

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/40

C07K 14/47 C12N 9/64

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02821967.8

[43] 公开日 2005 年 3 月 23 日

[11] 公开号 CN 1599755A

[22] 申请日 2002.9.4 [21] 申请号 02821967.8

[30] 优先权

[32] 2001. 9. 4 [33] IL [31] 145279

[86] 国际申请 PCT/IL2002/000734 2002.9.4

[87] 国际公布 WO2003/020767 英 2003.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.8

[71] 申请人 耶达研究发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特市

[72] 发明人 D·沃勒克 T·冈察洛夫

G·克鲁马姆

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

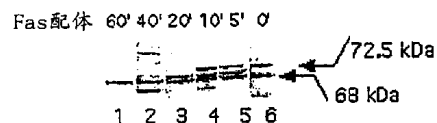
代理人 周承泽

权利要求书 2 页 说明书 34 页 序列表 10 页
附图 12 页

[54] 发明名称 抗天冬氨酸特异半胱氨酸蛋白酶-8
的抗体,其制备方法及应用

[57] 摘要

本发明涉及抗天冬氨酸特异半胱氨酸蛋白酶-8
(caspase-8) 中特异性区域的抗体及其应用。



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

- 1.一种通过用天冬氨酸特异半胱氨酸蛋白酶-8(caspase-8) Sub-1 亚基 C 末端的肽及其片段免疫动物而得到的抗体,其特征在于:所述抗体能够共免疫沉淀所述的 caspase(活性 caspase-8 和 pro-caspase-8)与 caspase 结合蛋白,而且能够在洗脱后自免疫复合物中有效地释放出 caspase 和 caspase 结合蛋白。
5
- 2.如权利要求 1 所述的抗体,其特征在于:所述抗体是多克隆抗体或其片段。
- 3.如权利要求 1 所述的抗体,其特征在于:所述抗体是单克隆抗体或其片段。
- 4.如权利要求 1 所述的抗体,其特征在于:所述抗体是嵌合抗体或其片段。
- 10 5.如权利要求 1 所述的抗体,其特征在于:所述抗体是全人源化抗体或其片段。
- 6.如权利要求 1 所述的抗体,其特征在于:所述抗体是抗-抗 Id 抗体或其片段。
- 7.如权利要求 1-6 中任何一项所述的抗体,其特征在于:用来免疫的肽包括序列 CQGDNYQKGIPVETD。
- 8.如权利要求 1-7 中任何一项所述的抗体,其特征在于:用来免疫的肽与匙孔血蓝蛋白(KLH)偶联。
15
- 9.如权利要求 1-8 中任何一项所述的抗体,其特征在于:所述抗体是免疫球蛋白同种型 IgG₁。
10. 如权利要求 9 所述的抗体,其特征在于:所述抗体引发 caspase-8 的加工。
11. 如权利要求 1-10 中任何一项所述的抗体在改进 ELISA 试验中的应用。
- 20 12. 一种权利要求 1 或 2 所述的抗体的制备方法,其特征在于:所述方法包括用 caspase-8 Sub-1 亚基 C 末端的肽免疫动物。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其特征在于:所述抗体是单克隆抗体。
14. 如权利要求 12 或 13 所述的方法,其特征在于:用来免疫的肽包括氨基酸序列 CQGDNYQKGIPVETD。
- 25 15. 如权利要求 12 或 13 所述的方法,其特征在于:免疫原与载体连接。
16. 如权利要求 15 所述的方法,其特征在于:所述载体是 KLH。
17. 一种 caspase 和 caspase 结合蛋白的纯化方法,其特征在于:所述方法包括使含有 caspase 和 caspase 结合蛋白的样品与权利要求 1-10 中任何一项所述的抗体接触,共免疫沉淀 caspase 和 caspase 结合蛋白,洗涤产生的免疫复合物,并用 caspase 衍生的竞争肽自免疫复合物中回收 caspase 和 caspase 结合蛋白。
30
18. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于:所述样品选自体液、细胞提取物

和 DNA 表达文库。

19. 如权利要求 17 或 18 所述的方法，其特征在于：所述竞争肽包括氨基酸序列 CQGDNYQKGIPVETD (SEQ ID NO: 4)。

20. 如权利要求 17 至 19 中任何一项所述的方法，其特征在于：所述样品中的
5 细胞在提取前受刺激。

21. 如权利要求 17 至 20 中任何一项所述的方法，其特征在于：所述 caspase 是 caspase-8。

22. 一种用针对 Sub-1 C 端结构域的抗体联合针对 Sub-1 N 端结构域的抗体纯化与 caspase-8 C 端结构域相结合的 caspase-8 调节蛋白的方法，其特征在于：所
10 述方法包括首先使 caspase-8 和调节蛋白与抗 N-端结构域抗体共沉淀，再用抗 C-端结构域抗体洗脱 caspase-8 调节蛋白。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于：所述抗 N 端结构域抗体是单抗 182。

24. 如权利要求 22 或 23 所述的方法，其特征在于：所述抗 C 端结构域抗体是
单抗 179。

25. 表位 179 (SEQ ID NO: 4) 在获得权利要求 1 至 6 中任何一项所述抗体中的应
15 用，其特征在于：所述的应用包括用这样一个表位免疫动物。

抗天冬氨酸特异半胱氨酸蛋白酶-8 的抗体，其制备方法及应用

5 技术领域

本发明涉及抗天冬氨酸特异半胱氨酸蛋白酶(caspase-8)中特异性区域的抗体及其应用。

发明背景

10 肿瘤坏死因子(TNF- α)和淋巴毒素(TNF- β)是多功能促炎细胞因子，它们主要由单核白细胞形成，对细胞有多种作用(Wallach, D. (1986), Interferon 7 (Ion Gresser 编辑), 83-122 页, Academic Press, London; Beutler 和 Cerami (1987))。TNF- α 和 TNF- β 通过结合特异性细胞表面受体来启动其作用。其中一些作用可能对生物体有利：它们可能会破坏例如肿瘤细胞或感染了病毒的细胞，并增强粒细胞的
15 抗菌活性。通过这种方式，TNF 对于保护生物体抵御肿瘤和感染性因子以及从损伤中恢复有贡献。因此，TNF 可用作抗肿瘤剂，其中它结合肿瘤细胞表面上的受体，从而启动了导致肿瘤细胞死亡的行为。TNF 还可用作抗感染剂。

然而，TNF- α 有有害的作用。有证据显示，过度产生 TNF- α 会在几种疾病中起主要致病作用。例如，已经知道，TNF- α 主要作用于脉管结构，这是脓毒休克症状
20 的主要病因(Tracey 等, 1986)。在一些疾病中，TNF 可能会通过抑制脂肪细胞的活性和引起缺乏食欲而导致体重过度减轻(恶病质)，因此，TNF- α 称为恶病质素。另外，它还被描述成是风湿性疾病中组织损伤的一种介导剂(Beutler 和 Cerami, 1987)，以及移植物抗宿主反应中所见破坏的主要介导剂(Grau GE 等人, 1989)。此外，已知 TNF 参与发炎过程和其它许多疾病。

25 两种不同的独立表达的受体 p55(CD120a)和 p75(CD120b) TNF 受体与 TNF- α 和 TNF- β 特异性结合，它们启动和/或介导了 TNF 的上述生物学效应。这两种受体在结构上有不相似的胞内结构域，这暗示它们的信号传导方式不同(参见 Hohmann 等, 1989; Engelmann 等, 1990; Brockhaus 等, 1990; Loestscher 等, 1990; Schall 等, 1990; Nophar 等, 1990; Smith 等, 1990)。然而，例如涉及 CD120a 和 CD120b
30 胞内信号传导的各种蛋白和可能存在的其它因子的细胞机制尚未得到阐明。该胞内信号的传导通常在配体(即 TNF- α 或 β)结合受体后发生，正是该胞内信号的传导致

使级联反应开始并最终导致所见的细胞对 TNF 的反应。

关于上述 TNF 的杀细胞作用,就目前研究的大多数细胞而言,该作用主要由 CD120a 引发。抗 CD120a 胞外结构域(配体结合域)的抗体本身能引发杀细胞效应(见 EP 412486),该效应与受体交联抗体的效率相关,认为这是胞内信号传导过程产生的第一步。而且,诱变研究(Brakebusch 等,1992; Tartaglia 等,1993)已经表明, CD120a 的生物功能取决于其胞内结构域的完整性,因而提出导致 TNF 杀细胞效应的胞内信号传导启动的发生是 CD120a 的两个或多个胞内结构域缔合的结果。而且, TNF(α 和 β)形成均三聚体,因此,已提出通过 CD120a 靠其结合和交联受体分子即引起受体聚集的能力来诱导胞内信号传导(Engelmann H 等,1990)。

10 TNF/NGF 受体超家族的另一个成员是 FAS/AP01 受体(CD95)。CD95 以凋亡方式介导细胞死亡(Itoh 等,1991),并且好象是自身反应 T 细胞的阴性选择物,即在 T 细胞成熟期间,CD95 介导了识别自身抗原的 T 细胞的凋亡性死亡。还发现,CD95 基因(lpr)中的突变在小鼠引起了与人自身免疫疾病全身性红斑狼疮(SLE)相似的淋巴细胞增生疾病(Watanable-Fukunaga 等,1992)。CD95 的配体是其它细胞中杀
15 伤 T 细胞(或细胞毒性 T 淋巴细胞-CTL)中携带的细胞表面相关分子,因此,当该 CTL 接触携带 CD95 的细胞时,它们能诱导携带 CD95 的细胞编程性细胞死亡。另外,已经制得对 CD95 有特异性的单克隆抗体,该单克隆抗体能诱导携带 CD95 的细胞,包括被编码人 CD95 的 cDNA 转化的小鼠细胞凋亡性细胞死亡(Itoh 等,1991)。

20 Wallach 等(1999)对 TNF 受体与包括不同受体的 Fas 信号传导机制、它们的调节及下游已鉴定的信号传导分子作了详细综述。

已经发现,某些恶性细胞和 HIV 感染的细胞在其表面携带了 CD95,因此可利用抗 CD95 的抗体或 CD95 配体来引发这细胞中的 CD95 介导的胞毒作用,从而提供一种抵抗这些恶性细胞或 HIV 感染的细胞的方法(见 Itoh 等,1991)。因此,寻求其它方法来增强 CD95 胞毒活性可能也会有治疗潜力。

25 提供一种调节对 TNF(α 或 β)和 CD95 配体的细胞反应的方法是人们长期以来的需求。例如,在上述病理场合下,当 TNF 或 CD95 配体过度表达时,就需要抑制 TNF 或 CD95 配体诱导的杀细胞效应,而在其它场合,例如伤口愈合的应用中,则希望增强 TNF 的效应,或在 CD95 的情况下,在肿瘤细胞或 HIV 感染的细胞中,希望增强 CD95 介导的效应。

30 申请人已经用了很多方法(例如参见欧洲专利申请 No. EP 186833, EP 308378, EP 398327 和 EP 412486)来调节 TNF 的有害作用,方法是用抗 TNF 抗体或可溶性

TNF 受体(基本上是此受体的可溶性胞外结构域)抑制 TNF 与其受体结合, 以和 TNF 与细胞表面结合的 TNF 受体(TNF-Rs)结合竞争。另外, 由于 TNF 与其受体的结合是 TNF 诱导细胞效应所需的, 因此申请人已经设法通过调节 TNF-Rs 的活性来调节 TNF 的作用(例如参见 EP 568925)。

5 EP 568925 涉及一种调节信号转导和/或 TNF-Rs 中断裂的方法, 从而肽或其它分子可与受体本身或与该受体相互作用的效应蛋白相互作用, 从而调节了 TNF-Rs 的正常功能。EP 568925 描述了在 CD120a 的胞外、跨膜和胞内结构域中有突变的各种 CD120a 突变体的构建和性质分析。这样, CD120a 的上述结构域内的区域被确定为受体发挥功能, 即与配体(TNF)结合以及随后的信号转导和胞内信号传导, 最终导致所见的 TNF 对细胞的效应所必需的。而且, 该文还描述了许多分离和鉴定蛋白、肽或其它因子的方法, 这些蛋白、肽或其它因子能结合 CD120a 上述结构域内的不同区域, 可能参与了 TNF-Rs 活性的调节或调控。在 EP0 368925 中还描述了分离和克隆编码这些蛋白和肽的 DNA 序列的方法; 构建表达载体来产生这些蛋白和肽的方法; 以及与 CD120a 或与结合 CD120a 不同区域的上述蛋白和肽相互作用的抗体或其片段的制备方法。然而, EP 568925 没有指明结合 TNF-Rs 胞内结构域的实际蛋白和肽。同样, EP 568925 也没有公开能结合 CD95 胞内结构域的蛋白或多肽。

10 因此, 当希望抑制 TNF 或 CD95 配体的作用时, 需要减少细胞表面的 TNF-Rs 或 CD95 的数量或活性, 而当需要增强 TNF 或 CD95 配体的作用时, 希望增加 TNF-Rs 或 CD95 的数量或活性。出于这一目的, 已经对 CD120a 和 CD120b 的启动子进行了测序和分析, 并且已经发现了许多对不同转录调节因子有特异性的一些关键序列基序, 因此可以在其启动子水平上来控制这些 TNF-Rs 的表达, 即通过抑制启动子的转录来减少受体数量, 增强启动子转录来增加受体数量(EP 606869 和 WO 9531206)。

25 尽管已经知道肿瘤坏死因子(TNF)受体以及结构上相关的受体 CD95, 在受白细胞产生的配体机制刺激时, 在细胞内引发了导致细胞自身死亡的破坏性活性, 但是对该引发的机制认识甚少。突变研究表明, 在 CD95 和 CD120a 中, 细胞毒性的信号传导涉及其胞内结构域的不同区域(Brakebusch 等, 1992; Tartaglia 等, 1993; Itoh 和 Nagata, 1993)。这些区域(“死亡结构域”)的序列相似。CD95 和 CD120a 的“死亡结构域”均有自身缔合的超势。它们的自身缔合明显促进了信号传导作用启动所需的受体聚集(见 Bigda 等, 1994; Boldin 等, 1995), 且在高水平受体表达下会导致引发不依赖于配体的信号传导(Boldin 等, 1995)。

一些淋巴细胞的细胞毒性效应受淋巴细胞产生的配体和该靶细胞 CD95 相互作用所介导(另见 Nagata 和 Goldstein, 1995)。单核吞噬细胞杀死细胞作用涉及 TNF 及其受体 CD120a (另见 Vandenabeele, 1995)。和其它受体诱导的效应一样, TNF 受体和 CD95 通过一系列蛋白-蛋白相互作用(从配体-受体结合到最终激活酶促效应功能)诱导细胞死亡, 在研究中已经描述启动细胞死亡信号传导作用的非酶促蛋白-蛋白相互作用: TNF 或 CD95 配体三聚体分子与受体结合, 其胞内结构域相互作用(Brakebusch 等, 1992; Tartaglia 等, 1993; Itoh 和 Nagata, 1993)由于死亡结构域基序自身缔合的趋势而增强(Boldin 等, 1995a), 以及两种细胞质蛋白(这两种蛋白也能相互结合)与受体胞内结构域受诱导结合—MORT-1(或 FADD)与 CD95 结合(Boldin 等, 1995b; Chinnaiyan 等, 1995; Kischkel 等, 1995), TRADD 与 CD120a 结合(Hsu 等, 1995; Hsu 等, 1996)。MORT-1 和 TRADD 除了能结合 CD95 和 CD120a 外, 还能相互结合, 或者与含有其它死亡结构域蛋白例如 RIP(另见 Stanger 等, 1995)结合, 从而在 CD95 和 CD120a 之间提供了功能性“串话(cross-talk)”。这些结合发生在受体及其结合蛋白中共有的保守序列基序—“死亡结构域模块”中。另外, 尽管在酵母双杂交测试中, MORT-1 显示出自发结合 CD95, 但是在哺乳动物细胞中, 这一结合只有在受体受刺激后才会发生, 提示 MORT-1 参与了 CD95 信号传导的启动行为。MORT-1 不含酶活性特征的序列基序, 因此, 它引发细胞死亡的能力看来似乎并不是 MORT-1 本身固有的活性, 而是激活了结合 MORT-1 的其它一些蛋白, 并进一步作用于信号级联反应的下游。分子缺少 N 端部分的 MORT-1 突变体的细胞表达已经显示出阻断 CD95 或 CD120a 诱导的细胞毒性(Hsu 等, 1996; Chinnaiyan 等, 1996), 这说明此 N 端区域通过蛋白-蛋白的相互作用传递了两种受体杀细胞效应的信号。

