

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-541741

(P2009-541741A)

(43) 公表日 平成21年11月26日(2009.11.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 B O 6 3
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 C O 8 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-516559 (P2009-516559)
 (86) (22) 出願日 平成19年6月20日 (2007. 6. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年2月23日 (2009. 2. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/014382
 (87) 国際公開番号 W02007/149486
 (87) 国際公開日 平成19年12月27日 (2007.12.27)
 (31) 優先権主張番号 60/814, 955
 (32) 優先日 平成18年6月20日 (2006. 6. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

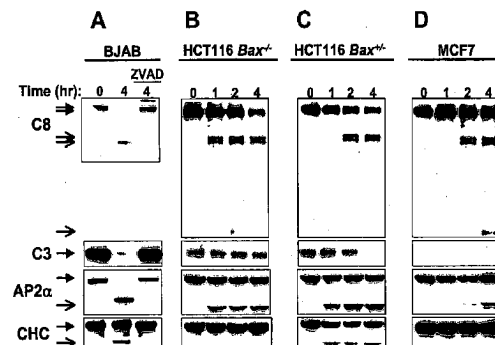
(71) 出願人 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシスコ・
 ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 オースティン, ケアリー, ディー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 70, サン カルロス, 4号, ブリ
 ッタン アヴェニュー 3349

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシスを観察するための方法と材料

(57) 【要約】

本発明は、アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片を観察して哺乳類細胞のこの過程を観察するための方法及び材料を提供する。本発明の実施態様を用いて、例えば、アポトーシスを観察してアポトーシス誘導薬剤に対する哺乳類の癌細胞の感受性を調べてもよい。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類細胞のアポトーシスを検出する方法であって、

- (a) アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合する抗体に細胞を接触させる工程、このとき該抗体が A P 2 - (配列番号： 1)、クラスリン重鎖(配列番号： 2)、A P 1 / 2 (配列番号： 3)又はダイナミン(配列番号： 4)のタンパク質断片に結合するものであり、
- (b) アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合する抗体の量を決定する工程、そして、
- (c) 工程(b)において結合した抗体の量を、アポトーシスのない哺乳類細胞においてタンパク質断片に結合する抗体の量と比較する工程を含み、このとき工程(B)の量がアポトーシスのない細胞の量よりも大きい場合に、アポトーシスが検出される方法。

10

【請求項 2】

前記細胞のアポトーシスがデスレセプター 4 (配列番号： 5)、デスレセプター 5 (配列番号： 6)又は F a s (配列番号： 8)によって引き起こされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞のアポトーシスが、A p o 2 L / T R A I L (配列番号： 7)、F a s L (配列番号： 9)、F a s アゴニスト抗体、D R 4 アゴニスト抗体又は D R 5 アゴニスト抗体に細胞を接触させることによって引き起こされる、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

A p o 2 L / T R A I L (配列番号： 7)、F a s L (配列番号： 9)、F a s アゴニスト抗体、D R 4 アゴニスト抗体又は D R 5 アゴニスト抗体の投与を含む療法の有効性に関する情報を得るためにアポトーシスの検出を使用する工程をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

抗体が A P 2 - (配列番号： 1)のタンパク質断片に結合し、抗体が結合した A P 2 のタンパク質断片が 6 4 k D a 又は 3 3 k D a である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

抗体が結合したタンパク質断片が配列番号： 1 の D V F D 又は配列番号： 1 の G P A A を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記細胞が、ヒトの大腸、結腸直腸、肺、胸部、前立腺、膀胱、腎臓、卵巣、脳、メラノーマ、白血病又は骨髄腫の癌細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

A P 2 - (配列番号： 1)、クラスリン重鎖(配列番号： 2)、A P 1 / 2 (配列番号： 3)又はダイナミン(配列番号： 4)のタンパク質断片が、イムノプロットティング、酵素結合免疫吸着アッセイ又は免疫組織化学を用いて観察される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

哺乳類の細胞における少なくとも一つの m R N A の発現を調べることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

哺乳類細胞を一又は複数の試験薬剤にさらした後に、該細胞を抗体と接触させて、哺乳類細胞におけるアポトーシスの検出によって、該一又は複数の試験薬剤を哺乳類細胞におけるアポトーシスのインデューサとして同定されるようにすることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ヒト癌細胞のアポトーシスを誘導する治療薬に応答する可能性がある、又は応答するヒト癌細胞を同定するための方法であって、ヒト癌細胞を治療薬にさらす工程、

A P 2 - (配列番号： 1)、クラスリン重鎖(配列番号： 2)、A P 1 / 2 (配列番号： 3

50

)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片の存在について、治療薬にさらされたヒト癌細胞を調べる工程、
ヒト癌細胞のタンパク質断片の量をリガンドにさらされていないコントロールのヒト癌細胞のタンパク質断片の量と比較する工程を含み、
このとき、
治療薬にさらされたヒト癌細胞に存在するタンパク質断片の量が治療薬にさらされていないコントロールのヒト癌細胞のタンパク質断片の量より大きい場合に、アポトーシスが観察され、ヒト癌細胞のアポトーシスの観察によってヒト癌細胞を該治療薬に応答する可能性があるか、又は応答するものと識別する方法。

【請求項12】

前記治療薬がデスレセプター4(配列番号：5)、デスレセプター5(配列番号：6)又はFas(配列番号：8)のシグナル伝達を誘導する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

AP2-(配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、AP1/2(配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片がイムノプロットティング、酵素結合免疫吸着アッセイ又は免疫組織化学を用いて観察される、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

ヒト癌細胞において少なくとも1つのmRNAの発現を調べることをさらに含む請求項11に記載の方法。

【請求項15】

ヒト癌細胞において少なくとも2つの異なるmRNAの発現を調べることをさらに含む請求項11に記載の方法。

【請求項16】

前記ヒト癌細胞が、大腸、結腸直腸、肺、胸部、前立腺、膀胱、腎臓、卵巣、脳、メラノーマ、白血病又は骨髄腫の癌細胞である、請求項11に記載の方法。

【請求項17】

ヒト癌細胞のアポトーシスがApoptosis Ligand 2 (配列番号：7)、FasL(配列番号：9)、Fasアゴニスト抗体、DR4アゴニスト抗体又はDR5アゴニスト抗体に細胞を接触させることによって引き起こされる、請求項11に記載の方法。

【請求項18】

ヒト癌細胞が、生検から得られ、1か月未満の間インビトロ培養において成長させたものである、請求項11に記載の方法。

【請求項19】

タンパク質断片が配列番号：1のDVFD又は配列番号：1のGPA Aを含むAP2-のタンパク質断片である、請求項11に記載の方法。

【請求項20】

哺乳類細胞におけるアポトーシスを観察するためのキットであって、

a) AP2-(配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、AP1/2(配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片を結合する一次抗体と、

b) AP2-(配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、AP1/2(配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片を結合する二次抗体と、このとき、一次及び二次抗体は同じタンパク質を結合しないものであり、

c) (a)及び(b)のための容器と、

d) キットの抗体を哺乳類細胞のアポトーシスを観察するために用いるための指示書とを具備するキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、出典明記によって本明細書中に全体の内容が援用される、2006年6月20日に出願の米国仮特許出願第60/814955号の優先権を主張するものである。

10

20

30

40

50

本発明は、一般に、アポトーシスを誘導する薬剤にさらされたヒト癌細胞などの哺乳類細胞のアポトーシスを観察するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

哺乳動物の細胞数の制御は、細胞増殖及び細胞死の間のバランスによってある程度測定される。時に壊死細胞死と称される細胞死の1タイプは、一般的に、いくつかの外傷又は細胞性損傷から生じる細胞死の病理学的形態に特徴がある。対照的に、通常規則的ないしは制御された様式で進行する細胞死の「生理的」形態がある。細胞死の規則的ないしは制御された形態は、「アポトーシス」と称される[例としてBarr等, *Bio/Technology*, 12:487-493 (1994); Steller等, *Science*, 267:1445-1449 (1995)を参照]。アポトーシスの細胞死は、胚発生及び免疫系のクローン選択を含む多くの生理的過程において自然に生じる[Itoh等, *Cell*, 66:233-243 (1991)]。

様々な分子、例えば腫瘍壊死因子- α (「TNF- α 」)、腫瘍壊死因子- β (「TNF- β 」又は「リンホトキシン- β 」)、リンホトキシン- γ (「LT- γ 」)、CD30リガンド、CD27リガンド、CD40リガンド、OX-40リガンド、4-1BBリガンド、Apo-1リガンド(Fasリガンド又はCD95リガンドとも称される)、Apo-2リガンド(TRAILとも称される)、Apo-3リガンド(TWEAKとも称される)、オステオプロテジェリン(OPG)、APRIL、RANKリガンド(TRANCEとも称される)、及びTALL-1(BlyS、BAFF又はTHANKとも称される)が、サイトカインの腫瘍壊死因子(「TNF」)ファミリーのメンバーとして同定されている[例えば、Gruss及びDower, *Blood*, 85:3378-3404(1995); Pitti等, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690(1996); Wiley等, *Immunity*, 3:673-682(1995); Browning等, *Cell*, 72:847-856(1993); Armitage等, *Nature*, 357:80-82(1992), 1997年1月16日公開の国際公報97/01633; 1997年7月17日公開の国際公報97/25428; Marsters等, *Curr. Biol.*, 8:525-528(1998); Simonet等, *Cell*, 89:309-319 (1997); Chicheportiche等, *Biol. Chem.*, 272:32401-32410(1997); Hahne等, *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190(1998); 1998年7月2日公開の国際公報98/28426; 1998年10月22日公開の国際公報98/46751; 1998年5月7日公開の国際公報/98/18921; Moore等, *Science*, 285:260-263(1999); Shu等, *J. Leukocyte Biol.*, 65:680(1999); Schneider等, *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756(1999); Mukhopadhyay等, *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981(1999)参照]。これらの分子のなかでも、TNF- α 、TNF- β 、CD30リガンド、4-1BBリガンド、Apo-1リガンド、Apo-2リガンド(Apo2L/TRAIL)及びApo-3リガンド(TWEAK)は、アポトーシス性細胞死に関与していることが報告されている。TNF- α 及びTNF- β は感受性のある腫瘍細胞のアポトーシスの死を誘導することが報告されている(Schmid等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry等, *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987))。

【0003】

TNFサイトカインのメンバーであると考えられる更なる分子は、アポトーシスに関与することが報告されている。例えば、Pitti等, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996)において、Apo-2リガンドと称する分子が記載されている。また1997年7月17日公開の国際公報97/25428も参照のこと。完全長ヒトApo-2のリガンドは、様々な哺乳類細胞のアポトーシスを誘導する281のアミノ酸ポリペプチドであることが報告されている。他の研究者はTRAIL(Wiley等, *Immunity*, 3:673-682 (1995); 1997年1月16日公開の国際公報97/01633)、及びAGP-1(1997年12月11日公開の国際公報97/46686)と称する関連したポリペプチドを記述している。

TNFファミリーの様々な分子もまた、免疫系の機能又は発達における役割(一又は複数)が明らかにされている(Gruss等, *Blood*, 85:3378 (1995))。Zheng等は、TNF- α がCD8陽性T細胞の刺激後アポトーシスに関与することを報告している(Zheng等, *Nature*, 377:348-351 (1995))。他の研究者は、CD30リガンドが胸腺の自己応答性T細胞の欠失に関与しうることを報告している(Amakawa等, *Cold Spring Harbor Laboratory Symposiu*

10

20

30

40

50

m on Programmed Cell Death, Abstr. No. 10, (1995)). CD40リガンドは、増殖、免疫グロブリン分泌及び生存を含むB細胞の多くの機能を活性化する(Renshaw等, J. Exp. Med., 180:1889 (1994)). 他の最近同定されたTNFファミリサイトカインであるTALL-1 (BlyS)は、ある条件下において、B細胞増殖及び免疫グロブリン分泌を誘導することが報告されている。(上掲のMoore等; 上掲のSchneider等; Mackay等, J. Exp. Med., 190:1697 (1999)).

マウスFas/Apo-1レセプター又はリガンドの遺伝子(それぞれlpr及びgldと称する)の突然変異はいくつかの自己免疫性疾患と関係していることから、末梢の自己応答性リンパ球のクローン欠失を制御する際にApo-1リガンドが役割を果たしうること示唆する(Krammer等, Curr. Op. Immunol., 6:279-289 (1994); Nagata等, Science, 267:1449-1456 (1995)). Apo-1のリガンドもまた、CD4ポジティブTリンパ球とBリンパ球の刺激後アポトーシスを誘導することが報告されており、これらの機能がもはや必要でない場合に活性化されたリンパ球の除去を伴いうる(上掲のKrammer等; 上掲のNagata等)。Apo-1レセプターに特異的に結合するアゴニストマウスモノクローナル抗体は、TNF- α に匹敵する、又は同類である細胞死活性を表すことが報告されている(Yonehara等, J. Exp. Med., 169:1747-1756 (1989)).

【0004】

このようなTNFファミリリガンドによって媒介される様々な細胞性応答の誘導は、一般的に特定の細胞レセプターへの結合によって開始される。すべてではなく、いくつかのTNFファミリリガンドは、細胞表面の「デスレセプター」に結合して、それを介して様々な生物学的活性を誘導し、細胞死やアポトーシス経路を行うカスパーゼ又は酵素を活性化する(Salvesen等, Cell, 91:443-446 (1997)). 今日までに同定されたTNFレセプタースーパーファミリのメンバーには、TNFR1、TNFR2、TACI、GITR、CD27、OX-40、CD30、CD40、HVEM、Fas (Apo-1又はCD95とも称される)、DR4 (TRAIL-R1とも称される)、DR5 (Apo-2又はTRAIL-R2とも称される)、DcR1、DcR2、破骨細胞分化抑制因子(OPG)、RANK及びApo-3 (DR3又はTRAMPとも称される)が含まれる。(例えば、Ashkenazi, Nature Reviews, 2:420-430 (2002); Ashkenazi及びDixit, Science, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi及びDixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997) Wallach, Cytokine Reference, Academic Press, 2000, 377-411頁; Locksley等, Cell, 104:487-501 (2001); Gruss and Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Hohman等, J. Biol. Chem., 264:14927-14934 (1989); Brockhaus等, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3127-3131 (1990); 1991年3月20日出願の欧州特許第417,563; Loetscher等, Cell, 61:351 (1990); Schall等, Cell, 61:361 (1990); Smith等, Science, 248:1019-1023 (1990); Lewis等, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:2830-2834 (1991); Goodwin等, Mol. Cell. Biol., 11:3020-3026 (1991); Stamenkovic等, EMBO J., 8:1403-1410 (1989); Mallett等, EMBO J., 9:1063-1068 (1990); Anderson等, Nature, 390:175-179 (1997); Chicheportiche等, J. Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997); Pan等, Science, 276:111-113 (1997); Pan等, Science, 277:815-818 (1997); Sheridan等, Science, 277:818-821 (1997); Degli-Esposti等, J. Exp. Med., 186:1165-1170 (1997); Marsters等, Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997); Tsuda等, BBRC, 234:137-142 (1997); Nocentini等, Proc. Natl. Acad. Sci., 94:6216-6221 (1997); vonBulow等, Science, 278:138-141 (1997)).

【0005】

これらTNFレセプターファミリメンバーの多くは、細胞外領域、膜貫通領域及び細胞内領域を含む細胞表面レセプターの典型的な構造を共有しており、一方、他のメンバーは膜貫通領域と細胞内ドメインを欠いた可溶性タンパク質として天然にみられる。典型的なTNFRの細胞外部位には、NH₂-末端から始まる複数のシステインリッチドメイン(CRD)の反復性のアミノ酸配列パターンを含有する。

Apo-2L又はTRAILと称されるリガンドはサイトカインのTNFファミリのメ

ンバーとして数年前に同定された。[例えばWiley等, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Pitti等, *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690 (1996); 国際公開公報97/01633; 国際公開公報97/25428; 1998年6月9日発行の米国特許第5,763,223号; 2001年9月4日発行の米国特許第6284236を参照]。完全長天然配列ヒトA p o 2 L / T R A I Lポリペプチドは281アミノ酸長のII型膜貫通タンパク質である。ある細胞は、ポリペプチドの細胞外領域の酵素切断によって、そのポリペプチドの天然の可溶型を生じうる[Mariani等, *J. Cell. Biol.*, 137:221-229 (1997)]。A p o 2 L / T R A I Lの可溶型の結晶学的研究はTNF及び他の関連タンパク質の構造に類似したホモ三量体構造を明らかにする[Hymowitz等, *Molec. Cell*, 4:563-571 (1999); Cha等, *Immunity*, 11:253-261 (1999); Mongkolsapaya等, *Nature Structural Biology*, 6:1048 (1999); Hymowitz等, *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)]。しかし、他のTNFファミリーメンバーとは異なり、A p o 2 L / T R A I Lは、(ホモ三量体の各サブユニットの位置230の)3つのシステイン残基が併せて亜鉛原子を配位しており、亜鉛の結合が三量体の安定性と生物学的活性のために重要であるという独特の構造的特徴を有していることが分かった。[上掲のHymowitz等; Bodmer等, *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637 (2000)]。

10

【0006】

A p o 2 L / T R A I Lは関節リウマチなどの自己免疫性疾患を含む、免疫系の調節において働きうることが文献で報告されている[例として、Thomas等, *J. Immunol.*, 161:2195-2200 (1998); Johnsen等, *Cytokine*, 11:664-672 (1999); Griffith等, *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999); Song等, *J. Exp. Med.*, 191:1095-1103 (2000)を参照]。

20

また、A p o 2 L / T R A I Lの可溶型は大腸、肺、乳房、前立腺、膀胱、腎臓、卵巣及び脳腫瘍を含む様々な癌細胞並びに黒色腫、白血病、及び多発性骨髄腫においてアポトーシスを誘導することが報告されている[例えば、上掲のWiley等; 上掲のPitti等; 2000年2月29日発行の米国特許第6,030,945号; 2004年6月8日発行の米国特許第6,746,668号; Rieger等, *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998); Ashkenazi等, *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999); Walczak等, *Nature Med.*, 5:157-163 (1999); Keane等, *Cancer Research*, 59:734-741 (1999); Mizutani等, *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612 (1999); Gazit, *Leukemia*, 13:1817-1824 (1999); Yu等, *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759 (2000)を参照のこと]。マウス腫瘍モデルでのインビボ研究は、A p o 2 L / T R A I Lが、単独で又は化学療法や放射線療法と組み合わせて、実質的な抗腫瘍効果を生じうることを示唆している[例えば上掲のAshkenazi等; 上掲のWalczak等; Gliniak等, *Cancer Res.*, 59:6153-6158 (1999); 上掲のChinnaiyan等; Roth等, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265:1999 (1999); PCT出願 US/00/15512; PCT出願 US/01/23691を参照のこと]。多くのタイプの癌細胞とは対照的に、殆どの正常なヒト細胞タイプはA p o 2 L / T R A I Lのある種の組換え形態によるアポトーシスの誘導に対して耐性があるように思われる[上掲のAshkenazi等; 上掲のWalczak等]。Jo等はA p o 2 L / T R A I Lのポリヒスチジンタグ可溶型が正常な単離された非ヒトではなくヒト肝細胞においてインビトロにてアポトーシスを誘導したことを報告している[Jo等, *Nature Med.*, 6:564-567 (2000); またNagata, *Nature Med.*, 6:502-503 (2000)を参照のこと]。ある種の組換えA p o 2 L / T R A I L調製物は、例えばタグ分子の有無、亜鉛含有量、及び三量体の含有%に応じて、罹患細胞対正常細胞に対する生化学的性質及び生物学的活性に関して変動しうると考えられている。[Lawrence等, *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:383-385 (2001); Qin等, *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)]。

30

40

【0007】

A p o 2 L / T R A I Lは、少なくとも5つの異なるレセプターに結合することが明らかとなった。A p o 2 L / T R A I Lに結合するそのレセプターの少なくとも2つは、機能的な細胞質ドメインを含有している。そのあるレセプターは「DR4」(あるいはTR4又はTRAIL-R1)と称されている(Pan等, *Science*, 276:111-113 (1997); また、1998年7月30日公開の国際公開公報98/32856; 1999年7月29日公開の国際公開公報99/3

50

7684 ; 2000年12月7日公開の国際公開公報00/73349 ; 2003年2月20日発行の米国特許公開2003/0036168 ; 2002年8月13日発行の米国特許第6,433,147号 ; 2002年10月8日発行の米国特許第6,461,823号及び2002年1月29日発行の米国特許第6,342,383号)。

A p o 2 L / T R A I L の他のレセプターは D R 5 と称されている(あるいは A p o - 2 ; T R A I L - R 又は T R A I L - R 2 、 T R 6 、 T a n g o - 6 3 、 h A P O 8 、 T R I C K 2 又は K I L L E R と称されている) (例として、Sheridan 等, Science, 277:818-821 (1997)、Pan 等, Science, 277:815-818 (1997)、1998年11月19日公開の国際公開公報98/51793 ; 1998年9月24日公開の国際公開公報98/41629 ; Screamton 等, Curr. Biol., 7:693-696 (1997) ; Walczak 等, EMBO J., 16:5386-5387 (1997) ; Wu 等, Nature Genetics, 17:141-143 (1997) ; 1998年8月20日発行の国際公開公報98/35986 ; 1998年10月14日発行の欧州特許第870,827号 ; 1998年10月22日公開の国際公開公報98/46643 ; 1999年1月21日公開の国際公開公報99/02653 ; 1999年2月25日公開の国際公開公報99/09165 ; 1999年3月11日公開の国際公開公報99/11791 ; 2003年5月22日公開の国際公開公報03/042367 ; 2002年12月5日公開の国際公開公報02/097033 ; 2003年5月8日公開の国際公開公報03/038043 ; 2002年8月13日公開の米国特許公開2002/0072091 ; 2001年12月7日公開の米国特許公開2002/0098550 ; 2001年12月6日発行の米国特許第6,313,269号 ; 2001年8月2日公開の米国特許公開2001/0010924 ; 2003年7月3日公開の米国特許公開 2003/01255540 ; 2002年10月31日公開の米国特許公開2002/0160446、2002年4月25日公開の米国特許公開2002/0048785 ; 2004年7月21日発行の米国特許公開2004/0141952 ; 2005年6月16日公開の米国特許公開2005/0129699 ; 2005年6月16日公開の米国特許公開2005/0129616 ; 2002年2月発行の米国特許第6,342,369号 ; 2003年5月27日発行の米国特許第6,569,642号、2000年6月6日発行の米国特許第6,072,047号、2003年11月4日発行の米国特許第6,642,358号 ; 2004年6月1日発行のUS 6,743,625を参照)。D R 4 と同様に、D R 5 は細胞質デスドメインを含有し、リガンド結合時(又はリガンドの活性を擬態するアゴニスト抗体などの分子の結合時)にアポトーシスをシグナル伝達することができることが報告された。A p o - 2 L / T R A I L と D R 5 とで形成される複合体の結晶構造はHymowitz 等, Molecular Cell, 4:563-571 (1999)に記載されている。他の同定されたデスドメイン含有レセプターは D R 6 と称される(Pan 等, FEBS Letters, 431:351-356 (1998))。

【 0 0 0 8 】

リガンドが結合すると、D R 4 と D R 5 はともに、F A D D / M o r t 1 と称されるデスドメイン含有アダプター分子を介してアポトーシスインヒビターであるカスパーゼ 8 を増加又は活性化することによって独立してアポトーシスを引き起こしうる[Kischkel 等, Immunity, 12:611-620 (2000) ; Sprick 等, Immunity, 12:599-609 (2000) ; Bodmer 等, Nature Cell Biol., 2:241-243 (2000)]。

また、A p o 2 L / T R A I L は D c R 1 、 D c R 2 及び O P G と称されるレセプターに結合することが報告されている。そのレセプター等はシグナル伝達のトランスデューサーというよりもインヒビターとして機能すると思われる。(例えば、DCR1 (TRID、LIT 又は TRAIL-R3 と称される) [Pan 等, Science, 276:111-113 (1997) ; Sheridan 等, Science, 277:818-821 (1997) ; McFarlane 等, J. Biol. Chem., 272:25417-25420 (1997) ; Schneider 等, FEBS Letters, 416:329-334 (1997) ; Degli-Esposti 等, J. Exp. Med., 186:1165-1170 (1997) ; 及び Mongkolsapaya 等, J. Immunol., 160:3-6 (1998) ; DCR2 (TRUNDD 又は TRAIL-R4 と称される) [Marsters 等, Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997) ; Pan 等, FEBS Letters, 424:41-45 (1998) ; Degli-Esposti 等, Immunity, 7:813-820 (1997)]、及び OPG [Simonet 等, supra]。D R 4 及び D R 5 に反して、D c R 1 及び D c R 2 レセプターはアポトーシスをシグナル伝達しない。

【 0 0 0 9 】

D R 4 、 D R 5 及び / 又は F a s レセプターに結合する特定の抗体が文献で報告されている。例えば、D R 4 レセプターに対するものであり、特定の哺乳動物細胞の拮抗的ないしはアポトーシス的な活性を有する抗 D R 4 抗体は、例として、1999年7月29日公開の国際公開公報99/37684 ; 2000年7月12日公開の国際公開公報00/73349 ; 2003年8月14日公開の

10

20

30

40

50

国際公開公報03/066661に記載されている。例として、Griffith 等, J. Immunol., 162:2597-2605 (1999); Chuntharapai 等, J. Immunol., 166:4891-4898 (2001); 2002年12月2日公開の国際公開公報02/097033; 2003年5月22日公開の国際公開公報03/042367; 2003年5月8日公開の国際公開公報03/038043; 2003年5月8日公開の国際公開公報03/037913; 2003年4月17日公開の米国特許公開2003/0073187; 2003年6月12日公開の米国特許公開2003/0108516も参照のこと。特定の抗DR5抗体も同様に記載されている。例として、1998年11月8日公開の国際公開公報98/51793; Griffith 等, J. Immunol., 162:2597-2605 (1999); Ichikawa 等, Nature Med., 7:954-960 (2001); Hylander 等, "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", Abstract, 2d International Congress on Monoclonal Antibodies in Cancers, Aug. 29-Sept. 1, 2002, Banff, Alberta, Canada; 2003年5月8日公開の国際公開公報03/038043; 2003年5月8日公開の国際公開公報03/037913; 2003年9月25日公開の米国特許公開2003/0180296を参照のこと。さらに、DR4とDR5レセプターの両方と交差反応する特定の抗体が記載されている(例として、2001年6月26日発行の米国特許第6,252,050号を参照)。Fasを発現している標的細胞のアポトーシスを誘導するアゴニスト抗Fas抗体には、限定するものではないが、MAb M2及びM3(IgG; Alderson等, 1995, J. Exp. Med. 181: 71-77); 抗Fas MAb(免疫グロブリンM; Yonehara等, 1989, J. Exp. Med. 169: 1747-1756); MAb CH11(免疫グロブリンM; Alderson等, 1994, Int. Immunol. 6:1799-806); 及び抗APO-1(IgG; Dhein等, 1992, J. Immunol., 149:3166-3173)が含まれる。

