

(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2005-508162

(P2005-508162A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 19/02	4 B O 6 4
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 25/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/00	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 155 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-532638 (P2003-532638)	(71) 出願人	596168317
(86) (22) 出願日	平成14年10月1日 (2002.10.1)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月2日 (2004.4.2)		GENENTECH, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/031210		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(87) 国際公開番号	W02003/029420		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開日	平成15年4月10日 (2003.4.10)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	60/326, 622	(74) 代理人	100109726
(32) 優先日	平成13年10月2日 (2001.10.2)		弁理士 園田 吉隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101199
			弁理士 小林 義敦
		(72) 発明者	ケリー, ロバート エフ.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
			66, サン ブルーノ, サン フェリ
			ペ アベニュー 1029
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 A p o - 2 リガンド変異体とその使用法

(57) 【要約】

本開示はA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを提供する。A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを製造し、化学的に修飾するための方法もまた提供される。更に、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドの製剤が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；R 1 7 0 S；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；H 2 6 4 Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の A p o - 2 リガンド変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。 10

【請求項 3】

請求項 2 に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 5】

上記宿主細胞は大腸菌、酵母細胞又は C H O 細胞である、請求項 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

（a）請求項 4 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞を提供し；（b）培養培地を提供し；（c）A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを発現するのに十分な条件下で培養培地中で宿主細胞を培養し；（d）宿主細胞又は培養培地から A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを回収し；（e）A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを精製する工程を含んでなる、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドの製造方法。 20

【請求項 7】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドの実際の分子量を増大させる一又は複数のポリオール基に抱合又は結合されている、請求項 1 に記載の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 8】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドのインビボ半減期を増大させる一又は複数のポリオール基に抱合又は結合されている、請求項 1 に記載の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。 30

【請求項 9】

一又は複数のポリオール基がポリ(エチレングリコール)である、請求項 7 に記載の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 10】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、約 2 0 0 0 ダルトンの分子量を有するポリ(エチレングリコール)の一分子に抱合又は結合されている、請求項 9 に記載の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 11】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、可溶型細胞外ドメイン A p o - 2 リガンドポリペプチドである、請求項 1 に記載の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。 40

【請求項 12】

図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；R 1 7 0 S；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；H 2 6 4 Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドであって、D R 4 レセプター及び D R 5 レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 13】

図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S96C；S101C；S111C；V114C；R115C；E116C；N134C；N140C；E144C；N152C；S153C；R170C；R170K；R170S；K179C；D234C；E249C；R255C；E263C；H264Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたApo-2リガンド変異体ポリペプチドであって、一又は複数の哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導するApo-2リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 14】

請求項12に記載のApo-2リガンド変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。 10

【請求項 15】

請求項14に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 16】

請求項15に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 17】

上記宿主細胞は大腸菌、酵母細胞又はCHO細胞である、請求項16に記載の宿主細胞。

【請求項 18】

（a）請求項15に記載のベクターを含んでなる宿主細胞を提供し；（b）培養培地を提供し；（c）Apo-2リガンド変異体ポリペプチドを発現するのに十分な条件下で培養培地中で宿主細胞を培養し；（d）宿主細胞又は培養培地からApo-2リガンド変異体ポリペプチドを回収し；（e）Apo-2リガンド変異体ポリペプチドを精製する工程を含んでなる、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドの製造方法。 20

【請求項 19】

Apo-2リガンド変異体ポリペプチドが、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドの実際の分子量を増大させる一又は複数のポリオール基に抱合又は結合されている、請求項12に記載のApo-2リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 20】

Apo-2リガンド変異体ポリペプチドが、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドのインビボ半減期を増大させる一又は複数のポリオール基に抱合又は結合されている、請求項12に記載のApo-2リガンド変異体ポリペプチド。 30

【請求項 21】

一又は複数のポリオール基がポリ(エチレングリコール)である、請求項19に記載のApo-2リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 22】

Apo-2リガンド変異体ポリペプチドが、約2000ダルトンの分子量を有するポリ(エチレングリコール)の一分子に抱合又は結合されている、請求項21に記載のApo-2リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 23】

Apo-2リガンド変異体ポリペプチドが、可溶型細胞外ドメインApo-2リガンドポリペプチドである、請求項12に記載のApo-2リガンド変異体ポリペプチド。 40

【請求項 24】

一又は複数のポリオール基に抱合又は結合したApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含有する組成物であって、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドが、図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S96C；S101C；S111C；V114C；R115C；E116C；N134C；N140C；E144C；N152C；S153C；R170C；R170K；R170S；K179C；D234C；E249C；R255C；E263C；H264Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる組成物。

【請求項 25】

一又は複数のポリオール基に抱合又は結合したA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する組成物であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図1（配列番号：1）の天然配列A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の次の残基位置のアミノ酸置換：S 9 6；S 1 0 1；S 1 1 1；V 1 1 4；R 1 1 5；E 1 1 6；N 1 3 4；N 1 4 0；E 1 4 4；N 1 5 2；S 1 5 3；R 1 7 0；K 1 7 9；D 2 3 4；E 2 4 9；R 2 5 5；E 2 6 3；H 2 6 4に抱合又は結合した一又は複数のポリオール基を有するアミノ酸配列を含んでなる組成物。

【請求項26】

一又は複数のポリオール基に抱合又は結合したA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する組成物であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図1（配列番号：1）の天然配列A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の次の残基位置のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；H 2 6 4 Cに抱合又は結合した一又は複数のポリオール基を有するアミノ酸配列を含んでなる組成物。

【請求項27】

一又は複数のポリオール基がポリエチレングリコールである、請求項24に記載の組成物。

【請求項28】

ポリエチレングリコールが約1000から約25000ダルトンの分子量を有する、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

ポリエチレングリコールが約2000ダルトンの分子量を有する、請求項28に記載の組成物。

【請求項30】

一又は複数のポリオール基に抱合又は結合したA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する組成物であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図1（配列番号：1）の天然配列A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；R 1 7 0 S；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；H 2 6 4 Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含み、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、DR4レセプター及びDR5レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する組成物。

【請求項31】

一又は複数のポリオール基に抱合又は結合したA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する組成物であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図1（配列番号：1）の天然配列A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置のアミノ酸置換：S 9 6；S 1 0 1；S 1 1 1；V 1 1 4；R 1 1 5；E 1 1 6；N 1 3 4；N 1 4 0；E 1 4 4；N 1 5 2；S 1 5 3；R 1 7 0；K 1 7 9；D 2 3 4；E 2 4 9；R 2 5 5；E 2 6 3；H 2 6 4に抱合又は結合した一又は複数のポリオール基を有するアミノ酸配列を含み、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、DR4レセプター及びDR5レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する組成物。

【請求項32】

一又は複数のポリオール基に抱合又は結合したA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する組成物であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図1（配列番号：1）の天然配列A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5

C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C に抱合又は結合した一又は複数のポリオール基を有するアミノ酸配列を含み、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、D R 4 レセプター及びD R 5 レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する組成物。

【請求項 3 3】

一又は複数のポリオール基がポリエチレングリコールである、請求項 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

ポリエチレングリコールが約 1 0 0 0 から約 2 5 0 0 0 ダルトンの分子量を有する、請求項 3 3 に記載の組成物。 10

【請求項 3 5】

ポリエチレングリコールが約 2 0 0 0 ダルトンの分子量を有する、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

図 1 (配列番号: 1) の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1 (配列番号: 1) の次の残基位置: S 9 6 ; S 1 0 1 ; S 1 1 1 ; V 1 1 4 ; R 1 1 5 ; E 1 1 6 ; N 1 3 4 ; N 1 4 0 ; E 1 4 4 ; N 1 5 2 ; S 1 5 3 ; R 1 7 0 ; K 1 7 9 ; D 2 3 4 ; E 2 4 9 ; R 2 5 5 ; E 2 6 3 ; H 2 6 4 に一又は複数のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる A p o - 2 リガンド三量体。 20

【請求項 3 7】

図 1 (配列番号: 1) の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1 (配列番号: 1) の残基位置に次のアミノ酸置換: S 9 6 C ; S 1 0 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 3 8】

図 1 (配列番号: 1) の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1 (配列番号: 1) の残基位置に次のアミノ酸置換: S 9 6 C ; S 1 0 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる A p o - 2 リガンド三量体であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、D R 4 レセプター及びD R 5 レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する A p o - 2 リガンド三量体。 30

【請求項 3 9】

図 1 (配列番号: 1) の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1 (配列番号: 1) の残基位置に次のアミノ酸置換: S 9 6 C ; S 1 0 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる A p o - 2 リガンド三量体であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、一又は複数の哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導する A p o - 2 リガンド三量体。 40

【請求項 4 0】

三量体が少なくとも二の上記 A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含む、請求項 3 6 50

に記載の A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 4 1】

A p o - 2 リガンド三量体が三の上記 A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含む、請求項 3 6 に記載の A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 4 2】

一又は複数のポリオール基に抱合又は結合した少なくとも一の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる A p o - 2 リガンド三量体であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置の次のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；R 1 7 0 S；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含む A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 4 3】

一又は複数のポリオール基に抱合又は結合した少なくとも一の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる A p o - 2 リガンド三量体であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；H 2 6 4 C に抱合又は結合した一又は複数のポリオール基を有するアミノ酸配列を含み、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、D R 4 レセプター及び D R 5 レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 4 4】

三量体が一又は複数のポリオール基に抱合又は結合した三の上記 A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含む、請求項 4 2 に記載の A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 4 5】

一又は複数のポリオール基がポリエチレングリコールである、請求項 4 2 に記載の A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 4 6】

ポリエチレングリコールが約 1 0 0 0 から約 2 5 0 0 0 ダルトンの分子量を有する、請求項 4 5 に記載の A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 4 7】

ポリエチレングリコールが約 2 0 0 0 ダルトンの分子量を有している、請求項 4 6 に記載の A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 4 8】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが一又は複数の哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導する、請求項 4 2 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 4 9】

図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、
（a）図 3 に示された D R 5 ・ A p o 2 L 複合体のレセプター接触領域の外側にあり；かつ
（b）図 3 に示された D R 5 ・ A p o 2 L 複合体の結晶構造において高溶媒到達性を示す；
残基位置となるように図 3 に示された D R 5 ・ A p o 2 L 複合体の X 線結晶構造から同定された残基位置に一又は複数のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含んでなる単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 5 0】

残基位置が、図 3 に示された D R 5 ・ A p o 2 L 複合体の結晶構造に示された上部から底

部の A p o 2 L 単量体の一面に位置している、請求項 49 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 51】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが図 1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：V 1 1 4；R 1 1 5；E 1 1 6；N 1 3 4；N 1 4 0；E 1 4 4；N 1 5 2；N 1 5 3；R 1 7 0；D 2 3 4；E 2 4 9；R 2 5 5；E 2 6 3；H 2 6 4 の一又は複数を有する、請求項 49 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 52】

単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが一又は複数のポリオール基に抱合又は結合している、請求項 49 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド 10

【請求項 53】

一又は複数のポリオール基がポリエチレングリコールである、請求項 52 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 54】

ポリエチレングリコールが約 1 0 0 0 から約 2 5 0 0 0 ダルトンの分子量を有する、請求項 53 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 55】

ポリエチレングリコールが約 2 0 0 0 ダルトンの分子量を有する、請求項 54 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。 20

【請求項 56】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、D R 4 レセプター及び D R 5 レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する、請求項 49 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 57】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、一又は複数の哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導する、請求項 49 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 58】

S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C 30
；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；R 1 7 0 S；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；及び H 2 6 4 C からなる群から選択される図 1（配列番号：1）の残基位置にアミノ酸置換を有することによって、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なるアミノ酸配列を含んでなる単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 59】

約 2 0 0 0 ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコール基に抱合又は結合した A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する組成物であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なるアミノ酸配列を含み、ポリエチレングリコール基は S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 40
1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；R 1 7 0 S；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；及び H 2 6 4 C からなる群から選択される図 1（配列番号：1）の残基位置に抱合又は結合している組成物。

【請求項 60】

約 2 0 0 0 ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコール基に抱合又は結合した三の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる A p o - 2 リガンド三量体であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なるアミノ酸配列を含み、ポリエチレングリコール基は S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C； 50

N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; 及び H 2 6 4 C からなる群から選択される図 1 (配列番号: 1) の残基位置に抱合又は結合している A p o - 2 リガンド三量体。

【請求項 6 1】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、D R 4 レセプター及び D R 5 レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する、請求項 6 0 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

【請求項 6 2】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、一又は複数の哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導する、請求項 6 0 に記載の単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチド。

10

【請求項 6 3】

製薬的に許容可能な担体と混合せしめられて、図 1 (配列番号: 1) の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1 (配列番号: 1) の残基位置に次のアミノ酸置換: S 9 6 C ; S 1 0 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる有効量の単離 A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する製薬組成物。

20

【請求項 6 4】

製薬的に許容可能な担体と混合せしめられて、一又は複数のポリオール基に抱合又は結合した A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる有効量の組成物を含んでなり、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図 1 (配列番号: 1) の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1 (配列番号: 1) の残基位置に次のアミノ酸置換: S 9 6 C ; S 1 0 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなり、組成物が、D R 4 レセプター及び D R 5 レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する製薬組成物。

30

【請求項 6 5】

製薬的に許容可能な担体と混合せしめられて、図 1 (配列番号: 1) の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1 (配列番号: 1) の次の残基位置に: S 9 6 ; S 1 0 1 ; S 1 1 1 ; V 1 1 4 ; R 1 1 5 ; E 1 1 6 ; N 1 3 4 ; N 1 4 0 ; E 1 4 4 ; N 1 5 2 ; S 1 5 3 ; R 1 7 0 ; K 1 7 9 ; D 2 3 4 ; E 2 4 9 ; R 2 5 5 ; E 2 6 3 ; H 2 6 4 の一又は複数のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含んでなる少なくとも一の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる有効量の A p o - 2 リガンド三量体を含有する製薬組成物。

【請求項 6 6】

上記製薬組成物は一又は複数の二価金属イオンを更に含有する、請求項 6 3 に記載の製薬組成物。

40

【請求項 6 7】

A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが一又は複数の哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導する、請求項 6 3 に記載の製薬組成物。

【請求項 6 8】

D R 4 レセプター及び D R 5 レセプターからなる群から選択されるレセプターを発現する哺乳動物細胞を、図 1 (配列番号: 1) の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1 (配列番号: 1) の残基位置に次のアミノ酸置換: S 9 6 C ; S 1 0 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ;

50

D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる治療的有効量の単離 A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドに暴露することを含む、哺乳動物においてアポトーシスを誘導する方法。

【請求項 6 9】

D R 4 レセプター及び D R 5 レセプターからなる群から選択されるレセプターを発現する哺乳動物細胞を、一又は複数のポリオール基に抱合又は結合した A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する治療的有効量の組成物に暴露することを含んでなる哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置のアミノ酸置換：S 9 6 ; S 1 0 1 ; S 1 1 1 ; V 1 1 4 ; R 1 1 5 ; E 1 1 6 ; N 1 3 4 ; N 1 4 0 ; E 1 4 4 ; N 1 5 2 ; S 1 5 3 ; R 1 7 0 ; K 1 7 9 ; D 2 3 4 ; E 2 4 9 ; R 2 5 5 ; E 2 6 3 ; H 2 6 4 に抱合又は結合した一又は複数のポリオール基を有するアミノ酸配列を含んでなる方法。 10

【請求項 7 0】

D R 4 レセプター及び D R 5 レセプターからなる群から選択されるレセプターを発現する哺乳動物細胞を、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S 9 6 C ; S 1 0 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる少なくとも一の A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる治療的有効量の A p o - 2 リガンド三量体に暴露することを含む、哺乳動物においてアポトーシスを誘導する方法。 20

【請求項 7 1】

哺乳動物細胞が大腸又は結腸直腸癌細胞である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 2】

哺乳動物細胞における癌を治療する方法において、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S 9 6 C ; S 1 0 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる有効量の単離 A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを上記哺乳動物に投与することを含む方法。 30

【請求項 7 3】

哺乳動物細胞における癌を治療する方法において、一又は複数のポリオール基に抱合又は結合した A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する有効量の組成物を上記哺乳動物に投与することを含み、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置のアミノ酸置換：S 9 6 ; S 1 0 1 ; S 1 1 1 ; V 1 1 4 ; R 1 1 5 ; E 1 1 6 ; N 1 3 4 ; N 1 4 0 ; E 1 4 4 ; N 1 5 2 ; S 1 5 3 ; R 1 7 0 ; K 1 7 9 ; D 2 3 4 ; E 2 4 9 ; R 2 5 5 ; E 2 6 3 ; H 2 6 4 に抱合又は結合した一又は複数のポリオール基を有するアミノ酸配列を含み、組成物が、D R 4 レセプター及び D R 5 レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する方法。 40

【請求項 7 4】

哺乳動物細胞における癌を治療する方法において、図 1（配列番号：1）の天然配列 A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S 9 6 C ; S 1 0 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる少なくとも一の A p o - 2 リガ 50

ンド変異体ポリペプチドを含んでなる有効量のA p o - 2 リガンド三量体を上記哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 7 5】

上記癌が肺癌、乳癌、大腸癌又は結腸直腸癌である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 6】

哺乳動物細胞における免疫関連疾患を治療する方法において、図 1（配列番号：1）の天然配列A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；R 1 7 0 S；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；H 2 6 4 Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる有効量の単離A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを上記哺乳動物に投与することを含む方法。 10

【請求項 7 7】

哺乳動物細胞における免疫関連疾患を治療する方法において、一又は複数のポリオール基に抱合又は結合したA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含有する有効量の組成物を上記哺乳動物に投与することを含み、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドが、図 1（配列番号：1）の天然配列A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置のアミノ酸置換：S 9 6；S 1 0 1；S 1 1 1；V 1 1 4；R 1 1 5；E 1 1 6；N 1 3 4；N 1 4 0；E 1 4 4；N 1 5 2；S 1 5 3；R 1 7 0；K 1 7 9；D 2 3 4；E 2 4 9；R 2 5 5；E 2 6 3；H 2 6 4に抱合又は結合した一又は複数のポリオール基を有するアミノ酸配列を含み、組成物が、D R 4 レセプター及びD R 5 レセプターからなる群から選択されるポリペプチドに結合する方法。 20

【請求項 7 8】

哺乳動物細胞における免疫関連疾患を治療する方法において、図 1（配列番号：1）の天然配列A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 0 1 C；S 1 1 1 C；V 1 1 4 C；R 1 1 5 C；E 1 1 6 C；N 1 3 4 C；N 1 4 0 C；E 1 4 4 C；N 1 5 2 C；S 1 5 3 C；R 1 7 0 C；R 1 7 0 K；R 1 7 0 S；K 1 7 9 C；D 2 3 4 C；E 2 4 9 C；R 2 5 5 C；E 2 6 3 C；H 2 6 4 Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる少なくとも一のA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなる有効量のA p o - 2 リガンド三量体を上記哺乳動物に投与することを含む方法。 30

【請求項 7 9】

上記免疫関連疾患が関節炎又は多発性硬化症である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 8 0】

少なくとも二のA p o - 2 リガンド三量体を結合させること含むA p o - 2 リガンドオリゴマーの調製方法であって、各A p o - 2 リガンド三量体中の少なくとも一のA p o - 2 リガンド単量体が、図 1（配列番号：1）のアミノ酸残基位置 1 7 0 にシステインアミノ酸置換を有するA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含み、A p o - 2 リガンド三量体が、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドの位置 1 7 0 のシステインアミノ酸残基間でジスルフィド結合によって結合している方法。 40

【請求項 8 1】

少なくとも二のA p o - 2 リガンド三量体を含んでなるA p o - 2 リガンドオリゴマーであって、各A p o - 2 リガンド三量体中の少なくとも一のA p o - 2 リガンド単量体が、図 1（配列番号：1）のアミノ酸残基位置 1 7 0 にシステインアミノ酸置換を有するA p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含み、A p o - 2 リガンド三量体が、A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドの位置 1 7 0 のシステインアミノ酸残基間でジスルフィド結合によって結合しているA p o - 2 リガンドオリゴマー。

【請求項 8 2】

容器と、該容器内に、図 1（配列番号：1）の天然配列A p o - 2 リガンドポリペプチド配列とは異なり、図 1（配列番号：1）の残基位置の次のアミノ酸置換：S 9 6 C；S 1 50

O 1 C ; S 1 1 1 C ; V 1 1 4 C ; R 1 1 5 C ; E 1 1 6 C ; N 1 3 4 C ; N 1 4 0 C ; E 1 4 4 C ; N 1 5 2 C ; S 1 5 3 C ; R 1 7 0 C ; R 1 7 0 K ; R 1 7 0 S ; K 1 7 9 C ; D 2 3 4 C ; E 2 4 9 C ; R 2 5 5 C ; E 2 6 3 C ; H 2 6 4 C の一又は複数を有するアミノ酸配列を含む単離された A p o - 2 リガンド変異体ポリペプチドを含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般に A p o - 2 リガンド変異体、特に A p o - 2 リガンド置換変異体、並びに 10
その化学的修飾形態に関する。

