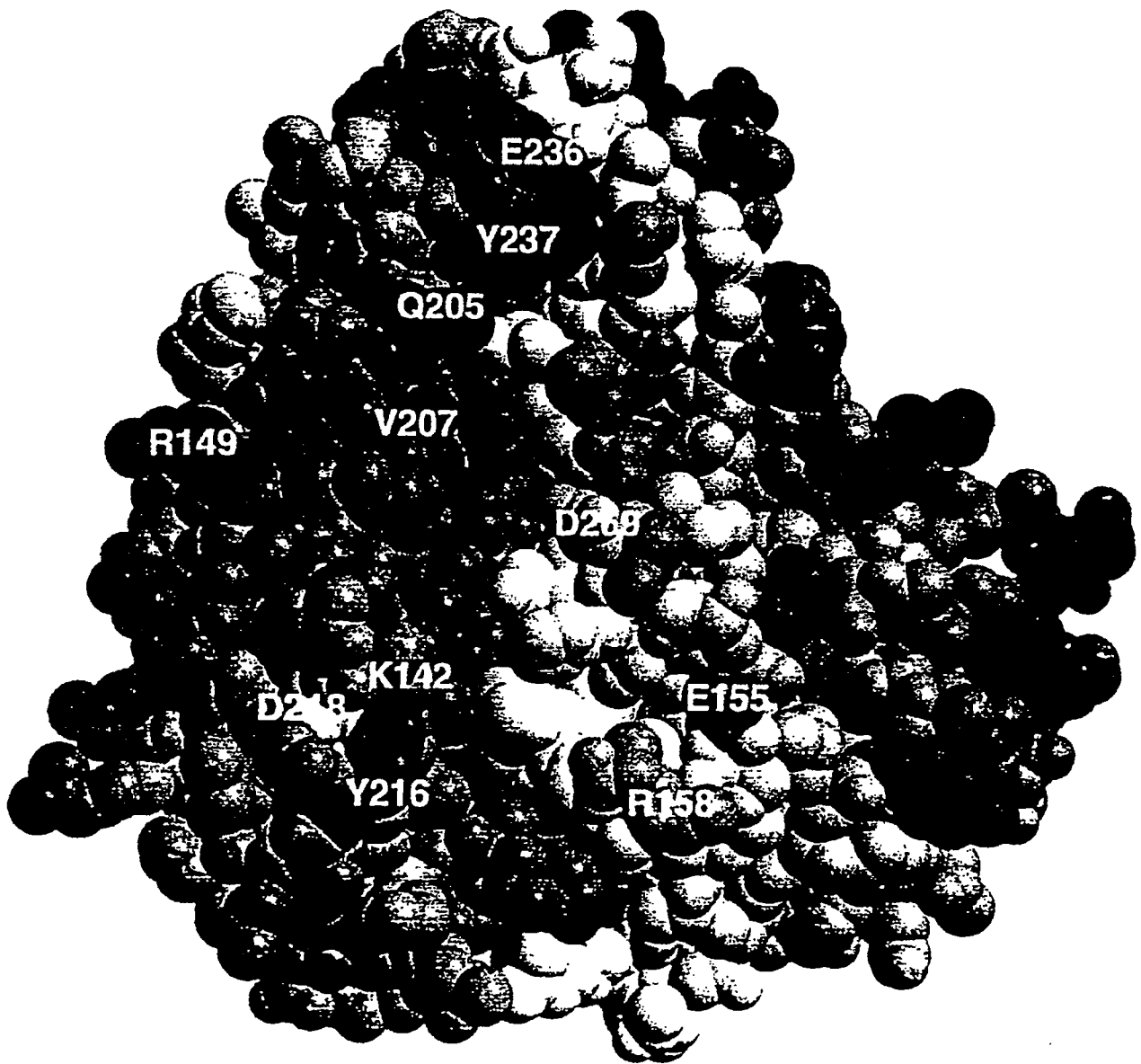


图 5

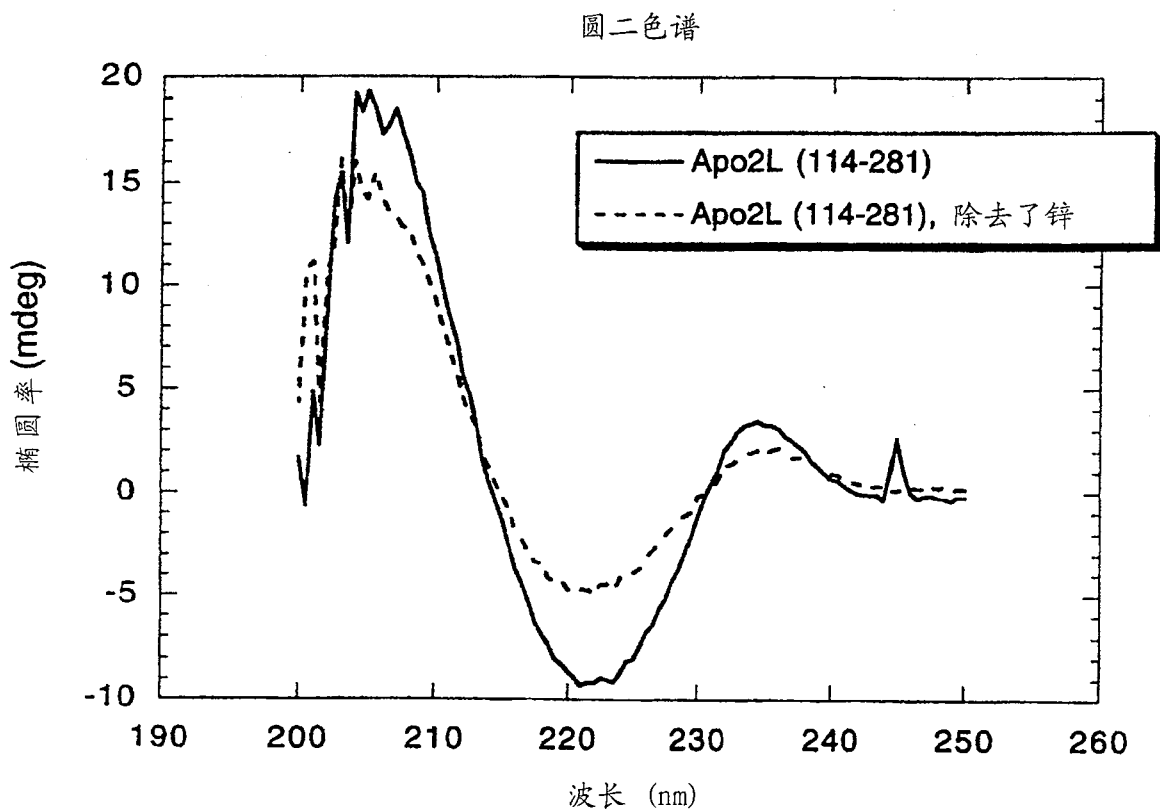