10

20

【0010】

アポトーシスは多細胞生物の発達及びホメオスタシスにおいて重要な役割を果たす(Danial, N.N.等, Cell 116, 205-19 (2004)を参照)。2つの主要なシグナル伝達メカニズムである、細胞内因性及び細胞外因性の経路はアポトーシスを誘導を制御する(Strasser, A., 等, Annu Rev Biochem 69, 217-45 (2000)を参照)。これらの経路は、カスパーゼと称する細胞統合性のために必須である様々な細胞性タンパク質を切断するシステインプロテアーゼを活性化させる。カスパーゼはアスパラギン酸を含む特定のテトラペプチド配列を認識して、隣接したペプチド結合を切断する(Thornberry, N.A.等, Science 281, 1312-6 (1998)を参照)。細胞外因性経路の活性化は、Fasリガンド(FasL)及びAPO2リガンド/TNF関連のアポトーシスを誘導するリガンド(APO2L/TRAIL)などのリガンドに反応して、これらのそれぞれの細胞表面「デスレセプター」Fas(APO1/CD95)及びDR4又はDR5を介して起こる(Nagata, S. Cell 88, 355-65 (1997)及びLeBlanc, H.N.等, Cell Death Differ 10, 66-75 (2003)を参照)。リガンド結合は、レセプターの細胞質側末端内のデスドメインへのアダプターFADD(Fas関連の「デス」ドメイン)の動員を誘発する。FADDはイニシエーターであるプロテアーゼカスパーゼ-8を集め、「死を誘導するシグナル伝達複合体」(DISC)を形成する(Kischkel, F.C.等, Embo J 14, 5579-88 (1995)を参照)。DISCのカスパーゼ-8分子の近くは酵素活性を刺激し、その結果自己プロセシングが生じる(Boatright, K.M.等, Mol Cell 11, 529-41 (2003)を参照)。次いで、切断されたカスパーゼ-8はDISCから細胞質に放出し、タンパク質分解によってエフェクターであるカスパーゼ、例えばカスパーゼ-3及び-7を活性化

ある細胞では、DR刺激は強力なカスパーゼ-8活性を生成し、この活性はエフェクターであるカスパーゼを強く活性化して、細胞にアポトーシスを起こさせる(Scaffidi, C., 等, J Biol Chem 274, 1541-8 (1999)を参照)。他の細胞は内因性経路によるシグナル増幅を必要とする。カスパーゼ-8はBcl-2相同ドメイン3(BH3)-オンリータンパク質Bidを切断し、マルチ-BHドメインタンパク質であるBaxとBakによる内因性経路を起こし、エフェクター-カスパーゼ活性化とアポトーシスを亢進する(Danial, N.N.等, Cell 116, 205-19 (2004)及びStrasser, A., 等, Annu Rev Biochem 69, 217-45 (2000)を参照)。

30

40

アポトーシスは一般的に、核クロマチンの凝縮と辺縁趨向、及びいわゆるアポトーシス体への核構造の断片化に特徴がある。このアポトーシスの形態は、従来の染色剤、プロピ

50

ジウムヨウ素又はヘキスト 3 3 2 5 8 などの選択的に核に蓄積する色素を使用して、又は、電子顕微鏡法によって観察されうる。アポトーシスによる細胞死に関連があることが多いが、そうとは診断できない DNA のヌクレオソーム間断片化もまた、アポトーシスを同定して、定量化するために用いられる。

【発明の概要】

【0011】

本出願人は、アポトーシス性の細胞死のバイオマーカーとして使われうる、アポトーシスを経る細胞において生成されるタンパク質断片を同定した。本発明の実施態様は、例えば、一又は複数のアポトーシスを誘導する薬剤にさらされた哺乳類細胞のアポトーシス性の細胞死を観察するために、前記タンパク質断片を観察するための方法及び材料を提供する。本発明の例示的な実施態様では、アポトーシスのこれらのバイオマーカーは、アポトーシスを誘導する薬剤、例えば A p o 2 L / T R A I L、F a s L 又は A p o 2 L / T R A I L 又は F a s L アゴニストの投与を含む療法の有効性を調べるために、ヒト癌細胞において観察される。

10

【0012】

本出願の発明は多くの実施態様を有する。本発明の一実施態様は、アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合する抗体に細胞を接触させること、このとき該抗体が A P 2 - (配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、A P 1 / 2 (配列番号：3) 又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片に結合する、アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合する抗体の量を決定すること、そして、この工程において結合した抗体の量を、アポトーシスのない哺乳類細胞においてタンパク質断片に結合する抗体の量と比較すること、このときこの量がアポトーシスのない細胞の量よりも大きい場合に、アポトーシスが検出されることによって、哺乳類細胞のアポトーシスを検出する方法である。場合によって、この方法によって調べられる哺乳類細胞は、ヒトの大腸、結腸直腸、肺、胸部、前立腺、膀胱、腎臓、卵巣、脳、メラノーマ、白血病又は骨髄腫の癌細胞である。

20

後述するように、本発明の方法は、アポトーシスが多くの異なる細胞レセプターによって引き起こされるのを観察するために用いてもよい。この方法のいくつかの実施態様では、細胞のアポトーシスは、例えば、A P O 2 L / T R A I L (配列番号：7) 又はデスレセプター 4 (配列番号：5) 又はデスレセプター 5 (配列番号：6) を結合する抗体と細胞を接触させることによって、デスレセプター 4 (配列番号：5) 又はデスレセプター 5 (配列番号：6) を介して引き起こされる。本発明の他の実施態様では、細胞のアポトーシスは、例えば、F a s L (配列番号：9) 又は F a s を結合する抗体と細胞を接触させることによって、F a s (配列番号：8) を介して引き起こされる。

30

【0013】

本発明の方法は、多くの文脈においてさらに応用されてもよい。例えば、アポトーシスを観察するこれらの方法は、A p o 2 L / T R A I L (配列番号：7) 又はデスレセプター 4 (配列番号：5) 又はデスレセプター 5 (配列番号：6) を結合する抗体に対する細胞の感受性を評価するために用いてもよい。本発明のある例示的な実施態様では、これらの方法は、A p o 2 L / T R A I L (配列番号：7) 又はデスレセプター 4 (配列番号：5) 又はデスレセプター 5 (配列番号：6) を結合する抗体の投与を含む療法の有効性を評価するために用いてもよい。同様に、本発明の他の実施態様は、例えば F a s L (配列番号：9) 又は F a s を結合する抗体の投与を含む療法の有効性を評価するために、F a s L (配列番号：9) 又は F a s を結合する抗体に対する細胞の感受性を調べるために用いてもよい。

40

以下に詳細に述べられるように、本発明の方法は、一又は複数のアポトーシス断片に対する抗体を用いたイムノアッセイなどの当分野で公知の様々な技術のいずれかを用いて、細胞内の多くの異なるタンパク質のアポトーシス性の断片化を観察してもよい。例えば、本発明のある実施態様では、抗体は A P 2 - (配列番号：1) のタンパク質断片、例えばおよそ 6 4 k D a 又は 3 3 k D a の断片に結合する。本発明のいくつかの実施態様では、抗体が結合した A P 2 のタンパク質断片は、配列番号：1 の D V F D 又は配列番号：

50

1のG P A Aを含む。本発明の他の実施態様は、クラスリン重鎖(配列番号：2)のタンパク質断片に結合する抗体を使用してもよい。本発明の他の実施態様は、A P 1 / 2 (配列番号：3)のタンパク質断片に結合する抗体を使用してもよい。本発明の他の実施態様は、ダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片を結合する抗体を使用してもよい。

【0014】

本発明の特定の実施態様は、特定の生理学的関係において特定のタイプのアポトーシスの活性及び/又はアポトーシスを調べるために適宜変更される。例えば、本発明の実施態様は、デスレセプター4(配列番号：5)、デスレセプター5(配列番号：6)又はF a s (配列番号：8)によって媒介される哺乳類細胞のアポトーシスを観察するために用いられてもよい。一般的に、このような方法は、細胞をデスレセプター4、デスレセプター5又はF a s リガンドにさらすこと、A P 2 - (配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、A P 1 / 2 (配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片の存在についてリガンドにさらした細胞を調べること、細胞のタンパク質断片の量をリガンドにさらされていないコントロール細胞のタンパク質断片の量と比較することを含み、このとき、リガンドにさらされた細胞に存在するタンパク質断片の量がリガンドにさらされていないコントロール細胞のタンパク質断片の量より大きい場合に、アポトーシスが観察される。一般的にこのような方法では、デスレセプター4、デスレセプター5又はF a s リガンドは、A p o 2 L / T R A I L (配列番号：7)、デスレセプター4ないしはデスレセプター5を結合する抗体、F a s L (配列番号：9)又はF a s を結合する抗体である。

【0015】

本発明の他の実施態様は、哺乳類細胞をA p o 2 L / T R A I L又はF a s Lにさらすことによる、A p o 2 L / T R A I L (配列番号：7)又はF a s L (配列番号：8)誘導アポトーシスに対する哺乳類細胞の感受性を観察すること、A P 2 - (配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、A P 1 / 2 (配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片の存在についてA p o 2 L / T R A I L又はF a s Lにさらされた細胞を調べること、哺乳類細胞のタンパク質断片の量をA p o 2 L / T R A I L又はF a s Lにさらされていないコントロール哺乳類細胞のタンパク質断片の量と比較することを含み、このとき、A p o 2 L / T R A I L又はF a s Lにさらされた哺乳類細胞に存在するタンパク質断片の量が、A p o 2 L / T R A I L又はF a s Lにさらされていないコントロール哺乳類細胞のタンパク質断片の量より多い場合に、該哺乳類細胞がA p o 2 L / T R A I L又はF a s Lが媒介するアポトーシスに対して感受性があることが観察される。

また、本発明の実施態様は、A P 2 - (配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、A P 1 / 2 (配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片を結合する抗体を具備する製造品及びキットを提供する。例示的な実施態様は、哺乳類細胞の特徴を表すためのキットであって、A P 2 - (配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、A P 1 / 2 (配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片を結合する一次抗体と、A P 2 - (配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、A P 1 / 2 (配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片を結合する二次抗体と、このとき、一次及び二次抗体は同じエピトープを結合しない(場合によって同じタンパク質を結合しない)ものであり、(a)及び(b)のための容器と、キットを使用するための指示書を具備するキットである。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】A p o 2 L / T R A I Lがクラスリン依存性のエンドサイトーシス機構の選択的な切断を誘導することを示す。(a) 三量体のA p o 2 L / T R A I L (C o l o 2 0 5、H C T 8)又は抗体架橋、タグ化A p o 2 L / T R A I L (B J A B、H e L a - M)のいずれかにて37 で細胞を処理し、カスパーゼ-8(C 8)、カスパーゼ-3(C 3)、アダプチン(A P)2、A P 1 / 2 (抗体はA P 1と2のアイソフォームを区別しない)クラスリン重鎖(C H C)又はT f レセプター(T f R)の切断について、細胞溶解物をイムノブロットによって分析した。(b) C o l o 2 0 5細胞を(a)に記載のように処理して、様々な種

10

20

30

40

50

類のクラスリン関連エンドサイトーシス輸送の特定の構成成分のプロセッシングについてイムノプロットによって分析した。

【図2】AP2 及びCHCの切断における異なるカスパーゼの関与を示す。(a) B J A B細胞をパン-カスパーゼインヒビターであるz V A D-f m k (20 μM、30分)にて処理した後に、架橋したA p o 2 L / T R A I L (1 μg / m L)にて処理し、カスパーゼ-8、カスパーゼ-3、AP2 及びCHCのプロセッシングについてイムノプロットによって分析した。矢印は切断生成物を示し、太い矢印は完全長タンパク質を示す。(b-d) B a x ⁻ / - 又はB a x ⁺ / - のH C T 1 1 6細胞又はカスパーゼ-3欠失M C F - 7細胞を、A p o 2 L / T R A I Lにて処理して、(a)のように分析した。

【図3】A p o 2 L / T R A I L前処置がT fエンドサイトーシスを阻害することを示す。(a, b) B J A B細胞(a)又はC o l o 2 0 5細胞(b)を、架橋したA p o 2 L / T R A I L (a)又は架橋していないA p o 2 L / T R A I L (b)にて、又はこれらを用いないで、示した時間の間37 °Cで前処理して、氷上で冷ました。次いで、細胞をA l e x a - 6 4 7 -コンジュゲートT f (647 T f)にて30分間の氷上で平衡化し、37 °Cでの取り込みをフローサイトメトリーによって測定した。各々のエンドサイトーシス速度は、4分の吸収動態プロットの開始線形段階の傾斜から得た(a, 挿入図)。速度はA p o 2 L / T R A I L ()の非存在下で観察された速度に正規化した。その速度は、ブレインキュベーション工程からリガンドが除かれるが、アッセイのT f インキュベーション段階の間()、0分)ではリガンドが存在する場合に観察される速度と同等であった。(c) B J A B細胞をD M S Oピヒクル又はz V A D-f m kに30分間予めさらし、その後架橋したA p o 2 L / T R A I Lにて4時間処理し、氷上で冷やし、647 T fエンドサイトーシス速度について(a)及び(b)のように分析した。速度はD M S O処理試料(± S E M)に正規化した。

【図4】D R 5エンドサイトーシスの特徴づけを示す。(a, b) 表面に^{6 4 7 5 C 7} m A bが結合したC o l o 2 0 5細胞を、10 μg / m lの三量体のA p o 2 L / T R A I L ()又は架橋したA p o 2 L / T R A I L ()の存在下又は非存在下()にて氷上で30分インキュベートし、次いで37 °Cで示した時間インキュベートし、氷上で急速に冷ました。表面蛍光は酸の除去によって取り除き、D R 5取り込みをフローサイトメトリーによって定量化した。平均値をプロットした(bにおいては± S E M)。(c) H e l a - m細胞を5 μg / m lの^{6 4 7 5 C 7}及び5 μg / m lの架橋したA p o 2 L / T R A I Lとともに37 °Cでインキュベートし、次いで免疫蛍光顕微鏡法のために処理する(バー: 20 μM)。(d) C o l o 2 0 5細胞を、非標識m A b ^{5 C 7}にて37 °Cで30分間予め平衡化して表面及び再循環D R 5プールを結合させた。インキュベーションは10 μg / m lのA p o 2 L / T R A I Lの有無にかかわらず続け、その後細胞を氷上で急速に冷ました。細胞表面露出したm A b ^{5 C 7}はC Y 5 -抗マウスI g Gにて探索し、フローサイトメトリーによって定量化し、平均をプロットした(± S E M)。(e) C o l o 2 0 5細胞を10 μg / m lのA p o 2 L / T R A I Lにて37 °Cで前処理し、次いで急速に氷上で冷やし、エンドサイトーシスについてa(^{6 4 7 5 C 7})及び図3 b(^{6 4 7 T f})にあるようにアッセイした。エンドサイトーシス速度は、A p o 2 L / T R A I L前処置(± S E M)のない値に正規化した。細胞を(c)のように調整し、エンドサイトーシスを表面結合したC Y 5 -抗マウスF a bにてアッセイした場合に、類似の結果が観察された。(f-f) 表面にm A b ^{5 C 7}が結合したC o l o 2 0 5細胞を、A p o 2 L / T R A I Lとともに氷上でインキュベートし、37 °Cに5分間移し、固定した。超薄凍結切片を、ウサギ抗マウスI g G抗体及びプロテインAゴールド(10 nm)にて標識した。代表的な高電子密度クラスリンコートを示す。P、細胞膜。スケールバー、200 nm。

【図5】ダイナミンの失活がD R 5エンドサイトーシスを阻害することを示す。(a-d) D y n G 2 7 3 Dを形質導入したH e l a - M細胞を、ピューロマイシン選択して、ドキシサイクリンを誘導して、示した温度で20分間予めインキュベートし、そしてA l e x a - 4 8 8コンジュゲートT f (^{4 8 8 T f})の存在下にてさらに20分間インキュベートした。次いで、ダイナミン-1特異的抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡法のために細胞を処理

10

20

30

40

50

した。(e, f) 形質導入していない B J A B 細胞(親)又はクローン化した $D y n 1^{G 2 7 3 D}$ 形質導入 B J A B 細胞のうちドキシサイクリン誘導あり(+ d o x)又はドキシサイクリン誘導なし(d o x なし)のものを、 $4 8 8 T f$ 又は $6 4 7 5 C 7$ 取り込みについて、フローサイトメトリーによって 3 0 (白色バー)又は 3 8 (黒色バー)で 2 0 分間にわたってアッセイし、平均をプロットした($\pm S D$)。

【図 6】ダイナミン失活により DR が媒介するカスパーゼ活性化及びアポトーシスが增えることを示す。(a) $D y n^{G 2 7 3 D}$ 形質導入 B J A B 細胞のうちドキシサイクリン誘導あり又はドキシサイクリン誘導なしのものを、図 5 のように 3 8 で 2 0 分間インキュベートしてダイナミンを不活性化し、その後架橋した A p o 2 L / T R A I L の有無の下で更に 4 時間インキュベートし、示したタンパク質のプロセッシングについてイムノプロットによって分析した。(b) $D y n^{G 2 7 3 D}$ 形質導入 B J A B 細胞のうちドキシサイクリン誘導あり又はドキシサイクリン誘導なしのものを、3 0 又は 3 8 で 2 0 分間インキュベートして、その後架橋した A p o 2 L / T R A I L の有無の下で更に 2 時間インキュベートし、カスパーゼ-3 / 7 活性についてアッセイした。(c) $D y n^{G 2 7 3 D}$ 形質導入 B J A B 細胞のうちドキシサイクリン誘導あり又はドキシサイクリン誘導なしのものを、3 8 で 2 0 分間予めインキュベートして、その後架橋した A p o 2 L / T R A I L 又は DR 5 - 選択 A p o 2 L / T R A I L 変異体(D 5 - s e l)の有無の下で更に 4 時間インキュベートし、DNA 断片化をアッセイした($\pm S E M$)。

【図 7】癌細胞株のクラスリン-経路構成成分のプロセッシングを示す。(a) 示した細胞株を A p o 2 L / T R A I L にて処理し、A P 2 又は C H C の切断をイムノプロットによって分析した。(b) B J A B 細胞を架橋した A p o 2 L / T R A I L 又は F a s L にて処理して、A P 2 又は C H C のプロセッシングをイムノプロットによって分析した。(c) B J A B 細胞を架橋した A p o 2 L / T R A I L にて処理し、ダイナミンのプロセッシングをイムノプロットによって測定した。

【図 8】A P 2 及び C H C の切断のためのカスパーゼの必要性を示す。(a) B J A B 細胞を、z V A D - f m k (2 0 μM 、3 0 分)の有無の下で予めインキュベートし、架橋した A p o 2 L / T R A I L (1 $\mu g / m L$)にて示したように 2 4 時間処理した。カスパーゼ-8、カスパーゼ-9、カスパーゼ-3 及び A P 2 のプロセッシングについて細胞をイムノプロットによって分析した。(b) 以下の J u r k a t T 細胞株: A 3 (w t)、I 9 . 2 (カスパーゼ-8 欠失)及び E 1 (F A D D 欠失)を、示した時間間、架橋した A p o 2 L / T R A I L 又は F a s L にて処理し、図 1 のようにクラスリンが媒介するエンドサイトーシス経路の構成成分のプロセッシングについて分析した。(c) H T 1 0 8 0 線維肉腫細胞に、カスパーゼ-3 特異的な s i R N A (C 3)又はコントロール s i R N A を形質移入して、示した時間の間、A p o 2 L / T R A I L にて処理して、A P 2 又は C H C の切断について、又はカスパーゼ-3 の s i R N A 枯渇についてイムノプロットによって分析した。

【図 9】A P 2 切断部位の決定。(a) 切断した A P 2 の C 末端断片を、A p o 2 L / T R A I L で刺激した B J A B 細胞から免疫沈降して、トリプシンにて消化して質量分析によって分析してその同一性を検査するか、又はゲル電気泳動及びウェスタン転移によって単離して N 末端配列決定を行った。タンデム型質量分析によって同定されたトリプシンペプチドを、A P 2 の C 末端配列と整列配置する。N 末端配列決定により、切断部位が D X X D カスパーゼ認識モチーフ(下線部)であることが同定された。(b) 切断部位を A P 2 の「ヒンジ」領域にマッピングした。これは機能的に異なる「e a r」と「t r u n k」ドメインを連結する。

【図 10】温度感受性が高い $D y n 1^{G 2 7 3 D}$ とドミナントネガティブな $D y n 1^{K 4 4 A}$ 変異体は、H e L a - M 細胞における T f 及び DR 5 のエンドサイトーシスを阻害する。(a, b) 図 6 のレトロウイルスで形質導入した H e L a - M 細胞集団由来の 2 つのクローン化細胞株である t s 3 と t s 1 のうちドキシサイクリン誘導あり(+ d o x)又はドキシサイクリン誘導なし(d o x なし)のものを、 $4 8 8 T f$ (A) 又は $6 4 7 5 C 7$ (B) 取り込みについて、実験の手順の項目に記載のように、フローサイトメトリーによって 3 0 (

10

20

30

40

50

白色バー)又は38 (黒色バー)で20分間にわたってアッセイし、平均をプロットした(±SD)。(c) Dyn^{K44A}を形質導入したHeLa-M細胞及び形質導入していないHeLa-M細胞(親)のうちドキシサイクリン誘導あり又はドキシサイクリン誘導なしのものを、正規化していない図5dの記載のように、⁴⁸⁸Tf又は⁶⁴⁷5C7エンドサイトーシス速度(±SD)についてアッセイした。

【図11】エンドサイトーシスの非存在下でのDISC集合化を示す。(a) BJA B細胞を⁶⁴⁷Tfにて氷上で平衡化し、示した取り込み間隔の間、37 °又は氷上でインキュベートし、そして、蛍光をフローサイトメトリーによって定量化した。(b) BJA B細胞を架橋したApo2L/TRAIL(1 µg/mL)にて、示した時間の間、37 °又は氷上で処理し、DISCを材料と方法の項目に記載のように、リガンドで免疫沈降した。DISC関連のFADDとカスパーゼ-8をイムノプロットによって視覚化した。(c, d) Dyn^{G273D}を形質導入したBJA B細胞を、バッファ(Doxなし)又はドキシサイクリン(Dox)にて処理し、38 °に20分間移し、ダイナミンを不活性化した。細胞を架橋したApo2L/TRAILにて示した時間の間処理し、DISCを免疫沈降させた。DISC関連のFADDとカスパーゼ-8をイムノプロット(c)によって視覚化するが、又は既に記載されているように(Sharp等 J Biol Chem 280, 19401-409, 2005)、DISC関連のカスパーゼ-8活性を測定した。

【図12】DNA傷害剤がクラスリン-経路構成成分の切断を誘導することを示す。BJA B細胞又はColo205細胞をピンラスチン又はアドリアマイシンにて、示した時間の間処理し、図1にあるようにイムノプロットによって分析した。

【発明を実施するための形態】

【0017】

(発明の詳細な説明)

本明細書において記述されるか又は参照される技術及び手順は一般的に十分に理解されており、当業者によって従来の方法論を用いて共通して実施される。必要に応じて、市販のキット及び試薬の使用を伴う手順は通常、特に明記しない限り製造業者が定めたプロトコール及び/又はパラメーターに従って実行される。特に定めない限り、本明細書において使用するすべての技術用語、表記法及び他の科学的な用語は、本発明が関係する当業者によって共通に理解される意味を有することを意図する。場合によって、共通して理解されている意味を有する用語は、明確にするため及び/又はすぐに参照できるように本明細書において定め、そして、本明細書にこのような定義を含めることは、通常、当分野において一般的に理解されていることと実質的な相違を表すためであると必ずしも解釈されるものではない。さらに、特定の略記号が本明細書中で用いられる。⁴⁸⁸-:コンジュゲートしたAlexa-488、⁶⁴⁷-:コンジュゲートしたAlexa-647、Apo2L/TRAIL: Apo2Lリガンド/TNF関連のアポトーシス誘導リガンド、BSA: ウシ血清アルブミン、DR: デスレセプター、PBS: リン酸緩衝食塩水、Tf: トランスフェリン、そして、zVAD-fmk: N-ベンジルオキシカルボニル-VaI-Ala-Asp-フルオロメチルケトン。

【0018】

I. 定義

「アポトーシス」及び「アポトーシス活性」という用語は広義に使用され、典型的には、細胞質の凝集、原形質膜の微絨毛の喪失、核の分節化、染色体DNAの分解又はミトコンドリア機能の喪失を含む一又は複数の特徴的な細胞変化を伴う、哺乳動物における細胞死の規則的又はコントロールされた形態を称す。この活性は、当該技術で公知の多くの技術、例えば細胞生死判別アッセイ、FACS分析又はDNA電気泳動法、そしてより詳細にはアネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡大、細胞断片化、及び/又は膜ベジクル(アポトーシス体と呼ばれる)の生成により、決定し測定することができる。

「Apo-2リガンド」、「Apo-2L」又は「TRAIL」という用語は、Pitti等、J. Biol. Chem., 271: 12687-12690 (1996)の図1Aに示されたアミノ酸配列のアミノ酸

残基 95 - 281、114 - 281、残基 91 - 281、残基 92 - 281、残基 41 - 281、残基 15 - 281、又は残基 1 - 281、並びに上記配列の生物活性な断片、欠失、挿入又は置換変異体を含むポリペプチドを称する。一実施態様において、ポリペプチド配列は、残基 114 - 281を含む。場合によっては、ポリペプチド配列は、少なくとも残基 91 - 281又は残基 92 - 281を有する。他の好適な実施態様では、生物活性な断片又は変異体は、上記配列の何れかと少なくとも約 80%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 90%のアミノ酸配列同一性、そして更により好ましくは少なくとも約 95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有する。本定義は、(上掲のPitti等に示す配列の番号を用いて)位置 203、218又は269で少なくとも1のアミノ酸がアラニン残基によって置換される、Pitti等, J. Biol. Chem., 271:12687-12690(1996)の図1Aのアミノ酸91-281を含んでなるApo-2リガンドの置換変異体を包含する。本定義は、例えばヒト組織型又は他の供給源のようなApo-2リガンド供給源から単離されるか、組み換え又は合成法により調製されたApo-2リガンドを包含する。Apo-2リガンドという用語はまた上掲の国際公開第97/25428号及び上掲の国際公開第97/01633号に記載されたポリペプチドを称する。