最近的研究已经暗示了一组胞质硫醇蛋白酶, 它们在各种生理性细胞死亡过程开始时与 *Caenorhabditis elegans* 蛋白酶 CED3 以及哺乳动物白介素-1 β 转化酶 (ICE)在结构上相关(综述见 Kumar, 1995 和 Kenkart, 1996)。也有一些证据表明, 该家族的蛋白酶可能参与了 CD95 和 TNF-Rs 诱导的细胞毒性。发现这些蛋白酶的特异性肽抑制剂以及封闭其功能的两种病毒编码的蛋白: 牛痘蛋白 crmA 和杆状病毒 p35 蛋白, 为细胞提供了抗此细胞毒性的保护力(Enari 等, 1995; Tewari 等, 1995; Xue 等, 1995; Beidler 等, 1995)。某些特异性细胞蛋白的迅速断裂明显是由 CED3/ICE (caspase)家族蛋白酶介导的, 这可在 CD95 或 TNF-Rs 刺激后不久在细胞内得到证实。

已经分离、克隆并鉴定出这样一种蛋白酶及其各种同种型(包括抑制性的同种型),命名为 MACH(也称为 caspase-8),它是一种 MORT-1 结合蛋白,关于其可能的用途在共同拥有的 PCT 申请 PCT/US96/10521 和本发明人最近的出版文献(Boldin 等, 1996)中有详细描述,它们全部纳入本文作为参考。本发明人(未发表)和其他人(Fernandes-Alnermri 等, 1996; Srinivasula 等, 1996)还分离并鉴定出另一种此类蛋白酶及其各种同种型(包括抑制性同种型),其命名为 Mch4(也称为 caspase-10)。caspase-10 也是一种 MORT-1 结合蛋白。因此,上述文献中还描述了关于 caspase-10 的所有方面、特征、性质和用途,所有这些文献均全部纳入本文作为参考。

还应注意,caspase、caspase-8 和 caspase-10 具有相似的前域(prodomain)(见 Boldin 等, 1996; Muzio 等, 1996; Fernandes-Alnermri 等, 1996; Vincent 和 Dixit, 1997),它们通过其前域与 MORT-1 相互作用,该相互作用是通过 MORT-1 N 端部分中的、以及 caspase-8 和 caspase-10 中重复存在的“死亡效应域”DED 而发生的(见 Boldin 等, 1995b; Chinnaiyan 等, 1995)。

这些蛋白酶(天冬氨酸特异半胱氨酸蛋白酶)是一个数量渐增的具有几个共同特征的半胱氨酸蛋白酶家族。已经发现大多数 caspase 参与了编程性细胞死亡或凋亡的启动和执行,而其他的看来参与了促炎细胞因子的产生(Nicholson DW 等, 1997; Salvesen GS 等, 1997; Cohen GB, 1997)。它们被合成作为几乎无催化活性的前体,通常靠结构域间接头中存在的特异性内部天冬氨酸残基断裂来激活。caspase 的断裂位点用四肽序列(X-X-X-D)来确定,而断裂总发生在天冬氨酸的下游。结果,某些成熟的活性 caspase 就能加工并激活其自身以及其它无活性的前体(Fernandes-Alnermri T 等, 1996; Srinivasula SM 等, 1996)。

编程性细胞死亡过程的激活通常是特异性的,涉及上游的 caspase(称为“启动 caspase”)对下游的 caspase(称为“执行 caspase”)的连续加工。这两类 caspase 的结构也反映了它们的功能特征。实际上,“启动 caspase”与“执行 caspase”相比具有更长的前域区域(Salvesen GS 等, 1997; Cohen GM, 1997)。长的前域允许启动物或“顶端”caspase 能被 TNF 受体家族的死亡受体触发而激活。在配体诱导死亡受体发生三聚后,启动 caspase 通过其长的 N-端前域被募集,与特异性衔接分子相互作用,形成了诱导死亡的信号传导复合物(Cohen GM, 1997; Kischkel FC 等, 1995)。例如,caspase-8/MACH 以及可能的 caspase-10(它含有两个死亡效应域)被衔接分子 FADD/MORT-1 募集到受体复合物处,而 caspase-2 通过 CRADD/RAIDD

以及 RIP 被募集 (Nagata S 等, 1997; Mac Farlane 等, 1997; Ahmad M 等, 1997; Duan H 等, 1997)。由于激活的受体复合物的三聚特征, 认为至少两个 caspase 分子相互毗邻, 从而使它们通过自身催化加工被激活 (Yang 等, 1998; Muzio 等, 1998)。

caspase 被合成作为由三个主要亚基组成的酶原, 这三个亚基是 N-端前域以及两个亚基, 两个亚基有时被一个接头肽隔开。两个亚基称为“长的”亚基或含有活性酶促位点主要部分的亚基 1 (Sub-1) 和“短的”亚基或亚基 2 (Sub-2)。为了完全激活酶, 应对前域和两个亚结构加工, 形成前域和两个亚基。该两个亚基形成一个异二聚体。根据 caspase-3 的推定的三维结构, 看来长结构域的 C-端和短亚基结构域的 N-端必须被释放, 且短亚基的 C-端必须与长亚基的 N-端紧密毗邻, 以便产生一个正确折叠的有活性的酶 (Rotonda 等, 1996; Mittle 等, 1997, Srinivasula 等, 1998)。

虽然一直认为导致细胞凋亡或坏死的通道是完全不同的, 最新研究结果表明: caspase 是细胞凋亡的主要介导剂, 也能够以正面或负面方式牵涉于细胞坏死。事实表明, caspase 抑制剂 crmA 在 L929 细胞中的过度表达使这些细胞对 TNF 的坏死活性的敏感度增加 1000 倍 (Vercammen 等人, 1998), 这表明 caspase 对 TNF 诱导的坏死活性有抑制作用。另外, 最近也有人提出, 通过这些配体在细胞凋亡诱导中发挥关键作用 (综述见 Wallach 等, 1999) 的 TNFR1 和 Fas 相关的死亡结构域在坏死诱导中起重要作用 (Boone 等, 2000)。令人感兴趣的是, 有迹象显示 caspase 抑制剂阻断 FasL 诱导的肝坏死 (Kunstle 等, 1997)。

因为 caspase 介导的蛋白水解是细胞凋亡过程的关键中心要素 (Nicholson D. W. 和 Thornberry N. A. (1997); Villa 等 (1997) 和 Salvesen G. S., 以及 Dixit, V. M. (1997)), 鉴定这些蛋白酶关键下游分子目标对了解细胞信号转导不可避免的。已经显示, 在细胞死亡过程中, 各种结构和信号传导蛋白经由 caspase 切断 (Nicholson D. W. 和 Thornberry N. A. (1997); Villa P 等 (1997)), 包括 caspase 激活的脱氧核糖核酸酶 ICAD, 它是核小体间 DNA 降解所需的, 但对细胞凋亡的执行是不必要的 (Enari M 等, 1998; Sakahira 等, 1998)。胶溶蛋白是一种调节细胞质肌动蛋白胶溶转换的肌动蛋白调节蛋白 (Yin H. L. 和 Stossel T. P. 1979), 牵涉于细胞凋亡中, 依据是: (i) 它在体内细胞凋亡过程中断裂 (Kothakota S. 等, 1997), (ii) 它通过过度表达防止细胞凋亡 (Ohtsu M 等, 1997); 以及 (iii) 通过其中一种断裂的产物诱导细胞凋亡 (Kothakota S. 等, 1997)。胶溶蛋白具有 Ca²⁺ 激活的多重活性, 切断肌动蛋白丝, 盖在丝的快速生长端上, 还能使肌动蛋白聚合成

核(Yin H. L. 和 Stossel T. P. (1980); Kurth M. 和 Bryan J. (1984); Janmey P. A. 和 Stossel T. P. (1987))。

5 专利申请 WO 0039160 公开了能够与 caspase-8 的 Sub-1 和/或 Sub-2 相互作用的 caspase-8 相互作用蛋白。通过采用 caspase-8 单链构造体的双杂交筛选法发现了 caspase 相互作用蛋白。

通常, 共同纯化 caspase-8 和 caspase-8 结合蛋白涉及 caspase-8 的标记表位(tag epitope)修饰(例如 HA 与 caspase 融合, Roth 等)以及抗标记特异性抗体的使用。然而, 给蛋白表位标记可能影响到标记蛋白的活性。

对 caspase-8 有特异性的抗体有:

10 抗-Mach Cat. No 218777, 它是 Calbiochem 公司的一种多克隆鸡抗体, 能识别天冬氨酸特异半胱氨酸蛋白酶-8(pro-caspase-8)和激活的 caspase-8。用来获得该抗体的免疫原是全长人重组 caspase-8 蛋白。

Caspase-8(D384)6B6, 它是 Cell Signalling technology 的一种单克隆抗体, 用与 KLH(匙孔 血 蓝 蛋白)偶联的合成肽免疫小鼠而制成, 对应于在 caspase-8
15 Sub-2 的氨基末端上的残基。通过蛋白质印迹, 这种抗体能特异性地检测 caspase-8 的断裂 10 kDa 小亚基的内源水平。进行蛋白质印迹时建议采用该单克隆抗体, 因为它不会与全长 caspase-8 起交叉反应。

B9-2 抗体, 它是 Pharmingen(A Becton Dickinson 公司)的一种单克隆抗体, 能识别对应于 caspase-8 的 55 kDa 条带。以对应于 caspase-8 的氨基酸 335-469
20 的人重组 caspase-8 蛋白片段作为免疫抗原(Weaver 等, 2000)。在蛋白质印迹分析中, 建议采用这种单克隆抗体来监测 caspase-8 的水平。用此单克隆抗体不能鉴定活性 caspase-8, 这是因为用来产生抗体的片段只有在非活性 caspase-8 中是完整的。

Caspase-8 p10(S-19): sc-6135, 它是 Santa Cruz Biotechnology 公司经亲
25 和纯化而得到的一种山羊多克隆抗体, 针对源自在人 caspase-8 Sub-2 的羧基末端附近的肽。通过蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫组织化学法, 这种多克隆抗体与源自人的 p10 亚基(Sub-2)和 pro-caspase-8 反应。它与 caspase-8 p20(Sub-1)不起交叉反应。

Caspase-8 1C12, 它是 Cell Signalling technology 的一种单克隆抗体, 用
30 与 KLH 偶联的合成肽免疫小鼠而制成, 对应于在 caspase-8 Sub-1 的羧基末端上的残基。通过蛋白质印迹, 这种抗体能特异性地检测 pro-caspase-8 和活性

caspase-8。现时尚未知道用来免疫小鼠，产生此单克隆抗体的肽的精确序列。

Caspase-8 p20(H-134): sc-7890, 它是 Santa Cruz Biotechnology 公司的一种兔多克隆抗体，针对对应于源自在人 caspase-8 Sub-1 内的氨基酸 217-350 的重组蛋白。通过蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫组织化学法，这种多克隆抗体与源自小鼠、兔和人的活性 caspase-8 与 pro-caspase-8 反应。

然而，技术数据书上并没有关于 caspase-8 免疫沉淀的效率、结合蛋白是否可能被共沉淀以及若能共沉淀，是否可能自免疫复合物中回收 caspase-8 和 caspase-8 结合蛋白的资料。

所以，目前未见有报导抗 caspase-8 的多克隆和单克隆抗体，其包括以下全部特征：能有效地免疫沉淀 pro-caspase-8 和活性 caspase-8，并能在免疫沉淀复合物中分离出 caspase-8，以便共纯化 caspase-8 和 caspase-8 结合蛋白。

所以，本发明的方法解决了 caspase-8 和 caspase-8 结合蛋白共沉淀与纯化领域中长期存在的问题。

15 发明内容

本发明通过用 caspase-8 亚基 Sub-1 C 末端的肽(例如 CQGDNYQKGIPVETD)及其片段免疫动物而得到一种抗体(多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、全人源化抗-抗 Id 抗体或其片段)，它能够共免疫沉淀所述的 caspase(活性 caspase-8 和 pro-caspase-8)与 caspase 结合蛋白，而且洗脱后能自免疫复合物中有效地释放出 caspase 和 caspase 结合蛋白。更具体地说，用来免疫的肽最好与 KLH 偶联。

在一实施例中，本发明的抗体是免疫球蛋白同种型 IgG₁。

在另一实施例中，本发明的抗体引发 caspase-8 的加工。

本发明一方面提供了一种能用来建立 ELISA 试验的抗体。

本发明另一方面提供了一种制备本发明抗体的方法，以及该抗体在细胞样品例如细胞提取物、表达 cDNA 文库以及基因组或组合肽文库中所含的 caspase 相关蛋白，更好是包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的 caspase 相关蛋白，或其同种型、等位基因变体、片段、功能性类似物、融合蛋白、突变体或衍生物的分选方法中的应用。更具体地说，本发明涉及所述抗体在分离 caspase 相关蛋白中的应用，其中 caspase 是 caspase-8。

30 在本发明一实施例中，用来免疫的免疫原与载体相连优选 KLH 相连。

本发明还提供了一种纯化 caspase 优选 caspase-8 和 caspase 相关蛋白的方

法,其包括使含有人 caspase 的材料与所述单克隆抗体接触。更具体地说,优选用免疫肽洗脱 caspase 相关蛋白。

此外,本发明提供了一种用针对 Sub-1 C 端结构域的抗体(例如单抗 179)联合针对 Sub-1 N 端结构域的抗体(例如单抗 182)来纯化与 caspase-8 C 端结构域相结合的 caspase-8 调节蛋白的方法,其包括首先使 caspase-8 和调节蛋白与抗 N-端结构抗体共沉淀,再用抗 C-端结构域抗体洗脱 caspase-8 调节蛋白。

另外,本发明提供了表位 179(SEQ ID NO: 4)在获得本发明抗体中的应用,其包括用该表位免疫动物。

10 附图说明

图 1 所示为 pro-caspase-8 的氨基酸序列。用来制备单克隆抗体的 caspase-8 肽序列以粗体和下划线表示。

肽 179—肽 CQGDNYQKGIPVETD, 对应于 caspase-8 大亚基(Sub-1)C 端。

肽 182—肽 LSSPQTRYIPDEAD, 对应于 caspase-8 小亚基(Sub-2, 残基 Lys385-Gly399)N 端。

肽 183—肽 SESQTLDKVYQMKS KPR, 对应于 Sub-1(残基 Ser217-Gly234)N 端。

图 2 所示为用抗表位 179 的单克隆抗体在 BJAB 细胞溶胞产物中所见的少量 caspase-8 的有效免疫沉淀。利用各种抗体进行免疫沉淀将 BJAB 细胞溶胞产物中的 caspase-8 除去(制备前: -, 制备后: +, 用 Fas 受体刺激), 从左至右为:

泳道 3 和 4, 单抗 179: 抗对应于 Sub-1 C 端(caspase-8 大亚基, 残基 Cys360-Asp374)的肽的单克隆抗体。

泳道 5 和 6, 单抗 183.1 以及泳道 7 和 8, 单抗 183.2: 抗对应于 Sub-1 N 端(残基 Ser217- Gly234)的肽的两种单克隆抗体。