图 6



除去Zn对稳定性的影响：通过CD热变性

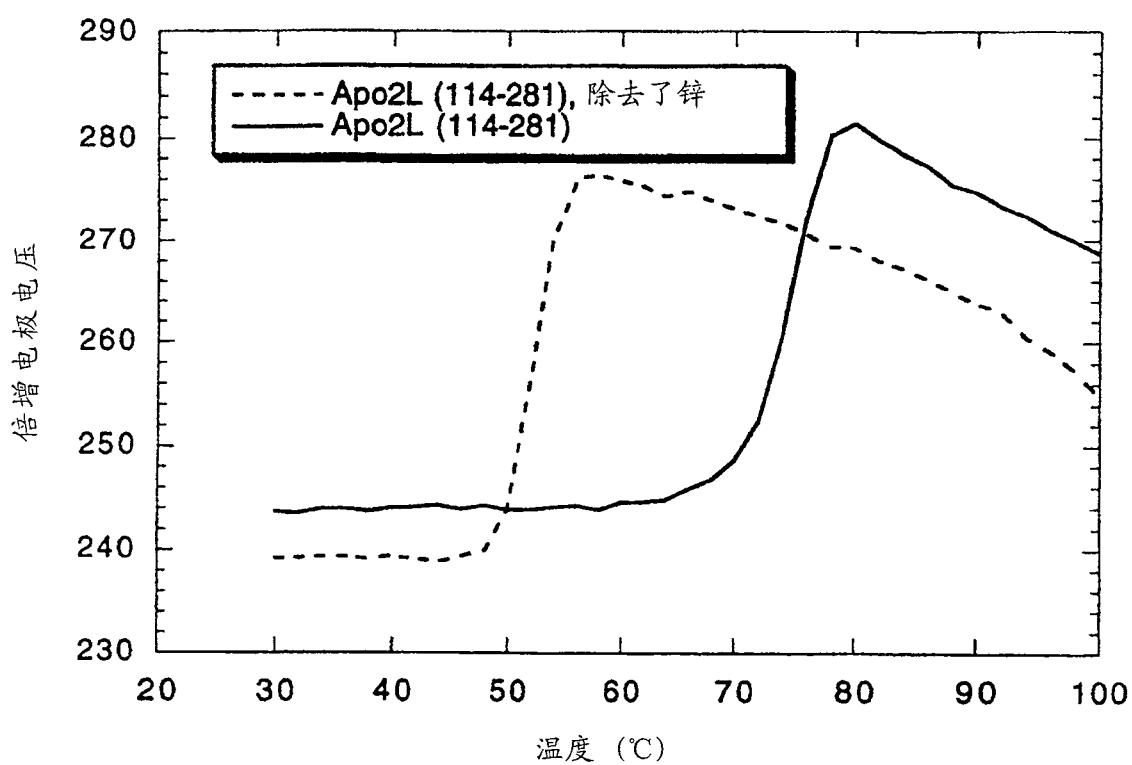