10

【0019】

「Apo-2リガンドレセプター」は、当該分野において「DR4」及び「DR5」と称されるレセプターを含む。Pan等は、「DR4」と称される他のTNFレセプターファミリーのメンバーを開示している [Pan等, Science, 276:111-113(1997); また1998年7月30日公開の国際公開第98/32856号を参照]。DR4レセプターは、細胞自殺機構に関わることが可能な細胞質死ドメインを含むことが報告されている。Pan等は、DR4がApo-2L/TRAILとして知られるリガンドのレセプターであると考えられると開示している。Sheridan等, Science, 277:818-821(1997)及びPan等, Science, 277:815-818(1997)においては、Apo-2L/TRAILの他のレセプターが記載されている。[1998年1月19日発行の国際公開第98/51793号; 1998年9月24日発行の国際公開第98/41629号を参照のこと]。このレセプターはDR5とも呼ばれる。(該レセプターはまた、Apo-2; TRAIL-R、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2又はKILLERとも呼ばれる; Sreaton等, Curr. Biol., 7:693-696(1997); Walczak等, EMBO J., 16:5386-5387(1997); Wu等, Nature Genetics, 17:141-143(1997); 1998年8月20日に公開の国際公開第98/35986号; 1998年10月14日に公開の欧州特許第870,827号; 1998年10月22日に公開の国際公開第98/46643号; 1999年1月21日に公開の国際公開第99/02653号; 1999年2月25日に公開の国際公開第99/09165号; 1999年3月11日に公開の国際公開第99/11791号]。DR4のように、DR5は細胞質死ドメインを含み、アポトーシスのシグナル伝達が可能であると報告されている。前記されるように、Apo-2Lに対する他のレセプターはDCR1、DCR2、及びOPGを含む [Sheridan等、上掲; Marsters等、上掲; 及びSimonet等、上掲を参照のこと]。ここで使用される場合の「Apo-2Lレセプター」という用語は天然配列レセプター及びレセプター変異体を含む。これらの用語は、ヒトを含む様々な動物で発現されるApo-2Lレセプターを含む。Apo-2Lレセプターは、様々なヒト組織系統で自然に発生して内因的に発現されても、あるいは組換え又は合成方法によって発現されてもよい。「天然配列Apo-2Lレセプター」は、自然から誘導したApo-2Lレセプターと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。よって、天然配列Apo-2Lレセプターは、任意の動物から自然に発生したApo-2Lレセプターのアミノ酸配列を有することができる。このような天然配列Apo-2Lレセプターは、自然から単離することができ、あるいは組換え又は合成法によって作成することもできる。「天然配列Apo-2Lレセプター」なる用語は、特にレセプターの自然に発生する切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列を含む可溶化形態など)、自然に発生する変異形態(例えば選択的にスプライシングされた形態)及び自然に発生する対立遺伝子変異体を含む。レセプター変異体は天然配列Apo-2Lレセプターの断片又は欠失突然変異を含みうる。

20

30

40

【0020】

50

「F a s」なる用語は、NCBI 寄託番号 A A A 6 3 1 7 4 に示され、Itoh等, Cell 6 6 (2), 233-243 (1991)において記述されるアミノ酸残基 1 - 3 1 9 を含むポリペプチド、並びに、上記配列の生物学的に活性な断片、欠失、挿入又は置換の変異体を指すために本明細書中で用いられる。このポリペプチドは、ある文献では「A p o - 1」及び「C D 9 5」と称される。「F a s リガンド」又は「F a s L」なる用語は、NCBI 寄託番号 N P _ 0 0 0 6 3 0 に示され、Suda等, Cell 75 (6), 1169-1178 (1993)において記述されるアミノ酸残基 1 - 2 8 1 を含むポリペプチド、並びに、上記配列の生物学的に活性な断片、欠失、挿入又は置換の変異体を指すために本明細書中で用いられる。F a s L の F a s への結合、又はアゴニスト抗体との F a s の架橋は細胞死となるアポトーシスを誘導する(例としてNagata, S. Ann. Rev. Genet. 33:29, 1999; 及びLabroille等, Cytometry 39(3): 195-202 (2000)を参照)。F a s L の F a s への結合は F A D D アダプター(デスドメインを有する F a s 関連タンパク質)を介してカスパーゼのカスケードを活性化する。これによって、様々な細胞性基質の切断と D N A 断片化が起こる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

ここで同定されるポリペプチド配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。場合によっては、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、ソースコードは米国著作権庁, Washington D.C., 20559 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社, South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。しかしながら、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschul等, Nucleic Acids Res. 25 : 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードできる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全てはデフォルト値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15/5、マルチパス e - 値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

【 0 0 2 2 】

ここで「抗体」なる用語は、広い意味で用いられ、特に無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成した多特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及び抗体断片の範囲にわたる。ここで用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、典型的に異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。これらの特異性に加えて、モノクローナル抗体はハイブリドーマ培養物によって合成され、他の免疫グロブリンと混合しない点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体の実質的に均一な集団から得た抗体の特性を表し、抗体を何か特

定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明で用いられるモノクローナル抗体は、最初にKohler等、Nature 256, 495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって、作ることができる(例えば、米国特許第4816567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等、Nature 352:624-628(1991)、及びMarks等、J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。目的の抗原に「結合する」抗体とは、抗体が抗原発現細胞を標的とした治療薬又は診断剤として有用となるように十分な親和性及び/又は結合活性を有して抗原に結合することができるものである。

【0023】

「デスレセプター抗体」は、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリーであり、アポトーシスをシグナル伝達することができるデスドメインを含有するレセプターに対する抗体(一ないし複数)を一般的に意味するものであり、このような抗体にはDR5抗体、DR4抗体及びFas抗体が含まれる。

「DR5レセプター抗体」、「DR5抗体」又は「抗DR5抗体」とは、広義で、DR5レセプターの少なくとも一形態に結合する抗体を意味する。場合によっては、DR5抗体は異種性配列又は分子に融合又は結合する。好ましくは、異種性配列は抗体がより高次の複合体又はオリゴマー複合体を形成させる又は形成を補助する。場合によっては、DR5抗体はDR5レセプターに結合するが、任意の付加的なApo-2Lレセプター(例えばDR4、DcR1又はDcR2)と結合又は交差反応をしない。場合によっては、抗体はDR5シグナル伝達活性のアゴニストである(例として米国特許公開20040005314及び20060188498を参照)。

【0024】

「DR4レセプター抗体」、「DR4抗体」又は「抗DR4抗体」とは、広義で、DR4レセプター又はその細胞外ドメインの少なくとも一形態に結合する抗体を意味する。場合によっては、DR4抗体は異種性配列又は分子に融合又は結合する。好ましくは、異種性配列は抗体がより高次の複合体又はオリゴマー複合体を形成させる又は形成を補助する。場合によっては、DR4抗体はDR4レセプターに結合するが、任意の付加的なApo-2Lレセプター(例えばDR5、DcR1又はDcR2)と結合又は交差反応をしない。場合によっては、抗体はDR4シグナル伝達活性のアゴニストである(例として米国特許公開20040005314及び20060188498を参照)。

「Fas抗体」又は「抗Fas抗体」は、広義に用いられ、少なくとも一つのFasの形態又はその細胞外ドメインに結合する抗体を指す。場合によって、Fas抗体は異種性の配列又は分子に融合するか又は結合する。好ましくは、異種性の配列により、抗体が高次構造又はオリゴマー複合体を形成するが可能になるか又は促される。場合によって、Fas抗体はFasレセプターを結合するが、任意の更なるFasLレセプターと結合しないか又は交差反応しない。場合によって、抗体はFasシグナル伝達活性のアゴニストである(例としてNagata, S. Ann. Rev. Genet. 33:29, 1999; 及びLabroille等, Cytometry 39(3): 195-202 (2000)を参照)。

【0025】

ここで、モノクローナル抗体は特に、「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を含み、それは、重鎖又は軽鎖の一部が特定の種から誘導された又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖の残りの部分は他の種から誘導された又は他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である抗体、並びにそれらが所望の生物学的活性を示す限りにおいてそれらの抗体の断片である(米国特許第4,816,567号; Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984))。

【0026】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、あるいはそれらの断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体

10

20

30

40

50

の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。大部分において、ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練し、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる。更なる詳細については、Jones等, *Nature*, 321: 522-525(1986); Reichmann等, *Nature*, 332: 323-329(1988); 及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596(1992)参照。ヒト化抗体はPRIMATIZED™を含み、抗体の抗原結合領域が、関心ある抗原でマカク属サルに免疫性を与えることで生成される抗体から得られる。

10

20

30

40

50

【0027】

抗体は、典型的には、特定の抗原に結合特異性を示すタンパク質又はポリペプチドである。天然抗体は、通常はヘテロ四量体糖タンパク質であり、2つの同一な軽(L)鎖と2つの同一な重(H)鎖とからなる。典型的には、各軽鎖は共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合しているが、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変化する。また各重鎖及び軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一端に多数の定常ドメインに続く可変ドメイン(V_H)を持つ。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が軽鎖と重鎖の可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている[Chothia等, *J. Mol. Biol.*, 186: 651-663 (1985); Novotny及びHaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4592-4596 (1985)]。任意の脊椎動物種からの抗体の軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型に割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てられる。免疫グロブリンには5つの大きなクラス: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、そのうちの幾つかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3、及びIgG-4; IgA-1及びIgA-2に更に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、各々、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミューと呼ばれる。

【0028】

「抗体断片」は無傷の抗体の一部、一般的には無傷の抗体の抗原結合性又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片、ダイアボディ(dibodies)、一本鎖抗体分子、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

ここで「可変」という用語は、抗体間で配列が異なり各特定の抗体のその抗原に対する結合性及び特異性の使用される可変ドメインの或る一部を記述するのに用いられる。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインを通して常に均一に分布しているわけではない。典型的には、軽鎖と重鎖の両方の可変ドメインにおいて相補性決定領域(CDR)又は高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存される部分はフレームワーク(FR)と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々4つのFR領域を含み、これは大きくβ-シート配置をとり、3つのCDRに結合してループ状結合を形成するが、β-シート構造の一部を形成する場合もある。各鎖のCDRは、FR領域の直近に保持され、他の鎖からのCDRとともに抗体の抗原結合部位の形成に寄与する[Kabat, E.A.等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Na

tional Institutes of Health, Bethesda, MD (1987) 参照]。定常ドメインは抗体の抗原への結合には直接含まれないが、抗体依存的細胞毒性における抗体の寄与といった様々なエフェクター機能を示す。

ここで、モノクローナル抗体は、起源の種又は免疫グロブリンクラス又はサブクラスの命名にかかわらず、キメラ、定常ドメインを有する抗-Ap o-2 Lレセプター抗体の変(高頻度可変を含む)ドメインをスプライシングすることによって生産されるハイブリッド及び組換え抗体(例えば「ヒト化」抗体)、又は重鎖を有する軽鎖、又は他の種からの鎖を有するある種からの鎖、又は異種タンパク質との融合体、並びにそれが所望の生物学的活性を有する限り抗体断片(例えばF a b、F(a b')₂及びF v)を特に含む。例えば、米国特許第4,816,567号、及びMage等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97(Marcel Dekker, Inc.:ニューヨーク, 1987)を参照。

10

【0029】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に一致するアミノ酸配列を有するもの、及び/又はここにおいて開示されたヒト抗体を製造するいずれかの技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体この定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。ヒト抗体は、この分野で知られている種々の技術を使用することによって生産することが可能である。一実施態様では、ヒト抗体は、ヒト抗体を発現するファージライブラリーから選択される(Vaughan等, Nature Biotechnology 14:309-314 (1996); Sheetsら. PNAS, (USA)95:6157-6162(1998); Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991))。また、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。この試みでは、遺伝子再構成、構築及び抗体レパートリーを含む、あらゆる点でヒトに見られるものと密接に類似しているヒト抗体の産生が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号; 第5,545,806号; 第5,569,825号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,661,016号、及び次の科学文献: Marks等, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368:856-859 (1994); Morrison等, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)。あるいは、ヒト抗体は、標的抗原に対する抗体を生産するヒトBリンパ球の固定化によって調製されてもよい(そのようなBリンパ球は、個々から回収されてもよいし、インビトロで免疫化してもよい)。例えば、Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77(1985)及びBoerner等, J. Immunol., 147(1):86-95(1991); 及び米国特許第5,750,373号を参照のこと。

20

30

【0030】

「Fc領域」という用語は、無傷の抗体のパイン消化で生じ得る免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。Fc領域は、天然配列Fc領域又は変異体Fc領域である。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかも知れないが、ヒトIgG重鎖のFc領域は、通常、Cys 226の位置のアミノ酸残基、又は約位置Pro 230からFc領域のカルボキシル末端まで伸展すると定義される(ここにおいては、Kabatら, 上掲の番号方式を使用)。免疫グロブリンのFc領域は、一般的に、二つの定常ドメイン、CH2ドメイン及びCH3ドメインを含み、場合によってはCH4ドメインを含む。

40

ここで「Fc領域鎖」とは、Fc領域の二つのポリペプチド鎖のうちの一つを意味する。

【0031】

ヒトIgGFc領域の「CH2ドメイン」(「C₂」ドメインとも呼ばれる)は通常アミノ酸残基で約位置231からアミノ酸残基で約位置340まで伸展する。CH2ドメインは、他のドメインと密接には対をなさないという点で独特である。むしろ、2つのN-結合分岐炭水化物鎖が未変性の天然IgG分子の2つのCH2ドメインの間に介在されて

50

いる。炭水化物はドメイン-ドメイン対形成に対する代替物を提供し、C H 2ドメインを安定化させるのに役立つと推測されてきた。Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)。ここにおけるC H 2ドメインは、天然配列C H 2ドメイン又は変異体C H 2ドメインであってもよい。

「C H 3ドメイン」は、残基C末端からFc領域のC H 2ドメインへの伸長を含む(すなわち、I g Gのアミノ酸残基で約位置341からアミノ酸残基で約位置447)。ここにおけるC H 3領域は、天然配列C H 3ドメイン又は変異体C H 3ドメインでもよい(例えば、その一つの鎖の導入された「突出部(protoberance)」を伴うC H 3ドメイン、及びその他の鎖の相当する導入された「空洞(キャビティ)」；米国特許第5,821,333号を参照のこと)。

【0032】

「ヒンジ領域」は、ヒトI g G 1の約G l u 2 1 6、又は約C y s 2 2 6から約P r o 2 3 0の伸展として一般に定義されている(Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985))。他のI g Gアイソタイプのヒンジ領域は、重鎖間S-S結合を形成する最初と最後のシステイン残基を同じ位置に配することにより、I g G 1と整列させられうる。ここにおけるヒンジ領域は、天然配列ヒンジ領域又は変異体ヒンジ領域であってもよい。変異体ヒンジ領域の二つのポリペプチド鎖は、一般的に、ポリペプチド鎖当たり少なくとも一つのシステイン残基を保持し、変異体ヒンジ領域の二つのポリペプチド鎖は、二つの鎖の間でジスフィルド結合を形成できる。ここにおける好ましいヒンジ領域は、天然配列ヒトヒンジ領域で、例えば天然配列ヒトI g G 1ヒンジ領域である。

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の少なくとも一つの「エフェクター機能」を有する。模範的な「エフェクター機能」は、C 1 q結合を含む；補体依存性細胞障害性(CDC)；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞媒介障害活性(ADCC)；ファゴサイトーシス；細胞表面レセプターの下方向制御(例えば、B細胞レセプター；BCR)等。このようなエフェクター機能は、一般的に、結合ドメインと結合するFc領域を必要とし(例えば、抗体可変ドメイン)、そのような抗体エフェクター機能を評価するための分野で知られた種々のアッセイを使用して評価できる。

【0033】

「天然配列Fc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。「変異体Fc領域」は、少なくとも一つのアミノ酸修飾によって天然配列Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異体Fc領域は、天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域と比較し、少なくとも一つのアミノ酸置換を有する、例えば、天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域において、約1から約10アミノ酸置換、及び好ましくは約1から約5アミノ酸置換である。ここにおける変異体Fc領域は、好ましくは、天然配列Fc領域及び/又は親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%配列同一性、最も好ましくは少なくとも約90%配列同一性、さらに好ましくは少なくとも約95%配列同一性を有する。

「Fcレセプター」又は「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記述するために使用される。好適なFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、I g G抗体(ガンマレセプター)に結合し、Fc R I、Fc R II及びFc R IIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。Fc R IIレセプターは、Fc R IIA(「活性化レセプター」)及びFc R IIB(「阻害レセプター」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFc R IIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITIM)を有する。阻害レセプターFc R IIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234(1997)に概説されている)。FcRsはRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991)；Capel等, Immunomethods 4:25-34(1994)；及びde Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41(1995)において概説されている。将来同定され

10

20

30

40

50

るものも含む他のFcRsが、ここにおける「FcR」なる用語によって包含される。この用語は胎児への母性IgGsの移動の原因である新生児レセプター、FcRnもまた含む(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol. 24:249 (1994))。

【0034】

「親和性成熟」抗体とは、変化を有しない親抗体と比較し、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、抗体の一又は複数のCDRにおける一又は複数の変化を伴うものである。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当該分野において知られる手順によって生産される。Marksら. Bio/Technology, 10:779-783(1992)は、VH及びVLドメイン混合による親和性成熟について記載している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発は、Barbas等, Proc Nat Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier等, Gene, 169:147-155(1995); Yelton等, J. Immunol., 155:1994-2004(1995); Jackson等, J. Immunol., 154(7):3310-9(1995); 及びHawkins等, J. Mol. Biol., 226:889-896(1992)に記載されている。

本明細書中で用いられる「標識」なる用語は、抗体などの試薬に直接的又は間接的にカップリングないしは融合され、カップリングないしは融合した試薬の検出を容易にする化合物又は組成物を指す。標識自体が検出可能なもの(例えば放射性標識、蛍光性標識)であってもよく、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物ないしは組成物の化学的变化を触媒するものであってもよい。

【0035】

「アンタゴニスト」なる用語は、最も広い意味で用いられ、インビトロ、インサイツ又はインビボでのApo2L/TRAIL、DR4ないしDR5、FasL又はFasの一又は複数の生物学的活性を一部ないしは完全に遮断する、阻害する又は中和する任意の分子を包含する。Apo2L/TRAIL、DR4又はDR5のこのような生物学的な活性の例には、Apo2L/TRAILのDR4又はDR5への結合、アポトーシスの誘導、並びに文献に報告される更なるものが含まれる。FasL及びFasのこのような生物学的な活性の例には、FasLのFasへの結合、アポトーシスの誘導、並びに文献に報告される更なるものが含まれる。アンタゴニストは直接的又は間接的な方法で機能しうる。例えば、アンタゴニストは、DR4又はDR5に直接結合して、インビトロ、インサイツ又はインビボでのApo2L/TRAILの一又は複数の生物学的活性を一部ないしは完全に遮断する、阻害する又は中和しうる。また、アンタゴニストは、例えば他のエフェクター分子を遮断するか又は阻害して、インビトロ、インサイツ又はインビボでのApo2L/TRAIL、DR4又はDR5の一又は複数の生物学的活性を一部ないしは完全に遮断する、阻害する又は中和するように間接的に機能しうる。アンタゴニスト分子は、該分子がApo2L/TRAIL、DR4ないしDR5、Fas又はFasLの生物学的活性を一部ないしは完全に遮断する、阻害する又は中和することが可能である「二重」アンタゴニスト活性を含みうる。

【0036】

「アゴニスト」なる用語は広義で用いられ、Apo2L/TRAIL、DR4ないしDR5、FasL又はFasのインビトロ、インサイツないしインビボでの一以上の生物学的活性を部分的又は完全に亢進、刺激又は活性化する任意の分子を含む。このような生物学的活性の例には、Apo2L/TRAILの、DR4又はDR5への結合、アポトーシス並びに更に文献に報告されているものが含まれる。このような生物学的活性の例には、FasLのFasへの結合、アポトーシスの誘導、並びに更に文献に報告されるものが含まれる。アゴニストは直接的ないし間接的形式で機能しうる。例えば、アゴニストは、レセプター活性化又はシグナル伝達を起こすDR4ないしDR5への直接的結合の結果としてのインビトロ、インサイツないしインビボでのDR4ないしDR5の一以上の生物学的活性を部分的又は完全に亢進、刺激又は活性化するために機能するかもしれない。また、アゴニストは、例えば、DR4又はDR5の活性化ないしシグナル伝達を引き起こす他のエフェクター分子を刺激する結果としてのDR4ないしDR5のインビトロ、インサイツ

ないしインビボでの一以上の生物学的活性を部分的又は完全に亢進、刺激又は活性化するために間接的に機能するかもしれない。アゴニストは、DR4ないしDR5の活性化ないし活性を亢進又は増強するように間接的に機能するエンハンサー分子として働きうることが考えられる。例えば、アゴニストは哺乳動物の内因性のApo-2Lの活性を亢進しう。例えば、これはDR4ないしDR5をプレ複合体化することによって、ないし、DR4ないしDR5レセプターとのそれぞれのリガンドの複合体を安定化することによって達成することができる(Apo-2LとDR4ないしDR5との天然複合体型を安定化するなど)。

【0037】

「単離された」とは、ここで開示された種々のタンパク質を記述するために使用するときには、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたタンパク質を意味する。その自然環境の汚染成分とは、タンパク質の診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、タンパク質は、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N末端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように十分なほど精製される。タンパク質の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、単離されたタンパク質には、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたタンパク質は少なくとも1つの精製工程により調製される。

ここでの目的における「生物学的に活性な」又は「生物学的活性」とは、(a)インビボ及び/又はエキソビボで、少なくとも一種類の哺乳類癌細胞又はウイルス感染した細胞においてアポトーシスを誘発又は刺激する能力を有する；(b)抗体を産生する能力がある、すなわち免疫原である；又は(c)天然又は天然に生じるApo-2リガンドポリペプチドの活性を保持していることを意味する。

【0038】

ここで使用される場合の「成長阻害剤」とは、インビトロ及び/又はインビボにおいて細胞の成長を阻害する化合物又は組成物のことを称する。従って、成長阻害剤には、S期の細胞の割合を著しく減少させるようなものでありうる。成長阻害剤の例には、細胞周期の進行をブロックする薬剤(S期以外の時点において)、例えばG1停止及びM期停止を誘発する薬剤が含まれる。典型的なM期ブロッカーには、ビンカス(ビンクリスチン及びビンブラスチン)、タキソール(登録商標)、トポIIインヒビター、例えばドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びプレオマイシンが含まれる。また、G1を停止させるこれらの薬剤、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-CがS期停止に溢流する。更なる情報は、Murakamiらにより「細胞周期の調節、オンコジーン、及び抗新生物薬」と題された、癌の分子的基礎、Mendelsohn及びIsrael編、第1章(WB Saunders; Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

【0039】

この出願で使用される「プロドラッグ」という用語は、親薬物に比べて、癌細胞に対する細胞毒性が低く、より活性な親形態に、酵素的に活性化又は転換され得る製薬的に活性な物質の先駆体又は誘導体形態を称する。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, pp.375-382, 615th Meeting Belfast(1986)及びStella等, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, Directed Drug Delivery, Borchardt等,(編), pp.247-267, Humana Press(1985)を参照。限定するものではないが、本発明のプロドラッグには、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸変性プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は任意

10

20

30

40

50

に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグが含まれる。限定するものではないが、本発明で使用されるプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞障害剤の例には、下記の化学療法剤が含まれる。

ここで用いられる「細胞障害剤」という用語は、細胞の機能を阻害し又は妨害し、及び/又は細胞の破壊を引き起こす物質のことをいう。この用語は放射活性アイソトープ（例えば $A t^{211}$ 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、及び Lu の放射性アイソトープ）、化学療法剤、及び断片及び/又はその変異体を含む細菌性、真菌性、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素又は小分子毒素等の毒素を含むことが意図されている。

【0040】

「化学療法剤」は、癌のような症状の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXANTM)のようなアルキル化剤；プスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類、；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(al tretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramid e)及びトリメチロロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(acetogenins) (特にプラタシン(bullatacin)及びプラタシノン(bullatacinone))；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)を含む)；プリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン(adzelesin)、カルゼレシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin) 合成類似体を含む)；クリプトフィシン(cryptophycin) (特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン(dolastatin)；デュカロマイシン(duocarmycin) (合成類似体、KW-2189及びCBI-TMIを含む)；エレトロピン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancrat istatin)；サルコデイチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistatin)；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チオロホスファミド(cholophospham ide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネステリン(phenesteri ne)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustin e)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediynes) 抗生物質等の抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン₁^I及びカリケアマイシン^I₁、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)を参照のこと；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン(dynemicin)；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン(enediynes) 抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomyci ns)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カリミノマイシン(car minomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトロピシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(モルフォリノ-ドキシソルピシン、シアノモルフォリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン及びデオキシドキシソルピシンを含む)、エシルピシン、エソルピシン(esorubicin)、イダルピシン、マセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシン(mitomycins)、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogal amycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiro mycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)；メトトレキセート及び5-フルオロ

10

20

30

40

50

ウラシル(5-FU)のような抗-代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)、5-FUのようなピリミジン類似体；カルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルピシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P SK (登録商標)；ラゾキサラン(razoxane)；リゾキシシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニユアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(trichothecenes)(特に、T-2トキシシン、ベラキュリンA(verracurin A)、ロリデンA(roridin A)及びアングイデン(anguidine))；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピボプロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばパクリタキセル(タキソール(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、及びドキセタキセル(タキソテア(登録商標)、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲンシタビン(gemcitabine)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ピンブラスチン；プラチナ；エトボシド(VP-16)；イフォスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン(navelbine)；ノバントロン(novantrone)；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセローダ(xeloda)；イバンドロナート(ibandronate)；CPT-11；トポイソメラーゼインヒビターRFS2000；ジフルオロメチロールニチン(DMFO)；レチノイン酸；カペシタビン(capecitabine)；並びに上述したものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。また、この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働く抗ホルモン剤、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン(raloxifene)、4(5)-イミダゾール類を阻害するアロマターゼ、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナプリストーン(onapristone)、及びトレミフェン(Fareston)を含む抗エストロゲン；及び抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；並びに上記のものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0041】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。そのようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシシン；インスリ

ン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、副甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体形成ホルモン（LH）のような糖タンパク質ホルモン；肝臓成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- 及び- ；マレリアン(mullerian)阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF- のような神経成長因子；血小板成長因子；TGF- 及びTGF- のようなトランスフォーミング成長因子(TGF)；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイエチン(EPO)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン、例えばインターフェロン、 、 コロニー刺激因子(CSF)、例えばマクロファージ-CSF(M-CSF)；顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)及び顆粒球-CSF(G-CSF)；IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12等のインターロイキン(IL)；TNF- 又はTNF- のような腫瘍壊死因子；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合は、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

10

【0042】

「処理」又は「治療」とは、双方とも、治癒的処理、及び予防的又は防護的処置を称する。

「治療的有効量」という用語は、哺乳類の疾病や疾患の治療のために有効な薬剤の量に相当する。癌の場合は、治療的有効量の薬剤により、癌細胞の数を減少させ；腫瘍の大きさを小さくし；癌細胞の周辺器官への浸潤を阻害(すなわち、ある程度に遅く、好ましくは止める)し；腫瘍の転移を阻害(すなわち、ある程度に遅く、好ましくは止める)し；腫瘍の成長をある程度阻害し；及び/又は疾患に関連する一又は複数の症状をある程度和らげることが可能である。ある程度、薬剤は、成長を妨げ及び/又は現存の癌細胞を殺すことが可能で、細胞分裂停止性及び/又は細胞障害性である。癌治療に対しては、インビボにおける効力は、腫瘍の負荷又は体積の評価、例えば病状の進行時間(TTP)の評価、及び/又は応答速度(RR)の測定により測定される。