泳道 9 和 10, 单抗 182: 抗对应于 Sub-2 N 端(caspase-8 小亚基, 残基 Lys385-Asp399)的肽的单克隆抗体。

泳道 11, NMS—正常小鼠血清。

该图为用所示抗体免疫沉淀后细胞溶胞产物和未沉淀的总细胞溶胞产物中剩余量的 caspase-8 的蛋白质印迹评估。

图 3a 所示为如图 2 所示免疫沉淀后的 caspase-8 通过与各自的肽竞争而洗脱, 其中这些肽是各种抗体所针对的。以所示抗体产生的免疫沉淀物洗脱液中的 caspase-8 用蛋白质印迹分析进行检测(如图 2)。

图 3b 所示为如图 2 所示免疫沉淀后的 caspase-8 通过与各自的肽竞争而洗脱, 其中这些肽是各种抗体所针对的。以所示抗体产生的免疫沉淀物洗脱液中的 caspase-8 用银染示出。

图 4 所示为用对应于 Sub-1 C 端 (caspase-8 大亚基, 残基 Cys360-Asp374) 的肽免疫而制成的多克隆血清在 BJAB 细胞溶胞产物中所见的少量 caspase-8 的有效免疫沉淀。从左至右是用各种抗体进行免疫沉淀将 BJAB 细胞溶胞产物中的 caspase-8 除去(制备前: -, 制备后: +, 用 Fas 受体刺激)。用下列抗体免疫沉淀后经蛋白质印迹分析检测溶胞产物中剩余的 caspase-8:

泳道 3 和 4, NMS—正常小鼠血清。

10 泳道 5 和 6, 抗 179 多克隆抗体, 它是一种抗 Sub-1 C 端 (caspase-8 大亚基, 残基 Cys360-Asp374) 的兔多克隆抗体。

泳道 7 和 8, 单抗 182。

TL-总细胞溶胞产物。

图 5 所示为用各种抗体在无刺激的 BJAB 细胞溶胞产物中得到的免疫沉淀和洗脱的 caspase-8。从左至右是用下列抗体对免疫沉淀物洗脱之后经蛋白质印迹分析检测到的 caspase-8 水平:

泳道 1, 抗 Sub-1 N 端 (残基 Ser217-Gly234) 的抗 183 多克隆血清。

泳道 2, 单抗 183.2, 抗 Sub-1 N 端 (残基 Ser217-Gly234) 的单克隆抗体。

20 泳道 3, 单抗 179, 抗 Sub-1 C 端 (caspase-8 大亚基, 残基 Cys360-Asp374) 的单克隆抗体。

加入单抗 179 以新加工模式产生的 caspase-8 小片段 (5.6 kDa), 用箭头标记。

图 6 所示为以 Fas 配体刺激前或刺激 1 小时后, 用单抗 179 从 BJAB 细胞溶胞产物中免疫沉淀, 并用肽 179 洗脱得到的 caspase-8 及相关蛋白 (P72/Cari)。用单抗 179 免疫沉淀的 caspase-8 及相关蛋白被洗脱出来 (如图 3b), SDS-PAGE 分离, 25 银染。泳道 1 和 2 为对照物, 其中细胞溶胞产物用 MIgG1、小鼠免疫球蛋白 IgG1 免疫沉淀。

图 7 所示为 P72 蛋白基序的示意图。一个卷曲螺旋基序 (C)、紧靠蛋白 N 端的两个串联位列的 'SURP 基序' (S) 以及一个位于蛋白 C 端的 'G-膜片' 基序 (G 基序)。图中也指出 G 基序内存在的天冬氨酸残基 D600。D600 是蛋白质的残基 D600 被谷氨酸残基取代的突变体。

图 8 所示为用来制备全长 p72 cDNA 的方法的示意图。EST 克隆 IMAGE 2964545

购自 Incyte Genomics, 它缺少最初 21 个核苷酸序列(编码最初 7 个氨基酸), 用此克隆作为模板与下列一对引物进行第一次聚合酶链式反应(PCR), 正向引物: 含有与 5' EST 克隆重叠的核酸以及 21 个缺失核苷酸中的 15 个核苷酸的 P2, 逆向引物: 含有与 3' EST 重叠的序列的 P3。所得的 PCR 产物作为模板与下列一对引物进行第二次 PCR, 正向引物: 含有全部 21 个缺失核苷酸以及 5 个 EST 核酸的 P1, 逆向引物: 含有与 3' EST 重叠的序列的 P3。

图 9 所示为在零点和 Fas 配体刺激 20 分钟后在 BJAB 细胞溶胞产物中用单抗 179 共免疫沉淀 caspase-8 和 p72。用单抗 179 免疫沉淀后洗脱出来的蛋白质经 SDS-PAGE 凝胶分离, 银染检测。在 Fas 配体刺激之前, 对应于 p72 的表观分子量约 72.5 kDa 条带与 pro-caspase-8 共沉淀(泳道 3)。刺激 20 分钟后, 72.5 kDa 条带的水平下降, 检测到一条对应于较低表观分子量约 68 kDa 的蛋白质的新条带(泳道 4)。

泳道 1 和 2 为负对照, 其包括用 MIgG1、小鼠免疫球蛋白 IgG1 免疫沉淀细胞溶胞产物。

图 10 所示为用活性 caspase-8 切割 p72。在 ^{35}S 甲硫氨酸存在下, 利用 TnT T7 偶联的网织红细胞溶胞系统使 P72 cDNA 编码的蛋白质在网织红细胞溶胞产物中体外表达, 37°C 下在重组活性 caspase-8 存在或不存在下培育 1 小时后测试该 P72 cDNA 编码的蛋白质。另外, 用 2 个不同 p72 cDNA 突变体编码的 TnT 产物研究 p72 的切割: 一个是编码 p72 的突变体, 其中被推测是 caspase-8 的靶残基的残基 D600 突变为 E[p72(D600E)], 另一个基因缺失突变体, 所得的截短蛋白缺少下游残基 [D600 p72(1-600)]。得到的蛋白质 SDS-PAGE 分离, 实验结果用磷屏成像仪观察。

图 11 所示为用 Fas 配体刺激之前(0)或刺激之后 5、10、20、40 和 60 分钟时在 BJAB 细胞溶胞产物中以单抗 179 共免疫沉淀得到的 caspase-8 和 p72。肽被洗脱出来, SDS-PAGE 凝胶分离, 银染检测。刺激前(0)检测到表观分子量为 72.5 kDa 的肽。刺激 5 和 10 分钟后, 出现具有较低表观分子量约 68 kDa 的新蛋白。刺激 40 分钟后, 72.5 kDa 条带完全消失, 只检测到 68 kDa。在 60 分钟时, 上述蛋白没有一种与 caspase-8 共沉淀。

具体实施方式

本发明涉及抗 caspase-8 的 Sub-1 C 端结构域的抗体。结果发现抗此结构域的这些抗体具有很好的使 caspase-8 (pro-caspase-8 和活性 caspase) 免疫沉淀的

能力,即使 caspase 的浓度很低,效率也很高。这些抗体还可以用来有效地共沉淀和分离结合 caspase-8 的蛋白。

本发明的抗体可以是多克隆抗体,或者更优选为单克隆抗体。在一优选实施例中,由 caspase-8 的 Sub-1 C 端产生的肽包括残基 Cys360-Asp374 和序列
5 CQGDNYQKGIPVETD(肽 179, SEQ ID NO: 4),其用来免疫沉淀产生抗体。

用来免疫沉淀的肽可以是合成而来的,用逆向高效液相层析法纯化,并与任何载体如 KLH 偶联,优选通过其天然半胱氨酸或通过一个人工融合半胱氨酸使该肽暴露于载体表面,用来免疫例如制备单克隆抗体的小鼠和制备多克隆抗体的兔。

在一实施例中,用对 Sub-1 C 端结构域所见的表位 179 有特异性的 caspase-
10 8 抗体进行 caspase-8 和 caspase-8 结合蛋白的共免疫沉淀。

本发明的共免疫沉淀以选自静止细胞或刺激细胞的细胞溶胞产物,或者 cDNA 表达文库、基因组或组合肽库的样品进行。

细胞在溶胞作用和免疫沉淀之前,可以用不同细胞凋亡诱导剂刺激,例如用 Fas 配体、TNF 等淋巴因子,或者用饥饿、热激等环境因子处理。

根据本发明,在共免疫沉淀中使用抗体, caspase-8 和 caspase 结合蛋白就能够有效地从免疫沉淀复合物中洗脱出来,通过与由 caspase-8 衍生肽
15 CQGDNYQKGIPVETD 竞争回收在上清液中,免疫时使用同一种肽。

由序列 CQGDNYQKGIPVETD 和 SEQ ID NO: 4 表示的 caspase-8 衍生肽 179 或表
20 位 179,或其突变蛋白、片段、融合蛋白或衍生物,可用来免疫沉淀和产生本发明的抗体。如上所述,通过化学合成或在哺乳动物细胞中利用重组 DNA 技术或切割纯化的蛋白都可产生用来免疫的肽。蛋白还可在细菌或昆虫细胞中产生,详见 F.M. Ausubel 的 Current Protocols in Molecular Biology, ISBN: 047150338X, 1998, 第 16 章。

本发明还涉及本发明的上述表位 179(SEQ ID NO: 4)的突变蛋白,这些突变蛋
25 白基本上保留了基本上只具有该肽天然存在的序列的肽相同的性质。这些“突变蛋白”可以是这样一些突变蛋白,其中肽中的氨基酸残基缺失,或加入了另外一些氨基酸,或被另外一些氨基酸取代,这种修饰而来的肽突变蛋白的生物性质与肽本身相比无显著的改变。

这些突变蛋白由已知的合成和/或定点诱变技术,或任何适合的其它已知技术
30 制备。

本发明突变蛋白中的优选变化被称为“保守的”取代。保守的氨基酸取代包

括一组内同义氨基酸，其具有足够相似的生理化学特性，该组原子之间的取代将保留该分子的生物功能(Grantham, Science, Vol. 185, 第 862-864 页, 1974)。很明显，在上述序列中不改变其功能还可进行氨基酸的插入和缺失，特别是如果这种插入或缺失只涉及少数氨基酸时，如 3 个以下，最好为 2 个以下，不会移去或取代对功能性构造起关键作用的氨基酸。

5 优选同义氨基酸组列于表 1；更好的同义氨基酸组列于表 2；最好的同义氨基酸组列于表 3。

表 1 优选同义氨基酸组

氨基酸	同义组
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

表 2 更好的同义氨基酸组

氨基酸	同义组
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

表 3 最好的同义氨基酸组

氨基酸	同义组
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala

Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

在蛋白中产生氨基酸取代的实施例可用来获得本发明中所用的蛋白质的突变蛋白，包括任何已知的方法步骤，如 Mark 等人的美国专利 RE 33,653、4,959,314、4,588,585 和 4,737,462;Koths 等人的 5,116,943;Namen 等人的 4,965,195;Chong 5 等人的 4,879,111 和 Lee 等人的 5,017,691 专利中提出的方法，以及美国专利 4,904,584 (Shaw 等人) 中提出的赖氨酸取代蛋白。

然后，从产生蛋白或肽的合成混合物或细胞中纯化该蛋白或肽。蛋白的纯化方法已为本领域技术人员所公知，例如在上述文献 *Current Protocols in Molecular Biology* (第 16 章)以及 *Current Protocols in Protein Science* (Wiley and Sons Inc., 第 5 和 6 章)有详细描述。有利的是，肽可以与 KLH 或谷胱甘肽 S-转移酶或等等，或者与序列标记(sequence tag)如组氨酸标记序列的融合物形式 10 产生。融合或标记蛋白的使用简化了纯化程序，如上述文献 *Current Protocols in Molecular Biology* (第 16 章)以及 Qiagen 的组氨酸标记蛋白表达与纯化试剂盒的说明书中所述。

15 如果蛋白或肽已经表达成融合蛋白的形式，在用该蛋白产生抗体之前可切割其融合配偶体，以避免产生抗融合配偶体的抗体。切割融合配偶体以及分离所希望的蛋白在上述 *Current Protocols in Molecular Biology* (第 16 章)中有所描述。

用来表达并纯化与麦芽糖结合蛋白融合的重组蛋白的载体、方案和试剂也可从商业途径获得。

在生产肽时，可能希望不除去融合配偶体，这是因为融合蛋白可能会刺激抗该肽抗体的产生。

5 如上所述，肽还可用化学领域公知的化学方法合成。

抗蛋白质多克隆抗体的产生在 *Current Protocols in Immunology* (Wiley and Sons Inc.) 中有所描述。抗肽抗体的产生可能需要在方案中作些改变，因为肽与蛋白质相比抗原性通常较低。抗肽多克隆抗体的产生可参见上述文献 *Current Protocols in Immunology* (第9章)。

10 单克隆抗体可以从受免疫动物，特别是大鼠或小鼠的脾或淋巴结 B 细胞制得，方法是在有利于杂交细胞生长的条件下与无限增殖的 B 细胞融合。优选与小鼠 B 细胞、细胞系 Ag-8 融合。

产生单克隆抗体的技术在许多文章和书籍中有描述，例如 *Current Protocols in Immunology* (Wiley and Sons Inc.) 的第2和9章，其中描述了用肽免疫动物。
15 这些动物的脾或淋巴结细胞能以经蛋白免疫的动物的脾或淋巴结细胞那样使用，来产生书中第2章所述的单克隆抗体。

用来产生单克隆抗体的技术在 Kohler 和 Milstein(1975) 以及美国专利 4,376,110 中有进一步的描述。

从抗体超变区被几乎随机的序列取代的人抗体基因库中制备抗体的方法在美国专利 5,840,479 中有所描述。如果很难用给定的肽或蛋白免疫动物的话，则这些
20 抗体是优选的。一些结构的免疫原性很弱，即使加入佐剂和与其它蛋白连接成融合构造体，它们的免疫原性仍然很弱。如果希望使用具有与人抗体相似结构的抗体，例如，当希望抗体在人体内有低免疫原性时，则美国专利 5,840,479 中所述的抗体是更优选的。

25 一旦鉴定出合适的抗体，就可能需要改变其特性。例如，嵌合抗体可在生产中获得较得的得率。当希望抗体在人体内免疫原性低时，恒定区被人抗体恒定区取代的嵌合抗体是较为理想的。嵌合抗体的产生在许多出版物中有所描述，例如 Cabilly 等, 1994; Morriso 等, 1984; Boulianne 等, 1984; EP 125023, EP 171496, EP 173494, EP 184187, WO 86/01533, WO 87/02671, Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Hoarbor Labortory, 1988。
30

“全人源化抗体”是指含有人免疫球蛋白的可变区和恒定区的分子。全人源化抗

体有可能用于治疗需要重复治疗的慢性和复发病，如自身免疫病等。一种制备全人源化抗体的方法包括小鼠体液免疫系统的“人源化”，即通过把人免疫球蛋白(Ig)基因座引入内源性 Ig 基因已经失活的小鼠中，制成能产生人 Ig 的小鼠品种(变种小鼠)。Ig 基因座的物理结构和基因重排非常复杂，而表达方法要求最终产生范围大的免疫应答。抗体的差异性主要是 Ig 基因座中的不同 V、D 和 J 基因之间组合重排的结果。这些基因座也含有分散布置的调控元件，它们调控抗体表达、等位基因排斥、类型转换及亲合力成熟性。将未重排的人 Ig 转基因引入小鼠中，结果显示小鼠的重组系统和人的基因兼容。另外，用抗原免疫变种小鼠可以得到分泌各种同种型的抗原特异性人单克隆抗体的杂交瘤细胞。

10 全人源化抗体及其产生方法已为本技术领域公知(Mendez 等, *Nature Genetics*, 15: 146-156 页, (1997); Buggemann 等, *Eur. J. Immunol.*, 21: 1323-1326 页, (1991); Tomizuka 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 722-727 页, (2000); W098/24893)。