【0002】

(発明の背景)

哺乳動物における細胞数のコントロールは、細胞増殖と細胞死のバランスにより部分的に決定され则认为られている。しばしば壊死性細胞死と称される細胞死の一形態は、典型的には、ある種の外傷又は細胞傷害の結果生じる細胞死の病理的形態として特性付けられる。これに対して、通常は規則的又はコントロールされた状態で進行する細胞死の他の「生理的」形態がある。細胞死のこの規則的又はコントロールされた形態は、しばしば「アポトーシス」と称される [例えば、Barrら, Bio/Technology, 12: 487-493(1994); Stellerら, Science, 267: 1445-1449(1995)を参照]。アポトーシス性細胞死は、免疫系にお 20
けるクローン選択と胚の発達を含む多くの生理的プロセスにおいて自然に生じる [Itohら, Cell, 66: 233-243(1991)]。

【0003】

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- α 」)、リンホトキシン- β (「LT- β 」)、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(Apo2L又はTRAILとも称される)、Apo-3リガンド(TWEAKとも称される)、APRIL、OPGリガンド(RANKリガンド、ODF又は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); Schmidら, Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 881 (1986); Dealtryら, Eur. J. Immunol., 17: 689 (1987); Pittiら, J. Biol. Chem., 271: 12687-12690(1996); Wileyら, Immunity, 3: 673-682(1995); Browningら, Cell, 72: 847-856(1993); Armitageら, Nature, 357: 80-82(1992), 1997年1月16日公開のW097/01633; 1997年7月17日公開のW097/25428; Marstersら, Curr. Biol., 8: 525-528(1998); Chicheporticheら, Biol. Chem., 272: 32401-32410(1997); Hahneら, J. Exp. Med., 188: 1185-1190(1998); 1998年7月2日公開のW098/28426; 1998年10月22日公開のW098/46751; 1998年5月7日公開のW0/98/18921; Mooreら, Science, 285: 260-263(1999); Shuら, J. Leukocyte Biol., 65: 680(1999); Schneiderら, J. Exp. Med., 189: 1747-1756(1999); Mukh 40
opadhyayら, 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。

【0004】

Apo2L/TRAILはサイトカインのTNFファミリーのメンバーとして数年前に同定された。 [例えばWileyら, Immunity, 3: 673-682 (1995); Pittiら, J. Biol. Chem., 271: 12697-12690 (1996); 2001年9月4日発行の米国特許第6284236を参照]。完全長ヒトApo2L/TRAIL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による切断を通して、そ 50

のポリペプチドの天然の可溶型を生じうる [Marianiら, 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 T N F 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ら, Molec. Cell, 4:563-571 (1999); Hymowitzら, Biochemistry, 39:633-644 (2000)]。しかし、他の T N F 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ら; Bodmerら, J. Biol. Chem., 275:20632-20637 (2000)]。

A p o 2 L / T R A I L は、リウマチ様関節炎のような自己免疫疾患を含む免疫系の調節に役割を担っている可能性があることが文献において報告されている [例えば、Thomasら, J. Immunol., 161:2195-2200 (1998); Johnsenら, Cytokine, 11:664-672 (1999); Griffithら, J. Exp. Med., 189:1343-1353 (1999); Songら, J. Exp. Med., 191:1095-1103 (2000)]。

【0005】

A p o 2 L / T R A I L の可溶型はまた大腸、肺、乳房、前立腺、膀胱、腎臓、卵巣及び脳腫瘍を含むインビトロの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ら; 上掲の Pittiら; Riegerら, FEBS Letters, 427:124-128 (1998); Ashkenaziら, J. Clin. Invest., 104:155-162 (1999); Walczakら, Nature Med., 5:157-163 (1999); Keaneら, Cancer Research, 59:734-741 (1999); Mizutaniら, Clin. Cancer Res., 5:2605-2612 (1999); Gazitt, Leukemia, 13:1817-1824 (1999); Yuら, Cancer Res., 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyanら, 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又は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ら; 上掲の Walczakら; Gliniakら, Cancer Res., 59:6153-6158 (1999); 上掲の Chinnaiyanら; Rothら, Biochem. Biophys. Res. Comm., 265:1999 (1999)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ら; 上掲の Walczakら]。Joらは、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ら, 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、死亡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ら, Nature Med., Letter to the Editor, 7:383-385 (2001); Qinら, Nature Med., Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)]。

【0006】

このような T N F ファミリーのサイトカインが介在する種々の細胞応答の誘導は、特異的な細胞レセプターに結合することにより開始されると考えられている。約 55-kDa (T N F R 1) と 75-kDa (T N F R 2) の 2つの異なる T N F レセプターが同定され [Hohmanら, J. Biol. Chem., 264:14927-14934 (1989); Brockhausら, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3127-3131 (1990); 1991年3月20日に公開された欧州特許第 417563号]、両者のレセプター型に対応するヒト及びマウス cDNA が単離され特徴付けられている [Loetscherら, Cell, 61:351 (1990); Schallら, Cell, 61:361 (1990); Smithら, Science, 248:1019-1023 (1990); Lewisら, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:2830-2834 (1991); Goodwinら, Mol. Cell. Biol., 11:3020-3026 (1991)]。広範な多型が両方の T N F レセプター遺伝子に伴っている [例えば Takaoら, Immunogenetics, 37:199-203 (1993)]。両方の T N F R が細胞外、膜貫通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いる。双方のレセプターの細胞外部分はまた可溶型 T N F 結合タンパク質

10

20

30

40

50

として天然に見出されている [Nophar, Yら, EMBO J., 9: 3269(1990); 及び Kohno, Tら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 8331(1990)]。組換え可溶型 T N F レセプターのクローニングは Hale 等 [J. Cell. Biochem. 増補 15F, 1991, p.113(P424)] によって報告されている。

【0007】

1 型又は 2 型の T N F R (T N F R 1 及び T N F R 2) の細胞外部分は、N H₂ -末端から出発して、1 から 4 と命名される 4 つのシステインに富んだドメイン (C R D) の反復アミノ酸配列パターンを含む [Schallら, 上掲; Loetscherら, 上掲; Smithら, 上掲; Nopharら, 上掲; Kohnoら, 上掲]。T N F R 1 における、4 つの C R D のおよその境界は次の通りである: C R D 1 - 約 1 4 から約 5 3 までのアミノ酸; C R D 2 - 約 5 4 から約 9 7 までのアミノ酸; C R D 3 - 約 9 8 から約 1 3 8 までのアミノ酸; C R D 4 - 約 1 3 9 から約 1 6 7 までのアミノ酸。T N F R 2 における、C R D 1 は 1 7 から約 5 4 までのアミノ酸; C R D 2 - 約 5 5 から約 9 7 までのアミノ酸; C R D 3 - 約 9 8 から約 1 4 0 までのアミノ酸; 及び C R D 4 - 約 1 4 1 から約 1 7 9 までのアミノ酸を含む [Bannerら, Cell, 73:431-435 (1993)]。リガンド結合における C R D の潜在的な役割はまた上掲の Bannerらに記載されている。

【0008】

C R D の類似の反復パターンが、p 7 5 神経成長因子レセプター (N G F R) [Johnsonら, Cell, 47: 545(1986); Radekら, Nature, 325: 593(1987)]、B 細胞抗原 C D 4 0 [Stamenkovicら, EMBO J., 8: 1403(1989)]、T 細胞抗原 O X 4 0 [Malletら, EMBO J., 9: 1063(1990)] 及び F a s 抗原 [Yoneharaら, J. Exp. Med. 及び Itohら, Cell, 66:233-243(1991)] を含む幾つかの他の細胞表面タンパク質に存在している。また、C R D はショープ (Shope) 及び粘液腫ボックスウィルスの可溶型 T N F R (s T N F R) 様の T 2 タンパク質にも見出されている [Uptonら, Virology, 160: 20-29(1987); Smithら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 176: 335(1991); Uptonら, Virology, 184: 370(1991)]。これらの配列の最適なアラインメントは、システイン残基の位置が良好に保存されていることを示している。これらレセプターは、しばしば集合的に、T N F / N G F レセプタースーパーファミリーのメンバーと称される。p 7 5 N G F R に関する最近の研究では、C R D 1 の欠失 [Welcher A.A.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:159-163 (1991)] 又はこのドメインでの 5 -アミノ酸の挿入が N G F 結合には殆ど又は全く効果がないことを示した [上掲の Yan, H. 及び Chao, M.V.]。p 7 5 N G F R はその C R D 4 及び膜貫通領域の間に約 6 0 のアミノ酸のプロリンリッチなストレッチを含んでおり、これは N G F 結合には関与していない [Peetre, C.ら, Eur. J. Hematol., 41:414-419 (1988); Seckinger, P.ら, J. Biol. Chem., 264:11966-11973 (1989); 上掲の Yan, H 及び Chao, M.V.]。

【0009】

リンホトキシン- α を除き、今日までに同定されている T N F ファミリーのリガンドは、I I 型の膜貫通タンパク質であり、その C 末端は細胞外にある。これに対して、今日までに同定されている T N F レセプター (T N F R) ファミリーのほとんどのレセプターは I 型の膜貫通タンパク質である。しかしながら、T N F リガンド及びレセプターファミリーの双方において、ファミリーメンバー間で同定された相同性は、主として細胞外ドメイン (「E C D」) において見出されている。T N F - α 、A p o - 1 リガンド及び C D 4 0 リガンドを含む T N F ファミリーサイトカインのいくつかは、細胞表面においてタンパク質分解的に切断され; それぞれの場合に得られるタンパク質は、典型的には、可溶性サイトカインとして機能するホモ三量体分子を形成する。また、T N F レセプターファミリーのタンパク質は、通常、タンパク質分解的に切断され、同族のサイトカインの阻害剤として機能し得る可溶性レセプターの E C D を放出する。

【0010】

最近になって、T N F R ファミリーの他のメンバーが同定されている。このような新たに同定された T N F R のメンバーは、C A R 1、H V E M 及びオステオプロテジェリン (osteoprotegerin) (O P G) [Brojatschら, Cell, 87:845-855 (1996); Montgomeryら, Cel

10

20

30

40

50

l, 87:427-436 (1996); Marstersら, J.Biol.Chem., 272:14029-14032 (1997); Simonetら, Cell, 89:309-319 (1997)]を含む。上掲のSimonetらは、他の周知のTNFR様分子とは異なり、OPGは疎水性の膜貫通スパニング配列を含まないと報告している。下記にて検討されているように、OPGはデコイ(囹)レセプターのように作用すると考えられている。

Panらは、「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ら, Science, 276:111-113(1997)]。DR4は細胞自殺機構に関与可能な細胞質デスドメインを含むと報告されている。Panらは、DR4がApo-2リガンド又はTRAILとして知られているリガンドに対するレセプターであると考えられることを開示している。

10

【0011】

Sheridanら, Science, 277: 818-821 (1997)及びパンら, Science, 277: 815-818 (1997)においては、Apo-2L/TRAILに対するレセプターと思われる他の分子が記載されている[1998年11月19日に公開の国際公開98/51793; 1998年9月24日公開の国際公開98/41629もまた参照のこと]。この分子は、DR5と呼ばれる(あるいは、Apo-2; TRAIL-R、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2又はKILLERとも呼ばれている[Screatonら, Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczakら, EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wuら, Nature Genetics, 17:141-143 (1997); 1998年8月20日公開の国際公開98/35986; 1999年1月21日公開の国際公開99/02653; 1998年2月25日公開の国際公開99/09165; 1999年3月11日公開の国際公開99/11791])。DR4と同様に、DR5は細胞質デスドメインを含み、アポトーシスをシグナル伝達可能であると報告されている。Apo-2L/TRAIL及びDR5の間に形成される複合体の結晶構造はHymowitzら, Molecular Cell, 4:563-571 (1999)に記載されている。

20

【0012】

最近同定されたTNFRファミリーメンバーの更なるグループは、「デコイレセプター」と称され、シグナル伝達トランスデューサーというよりはむしろ阻害剤として機能すると考えられている。このグループには、DCR1 (TRID、LIT又はTRAIL-R3とも称される)[Panら, Science, 276:111-113(1997); Sheridanら, Science, 277:818-821 (1997); McFarlaneら, J. Biol. Chem., 272:25417-25420(1997); Schneiderら, FEBS Letters, 416:329-334(1997); Degli-Espostiら, J. Exp. Med., 186:1165-1170(1997); 及びMongkolsapayaら, J. Immunol., 160:3-6(1998)]及びDCR2 (TRUND, 又はTRAIL-R4とも称される)[Marstersら, Curr. Biol., 7:1003-1006(1997); Panら, FEBS Letters, 424:41-45(1998); Degli-Espostiら, Immunity, 7:813-820(1997)]が含まれ、両者とも細胞表面分子であり、更にOPG[上掲のSimonetら]及びDCR3[Pitti等, Nature, 396:699-703(1998)]も含まれ、これら両者は分泌性の可溶性タンパク質である。Apo-2L/TRAILはDCR1、DCR2及びOPGと称されるレセプターに結合すると報告されている。

30

【0013】

Apo2L/TRAILは細胞表面「デスレセプター」DR4及びDR5を通して作用してカスパーゼ、又は細胞死プログラムを実施する酵素を活性化させると考えられている。

40

[例えば、Salvesenら, Cell, 91:443-446 (1997)を参照のこと]。リガンド結合の際、DR4とDR5は、双方共、FADD/Mort1[Kischkelら, Immunity, 12:611-620 (2000); Sprickら, Immunity, 12:599-609 (2000); Bodmerら, Nature Cell Biol., 2:241-243 (2000)]と称されるデスドメイン含有アダプター分子を通してアポトーシス発動因子であるカスパーゼ-8を独立して補充し活性化することによってアポトーシスを惹起しうる。DR4及びDR5とは対照的に、DCR1及びDCR2レセプターはアポトーシスをシグナル伝達しない。

サイトカインのTNFファミリー及びそれらのレセプターの概説については、Ashkenazi及びDixit, Science, 281:1305-1308(1998); Ashkenazi及びDixit, Curr. Opin. Cell Bi

50

ol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753(1997); 上掲のGruss及びDower、及びNagata, Cell, 88:355-365(1997); Locksleyら, Cell, 104:487-501 (2001)を参照のこと。

【0014】

多様な境界面に関与するあるタンパク質のタンパク質-タンパク質相互作用において、亜鉛結合部位は構造的役割を担うことが示されているが[Feeseら, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:3544-3548(1994); Somersら, Nature, 372: 478-481(1994); Ramanら, Cell, 95: 939-950(1998)]、TNFファミリー(CD40リガンド、TNF- α 、又はTNF- β)で以前に構造的に特徴付けられたメンバーには、金属へ結合するものはない。ヒト成長ホルモン(hGH)のような種々のホルモンの製剤における亜鉛のような金属イオンの利用は、文献に記載されている。[例えば、1992年10月15日公開の国際公開92/17200を参照のこと]。レセプターへのhGHの結合における亜鉛の関与は同様に1992年3月5日公開の国際公開92/03478に記載されている。インターフェロン- α 二量体及びインターフェロン- β 二量体における亜鉛結合の役割は、それぞれWalterら, Structure, 4:1453-1463(1996)及びKarpusasら, Proc. Natl. Acad. Sci., 94:11813-11818(1997)に報告されている。亜鉛のような種々の金属イオンの構造的及び生物学的役割は、当該分野で概説されており、例えば、Christiansonら, Advances in Protein Chemistry, 42: 281-355(1991)を参照のこと。

【0015】

(発明の概要)

本発明はApo-2リガンド変異体を提供する。特に、本発明は、Apo-2リガンドの天然配列(図1)中に一又は複数のアミノ酸置換を含むApo-2リガンド変異体を提供する。場合によっては、Apo-2リガンド変異体は以下の表Iに提供されるようにシステイン、リジン及びセリン置換を含む。本発明の代表的な実施態様は、図1(配列番号: 1)の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1(配列番号: 1)の残基位置に次のアミノ酸置換: S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含む。本発明の関連実施態様は、一又は複数のポリオール基、例えばポリ(エチレングリコール)に抱合又は結合したそのようなApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含む。本発明の非常に好適な実施態様は、そのような置換を有し、更にDR4レセプター及びDR5レセプターからなる群から選択されるデスレセプターに結合し、及び/又は一又は複数の哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導するApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含む。

【0016】

本発明の関連実施態様は、そのようなApo-2リガンド変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸、そのような核酸を含んでなるベクター及びこれらのベクターを含んでなる宿主細胞(例えば大腸菌)を含む。関連実施態様は、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドをコードするベクターを含む宿主細胞を、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドを発現するのに十分な条件下で培養培地中で培養し、ついでApo-2リガンド変異体ポリペプチドを回収し精製する方法を含む。

本発明の更に他の実施態様は、図1(配列番号: 1)の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1(配列番号: 1)の次の残基位置: S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179; D234; E249; R255; E263; H264に一又は複数のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一のApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含んでなるApo-2リガンド三量体である。本発明の関連実施態様は、一又は複数のポリオール基、例えばポリ(エチレングリコール)に抱合又は結合したApo-2リガンド三量体を含む。本発明の好適な実施態様では、これらの三量体はDR

10

20

30

40

50

4 レセプター及びDR5レセプターからなる群から選択されるデスレセプターに結合する。

【0017】

本発明の更に他の実施態様は、図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図3に示されたDR5・Apo2L複合体のX線結晶構造から同定された残基位置に一又は複数のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたApo-2リガンド変異体ポリペプチドである。好適な実施態様では、残基位置は、DR5・Apo2L複合体のレセプター接触領域の外側にあり、かつ高溶媒到達性を示す。非常に好適な実施態様では、そのような単離Apo-2リガンド変異体ポリペプチドの残基位置は、図3に提供されたDR5・Apo2L複合体のX線結晶構造に示されるように上部から底部までのApo2L単量体の一面に位置している。本発明の関連実施態様は、ポリ(エチレングリコール)のような一又は複数のポリオール基に抱合又は結合したかかるApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含む。本発明の非常に好適な実施態様は、そのような置換を有し、更にDR4レセプター及びDR5レセプターからなる群から選択されるデスレセプターに結合し、及び／又は一又は複数の哺乳動物細胞においてアポトーシスを誘導するApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含む。

10

【0018】

本発明の更に他の実施態様は、少なくとも二のApo-2リガンド三量体を含んでなるApo-2リガンド三量体オリゴマーであって、各Apo-2リガンド三量体中の少なくとも一のApo-2リガンド単量体が、図1（配列番号：1）のアミノ酸残基位置170にシステインアミノ酸置換を有するApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含み、Apo-2リガンド三量体が、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドの位置170のシステインアミノ酸残基間でジスルフィド結合によって結合しているApo-2リガンド三量体オリゴマーを含む。

20

他の実施態様では、本発明はApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含有する製剤を提供する。特に、本発明は一又は複数のApo-2リガンド変異体ポリペプチド及び担体、例えば製薬的に許容可能な担体、及び場合によっては一又は複数の二価金属イオンを含有する組成物を提供する。一実施態様では、そのような組成物は製造物品又はキットに収容されうる。該組成物は、例えば哺乳動物の癌細胞においてアポトーシスを誘導又は刺激し、又は免疫関連疾患、例えば関節炎又は多発性硬化症を治療するために有用な製薬的に許

30

また、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドを使用する治療方法が提供される。

【0019】

本発明の特定の実施態様は、図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S96C；S101C；S111C；V114C；R115C；E116C；N134C；N140C；E144C；N152C；S153C；R170C；R170K；R170S；K179C；D234C；E249C；R255C；E263C；H264Cの一又は複数のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含む。このようなApo-2リガンド変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸、ベクター及び宿主細胞が更に提供される。Apo-2リガンド変異体ポリペプチドを製造する方法において、そのような宿主細胞を提供し；培養培地を提供し；Apo-2リガンド変異体ポリペプチドを発現するのに十分な条件下で培養培地中で宿主細胞を培養し；宿主細胞又は培養培地からApo-2リガンド変異体ポリペプチドを回収し；Apo-2リガンド変異体ポリペプチドを精製する工程を含んでなる方法が提供される。場合によっては、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドは、Apo-2リガンド変異体ポリペプチドの実際の分子量を増大させる一又は複数のポリオール基に抱合又は結合されている。場合によっては、かかるApo-2リガンド変異体ポリペプチドは、2000ダルトン又は約2000ダルトンの分子量を有するポリ(エチレングリコール)の一分子に抱合又は結合されている。

40

50

【0020】

本発明の更なる実施態様は、図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の次の残基位置に一又は複数のアミノ酸置換：S96；S101；S111；V114；R115；E116；N134；N140；E144；N152；S153；R170；K179；D234；E249；R255；E263；H264を有するアミノ酸配列を含んでなる少なくとも一のApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含んでなるApo-2リガンド三量体を含む。