20

【0043】

処置又は治療を目的とした「哺乳動物」とは、ヒト、家畜及び農場飼育動物、及び動物園、スポーツ、又は愛玩動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を称する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

30

「被検体」又は「患者」は、ヒトを含む、治療が望まれる任意の単一の被検体を意味する。また、臨床試験に用いられる疾患の臨床的な特徴を全く示さない任意の被検体、又は疫学的な研究に用いられる被検体、又はコントロールとして用いられる被検体も被検体に含まれる。

【0044】

「癌」、「癌性」又は「悪性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を称するか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、大腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、精巣癌、食道癌、胃腸癌、腎癌、膵癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、膠腫、肝癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌、子宮内膜カルチノーマ、唾液腺カルチノーマ、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌及び様々な形態の頭頸部癌が含まれる。

40

本出願中で用いられる「バイオマーカー」なる用語は一般的に、遺伝子、タンパク質ないしタンパク質断片、糖質構造又は糖脂質を含む分子を指し、哺乳動物組織又は細胞中ないしは組織又は細胞上での該分子の発現は標準的な方法(本明細書中で開示される方法)によって検出されうるものであり、哺乳動物細胞又は組織のApoptosis/Trailないしはデスレセプター抗体などのアポトーシスを誘導する薬剤への感受性を予測するものであ

50

る。本発明で考慮されるこのようなバイオマーカーには、限定するものではないが、本明細書中に開示される(例として図1及び2を参照)AP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)のタンパク質断片が含まれる。

【0045】

「組織又は細胞試料」は、被検体又は患者の組織から採取された同種の細胞の集まりを意味する。組織又は細胞試料の供給源は、新鮮な、凍結された及び/又は保存されていた臓器や組織試料又は生検又は吸引による固形組織;血液又は血液成分;大脳脊髄液、羊水、腹水又は間質液などの体液;被検体の妊娠期又は発生の任意の時期の細胞であってもよい。また、組織試料は原発性又は培養した細胞又は細胞株であってもよい。場合によ

10

っては、組織又は細胞試料は原発性腫瘍又は転移性腫瘍から得られる。組織試料は、防腐剤、抗凝血物質、バッファ、固定液、栄養分、抗生物質など天然の組織にはもともと混在していない化合物を含んでもよい。

本明細書中の組織試料の「切片」とは、組織試料の一部又は一片、例えば組織試料から切り出した組織又は細胞の一薄片を意味する。組織試料の複数の切片は採取され、本発明の分析に供されることが理解される。

「相関」又は「相関する」は、任意の方法で、第一の分析又はプロトコルの成績及び/又は結果を、第二の分析又はプロトコルの成績及び/又は結果と比較することを意味する。例えば、第二のプロトコルを行う際に第一の分析又はプロトコルの結果を用いてもよいし、第一の分析又はプロトコルの結果を用いて、第二の分析又はプロトコルを行うかどうかを決定してもよい。本明細書に開示される様々な実施態様に関し、アポトーシスの間に生成されるAP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)の断片を同定するもの等の分析アッセイの結果を用いて、APO2L/TRAIL、FasL、デスレセプター抗体などのアポトーシスを誘導する薬剤を使用する特定の治療計画を実行するかどうかを決定してもよい。

20

【0046】

II. 方法と材料

A. 方法

通常、本発明の方法と材料は、例えば、アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合する抗体に哺乳類細胞を接触させること、このとき該抗体がAP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)のタンパク質断片に結合する、アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合する抗体の量を決定すること、そして、該哺乳類細胞において結合した抗体の量を、アポトーシスのない哺乳類細胞においてタンパク質断片に結合する抗体の量と比較すること、このときこの試験した細胞の量がアポトーシスのない細胞の量よりも大きい場合に、アポトーシスが検出されることによって、哺乳類細胞のアポトーシスを検出及び/又はモニターするために用いられる。本明細書において提供される実施例にて図示するように、アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合する抗体に細胞を接触させることには、細胞の細胞構成成分と接触させる方法が含まれる。一般的に、細胞は、細胞の構成成分の抗体の接触を促すために、例えば抽出(例えば、本明細書中で言及されるウエスタンブロット手順など)によって前処理される。

30

40

本明細書において開示される方法及びアッセイが、多くの場面で使われてもよい。例えば、中には、APO2L/TRAIL又はデスレセプター抗体の細胞死誘導作用に耐性がある、罹患したヒトの細胞型の集団(例えば癌細胞のある集団)がある。したがって、開示された方法及びアッセイは、患者を治療するために適切又は有効な療法を評価する際に有用なデータ及び情報を得るための、簡便でかつ効率的な、費用対効果が良いと思われる手段を提供しうると思われる。例えば、癌又は免疫関連の症状を診断された患者は、組織又は細胞試料を得るために生検が実施され、その試料を本発明の様々なインビトロアッセイによって調べられ、APO2/TRAIL又はデスレセプター抗体などの治療薬に対して患者の細胞が感受性があるか否かを決定してもよい。

50

【0047】

試料調整のために、哺乳動物(一般的にヒト患者)からの組織又は細胞試料が使われてもよい。試料の例には、限定するものではないが、癌細胞、例として大腸、胸部、前立腺、卵巣、肺、胃、膵臓、リンパ腫、及び白血病の癌細胞が含まれる。場合によって、試料には、非小細胞肺癌細胞、膵臓癌細胞又は非ホジキンリンパ腫癌細胞が含まれる。試料は、外科的切除、吸引又は生検を含むがこれらに限らない当分野で公知の様々な手順によって得られてよい。

本明細書中に開示される発明は多くの実施態様を有する。例えば、本発明のある実施態様は、細胞アポトーシス及び、哺乳動物などの被検体、特にヒト患者の関連する症状を観察するために用いてもよい。ある例示的な実施態様では、本発明の方法は、A p o 2 / T R A I L 又は F a s L などの一又は複数のアポトーシスを誘導する薬剤に対する哺乳類細胞の感受性を調べるために、例えば該薬剤の投与を含む療法の有効性を評価するために、哺乳類細胞のアポトーシスの存在(又は不在)を観察するために用いられる。また、本発明の方法は、哺乳類細胞のアポトーシス活性を低減する又は亢進する際の候補化合物の活性の程度を決定するために用いられてもよい。この化合物は、例えば A p o 2 L / T R A I L (配列番号：7)、F a s L (配列番号：9)、F a s アゴニスト抗体、D R 4 アゴニスト抗体又は D R 5 アゴニスト抗体などのアポトーシスを誘導する薬剤の活性を調整するものがある。また、本発明の実施態様は、化合物がアポトーシス生成タンパク質断片の形成を阻害するか又は刺激することを決定することによって、アポトーシス性の細胞死を阻害するか又は刺激する化合物を同定するために有用である。

10

20

【0048】

本発明の代表的な実施態様は、アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合する抗体に哺乳類細胞を接触させること、このとき該抗体が A P 2 - (配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、A P 1 / 2 (配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片に結合する、アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合する抗体の量を決定すること、そして、該哺乳類細胞において結合した抗体の量を、アポトーシスのない哺乳類細胞においてタンパク質断片に結合する抗体の量と比較すること、このときこの哺乳類細胞における量がアポトーシスのない細胞の量よりも大きい場合に、アポトーシスが検出されることによって、哺乳類細胞のアポトーシスを検出する方法である。多種多様な哺乳類細胞がこのような方法で用いられてもよい。本発明のある実施態様では、細胞はヒトの大腸、結腸直腸、肺、胸部、前立腺、膀胱、腎臓、卵巣、脳、メラノーマ、白血病又は骨髄腫の癌細胞である。

30

本発明の他の実施態様は、ヒト癌細胞においてアポトーシスを誘導する治療薬に応答するか又は応答する可能性があるヒト癌細胞を同定するための方法である。本発明の実施態様には、ヒト癌細胞を治療薬にさらす工程、A P 2 - (配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、A P 1 / 2 (配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片の存在について治療薬にさらされたヒト癌細胞を調べる工程、ヒト癌細胞におけるタンパク質断片の量を、リガンドにさらされていないコントロールのヒト癌細胞におけるタンパク質断片の量と比較する工程が含まれる。この実施態様では、治療薬にさらされたヒト癌細胞に存在するタンパク質断片の量が治療薬にさらされていないコントロールのヒト癌細胞のタンパク質断片の量より大きい場合に、アポトーシスが観察され、ヒト癌細胞のアポトーシスの観察によってヒト癌細胞を該治療薬に応答する可能性があるか、又は応答するものと識別される。本発明のある実施態様では、ヒト癌細胞は、癌と診断された個体から得られ、1か月未満の間、典型的には2週間未満、又は1週間未満の間、インビトロ培養において成長させたものである。代替的な実施態様では、ヒト癌細胞は、インビトロ培養物由来の不死化細胞株である。

40

【0049】

本発明の代表的な実施態様では、アポトーシスの存在について観察される哺乳類細胞、例えばアポトーシスを誘導する薬剤にさらされた哺乳類細胞において結合した抗体の量は、アポトーシスのない哺乳類細胞、例えばアポトーシスを誘導する薬剤にさらされてい

50

いコントロール細胞におけるタンパク質断片に結合する抗体の量と比較される。当業者は、このようなコントロール細胞は、試験している変動要因(例えばアポトーシスを誘導する薬剤への曝露)を除いてはアポトーシスの存在について観察されている実験的哺乳類細胞と類似しているとして選択されたものであることを理解する。本発明の一実施態様では、コントロール細胞は、同じ供与源からの細胞(例えば原発性又は転移性の腫瘍の部位からの生検試料)であり、及び/又は、コントロールの哺乳類細胞がデスレセプター4(配列番号:5)、デスレセプター5(配列番号:6)又はFas(配列番号:8)のシグナル伝達を引き起こす薬剤にさらされていないことを除いてはアポトーシスの存在について観察される実験的哺乳類細胞と同じ系統のものである。本発明のある実施態様では、前記のコントロール細胞におけるAP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)の断片化のパターンはすでに特徴付けられており、アポトーシスの存在について観察される哺乳類細胞におけるAP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)の断片化のパターンと比較されるコントロール細胞の断片化の既に特徴付けがされたパターンである。このような実施態様は、例えば細胞のコントロール、例えば細胞にアポトーシスが起こらないと特徴付けたコントロールの不要かつ重複した特徴付けを除くために用いられる。

10

【0050】

本発明の実施態様は、プログラムされた細胞死を引き起こすことが知られている多種多様な因子のいずれかによって誘導されるアポトーシスを経る細胞を調べるために用いられてもよい。これらの実施態様は、一般的に、細胞表面上のレセプター、例えばデスレセプター4(配列番号:5)、デスレセプター5(配列番号:6)又はFas(配列番号:8)によって引き起こされる細胞のアポトーシスを観察する。本発明のある実施態様では、Apoptosis L/TRAIL(配列番号:7)、FasL(配列番号:9)、Fasアゴニスト抗体、DR4アゴニスト抗体又はDR5アゴニスト抗体などのポリペプチドに細胞を接触させ、アポトーシスの検出のための記述される方法(アポトーシスがいないことの検出を含む)は、例えばこのような薬剤の投与を含む療法の有効性に関する情報を得るために用いられる。

20

また、本発明の方法は、新規のアポトーシスを誘導する薬剤及び/又はアポトーシスを誘導する薬剤のモジュレータを同定するために用いてもよい。例示的な実施態様には、哺乳類細胞を一又は複数の試験薬剤にさらす工程と、アポトーシスを観察するために本発明の方法を使用する工程を含み得、哺乳類細胞のアポトーシスの検出によって該一又は複数の試験薬剤が哺乳類細胞のアポトーシスのインデューサーとして同定される。また、本発明の方法は、細胞性分析、例えば遺伝子のプロファイリングの補完的な方法と組み合わせられてもよい。本発明のそのような実施態様には、アポトーシスが観察される哺乳類細胞において少なくとも一つのmRNAの発現を調べる工程が含まれる。

30

【0051】

本発明の方法には、アポトーシスを経ている細胞中の断片として本明細書中で示される細胞のタンパク質の観察が含まれる。これらのタンパク質断片、例えばAP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)の断片は、当分野で公知の多種多様なアッセイのいずれかによって観察されうる。一般的に、このような断片は、イムノプロットティング、酵素連結された免疫吸着剤アッセイ又は免疫組織化学を使用しているのを見られる。さらに、本発明の方法は、本明細書において同定される多数のタンパク質断片、例えばおよそ64kDa又は33kDaの分子量を有するAP2のタンパク質断片を調べるために用いてもよい。本発明のある実施態様では、抗体が結合したタンパク質断片は、その断片、例えばAP2-アミノ酸配列である配列番号:1のDVFD又は配列番号:1のGPA Aに特異的なアミノ酸配列によって同定される。

40

【0052】

上記したように、本発明の実施態様には、癌と診断されたヒト患者が一又は複数のアポトーシスを誘導する薬剤、例えばAPO-2/TRAILに応答する可能性があるか否か

50

を決定する方法を包含する。これらの方法は、癌と診断された患者がアポトーシスを誘導する薬剤などの薬剤(一又は複数)を有する治療に应答する可能性があるか否かの決定を促す当分野で公知の多様な他の方法、例えば癌(例えば原発性腫瘍又は転移)と診断されたヒト患者において少なくとも一つの遺伝子(例えばmRNA又はこのmRNAによってコードされるタンパク質の存在又はレベル)の発現を調べる方法とともに用いられるように応用してもよい。このような遺伝子のプロファイリング方法は、当分野で公知であり、米国特許第20060015952号の実施例に記載されている。

本発明の方法のそのような実施態様には、患者から入手した癌細胞における、AP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)のタンパク質断片を含む、アポトーシス中に生成される断片を観察する工程を、複数の遺伝子の遺伝子発現プロファイルを得る工程と組み合わせて、それを、同系統の非癌性細胞及び/又は一又は複数のアポトーシスを誘導する薬剤による治療に应答する(ないしは選択的に应答しない)ことがわかっている動物モデルから入手した癌細胞の遺伝子発現プロファイルと比較することが含まれる。一般的に、前記のような方法には、例えば患者から入手した癌細胞が、一又は複数のアポトーシスを誘導する薬剤による治療の利益を得ることがわかっている患者(又は癌の動物モデル)から入手した癌細胞の遺伝子発現プロファイルに類似する遺伝子発現プロファイルを有する場合に、該患者を、一又は複数のアポトーシスを誘導する薬剤による治療の利益を得る可能性があると同定する工程がさらに含まれる。

【0053】

本明細書中では、「同様の」とは、遺伝子発現特性を測定するために用いるアッセイ又は技術による量又は他の測定可能な発現パラメータにおいて約80%から100%の同一性、更に以下に詳細に記載するようにより好ましくは約90%から100%、より好ましくは約95%から100%の同一性の範囲内である発現特性を示すことによって、当該発現特性がある程度又はかなりにているないしは互いに重なることを意味する。患者及び動物モデルからの癌細胞の遺伝子発現特性は、通常、比較を容易にするために、同じ技術又はアッセイによって得る。

遺伝子発現プロファイリングの方法は公知技術であり、一般的にポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション分析又はポリヌクレオチドの配列決定に基づく。試料中のmRNA発現の定量化のために公知技術の最も一般的に用いられる方法には、ノーザンブロット法及びインサイツハイブリッド形成(Parker及びBarnes, *Methods in Molecular Biology*, 106:247-283 (1999)); RNアーゼ保護アッセイ(Hod, *Biotechniques*, 13:852-854 (1992)); 及び逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)(Weis等, *Trends in Genetics*, 8:263-264 (1992))が含まれる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二体鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はタンパク質二本鎖を含む特異的な複合化を認識するために抗体を用いてもよい。配列決定ベースの遺伝子発現分析法の典型的な方法には、遺伝子発現の段階的分析法(SAGE)、及び大規模並列シグネチャ配列決定による遺伝子発現分析(MPSS)が含まれる。これらの方法又は公知技術の他の方法の何れかを用いて、患者(例えばヒト患者及びTGF- α アンタゴニストに应答する癌のモデルとして役立つマウスモデルなどの動物)から得られた腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイリングを決定することができる。ヒト患者の場合、腫瘍細胞の供与源は、新鮮な、凍結された又は、固定してパラフィン包埋された組織サンプルでもよく、その試料はmRNAが抽出され、遺伝子発現分析を受けることができるものである。

【0054】

あるいはまた、プロテオミクス技術は、また、癌細胞中のヒトと参照(例えばマウス)のタンパク質の発現プロファイルを比較するために用いることができる。プロテオミクスプロファイルは、生物学的試料(例えば癌組織)中の複数のタンパク質の発現パターンの表れである。例えば、発現プロファイルは、質量範囲として表されるが、タンパク質の任意の物理化学的又は生化学特性に基づく他の表現でもよい。したがって、発現プロファイルは、2-D PAGEなどの二次元のゲル電気泳動法によって測定されるタンパク質の電気泳動的

性質の違いに基づいてもよく、例えば二次元電気泳動ゲルの複数の点として表されるものでもよい。プロテオミクス技術は公知技術であり、例として以下のテキストに詳述されている：Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics (Principles and Practice), M.R. Wilkins等, 編集, Springer Verlag, 1007; 2-D Proteome Analysis Protocols, Andrew L Link, editor, Humana Press, 1999; Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods (Principles and Practice), T. Rabilloud editor, Springer Verlag, 2000; Proteome Research: Mass Spectrometry (Principles and Practice), P. James editor, Springer Verlag, 2001; Introduction to Proteomics, D. C. Liebler editor, Humana Press, 2002; Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis, R. Westermeier等, 編集, John Wiley & Sons, 2002。

10

【0055】

試料中の、AP2- (配列番号: 1)、クラスリン重鎖(配列番号: 2)、AP1/2 (配列番号: 3)又はダイナミン(配列番号: 4)のタンパク質断片を含む、アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片は当分野で周知の多くの手段によって分析されてもよい。例としてAusubel等 eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Unit 15 (Immunoblotting)には、前記のようなタンパク質断片を評価するための代表的なプロトコールが示されている。本発明のある実施態様において使われうるイムノアッセイには、限定するものではないが、ウエスタンブロット、免疫沈降、スロットないしドットブロットアッセイ、免疫染色、RIA、シンチレーション近接アッセイ、フルオレセイン又はローダミンなどの蛍光物質の抗体コンジュゲート又は抗原コンジュゲートを用いた蛍光イムノアッセイ、オクタロニー倍拡散分析、ELISA、細胞ベースのELISA、フィルター-結合ELISA、阻害ELISA、及びアビジン-ビオチン又はストレプトアビジン-ビオチン検出システムを用いたイムノアッセイが含まれる。

20

本発明のいくつかの実施態様では、イムノアッセイに使用する抗体はインタクトなタンパク質とタンパク質断片とに結合し、タンパク質断片は例えばウエスタンブロット手順においてはその特徴的に小さいサイズによって認識される。例えば、本発明の実施態様において使用する抗体は、本明細書中で開示される例示的な抗体のいずれか一つ、又は本明細書中で開示される例示的な抗体のいずれか一つが結合したエピトープに結合する抗体であってもよい。本発明の他の実施態様では、インタクトなタンパク質でなく、アポトーシスの生成されたタンパク質断片を特異的に認識する抗体を用いてもよい。このような抗体は、前記断片を免疫原として用いて、インタクトなタンパク質でなくアポトーシスの生成されたタンパク質断片を結合する生成された抗体を同定する、標準的な免疫化方法によって調製されてもよい。

30

【0056】

本発明の代表的な実施態様では、分析は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(「PAGE」)によって分離された溶解細胞から得られるタンパク質について実行される。タンパク質を抗体と接触させ、好ましくはイムノアッセイによって分析を行い、抗体に結合するタンパク質断片の存在を決定する。アポトーシスがないことがわかっている同様な溶解細胞(例えば同じ供与源及び/又は系統からの細胞)のタンパク質からなるコントロールと比較を行ってもよい。上記のいずれかのイムノアッセイを用いて生きている被検体からの組織試料を分析してもよい。この分析のために可能な生体試料には、標準的な方法によって入手することができる血液細胞ないしは生検細胞又は組織試料が含まれる。上記の生体試料におけるアポトーシスの生成されたペプチド断片のレベルは、AP2- (配列番号: 1)、クラスリン重鎖(配列番号: 2)、AP1/2 (配列番号: 3)又はダイナミン(配列番号: 4)のタンパク質断片に特異的に結合する抗体を用いる上記いずれかのイムノアッセイにおいて決定されうる。分析される被検体の生体試料において決定されるアポトーシスの生成されたペプチド断片のレベルは、罹患していない患者細胞、又は公知の基準において見られるレベルと比較される。例示的な基準は、例えば、アポトーシスを経ていない細胞において(例えば、アポトーシスを誘導する薬剤にさらされていないコン

40

50

トロール細胞において)典型的に観察される一又は複数のタンパク質断片の存在及び/又は濃度であってもよい。このような実施態様は、例えば、異常なアポトーシスに特徴を示す症状を診断するために用いられてもよい。本発明のある実施態様では、アポトーシスのレベルは細胞内で観察され、例えばコントロール試料と比較して、少なくとも10、20、30、40又は50パーセント、100又は150パーセントのアポトーシス性の生成されたペプチド断片の増加となっている場合に、病的状態であることが示される。本発明の他の実施態様では、アポトーシスのレベルは細胞内で観察され、例えばコントロール試料と比較して、アポトーシス性の生成されたペプチド断片の増加が少なくとも10倍、100倍又は1000倍となっている場合に、病的状態であることが示される。

本発明の実施態様は、AP2- (配列番号: 1)、クラスリン重鎖(配列番号: 2)、AP1/2 (配列番号: 3)又はダイナミン(配列番号: 4)のタンパク質断片の検出及び定量化に有用な免疫学的アッセイに使用するために応用してもよい。このようなアッセイには、必要に応じて、タンパク質断片を認識して結合することが可能な一又は複数の抗体が含まれる。これらのアッセイは、様々な様式のウエスタンブロットアッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、酵素結合免疫蛍光アッセイ(ELIFA)などを含むがこれらに限らず、当分野で周知の様々な免疫学的アッセイ様式の範囲内で実施される。

【0057】

例示的な方法では、試料を、抗体-バイオマーカー複合体が形成するために十分な条件下で、AP2- (配列番号: 1)、クラスリン重鎖(配列番号: 2)、AP1/2 (配列番号: 3)又はダイナミン(配列番号: 4)のタンパク質断片などのバイオマーカーに特異的な抗体と接触させ、次いで該複合体を検出してもよい。タンパク質断片バイオマーカーの存在を検出することは多くの方法、例えば血漿又は血清を含む多種多様な組織及び試料を検定するためのウエスタンブロッティング(免疫沈降工程を含む場合と含まない場合)及びELISA手順によって行ってもよい。このようなアッセイ様式を用いた広範囲にわたるイムノアッセイ技術は利用可能である。米国特許第4016043号、同第4424279号及び同第4018653号参照。これらには、単一の部位及び2-部位の両方、あるいは非競合型の「サンドイッチ」アッセイ、並びに従来の競合的結合アッセイが含まれる。また、これらのアッセイには、標的バイオマーカーに対する標識抗体の直接結合が含まれる。

サンドイッチアッセイは最も有用なものの一つで、一般的に用いられるアッセイである。サンドイッチアッセイ技術には多くのバリエーションあり、そのすべては本発明により包含されることを目的とする。簡潔には、代表的な最近のアッセイでは、非標識抗体を固体基板上に固定して、試験する試料を結合した分子に接触させる。抗体-抗原複合体が形成されるくらいの適当な期間インキュベートした後、検出可能なシグナルを産生できるレポーター分子で標識した、抗原特異的な第二抗体を添加して、更なる抗体-抗原-標識抗体の複合体が形成されるために十分な時間インキュベートする。反応しなかった材料を洗い流し、レポーター分子により産生されるシグナルを観察することによって抗原の存在を決定する。結果は、可視的なシグナルを単純に観察したものであれば質的なものであり、バイオマーカーを既知量含有するコントロール試料と比較したものであれば量的なものである。

【0058】

前記のアッセイへのバリエーションには、試料及び標識抗体の両方を結合した抗体に同時に添加する同時アッセイなどがある。これらの技術は当分野の技術者には公知であり、多少のバリエーションが加えられることは容易に明らかであろう。代表的な近年のサンドイッチアッセイでは、バイオマーカーに対して特異性を有する第一抗体は固形表面に共有結合するか受動的に結合する。固形表面は一般的にガラス又はポリマーであり、最も一般的に用いられるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリプロピレンである。固形支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートの皿、又はイムノアッセイを行うために適切な他の任意の表面の形態でもあって

10

20

30

40

50

もよい。結合方法は従来技術において周知であり、一般に、架橋性共有結合物理的吸着から成り、ポリマー-抗体複合体は試験試料の調整において洗浄される。次いで、試験される試料の分割量を固相複合体に添加し、抗体中に存在する任意のサブユニットが結合するために十分な時間(例えば、より便利であるならば2~40分又は前夜)と適切な条件(例えば室温から40、例えば25から32の間)下でインキュベートする。インキュベーションの後、抗体サブユニット固相を洗浄して、乾燥させ、一部のバイオマーカーに特異的な二次抗体とともにインキュベートする。二次抗体は、分子マーカーへの二次抗体の結合を表すために用いられるレポーター分子に結合させる。

【0059】

別法では、試料中の標的バイオマーカーを固定して、その後レポーター分子にて標識しているか又は標識していない特異的抗体に固定された標的を曝すことを伴う。標的の量及びレポーター分子シグナルの強度に応じて、結合した標的は、抗体で直接標識することによって、検出可能でありうる。あるいは、一次抗体に特異的な二次標識抗体を標的-一次抗体複合体に曝して、標的-一次抗体-二次抗体の三位複合体を形成させる。複合体は、レポーター分子により発されるシグナルにより検出される。本明細書中で用いられる「レポーター分子」は、その化学的性質によって、抗原と結合した抗体を検出するための分析して同定可能となるシグナルを提供する分子を意味する。この種のアッセイにおいて、最も一般的に用いられるレポーター分子は、酵素、蛍光体又は分子を含有する放射性核種(すなわち放射性同位体)及び化学発光分子である。

酵素イムノアッセイの場合、一般にグルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸塩によって、酵素を二次抗体にコンジュゲートさせる。しかしながら、容易に認識されるように、技術者に容易に利用可能である多種多様な異なるコンジュゲート技術が存在する。一般的に用いられる酵素には、西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ-中でもガラクトシダーゼ及びアルカリホスファターゼなどがある。特定の酵素と共に用いられる基質は、一般的に、対応する酵素による加水分解の際に生じる検出可能な色の変化で選択する。適切な酵素の例として、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼなどがある。また、上記の色素生産性基質よりも蛍光性産物を産生する蛍光性基質を用いることができる。多くの場合、酵素標識抗体を一次抗体-分子マーカー複合体に加えて、結合させ、次いで過剰な試薬を洗い流す。次いで、適当な基質を含有する溶液を抗体-抗原-抗体の複合体に加える。基質は二次抗体と結合した酵素と反応して、通常は分光測定法による量的なものである定性的な可視化シグナルを生じ、試料中に存在するバイオマーカーの量を表す。あるいは、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光性化合物を、抗体の結合能を変化させることなく抗体に化学的に結合させてもよい。特定の波長の光を照射することにより活性化されると、蛍光色素標識抗体はその光エネルギーを吸収し、それによりその分子において励起状態が誘発され、続いて光学顕微鏡を用いて目視で検出可能な特徴的な色で光が放射される。EIAでは、蛍光標識抗体は、一次抗体-分子マーカー複合体に結合できる。結合していない試薬を洗い落としした後に、残りの三位複合体を適当な波長の光に曝すと、対象の分子マーカーの存在を示す蛍光発光が観察される。免疫蛍光法及びEIA技術は何れも、当分野で非常に確立されたものである。しかしながら、放射性同位体、化学発光性分子又は生物発光性分子などの他のレポーター分子も用いられてもよい。