另一类抗体是抗独特型抗体。抗独特型(抗-Id)抗体是这样一种抗体，它识别通常与抗体的抗原结合位点相关的独特决定簇。Id 抗体可这样制得，免疫与单克隆抗体来源动物相同的物种和基因型的动物(例如小鼠品种)，其中该单克隆抗体就是制备的抗 Id 所针对的。受免疫动物会识别免疫用抗体的独特型决定簇，并通过产生针对这些独特型决定簇的抗体(抗-Id 抗体)而进行应答。例如参见美国专利 No. 4, 699, 880，纳入其全文作为参考。

20 抗-Id 抗体还可用作“免疫原”，在另一动物中诱导免疫应答，产生所谓的抗-抗-Id 抗体。该抗-抗-Id 抗体与最初诱导抗-Id 的单克隆抗体在表位上相同。因此，通过使用针对单克隆抗体的独特型决定簇的抗体，就可鉴定出表达具有相同特异性的抗体的其它克隆。

因此，针对本发明 caspase-8 C 端亚基、其类似物、片段或衍生物的单克隆抗体可用于在合适的动物如 BALB/c 小鼠中诱导抗-Id 抗体。可用该被免疫小鼠的脾细胞产生分泌抗-Id 单克隆抗体的抗-Id 杂交瘤。此外，抗-Id 单克隆抗体还可与载体，如匙孔 血蓝蛋白(KLH)偶联，并用于免疫其他的 BALB/c 小鼠。这些小鼠的血清含有抗-抗-Id 抗体，该抗体具有最初单克隆抗体的结合特性，对上述的 caspase-8、其类似物、片段或衍生物的表位有特异性。

30 抗-Id 单克隆抗体具有它们自己的独特型表位，或有结构上与被评价表位相似的“独特位”。

术语“抗体”还包括完整的分子及其片段,例如能够结合抗原的 Fab 和 F(ab')₂。Fab 和 F(ab')₂ 片段缺少完整抗体的 Fc 片段,能够更迅速地从循环系统中清除,并且与完整抗体相比具有更低的非特异性组织结合性(Wahl 等, 1983)。

5 应理解, 根源本文公开的用于完整抗体分子的方法, 本发明中有用的 Fab 和 F(ab')₂ 以及其他抗体片段也可用于检测和定量测定 p72 蛋白。这些片段通常用木瓜酶(产生 Fab 片段)或胃蛋白酶(产生 F(ab')₂ 片段)通过蛋白酶水解切割产生。

如果抗体能特异性地与某分子反应从而使该分子与抗体结合, 那么称该抗体“能够结合”该分子。术语“表位”指任何分子中能被抗体识别且还能被抗体结合的部分。表位或“抗原结合簇”通常由分子表面化学活性基团如氨基酸或糖侧链构成, 而且具有特异性的三维结构特征和特异性的电荷特征。

“抗原”是能被抗体结合并还能诱导动物产生能与该抗原表位结合的抗体的分子或分子的一部分。抗原可具有一个或多个表位。上述特异反应指抗原会以高度选择性的方式与其相应的抗体反应, 而不会与大量由其他抗原引起的其他抗体反应。

15 本发明的表位 179 可用来产生有特异性的多克隆抗体、单克隆抗体, 以很好地免疫沉淀和洗脱 caspase-8 与 caspase-8 相关蛋白。这些抗体还可用来诱导 caspase-8 的新加工。

针对 Sub-1 C 端结构域的抗体如单抗 179 可与针对 Sub-1 N 端结构域的抗体如单抗 183 联用, 以特异性地分离 caspase-8 调节蛋白。已知 Sub-1 C 端结构域是 caspase-8 活性位点的一部分, 因此调节蛋白可与它结合(Thornberry 等, 1997)。先用单抗 183, 再用单抗 179 使 caspase-8 与相关的调节蛋白共沉淀, 调节蛋白就可以从 caspase-8 释放到介质中, 并导致鉴定出参与细胞凋亡调节的关键蛋白。

25 在一实施例中, 利用本发明的免疫沉淀方法以单抗 179 将 pro-caspase-8 结合蛋白 Cari 分离出来。结果发现, Cari 被活性 caspase-8 切割, 并参与 caspase-8 激活和细胞凋亡。

本发明的抗体(或其片段)可在组织学上被用作在免疫荧光或免疫电子显微镜中, 用原位检测 caspase-8。原位检测可这样实现: 从患者体内取一份组织样品, 然后将本发明经标记的抗体加入该样品中。抗体(或其片段)的提供最好是通过将标记的抗体(或其片段)施加或覆盖在生物样品上。采用了本发明, 一般技术人员容易知道, 可对各种组织学方法(例如染色步骤)加以改动来实现这种原位检测。

生物样品可以用固相支持物或载体如硝酸纤维素、或能固定细胞、细胞颗粒

或可溶蛋白的其他固相支持物或载体来处理。然后用合适的缓冲液洗涤支持物或载体，再根据本发明上述那样用可检测的标记的抗体处理。再用缓冲液第二次洗涤固相支持物或载体，除去未结合的抗体。然后可用常规方法检测所述固相支持物或载体上所结合的标记的量。

5 “固相支持物”、“固相载体”、“固体支持物”、“固体载体”、“支持物”或“载体”指能结合抗原或抗体的任何支持物或载体。熟知的支持物或载体包括：玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙淀粉酶、天然的和改性的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁石。出于本发明的目的，载体的物性可以是不溶的，或在某种程度上可溶。载体材料可以有实际上所有可能的结构构型，只要偶联的分子能够
10 结合抗原或抗体。因此，支持物或载体的结构可以是球形(如在玻珠内)、圆柱形(如试管的内表面或棒的外表面)。另外，表面可以是平坦的，例如板、测试条带等。优选的支持物或载体包括聚乙烯珠。本领域技术人员可知道用于结合抗体或抗原的其他合适的载体，或者能够通过常规实验来确定这些载体。

如上所述的本发明给定量抗体的结合活性可以用众所周知的方法测定。本领域技术人员能够通过常规实验来确定每次测定的操作条件和最佳试验条件。
15

其他的步骤，诸如洗涤、搅拌、振荡、过滤等，可增加到试验方法中，这些步骤都是常规的或是具体情况下所需的。

本发明的抗体能够可检测地标记的一种方法是将该抗体与酶相连，然后用于酶免疫分析(EIA)。然后，当该酶与合适的底物接触时，酶会与底物反应，从而产生可被例如通过分光光度分析、荧光分析、或肉眼观察检测的化学物。可用于可检测地标记抗体的酶包括(但不局限于)：苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、
20 脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。采用酶的生色底物，利用比色方法就可以完成检测。检测还可以通过将酶与底物反应的程度与类似制备的标准物进行肉眼比较来实现。

检测可用其他各种免疫试验实现。例如，通过放射性标记抗体或抗体片段，就可以通过采用放射性免疫分析(RIA)来检测 R-PTP 酶。关于 RIA 的清楚描述可在 Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology(Work T. S. 等，
30 North Holland Publishing Company, NY, 1978)中找到，尤其参见 Chard, T. 所写的标题为 An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques

的章节，纳入其内容作为参考。放射性同位素可用 g 计数器或闪烁计数器等设备或通过放射性自显影来进行检测。

还可以用荧光化合物来标记本发明的抗体。当荧光标记的抗体被暴露于适当波长的光时，就能因荧光而检测出它的存在。最常用的荧光标记化合物有异硫氰酸
5 荧光素、罗明丹、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺。

抗体还可用发出荧光的金属如 ^{152}E 或其他镧系金属进行可检测地标记。这些金属可通过这些金属的螯合基团如二乙三胺五乙酸(ETPA)与抗体连接。

还可以将抗体偶联化学发光化合物，对抗体进行可检测标记。然后，检测在化学反应过程中发光的存在来检测带有化学发光标记的抗体的存在。特别有用的化学发光标记化合物的例子是鲁米诺、异鲁米诺、热吡啶翁酯(theromatic
10 acridinium ester)、咪唑、吡啶翁盐和草酸酯。

同样，还可以用生物发光化合物来标记本发明抗体。生物发光是在生物系统中发现的一种化学发光，其中催化性蛋白提高了化学发光反应的效率。生物发光蛋白的存在可通过检测发光的存在来确定。用于标记目的的重要的生物发光化合物是
15 荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白。

本发明的抗体分子可用于免疫计量试验，也称为“双位点”或“夹心”试验。在典型的免疫计量试验中，将一定量的未标记抗体(或抗体片段)结合于固相支持物或载体上，加入一定量的带可检测标记的可溶抗体，从而可以检测和/或定量分析在固相抗体、抗原和标记抗体之间形成的三元复合物。

典型的且优选的免疫测量试验包括“正向”试验，在该试验中与固相结合
20 的抗体先与待测样品接触，通过形成二元固相抗体-抗原复合物从而将抗原从样品中抽提出。在培育合适的时间后，洗涤固相支持物或载体以去除液体样品残余物(包括未反应的抗原，如果有的话)，然后再与含有未知量的标记抗体(其功能为“报导分子”)的溶液接触。在第二次培育使标记抗体通过未标记抗体与结合于固相支持物或载体上的抗原复合之后，第二次洗涤固相支持物或载体，除去未反应的标记抗体。
25

在另一种可与本发明的抗原一起使用的“夹心”试验中，使用所谓的“同时”和“反向”试验。同时试验涉及一次培育步骤，因为和固相支持物或载体结合的抗体以及标记抗体被同时加入到测试样品中。在培育结束后，洗涤固相支持物或载体以除去液体样品残余物和未复合的标记抗体。然后，象常规的“正向”夹心试验那样，测定与固相支持物或载体结合的标记抗体的存在。
30

在“反向”试验中，分步先将标记抗体溶液加至液体样品中，然后在培育适当时间后，再加入结合在固相支持物或载体上的未标记抗体。在第二次培育后，以常规方法洗涤固相载体，使其不含被测试样品的残余物和未反应的标记抗体溶液。然后再象“同时”和“正向”试验那样，测定与固相支持物或载体结合的标记抗体的存在。

免疫试验如 RIA 或 ELISA 的建立在许多文章、书籍和其它出版物中已有描述。参见 W0 97/03998，48 页第 4 行至 52 页第 27 行。本发明的免疫试验有两种通用形式，第一，采用固定化 caspase 或等价肽的免疫试验可用于定量测定 caspase-8。第二，采用抗 caspase 表位的固定化抗体用来定量测定 caspase 蛋白。

这些试验可用于诊断，因为在可能涉及这些通道的许多疾病或综合征中需要评价参与凋亡通道的 caspase 以及其他蛋白的水平。

在一实施例中，借助本发明的抗体将 pro-caspase-8 相互作用蛋白(命名为 Cari)分离出来。然而，如果人们希望免疫沉淀结合不同 caspase 的蛋白，在上述免疫沉淀方法中，可采用对 caspase 的 Sub-1 C 端结构域有特异性而非对 caspase-8 有特异性的抗体。

因为本发明的抗体能够沉淀 pro-caspase-8 和 caspase-8，所以通过共免疫沉淀可以使 caspase 结合蛋白与活性 caspase 或 caspase 前体共沉淀。

以下，将通过一些列非限制性的实施例对本发明进行叙述。

20 实施例 1 免疫小鼠产生对 caspase-8 有特异性的单克隆抗体

Caspase-8 被激活后，切割，在两个亚基(Sub-1 和 Sub-2)内装配。

要产生对 caspase-8 被激活后形成的可能的新的表位有特异性的抗体，使用 Sub-1 C 端以及 Sub-1 和 Sub-2 N 端产生的合成肽免疫小鼠。

采用以下肽来免疫小鼠，产生单克隆抗体：

25 肽 179—肽 CQGDNYQKGIPVETD (SEQ ID NO: 4)，对应于 caspase-8 大亚基 (Sub-1)C 端，(表位对应于残基 Cys360-Asp374，图 1)，这种肽由合成而来，用逆向高效液相层析法纯化，并通过其天然的半胱氨酸与载体 KLH 偶联，使该肽暴露于载体表面。

30 肽 182—肽 LSSPQTRYIPDEADC (SEQ ID NO: 5)，对应于 caspase-8 小亚基 N 端(Sub-2，残基 Lys385-Gly399)，这种肽由合成而来，用逆向高效液相层析法纯化，并通过不是由 Sub-2 序列产生的 C 端与载体 KLH 偶联。

肽 183—肽 SESQTLDKVYQMKS KPRC (SEQ ID NO: 6), 对应于 Sub-1 N 端(残基 Ser217-Gly234), 这种肽由合成而来, 用逆向高效液相层析法纯化, 并通过不是由 Sub-1 序列产生的 C 端与载体 KLH 偶联。

按以下程序给予小鼠 4 次免疫和 2 次等量抗原(肽-KLH)的加强注射:

5 第 1 次免疫: 将 50 微克肽-KLH 溶于 50 微升 PBS 中, 用 50 微升完全弗氏佐剂使其均匀, 然后分别注射在 5 只 7 周龄的 BALB/c 雌性小鼠的足垫中。

第 2 次免疫: 在第 1 次免疫后 2 星期进行, 给小鼠肌内加强注射在 50%(v/v) 不完全弗氏佐剂中的等量肽。

10 第 3 次免疫: 在第 2 次免疫后 2 星期进行, 给小鼠腹膜内注射在 50 微升 PBS 中的 50 微克肽-KLH。

在第 2 次和第 3 次免疫之后 10 天测试注射后小鼠的血清。

第 4 次免疫(仅注射肽 182 和 183): 1 个月后进行, 方法与第 3 次免疫相同。

第 4 次免疫(或者以肽 179 攻击小鼠的第 3 次免疫)后 1 个月, 相隔 2 天进行 2 次加强注射(方法与第 3 次和第 4 次免疫相同)

15 4 天后, 2 只小鼠的脾和腹股沟淋巴结显示有最高特异性免疫反应性, 故而被收集与骨髓瘤细胞融合(Eshhar Z., 1985)。

实施例 2 免疫兔产生对 caspase-8 有特异性的多克隆抗体

20 用 179-KLH 和 183-KLH 免疫兔, 产生有特异性的多克隆抗体。

第 1 次免疫用 100 微克肽-KLH 进行, 其中肽-KLH 溶于 50 微升 PBS 中, 用 50 微升完全弗氏佐剂使其均匀, 然后皮下注射。第 2 次免疫在 2 星期后进行, 肽-KLH 的用量相同, 2 星期后与不完全弗氏佐剂一起肌内注射。这两次免疫后再进行 2 次加强注射, 肽-KLH 的用量相同, 溶于 PBS 中, 相隔 2 星期皮下给予。

25

实施例 3 杂交瘤的制备、产生克隆的抗体的选择以及腹水抗体的纯化

融合过程和杂交瘤细胞的选择均按 Eshhar Z 在 1985 年提出的方案进行。简言之, 用 2 只反应性小鼠的脾细胞和淋巴结细胞的混合物通过与聚乙二醇(PEG)培育一段短时间而与 32×10^6 个 NSO/1 骨髓瘤变体骨髓瘤细胞融合。先用 DMEM 缓慢稀
30 释 PEG, 再离心完全除去 PEG。细胞重悬于 DMEM-HAT 培养液中, 并分布在 96 孔板上, 浓度约为 2.5×10^4 细胞/孔, 在 37°C 8%二氧化碳培育箱中培育。把所有杂交瘤

孔中的培养液换成以 10%马血清(HS)补给的 DMEM。融合两星期后用 ELISA 试验(下面实施例 12 中有描述)筛选杂交瘤培养上清液样品中是否存在特异性单克隆抗体。将培养上清液中检测到有特异性抗体的孔内的细胞转移到 24 孔板。阳性克隆进行 2 次亚克隆;在此阶段,发现所有亚克隆都是阳性的。将克隆在 24 孔板内扩增,再转移到 25cm² T 瓶中。监测扩增的培养液分泌特异性单克隆抗体的情况。将阳性培养液的细胞安瓿冷存于液氮中。