图 7

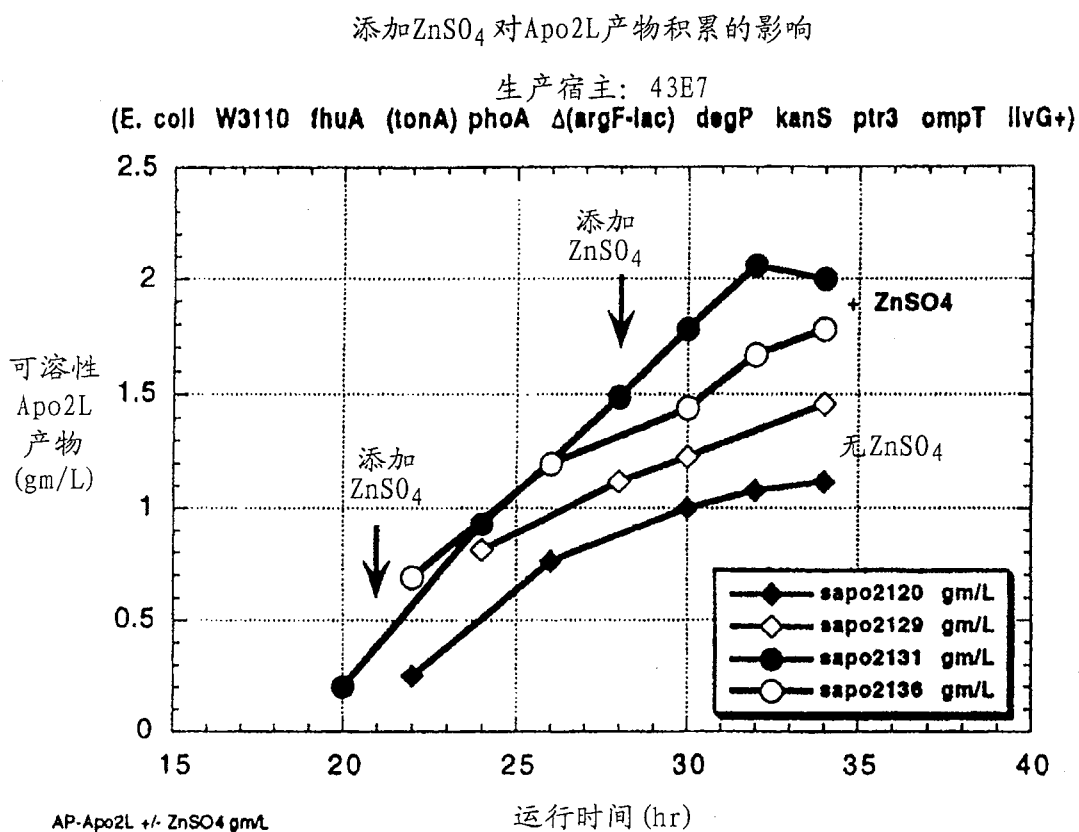


图 8