本発明の更なる実施態様は、図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、

（a）図3に示されたDR5・Apo2L複合体のレセプター接触領域の外側にあり；かつ 10

（b）図3に示されたDR5・Apo2L複合体の結晶構造において高溶媒到達性を示す；

残基位置となるように図3に示されたDR5・Apo2L複合体のX線結晶構造から同定された残基位置に一又は複数のアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含む。場合によっては、そのようなApo-2リガンド変異体ポリペプチドは、図1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S96；S111；V114；R115；E116；N134；N140；E144；N152；N153；R170；D234；E249；R255；E263；H264の一又は複数を有する。場合によっては、そのようなApo-2リガンド変異体ポリペプチド 20 は一又は複数のポリオール基に抱合又は結合している。

【0021】

本発明の更なる実施態様は、製薬的に許容可能な担体と混合せしめられて、図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S96C；S101C；S111C；V114C；R115C；E116C；N134C；N140C；E144C；N152C；S153C；R170C；R170K；R170S；K179C；D234C；E249C；R255C；E263C；H264Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる有効量の単離されたApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含有する製薬的組成物を含む。場 30 合によっては、かかる製薬組成物は、一又は複数の二価金属イオンを含む。

本発明の更なる実施態様は、DR4レセプター及びDR5レセプターからなる群から選択されるレセプターを発現する哺乳動物細胞を、図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S96C；S101C；S111C；V114C；R115C；E116C；N134C；N140C；E144C；N152C；S153C；R170C；R170K；R170S；K179C；D234C；E249C；R255C；E263C；H264Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる治療的有效量の単離されたApo-2リガンド変異体ポリペプチドに暴露することを含む、哺乳動物においてアポトーシスを誘導する方法を含む。

【0022】

本発明の更なる実施態様は、哺乳動物細胞における癌を治療する方法において、図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S96C；S101C；S111C；V114C；R115C；E116C；N134C；N140C；E144C；N152C；S153C；R170C；R170K；R170S；K179C；D234C；E249C；R255C；E263C；H264Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる有効量の単離されたApo-2リガンド変異体ポリペプチドを上記哺乳動物に投与することを含む方法を含む。場合によっては、該方法において、癌は肺癌、乳癌、大腸癌、又は直腸結腸癌である。

本発明の更なる実施態様は、哺乳動物細胞における免疫関連疾患を治療する方法において 50

、図1（配列番号：1）の天然配列Apo-2リガンドポリペプチド配列とは異なり、図1（配列番号：1）の残基位置に次のアミノ酸置換：S96C；S101C；S111C；V114C；R115C；E116C；N134C；N140C；E144C；N152C；S153C；R170C；R170K；R170S；K179C；D234C；E249C；R255C；E263C；H264Cの一又は複数を有するアミノ酸配列を含んでなる有効量の単離されたApo-2リガンド変異体ポリペプチドを上記哺乳動物に投与することを含む方法を含む。場合によっては、該方法では、免疫関連疾患は関節炎又は多発性硬化症である。

【0023】

（好適な実施態様の詳細な説明）

10

I. 定義

「Apo-2リガンド」、「Apo2L」、「Apo-2L」及び「TRAIL」という用語は、ここでは図1に示されたアミノ酸配列のアミノ酸残基114-281、95-281、残基92-281、残基91-281、残基41-281、残基15-281、又は残基1-281、並びに上記配列の生物学的に活性な断片、欠失、挿入、又は置換変異体を含むポリペプチド配列を意味するものとして使用される。一実施態様では、ポリペプチド配列は図1（配列番号：1）の残基114-281を含む。場合によっては、ポリペプチド配列は図1の残基95-281、残基92-281又は残基91-281を含む。Apo-2Lポリペプチドは図1に示された天然ヌクレオチド配列によってコードされていてもよい。場合によっては、残基Pro119（図1）をコードするコドンは「CCT」又は「CCG」でありうる。他の好適な実施態様では、断片又は変異体は生物学的に活性であり、上記の配列の何れか一と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、更により好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する。この定義には、その天然のアミノ酸の少なくとも一がシステイン残基のような他のアミノ酸残基によって置換されているApo-2リガンドの置換変異体が包含される。好適な置換変異体は、以下の表Iに特定された残基の置換の一又は複数を含む。定義には、組換え又は合成法によって調製された、又はApo-2リガンド源から単離された天然配列Apo-2リガンドもまた包含される。本発明のApo-2リガンドは1997年1月16日公開の国際公開97/01633、1997年7月17日公開の国際公開97/25428及び2001年1月4日公開の国際公開01/00832に開示されたApo-2リガンド又はTRAILと称されるポリペプチドを含む。「Apo-2リガンド」、「Apo2L」又は「Apo-2L」という用語は、一般に、ポリペプチドの単量体、二量体又は三量体を含むApo-2リガンドの形態を意味するものとして使用される。Apo-2L配列において言及されているアミノ酸残基の全ての番号付けは、特に他の定義を述べない限り、図1（配列番号：1）における番号付けを使用している。例えば、「D203」又は「Asp203」は図1（配列番号：1）に与えられた配列中、位置203のアスパラギン酸残基を意味する。

20

30

【0024】

「Apo-2リガンド細胞外ドメイン」又は「Apo-2リガンドECD」という用語は、膜貫通及び細胞質ドメインを本質的に持たないApo-2リガンドの可溶型を意味する。通常、ECDは、そのような膜貫通及び細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満だけ有する。

40

「Apo-2リガンド単量体」又は「Apo-2L単量体」という用語はApo-2Lの細胞外ドメイン配列の共有結合鎖を意味する。

「Apo-2リガンド二量体」又は「Apo-2L二量体」という用語はジスルフィド結合を介して共有結合によって結合した二つのApo-2L単量体を意味する。ここで使用される該用語には、Apo-2Lの三量体型内にあるApo-2L二量体及び遊離しているApo-2L二量体が含まれる（すなわち、他のApo-2L単量体と結合している）。

「Apo-2リガンド三量体」又は「Apo-2L三量体」という用語は非共有的に結合している(associated)三つのApo-2L単量体を意味する。

50

【0025】

「Apo-2 L. 0」又は「A p o 2 L. 0」という用語は図1（配列番号：1）のアミノ酸114から281からなり、如何なるエピトープタグ配列にも結合又は抱合されていないポリペプチドを意味する。

ここで使用されるところの「DR4レセプター」という用語は、Panら, Science, 276:111-113 (1997)に記載されているレセプターの完全長及び細胞外ドメイン型を意味する。DR4レセプターの完全長アミノ酸配列は図20A-20B（配列番号：4）に与えられている。

ここで使用されるところの「DR5レセプター」という用語は、Sheridanら, Science, 277:818-821 (1997); Panら, Science, 277:815-818 (1997)、1998年11月19日公開の国際公開98/51793; 1998年9月24日公開の国際公開98/41629; Screatonら, Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczakら, EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wuら, Nature Genetics, 17:141-143 (1997); 1998年10月22日公開の国際公開98/35986; 1998年10月14日公開のEP870827; 1998年10月22日公開の国際公開98/46643; 1999年1月21日公開の国際公開99/02653; 1999年2月25日公開の国際公開99/09165; 1999年3月11日公開の国際公開99/11791に記載されているレセプターの完全長及び細胞外ドメイン型を意味する。DR5レセプターは当該分野においてA p o - 2; T R A I L - R、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とも呼ばれている。ここで使用されるところのDR5という用語には、図21（配列番号：5）に提供された完全長411アミノ酸ポリペプチド及び図22A-B（配列番号：6）に提供された完全長440アミノ酸ポリペプチドが含まれる。

10

20

【0026】

ここで使用される場合の「ポリオール」という用語は広義に多価アルコール化合物を意味する。ポリオールは例えば任意の水可溶型ポリ(アルキレンオキシド)ポリマーであり得、直鎖又は分枝鎖を有する。好適なポリオールには、一又は複数のヒドロキシル位置に化学基、例えば1から4の炭素を有するアルキル基が置換されているものが含まれる。典型的には、ポリオールはポリ(アルキレングリコール)、好ましくはポリ(エチレングリコール)である。しかし、当業者であれば、他のポリオール、例えばポリ(プロピレングリコール)及びポリエチレン-ポリプロピレングリコールコポリマーを、ここでPEGについて記載した抱合技術を使用して用いることができることが分かるであろう。本発明のポリオールには当該分野でよく知られたもの及び公的に入手可能なもの、例えば商業的に利用可能な供給源からのものが含まれる。

30

「抱合（コンジュゲート）」という用語は、ここではその最も広い定義で使用され、共に接合（joined）又は結合（linked）されていることを意味する。分子は、接合されているように作用又は機能する場合、「抱合」されている。

【0027】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したA p o - 2リガンド、又はそれらの部分を含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、抗体が産生され得るモノに対するエピトープを提供するのに十分な残基を有しているが、A p o - 2リガンドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようになり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8から約50のアミノ酸残基（好ましくは約10から約20の残基）を有する。

40

「二価の金属イオン」という用語は、二つの正電荷を有する金属イオンを称する。本発明において使用される二価金属イオンの例には、限定されるものではないが、亜鉛、コバルト、ニッケル、カドミウム、マグネシウム、及びマンガンが含まれる。かかる金属の特定の形態は塩形態（例えば、製薬剤的に許容可能な塩形態）、例えば、上述の二価の金属イオンの塩化物、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩及び硫酸塩形態を含むものが用いられうる。本発明において使用される好適な二価金属イオンは、亜鉛、より好ましくはその塩形態、

50

硫酸亜鉛である。ここにおいて記載の二価金属イオンは、好ましくは、例えば、(1) 所望する期間にわたってA p o - 2 L三量体の貯蔵安定性を高め、(2) 組換え細胞培養又は精製法においてA p o - 2 L三量体の生産又は収量を高め、(3) A p o - 2 L三量体の溶解性を高め(又は凝集性を低下させ)、又は(4) A p o - 2 L三量体の形成を高めるのに十分な濃度又は量(例えば有効量)で用いられる。

【0028】

「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的な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。好ましい実施態様では、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、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の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により均一になるまで十分なほど精製される。A p o - 2リガンドの自然環境の少なくとも一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で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一の精製工程により調製される。

10

【0029】

「単離された」A p o - 2リガンド核酸分子は、同定され、A p o - 2リガンド核酸の天然源に通常付随している少なくとも一の汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたA p o - 2リガンド核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離されたA p o - 2リガンド核酸分子は、天然の細胞中に存在するA p o - 2リガンド核酸分子とは区別される。しかし、単離されたA p o - 2リガンド核酸分子は、例えば、核酸分子が天然の細胞のものとは異なった染色体位置にあるA p o - 2リガンドを通常発現する細胞に含まれるA p o - 2リガンド核酸分子を含む。

20

【0030】

ここで特定されている配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、必要ならば最大のパーセント配列同一性を得るために間隙を導入し、如何なる同類置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、A p o - 2リガン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。パーセントアミノ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で達成可能であり、比較される配列の完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アルゴリズムを割り当てることを含み、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。ここでの目的のために、パーセントアミノ酸同一性値は、ジェネンテック社によって作成され、ソースコードが米国著作権庁, 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TXU 510087の下で登録されている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プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, CAを通して公に入手可能である。全ての配列比較パラメーターはALIGN-2プログラムにより設定され、変化しない。

30

40

【0031】

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。原核生物に好適なコントロール配列は、例えばプロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に寄与するプレタンパク質として発現されているならそのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならばコード配列に作用可能

50

に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるならコード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合する」とは、結合されたDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにある。しかし、エンハンサーは必ずしも近接しているわけではない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、通常の手法にしたがって、合成されたオリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0032】

「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。このようなサイトカインの例としては、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を挙げることができる。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)のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)；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- α 及び- β ；ミューラー阻害物質；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；トロネンポエチン(TPO)；神経成長因子；血小板成長因子；TGF- α あるいはTGF- β のような形質転換成長因子(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- α 、- β 、及び- γ のようなインターフェロン；マクロファージCSF(M-CSF)のようなコロニー刺激因子(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-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12等のインターロイキン(IL)；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、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。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。この用語は放射性アイソトープ（例えば I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 及び R^{186} ）、化学療法剤、及び細菌性、真菌性、植物又は動物起源、又はそれらの断片の酵素的に活性な毒素のようなものを含むことが意図されている。

【0033】

「化学療法剤」は、癌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(CYTOXAN(登録商標))のようなアルキル化剤；ブスルファン、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(altretamine)、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(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチローロメラミン(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)（特にブラタシン(bullatacin)及びブラタシノン(bullatacinone)）；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)を含む)；ブリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン(adozelesin)、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CB I-TMIを含む）；エレトロピン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディチン(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)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、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(phenesterine)、ブ

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(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediyne) 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 γ 1 I 及びカリケアマイシン θ 1 I、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(enediyne) 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(bleomycins) 10
 、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カリミノマイシン(carminomycin)、カルチノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトロビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシルビシン(モルフォリノードキシルビシン、シアノモルフォリノードキシルビシン、2-ピロリノードキシルビシン及びデオキシドキシルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシン、C、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(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)、ゾルビシン(zorubicin)のようなマイトマイシン(mitomycins)；メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)のような抗-代謝産物；デノプテリン(denopterine)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(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)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(frolinic 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)；ビスアントレン(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)；ピラルビシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド 40
 ；プロカルバジン；P S K(登録商標)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン(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；ビンデシン；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)；ピポブロマン(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)、Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲンシタビン(ge 50

mcitabine); 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; ビンブラスチン; プラチナ; エトポシド(V P-16); イフォスファミド; マイトマイシンC; ミトキサントン; ビンクリスチン; ビノレルビン; ナベルビン(navelbine); ノバントロン(novantrone); テニポシド; 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); C P T-11; トポイソメラーゼインヒビターR F S 2000; ジフルオロメチロールニチン(D M F O); 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)、L Y 117018、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)、ビカルタミド、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。

10

【0034】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にここで同定される任意の遺伝子を過剰発現する癌細胞の成長をインビトロ又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。即ち、成長阻害剤は、S期でそのような遺伝子を過剰発現する細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、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、及びトポII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド及びブレオマイシンを含む。G1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも溢流し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、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である。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakamiら, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

20

【0035】

ここにおける目的のための「生物学的に活性」又は「生物学的活性」は、(a) インビボ又はエキソビボで少なくとも一のタイプの哺乳動物癌細胞又はウイルス感染細胞において、アポトーシスを誘導し又は刺激する能力を有すること; (b) 抗体を産生することが可能であること、すなわち免疫原性であること; (c) Apo2L/TRAILのレセプターへ結合し及び/又はこれを刺激することが可能あること; 又は(d) 天然又は天然に生じるApo2L/TRAILポリペプチドの活性を保持することを意味する。Apo2L/TRAILの生物学的活性を定量するためのアッセイは、細胞毒性、DNA断片化(例えばMarstersら, Curr. Biology, 6: 1669 (1996))、カスパーゼ不活性化、DR4結合、DR5結合(例えば1998年11月19日公開の国際公開98/51793を参照)並びにPCT公報番号WO97/01633、WO97/25428、WO01/00832、及びWO01/22987に記載されたアッセイ法などの当該分野で既知の方法を使用して実施することができる。

30

40

「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、細胞質の凝結、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指す。この活性は、例えば細胞生死判別アッセイ(例えばアラマブルーアッセイ又はMTTアッセイ)、FACS分析、DNA断片化(Nicolettiら, J. Immunol. Methods, 139:271-279 (1991))、又はポリ-ADPリボースポリメラーゼ、「PARP」切断アッセイにより決定し測定することができる。

【0036】

50

ここで用いられる場合、「疾患」という用語は、一般に、A p o 2 L / T R A I L のような有効量のポリペプチドによって治療することができる任意の疾病又は疾患を含む、ここに記載の組成物を用いた治療により恩恵を受ける任意の状態を意味する。これは慢性及び急性疾患、並びに哺乳動物を当該疾患にかかりやすくする病理的状态を含む。限定されないが、ここで治療される疾患の例には、良性及び悪性癌；炎症性、血管由来、及び免疫疾患、自己免疫疾患、関節炎（リウマチ様関節炎を含む）、多発性硬化症、及びH I V / A I D S が含まれる。

「癌」、「癌性」及び「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指すか記述する。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、白血病、芽細胞腫、及び肉腫が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、芽細胞腫、胃腸癌、腎癌、卵巣癌、肝臓癌、結腸直腸癌、子宮体癌、腎臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、多形神経膠芽腫、子宮頸癌、胃癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、大腸癌、及び頭部及び頸部の癌が含まれる。

ここで使用される「治療する」、「治療」、及び「療法」とは、治癒的療法、予防的療法及び防護的療法を称する。

「哺乳類」という用語は、ヒト、ウシ、ウマ、犬及びネコを含む哺乳類と分類されるあらゆる動物に相当する。本発明の好ましい実施態様では、哺乳類はヒトである。

【0037】

I I . 本発明の組成物及び方法

T N F リガンドファミリーに関連したサイトカインで、ここにおいて「A p o - 2 リガンド」と特定されたサイトカインが記載されている。ヒトA p o - 2 リガンドの予測成熟アミノ酸配列は、281個のアミノ酸を含み、約32.5 k D a の計算上の分子量を有する。シグナル配列が存在せず内在性疎水性領域が存在することは、A p o - 2 リガンドがI I 型膜貫通タンパク質であることを示唆する。また、可溶性細胞外ドメインA p o - 2 リガンドポリペプチドが記載されている。例えば1997年7月17日に公開のW O 97 / 25428を参照のこと。A p o - 2 L 置換変異体がさらに記載されている。アラニンスキャンニング技術が、生物学的活性を有する種々の置換変異体分子を同定するために利用されてきた。A p o - 2 リガンドの特定の置換変異体は、少なくとも一つのアミノ酸がシステイン残基によって置換されているものを含む。置換変異体は、例えば「R 1 1 5 C」、

【0038】

A p o - 2 リガンドの細胞外ドメインのX線結晶構造が提供され、アラニンスキャンニング突然変異誘発が、そのレセプター接触領域のマッピングを提供するために実施されている。A p o - 2 リガンドに対して得られた構造は、A p o - 2 リガンド三量体分子の三つのサブユニットの相互作用を統合する新規な二価金属イオン（亜鉛）結合部位を含むホモ三量体タンパク質を明らかにする。

A p o - 2 L のX線構造は、T N F - α のモデルを利用する分子置換 [Eckら, J. Bio. Chem., 264: 17595-17605 (1989)] によって決定され、3.9オングストローム（114-281残基形態に対して）及び1.3オングストローム（D 2 1 8 A 変異体；91-281形態に対して）まで精緻化される。T N F ファミリーの他のメンバーのように、A p o - 2 L は、約5100平方オングストローム（単量体当たり平方1700オングストローム）を埋めて球状三量体を形成する、三つのゼリーロール単量体からなる緻密な三量体を含むと思われる（図2Aを参照のこと）。コアの β ストランドの位置は、T N F ファミリーの他の構造的に特徴付けられたメンバーのT N F - α [Eckら, 上掲；Jonesら, Nature, 338:225-228(1989)]、T N F - β [Eckら, J. Biol. Chem., 267:2119-2122(1992)]、

10

20

30

40

50

及びC D 4 0 L [Karpusasら, Structure, 3:1031-1039(1995)] で、T N F - α 又はT N F - β のコアストランドと比較して0.8オングストロームのr.m.s.d.のものと比較して良好に保持されている。A p o - 2 L三量体の境界面のどの残基も、現在知られている全てのヒトT N Fファミリーメンバーの配列において完全に保持されているものはないようである；しかしながら、これら残基の疎水化学的性質は保持されている。A p o - 2 L三量体における保境界面の保持された残基は、塩基の近傍（三量体の最も広い部分）及び三回転軸に沿ってクラスターを形成する。C y s 2 3 0の近傍のA p o - 2 L三量体境界面の頂点の近くでは、構造は分岐しているように思われ、1 9 0及び2 3 0のループのコンホメーションは各構造において変動する。

【0 0 3 9】

β 骨格コアとは対照的に、レセプター結合表面及びループの構造は、T N Fファミリーメンバーの中でかなり変化する。A p o - 2 リガンドの構造とT N F - α 、T N F - β 、及びC D 4 0 Lの構造の間の一つの違いは、ストランドA及びA'の間の接合である。T N F - α 、T N F - β 、及びC D 4 0 Lでは、ストランドAの後に、緻密なループが続いている。A p o - 2 リガンドでは、15残基の挿入がこのループを長くし、そのコンホメーションを変える。ループの最初の部分（残基1 3 1から1 4 1）は、ループの二番目の部分（残基1 4 2から1 5 4）がC D 4 0 Lに類似するコンホメーションをそのC末端部分に有して、分子の表面を一つの単量体-単量体境界面から次へ（図2 Aを参照のこと）と越える際に乱れる。