在约 700 个待筛选用来检测针对肽 179 的特异性抗体的克隆中,仅找到一个阳性克隆(单抗 179),在约 700 个待筛选用来检测针对肽 182 的特异性抗体的克隆中,仅找到一个阳性克隆(单抗 182),在约 1100 个待筛选用来检测针对肽 183 的特异性抗体的克隆中,仅找到两个阳性克隆(单抗 183.1 和 183.2)。在 96 孔板内限制稀释亚克隆这些阳性克隆。用 ELISA 试验测试多次生长克隆的上清液,分析特异性抗体(实施例 12 中有描述)。

阳性杂交瘤克隆在组织培养瓶含有 15%马血清的 DMEM 中生长,冷冻一部分培养液的安瓿。同时,给 2-4 只小鼠各注射不同杂交瘤克隆细胞,获得腹水。用亲和凝胶珠(affigel bead) (affigel 15 Biorad)进行亲和纯化,将抗体从腹水中提纯出来,所述的亲和凝胶珠与 BSA (Pierce Cat 77116)交联,而 BSA 与用来免疫小鼠的合成肽(肽 179, 182 或 183)偶联。

要纯化抗体,用 50%硫酸铵沉淀腹水,再在 0℃下使腹水对 PBS 透析 16 小时。透析后,等分试样在 0℃下与 1 毫升亲和凝胶-BSA-肽珠培育 16 小时,用培育前的珠装 1 毫升柱。柱先用 10 毫升 PBS 洗涤,再用含 1 M 氯化钠的 10mM pH7.5 Tris 洗 1 次,最后用 PBS 洗 1 次。抗体从柱中洗脱出来,洗脱液为含 100mM pH2.7 盐酸和 0.5M 氯化钠的溶液。将 1 毫升馏分收集在含有 40 微升 Tris base 的试管中,中和洗脱液。25 毫升腹水大约得到 5-13.6 毫克纯化的抗体。

25 实施例 4 单克隆抗体同种型

用市售同种型试剂盒(Southern Biotechnology Associates, INC cat 5300-05),根据制造商的检测程序测定单克隆抗体同种型。鉴定出单抗 183 和 179 是 IgG1,而单抗 182 是 IgM 类。

30 实施例 5 用单抗 179、182 和 183 免疫沉淀 caspase-8

对上述实施例 3 中叙述的不同单克隆抗 caspase-8 抗体进行测试,以测定它

们在静止和激活的BJAB细胞溶胞产物中免疫沉淀 caspase-8的能力(参见下面实施例 12)。BJAB 系是一种连续淋巴瘤系,其源自非洲 Burkitt's 淋巴瘤系(Clement 等, 1975)。

BJAB 细胞用 Fas 配体刺激 1 小时。从刺激前后的 BJAB 细胞制备细胞溶胞产物。
5 用单抗 179、182 和 183 免疫沉淀(如实施例 12 中所述)后,以抗 Sub-1 抗体为第一抗体(Cell Signaling Technology, caspase-8 ICI2 Cat 9746),经 SDS-PAGE 分离和银染或者通过蛋白质印迹分析法分析“去除溶胞产物(depleted lysate)”和以相应的肽洗脱出来的 caspase-8。

图 2 所示为用单抗 179、183.1 和 183.2 以及 182 免疫沉淀后得到的总细胞提
10 取物和“去除溶胞产物”的蛋白质印迹分析(实施方法参见以下实施例 10)。

在无刺激的细胞(泳道 2、4、6、8 和 10)的总细胞提取物(泳道 2)以及用抗 183 和抗 182 抗体得到的去除溶胞产物(泳道 6、8 和 10)中检测到对应于 pro-caspase-8 同种型 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ (pro-caspase-8, 53/55 kDa)的一对条带,反而在以单抗 179 得到的去除溶胞产物(泳道 4)中检测不到 pro-caspase-8。

15 在刺激的细胞的总细胞提取物中的 pro-caspase-8 水平较低(泳道 1)。激活后出现另外一些对应于活性 caspase-8 片段的较小条带,即对应于同种型 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 的被部分加工的 caspase-8(部分加工的 caspase-8 p41/43, 缺少 Sub-2)的一对条带以及对应于 Sub-1(p20)的一条较小条带。用 Fas 配体刺激的细胞测试被单克隆抗体除去的微量 pro-caspase-8 和激活的 caspase-8 片段(图 2, 泳道 3、5、7、9 和
20 11)。

应注意,还需测试用对 Sub-2 有特异性的单抗 182 去除 Sub-1,因为激活的 caspase-8 包括与 Sub-2 结合的 Sub-1,因此用单抗 182 免疫沉淀消除 Sub-2 的结果会导致去除 Sub-1。

从刺激的细胞溶胞产物中免疫沉淀 caspase-8,结果显示单抗 182、183.1 和
25 183.2 与正常小鼠血清对照(图 2, 泳道 11)一样,不能消除少量剩余的 pro-caspase-8 或活性 caspase-8 片段(分别是泳道 9、7、5 和 11)。与这些结果正好相反,用单抗 179 处理细胞溶胞产物,能有效地去除全部 pro-caspase-8 以及活性 caspase-8 片段。

图 3a(蛋白质印迹分析)和 3b(银染检测蛋白)显示,用单抗 179、182 以及 183.1
30 和 183.2 抗体免疫沉淀的 pro-caspase-8 和活性 caspase-8 片段,通过与各自的肽竞争(其中这些肽是各种抗体所针对的),能有效地回收在上清液中(实施例 12)。

在无刺激的细胞(图 3a, 泳道 2、4、6、8 和 10, 图 3b, 泳道 2、3、6、8 和 10)中, pro-caspase-8 以单抗 179 免疫沉淀以及与肽 179 竞争, 有效地被回收(图 3a 和图 3b, 泳道 8)。在刺激的细胞中, 虽然激活后还有少量 pro-caspase-8, 但用单抗 179 免疫沉淀可以有效回收蛋白(图 3a 和图 3b, 泳道 9)。在以单抗 183.2 5 无激活的细胞(图 3a, 泳道 6)以及在以单抗 183.1 激活的细胞(图 3a, 泳道 5)中, 也可以发现一些 pro-caspase-8 的回收, 其中 caspase-8 活性片段可回收在单抗 182(图 3a, 泳道 3)、183.1(图 3a, 泳道 5)和 183.2(图 3a, 泳道 7, 只有 p20)激活的细胞溶胞产物中。

所得的结果表明, 抗对应于 Sub-1 C 端(179 表位)的肽的单抗 179 即使对微量 10 的 pro-caspase-8 和激活的 caspase-8 的免疫沉淀和纯化也有很高的效率。

产生对同一个 179 表位有特异性的多克隆抗体(制备方法参见上面实施例 1 中的描述), 以研究 179 表位是否有诱发抗体的独特能力, 这些抗体通常用来有效地免疫沉淀和纯化 pro-caspase-8 或活性 caspase-8。比较了以对表位 179 有特异性的多克隆抗体(泳道 5 和 6, 分别是激活和无激活的细胞)或以对表位 182 有特异性的单克隆抗体(泳道 7 和 8, 分别是激活和无激活的细胞)免疫沉淀得到的“去除溶胞产物”。图 4 的结果清楚表明, 事实上, 刺激细胞的 pro-caspase-8 或活性 caspase-8 片段从多克隆抗 179 抗体得到的细胞溶胞产物中被去除的效率比从单克隆抗 182 抗体得到的溶胞产物中更好。 15

同时, 还比较了用对 183 表位有特异性的单抗 183 和多克隆抗体进行的 pro-caspase-8 自静止细胞溶胞产物中免疫沉淀和回收以及单抗 179 进行的免疫沉淀和回收。由图 5 可见, 单抗 183 和多抗 183 进行的 pro-caspase-8 免疫沉淀效率很低, 而单抗 179 进行的 pro-caspase-8 免疫沉淀效率则高得多。 20

另一个约 5.6 kDa 的 caspase-8 衍生片段只在用单抗 179 进行的免疫沉淀中才能看到(泳道 3)。抗对应于 caspase 大亚基 Sub-1 C 端的 caspase-8 区域的抗体 25 具有对 caspase 施加新加工模式的独特能力。

上述实验结果表明, caspase-8 的表位 179 与其它表位不同, 具有诱发特异性抗体的特殊能力, 所述的特异性抗体能高效地免疫沉淀 pro-caspase-8 和激活的 caspase-8, 并能诱导 pro-caspase-8 自加工。

30 实施例 6 caspase-8 结合蛋白(p72)的分离和鉴定

由于单抗 179 能够有效地免疫沉淀 caspase-8, 所以可用它来共免疫沉淀

caspase-8 和 caspase-8 相关蛋白。

BJAB 细胞(Stinitz M, Klein G. 1975)用 Fas 配体刺激 1 小时,从刺激前后的细胞制备细胞溶胞产物。免疫沉淀和洗脱之后,如实施例 12 所述,经 SDS-PAGE 分离回收的蛋白,用银染检测。用小鼠 IgG1 免疫沉淀作为负对照。图 6 的结果显示,表观分子量约 72.5 kDa 的蛋白(本文称之为 p72)与静止细胞溶胞产物中的 pro-caspase-8(p53/55)共沉淀(泳道 3),但不会与刺激的细胞溶胞产物中的活性 caspase-8 共沉淀(泳道 4)。

另外,已经发现,p72 蛋白也与无刺激的 HeLa、Raji、H9、K562、HL-60、CEM 和 Hut78 细胞制成的溶胞产物中的 pro-caspase-8 共免疫沉淀(ATCC)。

这些结果提示,p72 蛋白一般与 pro-caspase-8 而非与活性 caspase-8 结合。

切下对应 p72 的 SDS-PAGE 条带,胰蛋白酶消化,并作有限序列分析和质谱分析。用胰蛋白酶消化得到的 7 个肽搜索由核苷酸序列(或 EST)推导的蛋白数据库。该蛋白序列与基因库中找到的功能仍未被人所知的人 EST 克隆(SEQ ID NO: 1)(查询号: gi/2988397/gbAAC08052.1/(AC004475))的推定蛋白序列的一部分匹配。

15

实施例 8 编码 p72 的全长 cDNA 的产生

按以下方法产生编码 p72 的全长 cDNA:

用(实施例 7)的 EST 筛选 TIGR 人基因指引,得到含有符合该序列的全部 EST 共有序列的 THC 报导子(THC510568, SEQ ID NO: 1)。

20 编码该推定蛋白一部分的 DNA 克隆购自 Incyte Genomics 公司(IMAGE #2964545)。该克隆缺少编码第 1 个甲硫氨酸和接着的 6 个氨基酸(即 21 个核苷酸)的核苷酸序列。发现这些蛋白的小鼠和人序列高度地相似(约有 90%同一性),因此,将编码小鼠蛋白第 1 个甲硫氨酸和接着的 6 个氨基酸(在小鼠 EST 中无缺失)的核苷酸序列与人基因组的工作初稿序列(working draft sequence)作对比,以完成缺失的人序列。已成功获得的匹配对应于现代人染色体 19(克隆 LLNLR-232E12)的序列。此克隆被确认有编码 p72 的 7 个缺失氨基酸的核苷酸序列。经过两次 PCR 得到 p72 全长 cDNA(使用 Takara ExTaq, cat#R001A),参见图 8 的示意图。

30 在第 1 次 PCR 中,以 Incyte Genomics 的克隆作为模板,正向引物是 CTCAAGATGGACAACCGGGATGTTGCAGGAAAGG,该正向引物被合成为含有 21 个缺失核苷酸中的 15 个核苷酸(下划线)以及 p2 的存在序列(图 8,引物 2),逆向引物是 CCACTCGAGTCAGTAGTAAGGCCGTCTGGGATT,该逆向引物含有 3'区末端与终止密码子(图

8, 引物 3)。

第 2 次 PCR 以第 1 次 PCR 的 PCR 产物作为模板, 正向引物是 AATGGATCCATGAGTCTCAAGATGGACAACCGGA, 该正向引物含有全部 21 个缺失核苷酸和 5 个存在核苷酸(图 7, 引物 1), 逆向引物同上(图 7, 引物 3)。回收并测序编码 p72 的全 cDNA (SEQ ID NO: 2), 从该核苷酸序列 (SEQ ID NO: 3) 推导氨基酸序列。

对含有全部 EST 共有序列的 THC 报导子 (THC510568 SEQ ID NO: 1) 与由产生的全长 cDNA 推导的蛋白 (SEQ ID NO: 3) 作序列对比, 结果显示在 EST 中缺失最初 7 个氨基酸, 在 EST 中缺少 25 个氨基酸序列以及氨基酸 397 不准确(脯氨酸而非亮氨酸)。

已经发现, p72 蛋白含有 3 个保守的基序(图 7): C 基序是卷曲基序, 紧靠蛋白 N 端的两个串联位列的 'SURP 基序' (也称 'SWAP' 基序, 图 7 以 S 表示) (Denhez F 和 Lafyatis R, 1994), 位于蛋白 C 端的 'G-膜片' 基序(图 8 以 G 表示) (Aravind L 和 Koonin EV, 1999)。一般认为, SURP 和 G-膜片基序有助于 RNA 结合, 提示 p72 靶可能是 RNA 分子。

15

实施例 9 用 caspase-8 切割 p72

如实施例 8 所示, 经过 1 小时刺激之后, p72 只与 pro-caspase-8 结合, 而不与活性 caspase-8 结合。在 20 分钟刺激之后仍可检测到一些 pro-caspase-8。为了确定在更短刺激时间内是否可以使 p72 与 caspase-8 共沉淀, 将仅激活 20 分钟的 BJAB 细胞溶解, 与单抗 179 免疫沉淀。在免疫共沉淀和洗脱后, caspase-8 与结合蛋白经 SDS-PAGE 分离, 以银染检测蛋白。在刺激前的细胞溶胞产物中免疫沉淀的是一条对应 p72 的 72.5 kDa 条带(图 9, 泳道 3), 而刺激 20 分钟后检测到较低表观分子量约 68 kDa 的蛋白(图 9, 泳道 4)。将 BJAB 细胞免疫沉淀得到的两种蛋白(72.5 kDa 和 68 kDa)作质谱分析。Tripsynization 后发现, 两种蛋白的肽曲线图除了有一个明显区别之外是相似的, 该区别在于 72.5 kDa 蛋白 C 端存在一个序列 FRPNPLNNPR 的附加肽(残基 632-641), 而 68 kDa 蛋白则没有该肽。

25

这一结果提示, 刺激细胞后, p72 C 端约 4.5 kDa 的片段可能被激活的 caspase-8 切除, 结果得到一个表观分子量 68 kDa 的较小蛋白, 但它仍然与剩余的 pro-caspase-8 结合。

令人信服的是, 位于 p72 C 端的残基 D600(图 8)可能是切割的候选残基, 因为该切割得到的推定片段的分子量与 20 分钟刺激后体内检测到的 p72 片段相近。

30

为了测试 p72 是否如所设想那样是 caspase-8 的底物, 以及 D600 是否是切割的靶残基, 使体外转录翻译并以放射性同位素标记的 (^{35}S)p72 (TnT 系统) 与重组活性 caspase-8 作用。在 ^{35}S 甲硫氨酸存在下, 利用 TnT T7 偶联的网织红细胞溶胞系统使 P72 cDNA 编码的蛋白在网织红细胞溶胞产物中体外表达, 并用重组活性 caspase-8 切割 (由大肠杆菌中分别制成的亚基 Sub-1 和 Sub-2 各自在体外一起混合, 重折叠)。简言之, 在 37°C 以及在细菌产生的 caspase-8 存在下, 使体外合成的 ^{35}S 标记的 p72 在蛋白酶缓冲液 (25 mM Hepes pH 7.5、0.1% CHAPS、5 mM EDTA 和 2 mM DTT) 中培育 30 分钟。蛋白及其片段经 SDS-PAGE 分离, 实验结果用磷屏成像仪观察。实验结果 (图 10) 显示, 在 caspase-8 不存在下, 只检测到对应于 p72 的 72.5 kDa 条带 (泳道 1)。该条带在加入激活的 caspase-8 1 小时后消失, 出现一条对应于 68 kDa 的新条带 (泳道 4)。这一结果表明, 用作底物的 p72 cDNA 编码的蛋白被 caspase-8 有效地切割。另外, TnT 转录翻译系统也可用来体外产生 2 个不同 p72 突变体: 一个 p72 突变体, 其中被推测在体内实验中是 caspase-8 的靶残基的残基 D600 突变为 E (D600E), 另一个缺失型 p72 突变体, 其缺少 D600 下游残基 (即表达的蛋白有 1-600 残基)。