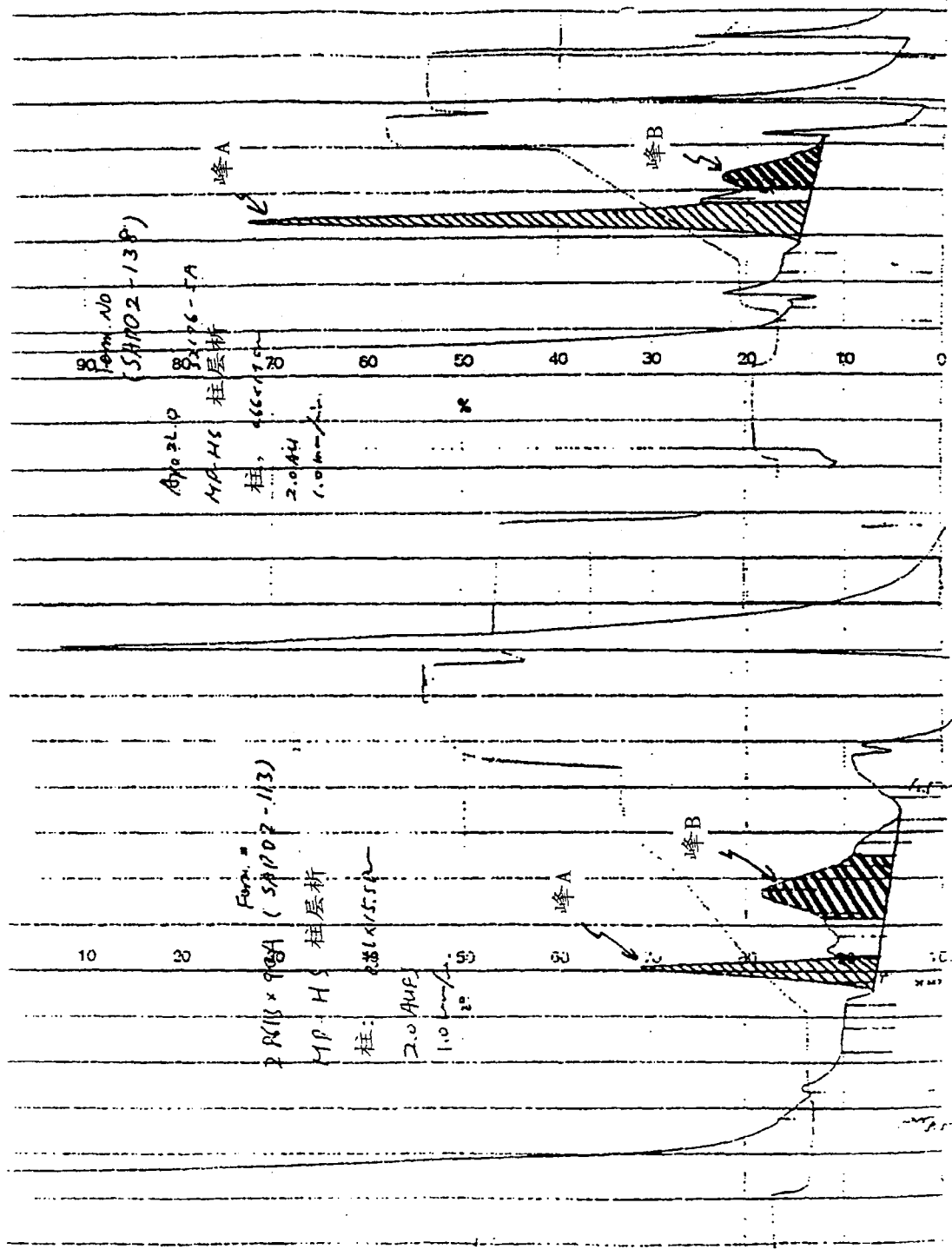


图 9

添加ZnSO<sub>4</sub>对Apo2L产物积累的影响

采用trp启动子的大肠杆菌表达