三量体化境界面の頂点の近くに、二価金属イオン（亜鉛）結合部位が埋もれている。T N Fファミリーメンバーは、配列分析によって、C y s 2 3 0に関して三つのグループに分けられる：（1）C y s 2 3 0に対応する位置のシステイン残基に、金属イオンとの相互作用を妨げるジスルフィド結合を形成することが可能な隣接ループ（A p o - 2 Lの1 9 4 - 2 0 3ループ）の中の他のシステインが伴っているT N F - α 及びF a s リガンドのようなタンパク質、（2）C y s 2 3 0に対応するシステインを持たないタンパク質（例えばT N F - β 及びO P G L）、及び（3）C y s 2 3 0に対応するシステイン残基を一つのみ有するタンパク質である。A p o - 2 L及び他の種におけるそのオルソログは、後者の基準に当てはまり（すなわち、C y s 2 3 0のみを持つタンパク質）、三量体表面において二価金属イオンと結合することが期待される。A p o - 2 LのC y s 2 3 0の直ぐ前の主要鎖のコンホメーションは、T N F - α 及びC D 4 0 LのようなT H Fファミリーメンバーを含むジスルフィドとは異なる。A p o - 2 Lでは、C y s 2 3 0の側鎖は、境界面から遠ざかるのではなく、境界面に向かっている。

【0 0 4 0】

各A p o - 2 L単量体のC y s 2 3 0残基は内部を三量体軸へ向いて内方を指し、内部の溶媒分子と共に二価金属イオンを配位する。この二価金属イオン結合部位は、亜鉛結合部位にとって適切な結合及び角度を持つ僅かに歪んだ四面体幾何を示し、溶媒へは完全に接触不可能である（図2 Bを参照のこと）。結合金属の同一性は、誘導結合プラズマ原子発光分光分析法（I C P - A E S）を利用して確認された。I C P - A E Sを利用したC d、C o、Z n、N i及びC uの定量分析では、A p o - 2 L三量体の一分子当たり0.79モルのZ nと0.06モルのC oが検出され、構造中の結合イオンが、約1対1のモル比の亜鉛であることが示された。この部位の重要性は、C y s 2 3 0のアラニン置換が8倍未満のアポトーシス活性の減少となったという観察によって立証された。更に、キレート試薬に対する透析によるA p o - 2 Lからの結合金属の除去により、D R 5親和性の7倍の低下及びアポトーシス活性の90倍未満の低下が生じた。Z nの除去によって、システインは酸化されやすくなり、アポトーシス活性が低下したジスルフィド結合A p o - 2 L二量体が形成された。金属結合部位はA p o - 2 L三量体構造に埋もれているように思われ、レセプターに接触するとは予想されないことから、データは、二価金属イオン結合が、A p o - 2 Lの安定性と三量体構造を維持するのに重要であろうことを示唆している。

【0 0 4 1】

A p o - 2 リガンドと A p o - 2 レセプターの細胞外ドメイン配列 (D R 5) との間の複合体の結晶構造は決定されている。(Hymowitzら, Mol. Cell., 4:563-571 (1999)を参照のこと)。A p o - 2 は全体構造が T N F R 1 に似ており、比較的定まっていな二次構造を持つ。それは一連の 7 つのジスルフィド結合によって長い形状に繋ぎ止められており、そのジスルフィド結合の 6 つは T N F R 1 レセプターの第二及び第三の C R D に構造的に対応する A p o - 2 のサブドメイン (それぞれ残基 4 3 - 8 4 及び 8 5 - 1 3 0) に見出される。

A p o - 2 リガンド / A p o - 2 複合体の接触面は、2 つのパッチ、パッチ A とパッチ B に分けられる。A p o - 2 L / A p o - 2 接触面のパッチ B の顕著な特徴は A p o - 2 L の T y r 2 1 6 (図 1 に提供される A p o - 2 L のアミノ酸配列の番号付けを用いて) と A p o - 2 レセプターの 5 0 s ループの間の相互作用である。残基 T y r 2 1 6 は、T N F のスーパーファミリーリガンド (T N F - α 、T N F - β 、F a s L 及び O P G L を含む) の多くに保存され、他のメンバーはこの位置に同様の大きな疎水性残基を有する。T N F - α 、T N F - β 、F a s L 及び A p o - 2 L の突然変異誘発研究は、この残基が結合に重要である (Schneiderら, J. Biol. Chem., 272:18827-18833(1997); Gohら, Protein Eng., 4:785-791(1991); Yamagishiら, Protein Eng., 3:713-719(1990); Van Ostadeら, Protein Eng., 7:5-22(1990); Hymowitzら, Personal communication) ことを示す全てである。チロシン側鎖の相互作用は A p o - 2 L / A p o - 2 と T N F - β - T N F R 1 の複合体の間に保存される。さらに、側鎖の結合ポケットを形成するレセプターの 5 0 s ループのバックボーン構造は、A p o - 2 及び T N F R 1 の間 (残基 5 1 から 6 2 の C - α 原子の間の僅か 0. 3 5 の r m s d) で実質的に同一である。さらに、このループの長さは、異なる T N F レセプタースーパーファミリーメンバーの間に保存されている。このループが、C R D 3 により媒介されるより特異的な接触のためにレセプターの上位の部分を適切に判断する助けとなりうるリガンドの保存された疎水性特性と相互作用する一般的な疎水性結合パッチのように機能しうることが考えられる。

【0042】

パッチ B での保存的な相互作用に比較して、接触面の下方付近のパッチ A は T N F R 1 の対応するループに比べ完全に異なる構造を有する A p o - 2 の C R D 3 の 9 0 ループにより成される相互作用に関連している。

パッチ B において、レセプターの 5 0 s ループ及び A p o - 2 リガンド残基 2 1 6 が結合に一般的に重要な疎水性パッチを提供していることが考えらるが、パッチ A においては、レセプター 9 0 s ループと、位置 2 0 5 の、又はその付近の A p o - 2 リガンド残基が特異性と交差反応をコントロールする。A p o - 2 レセプターの 5 0 s ループ及び 9 0 s ループがリガンド結合決定基のほとんどを運ぶと思われる。A p o - 2 配列の位置 5 3 及び 5 9 のヒスチジン及びフェニルアラニン残基は、それぞれ共に比較的大きな残基である。これら 2 つの残基は、A p o - 2 リガンドの残基 A s p 2 1 8 及び S e r 1 5 9 と接触すると考えられ；従って、A p o - 2 配列の 5 3 及び 5 9 位置の導入した大きい側鎖は A p o - 2 に対する A p o - 2 親和性に逆に影響しうる (しかし、D R 4 に対する親和性を向上させる)。

【0043】

A p o - 2 リガンドレセプター結合及び活性を特徴付けるために、アミノ酸置換部位を、D R 5 ・ A p o - 2 L 複合体の X 線構造の検査に基づいて選択した (図 3)。置換システムアミノ酸残基の突然変異又は続く修飾の際に活性が失われることを避けるために、セプター接触領域の外側の部位を突然変異誘発のために考慮した。システイン側鎖の効率的な化学的修飾を確かなものにするために、結晶構造で高い溶媒接近性を示した残基を選択した。これらの基準に適合した残基には、限定されるものではないが、G l u 1 4 4、A s n 1 5 2、S e r 1 5 3、A r g 1 7 0、A s p 2 3 4、G l u 2 4 9、A r g 2 5 5、G l u 2 6 3、及び H i s 2 6 4 が含まれる。また、V a l 1 1 4、A r g 1 1 5、G l u 1 1 6、A s n 1 3 4 及び A s n 1 4 0 をシステイン置換部位として選択した。これらの残基は A p o - 2 L - D R 5 結晶構造において分子の乱れた部分にあり、このように溶媒

接近性でありと推定され、レセプター結合には寄与しない。図3に示されるように、この残基群はA p o - 2 L単量体の一面の頂部から底部までにかかっている。実験的に検査したシステイン置換A p o - 2 Lタンパク質のなかで、E 1 1 6 CがS K - M E S細胞に対するアポトーシス活性を有意に低減させた(表Iを参照のこと)。R 1 7 0 C変異体は約10倍増加した能力を示した。また、A r g 1 7 0をA l a、L y s又はS e r残基の何れかで置換したA p o - 2 L変異体はA p o - 2 L 0ポリペプチドに匹敵する活性を有していた。本発明のある実施態様では、好適なA p o - 2 L変異体は、図1のA p o - 2 L配列にけるE 1 1 6、N 1 3 4、N 1 4 0及び／又はR 2 5 5に対応する位置に天然の残基を含む(つまり突然変異していない)と考えられる。

【0044】

下記の説明は、核酸をコードするA p o - 2リガンド変異体を含むベクターで形質転換又は形質移入された宿主細胞を培養し、細胞培養物からポリペプチドを回収することによってA p o - 2リガンド変異体を生産する方法に関する。

A p o - 2リガンドをコードするD N Aは、A p o - 2リガンドm R N Aを有し、これを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製された任意のc D N Aライブラリーから得ることできる。従って、ヒトA p o - 2リガンドD N Aは、国際公開97/25428に記載されているヒト胎盤c D N Aのバクテリオファージライブラリーのような、ヒト組織から調製されたc D N Aライブラリーから簡便に得ることが可能である。また、A p o - 2リガンドコード化遺伝子は、ゲノムライブラリーから又はオリゴヌクレオチド合成によって得ることもできる。

ライブラリーは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計された(A p o - 2リガンドに対する抗体又は少なくとも約20-80塩基のオリゴヌクレオチド等の)プローブによってスクリーニングすることができる。選択されたプローブによるc D N A又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えばSambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。A p o - 2リガンドをコードする遺伝子を単離する他の方法はP C R法を使用するものである[Sambrookら, 上掲; Dieffenbachら, PCR Primer: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

【0045】

A p o - 2リガンドのアミノ酸配列断片又は変異体は、A p o - 2リガンドD N Aに適切なヌクレオチド変化を導入するか、所望のA p o - 2リガンドポリペプチドを合成することにより調製することができる。このような断片又は変異体は、完全長A p o - 2リガンドについて図1(配列番号: 1)に示したアミノ酸配列の、又は細胞内領域、膜貫通領域、又は細胞外領域(例えば114-281アミノ酸形態)の内部あるいは一方又は両方の末端に残基の挿入、置換及び／又は欠失を示す。最終構築物が例えばここに定義する所望の生物活性又はアポトーシス活性を有する限り、挿入、置換及び／又は欠失の任意の組み合わせで最終構築物に到達することができる。好ましい実施態様では、断片又は変異体は、A p o - 2リガンドの細胞内、膜貫通、又は細胞外領域についてここで同定した配列、あるいはA p o - 2リガンドの完全長配列に対して、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約90%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する。また、アミノ酸の変化により、グリコシル化部位の数と位置の変化、又は膜係留特性(膜アンカー特性)の改変のように、A p o - 2リガンドの翻訳後プロセスを改変し得る。

【0046】

ここで記載されているA p o - 2リガンド配列における変異は、米国特許第5364934号に記載された保存的あるいは非保存的突然変異に関する技術とガイドラインの任意のものを使用して生じさせることができる。これらは、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキニング、及びP C R突然変異誘発を含む。

近接配列に沿った一又は複数のアミノ酸を同定するために、スキニングアミノ酸分析法

10

20

30

40

50

を使用することができる。好ましいスキヤニングアミノ酸は、比較的小さい中性アミノ酸である。このようなアミノ酸には、アラニン、グリシン、セリン及びシステインが含まれる。変異体の主鎖構造をあまり改変することなく、ベータ炭素を越えた側鎖が除去されるため、アラニンがこの群のなかで好ましいスキヤニングアミノ酸である [Cunninghamら, Science, 244: 1081 (1989)]。またアラニンは最も一般的なアミノ酸であることによっても好ましい。さらに、アラニンは埋設及び露出位置の双方に頻繁に見出される [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。

【0047】

本発明の特定の A p o - 2 L 変異体は、下記の表 1 に与えられた一又は複数の列挙された置換を含む A p o - 2 L ポリペプチドを含む。このような A p o - 2 L 変異体は、典型的には、少なくとも一又は複数のアミノ酸が天然配列 A p o - 2 L (例えば、図 1 に提供のもの; A p o - 2 L の完全長又は成熟形態あるいはその細胞外ドメイン配列) と異なる非天然に生じるアミノ酸配列を含む。場合によっては、天然配列 A p o - 2 L と比較して A p o - 2 L 変異体において異なる一又は複数のアミノ酸は、表 1 に示されたもののようなアミノ酸置換を含む。本発明の A p o - 2 L 変異体は、図 1 の残基 91-281、92-281、95-281 又は 114-281 を含んでなり、表 1 に記載されている一又は複数のアミノ酸置換を有する可溶性 A p o - 2 L 変異体を含む。好ましい A p o - 2 L 変異体は、図 1 (配列番号: 1) の残基 91-281、92-281、95-281 又は 114-281 を含んでなり、表 I に記載された一又は複数のアミノ酸置換を有し、ここに記載されるような所望の生物活性を更に有する変異体を含む。

10

20

【0048】

また、本発明の範囲に含まれる A p o - 2 リガンド配列の変異体は、アミノ末端誘導体又は修飾形にも関連する。このような A p o - 2 リガンド配列は、ポリペプチド配列の N 末端にメチオニン又は修飾メチオニン (例えばホルミルメチオニル又は他のブロックされたメチオニル種など) を有するここに記載した任意の A p o - 2 リガンド変異体を含む。天然又は変異体 A p o - 2 リガンドをコードする核酸 (例えば、cDNA 又はゲノム DNA) は、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。様々なベクターが公的に入手可能である。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、エンハンサー成分、プロモーター、及び転写終結配列であり、それぞれを以下に説明する。用いられるであろう任意のシグナル配列、複製開始点、マーカー遺伝子、エンハンサーエレメント及び転写終結配列は当該分野で知られており、WO 97/25428 にさらに詳しく記載されている。

30

【0049】

発現及びクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、A p o - 2 リガンド核酸配列に作用可能に結合したプロモーターを含む。プロモーターは、作用可能に結合した A p o - 2 リガンド変異体核酸配列のような特定の核酸配列の転写及び翻訳を制御する構造遺伝子 (一般的に約 100 ないし 1000 塩基対) の開始コドンの上流側 (5') に位置する未翻訳配列である。このようなプロモーターは典型的には、誘発的なクラス及び構成的なクラスの 2 つのクラスに属する。誘発的なプロモーターは、例えば、養分の存在あるいは不存在、温度変化などの培養条件のある変化に対応してその制御の下で DNA からの転写レベルを上昇させるプロモーターである。現時点において多種の可能な宿主細胞により認識される非常に多くのプロモーターがよく知られている。これらのプロモーターは、制限酵素の消化によって供給源 DNA からプロモーターを除去し、ベクターに単離したプロモーター配列を挿入することで、A p o - 2 リガンド変異体をコードする DNA に作用的に結合している。天然の A p o - 2 リガンドプロモーター配列及び多くの異種性プロモーターはいずれも A p o - 2 リガンド DNA の直接増幅及び/又は発現に用いることができる。

40

【0050】

50

原核生物及び真核生物宿主に適したプロモーターは当該分野で知られており、WO 97/25428にさらに詳しく記載されている。

大腸菌におけるApo-2Lの生産の好ましい方法には、生産物発現の制御のための誘発的プロモーターが用いられる。制御可能な誘発的なプロモーターの利用は、生産物発現の誘発、及び宿主によってよく耐えることのできないかなりの量の生産物の蓄積の前に、所望する細胞密度への培養成長を可能にする。

Apo-2L(114-281形態)の発現のために、三つの誘発的なプロモーター系(T7ポリメラーゼ、trp及びアルカリホスファターゼ(AP))が出願人によって評価された。これら三つのプロモーターのそれぞれの利用は、収集細胞ペーストから回収されたかなりの量の可溶性で生物学的に活性なApo-2L三量体を結果として生じた。しかし、10
かりとしたプロモーターコントロール、及び収集細胞ペーストにおいて到達したより高い細胞密度及び力価のために、試験されたこれら三つの誘発的なプロモーター系の中でAPプロモーターが好まれている。

一又は複数の上に列挙した成分を含む適切なベクターの構築には、標準的なライゲーション技術を用いる。単離されたプラスミド又はDNA断片を開裂させ、整え、そして必要とされるプラスミドの生成のために望ましい形態に再びライゲーションする。

【0051】

作成されたプラスミドが正しい配列であることを確認する分析のために、ライゲーション混合物を用いて、大腸菌K12菌株294(ATCC31446)を形質転換し、適当な場合にはアンピシリン又はテトラサイクリン耐性によって、形質転換細胞を好適に選択する。20
形質転換細胞からプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化により分析し、及び／又は当該分野で知られている標準的技術を利用して配列を決定する[例えば、Messingら, Nucleic Acids Res., 9:309 (1981); Maxamら, Methods in Enzymology, 65:499 (1980)を参照のこと]。

Apo-2リガンドをコードしているDNAの哺乳動物細胞における一過性発現をもたらす発現ベクターを使用することができる。一般に、一過性発現は、宿主細胞が発現ベクターの多くのコピーを蓄積し、次にその発現ベクターによってコードされている所望のポリペプチドを高レベルで合成するように、宿主細胞中で効果的に複製できる発現ベクターを使用することを含む[Sambrookら, 上掲]。一過性発現系は、適切な発現ベクターと宿主細胞を含むが、クローニングされたDNAによりコードされているポリペプチドの簡便で 30
確実な同定並びに所望の生物学的又は生理学的性質についてのポリペプチドの迅速なスクリーニングを可能にする。したがって、一過性発現系は、本発明において、生物学的に活性であるApo-2リガンドの類似物及び変異体を同定する目的のために特に有用である。

【0052】

組換え脊椎動物細胞培養でのApo-2リガンド変異体の合成に適応化させるのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gethingら, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei 40
ら, Nature, 281:40-46 (1979); EP117,060; 及びEP117,058に記載されている。

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、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例 40
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・マルセスキヤンス及び赤痢菌属、並びにバシラス、例えば枯草菌及びバシラス・リチェフォルミス(licheniformis)(例えば、1989年4月12日に公開されたDD266710に開示されたバシラス・リチェニフォルミス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。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌すべきである。

【0053】

大腸菌は、本発明において好ましい宿主細胞である。大腸菌は、グリコシル化の必要がな 50

く、大きさが20kd未満であるポリペプチドである、Apo-2リガンド(114-281形態)の発現に特によく適している。生産宿主として、大腸菌は比較的の高い細胞密度で培養が可能であり、比較的の高いレベルの異種タンパク質の生産が可能である。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、Apo-2リガンドをコードする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。グリコシル化Apo-2リガン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。CHO細胞を含むすべてのこのような宿主細胞の例は、さらにWO97/25428に記載されている。宿主細胞を形質移入し、好ましくは上述のApo-2リガンド産生のための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切に修飾された標準栄養培地で培養する。

10

トランスフェクション(形質移入)は、如何なるコード配列が実際に発現されるか否かにかかわらず、宿主細胞による発現ベクターの取り込みを意味する。多数のトランスフェクションの方法が当業者に知られている。例えば、CaPO₄及びエレクトロポレーションである。このベクターの操作のあらゆる徴候が宿主細胞内で生じたときに成功したトランスフェクションが一般に認められる。

【0054】

形質転換は、染色体外の成分としてであろうと染色体成分によってであろうと、DNAが複製可能であるように生物体中にDNAを導入することを意味する。用いられる宿主細胞に応じて、そのような細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrookらにより記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、原核生物又は実質的な細胞壁障壁を含む他の細胞に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shawら, Gene, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開のWO89/05859に記載されたように、ある種の植物細胞の形質転換に用いられる。加えて、1991年1月10日に公開されたWO91/00358に記載されているように、超音波処理を用いて植物をトランスフェクションすることもできる。

20

【0055】

このような細胞壁のない哺乳動物細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な側面は米国特許第4399216号に記載されている。酵母中の形質転換は、典型的には、Van Solingenら, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiaoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法によって実施する。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及びMansourら, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

30

Apo-2リガンド変異体を生産するために用いられる原核細胞は、前掲のSambrookらにより記載されているような適切な培地で培養される。大腸菌の培養に用いられうる培養培地の特定の形態は、下記の実施例にさらに記載されている。Apo-2リガンドを生産するための哺乳動物宿主細胞は、種々の培養培地において培養することができる。

40

【0056】

市販培地の例としては、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)が含まれる。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)、ヌクレオシド(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TM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

50

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充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。

一般に、哺乳動物の細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコル、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)に見出すことができる。