在激活的重组 caspase-8 存在 (分别是图 10 的泳道 5 和 6) 或不存在 (分别是泳道 2 和 3) 下, 测试上述两个 p72 突变体的切割。由图 10 可见 (分别是泳道 3 和 6), caspase-8 存在或不存在 p72 D600E 的蛋白曲线图是相同的, 表明 caspase-8 不会切割 p72 D600E 突变体。p72 1-600 突变体与野生型 p72 切割后产生的 68 kDa 片段共迁移, 而且加入 caspase-8 也不再被切割 (泳道 2 和 5)。这些结果显示, caspase-8 被激活后在 D600 残基切割 p72。

体内进行的研究提示, p72 的切割在细胞内很快发生, 用 Fas 配体处理后 5-20 分钟内发生 (图 11), 而切割的蛋白 (或其较大的片段) 仍可与 pro-caspase-8 缔合。

实施例 10 检测 caspase-8 免疫反应性血清的蛋白质印迹分析

用重组纯化 Sub-1 和 Sub-2 混合物进行蛋白质印迹, 以分析针对肽的抗体。简言之, 在还原条件 (0.04M DTT) 下把 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶和每条泳道 100 纳克 Sub-1 和 Sub-2 混合物一起装入柱中。一条泳道也装入低分子量标记物 (LMW)。通过电洗脱将凝胶分离出来的蛋白质转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 高粘性 P (Amersham) 膜。这些膜在含有 5% 低脂奶、0.05% Tween 20 的 PBS 中培育 16 小时。将膜剪成条

带状，室温下每条带与小鼠抗血清(稀释至 1/2000)一起培育 1 小时。膜条带用含有 0.05%Tween 20 的 PBS 洗涤(3x15 分钟)，在室温下再与第二抗体(与辣根过氧化物酶偶合的山羊抗小鼠(稀释至 1: 10, 000, Jackon))一起培育 1 小时。

膜条带用含有 0.1 %Tween 20 的 PBS 洗涤(3x15 分钟)。用增强化学发光法(ECL, 5 Amersham)检测阳性带。

实施例 5 进行的蛋白质印迹使用对 Sub-1 有特异性的抗体(Cell Signalling Technology, caspase-8 ICI2 Cat 9746)。

实施例 11 筛选杂交瘤的 ELISA 试验

10 按以下程序进行直接 ELISA 试验，以筛选产生特异性抗体的杂交瘤：在结合溶液(0.1 M 磷酸氢钠，pH 9)中将 96 孔板用浓度为 2.5 微克/毫升的 BSA-肽(或者仅 BSA 作为对照孔板)包被成 50 微升/孔，37°C 包被 1 小时或者 4°C 包被 16 小时。然后，孔板用 PBS-T(含 0.05% Tween-20 的 PBS)洗 3 次，37°C 置于 200 微升/孔的封闭溶液(在 PBS 中 1% 血红蛋白)1 小时，再用 PBS 洗 3 次。每孔加入 50 微升杂交
15 瘤培养上清液或稀释的标准物(PBS-T)，37°C 培育 1 小时或者 22°C 培育 4 小时。过了该培育期后，这些孔用 PBS-T 洗 6 次。第二抗体是与 HRP 偶合的抗小鼠抗体(Jackon 115-025-100)，用 PBS-T 稀释至 1: 5000，37°C 培育 1 小时，再用 PBS-T 洗 6 次洗净。HRP 底物是新鲜制成的(2.2 毫升 0.2M pH 9.2 磷酸氢钠、1.4 毫升 0.2M
20 pH 4.35 柠檬酸、6.4 毫升水、10 毫克 ABTS 和 1 微升过双氧水)，每孔 50 微升，在 22°C 培育至显色(约 5-80 分钟)。加入 50 微升/孔 0.2M 柠檬酸终止显色反应。在 405nm 处读出 96 孔板的读数。

正对照抗体使用稀释至 1: 1000 的阳性小鼠抗血清，也作为负对照介质。

实施例 12 caspase-8 的免疫沉淀

25 每次免疫沉淀用 10^8 个细胞。收集细胞，并在 0°C 下与 1% NP-40 溶胞缓冲液和完全蛋白酶抑制剂(完全蛋白酶抑制剂混合片剂(cocktail tablets), Roche Molecular Biochemicals)培育 40 分钟以溶解细胞。细胞溶胞产物在 Eppendorf 试管中等分，4°C 离心 10 分钟，转速 14000 rpm，把上清液收集在另一个新试管中。细胞溶胞产物先进行一个预清除步骤，目的在于除去非特异性地结合蛋白-G-琼脂
30 糖的蛋白。预清除步骤是在 4°C 将细胞溶胞产物与用 PBS 预先洗涤的蛋白-G-琼脂糖(Pharmacia)及小鼠 IgG 预培育 2-3 小时。过了该培育期后，溶胞产物在

Eppendorf 试管中离心 30 秒，转速 14000 rpm，弃掉蛋白-G-琼脂糖，收集清除前的上清液。把纯化单克隆抗体(或者小鼠 IgG 1 kappa，作为负对照)与用 PBS 预先洗涤的蛋白-G-琼脂糖混合，4℃下与清除前的上清液培育 4-16 小时。培育后，离心(30 秒，转速 14000 rpm)收集未结合的材料(命名为“去除溶胞产物”)，而结合

5 的材料则被洗脱出来，方法是用溶胞缓冲液洗琼脂糖珠 6 次，并在 22℃下与含 0.2% NP-40 溶胞缓冲液、蛋白酶抑制剂和 400 微克/毫升用来免疫的肽的“洗脱液”(300 微升洗脱液/100 微升琼脂糖)培育 2 小时。试管以 5000 rpm 的转速转动 5 分钟，将命名为“caspase-8 洗脱液”的上清液转移到新试管。

参考文献:

1. Adelman Jp et al. 1983 DNA 2 : 183.
2. Ahmad M et al. Cancer Res 1997; 57 (4): 615-9.
3. Akagi Y et al. 1997 Kidney Int. 51, p. 1265-9.
- 5 4. Aravind L and Koonin EV 1999 TIBS 24: 342-344.
5. Artelt Pet al. 1988 Gene 68, 213-9.
6. Barnikol-Watanabe S et al. Biol Chom Hoppe Seyler 1994; 375 (8) : 497-512.
7. Beidler Dret al. 1995. J Biol Chem 1995 Jul 14; 270 (28): 16526-8.
8. Beutler and Cerami 1987 N Engl J Med 1987 Feb 12; 316 (7): 379-85.
- 10 9. Bigda J et al. 1994 J Exp Med Aug 1; 180 (2): 445-60.
10. Boldin MP et al. 1995 J Biol Chem Apr 7; 270 (14): 7795-8.
11. Boldin MP et al. 1995a Biol Chem 1995 Jan 6; 270 (1) : 387-91.
12. Boldin MP et al. 1995b FEBS Lett 1995 Jun 19; 367 (1) : 39-44.
13. Boldin MP et al. 1996 Cell 1996 Jun 14; 85 (6): 803-15.
- 15 14. Boone, E et al. J. Biol Chem. 275, 37596-603.
15. Boulianne GL et al. 1984 Nature 1984 Dec 13-19; 312 (5995): 643-6.
16. Brakebusch C et al. 1992. EMBO J 1992 Mar; 11 (3): 943-50.
17. Brockhaus M et al. 1990 Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Apr; 87 (8): 3127-31.
18. Cabilly S et al. 1984 PNAS 81, 3273.
- 20 19. Cantor et al. 1993 PNAS 90 109-32.
20. Cao X et al. 1998 J Immunol 161, 6238-44.
21. Chen CJ et al. 1992 Ann. NY Acad. Sci. 660, 271-3.
22. Chinnaiyan AM et al. 1995 Cell May 19; 81 (4): 505-12.
23. Chinnaiyan AM et al. 1996 J Biol Chem Mar 1; 271 (9): 4961-5.
- 25 24. Clements GB et al. 1975 Int J Cancer 16: 125-33.
25. Cohen OM 1997 Biochem J; 326 (Pt 1). 1-1 6.
26. Daniel R et al. 1998 J Biomed Sci. 5, 383-94.
27. Denhez F and Lafyatis R 1994 J Biol Chem 269: 16170-16179.
28. Dirks, Wirth and Hauser 1983 Gene 128, 247-249.
- 30 29. Duan H and Dixit VM. Nature 1997; 385 (6611): 86-9.
30. Durfee T et al. Genes Dev 1993; 7 (4). SSS-69.
31. Edamatsu H, Kaziro Y, Itoh H. 1997, Gene 187, 289-94.
32. Edinger AL et al. 1998 Virology. 249, p. 367-78.
33. Enari M et al. 1995. Nature May 4; 375 (6526): 78-81.
- 35 34. Enari M et al. 1998 Nature (London) 391, 43-50.
35. Engelmann H et al. 1990. J. Biol Chem Jan 25; 265 (3): 1531-6.
36. Engelmann H et al. 1990 J. Biol. Chem. 265, p. 14497-504.
37. Eshhar Z, 1985 in "Hybridoma technology in the bioscience and medicine", Edited by Timothy A Springer (Plenum Publishing Corporation, 1985 ; Chapter 1).

38. Everett RD et al. 1983 *Nucleic Acids Res.* 11 2447-64.
39. Fernandes-Alnemri T et al. 1996 *Proc Natl Acad Sci USA*; 93 (15): 7464-9.
40. Fields S et al. 1989; *Nature* 340 (6230): 245-6.
41. Flanagan, 1998 *Cancer Metastasis Rev* 17, 169-76.
- 5 42. Furth PA et al. 1994 *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9302-6.
43. Gerster M et al. 1998 *Anal Biochem.* 262, 177-84.
44. Graham A et al. 1991, *Biochem Biophys Res Commun* 177, 8-16.
45. Grau GE 1989 *Schweiz Med Wochenschr* Dec 9 ; 119 (49): 1756-61.
46. Griscelli F et al. 1998, *Hum Gene Ther.* 9, 1919-28.
- 10 47. Guang-Lin M et al. 1998 *Transplant Proc* 30, 2923-4.
48. Guinot and Tamsamani, 1998 *Pathol Biol (Paris)* 46, p. 347-54.
49. Haendler B et al. *E. EMBO J* 1987 ; 6 (4): 947-50.
50. Hemmi S et al. 1998 *Hum Gene Ther* 9, p. 2363-73.
51. Henkart, PA 1996. *Immunity* Mar; 4 (3): 195-201.
- 15 52. Hohmann HP et al. 1989. *J Biol Chem* Sep 5; 264 (25): 14927-34.
53. Hsu H et al. 1996. *Cell* Jan 26; 84 (2): 299-308.
54. Huang MT and German CM. 1990 *Nucleic Acids Res.* 18, 937-47.
55. Ihle JN *Cell* 1996; 84 (3).. 331-4.
56. Itoh N et al. 1991. *Cell* Jul 26; 66 (2): 233-43.
- 20 57. Itoh and Nagata 1993 *J. Biol Chem* May 25; 268 (15): 10932-7.
58. Janmey, P. A. , and Stossel, T. P. 1987 *Nature (London)* 352, 362-364.
59. Joseph and Burke, 1993 *J. Biol. Chem.* 268, 24515.
60. Kamine J et al. Feb 15; 216 (2): 357-66.
61. King P and Goodbourn S. *J Biol Chem* 1998 ; 273 (15) 8699-704.
- 25 62. Kischkel FC et al. *EMBO J* 1995; 14 (22); 5579-88.
63. Kohler and Milstein, 1975 *Nature* 256, 495-497.
64. Kondo S et al. 1998 *Oncogene* 17, 2585-91.
65. Kothakota, S et al. 1997 *Science* 278, 294-298.
66. Kozak, M, 1984 *Nucleic Acids Res.* 12 p. 857-72.
- 30 67. Kumar, 1995 *Trends Biochem Sci* May; 20 (5): 198-202.
68. Kumar, 1997 *Science* 278 (5343): 1630-2.
69. Kunstle, G et al. 1997 *Immunol Lett.* 55, 5-10.
70. Kurth, M. , and Bryan, J. 1984 *J. Biol. Chem.* 259, 10895-10903.
71. Loetscher H et al. 1990 *J Biol Chem* 1990 Nov 25; 265 (33): 20131-8.
- 35 72. MacFarlane M et al. *J Biol Chem* 1997; 272 (41): 25417-20.
73. Meinkoth et al. (1984).
74. Meiri N et al. 1998 *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 15037-15042.
75. Mittl PR et al *J Biol Chem* 1997; 272 (10): 6539-47.
76. Miura K et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187 (1), 375-80.
- 40 77. Morrison et al. , 1984 *PNAS* 81, 6851.

-
78. Muranishi et al., 1991 Pharm. Research 8, 649.
79. Muzio et al. 1996. Cell Jun 14; 85 (6): 817-27.
80. Muzio M et al J Biol Chem 1998., 273 (5): 2926-30.
81. Nagata and Goldstein 1995.
- 5 82. Nagata S et al. Cell 1997 ; 88 (3): 355-65.
83. Nakashima A et al. J Biol Chem 1997; 272 (14): 9567-72.
84. Narumi et al., 1998 Am J Respir Cell Mol Biol 19, 936-941.
85. Nicholson D. W. and Thornberry, N. A. 1997 Trends Biochem. Sci. 22, 299-306.
86. Nishida et al. , 1998 Spine 23, 2437-42.
- 10 87. Nophar et al. 1990.
88. Ohtsu, Metal. 1997 EMBO J. 16, 4650-4656.
89. Pederson et al, 1998 J Gastrointest Surg 2, 283-91.
90. Quelle FW et al. J Biol Chem 1995; 270 (35): 20775-80.
91. Rotonda J et al Nat Struct Biol 1996; 3 (7): 619-25.
- 15 92. Ruzicka et al. 1993 Science 260: 487.
93. Sakahira, H. , et al. (1998) Nature (London) 391, 96-99.
94. Salvesen, G. S. , and Dixit, V. M. (1997) Cell 91, 443-446.
95. Sambrook et al., 1989.
96. Sano et al. , (1991) Biotechniques 9: 1378.
- 20 97. Sano et al. , (1992) Science 258: 120.
98. Schall et al. 1990.
99. Schek et al. , Mol Cell Biol., p. 5386-93, 1992.
100. Schwarzenberger et al. , 1998 J Immunol 161, 6383-9.
101. Shevchenko A, et al. 1997 Rapid Commun Mass Spectrom. 11, p. 1015-24.
- 25 102. Shimayama et al. , 1993 Nucleic Acids Symp Ser 29, 177.
103. Shoji et al. , 1998 J Drug Target 5 261-73.
104. Shore et al. , 1993 Oncogene 8, 3183.
105. Smith et al. 1990 J Infect Dis Dec; 162 (6): 1349-53.
106. Soukchareun et al. , 1998 Bioconjug Chem 9 466-75.
- 30 107. Srinivasula SM et al. 1996 Proc Natl Acad Sci USA; 93 (25) : 14486-91.
108. Srinivasula SM et al. J Biol Chem 1998 ; 273 (17) 10107-11.
109. Stanger et al. 1995 Cell May 19; 81 (4): 513-23.
110. Steinitz M and Klein G. Proc Natl Acad Sci U S A 1975 Sep; 72 (9): 3518-20.
- 35 111. Stix 1998 Sci Am. 279 46-50.
112. Surinya et al. J Biol Chem. 273, p. 16798-809, 1998.
113. Tartaglia et al. 1993 Cell Sep 10; 74 (5): 845-53.
114. Teoh et al. , 1998 Blood 92, 4591-4601.
115. Tewari et al. 1995 Cell Jun 2 ; 81 (5): 801-9.
- 40 116. Thomsen, et al. 1984 PNAS 81 659-63.