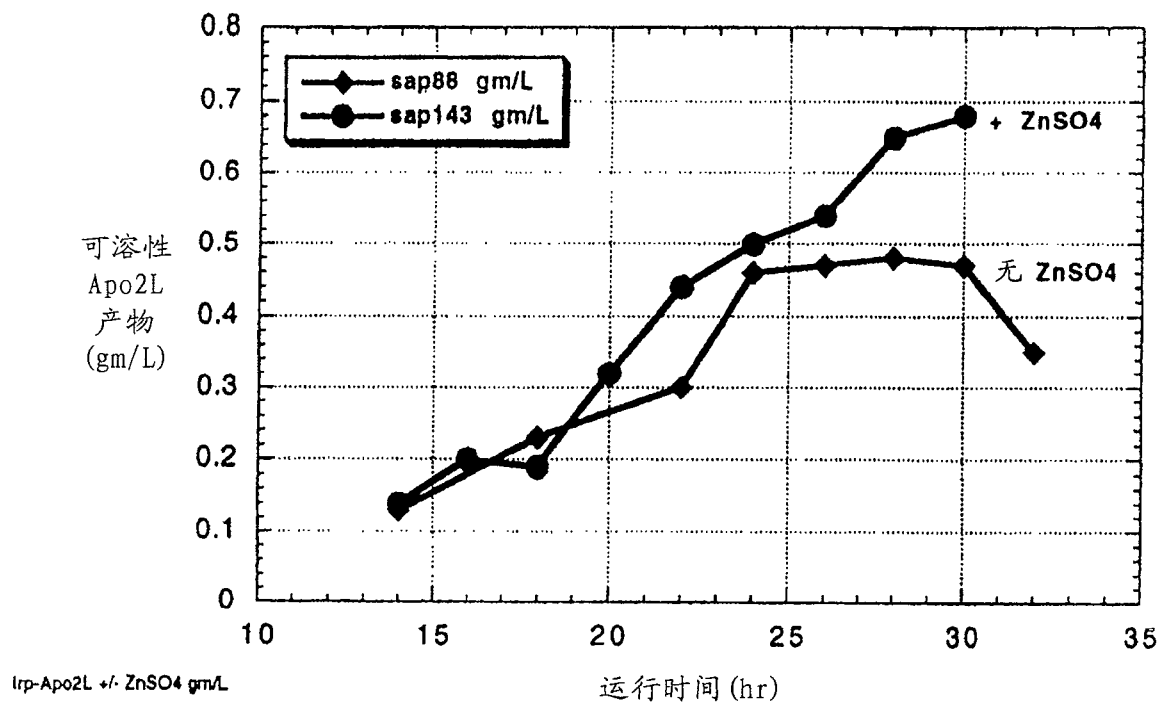


图 10

添加CoCl<sub>2</sub>对Apo2L产物积累的影响