【0060】

上記のように、本発明の実施態様は、完全なタンパク質(例えば完全長タンパク質の切断によって生成されるエピトープに結合する抗体)でなく、AP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)のタンパク質断片に結合する抗体を用いてもよい。このような実施態様を用いて、免疫組織化学染色技術によって細胞のタンパク質断片を調べることができる。このような技術では、組織試料は従来の方法によって固定(すなわち保存)されてもよい(例として、“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology,” 3rd edition (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced

10

20

30

40

50

Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.を参照)。当分野の技術者は、組織学的染色ないしは他の分析に供する組織の目的に応じて固定液を選択することは理解するところであろう。また、当分野の技術者は、組織試料の大きさ及び用いる固定液に応じて固定の長さを決定することも理解するであろう。実施例では、中性緩衝ホルマリン、ブアン固定液又はパラホルムアルデヒドを用いて組織試料を固定してもよい。組織調製の後に、組織切片に対して当分野で公知の多様な免疫組織化学技術のいずれか一つを行ってもよい。

【0061】

B. 材料

多種多様なアポトーシスを誘導する薬剤のいずれか一、並びにアポトーシス性の細胞死の間に生成される本明細書中で開示されるタンパク質断片を結合する抗体を含む本発明の実施において、様々な材料が用いられてもよい。例示的なアポトーシスを誘導する薬剤には、A p o 2 L、抗 D R 4 ないしは D R 5 アゴニスト抗体、F a s L 及び抗 F a s アゴニスト抗体が含まれる。本方法において使用することができる A p o - 2 L には、上掲の P i t t i 等、上掲の国際公開第97/25428号、及び上掲の国際公開第97/0163号に記載された A p o - 2 L ポリペプチド (T R A I L と称されるポリペプチド) を含む。全長ポリペプチド並びに細胞外ドメイン (E C D) 配列を含んでなる A p o - 2 L の可溶型のような、A p o - 2 L の様々な形態を使用することができると考えられる。そのような可溶型 E C D 配列の例には、P i t t i 等, J. Biol. Chem., 271 : 12687-12690 (1996) の図 1 A に示された A p o - 2 L 配列のアミノ酸 1 1 4 - 2 8 1、9 5 - 2 8 1、9 1 - 2 8 1 又は 9 2 - 2 8 1 を含んでなるポリペプチドが含まれる。アミノ酸 9 2 - 2 8 1 を含んでなるポリペプチドは A p o - 2 L の天然に切断した型であると現在は信じられている。本出願人は、C H O 細胞においてヒト A p o - 2 L を発現させ、9 2 - 2 8 1 ポリペプチドが A p o - 2 L の発現型であることを見出した。国際公開第97/25428号に記載された共有結合的に修飾された型のような A p o - 2 L の修飾型が含まれる。特に、ポリエチレングリコールのような非タンパク性ポリマーに結合した A p o - 2 L が本方法に使用されるものに含まれる。A p o - 2 L ポリペプチドは国際公開第97/25428号に記載された方法の何れかにより調製することができる。

【0062】

該方法で使用されうるアポトーシス活性を有する A p o - 2 リガンドの変異体は、例えばアラニンスキャン技術により同定されたものを含む。特に置換変異体は、位置 2 0 3、2 1 8 又は 2 6 9 でアミノ酸の少なくとも 1 種がアラニン残基で置換された、P i t t i 等, J. Biol. Chem., 271 : 12687-12690 (1996) の図 1 A のアミノ酸 9 1 - 2 8 1 を含んでなる。場合によっては、A p o - 2 リガンド変異体は 1 又は複数のこれら 3 つの異なった部位の置換を含みうる。

A p o - 2 L 及び / 又は F a s L のアポトーシス活性を模倣する分子がまた現在開示した方法において使用しうると考えられる。そのような分子の例には、A p o - 2 L に少なくとも匹敵するか、もしくは同様な方法でアポトーシスを誘発しうるアゴニスト抗体が含まれる。特に、これらのアゴニスト抗体は A p o - 2 L のレセプターの一又は複数に対する抗体を含む。好ましくは、アゴニスト抗体は、D R 4 又は D R 5 のような細胞質死ドメインを含む A p o - 2 L レセプターに対する。さらに好ましくは、アゴニスト抗体は、そのようなレセプターに結合し、その結合は例えば F A C S 分析又は E L I S A を用いて決定することができる。D R 5 (又は A p o - 2) と呼ばれるレセプターに対するアゴニスト抗体は、以下に記載するような融合技術を使用して調製されている。D R 5 又は A p o - 2 レセプターアゴニスト抗体の一つは 3 F 1 1 . 3 9 . 7 と呼ばれ、1998年1月13日に寄託番号 H B - 1 2 4 5 6 として A T C C に寄託されている。A p o - 2 L レセプター抗体のアゴニスト活性は、アポトーシス活性の様々な検査方法を使用して測定することができ、さらに場合によっては、このような抗体のアポトーシス活性は、F c 免疫グロブリン又は補体を用いて、抗体、単独又は架橋結合した形態でアッセイすることにより決定される。

【 0 0 6 3 】

さらに、DR 4 と呼ばれる他の A p o - 2 L レセプターに対するアゴニスト抗体もまた、調製される。例として DR 4 アゴニスト抗体は、4 H 6 . 1 7 . 8 と称され、1998年1月13日に寄託番号 H B - 1 2 4 5 5 として A T C C に寄託されている。A p o - 2 L レセプター抗体のアゴニスト活性は、アポトーシス活性の様々な検査方法を使用して測定することができ、さらに場合によっては、このような抗体のアポトーシス活性は、アポトーシス活性を検査するための様々なアッセイを用いて測定してもよいし、場合によっては、Fc 免疫グロブリン又は補体を用いて、抗体、単独又は架橋結合した形態をアッセイすることにより測定することもできる。

本発明において考察されているアゴニスト抗体には、1つの A p o - 2 L レセプター又は1以上の A p o - 2 L レセプターと結合する抗体が含まれる。1以上の A p o - 2 L レセプターを結合する抗体は、例えば以下の実施例にあるように E L I S A 又は F A C S により決定される、2又はそれ以上のそれぞれ異なる抗原と「交差反応し」、それぞれの異なる抗原と結合することができる抗体として特徴づけられうる。場合によっては、2又はそれ以上の異なる抗原と「特異的に交差反応する」抗体は、第1の抗原と結合するもので、さらに第2の異なる抗原と結合し、約 1 0 μ g / m L の抗体濃度で第2の抗原に対する抗体の結合能力は、捕獲 E L I S A (以下の実施例にあるような)で決定されるように第1の抗原の結合能力の約 5 0 % ~ 約 1 0 0 % (好ましくは約 7 5 % ~ 約 1 0 0 %)である。例えば抗体は、DR 5 (「第1抗原」と特異的に結合しても、更に DR 4 のような他の A p o - 2 レセプター(「第2抗原」と特異的に交差反応してもよく、ここで、約 1 0 μ g / m L の抗体の DR 4 との結合の範囲は、ここでの捕獲 E L I S A において DR 5 に対する抗体の結合能力の約 5 0 % ~ 約 1 0 0 % である。様々な A p o - 2 L レセプターとの抗体の交差反応は、国際特許出願番号 PCT/US99/13197 の更なる詳細に記載される。

以下に記載されるように、本発明の実施態様の実施において有用な抗体の例示的な形態としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロ抱合体抗体が含まれる。

【 0 0 6 4 】

1 . ポリクローナル抗体

本発明の実施において用いられる抗体はポリクローナル抗体を含んでよい。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。ポリクローナル抗体は、哺乳動物において、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射することにより哺乳動物に注射する。免疫化剤は、例えば完全又は部分的な A P 2 - (配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、A P 1 / 2 (配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)ポリペプチドを含みうる。免疫化剤を、免疫化される哺乳動物で免疫原性が知られたタンパク質に抱合させるのが有用である。そのような免疫原性タンパク質の例は、限定するものではないが、キーホール・リンペット(keyhole limpet)ヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及び M P L - T D M アジュバント(モノホスホリル脂質 A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。哺乳動物から採血し、血清を検定して抗体価を求める。望まれるならば、抗体価が増加又は平坦化するまで哺乳動物に追加免疫を施す。

【 0 0 6 5 】

2 . モノクローナル抗体

本発明の実施において用いられる抗体は、あるいは、モノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256 : 495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を産生するかあるいは産生可能なリンパ球

を誘発する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親の細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

10

【0066】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これはカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。そのようなマウス骨髄腫細胞株の例は、P3X63AgU.1である。ヒトモノクローナル抗体産生ためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も記載されている [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

20

ハイブリドーマ細胞が培養される培地は、次いで所望の免疫原に対するモノクローナル抗体の存在について検定することができる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)によるスクヤッチャード分析法によって測定することができる。

30

【0067】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程を経てサブクローニングし、標準的な方法で増殖させることができる [Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地又はRPMI-1640培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えばプロテインAセファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフニティークロマトグラフィー等の従来免疫グロブリン精製方法によって培地又は腹水液から分離又は精製される。

40

【0068】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明の実施において用いられるモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来手順によって(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができる。これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成しない骨髄腫細胞内にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNA

50

は、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [米国特許第4,816,567号 ; Morrison等, 上掲]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインの代わりに置換するか、本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置換し、キメラ性二価抗体を産生することができる。場合によって、本明細書中で開示される抗体のいずれか一などの抗体の少なくとも一可変ドメイン又は高頻度可変ドメインを含むキメラ抗体が構築されてもよい。

場合によって、本発明の抗体は、本明細書中で開示されるいずれかの抗体と同じエピトープ(一又は複数)に結合するであろう。これは本明細書において記載されるような様々なアッセイを実施することによって決定されてもよい。例えば、モノクローナル抗体が本明細書において特別に言及される抗体と同じ特異性を有するか否かを決定するために、アポトシスアッセイにおいてその活性を比較してもよい。

【 0 0 6 9 】

本発明の実施において用いられる抗体は、「架橋」抗体を含む。ここにおいて使用されている「架橋」という用語は、一(又は単)分子を形成するための、少なくとも二つのIgG分子が互いに結合することを称する。抗体は種々のリンカー分子を使用して架橋されてもよい。場合によっては、抗体は、抗IgG分子、補体、化学修飾又は分子工学を使用して架橋される。一度抗体が細胞表面膜へ結合すると、補体が抗体分子に対して比較的に高い親和性を有することは、当業者にとっては高く評価されることである。従って、細胞表面膜へ結合している二又はそれ以上の抗体を連結するための架橋分子として、補体を使用してもよいと考えられる。種々のマウスIgアイソタイプの中で、IgM、IgG2a及びIgG2bは、補体を固定することが知られている。

本発明の実施において用いられる抗体は、抗体の多価型と同様に、二量体抗体を任意に含むことができる。当業者は、当該分野で知られている技術及びここにおける抗Apo-2Lレセプター抗体を使用して、そのような二量体又は多価型を組み立てることができる。

本発明の実施において用いられる抗体は一価抗体を含み得る。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られてる。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意のポイントで切断される。あるいは、関連したシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

【 0 0 7 0 】

一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、その断片、特にFab断片の調製は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。例えば、消化はパパインの使用により行うことができる。パパイン消化の例は、1994年12月22日に公開された国際公開第94/29348号、及び米国特許第4,342,566号に記載されている。抗体のパパイン消化は、典型的には、Fab断片と呼ばれ、各々が単一の抗原結合部位を有する2つの同一の抗原結合断片と、残りのFc断片を生成する。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、抗原の架橋が尚も可能なF(ab')₂断片が得られる。

また、抗体の消化により生産されたFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第1定常ドメイン(CH₁)を含む。Fab'断片は、抗体のヒンジ領域から一又は複数のシステインを含む重鎖CH₁ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されているということで、Fab断片とは異なっている。Fab'-SHとは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。F(ab')₂抗体断片は、本来は、それらの間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生産された。抗体断片の他の化学的結合もまた知られている。

また、Iliades等, FEBS Letters, 409:437-441 (1997)に記載されているように、一本鎖Fv断片も産生されうる。このような一本鎖断片の種々のリンカーを用いた結合は、Ko

10

20

30

40

50

rtt等, Protein Engineering, 10: 423-433 (1997)に記載されている。

【0071】

上記に記載の抗体に加えて、キメラ又はハイブリッド抗体が、架橋剤を含む合成タンパク質化学における周知の方法を用いてインビトロで調製されうると考えられる。例えば、免疫毒素はジスルフィド交換反応を用いて、又はチオエーテル結合の形成により作成することができる。この目的に好適な薬剤の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミデートが含まれる。

本発明の実施において用いられる抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化型とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合性サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリン共通配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる [Jones等, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332: 323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)]。

【0072】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野で良く知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター(Winter)及び共同研究者の方法 [Jones等, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239: 1534-1536 (1988)] に従って、齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体である(米国特許第4,816,567号)。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

抗原性の軽減のためには、ヒト化抗体を作成するために使用するヒトの可変ドメイン、軽鎖及び重鎖両方の選択が非常に重要である。「ベストフィット法」に従うと、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。齧歯動物のものと最も近いヒトの配列を次にヒト化抗体のヒトフレームワーク(FR)として受け入れる [Sims等, J. Immunol., 151: 2296-2308 (1993); Chothia及びLesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)]。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを幾つかの異なるヒト化抗体に使用できる [Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-4289 (1992); Presta等, J. Immunol., 151: 2623-2632 (1993)]。

【0073】

さらに、抗体は、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよ

く知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは入手可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原と結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性を高めるといった、望ましい抗体特徴が得られるように、FR残基を共通及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、CDR残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている [1994年、3月3日に公開された国際公開第94/04679号を参照]。

【0074】

ヒトモノクローナル抗体は、ヒトBリンパ球を融合パートナーとして使用する、Kohler及びMilsteinによって最初に記載されたハイブリドーマ法を適応することによって作製することができる。関心ある抗体を生産するヒトBリンパ球は、例えば、インフォームド・コンセントを得た後に、ヒト個人から単離される。例えば、個人は、全身性紅斑性狼瘡(Schoenfeldら, J.Clin. Invest., 70:205(1982))、免疫媒介血小板新生紫斑病(ITP)(Nugentら, Blood, 70(1):16-22(1987))、又は癌のようなある疾患とともに生じる自己抗原に対する抗体を生産している。或いは、又は付加的に、リンパ球はインビトロで免疫化される。例えば、単離されたヒト末梢血リンパ球をlysotrophic agent(例えばL-ロイシン-O-メチルエステル、L-グルタミン酸ジメチルエステル又はL-ロイシル-L-ロイシン-O-メチルエステル)(米国特許第5,567,610号、Borrebaeck等)へ暴露させる；及び/又はインビトロでT細胞欠損ヒト末梢血リンパ球を8-メルカプトグアノシン及びサイトカインのようなアジュバントで処理(米国特許第5,229,275号、Goroff等)してもよい。

被検者より回収されたかインビトロで免疫化されたBリンパ球は、次には通常、ヒトモノクローナル抗体を生成するために不死化される。限定されるものではないが、Bリンパ球を不死化する技術は、(a)ヒトBリンパ球とヒト、マウスミエローマ又はマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞との融合；(b)ウイルスによる形質転換(例えば、エプスタイン・バーウイルス；例えば、Nugentら、上掲を参照のこと)；(c)リンパ芽球腫細胞株との融合；又は(d)リンパ腫細胞との融合、を含む。

【0075】

リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.590-103(Academic Press, 1986))。このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞の成長又は生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、成長させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT欠失細胞の成長を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。適切なヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株が記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984)；Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を生産するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により成長させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティーク

ロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

【0076】

また、ヒト抗体は、ヒト抗体を生産することのできるマウスのような非ヒト宿主を使用して生成してもよい。上記のように、免疫化することで、内在性免疫グロブリンが生成されない状態でもヒト抗体の完全リパートリを生成することができるトランスジェニックマウスを利用することが可能である。例えば、キメラ及び生殖系列変異マウスにおいて抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子をホモ接合的に欠失させると内在性抗体生産の完全な阻害が生じることが記述されている。このような生殖系列変異マウスにヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列を移すと、抗原投与時にヒト抗体の生成が生じる。例えば、Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovits等, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第5,591,669号; 米国特許第5,589,369号; 及び米国特許第5,545,807号を参照のこと。また、ヒト抗体は、S C I D - h u マウス (Duchosalら, Nature 355:258-262(1992)) を使用して作製してもよい。

10

【0077】

その他の実施態様では、ヒト抗体は、ヒト抗体ファージディスプレイライブラリより選択してもよい。抗体又はその断片のライブラリの調製は当該分野で良く知られており、宿主細胞へ導入可能な形質転換ベクターのファミリの構築のためには、いずれの既知の方法を使用してもよい。ファージ中の抗体軽鎖及び重鎖(Huseら, Science, 246:1275(1989))、又はファージ或いはファージミド中の融合タンパク質のライブラリは、既知の方法によって調製が可能である。例えば、Vaughan等, Nature Biotechnology 14:309-314(1996); Barbasら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982(1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581-597(1991); Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992); Barbasら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4457-4461(1992); Griffiths等, EMBO Journal, 13:3245-3260(1994); de Kruifら, J. Mol. Biol., 248:97-105(1995); 国際公開第98/05344号; 国際公開第98/15833号; 国際公開第97/47314; 国際公開第97/44491号; 国際公開第97/35196号; 国際公開第95/34648号; 米国特許第5,712,089号; 米国特許第5,702,892号; 米国特許第5,427,908号; 米国特許第5,403,484号; 米国特許第5,432,018号; 米国特許第5,270,170号; 国際公開第92/06176号; 国際公開第99/06587号; 米国特許第5,514,548号; 国際公開第97/08320号; 及び米国特許第5,702,892号を参照のこと。関心ある抗原は、標的抗原と結合するファージ抗体を選択するための分野において既知の方法を使用し、ファージライブラリに対して選別される。

20

30

40

【0078】

ここに記載の抗体は、場合によっては一又は複数の所望する生物活性又は特性を有する。そのような抗体は、限定されないが、キメラ、ヒト化、ヒト、及び親和性成熟抗体を包含してもよい。記載されているように、抗体は、これらの所望する活性又は特性を達成するための種々の技術を使用して構築又は設計される。一実施態様では、抗体は、少なくとも $10^5 M^{-1}$ 、好ましくは $10^6 M^{-1}$ から $10^7 M^{-1}$ の範囲、さらに好ましくは少なくとも $10^8 M^{-1}$ から $10^{12} M^{-1}$ の範囲、及びよりさらに好ましくは少なくとも $10^9 M^{-1}$ から $10^{12} M^{-1}$ の範囲の結合親和性を有する。抗体の結合親和性は、スキャッチャード分析法(Munsonら、上掲を参照のこと)を包含する当該分野において既知の技術に従った抗体の試験による過度の実験なしに測定することができる。

他の実施態様では、本発明の抗体は、本明細書中で開示した抗体が結合する同じエピトープと結合するか、又は本明細書中で開示した抗体が結合するエピトープと一致又は重複するエピトープと結合する。本発明の抗体のエピトープ結合特性は、当該分野において既知の技術を用いて決定されてもよい。例えば、抗体は、公知の結合相互作用をブロック又は阻害する抗体の能力を測定するための、競争阻害アッセイのようなインビトロアッセイにおいて試験されてもよい。

【0079】

50

3. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。

二重特異性抗体を生成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生成方法は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく [Milstein及びCuello, Nature, 305: 537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えたため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を作成でき、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開の国際公開第93/08829号、及びTrauneker等, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991)に開示されている。

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合することができる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、C H 2及びC H 3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C H 1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を生成するための更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121: 210(1986)を参照されたい。

【0080】

4. ヘテロ抱合体抗体

ヘテロ抱合体抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロ抱合体抗体は、2つの共有的に結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対して標的化させるため [米国特許第4,676,980号] 及びH I V感染の治療のために [国際公開第91/00360号; 国際公開号92/200373号; 欧州特許第03089号] 提案された。本抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク質化学における既知の方法を使用してインビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な薬剤の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

【0081】

5. トリアボディ(triabodies)

トリアボディも本発明の範囲内である。このような抗体は、例えば上掲のIliades等及び上掲のKortt等に記載されている。

【0082】

6. 他の修飾

抗体の他の修飾はここにおいて考慮されている。本発明の実施において用いられる特定の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開第81/01145号を参照)を活性な抗癌剤に転化させるプロドラッグ活性化酵素、又は細胞障害剤(毒素分子等)に抗体をコンジュゲートさせることにより修飾することができる。例えば国際公開第88/07378及び米国特許第4,975,278号を参照されたい。また、この技術は、「抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法」(ADEPT)と呼ばれている。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性な細胞毒形態に転化するように、プロドラッグに作用し得る任意の酵素が含まれる。限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ; スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアリアルスルファターゼ; 非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに転化するのに有用なシトシンデアミナーゼ; プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシンB及びL)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化す

るのに有用なもの；カスパーゼ、例えばカスパーゼ-3；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの転化に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ；ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化させるのに有用な β -ラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化するのに有用なペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼが含まれる。あるいは、当該技術において「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを転化させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328 : 457-458(1987)を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

10

【0083】

この酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えばヘテロ二官能性架橋剤を使用することにより、抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換えDNA技術を使用して作成することができる(Neuberger等, Nature 312 : 604-608[1984])。

当分野で公知であるように、AP2-(配列番号：1)、クラスリン重鎖(配列番号：2)、AP1/2(配列番号：3)又はダイナミン(配列番号：4)のタンパク質断片を検出するためにイムノアッセイにおいて用いられるものなどの抗体を様々な造影剤(imaging agent)にコンジュゲートさせてもよい。抗体と造影剤とを直接又は連結してコンジュゲートしてもよいし、又は中間体分子基が抗体と活性剤との間に提供されてもよい。しばしば用いられる架橋剤(crosslinker)は、付着部位を各々の成分に提供することによってコンジュゲートを促す。架橋剤には、スペーサーとして働いて互いに成分を分離して他の活性を阻害することを防ぐ更なる分子基が含まれる。

20

【0084】

造影()は、当業者に周知の多くの手順によって実施されてよく、このような手順で有用な適切な造影剤は周知の方法によって抗体にコンジュゲートされてもよい。例えば、ウェスタン手順の結果を、放射性シンチグラフィ、核磁気共鳴画像法(MRI)又はコンピューター断層装置(CTスキャン)によって可視化することによって造影してもよい。共通して使用される放射性核種造影剤には放射性ヨウ素やインジウムが含まれる。CTスキャンによる造影は、鉄キレートなどの重金属を使用してもよい。MRIスキニングは、ガドリニウム又はマンガンのキレートを使用してもよい。更に、ポジトロン放出断層撮影(PET)は、酸素、窒素、鉄、炭素又はガリウムのポジトロン発光体を使用して可能である。造影手順で有用な放射性核種の例には、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 及び ^{206}Bi などがある。

30

出典明記によって本明細書中に援用される、Magerstadt, M. (1991) *Antibody Conjugates And Malignant Disease*, CRC Press, Boca Raton, Fla., and Barchel, S. W.及びRhodes, B. H., (1983) *Radioimaging and Radiotherapy*, Elsevier, NY, N.Y.は、抗体のアミノ酸への様々な治療用及び診断用の放射性核種のコンジュゲートを教示している。このような反応は、適切なリンカーによって抗体に放射性核種をコンジュゲートするために応用されてもよい。適切な標識には、例えば、放射性核種、酵素(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ)、基質、補助因子、インヒビター、蛍光剤、化学発光剤(chemiluminescer)及び/又は磁性粒子などがある。このような標識の使用を教示している特許の例として、米国特許第3817837号；同第3850752号；同第3939350号；同第3996345号；同第4277437号；同第4275149号；及び同第4366241号を参照のこと。これらすべては出典明記によって援用される。

40

50

【0085】

さらなる抗体の修飾も考察されている。例えば、抗体は種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン類、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーに結合してもよい。また抗体は、例えばコアセルベーション技術又は界面重合により調製されたマイクロカプセル(例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)にコロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロソフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンに捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Oslo編(1980)に開示されている。抗体の血清半減期を増大させるために、米国特許第5,739,277号に記載されているように抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを組み込んでもよい。ここで使用される「サルベージレセプター結合エピトープ」という用語は、IgG分子のインビボでの血清半減期を増加させる原因となるIgG分子(例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを称する。

10

【0086】

7. 組み換え体方法

本発明はまた、対象のポリペプチドをコードする単離された核酸、例えば、タンパク質断片(例として、AP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)のタンパク質断片)及び/又は本明細書中で開示される抗体、該核酸を含むベクター及び宿主細胞、及び対象のポリペプチドの生産のための組換え技術を提供する。

20

対象のポリペプチドの組換え生産のために、それをコードする核酸が単離され、さらなるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために、複製可能なベクター内に挿入される。対象のポリペプチドをコードするDNAは直ぐに単離され、従来手法(例えば、対象のポリペプチドをコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドを使用するもの)を用いて配列決定される。多くのベクターが入手可能である。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、次のものの一又は複数が含まれる:シグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列である。

30

ここにおける方法は、AP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)を結合し、抗体軽鎖又は重鎖(又は軽鎖及び重鎖の両方)をコードするDNA配列を含んでなるベクターを提供する工程、宿主細胞をベクターでトランスフェクト又は形質転換する工程、及び組み換え産物を生産するのに十分な条件下で宿主細胞を培養する工程を含む、キメラ又は組み換え体抗体の生産のための方法を包含する。

【0087】

(i) シグナル配列成分

対象のポリペプチドは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、好ましくはシグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても産生される。好ましく選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。天然のシグナル配列を認識せずプロセッシングしない原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定なエンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。酵母の分泌に関しては、天然シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクレイベロマイシス(Kluyveromyces)因子リーダーを含む)、又は酸ホスファターゼリーダー、白体(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー、又は国際公開第90/13646号に記載されているシグナルにより置換されうる。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳

40

50

動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス g D シグナルが利用できる。

このような前駆体領域の DNA は、対象のポリペプチドをコードする DNA にリーディングフレームが結合される。

【 0 0 8 8 】

(ii) 複製開始点成分

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。一般に、この配列はクローニングベクターにおいて、宿主染色体 DNA とは独立にベクターが複製することを可能にするものであり、複製開始点又は自律的複製配列を含む。そのような配列は様々な細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点 (S V 4 0 、 ポリオーマ、アデノウイルス、 V S V 又は B P V) は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である (S V 4 0 開始点が典型的には初期プロモーターを有しているため用いられる)。