【0057】

場合によっては、ここに記載のApo-2リガンドポリペプチド組成物は亜鉛のような二価金属を含む。ここに記載の方法及び製剤において二価金属イオンが存在するとジスルフィド結合の形成から保護されうる。Apo-2L三量体の合成と構築の間に二価金属イオンを含有させると、正しく折り畳まれたホモ三量体Apo-2Lの蓄積と回収を更に改善しうると思われる。従って、本発明の他の側面では、宿主細胞の培養又は発酵のために、典型的には一又は複数の二価金属イオンが培養培地へ添加されるかあるいは含まれる。二価金属イオンは、好ましくは、貯蔵安定性を増すため、溶解性を増すため、又は一又は複数の亜鉛イオンによって調整される安定なApo-2L三量体の形成を補助するために十分な濃度レベルで培養培地に存在するかあるいは添加される。添加されうる二価金属イオンの量は、一部は培養中の宿主細胞密度又はこのような二価金属イオンへの潜在的な宿主細胞感受性に依存する。培養におけるより高い細胞密度では、二価金属イオンの濃度を増すことは有益である。宿主細胞による生産物の発現中又は発現後に二価金属イオンが添加される場合は、宿主細胞による産物の発現が増加するのに応じて二価金属イオン濃度を調節又は増加させることが望ましい。典型的な普通に入手可及な細胞培養培地に存在しうる微量レベルの二価金属イオンは、安定な三量体形成には十分ではないと一般的に考えられている。従って、更なる量の二価金属イオンの添加が好ましい。

【0058】

培養中の宿主細胞の成長期の中に二価金属イオンが添加される場合は、二価金属イオンは、逆に又は負の方向に宿主細胞へ影響しない濃度で培養培地へ添加されるのが好ましい。振盪フラスコ培養では、1mMより高い濃度でのZnSO₄の添加は、結果として低い宿主細胞密度を生じる可能性がある。当業者であれば、細菌細胞は、細胞マトリックスと金属イオン複合体を形成することで、効果的に金属イオンを隔離することが可能であることが分かる。従って、細胞培養では、成長期の後（所望する宿主細胞密度に達した後）又は宿主細胞による生産物発現の直前に、選択された二価金属イオンを添加することが好ましい。十分な量の二価金属イオンが存在していることを確かめるために、更なる二価金属イオンを、生産物発現期の中に細胞培養培地へ添加又は供給することができる。培養培地の二価金属イオン濃度は、宿主細胞に対して有害又は毒性でありうる濃度を越えてはならない。宿主細胞として大腸菌を用いる本発明の方法では、培養培地の二価金属イオンの濃度が約1mM（好ましくは ≤ 1 mM）を越えないことが好ましい。さらにより好ましくは、培養培地の二価金属イオン濃度は、約50マイクロモルから約250マイクロモルである。最も好ましくは、このような方法で使用される二価金属イオンは硫酸亜鉛である。金属イオン及びApo-2リガンド三量体が1対1モル比で存在することが可能である量の二価金属イオンを細胞培養へ添加することが望ましい。

二価金属イオンは、細胞培養へ如何なる許容可能な形態でも添加が可能である。例えば、金属イオンの溶液は水を使って調製することが可能であり、次に、二価金属イオン溶液は培養培地へ添加又は供給することが可能である。

【0059】

本発明の一実施態様では、選択されたApo-2L変異体は大腸菌で発現され、細胞培養の培養又は発酵の間、約40-50g m/L乾燥細胞重量につき約1.0-3.0mmol l e s/L分の酸素取り込み速度で細胞活動が行われるようにプロセスパラメーターが設定される。新規に合成された新生Apo-2Lポリペプチドは、適切なタンパク質の折り畳み（フォールディング）及びApo-2L単量体の三量体化に十分な時間を有してい

ることが好ましい。発酵プロセスの成長期は、好ましくは30℃で行われる。生産物発現の開始の直前において、プロセスの温度制御設定値は30℃のまま又は残りの発酵のために25℃へ下方制御されてもよい。場合によっては、細胞培養中の細胞密度を増加させることが望ましく、これに応じて、上において言及したパラメーターを調節（又は増加）させることが可能である。例えば、容積生産高を増やすために細胞培養中の細胞密度を増やすことは有利な可能性がある。当業者であれば、所望に応じて、当該分野で知られている常套的技術を利用し、細胞密度を徐々に増加させ、上述のパラメーターを徐々に増加させることができる。

Apo-2Lの発現は、例えば、ここに記載された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、一般的なサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法（Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)）、ドットブロット法（DNA分析）、又はインシットゥハイブリダイゼーション法によって、直接的に試料中で測定することができる。種々の標識を用いることができ、最も一般的なものは放射性同位元素、特に³²Pである。しかしながら、他の方法、例えばポリヌクレオチド中への導入のためのビオチン修飾ヌクレオチドを用いる方法もまた使用することができる。ついで、このビオチンは、例えば放射性核種、蛍光剤又は酵素等のような広範囲の標識で標識することができるアビジン又は抗体への結合部位となる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。ついで、抗体を標識し、検定を実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

10

20

【0060】

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液の検定によって測定することもできる。免疫組織化学的染色技術では、細胞試料を、典型的には脱水と固定によって調製し、結合した遺伝子産物に対し特異的な標識化抗体と反応させるが、この標識は通常は視覚的に検出可能であり、例えば酵素的標識、蛍光標識、ルミネセンス標識等である。

試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳類において調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列Apo-2リガンドポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はApo-2リガンドDNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

30

Apo-2リガンドは、好ましくは培養培地から分泌されたポリペプチドとして回収されるが、分泌シグナル無しで直接産生される場合は宿主細胞溶菌液から回収してもよい。Apo-2リガンドが膜結合性である場合は、適切な洗浄液（例えばトリトン-X100）を用いて膜から引き離すか、又は酵素的切断によりその細胞外領域を切り離すことができる。

【0061】

Apo-2リガンドがヒト起源のもの以外の組換え細胞でつくられる場合は、Apo-2リガンドはヒト起源のタンパク質又はポリペプチドを含まない。しかしながら、Apo-2リガンドに関して実質的に相同である調製物を得るには、組換え細胞タンパク又はポリペプチドからApo-2リガンドを精製することが通常必要である。第一段階として、培地又は溶菌液を遠心分離して粒状の細胞屑を除去することができる。ついで、Apo-2リガンドを、汚染した可溶性タンパク質及びポリペプチドから、適切な精製手順の例である次の手順により精製される：イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAE又はCM；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；及びIgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラムである。

40

好ましい実施態様では、Apo-2リガンドはアフィニティークロマトグラフィーによって精製される。残基が欠失され、挿入され、又は置換されたApo-2リガンド断片又は変異体は、その変異によってしばしば惹起される実質的な性質変化を考慮に入れて、天然

50

A p o - 2 リガンドと同じようにして回収することができる。例えば、他のタンパク質又はポリペプチド、例えば細菌性もしくはウイルス性抗原とのA p o - 2 リガンド融合体の調製は精製を容易にする；抗原に対する抗体を含む免疫アフィニティーカラムを、融合ポリペプチドを吸着させるために使用することができる。

【0062】

例えばフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)のようなプロテアーゼインヒビターもまた精製の間のタンパク分解を阻害するのに有用であり、偶発的な汚染物質の成長を防止するために抗生物質を含めることができる。天然A p o - 2 リガンドに適切な精製方法は、組換え細胞培養の発現の際におけるA p o - 2 リガンド又はその変異体の特性の変化の起因となる改変が必要となることは、当業者であれば分かるであろう。

10

このような精製工程では、回収されたA p o - 2 Lを二価金属イオン含有溶液又は一又は複数の二価金属イオンを含有する精製物質（例えばクロマトグラフィー媒体又は支持体）へ曝露することが望ましいであろう。好ましい実施態様では、二価金属イオン及び／又は還元剤は、A p o - 2 Lの精製又は回収の間に使用される。場合によっては、DTT又はBMEのような二価金属イオン及び還元剤の両方を、A p o - 2 Lの精製又は回収の間に使用してもよい。精製又は回収の間に二価金属イオンを使用することは、A p o - 2 L三量体の安定性を提供するか、あるいは細胞培養段階の間に形成されるA p o - 2 L三量体を維持すると考えられる。

原核生物宿主細胞（最も好ましくは細菌宿主細胞）から発現A p o - 2 Lを精製及び回収する好ましい方法は以下の工程を含む：（a）大腸菌細胞からA p o - 2 L（細胞内）を抽出する；（b）二価金属イオン及び／又は還元剤を含んでなるバッファー液において適切に折り畳まれたA p o - 2 Lを安定化する；（c）順次、カチオン（陽イオン）交換体、ハイドロキシアパタイト及び疎水性相互作用クロマトグラフィーを使用するクロマトグラフィーによってA p o - 2 Lを精製する、及び（d）各クロマトグラフィー支持体から、二価金属イオン及び／又は還元剤を含んでなるバッファー液へ選択的にA p o - 2 Lを溶出する。このような方法に使用される二価金属イオン及び還元剤には、硫酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸コバルト、DTT及びBME、そしてより好ましくは硫酸亜鉛又はDTTが含まれる。

20

【0063】

以下の記載はまた一又は複数の化学基に共有的に結合した（以下「抱合された(conjugated)」）A p o - 2 リガンド変異体を製造する方法に関する。本発明のA p o - 2 L抱合体に使用するのに適した化学基は好ましくは有意に毒性又は免疫原性ではない。化学基は場合によっては保存することができ保存に適した条件下で使用できるA p o - 2 L変異体抱合体を製造するために選択される。ポリペプチドに抱合されうる様々な例示的化学基が当該分野で知られており、例えば糖タンパク質に天然に生じる炭水化物のような炭水化物、及び非タンパク様ポリマー、例えばポリオールが含まれる（米国特許第6245901号を参照）。

30

例えばポリオールは、上掲の国際公開93/00109に開示されているように、リジン残基を含む一又は複数のアミノ酸残基においてA p o - 2 L変異体のようなポリペプチドに抱合されうる。用いられるポリオールは任意の水溶性ポリ(アルキレンオキシド)ポリマーとでき、直鎖又は分枝鎖を有しうる。好適なポリオールには一又は複数のヒドロキシル位置で1から4の炭素を有するアルキル基のような化学基が置換されているものが含まれる。典型的には、ポリオールはポリ(アルキレングリコール)、例えばポリ(エチレングリコール)(PEG)であり、よって記載を簡単にするために、以下の議論においては、用いるポリオールがPEGである例示的な実施態様に関するものとし、ポリペプチドにポリオールを抱合させる方法を「ペグ化(pegylation)」と称する。しかし、当業者であれば、他のポリオール、例えばポリ(プロピレングリコール)及びポリエチレン-ポリプロピレングリコールコポリマーを、PEGに対してここに記載した抱合法を使用して用いることができることは理解できるであろう。

40

【0064】

50

A p o - 2 L 変異体のペグ化に用いられる P E G の平均分子量は変動し得、典型的には約 5 0 0 から約 3 0 0 0 0 ダルトン (D) の範囲でありうる。好ましくは、P E G の平均分子量は約 1 0 0 0 から約 2 5 0 0 0 D であり、より好ましくは約 2 0 0 0 から約 5 0 0 0 D である。一実施態様では、ペグ化は約 2 0 0 0 D の平均分子量を持つ P E G を用いて実施される。好ましくは、P E G ホモポリマーは未置換であるが、一端にアルキル基が置換されていてよい。好ましくは、アルキル基は C 1 - C 4 アルキル基、最も好ましくはメチル基である。P E G 調製物は商業的に入手可能であり、典型的には本発明において使用するのに適した P E G 調製物は平均分子量に応じて販売されている非均一調製物である。例えば、市販の P E G (5 0 0 0) 調製物は典型的には分子量が僅かに変動し、通常は $\pm 5 0 0$ D の分子を含む。

10

本発明の A p o - 2 リガンド変異体は単量体形態又は三量体形態 (3 つの単量体を含む) でありうる。場合によっては、A p o - 2 L 変異体三量体は、P E G 分子が三量体 A p o - 2 L 変異体を構成する 3 つの単量体の各々に結合又は抱合されるようにペグ化される。そのような実施態様では、用いられる P E G は約 2 0 0 0 から約 5 0 0 0 D の平均分子量を有するのが好ましい。また、A p o - 2 L 変異体三量体は「部分的に」ペグ化され得、つまり、三量体を構成する三の単量体の一又は二だけが P E G に結合又は抱合される。そのような「部分的に」ペグ化された A p o - 2 L 変異体では、用いられる P E G が約 5 0 0 0 D 又は 5 0 0 0 D を超える平均分子量を有することが好ましい。

【0065】

タンパク質をペグ化するための様々な方法が当該分野で知られている。P E G に抱合したタンパク質を製造するための特定の方法には、米国特許第 4 1 7 9 3 3 7 号、米国特許第 4 9 3 5 4 6 5 号及び米国特許第 5 8 4 9 5 3 5 号に記載された方法が含まれる。典型的には、タンパク質は、主に反応条件、ポリマーの分子量等々に応じて、ポリマーの末端反応性基にタンパク質のアミノ酸残基の一又は複数を介して共有的に結合される。反応性基を有するポリマーはここでは活性化ポリマーと命名する。反応性基はタンパク質の遊離のアミノ又は他の反応性基と選択的に反応する。P E G ポリマーは無作為な形又は部位特異的な形の何れかの形でタンパク質上のアミノ又は他の反応性基に結合しうる。しかし、最適な結果を得るために、選択される反応性基のタイプと量、並びに用いられるポリマーのタイプは、反応性基がタンパク質上の余りに多くの特に活性な基と反応することを避けるために用いられる特定のタンパク質又はタンパク質変異体に依存するものと理解される。これは完全に避けることができないであろうため、タンパク質 1 モル当たり一般に約 0.1 から 1 0 0 0 モル、好ましくは 2 から 2 0 0 モルの活性化ポリマーを、タンパク質濃度に応じて用いることが推奨される。タンパク質 1 モル当たりの活性化ポリマーの最終量は、最適な活性を維持し、同時に可能ならばタンパク質の循環半減期を最適化するためのバランス量である。

20

30

【0066】

残基はタンパク質の任意の反応性アミノ酸、例えば N 末端アミノ酸基であってもよいが、好ましくは反応性アミノ酸はシステインであり、これは、例えば国際公開 9 9 / 0 3 8 8 7、国際公開 9 4 / 1 2 2 1 9、国際公開 9 4 / 2 2 4 6 6、米国特許第 5 2 0 6 3 4 4 号、米国特許第 5 1 6 6 3 2 2 号、及び米国特許第 5 2 0 6 3 4 4 号に示されているように、その遊離のチオール基を介して活性化ポリマーの反応性基に結合している。あるいは、反応性基はリジンであり、これは、活性化ポリマーの反応性基にその遊離のイプシロン-アミノ基を介して結合しており、あるいはグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、これはアミド結合を介してポリマーに結合している。ついで、この反応性基は例えばタンパク質の α 及び ϵ アミンと反応して共有結合を形成する。簡便には、P E G 分子の他端はメトキシ基のような非反応性基で「ブロック」されて、タンパク質分子の P E G 架橋複合体の形成を低減させることができる。

40

好適な活性化 P E G は多くの一般的な反応によって生成させることができる。例えば、P E G の N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (M - N H S - P E G) は、Buckmann 及び Mer r, Makromol. Chem., 182:1379-1384 (1981) の方法に従って、P E G - モノメチルエーテ

50

ル（ユニオンカーバイド社から市販されている）から、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）との反応によって調製することができる。また、PEG末端ヒドロキシ基は、例えば臭化チオニルと反応させてPEG-Brを生成した後、過剰のアンモニアでアミノ分解してPEG-NH₂を形成することによって、アミノ基に転換できる。ついで、PEG-NH₂は標準的なカップリング試薬、例えばウッドワード試薬Kを使用して対象のタンパク質に抱合される。更に、PEG末端-CH₂OH基は、例えばMnO₂での酸化によってアルデヒド基に転換できる。アルデヒド基は水素化シアノホウ素のような試薬を用いる還元性アルキル化によってタンパク質に抱合される。あるいは、本発明における使用に適した活性化PEGは多数の製造元から購入することができる。例えば、Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala.) は、メトキシ-PEGのスクシンイミジル炭酸塩及びメトキシ-PEGスクシンイミジルプロピオン酸塩に加えて、分子量2000のメトキシ-PEG-マレイミドを販売している。

10

【0067】

本発明のApo-2L変異体のペグ化の度合いを調節して、対応する非ペグ化Apo-2L変異体と比較してインビボ半減期（以下、「半減期」）を望ましく増加させることができる。ペグ化Apo-2L変異体の半減期は典型的にはペグ化の度合いが増加するのに対応して徐々に増加する。タンパク質のペグ化の度合いと部位は、例えば（1）ペグ化部位の数と反応性（例えば第一級アミン）及び（2）ペグ化反応条件によって、決まる。タンパク質におけるペグ化部位のいくつかは相対的に非反応性である可能性が高いので、標準的なペグ化反応では典型的には完全なペグ化にはならない。

20

標準的な突然変異誘発法を用いてタンパク質中の潜在的なペグ化部位の数を変えることができる。よって、アミノ酸置換がシステインやリジンのようなアミノ酸を導入又は置換する程度まで、本発明のApo-2L変異体は（図1に示された）天然配列Apo-2Lよりもより多い又は少ない数の潜在的ペグ化部位を含むことができる。ペグ化の度合いと部位はまた反応条件、例えば活性化PEG及びタンパク質の相対濃度並びにpHを調節することによって操作することができる。所望の度合いのPEG化に対する好適な条件は、標準的なペグ化反応のパラメータを変えることによって経験的に決定することができる。

R170CのようなApo-2L変異体のペグ化は任意の簡便な方法によって実施される。例示的な実施態様では、R170C-Apo2L、0のCys170側鎖（つまり、図1のアミノ酸114-281を持ち、位置170の天然アルギニン残基がシステイン残基に置換された変異体Apo-2L；このような分子はここではまた「R170C、0」と特定される）は、分子量2000Dのメトキシ-PEG-マレイミド（Shearwater Polymers）との反応によって共有結合的に修飾される。簡便には、R170C-Apo2L、0は、最初に約30分間、周囲温度で10mMのDTTを用いて還元し、ついでPD-10ゲル濾過カラムに通して、平衡にし、HICバッファー（0.45MのNa₂SO₄、25mMのTris-HCl、pH7.5）で溶出させて還元剤を除去することによって、修飾の準備がなされる。ついで、一定量のPEG-マレイミド溶液（dH₂O中10mM）を直ぐに添加する。完全な反応を確実にものにするために必要な時間と試薬濃度の条件は経験的に決定することができる。0.5から5倍の範囲のR170C-Apo2L、0単量体に対するPEG-マレイミドのモル濃度比と2又は24時間の反応時間を使用することができる。反応は、あらゆる未ペグ化Cys170チオールがカルボキシアミドメチル化されるように、R170C-Apo2L、0単量体濃度に対して10倍のモルの過剰のヨードアセトアミドを添加することによって停止される。ヨードアセトアミドでの修飾は約30分であり、その後、過剰な試薬は、平衡化されPBSで溶出されるNAP-5カラム（Pharmacia）でのゲル濾過によって除去される。

30

40

【0068】

ペグ化タンパク質はSDS-PAGE、ゲル濾過、NMR、ペプチドマッピング、液体クロマトグラフィー-質量分析法、及びインビトロ生物学的アッセイによって特徴付けすることができる。ペグ化の度合いは典型的にはSDS-PAGEによって最初に示される。10%のSDS中でのポリアクリルアミドゲル電気泳動は、典型的には溶出バッファーと

50

して10mMのTris-HCl、pH8.0、100mMのNaCl中で実施される。どの残基がペグ化されているかを証明するために、トリプシン及びLys-Cプロテアーゼのようなプロテアーゼ類を使用するペプチドマッピングを実施することができる。しかし、ペグ化及び非ペグ化R170C-Apo2L.0の試料を、Lys-Cプロテアーゼのようなプロテアーゼで消化させ、得られたペプチドを逆相HPLCのような方法で分離することができる。生成されたペプチドのクロマトグラフィーパターンを、Apo-2L.0ポリペプチドに対して過去に決定したペプチドマップと比較することができる。ついで、各ピークをピーク中のフラグメントのサイズを証明するために質量分析によって分析することができる。PEG基を有するフラグメントは、通常、注入後にはHPLCカラムに保持されておらず、クロマトグラフから消失している。クロマトグラフからのそのような消失は、少なくとも一のペグ化可能なアミノ酸残基を含んでいるに違いない特定のフラグメントに対するペグ化を示している。ペグ化Apo-2L変異体は、Apo-2Lレセプターと相互作用し、及び／又は哺乳動物においてアポトーシスを誘導する能力について、及び／又は他の生物学的活性について、当該分野で知られている方法を使用して、更にアッセイすることができる。

10

【0069】

また、このようなApo-2リガンド変異体ポリペプチドを含有する製剤が、本発明により提供される。このような製剤は、治療的投与のみならず、特に貯蔵に適している（及びApo-2L三量体の維持）。任意の製剤は、Apo-2L変異体及び亜鉛又はコバルトを含む。より好ましくは、この製剤は金属がタンパク質に対して<2Xモル比であるApo-2L変異体及び亜鉛又はコバルト溶液を含む。水溶性懸濁液が所望されるならば、製剤中の二価金属イオンはタンパク質に対して>2Xモル比であってもよい。当業者であれば、>2Xモル比では、金属が製剤にとって有害になりうるか又は治療用製剤として望ましくない製剤中の二価金属イオン濃度の上限範囲がありうるということが分かるであろう。