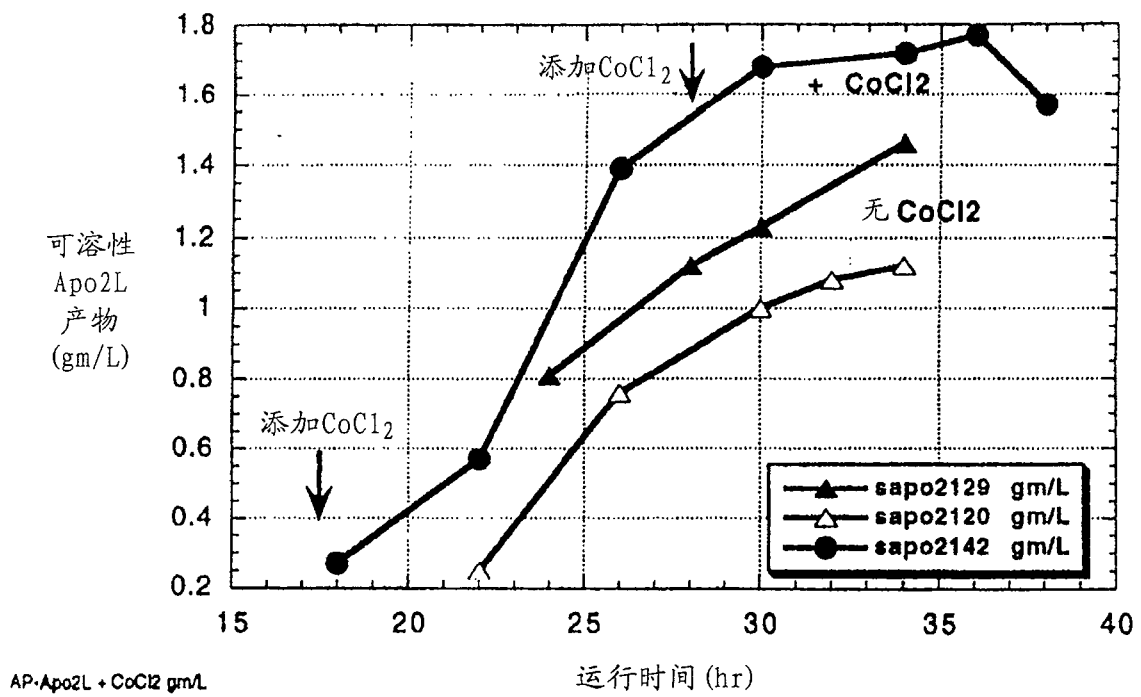


图 11