10

【 0 0 8 9 】

(iii) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a) アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b) 栄養要求性欠陥を補い、又は (c) 例えばパシラス菌に対する遺伝子コード D - アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。

20

選択技術の一例においては、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換したこれらの細胞は、抗薬物性を付与し、選択療法を生存するタンパク質を生産する。このような優性選択の例としては、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンが使用される。

哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの他の例は、核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することのできるもの、例えば D H F R 、 チミジンキナーゼ、メタロチオネイン I 及び I I 、 好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等である。

30

例えば、D H F R 選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、D H F R の競合的アンタゴニストであるメトトリキセート (M t x) を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型 D H F R を用いた場合の好適な宿主細胞は、D H F R 活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 株化細胞である。

【 0 0 9 0 】

あるいは、対象のポリペプチドをコードする DNA 配列、野生型 D H F R タンパク質、及びアミノグリコシド 3' - ホスホトランスフェラーゼ (A P H) のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞 (特に、内在性 D H F R を含む野生型宿主) は、カナマイシン、ネオマイシンあるいは G 4 1 8 のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地における細胞増殖により選択することができる。米国特許第 4,965,199 号を参照。

40

酵母中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミド Y R p 7 に存在する t r p 1 遺伝子である (Stinchcomb 等, Nature, 282 : 39 (1979)) 。 t r p 1 遺伝子は、例えば、A T C C 第 4 4 0 7 6 号あるいは P E P 4 - 1 のようなトリプトファン内で成長する能力に欠ける酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones, Genetics, 85 : 12 (1977) 。酵母宿主細胞ゲノムに t r p 1 破壊が存在することは、トリプトファンの不存在下における成長による形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、L e u 2 欠陥酵母株 (ATCC20,622 あるいは 38,626) は、L e u 2 遺伝子を有する既知のプラスミドによって補完される。

50

さらに、 $1.6 \mu\text{m}$ の円形プラスミド pKD1 由来のベクターは、クルイヴェロマイシス (*Kluyveromyces*) 酵母の形質転換に用いることができる。あるいは、組換え子ウシのキモシンの大量生産のための発現系が *K. ラクティス* (*lactis*) に対して報告されている。Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990)。クルイヴェロマイシスの工業的な菌株からの、組換えによる成熟したヒト血清アルブミンを分泌する安定した複数コピー発現ベクターも開示されている。Fleer 等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)。

【0091】

(iv) プロモーター成分

通常、発現及びクローニングベクターは、宿主生体により認識され、抗体核酸に作用可能に結合するプロモーターを含む。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは、*phoA* プロモーター、*ラクターゼ* 及び *ラクトース* プロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (*trp*) プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えば *tac* プロモーターを含む。しかし、他の既知の細菌プロモーターも好適である。細菌系で使用するプロモーターもまた対象のポリペプチドをコードする DNA と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ (*S.D.*) 配列を有する。

真核生物に対してもプロモーター配列が知られている。事実上、全ての真核生物の遺伝子は、転写開始部位からおよそ 25 ないし 30 塩基上流に位置する ATリッチ領域を有する。多数の遺伝子の転写開始位置から 70 ないし 80 塩基上流に見出される他の配列は、N が任意のヌクレオチドである CNC A A T 領域である。大部分の真核生物遺伝子の 3' 末端には、コード配列の 3' 末端へのポリ A 尾部の付加に対するシグナルである A A T A A A 配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

【0092】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ又は他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的利点を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクロム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母の発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは欧州特許第 73657 号に更に記載されている。また酵母エンハンサーも酵母プロモーターと共に好適に用いられる。

【0093】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス (例えばアデノウイルス 2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス及び最も好ましくはサルウイルス 40 (SV40) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、ヒートショックプロモーターによって、提供されるこのようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

SV40 ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40 ウイルスの複製起点をさらに含む SV40 制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII 制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを用いて哺乳動物宿主で DNA を発現する系が、米国特許第 4,419,446 号に開示されている。この系の変更例は米国特許第 4,601,978 号に開示されている。また、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞におけるヒト インターフェロン c DNA の発現について、Reyes 等, *Nature*, 297: 598-601 (1982)

10

20

30

40

50

を参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0094】

(v) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物による対象のポリペプチドをコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。哺乳動物の遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、
-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物のプロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、コード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

10

【0095】

(vi) 転写終結成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、また転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、多価抗体をコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号とそこに開示した発現ベクターを参照されたい。

20

【0096】

(vii) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的にとって適切な原核生物は、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えばエシェリチアのような腸内菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア(Erwinia)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキャンズ及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えば枯草菌及びB・リチエフォルミス(Lichestiformis)(例えば、1989年4月12日に公開されたDD 266,710に開示されたバシリ・リチエニフォルミス41P)、シュードモナス属、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス属を含む。一つの好適な大腸菌クローニング宿主は大腸菌294(ATCC31446)であるが、他の大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC31537)及び大腸菌W3110(ATCC27325)のような株も好適である。これらの例は限定するものではなく例示的なものである。

30

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシア、又は一般的なパン酵母は下等真核生物宿主微生物のなかで最も一般的に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株も、一般的に入手可能でここで使用でき、例えば、シゾサッカロマイセスポンベ; クルイペロマイセス宿主、例えばK・ラクティス、K・フラギリリス(ATCC12424)、K・ブルガリカス(ATCC16045)、K・ウィッケラマイ(ATCC24178)、K・ワルチイ(ATCC56500)、K・ドロソフィラルム(ATCC36906)、K・サーモトレランス、及びK・マルキシアナス; ヤローウィア(欧州特許第402,226号); ピチア・パストリス(欧州特許第183,070号); カンジダ; トリコデルマ・リーシア(欧州特許第244,234号); アカパンカビ; シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス; 及び糸状真菌、例えばパンカビ属、アオカビ属、トリポクラジウム、及びコウジカビ属(Aspergillus)宿主、例えば偽巢性コウジ菌(A. nidulans)及びクロカビ(A. niger)が使用できる。

40

【0097】

50

対象のポリペプチドの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウイルス株及び変異体及び対応する許容可能な昆虫宿主細胞、例えばスポドブレタ・フルギペルダ(毛虫)、アエデス・アエジプティ(蚊)、アエデス・アルボピクトゥス(蚊)、ドゥロソフィラ・メラノガスター(ショウジョウバエ)、及びボンピクス・モリが同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えば、オートグラファ・カリフォルニカNPVのL-1変異体とボンピクス・モリNPVのBm-5株が公に利用でき、このようなウイルスは本発明においてここに記載したウイルスとして使用でき、特にスポドブレタ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)細胞のトランスフェクションに使用できる。

綿花、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコのような植物細胞培養を宿主として利用することができる。

【0098】

しかしながら、脊椎動物細胞におけるものが最も興味深く、培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になった。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株[293又は懸濁培養での成長のためにサブクローン化された293細胞、Grahamほか, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)]; ハムスター乳児腎臓細胞(BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/DFHFR(CHO, Urlaub, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞[TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)]; サルの腎臓細胞(CVI ATCC CCL 70); アフリカミドリザルの腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL 34); パッファローラット肝臓細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝臓細胞(Hep G2, HB 8065); マウス乳房腫瘍(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI細胞[Motherほか, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)]; MRC5細胞; FS4細胞; ヒト肝癌株(HepG2); 及びミエローマ又はリンパ腫細胞(例えば、Y0, J558L, P3及びNS0細胞)(米国特許第5,807,715号を参照のこと)である。

宿主細胞は、対象のポリペプチドの生成のための上述した発現又はクローニングベクターで形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適当に修飾された常套的栄養培地で培養する。

【0099】

(viii) 宿主細胞の培養

対象のポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地、例えばハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM), シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM), シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes等, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), 米国特許第4,767,704号; 同4,657,866号; 同4,927,762号; 同4,560,655号; 又は同5,122,469号; 国際公開第90/03430; 国際公開第87/00195; 又は米国特許再発行第30,985号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン(商品名)薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補給物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0100】

(ix) 精製

組換え技術を使用する場合、対象のポリペプチドは細胞内、細胞膜周辺腔内に生成され

10

20

30

40

50

るか、又は培地に直接分泌され得る。対象のポリペプチドが細胞内に生成される場合、第1段階として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は限外濾過にかけて取り除く。Carter等、Bio/Technology 10:163-167(1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌されるタンパク質を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)の存在下で、30分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。対象のポリペプチドが培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には第1に市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

【0101】

細胞から調製した組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体に存在する任意の免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト1、2、又は4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等、J. Immunol. Meth. 62:1-13(1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト3に推奨されている(Guss等、EMBO J. 5:15671575(1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他のマトリクスも使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(例えばポリアスパラギン酸カラム)上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他の技術も、回収される対象のポリペプチドに応じて利用可能である。

【0102】

III. 製造品

本発明の他の実施態様では、前述した方法の実施態様の実施に有用な物質を具備する製造品が提供される。製造品は容器及びラベルを具備する。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ、及び試験管が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような様々な材料で形成することができる。容器はアポトーシスの観察に有効な組成物を収容しており、滅菌したアクセスポートを有している(例えば、容器は皮下注射針により貫通可能なストッパーを具備する静脈溶液用のバック又はバイアルであってよい)。組成物中の典型的な薬剤には、AP2-(配列番号:1)、クラスリン重鎖(配列番号:2)、AP1/2(配列番号:3)又はダイナミン(配列番号:4)のタンパク質断片を結合する一又は複数の抗体が含まれる。容器上の又は容器に伴うラベルには、組成物が、アポトーシスの観察及び/又は選択された病状の評価に使用されることが示されている。製造品は、製薬的に許容可能なバッファー、例えばリン酸緩衝生理食塩水、リンガル液及びブドウ糖液を収容する第2の容器をさらに具備する。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用指示書を含むパッケージ挿入物を含む、市販及び使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでいてもよい。

【0103】

このような一実施態様では、本発明は、細胞アポトーシスの検出において、そして、それに関連する疾患の診断において用いられうるキットを提供する。このような一キットは、(1)アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合することが可能な一次抗体と、(2)シグナルを産生する標識にコンジュゲートされた二次抗体と(該二次抗体は一次抗体に結合するものである)、(3)タグ化二次抗体を認識することが可能なシグナルを産生

する三次試薬とを具備する。本発明に係るアポトーシス性の生成されるタンパク質断片の検出に有用である他のキットは、(1) アポトーシスの間に生成されるタンパク質断片に結合することが可能な一次抗体と、(2) シグナルを産生する標識にコンジュゲートされた二次抗体とを具備し、該二次抗体はアポトーシス性の生成されるタンパク質断片とも反応するが、一次抗体が結合する部位とは異なる部位に結合するものである。

本発明のキットの実施態様では、二次抗体に結合したシグナル産生性の標識は、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼなどの酵素であってもよい。酵素及び基質はキットに具備されるのが好ましい。また、キットは、アッセイされる試料又は一次抗体が固定されうるコーティングしていない支持体を具備していてもよい。

【0104】

IV. アポトーシスと関係している細胞過程を調べるための本発明の方法と材料の使用

本発明の方法及び材料は、エンドサイトーシスなどの多種多様な細胞過程を調べるために用いてもよい。本発明のある実施態様は、例えば、アポトーシスの指標として細胞性エンドサイトーシスの速度の変化を観察し、アポトーシスの証拠となるエンドサイトーシスを阻害するものである。エンドサイトーシスは細胞ホメオスタシスの様々な態様に重要である。エンドサイトーシスは膜結合型小胞を通して細胞膜(PM)結合型タンパク質を内部移行させ、養分摂取、増殖因子シグナル伝達及び膜ホメオスタシスなどの多くの細胞性機能を支持する(Conner, S.D.等, Nature 422, 37-44 (2003)を参照)。最も特徴的なエンドサイトーシス経路のうちの一つはタンパク質クラスリンに依存する(Bonifacino, J.S.等, Annu Rev Biochem 72, 395-447 (2003)を参照)。アダプタータンパク質2(AP2)などのクラスリンアダプターは、クラスリン-被覆小孔として知られるPM陥入の形成の間、クラスリンをエンドサイトーシスカーゴの細胞質の決定基に連結させる。アダプターはまた、補助的又は調節タンパク質を補充することによってエンドサイトーシスの足場機能を果たす(Owen, D.J., et. al, P.R. Annu Rev Cell Dev Biol 20, 153-91 (2004)を参照)。ダイナミンによるGTP加水分解は、PMからエンドサイトーシス運搬小胞を放出するために深く陥入した被覆小孔の切断を促す。アンコーティングの後に、小胞は早期のエンドソームとドッキングして融合し、カーゴは、例えばPMに再利用するための管-小胞のエンドソーム膜、又はリソソーム分解のための多小胞の後期エンドソームの内膜など、異なる運命をたどる。

【0105】

本発明の方法及び材料を使用して、プロ-アポトーシス性のデスレセプター(DR)がクラスリンに依存するエンドサイトーシス機構を選択的に破壊する引き金となることが示される。DR刺激は、重要なクラスリン-経路構成成分の迅速な、カスパーゼが媒介する切断を誘導し、典型的なカーゴタンパク質トランスフェリンの細胞性取り込みを停止させる。DR近位のイニシエーターであるカスパーゼは機能的に異なるドメイン間のクラスリンアダプターサブユニットAP2を切断したのに対して、エフェクターカスパーゼはクラスリンの重鎖をプロセッシングした。DR5はリガンド誘導性のクラスリンが媒介するエンドサイトーシスを経ることが示されており、これによってDRシグナル伝達複合体の内部移行がカスパーゼによってクラスリン-経路ターゲティングを容易にするということがいえる。エンドサイトーシス-遮断性、温度感受性のダイナミン-1変異体は、DR内部移行を低減し、DRの下流のカスパーゼ刺激を亢進し、アポトーシスを増加させた。ゆえに、DRが誘発するカスパーゼ活性は、クラスリン依存性のエンドサイトーシスを中断させ、プログラムされた細胞死を増幅させる。

以下、本発明の方法と材料の更なる例示的な適用について説明する。

【0106】

DR活性化は、クラスリン依存性のエンドサイトーシス機構のカスパーゼが媒介する切断を誘導する

DR5エンドサイトーシスの研究において、DR5リガンドApoptosis Ligand 2 (APO2L) / TRAILがAP2のサブユニット(AP2)のタンパク質分解性の切断を引き起こすことが観察された。いくつかの癌細胞株の分析から、APO2L/TRAILがカスパーゼ-8及び-3

10

20

30

40

50

の予想されるプロセッシングだけでなく、A P 2、A P 1 / 2 及びクラスリン重鎖 (C H C) の切断も促進することが示された (図 1 a)。これらの現象は 2 時間以内に生じ、H C T 8 などの耐性細胞株よりも、C o l o 2 0 5、B J A B 及び H e L a - M などの A p o 2 L / T R A I L が誘導するアポトーシスに影響されやすい細胞株に限定されていた (図 1 a)。更なる細胞株によりこの所見を確認した (図 7 a)。F a s L は、A p o 2 L / T R A I L と同様に、B J A B 細胞における A P 2 と C H C の切断を刺激した (図 7 b)。A p o 2 L / T R A I L もダイナミンの切断を誘導し、刺激から 1 時間以内に完全長タンパク質の枯渇が生じた (図 7 c)。同じ時間枠において、A p o 2 L / T R A I L は、他のタイプのクラスリン依存性の小胞運搬現象を媒介する構造的に類似したアダプターのタンパク質分解を誘導しなかった (図 1 b)。これには、トランスゴルジネットワークとエンドソーム間の輸送を支持する A P 1、A P 3 ないし、及び A P 4、そして、小胞体とゴルジ間の運搬を媒介する C O P - I サブユニット - C O P 又は C O P - I I サブユニット S e c 2 3 などがある (例として Bonifacino, J.S. 等, Annu Rev Biochem 72, 395-447 (2003) 及び McMahon, H.T. 等, Curr Opin Cell Biol 16, 379-91 (2004) を参照)。したがって、D R 活性化により、クラスリン依存性のエンドサイトーシスに伴うタンパク質の迅速かつ特異的な切断が促進される。

【 0 1 0 7 】

カスパーゼ - 8 及び - 3 のリガンド誘導性のプロセッシングを阻害した用量のパン-カスパーゼインヒビターである N-ベンジルオキシカルボニル - V a l - A l a - A s p - フルオロオロメチルケトン (z V A D - f m k) による前処置により、A P 2 及び C H C (図 2 a)、並びに B J A B 細胞における A P 2 (図 8 a) の切断が阻害されることから、カスパーゼ活性の必要性が示唆された。さらに、A p o 2 L / T R A I L 及び F a s L は、w t ジャーカット細胞において A P 2 と C H C の切断を誘導したのに対し、いずれのリガンドもカスパーゼ - 8 欠損変異体 ジャーカット細胞株又は F A D D 欠損変異体 ジャーカット細胞株においてこれらターゲットのプロセッシングを刺激しなかった (図 8 b)。A P 2 切断は速く、カスパーゼ - 8 プロセッシングの時間と相関しており、カスパーゼ - 3 プロセッシングに先行していた (図 1 a)。それに対して、C H C 切断は相対的に遅く、カスパーゼ - 3 プロセッシングの時間とより相関していた。H C T 1 1 6 細胞では、A p o 2 L / T R A I L によるカスパーゼ - 3 活性化とアポトーシス誘導は B a x が必要であるのに対し、カスパーゼ - 8 刺激は必要としない (例として LeBlanc, H.N. 等, Cell Death Differ 10, 66-75 (2003) を参照)。予想されるように、A p o 2 L / T R A I L は B a x⁺ / - H C T 1 1 6 細胞においてはカスパーゼ - 8 と - 3 両方のプロセッシングを刺激するが、B a x⁻ / - H C T 1 1 6 細胞においてはカスパーゼ - 8 のみを刺激する (図 2 b、c)。A P 2 切断は B a x とは無関係であるのに対し、C H C 切断は B a x を必要とする (図 2 b、c)。カスパーゼ - 3 を欠損している M C F 7 細胞においては、A p o 2 L / T R A I L はカスパーゼ - 8 及び A P 2 のプロセッシングを相対的に弱く、ゆっくりと誘導するが、C H C 切断は刺激しなかった (図 2 d) (例として Kischkel, F.C. 等, Immunity 12, 611-20 (2000) を参照)。さらに、H T 1 0 8 0 細胞におけるカスパーゼ - 3 の s i R N A ノックダウンは、C H C のリガンド誘導性のプロセッシングをブロックするが、A P 2 のリガンド誘導性のプロセッシングはブロックしなかった (図 8 c)。これらの所見から、D R 経路のイニシエーターであるカスパーゼが A P 2 を切断するのに対し、エフェクターであるカスパーゼは C H C をプロセッシングすると言える。

【 0 1 0 8 】

A P 2 は 2 つの主要な機能部分である C 末端の「e a r」ドメインと N 末端の「t r u n k」ドメインを含有しており、「ヒンジ」領域によって連結されている (例として Owen, D.J., et. al, P.R. Annu Rev Cell Dev Biol 20, 153-91 (2004) を参照)。A P 2 切断の一次部位を定めるために、C 末端の 3 3 k D a の切断産物を B J A B 細胞から免疫精製し、質量分析によるそのトリプシンペプチドの同一性を確認した (図 9 a)。N 末端配列決定により、D V F D のすぐ上流の配列である G P A A Q P S L G P T P E E A F L S (図 9 a) が、非常に特徴的なカスパーゼ認識部位に似ているテトラペプチド配列であることが明らかになった

10

20

30

40

50

(例としてStennicke, H.R., et. al, Biochem J 350 Pt 2, 563-8 (2000)を参照)。切断部位は、裂けやすい結合に隣接しているP 1位及びP 1'位のそれぞれにAsp及びGlyを、P 4位にAspを有しており、これらはカスパーゼ-8に十分に許容される(例としてBlanchard, H.等 J Mol Biol 302, 9-16 (2000)を参照)。このテトラペプチド切断部位配列はAP 2 のアイソフォームAに存在するが、アイソフォームCには存在しない。この相違と一致して、BJAB、Colo 205、LS 1034及びSW 948細胞において、Apo 2L/TRAILは、アイソフォームAほど多くないアイソフォームCの切断を誘導しなかった。このAP 2 切断部位はヒンジ内に存在することから(図9 b)、その加水分解によりAP 2機能が破壊しうることが言える。特定の細胞株のより長いリガンド刺激により、二次部位でAP 2の更なるプロセシングが生じた。この二次部位は最初の33 kDaの断片内にあるようである(図7 a及びb)。

これらカスパーゼが媒介する切断現象の機能的結果を評価するために、トランスフェリン(Tf)の取り込みを調べた。レセプター結合したTfの内部移行はクラスリン-被覆小孔を経て生じ、AP 2を完全に必要とする(例としてBonifacino, J.S.等, Annu Rev Biochem 72, 395-447 (2003)を参照)。蛍光標識Tfのエンドサイトーシス速度を決定するために、測定値を、開始時、取り込みの線形段階、内部移行したタンパク質がPMに細胞内再利用される前に限定した(図3 a、挿入図)。Apo 2L/TRAILは、BJAB及びColo 205細胞のTfエンドサイトーシスの速度を75~85%阻害したが(図3 a、b)、zVAD-fmkによる前処置により実質的にこの阻害が起こらなかった(図3 c)。したがって、DR活性化により、クラスリンが媒介するエンドサイトーシスはカスパーゼに依存して破壊される。

【0109】

Apo 2L/TRAILはクラスリンが媒介するDR 5エンドサイトーシスを誘導するクラスリン経路構成成分が迅速かつ選択的に切断されると、クラスリンコートタンパク質にDRが物理的に近いことによりタンパク質分解現象が促されうると言える。したがって、DR 5がリガンド刺激時にクラスリンが媒介するエンドサイトーシスを経るかどうかを調べた。リガンド結合について競合しないレセプターの細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体(mAb 5C7)を用いた(例としてKischkel, F.C.等, Immunity 12, 611-20 (2000)を参照)。37 °Cでの飽和量の5C7とのインキュベーションは、他のオーバーラップしていないmAbによって検出されるように表面DR 5レベルに影響しないことから、5C7自体がDR 5エンドサイトーシスを変更しないことが確認された。mAb 5C7(6.475C7)の蛍光コンジュゲートを調製して、0 °CでColo 205細胞に結合させ、その後、37 °CでDR 5エンドサイトーシスの動態を測定した(図4 a)。Apo 2L/TRAILの三量体又は多量体の(抗体が架橋した)形態にさらすと、いずれもDR 5エンドサイトーシスの速度を2倍以下に促進した(図4 a)。これによって2時間にわたるレセプター内部移行が3分の1以下、主に開始30分以内になった(図4 b)。同様に、細胞-表面DR 5は刺激から30分の間に減少し、その後、このDR 5プールは安定した(図4 c)。同種の結果はBJAB細胞においても観察された。37 °Cでリガンドに短時間さらした際に得られたデータに反して(図4 a)、曝露を2時間に延長すると、Tfのエンドサイトーシスと同時にDR 5エンドサイトーシスが阻害され、それぞれ5分の1又は2.5分の1に速度が減少した(図4 d)。これらの結果から、クラスリン経路がDR 5のエンドサイトーシスを支持していると言える。実際、Apo 2L/TRAILにて短時間処理したColo 205細胞では、電子顕微鏡(EM)によりわずかな細胞表面5C7がクラスリン被覆小孔に局在しており、被覆されていない表面陥入部又は小窩部には局在が検出されなかった(図4 f-h)。

【0110】

次に、レトロウイルス-感染細胞のGTPアーゼダイナミン-1($\text{dyn}^{\text{G}273\text{D}}$)の温度感受性突然変異体のドキシサイクリン-調節発現に基づいた確立されたインターベンション方策を用いた。この変異体は、許容温度(30 °C)から非許容温度(38 °C)に変えると、急速かつ可逆的にクラスリン依存性のエンドサイトーシスを阻害する(例としてDamke,

10

20

30

40

50

H., 等, J Cell Biol 131, 69-80 (1995)を参照)。HeLa-M細胞の最初の実験により、ドキシサイクリン誘導が dyn^{G273D} 発現を有する細胞の38℃でのTf取り込みをブロックするが、隣接する発現していない細胞でも30℃でもブロックしなかったことが確認された(図5 a - d 及び図10 a)。HeLa-M又はColo205細胞における dyn^{G273D} の誘導発現は十分に安定していなかったのに対して、形質導入したBJAB細胞株では安定しており、38℃でのTf取り込みを強くブロックした(図5 e)。 dyn^{G273D} のドキシサイクリン刺激性の発現もまた、リガンド誘導性のDR5取り込みを30℃で25%以下から38℃で10%以下に減少させ、エンドサイトーシスはドキシサイクリン非存在下において両温度で同程度であった(図5 f)。HeLa-M細胞では、 dyn^{G273D} 誘導の後に38℃に移しても、リガンド誘導性のDR5取り込みを低減した。おそらく dyn^{G273D} 発現が減少したためにこの効果がBJAB細胞において弱くなったのであろう(図10 b)。これら20分の取り込み実験でのDR5取り込みの減少が、4分の取り込み間隔にわたってエンドサイトーシス速度が最も減少したことよりはむしろ、エンドサイトーシスの再利用の増加に起因するというありそうにない可能性を除外するために、無条件でクラスリン依存性のエンドサイトーシスをブロックするドミナントネガティブなダイナミン変異体(ダイナミン-1^{K44A})を用いた(例としてDamke, H., 等, J Cell Biol 127, 915-34 (1994)を参照)。ダイナミン-1^{K44A}は、HeLa-M細胞においてTf及びリガンド誘導性のDR5エンドサイトーシスを阻害した(図10 c)。

10

20

30

40

50

【0111】

EMデータと合わせると、これらの結果から、Apo2L/TRAIL誘導性のDR5取り込みがクラスリン依存性のエンドサイトーシスにより主に起こることが示唆される。ゆえに、クラスリンコート構成成分に対して被覆小孔内のDISCが物理的に近い場合にそれらの切断を促しうる。本当であれば、DISC集合及びイニシエーター-カスパーゼ活性化には被覆小孔の実際の内部移行が必要でないであろう。これを調べるために、BJAB細胞を氷上で冷やし、Tfエンドサイトーシスをブロックした(図11 a)。ブロックしたにもかかわらず、Apo2L/TRAIL及びFasLは、それぞれのレセプターに依然としてFADD及びカスパーゼ-8を補充し、カスパーゼ-8をプロセシングした(図11 b)。さらに、Apo2L/TRAILは、 dyn^{G273D} によってエンドサイトーシスが阻害されたにもかかわらず、38℃のDISCにおいて、類似のDISC形成、カスパーゼ-8プロセシング及びカスパーゼ-8活性を誘導した(図11 c 及び d)。