20

製剤は、既知の技術で調製することが可能である。例えば、Apo-2L変異体製剤はゲル濾過カラム上でのバッファー交換によって調製することが可能である。

典型的には、適量の製薬的に許容可能な塩が、製剤を等浸透圧にするために製剤において使用される。製薬的に許容可能な担体の例には、生理食塩水、リンガー液及びデキストロース液が含まれる。製剤のpHは、好ましくは約6～約9、さらに好ましくは約7～約7.5である。好ましくは、亜鉛がApo-2Lへ結合したままであることを確かなものにするためにpHは選択される。pHが高すぎる又は低すぎるならば、亜鉛はApo-2Lへ結合したままではなく、結果としてApo-2L変異体の二量体が形成される傾向となる。例えばApo-2リガンド変異体及び二価金属イオンの濃度及び投与経路によっては、ある種の担体がより好ましくなることは、当業者には明らかである。

30

【0070】

Apo-2L変異体の治療用製剤は、凍結乾燥製剤、水溶液又は水性分散液の形態で、任意的な製薬上許容可能な担体、賦形剤又は安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16版, A. Osol, A.編 (1980))と、適切な純度を有する所望のApo-2L変異体分子を混合することにより調製される。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、好ましくは用いられる投与量及び濃度で受容者に非毒性であり、トリス(Tris)、HEPES、PIPES、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤、アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベンのようなアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウ

40

50

ムなどの塩形成対イオン；及び／又はTWEENTM、PLURONICSTM、又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0071】

このような担体の更なる例は、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばグリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩、又は電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、コロイダルシリカ、マグネシウムトリシリケート、ポリビニルピロリドン、及びセルロースベースの物質である。局所用の担体又はゲルベースの形態は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース又はメチルセルロース等の多糖類、ポリビニルピロリドン、ポリ

10

アクリレート、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコール、及びモクロウアルコールを含む。あらゆる投与について、従来のデポ-形態が好適に用いられる。このような形態は、例えば、マイクロカプセル、ナノ-カプセル、リボソーム、硬膏剤、吸入形態、鼻スプレー、舌下錠、及び徐放性製剤を含む。Apo-2リガンド変異体の製剤としての有効な用量は経験的に決定することができ、このような決定は当業者の技量の範囲に含まれる。今日では、Apo-2リガンド変異体の有効用量又は量は、1日体重1kg当たり約1マイクログラム～約100mg又はそれ以上の範囲であると考えられている。用量の種内スケージングは、この分野で周知の方法、例えばMordentiら, Pharmaceut. Res., 8 1351 (1991)に記載されているように実施することができる。当業者はApo-2リガンド変異体の投与しなければならない用量が、例

20

【0072】

インビボ投与に使用されるApo-2L変異体は滅菌されていなくてはならない。これは、凍結乾燥及び再構成の前又は後に、滅菌フィルター膜を通す濾過により容易に達成される。Apo-2L変異体は通常は凍結乾燥形態又は全身投与される場合には溶液中に貯蔵される。凍結乾燥形態にある場合、Apo-2L変異体は典型的には使用時の適当な希釈剤を含む他の成分と組み合わせて処方される。Apo-2L変異体の液体製剤の例は、無菌の、透明な、無色の生鮮溶液で、皮下注射用の1回投与バイアルに充填されている。

治療的Apo-2L変異体製剤は、一般的に無菌のアクセスポート、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針で貫通可能なストッパーを備えたバイアルに入れられる。製剤は、好ましくは静脈内（i. v.）、皮下（s. c.）、又は筋肉内（i. m.）の繰り返し注射として、あるいは鼻内又は肺内送達に適したエアロゾル製剤として投与される（肺内送達については、例えばEP257956参照）。

30

また、Apo-2L変異体は、徐放性調製物の形態で投与することが可能である。徐放性調製物の適切な例には、タンパク質を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが含まれ、このマトリクスは、例えばフィルム又はマイクロカプセル等の成形品の形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、Langerら, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981)及びLanger, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982)に記載されたポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラ

40

クチド(米国特許第3773919号、EP58481)、L-グルタミン酸とガンマ-エチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidmanら, Biopolymers 22: 547-556 (1983)）、非分解性エチレン-酢酸ビニル（Langerら, 上掲）、分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注入可能な微小球)、及びポリ-D-(−)-3-ヒドロキシ酪酸（EP133988）が含まれる。ここに記載されたApo-2L変異体及びその製剤は、種々の治療的及び非治療的応用へ用いられる。これら応用は、種々の癌（上記に提供されている）、免疫関連症状、及びウイルス性症状の治療の方法である。このような治療的及び非治療的応用は、例えば、国際公開97/25428、国際公開97/01633、国際公開01/00832及び国際公開01/22987に記載されている。

50

【0073】

ここに記載の A p o 2 L 変異体は種々の病理状態、例えば免疫関連疾患又は癌を治療するのに有用である。ここに記載した様々な病理状態の哺乳動物における診断は、熟練した実務者によって行うことが可能である。例えば、哺乳動物の癌又は免疫関連疾患の診断と検出を可能にする診断技術は、当該分野で利用可能である。例えば、癌は、限定されるものではないが、触診（法）、血液分析、X線、NMR等々を含む技術を通して同定され得る。また、免疫関連疾患は容易に同定できる。全身性エリテマトーデスでは、疾患の中心媒介物は自己タンパク質／組織に対する自己反応性抗体、及び引き起こる免疫媒介炎症の産生である。腎臓、肺、骨格筋系、皮膚と粘膜、眼、中枢神経系、心臓血管系、胃腸管、骨髄及び血液を包含する複数の臓器と系が、臨床的に影響を受ける。リウマチ様関節炎 (R A) は、主に複数の関節の滑膜に係る慢性全身性自己免疫疾患であり、結果として関節軟骨に傷害が生じる。病原はTリンパ球依存であり、リウマチ因子、自己 I g G に対する自己抗体の生成を伴い、結果として関節体液及び血液において高レベルに達する免疫複合体が形成される。関節におけるこれらの複合体は、滑膜へのリンパ球及び単球の顕著な浸潤と、続いての顕著な滑膜変化を誘発しうる；多数の好中球の添加により同様の細胞で浸潤されるならば関節空間／体液でもある。影響を受けている組織は、多くの場合対称的パターンで主に関節である。しかしながら、2つの主要形態の関節外疾患も生じる。一方の形態は進行中の進行性関節疾患及び肺線維症の局部的障害、血管炎、及び皮膚潰瘍を伴う関節外障害の発達である。関節外疾患の第2の形態はいわゆるフェルティー症候群であり、R A 疾患経路の末期、時々関節疾患が鎮静した後に生じ、好中球減少、血小板減少及び脾腫大の存在に関与する。これは、梗塞、皮膚潰瘍及び壊疽の形成を伴う多数の器官及び血管炎に付随する。多くの場合、患者では、発病している関節上にある皮下組織にリウマチ様小結節が発達し；小結節は、混合炎症細胞浸潤に包囲された壊死性中心を有する。R A で生じる可能性のある他の徴候には：心外膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、肺線維症を伴う間質性肺炎、乾性角結膜炎、及びリウマチ様小結節が含まれる。

10

20

【0074】

A p o 2 L 変異体は、周知の方法に従い、ボラスとしての静脈内投与、又は一定期間にわたる連続的な注入、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、骨液内、くも膜腔内、経口、局所的、又は吸入の経路により投与できる。場合によっては、投与は、様々な市販の装置を使用するミニポンプでの注入によって実施することもできる。

30

A p o 2 L 変異体の投与の有効な用量とスケジュールは、経験的に決定することができ、そのような決定を行うことは当業者の技量の範囲にある。単独又は複数の用量が使用される。単独に使用される A p o 2 L 変異体の効果的な用量又は量は一日当たり約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ から約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重あるいはそれ以上までの範囲であると現在では考えられる。用量の種間スケールリングは、例えば、Mordentiら, Pharmaceut. Res., 8:1351(1991)に開示されているような当該分野で知られている方法で実施することができる。

A p o 2 L 変異体のインビボ投与が用いられる場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり1日に約 $10 \text{ng} / \text{kg}$ から $100 \text{mg} / \text{kg}$ まで、好ましくは約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ から $10 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ である。特定の用量及び輸送方法の指針は文献に与えられている；例えば、米国特許第4657760号、第5206344号、又は第5225212号参照。異なる製剤が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又は組織を標的とする投与には、他の器官又は組織とは異なる方式で輸送することが必要であることが予想される。当業者であれば、投与されなければならない A p o 2 L 変異体の用量が、例えば、A p o 2 L 変異体を受入れる哺乳動物、投与経路、及び哺乳動物に投与されている他の薬剤又は治療法に依存して変わりうることは理解できるであろう。

40

【0075】

更なる治療法を本方法において使用することも考えられる。一又は複数の他の治療法には、これらに限定されるものではないが、当該技術分野において既知であり、前述のセクション I においてさらに詳細に定義された、放射線療法、サイトカイン、成長阻害剤、化学

50

治療剤、細胞障害剤、チロシンキナーゼ阻害因子、ラスファルネシルトランスフェラーゼ阻害因子、血管形成阻害因子、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の投与が含まれる。更に、治療法は、R i t u x a n^{T M}又はH e r c e p t i n^{T M}などの腫瘍抗原を標的とする治療的抗体並びに抗V E G Fなどの抗血管形成抗体、又はD R 5又はD R 4のようなA p o 2 Lレセプターを標的とする抗体に基づく。

化学治療剤に対する調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務家により経験的に決定される。そのような化学療法に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service, M.C.Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)にも記載されている。また、化学療法剤は、A p o 2 L変異体の投与に先行し、又はその後に行い、又はそれらと共に与えられてもよい。

また、C D 2 0、C D 1 1 a、C D 1 8、C D 4 0、E r b B 2、E G F R、E r b B 3、E r b B 4、又は血管内皮因子(V E G F)、又は他のT N F Rファミリーメンバー（例えばD R 4、D R 5、O P G、T N F R 1、T N F R 2）に結合する抗体などの他の抗原に対する抗体を投与することも好ましい。他の方法として、又は付加的に、同一の抗原又はここに開示した二又はそれ以上の異なる抗原に結合する二又はそれ以上の抗体を患者に同時投与してもよい。しばしば、患者に一又は複数のサイトカインを投与することも有益である。一実施態様では、ここにおけるA p o 2 L変異体は、成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて当該発明のA p o 2 L変異体を投与する。

【0076】

A p o 2 L変異体（及び一又は複数の他の治療剤）は同時的又は経時的に投与される。A p o 2 L変異体の投与の後、インビトロにおいて処理された細胞を分析することができる。インビボでの治療がなされた場合、治療された哺乳動物は熟練した実務家にとって周知の様々な方法によりモニターすることができる。例えば、壊死をアッセイするために腫瘍細胞を病理検査することができ、又は血清の免疫系応答を分析することができる。

ここに記載した疾患の診断又は治療に有用なA p o - 2 L変異体を含むキットのような製造品は、少なくとも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種々の物質から形成できる。容器は、状態の診断又は治療に有効なA p o - 2 L変異体製剤を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。容器上又は添付されるラベルには、製剤が選択した状態の診断又は治療に使用されることが示されている。この製造品は、製薬的に許容可能なバッファー、例えばリン酸緩衝塩水、リンガー液、及びデキストロース溶液を収容した第2の容器をさらに具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用説明書を備えた包装挿入物を含む、商業的及び使用者の立場から望ましい他の材料を具備してもよい。また、この製造品は、上述の他の活性剤を収容した第2又は第3の容器を具備してもよい。

【0077】

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【実施例】

【0078】

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。A T C C登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【0079】

（実施例1）

A p o - 2 Lの結晶学分析

A p o - 2 L（アミノ酸残基114-281）の結晶は、20℃で、50%のp e g 2 K

10

20

30

40

50

MMEのウェル溶液を覆う、40 μ Lタンパク質(20 mM Tris、pH 8.0中の2.6 mg/mL)、20 μ L 50 mM Tris pH 8.0、及び10 μ L 8%PEG 2 K MMEを含有する、70 μ Lシッティングドロップ(sitting drop)の中で成長させ、非対称単位中に二つの単量体を有し、単位胞格子定数 $a = 72.5$ 、 $c = 140$ オングストロームで室温では3.9オングストロームへ回折する空間群P63のメンバーであった。D218A変異体の結晶は、4℃で、32%MPDのウェル溶液を覆う4 μ Lの4%MPD及び10 μ Lタンパク質(20 mM Tris pH 7.5の1.7 mg/mL)を含有する14 μ Lシッティングドロップ中で成長し、非対称単位当たり1単量体で、単位胞格子定数 $a = 66.4$ 、 $c = 197.7$ オングストロームで、シンクロトロン放射光で-180℃では1.3オングストロームへ回折する空間群R32のメンバーであった。データは、Apo-2L(残基114-281)の結晶に対して回折を3.9オングストロームに設定し、D218A変異体の1.9オングストロームは、MAR検出器が装備されているRigaku回転陽極X線発生装置で測定され、DENZO/SCALEPACKで処理された[Otwinowskiら, Proceeding of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing(eds. Sawyerら) pp56-62 Daresbury Laboratory, Daresbury, England, 1993]。D218A変異体のための1.3オングストロームの設定データは、アルゴン国立研究所のアドバンストフォトンソースにおいて測定、及びHKL2000/SCALEPACKで加工されて、100%の完成性と12倍の冗長性、及び $I/\langle I \rangle = 12.4$ を伴う6.4%のRsym(1.35-1.30シェルの中に34%)を有した。

10

20

【0080】

天然Apo-2L構造は、プログラムAmore [Acta Cryst., D50:760-763(1994)]によるTNF- α (pdbコード1TNF)を基礎とするモデルを利用した分子置換によって解明され[Brunger, X-PLOR:version 3.1, Yale Press, New Haven 1987]、35%のR_{free}まで厳密な2倍の非結晶学的リストレイン(non-crystallographic restraints)によって精密化された。この構造は、25%のR_{free}まで1.9オングストロームデータセットに対して、最後には、Refmac及びSHELXL [Sheldrickら, Methods in Enzymology, pp.319-343, Academic Press, San Diego 1997]によってR_{free} = 22%及び良好な幾何学(rmsd 結合0.011オングストローム、rmsd角度1.7°)を有する20%R_{factor}へ精密化された。すべての残基は、許容されるラマチャンドラプロットの領域の内側にある。精密化の間、電子密度の28シグマピークは、三量体軸上のCys230に関連する対称の間に観察された。この密度は、亜鉛イオンとしてモデル化され、B-因子の10へ精密化された。三量体軸上の塩素分子は、亜鉛に対して四番目のリガンドとして存在する。最終モデルは、170の溶媒分子及び1亜鉛イオンそして1塩素イオンをともなう残基120-130、142-194、203-281から構成される。残基91-119、131-141、及び195-202は秩序が乱れている。出発物質の質量分析が結晶が完全長であることを示す一方で、幾つかの結晶のN末端配列の決定は、N末端が原形態を保っていることを確かなものにした。結晶学的データの要約は図2Cに提供されている。

30

40

50

【0081】

(実施例2)

Apo2Lシステイン置換変異体の設計と生産

システイン置換の部位はDR5・Apo2L複合体のX線構造(図3)の検査を元にして選択した。突然変異の際の活性の喪失又は導入されたシステイン残基の引き続いての修飾を避けるために、レセプター接触領域の外側の部位のみを突然変異誘発のために考慮した。システイン側鎖の効率的な化学修飾を確実にするために、結晶構造において高い溶媒接近性を示した残基のみを選択した。これらの基準に合致する残基には、限定されるものではないが、Val114、Arg115、Glu116、Asn134、Asn140、Glu144、Asn152、Ser153、Arg170、Asp234、Glu249、Arg255、Glu263及びHis264が含まれる。図3に示されるように、この残基群はApo2L単量体の一面を頂部から底部までをスパンしている。

A p o - 2 L のシステイン置換変異体は、プラスミド p A P O K 5 . 0 の一本鎖型でのオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発 (Kunkelら, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:488-492 (1985); Kunkelら, Methods in Enzymology, 154: 367-382 (1987)) によって構築した。このプラスミドは、トリプトファン (t r p) プロモーターにより推進される A p o 2 L の 1 1 4 - 2 8 1 アミノ酸型の細胞内大腸菌発現のために設計した。p A P O K 5 . 0 は A p o - 2 L の残基 9 1 - 1 1 3 (図 1) をコードしている DNA セグメントの欠失突然変異誘発によって p A P O K 5 (1999 年 7 月 22 日公開の国際公開 99/36535) から構築した。p A P O K 5 は、t r p プロモーターを持つプラスミド p S 1 1 6 2 へ A p o - 2 L c D N A (図 1 の残基 9 1 - 2 8 1 をコードする) をクローニングするための P C R を利用して構築した。突然変異誘発後に、プラスミドの同一性をプラスミドの A p o 2 L の全体部分のジデオキシヌクレオチド配列決定 (Sanger) によって確認した。10 ついで、システイン置換タンパク質をコードするプラスミドを、発現のための大腸菌株 2 9 4 に形質転換した。培養物を L u r i a ブロス + 5 0 μ g / m L カルベニシリン中で 3 7 ° C にて飽和するまで一晩成長させた。続いて、飽和した培養物を 5 0 倍希釈して N a₂ H P O₄ (6 g / L)、K H₂ P O₄ (3 g / L)、N a C l (0.5 g / L)、N H₄ C l (1 g / L)、グルコース (4.9 g / L)、カザミノ酸 (4.9 g / L)、27 m M の M g S O₄、0.003 % チアミン H C l 及び適量の蒸留水 + カルベニシリン 40 μ g / m L からなる滅菌濾過培地中に蒔いた。A 500 が 0.5 - 0.8 になるまで培養物を 37 ° C にて成長させた後、25 μ g / m L の最終濃度になるまで 3 - α - インドールアクリル酸 (I A A) (Sigma, St.Louis, MO) を添加して発現を誘導した。振盪しながら細胞を 30 ° C で一晩成長させ、遠心分離して収集し、以下に記載されたような A p o 2 L の引き続いての回収のために - 20 ° C で凍結保存した。20

【0082】

モデル M 1 1 0 - F マイクロフルイダイザー (Microfluidics Corporation, Newton, MA) を使用して、凍結した大腸菌細胞ペレットから、10 容量 (w t / v o l) の 100 m M の T r i s、p H 8.0 / 200 m M の N a C l / 5 m M の E D T A / 1 m M の D T T 中での均質化によって A p o - 2 L タンパク質を抽出した。ポリエチレンイミン (P E I) を 0.5 % (v o l / v o l) の最終濃度までホモジネートに添加して、これをついで遠心分離して細胞片を除去した。固形の硫酸アンモニウムを攪拌しながら周囲温度にて 45 % の飽和度の最終濃度になるまで抽出上清に加え、遠心分離によってペレットを回収した。30 硫酸アンモニウムペレットを 50 % の硫酸アンモニウム溶液で洗浄して残留 E D T A を除去した後、50 容積 (w t / v o l) の 50 m M の H E P E S、p H 7.5 / 0.1 % トリトン X - 100 中に再懸濁させた。得られた溶液を遠心分離によって透明にし、5 m L の H i T r a p キレーティングセファロースカラム (Pharmacia, Piscataway, NJ) を使用して固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) によって精製した。カラムに、100 m M の N i S O₄ / 300 m M の T r i s、p H 7.5 中のニッケルを充填し、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中の 350 m M の N a C l で平衡化した。充填後、カラムを、P B S 中 350 m M の N a C l で洗浄し、P B S 中 50 m M のイミダゾール / 350 m M の N a C l で溶出させた。I M A C 溶出液を 20 m M の T r i s、p H 7.5 に対して透析し、遠心分離によって透明にし、更に、平衡化し 20 m M の T r i s、40 p H 7.5 で洗浄した 5 m L の H i T r a p S P セファロースカラム (Pharmacia) を使用する陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。H i T r a p S P カラムを 20 m M の T r i s、p H 7.5 / 0.5 M の N a C l で溶出させた。S P カラム溶出液を 2 m M の D T T で還元し、続いて周囲温度で 45 % の飽和度の最終濃度になるまで攪拌しながら固形の硫酸アンモニウムを加えることによって沈殿させた。硫酸アンモニウムペレットを 3.5 m L の 20 m M の T r i s、p H 7.5 / 100 m M の N a C l 中に再懸濁させ、P D 10 カラム (Pharmacia) を使用するゲル濾過クロマトグラフィーによって 20 m M の T r i s、p H 7.5 / 100 m M の N a C l / 2 m M の D T T の最終バッファー中に交換した。精製した A p o - 2 L システイン置換タンパク質を、クーマシー染色 S D S - P A G E 及び質量分析によって特徴付けし、- 20 ° C で凍結して保存した。50

【0083】

(実施例3)