-
117. Thornberry NA et al. *JBiol Chem* 1997; 272 (29): 17907-11.
 118. Tirode F et al. *J Biol Chem* 1997; 272 (37): 22995-9.
 119. Tokushige, et al. , 1997 *J Virol Methods*. 64 p. 73-80.
 120. Tracey et al. 1986 *Annu Rev Med* 45: 491-503.
 - 5 121. Vandenabeele et al. 1995 *J Immunol* Mar 15; 154 (6): 2904-13.
 122. Vercammen, D. , et al. 1998 *J Exp Med*. 4, 1477-85.
 123. Vielkind and Swierenga 1989 *Histochemistry*; 91 (1): 81-8.
 124. Villa, Pet al. (1997) *Trends Biochem. Sci.* 22, 388-393.
 125. Vincenz C and Dixit VM 1997. *J Biol Chem*. Mar 7; 272 (10): 6578-83.
 - 10 126. Wahl et al. , 1983 *J. Nucl. Med.* 24: 316-325.
 127. Wallach, D et al. 1999 *Annu Rev Immunol*. 17, 331-67.
 128. Wang, J 1998 *Controlled Release* 53, 39-48.
 129. Weaver et al. 2000 *Hybridoma* Apr; 19 (2): 167-9.
 130. Xue et al. 1995 *Nature* Sep 21; 377 (6546): 248-51.
 - 15 131. Yamamoto et al. 1980. *Cell* 22, 787-97.
 132. Yamamoto T et al. *JBiol Chem* 1997; 272 (49): 30595-8.
 133. Yang X et al. *Mol Cell* 1998; 1 (2). 319-25.
 134. Yeh et al. 1998 *J Bone Miner Res*. 13. p. 1870-9.
 135. Yin, H. L. and Stossel, T. P. (1979) *Nature (London)* 281, 583-586.
 - 20 136. Yin, H. L. and Stossel, T. P. , (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9490-9493.
 137. Zacharia et al. , 1991 *Eur. J. Pharmacol.* 203, 353.
 138. Zhang et al. 1998 *Clin Cancer Res* 4, 2669-76.
 139. Zhao and Pick, 1993 *Nature* 365, 448.

	100		105		110
Pro Val Lys Ser Tyr Ser His Ala Lys Gln Leu Pro Val Ala His Arg					
	115		120		125
Pro Ser Val Phe Gln Ser Pro Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Tyr Glu					
	130		135		140
Gln Trp Leu Glu Ile Lys Val Ser Pro Pro Glu Gly Ala Glu Thr Arg					
	145		150		155
					160
Lys Val Ile Glu Lys Leu Ala Arg Phe Val Ala Glu Gly Gly Pro Glu					
			165		170
					175
Leu Glu Lys Val Ala Met Glu Asp Tyr Lys Asp Asn Pro Ala Phe Ala					
			180		185
					190
Phe Leu His Asp Lys Asn Ser Arg Glu Phe Leu Tyr Tyr Arg Lys Lys					
			195		200
					205
Val Ala Glu Ile Arg Lys Glu Ala Gln Lys Ser Gln Ala Ala Ser Gln					
			210		215
					220
Lys Val Ser Pro Pro Glu Asp Glu Glu Val Lys Asn Leu Ala Glu Lys					
			225		230
					235
					240
Leu Ala Arg Phe Ile Ala Asp Gly Gly Pro Glu Val Glu Thr Ile Ala					
			245		250
					255
Leu Gln Asn Asn Arg Glu Asn Gln Ala Phe Ser Phe Leu Tyr Glu Pro					
			260		265
					270
Asn Ser Gln Gly Tyr Lys Tyr Tyr Arg Gln Lys Leu Glu Glu Phe Arg					
			275		280
					285
Lys Ala Lys Ala Ser Ser Thr Gly Ser Phe Thr Ala Pro Asp Pro Gly					
			290		295
					300

Leu Lys Arg Lys Ser Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gly Ser Leu Pro Pro
305 310 315 320

Ala Thr Thr Cys Pro Ala Ser Ser Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ile Pro
325 330 335

Ala Pro Ala Ala Pro Gly Lys Pro Ala Ser Ala Ala Thr Val Lys Arg
340 345 350

Lys Arg Lys Ser Arg Trp Gly Pro Glu Glu Asp Lys Val Glu Leu Pro
355 360 365

Pro Ala Glu Leu Val Gln Arg Asp Val Asp Ala Ser Pro Ser Pro Leu
370 375 380

Ser Val Gln Asp Leu Lys Gly Leu Gly Tyr Glu Lys Gly Lys Pro Val
385 390 395 400

Gly Leu Val Gly Val Thr Glu Leu Ser Asp Ala Gln Lys Lys Gln Leu
405 410 415

Lys Glu Gln Gln Glu Met Gln Gln Met Tyr Asp Met Ile Met Gln His
420 425 430

Lys Arg Ala Met Gln Asp Met Gln Leu Leu Trp Glu Lys Ala Val Gln
435 440 445

Gln His Gln His Gly Tyr Asp Ser Asp Glu Glu Val Asp Ser Glu Leu
450 455 460

Gly Thr Trp Glu His Gln Leu Arg Arg Met Glu Met Asp Lys Thr Arg
465 470 475 480

Glu Trp Ala Glu Gln Leu Thr Lys Met Gly Arg Gly Lys His Phe Ile
485 490 495

Gly Asp Phe Leu Pro Pro Asp Glu Leu Glu Lys Phe Met Glu Thr Phe
500 505 510

Lys Ala Leu Lys Glu Gly Arg Glu Pro Asp Tyr Ser Glu Tyr Lys Glu
515 520 525

Phe Lys Leu Thr Val Glu Asn Ile Gly Tyr Gln Met Leu Met Lys Met
530 535 540

Gly Trp Lys Glu Gly Glu Gly Leu Gly Ser Glu Gly Gln Gly Ile Lys
545 550 555 560

Asn Pro Val Asn Lys Gly Thr Thr Thr Val Asp Gly Ala Gly Phe Gly
565 570 575

Ile Asp Arg Pro Ala Glu Leu Ser Lys Glu Asp Asp Glu Tyr Glu Ala
580 585 590

Phe Arg Lys Arg Met Met Leu Ala Tyr Arg Phe Arg Pro Asn Pro Leu
595 600 605

Asn Asn Pro Arg Arg Pro Tyr Tyr
610 615

<210> 2

<211> 1938

<212> DNA

<213> 现代人

<400> 2

atgagtctca agatggacaa ccgggatggt gcaggaaagg ctaaccggtg gtttggggtt 60
gctcccccta aatctggaaa aatgaacatg aacatccttc accaggaaga gctcatcgct 120
cagaagaaac gggaaattga agccaaaatg gaacagaaag ccaagcagaa tcaggtggcc 180
agccctcage ccccatatcc tggcgaatc acaaatgcac acaactcttc ctgcatttcc 240
aacaagtttg ccaacgatgg tagcttcttg cagcagtttc tgaagttgca gaaggcacag 300
accagcacag acgccccgac cagtgcgcc agcggcctc ccagcacacc cacccccagc 360
gctgggaaga ggtccctgct catcagcagg cggacaggcc tggggctggc cagcctgccg 420
ggccctgtga agagctactc ccacgccaag cagctgcccg tggcgcaccg cccgagtgtc 480

ttccagtccc ctgacgagga cgaggaggag gactatgagc agtggctgga gatcaaagtt	540
tcacccccag agggagccga gactcggaaa gtgatagaga aattggcccc ctttgtggca	600
gaaggaggcc ccgagttaga aaaagtagct atggaggact acaaggataa cccagcattt	660
gcatttttgc acgataagaa tagcagggaa ttccttact acaggaagaa ggtggctgag	720
ataagaaagg aagcacagaa gtcgaggca gcctctcaga aagtttcacc cccagaggac	780
gaagaggcca agaaccttgc agaaaagttg gccaggttca tagcggacgg ggtccccgag	840
gtggaaacca ttgccctcca gaacaaccgt gagaaccagg cattcagctt tctgtatgag	900
cccaatagcc aagggtacaa gtactaccga cagaagctgg aggagtccg gaaagccaag	960
gccagctcca caggcagctt cacagcacct gatccccgcc tgaagcgcaa gtccccctct	1020
gaggccctgt cagggtcctt acccccagcc accacctgcc ccgcctcgtc cacgcctgcg	1080
cccactatca tcctgtctc agctgcccc gggaagccag cctccgcagc caccgtgaag	1140
aggaagcggg agagccggtg ggggcctgaa gaggataagg tagagctcct acctgctgaa	1200
ctggtgcaga gggacgtgga tgccctccc tcgcctctgt cagttcagga cctcaagggg	1260
ctcggctatg agaaggggaa gcctgtgggt ctagtggcg tcacagagct ttcagacgcc	1320
cagaagaagc agctgaagga gcagcaggag atgcagcaga tgtacgacat gatcatgcag	1380
cacaagcggg ccatgcagga catgcagctg ctgtgggaga aggcagtcca acagcaccag	1440
cacggctatg acagtgatga ggaggtggac agcgagctgg gcacctggga gcaccagctg	1500
cggcgcatgg agatggataa gaccagggaa tgggccgagc agctgacaaa gatgggccgg	1560
ggcaagcact tcacgggaga cttctgcct ccagacgagc tggaaaagtt tatggagacc	1620
ttcaaggccc tgaaggaggg ccgtgagcct gactactcag agtacaagga gttcaagctg	1680
actgtggaga acatcggcta ccagatgctg atgaagatgg gctggaagga gggcgagggg	1740
ctgggctcag agggccaggg catcaagaac ccagtgaaca aggcaccac cacagtggac	1800
ggcgctggct tcggcattga ccggccggcg gagctctcca aggaggacga cgagtatgag	1860
gcgttccgca agaggatgat gctggcctac cgcttccggc ccaaccccct gaacaatccc	1920
agacgcctt actactga	1938

<210> 3
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> 现代人

<400> 3

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

Trp Phe Gly Val Ala Pro Pro Lys Ser Gly Lys Met Asn Met Asn Ile
 20 25 30

Leu His Gln Glu Glu Leu Ile Ala Gln Lys Lys Arg Glu Ile Glu Ala
 35 40 45

Lys Met Glu Gln Lys Ala Lys Gln Asn Gln Val Ala Ser Pro Gln Pro
 50 55 60

Pro His Pro Gly Glu Ile Thr Asn Ala His Asn Ser Ser Cys Ile Ser
 65 70 75 80

Asn Lys Phe Ala Asn Asp Gly Ser Phe Leu Gln Gln Phe Leu Lys Leu
 85 90 95

Gln Lys Ala Gln Thr Ser Thr Asp Ala Pro Thr Ser Ala Pro Ser Ala
 100 105 110

Pro Pro Ser Thr Pro Thr Pro Ser Ala Gly Lys Arg Ser Leu Leu Ile
 115 120 125

Ser Arg Arg Thr Gly Leu Gly Leu Ala Ser Leu Pro Gly Pro Val Lys
 130 135 140

Ser Tyr Ser His Ala Lys Gln Leu Pro Val Ala His Arg Pro Ser Val
 145 150 155 160

Phe Gln Ser Pro Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Tyr Glu Gln Trp Leu
 165 170 175

Glu Ile Lys Val Ser Pro Pro Glu Gly Ala Glu Thr Arg Lys Val Ile
 180 185 190

Glu Lys Leu Ala Arg Phe Val Ala Glu Gly Gly Pro Glu Leu Glu Lys
 195 200 205

Val Ala Met Glu Asp Tyr Lys Asp Asn Pro Ala Phe Ala Phe Leu His
 210 215 220

Asp Lys Asn Ser Arg Glu Phe Leu Tyr Tyr Arg Lys Lys Val Ala Glu
 225 230 235 240

Ile Arg Lys Glu Ala Gln Lys Ser Gln Ala Ala Ser Gln Lys Val Ser
 245 250 255

Pro Pro Glu Asp Glu Glu Val Lys Asn Leu Ala Glu Lys Leu Ala Arg
 260 265 270

Phe Ile Ala Asp Gly Gly Pro Glu Val Glu Thr Ile Ala Leu Gln Asn
 275 280 285

Asn Arg Glu Asn Gln Ala Phe Ser Phe Leu Tyr Glu Pro Asn Ser Gln
 290 295 300

Gly Tyr Lys Tyr Tyr Arg Gln Lys Leu Glu Glu Phe Arg Lys Ala Lys
 305 310 315 320

Ala Ser Ser Thr Gly Ser Phe Thr Ala Pro Asp Pro Gly Leu Lys Arg
 325 330 335

Lys Ser Pro Pro Glu Ala Leu Ser Gly Ser Leu Pro Pro Ala Thr Thr
 340 345 350

Cys Pro Ala Ser Ser Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ile Pro Ala Pro Ala
 355 360 365

Ala Pro Gly Lys Pro Ala Ser Ala Ala Thr Val Lys Arg Lys Arg Lys
 370 375 380

Asn Lys Gly Thr Thr Thr Val Asp Gly Ala Gly Phe Gly Ile Asp Arg
 595 600 605

Pro Ala Glu Leu Ser Lys Glu Asp Asp Glu Tyr Glu Ala Phe Arg Lys
 610 615 620

Arg Met Met Leu Ala Tyr Arg Phe Arg Pro Asn Pro Leu Asn Asn Pro
 625 630 635 640

Arg Arg Pro Tyr Tyr
 645

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽 179

<400> 4

Cys Gln Gly Asp Asn Tyr Gln Lys Gly Ile Pro Val Glu Thr Asp
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽 182

<400> 5

Leu Ser Ser Pro Gln Thr Arg Tyr Ile Pro Asp Glu Ala Asp Cys
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 肽 183

<400> 6

Ser Glu Ser Gln Thr Leu Asp Lys Val Tyr Gln Met Lys Ser Lys Pro
1 5 10 15

Arg Cys

MDFSRNLYDIGEQDSEDLASLKFSLDYIPQRKQEPKDALMLFQRLQEKRMLEESNLS
FLKELLFRINRLDLLITYLNTRKEEMERELQTPGRAQISAYRFHFCRMSWAEANSQCQTQ
SVPFWRRVDHLLIRVMLYQISEEVSRSSELSFKFLLQEEISKCKLDDDMNLLDIFIEMEK
RVILGEGKLDILKRVCQINKSLLKIINDYEEFSKGEELCGVMTISDSPREQDSESQTLD
KVYQMKSKPRGYCLINNHNFAKAREKVPKLHSIRDRNGTHLDAGALTTTFFELHFEIKP
HHDCTVEQIYEILKIYQLMDHSNMDCFICILSHGDKGIYGTGQEAPIYELTSQFTGL
KCPSLAGKPKVFFIQACQGDNYQKGFVETDSEEQPYLEMDLSSPQTRYIPDEADFLGM
ATVNNCVSYRNPAEGTWYIQSLCQSLRERCPRGDDILTILTEVNIEVSNKDDKKNMGKQM
PQPTFTLRKKLVFSPD