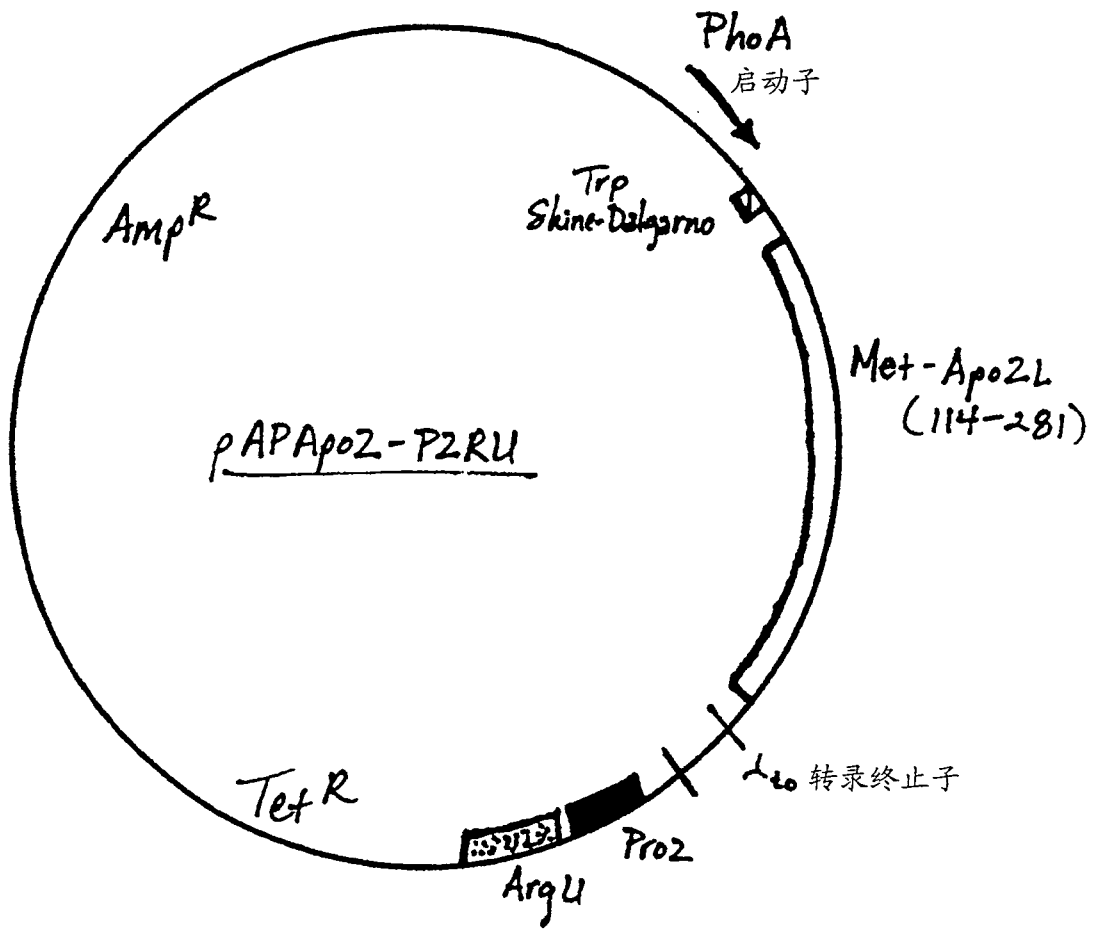


图 12

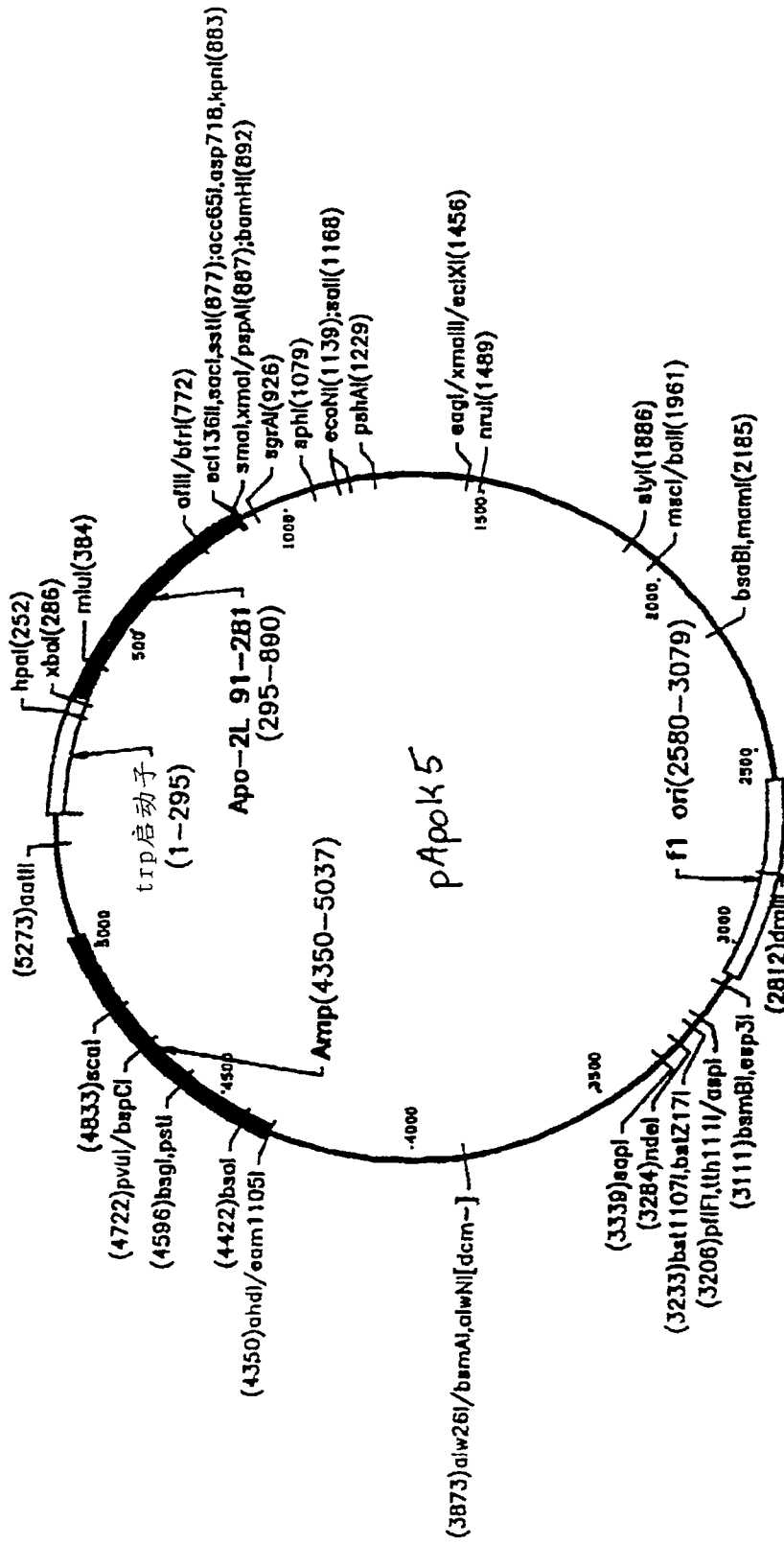


图 13