インビトロでのApo2L変異体のアポトーシス活性

蛍光色素の代謝転換から細胞生存度を測定するバイオアッセイを、Apo2L変異体のアポトーシス活性を測定するために用いた。Apo-2L、0、Apo2L、2、又はApo2L変異体の2倍段階希釈物を、0.1%BSAを含むRPMI-1640培地(Gibco)中で作製し、50 μ lの各希釈物を、96ウェルのファルコン培養マイクロプレートの個々のウェルへ移した。50 μ lのSK-MES-1ヒト肺癌細胞(ATCC HTB58)(RPMI-1640、0.1%BSA中)を、 2×10^4 細胞/ウェルの密度にて添加した。これらの混合物を、37 $^{\circ}$ Cで24時間にわたってインキュベートした。20時間目に、25 μ Lのアラマブルー(AccuMed, Inc., Westlake, Ohio)を添加した。細胞数を、530nmの励起時に590nmで相対蛍光を測定することで決定した。これらのデータを、細胞生存度の50%減少を示すApo2L、0の濃度であるED₅₀を計算するために、4パラメーターフィットを使用して分析した。

試験したシステイン置換Apo2L変異体のうち、E116CはSK-MES細胞に対するアポトーシス活性に有意な(>2倍)減少を示した(表I)。R170C変異体は約10倍増加した能力を有していた。R170C変異体の活性の増加はバイオアッセイ培地でのインキュベーション中のCys170の酸化に関連していると思われる。このアッセイにおいて、タンパク質はアッセイ培地で希釈され、貯蔵バッファー中に含まれる還元剤(2mMのDTT)が同時に希釈される。還元剤の濃度の減少により、ジスルフィド結合が形成されることになる。N-エチルマレイミド(NEM)(表I)又はヨードアセトアミド(図4)でのCys170の先のアルキル化が活性の増加を阻止した。また、Arg170がAla、Lys又はSer残基の何れかで置き換えられたApo2L変異体はApo-2L、0ポリペプチドに一層匹敵する活性を有していた。

【0084】

【表1】

表 I. アポトーシス誘導活性に対する Apo 2 L システイン置換体の効果

変異体	ED50 比	
Apo2L.2	15.3	
S96C.2	21.1	
S101C.2	8.7	
S111C.2	2.1	
V114C	1.4	
R115C	1.2	10
E116C	3.5	
N134C	0.7	
N140C	0.7	
E144C	1.5	
N152C	1.0	
S153C	1.3	
R170C	0.1	
R170C-NEM	1.1	
R170K	1.0	
R170S	0.4	20
K179C	1.2	
D234C	1.5	
E249C	1.6	
R255C	1.9	
E263C	0.6	
H264C	2.1	
S96C.2-PEG-2K	51	
S101C.2-PEG-2K	14.4	
S111C.2-PEG-2K	5.1	
V114C-PEG-2K	2.1	
R115C- PEG-2K	14.3	30
E116C- PEG-2K	ND	
N134C- PEG-2K	134	
N140C- PEG-2K	38	
E144C- PEG-2K	7	
N152C- PEG-2K	17.1	
S153C- PEG-2K	65	
R170C- PEG-2K	5.2	
K179C-PEG-2K	1.9	
D234C- PEG-2K	43	
E249C- PEG-2K	13.2	40
R255C- PEG-2K	ND	
E263- PEG-2K	23	
H264C- PEG-2K	54	

「ND」＝定量されず；タンパク質の 91-281 型からつくられた変異体 S96C.2、S101C.2、及び S111C.2（「Apo 2 L.2」）を除いて Apo-2 リガンド変異体の全てがタンパク質の 114-281 型（Apo 2 L.0）としてつくられた。

R170C-Apo-2L.0三量体間のジスルフィド結合形成の可能性を、空気酸化の速度を測定することによって更に調べた。2mMのDTTの存在下で保存したR170C-Apo-2L.0の1.4mg/mL溶液の一部を、DTTを除去するためにHICバッファー(0.45Mの Na_2SO_4 、25mMのTris-HCl、pH7.5)で平衡化したPD-10カラムに通した。この溶液(3.5mLの1.1mg/mL R170C-Apo-2L.0)を穏やかに攪拌しながら15mLのFalconチューブ中で周囲温度にてインキュベートした。一定量を様々な時点で除去し、R170C-Apo-2L.0に残る全ての溶媒接近可能なチオール類を10倍のモル過剰のヨードアセトアミドでアルキル化した。最初の時点は3分であるが、これはPD-10カラムからタンパク質を溶出させるのに必要な時間量であるためである。これらの試料を、上述のようにしてSK-ME5細胞での生物活性について特徴付けを行い、また多角度光散乱検出(SEC-MALS)を備えたサイズ排除クロマトグラフィーによって分子量について特徴付けを行った。クロマトグラフィーを、平衡化されPBSで溶出させられ、光散乱検出器とUV検出器の双方を備えたFPLCシステムで操作されるSuperdex200カラム(1.6x30cm)(Wyatt Technology, Inc.)を使用して実施した。

10

20

30

50

【0086】

図5に示されるように、3分だけの空気酸化では、大部分がR170C-Apo-2L.0は70000Dの算定分子量を持つ三量体形態で見出される。2時間では、有意な量のより高分子量の形態が見出される。2時間での三つのピークは70000、140000及び600000Dの算定分子量を有している。空気酸化24時間の時点では、R170C-Apo-2L.0の殆どが600000D分子量の種として見出される。更なる24時間のインキュベーションでも600000Dを越える種は生産されない。SDS-PAGEの際に、より大きい分子量の形態がジスルフィド結合二量体として移動する。これらの結果は、R170C-Apo-2L.0タンパク質が、ジスルフィド結合を介して三量体が互いに結合したオリゴマー種を形成することを示唆している。140000D形態は互いに結合した2つの三量体に対応する一方、600000D形態は共有結合した8-10の三量体を有している。SDSでの変性の際に、これらのオリゴマーはジスルフィド結合二量体に分解する。24時間の空気酸化後に、R170C-Apo-2L.0は、アポトーシスバイオアッセイにおいてSK-ME5細胞に対してほぼ20倍のED50の減少を生じさせた。生物活性の増加の時間的経過はオリゴマー形態の蓄積と同時進行する(図6)。Cys170ジスルフィド結合を通してのオリゴマー生成はまたDR5レセプターに対する親和性を増大させる結果となる。

これらの結果は、レセプター結合を排除しない形でのApo2Lのオリゴマー形成により腫瘍細胞に対して更に強力なデスシグナルを生じる分子が得られることを示唆している。

【0087】

(実施例4)

Cys残基でのApo-2Lのペグ化

システイン置換Apo2Lタンパク質を、メトキシ-PEG-マレイミド、分子量2000D(Shearwater Polymers)との反応により共有結合的に修飾した。PD-10ゲル濾過カラムを通過させて保存バッファー中に含まれるDTTを最初に除去して、Apo2L変異体の修飾の準備をした。カラムを平衡化し、HICバッファー(0.45Mの Na_2SO_4 、25mMトリス-HCl pH7.5)又はアルギニン製剤バッファー(0.5Mのコハク酸アルギニン、20mMトリス-HCl pH7.5)で溶出させた。一定量のPEG-マレイミド溶液(10mMの dH_2O 溶液)を直ぐに添加した。最初の実験では、完全な反応を行わしめるのに必要な反応時間と試薬濃度を決定するためにR170C変異体を使用した。1:1、2:1、5:1又は10:1のR170C-Apo2L.0単量体に対するPEG-マレイミドのモル濃度比及び2から24時間の反応時間を使用した。反応を、2mMになるまでDTTを添加することにより終結させ、周囲温度で30分インキュベーションした後、ヨードアセトアミドを10mMになるまで添加した。この反応停止手順によって、反応中に生じたあらゆるジスルフィド結合を減少させ、あらゆる未ペグ

化Cys 170チオールをカルボキシアミドメチル化させた。ヨードアセトアミドでの修飾は30分間で、その後、過剰な試薬を、平衡化されPBSで溶出されるNAP-5カラム (Pharmacia) でのゲル濾過によって除去した。これらの試料をSDS-PAGE及びSEC-MALSによって分析した。またSK-MES細胞に対するアポトーシス誘導活性を上述のようにしてアッセイした。図8に示されるように、PEG-2K-マレイミドでのR170C-Apo2L. 0の処理によって単量体分子量のおよそ2000ダルトンのシフトがあることがSDS-PAGEにより分かる。2:1又はそれ以上のPEG:タンパク質の比を用いる反応によって同様の程度の修飾が得られた。これらの反応について、残留した未修飾単量体を観察した。クーマシーブルー染色ゲルの視覚検査によって、未修飾単量体が全タンパク質の<10%であることが示唆される。2:1未満のPEG:タンパク質モル比では、得られた修飾は少なかった。24時間の反応時間では生成物の明らかな変化は観察されなかったので、反応は2時間以内に完了するように思われる。

10

【0088】

PEG化R170C-Apo2L. 0の水力学的性質を、Superdex200カラムに使用したランニングバッファーを0.4Mの硫酸アンモニウム、15mMのリン酸ナトリウム、pH6.5にした以外は上述のようにしてSEC-MALSによって評価した。この高イオン強度のバッファーを使用すると、カラム材料とのApo2Lの相互作用が低減される。ヨードアセトアミドでブロックされたCys170を有するR170C-Apo2L. 0は、60000g/molとして光散乱法から算定されたモル質量で、10.65mLを中心とする単一の対称ピークとして溶出された。2:1のPEG比と2時間の反応時間を使用して調製されたPEG-2K-R170C-Apo2L. 0はまた単一の対称ピークとして溶出されたが、溶出容積は9.25mL、算定モル質量は69000g/molであった。SDS-PAGEからの結果と併せると、これらのデータは、この試料が三量体当たり3つの共有結合PEG鎖を有しており、単量体当たり1PEG鎖を伴っていることが示唆される。PEG-2K-R170C-Apo2L. 0の算定分子量(69000D)は測定の標準誤差(±10%)の範囲で予想質量(66000D)に一致する。三量体当たり3つの共有結合PEG鎖を有しており、単量体当たり1PEG鎖を伴っているApo-2Lのこの三量体形態は、有意な生物活性性状と腎臓濾過カットオフより大なる MW_{app} を含む多くの共存する最適な特性を示すことによって本発明の好適な実施態様を表す複合体を生じる。IAM-R170C-Apo2L. 0に対して50000D、PEG-2K-R170C-Apo2L. 0に対して100000Dの見かけ分子量は相対溶出容積に基づいて計算された。既知の分子量の一連のタンパク質を使用して、見かけ分子量に溶出容積を関係づける校正曲線を構築した。IAM-R170C-Apo2L. 0とまた未修飾のApo2L. 0は予想よりも些か少ない分子量を示したが、三量体の緻密な形状と一致していた。PEG-2K-R170C-Apo2L. 0に対して算定されたより大なる分子量は親水性で延長されたPEG鎖から生じ、修飾されたタンパク質の水力学的半径を大きく増大させる。

20

30

【0089】

上記の結果に基づいて、他のシステイン置換変異体での最初のPEG化実験では2:1のPEG対単量体モル比と2時間の反応時間を用いた。これらの反応条件は通常3つの結合PEG鎖を有する三量体を生じた。しかし、V114C及びR115C変異体は、実験では反応性に乏しく、より完全な反応を達成するにはより高いPEG比とより長い反応時間を必要とした。R255C変異体はより高いPEG比とより長い反応時間でも修飾できなかった。修飾実験はE116C変異体では実施されなかった。

40

システイン置換タンパク質の多くは、上述のようにPEG化されたときに減少した生物活性(表I)を示した。生物活性の減少はPEG-V114Cの2.1倍からPEG-N134Cの134倍まで変動した。R170C-Apo2L. 0はPEG化の際に比較的高いレベルの活性を保持し、低PEG:タンパク質比で修飾が急速に完了まで進んだので、この変異体を更なる研究のために選択した。

より多量のPEG-R170C-Apo2L. 0の生産のために、PEG:Apo2L単量

50

体の2:1のモル比及び24時間の反応時間を使用した。70mgのR170C-Apo2L.0をゲル濾過した後、周囲温度で24時間の間、PEG-マレイミドと反応させた。10倍のモル過剰のヨードアセトアミドで反応を停止させた後、タンパク質を、製剤バッファー（コハク酸アルギニン）で平衡化したセファデックスG-25のカラムでのゲル濾過クロマトグラフィーによって遊離のPEGから分離した。この調製物はロット番号32176-87Cであった。精製したPEG-R170C-Apo2L.0（32176-87C）はApo2L.0に対して測定したものと等価なDR4、DR5、DcR1、DcR2、及びOPGに対する結合親和性を示した（表II）。

【表2】

表II. PEG-R170C-Apo2L.0についてエライザにより測定したレセプター結合親和性

EC50 (ng/mL)					
試料	DcR1	DcR2	OPG	DR4	DR5
Apo2L.0	10.8	6.0	85.2	94.3	42.3
PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C)	12.4	4.8	55.7	42.2	43.8
PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78)	2.7	0.8	6.7	4.5	9.0

10

20

【0090】

ついで、PEG-R170C-Apo2L.0（32176-87C）を質量分析及びペプチドマッピングによって分析した。MALDI-TOF-MS（図10）は、少量の未修飾単量体（分子量=19440）の存在と単一の結合PEGを持つタンパク質に対応する主要ピークを示している。PEG分子はポリマー単位エチレングリコール（分子量=44）の増分だけ分子量が異なる質量不均一性を有することがよく知られている。その結果、約21680を中心とする広い質量範囲が、単一のPEGが結合したタンパク質に対して観察された。ペグ化及び非ペグ化R170C-Apo2L.0間の平均質量差は、PEGの平均質量が2200Dであることを示している。

30

PEG結合部位はペプチドマッピングによって確認された。ペグ化及び非ペグ化R170C-Apo2L.0の試料をLys-Cプロテアーゼで消化し、得られたペプチドを逆相HPLCで分離した（図11）。生成されたペプチドのパターンを、Apo2L.0に対して過去に決定されたマップと比較した。Lys150及びLys179後の切断により生成されたL4と標識されたペプチドはR170C-Apo2L.0の消化にCys170残基を含んでいる。このピークは消失し、ペグ化タンパク質において、広い、後で溶出するピーク（L4*）によって置き換わる。このフラクションのMALDI-TOF質量スペクトルは、予想されたペプチド質量より大きい1.9-2.6kDaの分布を持つ44Daによって分離された一連のピークを示している。MALDI-TOFでのインソースフラグメンテーションによる更なる分析では、L4*を、Cys170がPEGで修飾された151-179ペプチドと確認した。これらの結果と対照的に、L10ペプチド（225-233）は未修飾及びペグ化R170C-Apo2L.0の双方において同様のピーク面積を示す。これは、埋もれており亜鉛イオンのキレート化に参与する天然Cys230残基がPEG-マレイミドによって修飾されないことを示している。Lys残基の側鎖のような他の官能基の有意な修飾は観察されなかった。無傷のタンパク質のSDS-PAGE及びMALDI-TOF質量スペクトルと併せると、これらのデータは、各単量体がCys170に結合した一つのPEGを有していることを示唆している。よって、天然の条件下では、R170C-Apo2L.0三量体は3つの結合したPEG分子を有している。

40

50

【0091】

(実施例5)

PEG-R170C-Apo2L.0の薬物動態学

Apo2Lのクリアランスに対するPEG化の効果をマウスで試験した。時間ゼロにおいてマウスの尾部にApo2L.0 (10mg/kg)又はPEG-R170C-Apo2L.0 (10mg/kg)を静脈注射した。血漿試料を1、20、40、60、及び80分に収集した。Apo2L濃度をELISAによって定量した。

図12に示されるように、Apo2L.0は循環から迅速に排除されるのに対して、PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C)はよりゆっくりと排除された。注射後60分で、Apo2L.0の血漿濃度は1分での濃度の1%未満であった。これに対して、PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C)の血漿濃度はこの時間では50%減少しただけである。よって、Apo2Lに対するPEG-2000の部位特異的付着によりクリアランス速度が有意に減少した。 10

【0092】

(実施例6)

マウス異種移植モデルにおけるヒトCOLO205腫瘍の成長に対するPEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C)の効果

胸腺欠損ヌードマウス (Jackson Laboratories) に 5×10^6 のCOLO205ヒト大腸癌細胞 (NCI) を皮下注射した。腫瘍を生じさせ、ノギスでの測定で約 150 mm^3 の体積になるまで成長させた。マウス (1グループ当たり8匹) にビヒクル (2x/週)、Apo2L.0 (60mg/kg、2x/週)、Apo2L.0 (10mg/kg、2x/週)、又はPEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C) (10mg/kg、2x/週) を静脈内注射した。腫瘍体積を三日毎に測定し、二週間後に治療を停止した。図13に示されるように、10mg/kgのPEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C) での処置はApo2L.0の等価な投薬量よりも腫瘍体積を大きく減少させた。10mg/kgのPEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C) の抗腫瘍効果はApo2L.0のより高い投薬量 (60mg/kg) で観察されたものと同様であった。Cys170でのApo2LのPEG化はこのヒト癌異種移植モデルにおいて効果を達成するのに必要とされる投薬量を低減させる。 20

【0093】

(実施例7)

部分的にPEG化され、ジスルフィド架橋されたR170C-Apo2L.0の調製

上述したように、R170C-Apo2L.0の一晩の空気酸化により、SK-MES細胞に対するインビトロでの生物活性を有意に増大させた60000D分子量の種を生じる。しかし、予備的な結果は、この高分子量形態がマウスでは有意に増加した半減期を持っていないことを示している。また、酸化されたR170C-Apo2L.0はマウス異種移植モデルにおいて抗腫瘍活性を増大させず、ある種の正常な肝細胞に対して毒性であると思われる。ジスルフィド結合形態の生物活性の増加をPEG化Apo2Lの遅いクリアランスと組み合わせるための努力において、PEG化実験を、PEG-マレイミド：R170C-Apo2L.0単量体の不足化学量論比を使用して実施した。これは同じ分子に対して架橋とPEG化の双方を可能にすることになる。 40

HICバッファーで平衡化したセファデックスG-25カラムでDTTを除去することによりPEG化反応のためのR170C-Apo2L.0 (95mg) を調製した。メトキシ-PEG-マレイミド、分子量2000D (Shearwater Polymers) を0.75：1のPEG：R170C-Apo2L.0-単量体の最終比になるまで添加した。単量体濃度は $55 \mu\text{M}$ であった。この溶液を周囲温度で一晩インキュベートした後、ヨードアセトアミドを $100 \mu\text{M}$ になるまで添加することによって反応を停止した。過剰な試薬を除去し、コハク酸アルギニン製剤バッファーで平衡化したセファデックスG-25カラムでの修飾タンパク質のゲル濾過によって、バッファーを交換した。この材料はPEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78) と命名され、増加したレセプター親和性 (表II) 及 50

びインビトロ生物活性（図14）を示した。

【0094】

PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78) の水力学的特性を、カラムを平衡化しPBSで溶出させた点以外はロット32176-87Cに対して上述したようなゲル濾過クロマトグラフィーによって調べた。PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78) は3つの主要ピークでカラムから溶出している（図15）。最初のピークは315000Dの算定分子量を有し、注入された材料の30%を占める。第二のピークは194000Dの算定分子量を有し、全体の23%を占める。第三のピークは108000Dの算定分子量を有し、全質量の46%を占める。SDS-PAGEによる分析は、全ての3つのピークがPEG化単量体とジスルフィド結合二量体を含むことを示す。これらの成分の比は、ピーク3が主として完全にPEG化された三量体からなり、ピーク2はほとんど「六量体」ージスルフィド結合で結合した2つの三量体ーであるように思われ、ピーク1はジスルフィド結合を介して結合した「九量体」であることを示唆している。六量体形態の模式図を図16に示す。ピーク1はアポトーシスアッセイにおいて最も高い活性を有しており、50の相対強度を示す。ピーク2は17の相対強度を示し、ピーク1は3の相対強度を有していた。

【0095】

マウス中のPEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78) の薬物速度を、血漿試料を10分、及び1、2、4、8及び24時間で採取したこと以外にロット32176-87Cに対して上述したようにして定量した。PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78) の血漿濃度を図17にプロットする。2コンパートメントモデルに従ったこれらのデータの分析（表III）は、PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78) がApo2L.0に対して48倍の増加した半減期と15倍の減少したクリアランス速度を有していることを示している。

【表3】

表III. ニコンパートメントモデルによる薬物速度データの分析

パラメータ	Apo2L.0	PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78)
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	18.6	283
K10 (hr ⁻¹)	12.5	0.258
K12 (hr ⁻¹)	0.53	0.166
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 観察値	87.4	67.3
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 予想値	232	73
Cl (mL/hr/kg)	536	35.3
Vc (mL/kg)	43.0	137
Vss (mL/kg)	66.5	244
K10 半減期 (hr)	0.056	2.69

【0096】

PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78) を次の変更点の下で上述したマウス異種移植モデルにおいて試験した：1) 全ての注射を腹腔内で行った；2) PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78) の注射を2週間の間、1、3、又は10mg/kgで2x/週、実施した；3) Apo2L.0の注射を共に2週間の間、60mg/kgで5x/週、又は10mg/kgで2x/週、実施した。図18に示されるよう