【0112】

クラスリンが媒介するエンドサイトーシスの阻害は、DR誘導性のカスパーゼ活性化とアポトーシスを増やす

クラスリン-経路タンパク質が迅速に切断されることから、エンドサイトーシスの破壊がリガンド誘導性のカスパーゼ活性化及びアポトーシスを促進しうる。実際、エンドサイトーシスが dyn^{G273D} によりブロックされると、全細胞溶解物からの合計の細胞のカスパーゼ-8プール、Bid、AP2及びエフェクターカスパーゼ-3ないし-7のリガンド誘導性のプロセシングが顕著に増加し(図6 a)、DISC自体の形成と活性化を有意に変化させた(図11 c 及び d)。定量分析により、 dyn^{G273D} の誘導と30℃より38℃への温度移行の後にリガンド刺激性のカスパーゼ-3/7酵素活性が実質的に増加したことが示された(図6 b)。さらに、この条件によっても結果としてアポトーシスが増大し(図6 c)、この効果はwtリガンド又はDR5選択変異体による刺激の後に観察された(例としてKelley, R.F.等, J Biol Chem 280, 2205-12 (2005)を参照)。感作(sensitization)は、用量-応答曲線の左シフトだけでなく、断片化したDNAを有する細胞の割合の最大が大きくなっていることから明らかであった(図6 c)。これらの結果から、クラスリン依存性のエンドサイトーシスがカスパーゼによって破壊されるとDISCの下流のカスパーゼ活性化が増幅され、より強力なアポトーシス刺激が生じることが示される。

【0113】

上記のように、本発明の方法及び材料を用いて、細胞外因性アポトーシス経路とクラスリン依存性のエンドサイトーシス機構との間の予想外の相互作用が明らかとなった。プロ-アポトーシスのDR嵌入(engagement)の数分以内に、活性化されたカスパーゼは、クラスリン依存性のエンドサイトーシスを媒介するタンパク質を切断し始める。AP2切断の相対的に迅速な動態、FADD及びカスパーゼ-8のためのこの現象の必要性、及びBax及びカスパーゼ-3に依存していないことから、DR近位のカスパーゼ、最も可能性が高いものにはカスパーゼ-8及び/又はカスパーゼ-10がAP2を始めにプロセッシングすると言える。実際、AP2ヒンジのカスパーゼ切断部位は、カスパーゼ-8が認識することが可能である配列と合う(例としてNicholson, D.W., Cell Death Differ 6, 1028-42 (1999)を参照)。

10

【0114】

DR活性化によるクラスリン依存性のエンドサイトーシスの阻害はカスパーゼ刺激と同じ時間枠で起こり、zVAD-fmkによってその刺激が後退したことから、カスパーゼ活性に依存することを示す。一次AP2プロセッシング部位はヒンジ領域にマップされた。ヒンジは、補助的なタンパク質動員を支持するearドメインを、他のAP2サブユニットと連動してPM会合(association)とカーゴ結合を媒介するtrunkドメインに連結させる(例としてOwen, D.J., et. al, P.R. Annu Rev Cell Dev Biol 20, 153-91 (2004)を参照)。COS7細胞のAP2 earドメインの過剰発現によりクラスリン依存性のエンドサイトーシスが阻害され、補助的-タンパク質の結合を阻害する突然変異によって効果が無効になる(例としてOwen, D.J.等, Cell 97, 805-15 (1999)を参照)。逆に、いくつかの細胞がearのないAP2だけを発現するショウジョウバエの研究から、earドメインが一般的なエンドサイトーシスに必要でないと言える(例としてBerdnik, D., 等, Dev Cell 3, 221-31 (2002)を参照)。ゆえに、AP2のカスパーゼ切断単独ではエンドサイトーシスを乱すために十分であるか否か、又は、他のクラスリン-経路構成成分のプロセッシングも貢献するか否かは、不明である。とにかく、DRが媒介するカスパーゼ活性化により、急速にクラスリン依存性のエンドサイトーシスが破壊される。

20

【0115】

活性化したカスパーゼがクラスリンコート基質にどのように近づいているのかを考慮する場合、データから、Apo2L/TRAIL刺激の後、表面DR5の実質部分がクラスリン依存性のエンドサイトーシスを通して細胞へ移動すると言える。予備的なEM研究によって、DR5がクラスリン-被覆小孔と会合することを確認する。近年の研究により、クラスリン及びAP2のRNAiが媒介するノックダウンがFasによるアポトーシスのシグナル伝達を阻害することが示され、この結果はレセプターシグナル伝達のためのエンドサイトーシスの必要性を表すと解釈される(例としてLee, K.H.等, Embo J 25, 1009-23 (2006)を参照)。エンドサイトーシスが氷上のインキュベーションによって、又は、ダイナミン不活性化によって阻害される場合に、Apo2L/TRAIL DISC集合、活性化及びアポトーシスが依然として起こりうるという所見を考慮すると、依然として細胞表面において、おそらくクラスリン-被覆小孔内でDR5がFADD及びカスパーゼ-8を結合しうると推測される。実際、氷上でのインキュベート又は温度感受性ダイナミンによってエンドサイトーシスをブロックしても被覆小孔形成やカーゴ動員を干渉しない(例としてDamke, H., 等, J Cell Biol 131, 69-80 (1995)を参照)。DR活性化によりAP2がほぼ完全に破壊された。それに対して、CHC及びAP1/2プロセッシングは、全細胞タンパク質の一部、おそらくDRエンドサイトーシスに直接関与する部分のみを必要とする。ゆえに、内部移行するDR会合DISCの近くのカスパーゼが活性化されることにより、特定のクラスリン-経路構成成分の局所の破壊が生じうる。

30

40

【0116】

カスパーゼがクラスリンが媒介するエンドサイトーシスを破壊する所見のある直接的な影響は、このメカニズムを除去するとアポトーシスのプログラムの以前には認識されていない部分が明らかになりうることであり、アポトーシスを受ける細胞は、もはや栄養分の取り込みも、増殖因子への応答も、又は膜ホメオスタシスの維持も必要なくなる。しかし

50

ながら、クラスリン及びA P 2が、多くの異なる研究グループによってs i R N Aを使用して効率よくノックダウンされているので、これら自体の切断がアポトーシスを誘発することはありそうになく、結果としてアポトーシスの増加が報告されていない。特に、細胞障害能、D N A 損傷薬剤ピンラスチン及びアドリアマイシンもクラスリン機構の構成成分の切断を誘導したが、D R リガンドより非常に遅い動態であった(図12)。一方では、クラスリンアダプターのカスパーゼ媒介性のプロセッシングも非アポトーシス性の細胞調節において機能しうる。未成熟の樹状細胞において、基礎のカスパーゼ活性により、アダプチンサブユニットの切断がいくらか起こるのに対して、この効果をz V A D - 阻害すると樹状細胞成熟が促進される(例としてSantambrogio, L.等, Nat Immunol 6, 1020-8 (2005)を参照)。

10

第二のおそらくより驚くべきことは、D R とクラスリンエンドサイトーシス機構との間の相互作用は、この相互作用が外因性経路によるカスパーゼ活性化を補強するポジティブフィードバックループを提供することを意味することである。このモデルによると、例えば標準以下の閾値リガンドレベルに応答してクラスリン機構が完全なままである場合、活性化されたD R のエンドサイトーシスは細胞生存を保存するためにアポトーシスのシグナル伝達を妨害する。しかしながら、D R 刺激によりエンドサイトーシスを崩壊させるのに十分なカスパーゼ活性が生じる場合、シグナルは持続し、さらにカスパーゼ活性化を増幅して、アポトーシスを促進する。おそらく、D R エンドサイトーシスは、リソソーム分解によるD R シグナル伝達、シグナル終了のいくつかの他の形状、又は競合する抗アポトーシスのシグナルの誘導を妨害しうる。エンドサイトーシスは、最初のD I S C 会合のレベルでカスパーゼ活性化を制御しなかった。それにもかかわらず、ダイナミンが不活性化すると全細胞性カスパーゼ-8、順に、カスパーゼ-3及び-7のプロセッシングが亢進され、より強力なアポトーシス活性化に至った。このことから、エンドサイトーシスが最初のD I S C の下流の更なるカスパーゼ活性化を制御するということが言える。

20

【0117】

まとめると、D R 誘導性のアポトーシス及びクラスリン依存性のエンドサイトーシスの双方向性の関係が本明細書において開示された。それは、D R 活性化によりクラスリンエンドサイトーシスの機構の重要な構成成分がカスパーゼによって媒介されて破壊され、これによって、この過程が停止されるということである。クラスリン依存性のエンドサイトーシスの破壊によりD R の下流のカスパーゼ活性化が増し、アポトーシスが増える。このことから、カスパーゼ活性化及びアポトーシスの実行を増幅するポジティブフィードバックループがあると言える。

30

以下の実施例は例示としてであって、制限するために示すものではない。本明細書中のすべての引用の開示内容は出典明記によって特別に本明細書中に援用される。

【実施例】

【0118】

実施例1：例示的な材料と方法

A P 2 カスパーゼ切断部位の同定

B J A B 細胞 (5×10^8) を A p o 2 L / T R A I L にて30分かけて刺激し、その後溶解し、C末端特異的抗A P 2 (A P 6、ABRの# M A 1 - 0 6 4)を用いて免疫沈降し、そしてプロテインA / G アガロース(Pierce)にて回収した。C末端断片をS D S - P A G E にて分析し、トリプシン切断のために溶出して液体クロマトグラフィ-エレクトロスプレーイオン化-イオントラップタンデム型質量分析にて分析するか、又は異なるI Pで、N末端配列決定のためにP V D メンブランに移した。

40

【0119】

エンドサイトーシス、取り込み及び表面ダウンレギュレーションアッセイ

常法のT f 測定のために、 10^6 の懸濁された細胞を、 $1 \sim 10 \mu\text{g} / \text{mL}$ のA p o 2 L / T R A I L にて37 で示された時間の間前処理した。いくつかの研究では、細胞は0.25% D M S O + / - 50 m M z V A D f m k にて37 で30分かけて前処理し、その後A p o 2 L / T R A I L を加えた。A p o 2 L / T R A I L 刺激の後、細胞を、

50

5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の蛍光 T f を含む結合培地(無血清 D M E、3 % B S A、2 0 m M H e p e s、p H 7 . 2)にて氷上で3 0 分かけて平衡化し、示されるように、0 ~ 5 分間3 7 に移し、その後急速に氷上で冷やしてエンドサイトーシスを停止させた。沈殿した細胞を、氷温の2 %パラホルムアルデヒド/P B S に再懸濁し、1 0 0 0 0 個の細胞の平均蛍光強度をクーラー E p i c s E l i t e - E S P フローサイトメーター(Hialeah, FL)にて定量化した。エンドサイトーシス速度は定常状態内部/表面プロット線の線形傾斜から決定した(例としてWiley, H.S. et. al, J Biol Chem 257, 4222-9 (1982)を参照)。温度を変える実験のために、氷温結合(ice binding)インキュベートを省略した。その代わりに、細胞を2 0 分かけて調製し、3 0 又は3 8 の結合培地中で維持し、^{6 4 7} T f とともに更に0 分(コントロール)又は2 0 分インキュベートし、氷上で冷却し、フローサイトメリーのために処理して内部/表面^{6 4 7} T f 比率を決定した。

10

【0 1 2 0】

常法の D R 5 測定のために、細胞を、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の^{6 4 7} 5 C 7 を含む結合培地にて氷上で飽和させ、氷温の結合培地にて3 回洗浄し、1 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の A p o 2 L / T R A I L のある場合又はない場合で、氷上にて3 0 分インキュベートした。次いで細胞を、示した時間の間3 7 に移し、急速に冷却して、氷温の2 M 尿素、5 0 m M グリシン、1 5 0 m M N a C l、p H 2 . 4 にて3 回未満処理することによる酸ストリップを行うか、又は酸ストリップを行わなかった。細胞をフローサイトメリーのために処理し、内部移行を以下の方程式を用いた既に記載されている方法と同じように算出した。 $\% \text{取り込み} = 1 0 0 \times [(S_t - S_0) / (N - S_0)]$ 、このとき S_t 及び S_0 はそれぞれ、時間 = t 及び時間 = 0 の間インキュベートして酸ストリップした試料の値であり、N はストリップしていない蛍光であり、この N は3 7 のインキュベーションの間、本質的に変わらなかった(例としてAustin, C.D.等, Mol Biol Cell 15, 5268-82 (2004)を参照)。

20

温度変化のために、細胞を2 0 分間調製して、3 0 又は3 8 で維持し、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の^{6 4 7} 5 C 7 にて3 分間平衡化し、0 分(コントロール)又は2 0 分の間、1 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の A p o 2 L / T R A I L にて処理し、その後氷上で3 0 分間冷却した。細胞は酸ストリップするか又は酸ストリップしないで、フローサイトメリーにて定量化した。

表面 D R 5 ダウン調節アッセイのために、懸濁した細胞を非標識 5 C 7 にて3 7 で3 0 分間予め平衡化し、表面及びリサイクル D R 5 プールを結合させ、1 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の A p o 2 L / T R A I L のある場合又はない場合で示された時間の間処理して、氷上で冷却した。表面 5 C 7 を C Y 5 - 抗マウス I g G にて探索し、フローサイトメリーにて定量化した。この技術は、^{6 4 7} 5 C 7 にて直接プロービングした際に見られるように、A p o 2 L / T R A I L 誘導性のレセプタークラスター形成に起因する表面プロービング効率の低下を避けるために行った。

30

【0 1 2 1】

カスパーゼ活性アッセイ

カスパーゼ-3 / 7 アッセイを A p o - O n e 同種カスパーゼ-3 / 7 アッセイ(Promega)を用いて行った。細胞を回収して、計数し、各々の処理について等しい数に等分し、3 0 又は3 8 で4 時間、異なる用量の A p o 2 L / T R A I L にて処理し、次いで、同種カスパーゼ-3 / 7 試薬(カスパーゼ-3 / 7 基質 Z - D E V D - R 1 1 0 を含有)にて溶解した。溶解物を室温で1 時間インキュベートして、蛍光光度計にて4 8 5 / 5 3 0 n M を読み取った。

40

【0 1 2 2】

アポトーシスアッセイ

細胞をエタノール固定と R N アーゼ処理の後に、プロピジウムヨウ素で染色し、標準以下のジプロイド D N A の量を、E p i c s X L . M C L 血球計数器(Coulter Beckman)と E x p o 3 2 ソフトウェアを用いて、既に記載されるようにフローサイトメリーにて分析した(例としてNicholson, D.W., Cell Death Differ 6, 1028-42 (1999)参照)。

【0 1 2 3】

D I S C 免疫沈降

50

B J A B細胞(時間点につき 1×10^7)を抗 F L A G M 2 A bを交差結合させた F l a g - A p o 2 L / T R A I Lにて処理し、回収して、溶解し、免疫沈降して、記述されるように、D I S Cを分析した(例としてKischkel, F.C.等, Immunity 12, 611-20 (2000)を参照)。

【 0 1 2 4 】

細胞株と試薬

ヒト結腸直腸腺癌 C o l o 2 0 5細胞、ヒトB細胞リンパ腫 B J A B細胞、及びヒトT細胞カルチノーマ J u r k a t野生型細胞(A3クローン)、F A D D欠損(E1)、及びカスパーゼ-8-欠損(I9.3)を、R P M I 1 6 4 0 + 1 0 %ウシ胎児血清(F B S) + 2 m M グルタミン + 1 0 0 0 U / m l ペニシリン-ストレプトマイシン(Life Technologies)にて培養した。ヒト子宮頸癌 H e L a - M細胞、ヒト胸部腺癌 M C F 7、及びヒト結腸直腸腺癌 H C T 1 5、H C T 8、S W 9 4 8、C o l o 3 2 0、ヒト線維肉腫 H T 1 8 0 (A T C C)、H C T 1 1 6 B a x (- / -)、H C T 1 1 6 B a x (+ / -)を、5 0 : 5 0 ダルベッコの変更イーグル培地及び F K 1 2 培地 + 1 0 % F B S + 1 0 0 0 U / m l ペニシリン-ストレプトマイシン中で生育させた。温度感受性ダイナミンをコードする c D N Aクローンは G 2 7 3 D 変異ダイナミン-1とドミナントネガティブな K 4 4 A 変異ダイナミン-1(それぞれ $D y n^{G 2 7 3 D}$ と $D y n^{K 4 4 A}$)であった。 $D y n^{G 2 7 3 D}$ は、Genentechで構築された単一のレトロウイルスのプラスミドテトラサイクリン誘導発現系である p H U S H - P r o E x から発現された。まず c D N Aを、C M Vエンハンサー-プロモーター配列と2コピーのテトラサイクリンオペレーター T e t O 2を含有するシャトルプラスミドにクローニングし、次いで、インビトロファージ ベースの組み換え、又は G a t e w a y (登録商標)技術(Invitrogen, Carlsbad)によって、野生型 T e t レプレッサーが異なる アクチンプロモーターによって制御され、その後、内在性リボソームエントリー配列とピューロマイシン選別カセットが続いているマローニーマウス白血病ウイルス主鎖ベクターに転移させた。 $D y n^{K 4 4 A}$ は、連続して感染させて、2-ベクターテトラサイクリン誘導レトロウイルスの発現系である p R e v T e t - O n / p R e v - T r e (Clontech)から発現させた。レトロウイルスベクターを、リポフェクタミン 2 0 0 0 (Stratagene)を用いてナツメヤシ両種指向性マローニーマウス白血病ウイルスパッキング細胞にトランスフェクションした。既に記載されているように(Simpson等 J Cell Biol 137, 835-45, 1997)、レトロウイルス粒子を回収し、H e L a - M及びB J A B細胞感染に用いた。 $D y n^{G 2 7 3 D}$ 感染細胞を、1~2週間かけてピューロマイシン選択し(2~3 $\mu g / m l$)、手動で個々のH e L a - Mコロニーをピックアップするか又は耐性B J A B細胞のF A C S分類(プロピジウムヨウ素の排除についてゲートする)によってクローニングし、A u t o c l o n e 装置(Coulter, Hialeah, FL)を備えたE P I C S E L I T E - E S Pを用いて96ウェル細胞培養プレートに単一細胞を播いた。細胞クローンを、免疫蛍光顕微鏡法によってドキシサイクリン誘導ダイナミン-1の発現の均一性についてスクリーニングした。 $D y n^{K 4 4 A}$ -感染細胞は、1~2週間かけてヒグロマイシン B (4 0 0 $\mu g / m l$)及びG 4 1 8 (1 m g / m l)選択した。既に記載されているように(Damke等 J Cell Biol 131, 69-80 1995)、ドキシサイクリン(1 $\mu g / m l$)により32で72時間かけて誘導を行った。硫酸ピンクリスチン(# T - 1 1 7)、アドリアマイシン.H C L (G R - 3 1 9)はBiomolから、テトラサイクリンのないF B SはHycloneから、ピューロマイシンはClontechから、ドキシサイクリンはSigmaから購入した。z V A D - f m k (N-ベンジルオキシカルボニル-V a l - A l a - A s p-フルオロメチルケトンとして)をMD Biosciences(# F K - 0 0 9)から入手した。

【 0 1 2 5 】

組換えタンパク質、抗体及び蛍光マーカー

タグ化していない又はF l a gタグ化した形態のヒト組み換え可溶性A p o 2 L / T R A I LとF l a gタグ化F a s Lを、記載されるように(Sharp等 J Biol Chem 280, 19401-409, 2005)調製した。イムノプロット分析のために、以下の抗体を用いた。Cell Signalingの抗カスパーゼ-8(1 C 1 2、# 9 7 4 6)及び抗カスパーゼ-7(C 7、# 9 4 9 4)

、Immunotechの抗カスパーゼ-8(5F7、#IM3148)、BD Transductionの抗FADD(#610399)、抗AP2(#610501)、抗AP1/2(#610381)、抗AP1(#610385)、抗AP3(#611328)、抗CHC(#610499)、抗AP4(#612018)、抗Bid(#550365)、及び抗ダイナミン1/2(#610245)、Biomolの抗カスパーゼ3(SA-320)、Oncogeneの抗カスパーゼ9(Ab2、#AM47)、Zymedの抗Tfレセプター(#13-6800)、Sigmaの抗Cop(M3A5、#G2279)、Gentexの抗Sec23(#GTX22913)、Genentech, Inc.で生成された抗DR5(3H3及び5C7)モノクローナル抗体、及び既に記載されている(例としてSimpson等, J Cell Biol. Volume 137, No. 4 pp 835-845 (1997)を参照)抗AP3。二次試薬として以下の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)-コンジュゲートAbを用いた。BD Bioscienceの抗マウス-IgG1(#559626);及び、Southern Biotechnology Associatesの抗マウス-IgG2(#190-05)、Jackson ImmunoResearchの抗ウサギIgG(#711-035-152)。免疫沈降実験のために、以下の抗体を用いた。ABRの抗Flag(M2, Sigma)及び抗AP2(AC1-M11, #MA3-061)又は(AP6, #MA1-064)。フローサイトメトリーと免疫蛍光顕微鏡法のために、Molecular Probesの⁴⁸⁸Tf(T-13342)、⁶⁴⁷Tf(T-23366)、⁵⁹⁴抗ウサギIgG(#A-11037)、及び⁵⁹⁴抗ヤギIgG(#A-11058)。Jackson ImmunoResearchの断片抗マウスIgG(#115-177-003)、Santa Cruz Biotechnologyの抗ダイナミン-1(#sc-6402)、及びAlexa 647コンジュゲートウシ血清アルブミン(Molecular Probes, Inc.)を抗原として用いてGenentech, Inc.で生成され、Alexa 647カダベリン(Molecular Probes, Inc.)と(CNBr)-活性化セファロースを反応させることによって作製したAlexa-647セファロースカラムにて親和性精製したAlexa 647ウサギポリクローナル抗体。製造業者の指示に従って、Alexa-647サクシニミジルエステル(Molecular Probes, Inc.)と反応させることによってAlexa-647をmAb 5C7(⁶⁴⁷5C7)にコンジュゲートさせた。

10

20

30

40

50

【0126】

免疫蛍光顕微鏡法

⁶⁴⁷5C7取り込みイメージングのために細胞を⁶⁴⁷5C7とともに37でインキュベートし、示した時間の間、Apo2L/TRAILを交差結合させた。温度感受性実験のために細胞を結合培地にて、30と38で20分間前処理し、次いで、⁴⁸⁸Tfを加え、示した時間の間、それぞれの温度でインキュベートを続けた。その後、細胞を3%パラホルムアルデヒドにて20分間固定し、0.4%サポニンにて透過処理し、ウサギ抗Alexa 647 IgG、その後⁵⁹⁴抗ウサギIgG(⁶⁴⁷5C7取り込み)、又は抗ダイナミン-1抗体、その後⁵⁹⁴抗ヤギIgG(温度感受性実験)にて染色した。イメージングには、Plan-Apochromat 1.4 NA 63x対物レンズ、CCDカメラ(AxioCam; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.)、及びQuad透過フィルターセット(Chroma Technology Corp.)を備えた顕微鏡(Axiovert 200; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.)を用い、AxioVision 3.1ソフトウェア(Carl Zeiss MicroImaging, Inc.)にてすべて制御した。

【0127】

免疫電子顕微鏡法

懸濁したColo205細胞を10µg/mlの5C7を含む結合培地とともに氷上で30分間インキュベートし、洗浄して、10mg/mlのApo2L/TRAILを含む結合培地とともに氷上で30分間インキュベートして、その後37に5分間移し、2%パラホルムアルデヒド/0.2%グルタルアルデヒドにて固定し、ウサギ抗マウスIgG(Dako, Glostrup, Denmark)による超薄凍結切片のイムノゴールド標識のために既に記載されるように(Austin等 Mol Biol Cell 15, 5268-82, 2004)処理した。

【0128】

前述の記載は当業者が本発明を実施するために十分であるとみなされる。本発明は本明細書に提示した実施例によって権利範囲が制限されるものではない。事実、本明細書に示

したものと記載内容に本発明の様々な変更が加わることは、前述の記載から当業者に明らかであり、添付の特許請求の範囲内のものである。

【0129】

表1 本発明の実施に有用な例示的なポリペプチド

A P 2 - (配列番号: 1) N C B I 寄託番号: C A B 6 6 8 5 9

MPAVSKGDGMRGLAVFISDIRNCKSKEAEIKRINKELANIRSKFKGDKALDGYSKKKYVCKLLFIFLLG
HDIDFGHMEAVNLLSSNKYTEKQIGYLFISVLVNSNSELIRLINNAIKNDLASRNPTFMCLALHCIANV
GSREMGEAFAADIPRILVAGDSMDSVKQSAALCLLRLYKASPDLPVPMGEWTARVVHLLNDQHMGGVVTA
VSLITCLCKKNPDDFKTCVSLAVSRLSRIVSSASTDLQDYTYFVPAPWLSVKLLRLLQCYPYPEDA
VAVKGRLEVECLETVLNKAQEPKSKKQVHNSNAKNAIFETISLIHYDSEPNLLVRACNQLGQFLQHRETNL
RYLALAESMCTLASSEFSHEAVKTHIDTVINALKTERDVSVRQRAADLLYAMCDRNSNAKQIVSEMLRYLE
TADYAIREEIVLKVAILAEKYAVDYSWYVDTIILNLRIRIAGDYVSEEVWYRVLQIVTNRDDVQGYAAKT
VFEALQAPACHENMVKVGYYLGEFENLIAGDPRSSPPVQFSLHLSKFHLCSVATRALLLSTYIKFINLF
PETKATIQGVLRAGSQLRNADVELQORAVEYLLTSSVASTDVLATVLEEMPPPPERESSILAKLKRKKG
PGAGSALDDGRRDPSNDINGGMEPTPSTVSTPSADLLGLRAAPPAAPPASAGAGNLLVDVFDGPA
AQPSLGPTPEEAFLSPGPEDIGPPIPEADELLNKFKVCKNNGVLFENQLLQIGVKSEFRQNLGRMYLFYG
NKTSVQFQNFSPTVVHPGDLQTLAVQTKRVAQAQVGGAAQVQLNIECLRDFLTPLLSVRFRYGGAP
QALTLKLPVTINKFFQPTEMAQDFQQRWKQLSLPQQEAQKIFKANHPMDAEVTKAKLLGFGSALLDNV
DPNPNFVVGAGIIQTKALQVGCLLRLEPNQAQMYRLTLRTSKEPVSRHLCELLAQF