图 1

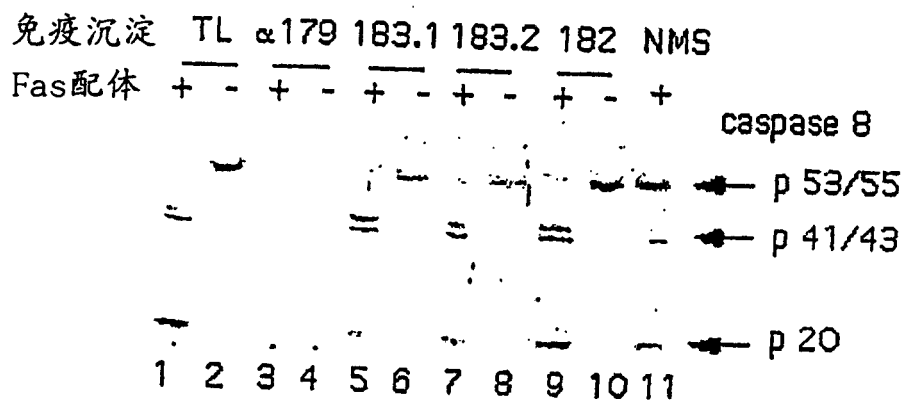


图 2

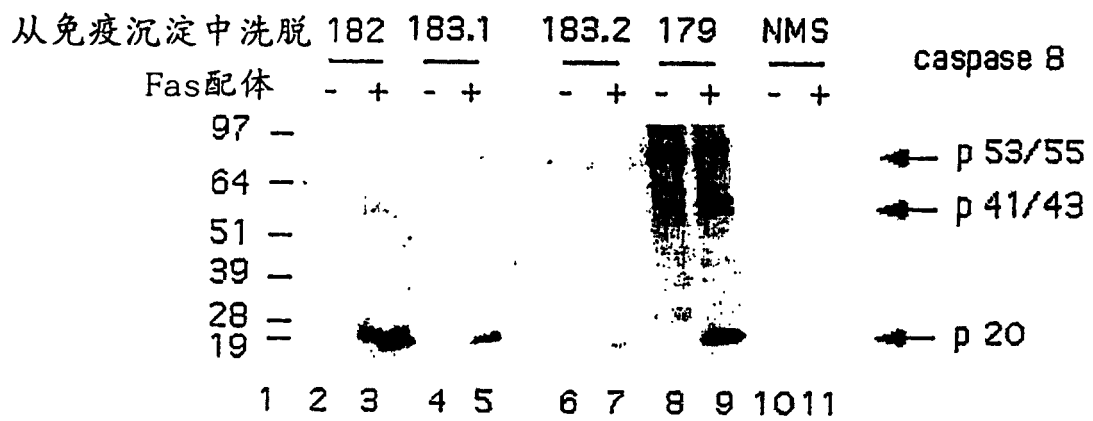


图 3a

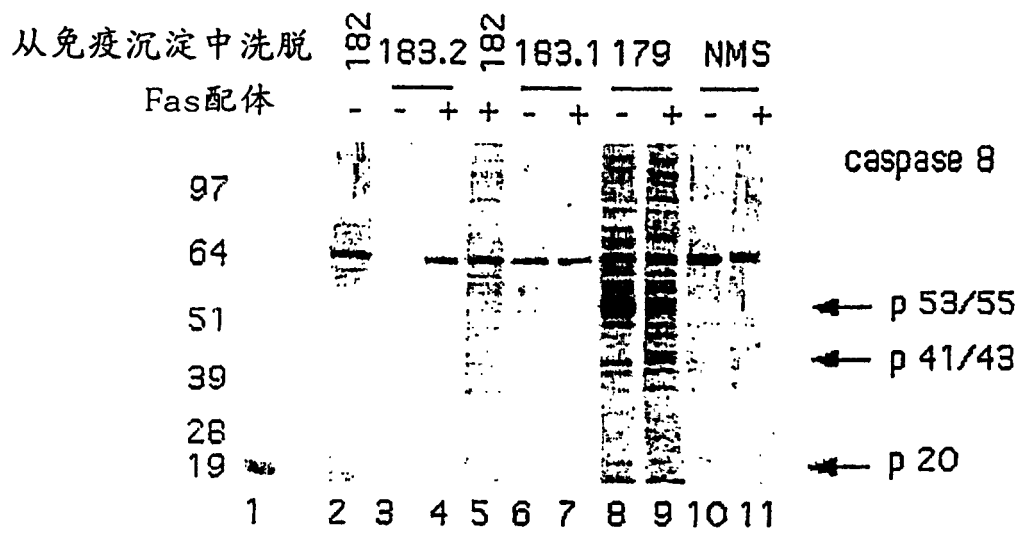


图 3b

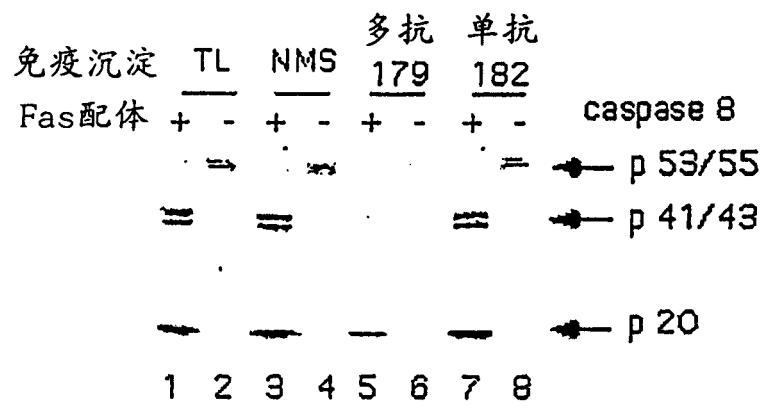


图 4

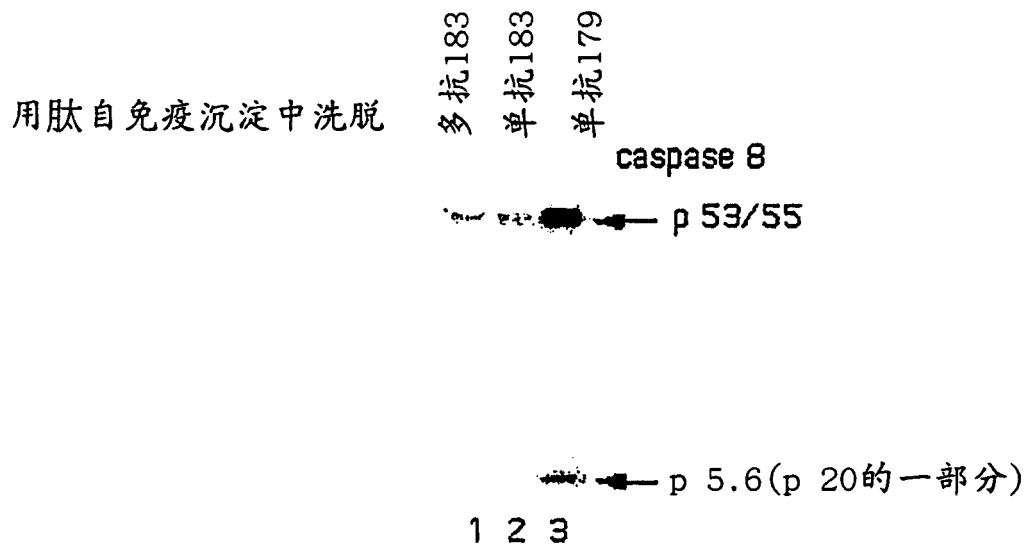


图 5

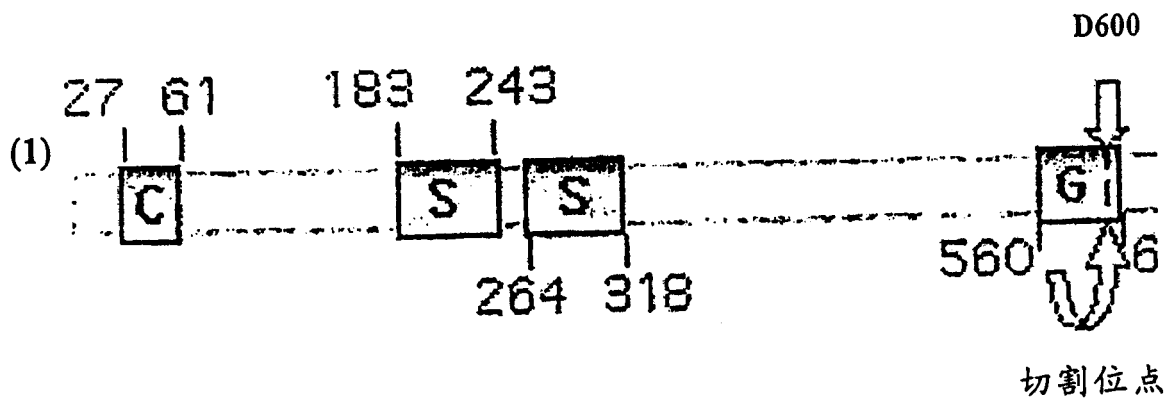


图 7

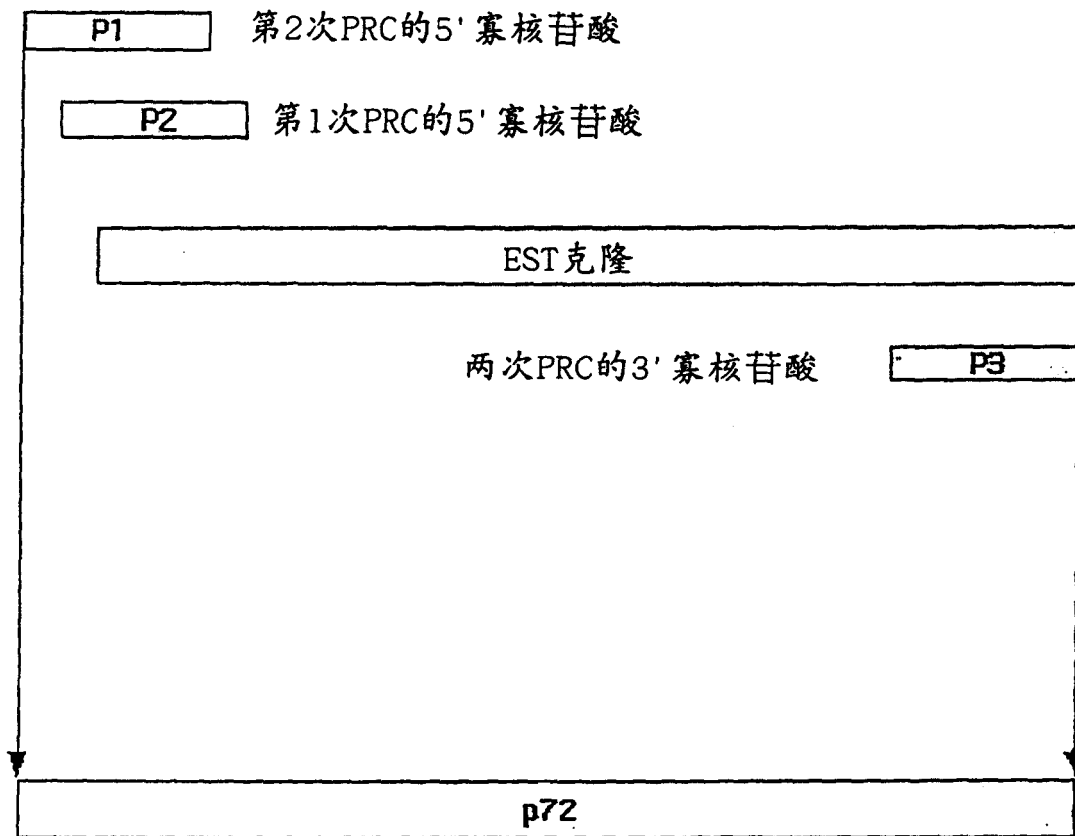


图 8

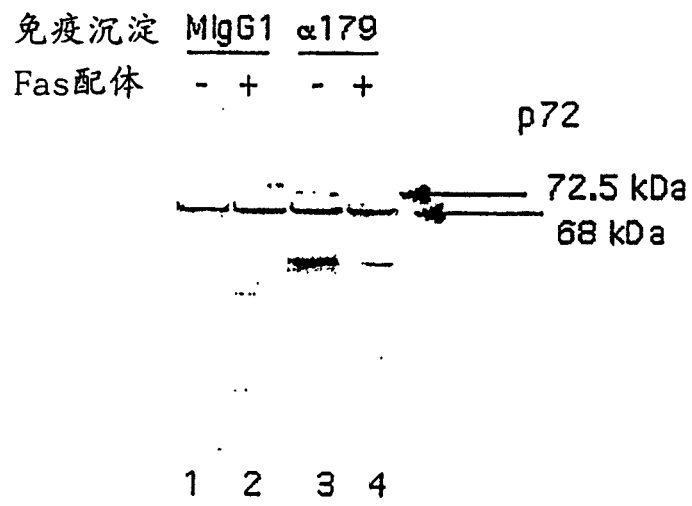


图 9

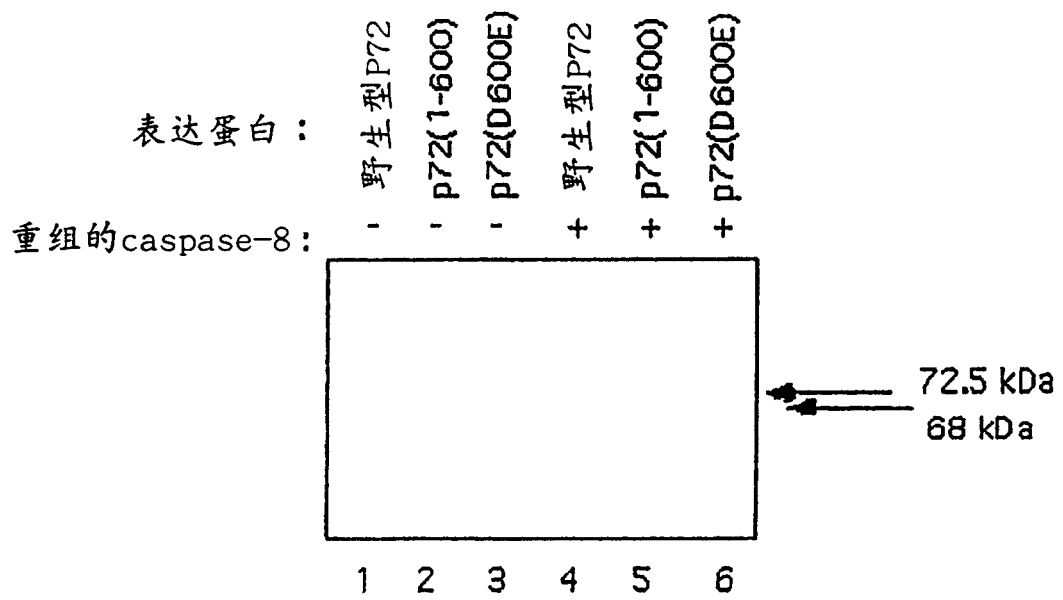


图 10

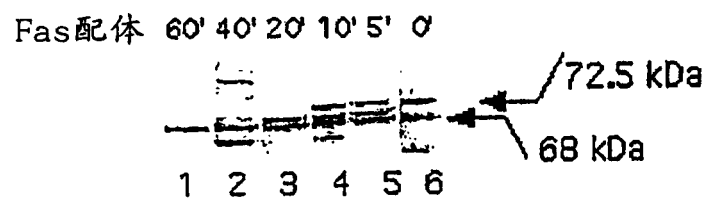


图 11

专利名称(译)	抗天冬氨酸特异半胱氨酸蛋白酶 - 8的抗体,其制备方法及应用		
公开(公告)号	CN1599755A	公开(公告)日	2005-03-23
申请号	CN02821967.8	申请日	2002-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	耶达研究发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	耶达研究发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	耶达研究发展有限公司		
[标]发明人	D沃勒克 T冈察洛夫 G克鲁马姆		
发明人	D·沃勒克 T·冈察洛夫 G·克鲁马姆		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P7/00 A61P37/02 C07K1/30 C07K16/40 C07K16/46 C12N15/02 C12P21/08 C07K14/47 C12N9/64 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/40		
代理人(译)	周承泽		
优先权	145279 2001-09-04 IL		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗天冬氨酸特异半胱氨酸蛋白酶 - 8(caspase - 8)中特异性区域的抗体及其应用。

Fas配体 60' 40' 20' 10' 5' 0'