10

クラスリン重鎖 (配列番号: 2) N C B I 寄託番号: N P 0 0 4 8 5 0

MAQILPIRFQEHLLQLQNLGINPANIGFSTLTMESDKFICIREKVGGEQAQVVIIDMNDPSNPIRRPISAD
SAIMNPASKVIALKAGKTLQIFNIEKSKMKAHTMTDDVTFWKWISLNTVALVTDNAVYHWSMEGESQP
VKMFDHRHSSLAGCQIINYRTDAKQKWLTLTGISAQQRNVGAMQLYSVDRKVSQPIEGHAASFAQFKME
GNAEESTLFCFAVRGQAGGKLHIEVGTPTGNQFPFKKAVDVFPEAQNDFFVAMQISEKHVVFLI
TKYGYIHLVDLETGTCIYMNRISGETIFVTAPHEATAGIIGVNRKQVLSVCVEEENIIPYITNVLQNP
DLALRMAVRNNLAGAEELFARKFNALFAQGNYSAAKVAANAPKGIILRTPDTIRRFQSVPAQPGQTSPL
LQYFGILLDQGGQLNKYESLELCRPVLQQRKQLEKWLKEDKLECSEELGDLVKSVDPTLALSIVLNRAN
VPNKVIQCFAETGQVQKIVLYAKKVGYPDWIFLLRNVMRI SPDQGGQFAQMLVQDEEPLADITQIVDV
FMEYNLIQQCTAFLLDALKNNRPSSEGPLQTRLLEMNLMHAPQVADAILGNQMFTHYDRAHIAQLCEKAG
LLQRALEHFTDLYDIKRAVVHTHLLNPEWLVNYFGSLSVEDSLECLRAML SANIRQNLQICVQVASKYH
EQLSTQSLIELFESFKSFEGLFYFLGSI VNFSDPDPVHFYIQAACKTGQIKEVERICRESNCYDPERV
KNFLKEAKLTDQLPLIIVCDRDFVHDLVLYLYRNNLQKYIEIYVQKVNPSRPLPVVIGGLLDVDCSEDV
IKNLLIVVRGQFSTDELVAEVEKRNRLKLLLPLEARIHEGCEEPATHNALAKIYIDSNNNPERFLREN
PYYSRVVGYKCEKRPHLACVAYERGQCDELINVCNENSLFKLSRYLVRRKDPPELWGSVLLLESNPY
RRPLIDQVVQTALSETQDPEEVSVTVKAFMTADLPNELIELLEKIVLDNSVFSEHRNLQNLILITAIKA
DRTRVMEYINRLDNYDAPDIANIAISNELFEEAFIFRKFVNTSAVQVLEHIGNLDRAYEFAERCNE
PAVWSQLAKAQLQKGMVKEAIDSYIKADDPSSYMEVVQAANTSGNWEELVKYLQMARKKARESIVETEL
IFALAKTNRLAEELEFINGPNNAHQVGDRCYMYDAKLLYNNVSNFGRLASTLVLHGEYQAAVD
GARKANSTRTWKEVCFACVDGKEFRLAQMCGLHIVVHADELEELINYYQDRGYFEELITMLEAALGLER
AHMGMPTELAIIYKFKPKQKMRHLELFWSRVNI PKVLRAEQAHLWAEVFLYDYKYEEDNAIITMMN
HPTDAWKEGQFKDIITKVANVELYYRAIQFYLEFKPLLLNDLLMVLSPRLDHTRAVNYFSKVKQLPLVK
PYLRSVQNHNNKSVNESLNNLFITEEDYQALRTSIDAYDNFDNISLAQRLEKHELIEFRRITAAFLKGN
NRKQSVLELCKKDSLQKAMQYASESKDTELABELLQWFLQEBKRECFGACLFCTCYDLLRPDVVLETAW
RHNIMDFAMPYFIQVMKEYLTKVDKLDASESLRKEEQATETQPIVYGQPQLMLTAGPSVAVPPQAPFG
YGYTAPPYQPPQPGFGYSM

20

30

A P 1 / 2 (配列番号: 3) N C B I 寄託番号: P 6 3 0 1 0

MTDSKYFTTNKKEIFELKAE LNNEKKEKRKEAVKVIAMTVGKDVSSLPDPVVMCMQTDNLELKKLV
YLALMNYAKSQPDMAIMAVNSFVKDCEDPNPLIRALAVRTMGCIRVDKITEYLCEPLRCKLKDDEDPYVR
KTAAVCVAKLHDINAQMVEDQGFLLSLRDLIADSNPMVVANAVAALSEISESHPNNSLDDLNPQINIKL
LTALNECTEWGQIFILDCLSNYNPKDDREAQSI CERVT PRLSHANS AVVLSAVKVLKMFLELLPKOSDY
YNMLLKKLAPPLVTLLSGEPVQYVALRNINLIVQKRPEILKQEI KVFVKYNDPIYVKLEKLDIMIRL
ASQANIAQVLAELKEYATEVDVDFVRKAVRAIGRCAIKVEQSAERCVSTLLDLIQTKVNYVVQEAIVVI
RDIFRKYPNKYESI IATLCENLDSLDEPDARAAMIWIVGEYAERIDNADELLESFLEGFHDESTQVQLT
LLTAIVKLFKPKSETQELVQVLSLATQSDNPDRLDRGYIYWRLLSTDPVTAKEVVVSEKPLISEET
DLIEPTLLEDELICHIGSLASVYHKPPNAFVEGSHGIHRKHLPIHGGST DAGSPVGT'TATNLEQPQVI
PSQDILLGDLNLDLGPVNVVPQVSSMQMGAVDLLGGGLDLSLVGQSFIPSSVPATFAPSPTFAVVSGL
NDLFLSTGICMAPGGYVAPKAVVLPVAVKAGLEISGTFTHRQGHIMEMNFTNKALQHTDFAVVSFNK
NSFGVIPSTPLAHTPLMPNQSIDVSLPLNTLGPVMKMEPLNNLQAVKNNIDVFYFSLIPLNVLFVE
DGKMERQVFLATWKDIPNENELQFQIKECHLNADTVSKLQNNNVYTI AKRNVEGQDMLYQSLKLTNGI
WILAE LR IQGPNPNYTL SLKCRAPEVSQYIYQVYDSILKN

40

ダイナミン (配列番号: 4) N C B I 寄託番号: N P 0 0 1 0 0 5 3 3 6

MGNRGMEDLIPLVNRLQDAFSAIGQNADLDLPQIAVVGQSQSAGKSSVLENFVGRDFLPRGSGIVTRRPL
 VLQLVNATTEYAIEFLHCKGKKFTDFEEVRLEIEAETDRVTGKNKGISPVVINLRVYSPhVLNLTlVLDLP
 GMTKVPVGDQPPDIEFQIRDMLMQFVTKENCLLILAVSPANSDLANSDALKVAKEVDPQOQRTIGVITKL
 DLMDEGTDARDVLENKLLPLRRGYIGVVNRSQKIDGKKDITAALAAERKFFLSHPSYRHLADRMGTPY
 LQKVLNQQLTNHIRDTLPGLRNKLSQLLSIEKEVEEYKNFRPDDPARKTKALLQMVQQFAVDFEKRIE
 GSGDQIDTYELSGGARINRIFHERFPFELVKMEFDEKELRREISYAIAKNIHGIRTGLFTPDMAFETIVK
 KQVKKIREPCLKCVDMVISLSTVTRQCTKKLQYPRLREEMERIVTTHIREREGRTKEQVMLLIDIEL
 AYMNTNHEDFIGFANAQQRSNQMNKKKTSGNQDEILVIRKGLWTINNIGIMKGGSKYWFVLTAEENLSW
 YKDDEEKEKKYMLSVDNLKLRDVEKGFMSKHIIFALFNTEQRNVYKDYRQLELACETQEVDVSWKASFL
 RAGVYPERVGDKEKASETEENGSDSFMHSMQPQLERQVETIRNLVDSYMAIVNKTVRDLMPKTIHMLMI
 NNTKEFIFSELLANLYSCGDQNTLMEESAQAQRDEMLRMYHALKEALSIGDINTTIVSTPMPFPVD
 DSWLQVQSVPAGRRSPTSPTQRRAPAVPPARPGSRGPAPGPPAGSALGGAPPVPSRPGASPDFFGP
 PPQVPSRPNRAPPVPRITISDP

10

デスレセプター 4 (配列番号 : 5) N C B I 寄託番号 : O O O 2 2 0

MAPPPARVHLGAFLAVTPNPGSAASGTEAAAATPSKVVWSSAGRIEPRGGGRGALPTSMGQHGPSARAR
 AGRAPGRPREAREASPRLRVHKTFKVVVGVLLQVVPSSAATIKLHDQSIGTQQWEHSPGLGELCPPGSHR
 SEHPGACNRCTEGVGYTNASNNLFACLPCTACKSDEEERSPCTTTRNTACQCKPGTFRNDNSAEMCRKC
 SRGCPRGMVYKDCPTPWSIDIECVHKESGNHNIWVILVVTLLVPLLVAVLIVCCCIGSGCGDPPKCMD
 RVCFWRLGLLRGPAGAEDNAHNEILSNADSLSTFVSEQMESQEPADLTGVTVQSPGEAQCLLGPAAEAG
 SQRRLLVPANGADPTETLMLFFDKFANIVPFDSDWQLMRQLDLTKNEIDVVRAGTAGPGDALYAMLMK
 WVNKTGRNASIHTLLDALERMEERHAKKEIKQDLLVDSGKFIYLEDGTGSAVSLE

デスレセプター 5 (配列番号 : 6) N C B I 寄託番号 : A A B 6 7 1 0 3

20

MEQRGNAPAAASGARKRHGPGPREARGARPGLRVPKTLVVLVVAVLLLVSAESALITQODLAPQORAAP
 QQKRSSPSEGLCPPGHHSIEDGRDCISCKYQDYSTHWNDLLFCLRCTRCDSGEVELSPCTTTRNTVCQ
 CEEGTREEDSPENCRKCTGCPRGVMVKGDCPTWSDIECVHKESGIIIGVTVAAVVLIIVAVFVCKSLL
 WKKVLPYLKGI CSGGGDPERVDRSSQRPGAEDNVLNEIVSILQPTQVPEQEMEVQEPAPTGVNMLSP
 GESEHLLPEAEARSQRRRLV PANEGDPTETLRQC FDDFADLVPFDSWEPLMRKLGMDNEIKVAKAE
 AAGHRDTLYTMLIKWVNKTGRDASVHTLLDALETLGERLAKQKIEDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

A P O 2 L / T R A I L (配列番号 : 7) N C B I 寄託番号 : N P 0 0 3 8 0 1

MAMMEVQGGPSLQGTQCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYFTNELKQMDKYSKSGIACFLKEDDSYWDPN
 EESMNSPCWQVQWQLRQLVRKMILRTSEETISTVQEKQNI SPLVRERGPORVAAHITGTRGRSNTLSS
 PNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMV
 QYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRI FVSVTNEHLIDMDHEASFFG
 AFLVG

30

F A S (配列番号 : 8) N C B I 寄託番号 : A A A 6 3 1 7 4

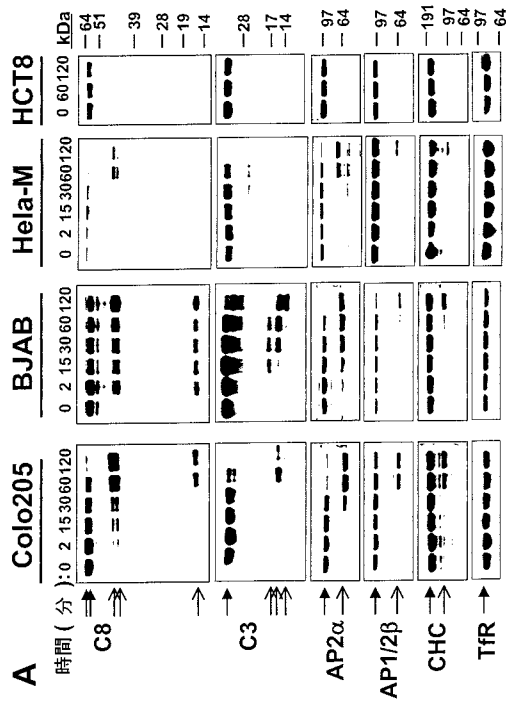
MLGIWTLPLVLTSVARLSSKSVNAQVTDINSKGLELRKTVTTVETQNLGLHHDGQFCHKPCPPGERK
 ARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTDKAHFSSKCRRCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNST
 VCEHCDPCTKCEHGIIECTLTSTNKCKEESRSNLGWLCLLLLP IPLIVVVKRKEVQKTCRKHRENQ
 GSHESTPLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKGFRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQ
 LLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKCANLCTLAEKIQTIIKDI TSDSENSNFRNEIQSLV

F A S リガンド (配列番号 : 9) N C B I 寄託番号 : N P 0 0 0 6 3 0

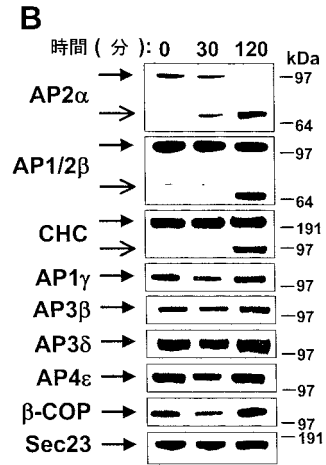
40

MQQPFNYYPQIYVWDSSASSPWAPPGTVLPCPTSVPRRPGQRRPPPPPPPPPLPPPPPPPLPPLPLP
 PLKKRGNHSTGLCLLVMFFMVLVALVGLGLGMFQLFHLQKELAELESTSQMHTASSLEKQIGHPSPPP
 EKKELRKAHLTGKSNRSMPLEWEDTYGIVLLSGVYKKGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPL
 SHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKMMSYCTTGQMWARSSYLGAVFNLTSADHLYVNVSELSLVNFEESQTF
 GLYKL

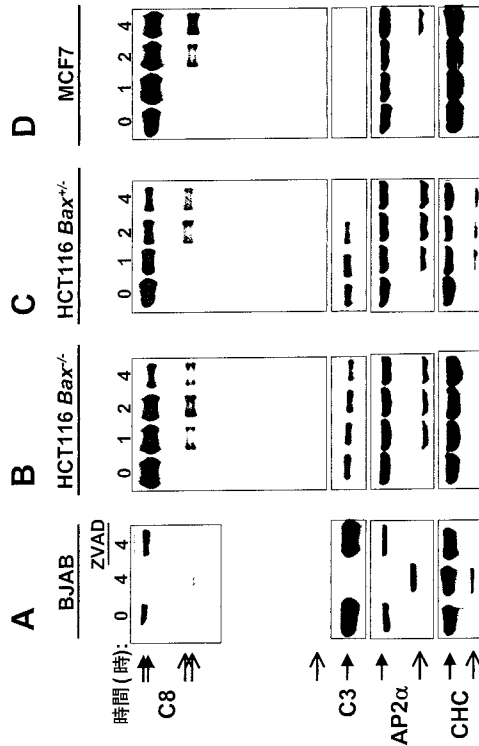
【 図 1 A 】



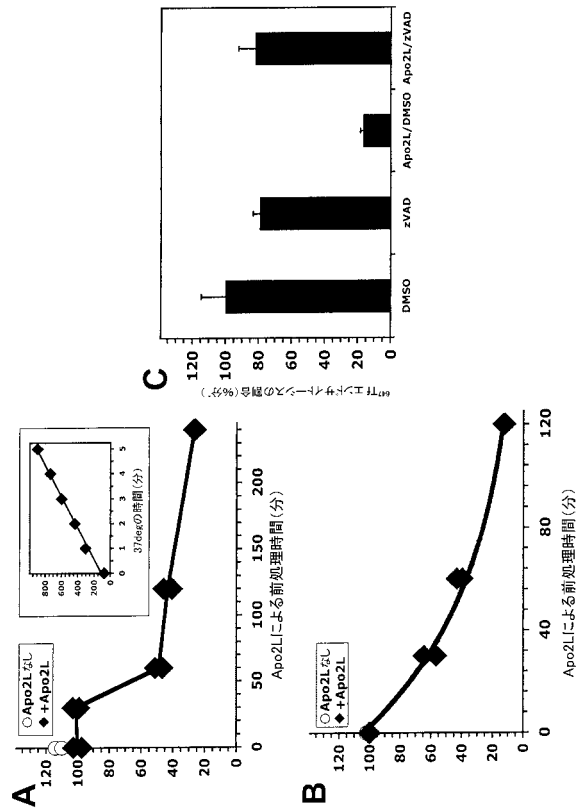
【 図 1 B 】



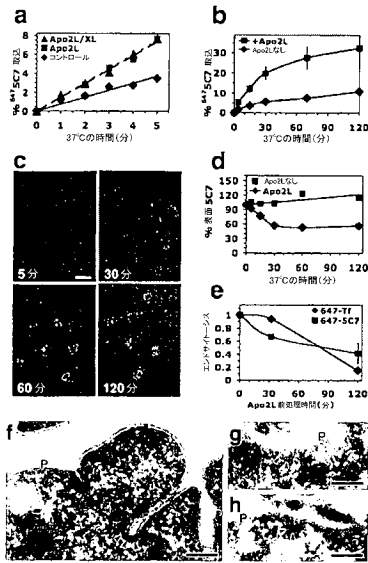
【 図 2 】



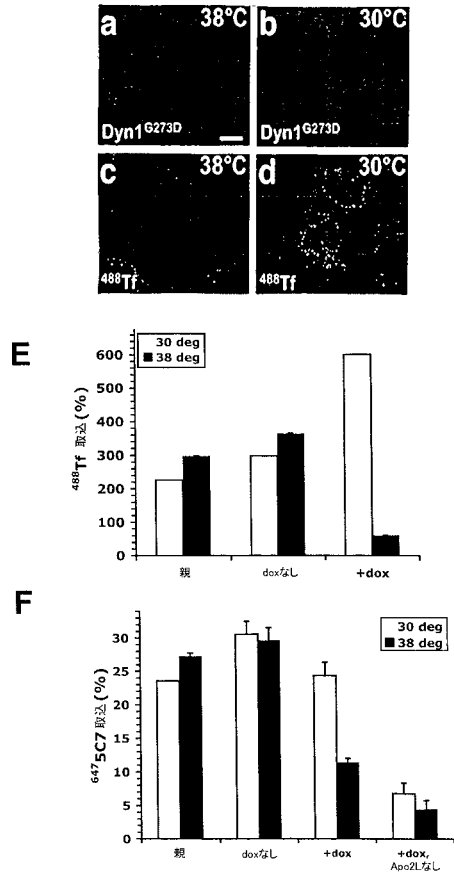
【 図 3 】



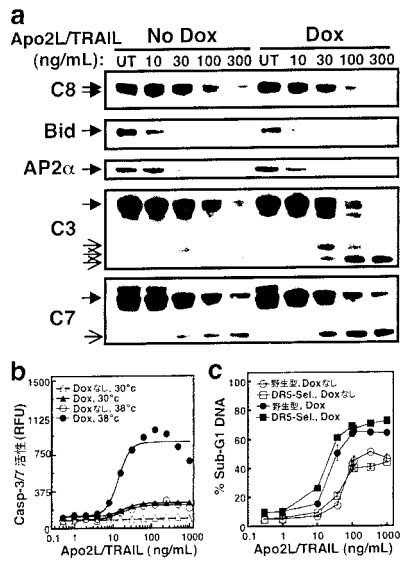
【 図 4 】



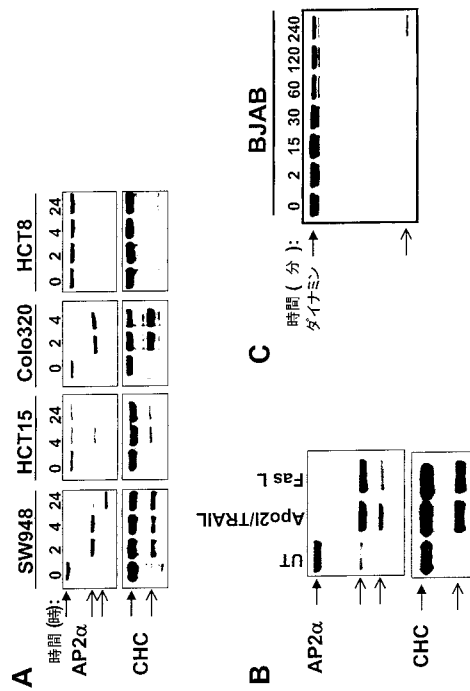
【 図 5 】



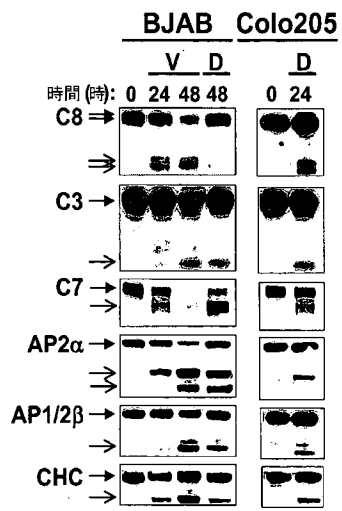
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 1 2 】



【 配 列 表 】

2009541741000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/014382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/17648 A (PROMEGA CORP [US]; RISS TERRY [US]) 30 March 2000 (2000-03-30) claims 14,30 examples 3,4,7,8	1-19
A	WETTEY FRANK R ET AL: "Controlled elimination of clathrin heavy-chain expression in DT40 lymphocytes." SCIENCE (NEW YORK, N.Y.) 30 AUG 2002, vol. 297, no. 5586, 30 August 2002 (2002-08-30), pages 1521-1525, XP002464805 ISSN: 1095-9203 the whole document	1-19
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 16 January 2008		Date of mailing of the international search report 01/02/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schalich, Juliane

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2007/014382

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HANSEN B ET AL: "Stabilin-1 and stabilin-2 are both directed into the early endocytic pathway in hepatic sinusoidal endothelium via interactions with clathrin/AP-2, independent of ligand binding" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, SAN DIEGO, CA, US, vol. 303, no. 1, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 160-173, XP004657342 ISSN: 0014-4827 page 161, column 2, paragraph 2; figure 9	20
P, X	AUSTIN CARY D ET AL: "Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 5 JUL 2006, vol. 103, no. 27, 5 July 2006 (2006-07-05), pages 10283-10288, XP002464806 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-20
A	ENARI MASATO ET AL: "Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription" GENES & DEVELOPMENT, vol. 20, no. 9, May 2006 (2006-05), pages 1087-1099, XP002464807 ISSN: 0890-9369 the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/014382

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0017648 A	30-03-2000	AT 382148 T	15-01-2008
		AU 6162999 A	10-04-2000
		EP 1116029 A1	18-07-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
		A 6 1 P	35/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ローレンス , デーヴィッド , エー .

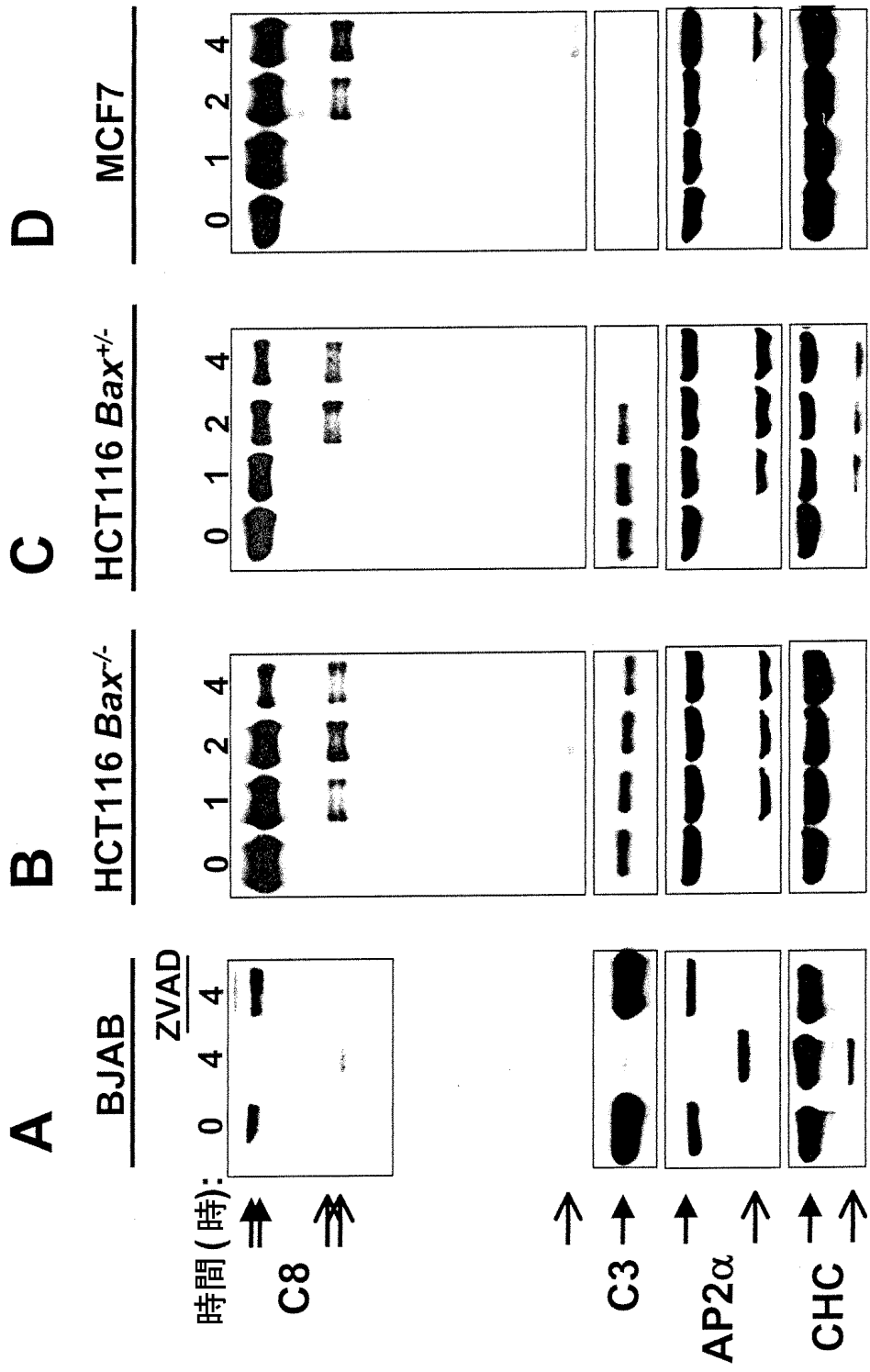
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 6 , サン フランシスコ , 1 0 番 アヴェニュー
2 0 6 6

(72)発明者 アシュケナジ , アヴィ .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2 , サン マテオ , タリータウン ストリート
1 4 5 6

Fターム(参考) 2G045 AA26 BB20 CB02 DA14 DA36 DA78 FB02 FB03
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ53 QQ91 QR77 QS25 QS34
4C084 BA01 BA08 BA22 BA44 NA14 ZB26
4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 CC23 EE01

【要約の続き】



专利名称(译)	观察细胞凋亡的方法和材料		
公开(公告)号	JP2009541741A	公开(公告)日	2009-11-26
申请号	JP2009516559	申请日	2007-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	オースティンケアリーデー ローレンスデーヴィッドエー アシュケナジアヴィ		
发明人	オースティン, ケアリー, デー. ローレンス, デーヴィッド, エー. アシュケナジ, アヴィ.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50 C12Q1/04 C12Q1/68 A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	G01N33/574 G01N2510/00		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/15.Z G01N33/53.Y G01N33/50.Z C12Q1/04 C12Q1/68.A A61K37/02 A61K39/395.N A61P35/00		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB20 2G045/CB02 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ91 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01		
优先权	60/814955 2006-06-20 US		
其他公开文献	JP5222845B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了观察细胞凋亡过程中产生的蛋白质片段以观察哺乳动物细胞的这一过程的方法和材料。本发明的实施方案可用于检查哺乳动物癌细胞对凋亡诱导剂的敏感性，例如通过观察细胞凋亡。