に、PEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78) の3通り全ての投薬は各群の8匹全ての動物において完全な腫瘍後退を引き起こした。腫瘍体積はゼロまで低減され、治療停止後にそのレベルまで維持された。Apo2L. 0の双方の投薬によって腫瘍体積の減少を生じたが、全ての処置動物において完全な腫瘍後退は引き起こさなかった。PEG-R170C-Apo2L. 0処置の3つの群では、投薬計画完了後に腫瘍を有していた動物はいなかった。より高い投薬量が腫瘍のより早い除去を生じるという用量応答があった。Apo2L. 0で処置した群はより少ない腫瘍消失%であり、腫瘍は60mg/kg用量を与えた8/8の動物と10mg/kg用量を受けた4/6で処置の中止時に再成長し始めた。PEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78) 処置群では、腫瘍が再びあらわれるのにより長い時間がかかりゆっくりと成長した。1、3及び10mg/kgのPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78) 処置群では、腫瘍はそれぞれ2/7、4/8及び3/8動物において再発した。これらのデータは、部分的にPEG化され架橋されたR170C-Apo2L. 0が、未修飾のApo2L. 0で観察されるよりも低い投薬量で大なる抗腫瘍効果を有していることを示している。

カニクイザル由来の正常な肝細胞に対するPEG-R170C-Apo2L. 0のロット番号32176-78及び32176-87Cの効果を図19において比較した。ロット32176-87Cは肝細胞に対して細胞毒性をあまり示さなかったが、ロット32176-78は中間の低い濃度である程度の毒性を示した。この濃度依存性は細胞表面上でのレセプターの高次のクラスター形成から生じる毒性と一致していると考えられる。

【0097】

(実施例8)

PEG化K179C-Apo2L. 0の調製

薬物動態学的及び効能実験をまたオリゴマー形成に対して減少した傾向を持つシステイン変異体を用いて実施した。(上記実施例に記載されたようにして調製された) K179C変異体がこれらの実験のために選択されたが、これは、その天然形態のこの変異体が野生型(天然) Apo-2リガンド分子に匹敵する活性を有し、予備PEG化実験がCys179修飾の際に活性が2倍だけ消失することを示していたためである(表I参照)。この変異体はジスルフィド結合オリゴマーを直ぐには形成しないようであった(データ示さず)。K179C-Apo2L. 0 (40mg) を8mg/mLまで濃縮し、周囲温度で2時間、10mMのDTTで還元した。還元剤を、コハク酸アルギニン製剤バッファーで平衡化したPD-10カラムでのゲル濾過によって除去した。タンパク質濃度を吸光度測定で定量した後、2K-メトキシPEG-マレイミドを5:1のPEG:Apo2L単量体の最終モル濃度になるまで添加した。この混合物を周囲温度で一晩インキュベーションした後、DTTを5mMになるまで添加することによって反応を停止させた。90分後に、20mMの濃度までヨードアセトアミドを添加することによって還元剤をブロックした。アルキル化を60分進行させた後、混合物を、PD-10カラムでコハク酸アルギニン製剤バッファー中に交換した。

【0098】

2K PEG-K179C-Apo2L. 0の水力学的性質を、平衡化しPBSで溶出させるSuperdex200カラムでのSEC-MALSによって調べた。2K PEG-K179C-Apo2L. 0は85000の算定分子量を持つ溶出容積(11.8mL)の単一ピークとして溶出した(図23)。より早い溶出ピークは検出されず、この調製物にジスルフィド結合オリゴマーがないことを示唆している。PEG化は、K179C-Apo2L. 0のヨードアセトアミド修飾形態が13.4mLで溶出し、70000の算定分子量を有するので、増加した見かけ分子量を生じた。

SK-MES細胞に対するアポトーシス誘導活性を、上記の実施例に記載されているようにして、2K PEG-K179C-Apo2L. 0について測定した。PEG化タンパク質は非常に活性であり、未修飾Apo2L. 0に対して生物活性が9倍減少しただけであった(図24)。

ヒトCOLO205腫瘍の成長に対する2K PEG-K179C-Apo2L. 0の効果

を、上述のマウス異種移植モデル（実施例 6）を使用して定量した。マウス（一群当たり 8）にビヒクル（5 x / 週）、A p o 2 L . 0（60 mg / kg、5 x / 週）、又は P E G - K 1 7 9 C - A p o 2 L . 0（60 mg / kg、1 x / 週）の腹腔内注射を与えた。血漿試料を最初の注射の 1 分及び 24 時間後に採取した。これらの試料中の A p o 2 L の濃度を E L I S A によって定量した。図 25 に示されるように、A p o 2 L . 0 と比較して P E G 化タンパク質の場合に 24 時間後に更に高いフラクションの注射投薬量が血漿中に保持されていた。マウス中の腫瘍体積を三日毎に測定し、二週間後に治療を停止した。図 26 に示されるように、P E G - K 1 7 9 C - A p o 2 L . 0 の 1 x / 週の投薬は、A p o 2 L . 0 での 5 x / 週の治療より平均腫瘍体積を大きく減少させた。

【図面の簡単な説明】

10

【0099】

【図 1】ヒト A p o - 2 リガンド c D N A のヌクレオチド配列（配列番号：2）とその誘導アミノ酸配列（配列番号：1）を示す。ヌクレオチド位置 447 の「N」は、「T」又は「G」でありうるヌクレオチド塩基を示すために使用される。

【図 2 A】図 2 A - 2 C は A p o - 2 L の結晶構造に関する。図 2 A は、3 回回転軸に沿った三量体の概略を示す。各単量体は同一である。秩序だったタンパク質構造は残基 120 から始まり、残基 131 - 141 は秩序だっておらず、残基 195 - 201 も同じである（破線で印が付けられている）。溶媒リガンドと三つの対称性に関連したシステインを含む亜鉛結合部位は空間充填図として示されている。

【図 2 B】図 2 B は、亜鉛結合部位の斜視立体密集図を提供する；S y - 亜鉛 - S y 間の角度は 112 ° で、S y - 亜鉛 - 溶媒角度は 107 ° で 2 . 3 オングストロームの亜鉛 - 硫黄及び 2 . 3 オングストロームの亜鉛 - 溶媒結合距離を有する。図 2 は、プログラム M o l s c r i p t [Kraulis ら, J. Appl. Cryst., 24:946-950(1991)] 及び R a s t e r 3 D [Merritt ら, Acta Cryst., D50:869-873(1994)] を用いて作成された。

20

【図 2 C】図 2 C は結晶データの要約を提供する。

【図 3】D R 5 ・ A p o 2 L 複合体の X 線構造を示す。

【図 4】S K - M E S 肺癌細胞に対する R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0 のアポトーシス誘導活性を示す。R 1 7 0 C 変異体の活性の増加はバイオアッセイ培地でのインキュベーション中の C y s 1 7 0 の酸化に関連しているように思われる。N - エチルマレイミド（N E M）又はヨードアセトアミドでの C y s 1 7 0 の予めのアルキル化が活性の増加を阻止した。

30

【図 5】オンライン光散乱検出器（M A L S）を備えたクロマトグラフィー系を使用しての（Wyatt Technology, Inc.）S u p e r d e x 2 0 0 カラム（Amersham Biotech）でのサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）による R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0 オリゴマーの分析を示す。実線は UV のトレースを示し、符号は光散乱データから計算したモル質量を示す。3 分だけの空気酸化では、R 1 7 0 C - A p o - 2 L . 0 は大部分が 7 0 0 0 0 D の算定分子量を持つ三量体形態で見出される（溶出容積 = 11 mL s）。2 時間では、有意な量のより高分子量の形態が見出される。2 時間での三つのピークは 7 0 0 0 0 D、140000 D（9.5 mL の溶出容積）及び 600000 D（6 mL の溶出容積）の算定分子量を有している。24 時間後には、600000 D の分子量の種のみが見出される。

40

【図 6】R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0 に対するオリゴマー形成の反応速度と生物活性の増加を示す。生物活性の増加の時間過程はオリゴマー形態の蓄積と同時に進行している。

【図 7】カニクイザル肝細胞に対する酸化 R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0 の効果を示す。

【図 8】P E G 化反応の S D S - P A G E 分析を示す。レーン（左から右）1、2 - R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0、3 - P E G - マレイミド無添加、4 - N E M 修飾 R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0、5 - 1 : 1 P E G : R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0、6 - 2 : 1 P E G : R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0、7 - 5 : 1 P E G : R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0、8 - 10 : 1 P E G : R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0、9 - 分子量標準物、10 - 空気酸化 R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0。P E G - マレイミドでの R 1 7 0 C - A p o 2 L . 0 の処理によって単量体分子量のおよそ 2000 ダルトンのシフトがあることが S D S - P A G E により

50

分かる。2 : 1 又はそれ以上の PEG : タンパク質の比を用いる反応によって同様の程度の修飾が得られた。これらの反応について、残留した未修飾単量体を観察した。クーマシーブルー染色ゲルの視覚検査によって、未修飾単量体が全タンパク質の < 10 % であることが示唆される。2 : 1 未満の PEG : タンパク質モル比では、得られた修飾は少なかった。24 時間の反応時間では生成物の明らかな変化は観察されなかったもので、反応は2時間以内に完了するように思われる。

【図9】SEC-MALSによるPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-87C) の分析を示す。11.3 mL のピーク溶出容積を持つカルボキシアミドメチル-R170C-Apo2L. 0 の曲線を比較のために示す。PEG化により溶出容積の減少と見かけ分子量の増大が引き起こされる。

【図10】質量分析によるPEG-R170C-Apo2L. 0 の分析を示す。MALDI-TOF-MS は、少量の未修飾単量体 (分子量 = 19440 D) の存在と単一結合PEGを有するタンパク質に対応する主要ピークを示している。PEG分子はポリマー単位エチレングリコール (分子量 = 44) の増分だけ分子量が異なる質量不均一性を有することがよく知られている。その結果、約21660 Dを中心とする広い質量範囲が、単一のPEGが結合したタンパク質に対して観察された。ペグ化及び非ペグ化R170C-Apo2L. 0 間の平均質量差は、PEGの平均質量が2200 Dであることを示している。

【図11A】PEG結合部位を確認するために使用したペプチドマッピングを示す。ペグ化及び非ペグ化R170C-Apo2L. 0 の試料をLys-Cプロテアーゼで消化し、得られたペプチドを逆相HPLCで分離した。生成されたペプチドのパターンを、Apo2L. 0 に対して過去に決定されたマップと比較した。Lys150及びLys179後の切断により生成されたL4と標識されたペプチドはR170C-Apo2L. 0 の消化にCys170残基を含んでいる。このピークは消失し、ペグ化タンパク質において、広い、後で溶出するピーク (L4*) によって置き換わる。

【図11B】図11Aと同様の図である。

【図11C】図11Aと同様の図である。

【図12】マウス中のPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-87C) の薬物速度を示している。時間ゼロにおいてマウスの尾部にApo2L. 0 (10 mg/kg) 又はPEG-R170C-Apo2L. 0 (10 mg/kg) を静脈注射した。血漿試料を1、20、40、60、及び80分に収集した。Apo2L濃度をELISAによって定量した。これらのデータは、PEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-87C) がApo2L. 0 より長い半減期を有していることを示している。

【図13】マウス異種移植モデルにおけるヒトCOLO205腫瘍の成長に対するPEG-R170C-Apo2L. 0 (31276-87C) の効果を示す。胸腺欠損ヌードマウス (Jackson Laboratories) に 5×10^6 のCOLO205ヒト大腸癌細胞 (NCI) を皮下注射した。腫瘍を生じさせ、ノギスでの測定で約150 mm³ の体積になるまで成長させた。マウス (1グループ当たり8匹) にビヒクル (2x/週)、Apo2L. 0 (60 mg/kg、2x/週)、Apo2L. 0 (10 mg/kg、2x/週)、又はPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-87C) (10 mg/kg、2x/週) を静脈内注射した。腫瘍体積を三日毎に測定し、二週間後に治療を停止した。10 mg/kg のPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-87C) での処置によりApo2L. 0 の等価用量よりも大なる腫瘍体積の減少が達成された。

【図14】SK-MES肺癌細胞に対するPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78) のアポトーシス誘導効果を示す。PEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78) の活性はApo2L. 0 に対して39倍増加している。

【図15】SEC-MALSによるPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78) の分析を示す。PEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78) は3つの主要ピークでカラムから溶出する。最初のピークは315000 Dの算定分子量を有し、注射された材料の30%を占める。第二のピークは194000 Dの算定分子量を有し、全体の23%を占める。第三のピークは108000 Dの算定分子量を有し、全質量の46%

を占める。

【図16】PEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78)の「六量体」の提案された構造の概略図である。2つのApo2L三量体がCys170を通してのジスルフィド結合にて示されており、三量体の残りのサブユニットはCys170に結合したPEG鎖を有している。

【図17】マウスにおけるPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78)の薬物速度を示す。マウスに時間ゼロにおいてApo2L. 0 (10mg/kg)又はPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78) (10mg/kg)の静脈注射を尾部に与えた。血漿試料を10分、及び1、2、4、8及び24時間で収集した。Apo-2L濃度をELISAによって定量した。これらのデータは、PEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78)がApo2L. 0よりも48倍長い半減期を有していることを示している。 10

【図18】マウス異種移植モデルにおけるヒトCOLO205腫瘍の成長に対するPEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-87C)の効果を示す。胸腺欠損ヌードマウス (Jackson Laboratories) に 5×10^6 のCOLO205ヒト大腸癌細胞 (NCI) を皮下注射した。腫瘍を形成させ、キャリパー測定で判断して約 150 mm^3 の体積になるまで成長させた。マウス (一群当たり8匹) にビヒクル (5x/週)、Apo2L. 0 (60mg/kg、5x/週)、Apo2L. 0 (10mg/kg、2x/週)、PEG-R170C-Apo2L. 0 (10mg/kg、2x/週)、PEG-R170C-Apo2L. 0 (3mg/kg、2x/週)、又はPEG-R170C-Apo2L. 0 (1mg/kg、2x/週) を腹腔内注射した。腫瘍体積を三日毎に測定し二週間後に処置を停止した。PEG-R170C-Apo2L. 0 (32176-78) の3通り全ての投薬量が、各群の8匹全ての動物において完全な腫瘍の後退を生じた。 20

【図19】カニクイザル由来の正常な肝細胞の生存に対するPEG-R170C-Apo2L. 0の効果を示す。ロット32176-78は中程度の濃度で効果を示す一方、ロット31276-87Cは肝細胞の生存に対して効果を持たない。

【図20A】完全長ヒトDR4のcDNAのヌクレオチド配列 (配列番号：4) 及びその誘導アミノ酸配列 (配列番号：3) を示す。ヒトDR4に対する各ヌクレオチド及びアミノ酸配列はPanら, 276:111 (1997)にも報告されている。

【図20B】図20Aの続きである。 30

【図21】1998年11月19日に国際公開98/51793中で公開されたヒトDR5 (Apo-2とも称される) の411のアミノ酸配列 (配列番号：5) を示す。ヒトDR5のスプライシング変異体は当該分野で知られている。このDR5スプライシング変異体は図22A及び22Bに示されたヒトDR5の440のアミノ酸配列 (配列番号：6) をコードする。

【図22A】1998年8月20日に国際公開98/35986中で公開されたヒトDR5の440のアミノ酸配列 (配列番号：6) を示す。

【図22B】図22Aの続きである。

【図23】SEC-MALSによる2K PEG-R179C-Apo2L. 0の分析を示す。 40

【図24】SK-MES肺癌細胞に対する2K PEG-R179C-Apo2L. 0 (図では「2KPEG-K179. 0」と称される) のアポトーシス誘導活性を示す。

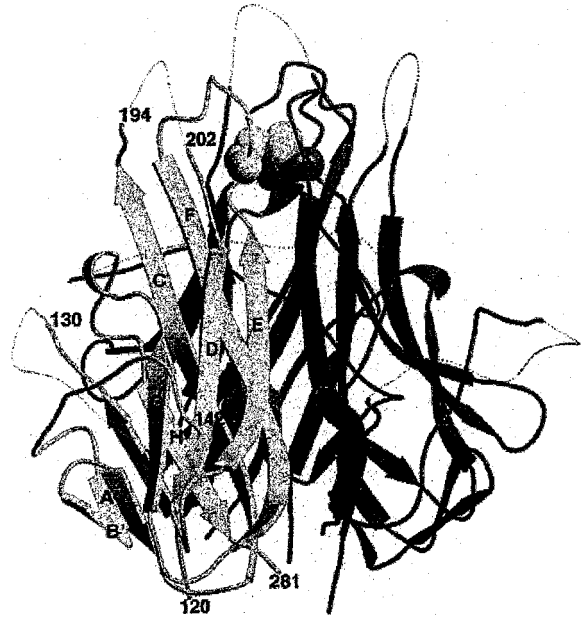
【図25】Colo205マウスモデルにおける2KPEG-R179C-Apo2L. 0の薬物速度を示す。血漿試料を示された時間において収集し、示されたタンパク質の濃度をELISAによって定量した。

【図26】マウス異種移植モデルにおけるヒトCOLO205腫瘍の成長に対する2KPEG-R179C-Apo2L. 0の効果を示す。

【図 1】

[illegible]

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【図 2 C】

	Apo-2L (114-281)	Apo-2L (91-281) D218A	Apo-2L (91-281) D218A
結晶			
空間群	P6 ₃	R32	R32
単位胞 (Å)	a=72.5 c=140	a=66.4 c=197.6	a=66.4 c=197.7
解像度 (Å)	3.9	1.9	1.3
カバレージ (%)	94 (96)	93 (99)	100 (100)
<I/σ(I)>	5.9	10.1	12.4
# ユニーク(hkl)	3589	12680	41840
冗長度	4.9	4.3	12.1
R _{sym} (%)	15.4 (34)	6.2 (27)	6.4 (34)
# ASUのプロトマー	2	1	1
精密化			
R _{cryst} (%)	33.8	20	
R _{free} (%)	27.6	22	
rmsd 結合 (Å)	0.009	0.015	0.007
rmsd 角度 (°)	1.79	2.0	1.41
平均 B-値	—	14	14
# 水分子	0	170	

$$R_{\text{symm}} = \sum_h \sum_i (I_{hi} - \langle I_h \rangle) / \sum_h I_h$$

ここで I_h はブラッグインデックス h を伴う対称関連反射の i 観測の平均構造因子強度である。

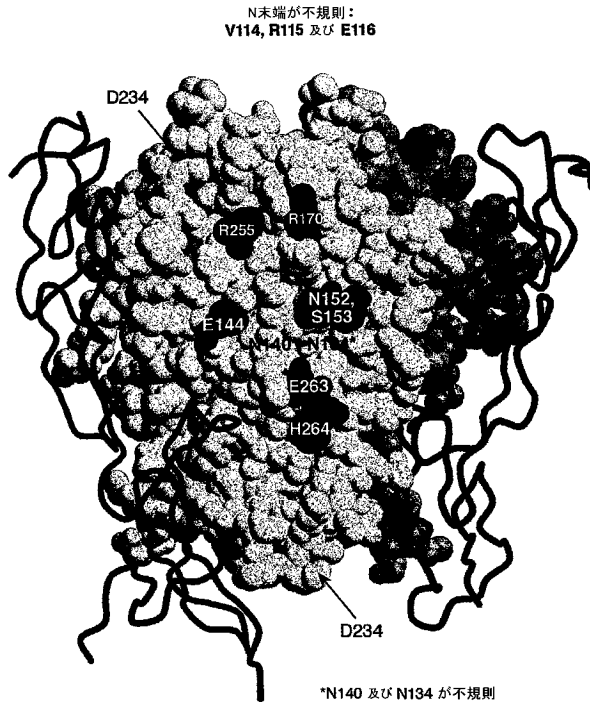
$$R_{\text{cryst}} = \sum_h \sum_i |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$$

ここで F_{obs} 及び F_{calc} は
観測及び算定構造因子振幅である。

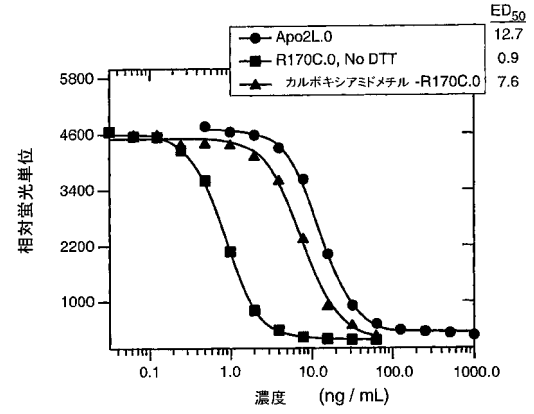
$$R_{\text{free}} = \frac{\sum (hkl) \varepsilon \tau \|F_{\text{obs}}(hkl) - k|F_{\text{calc}}(hkl)\|}{\sum (hkl) \varepsilon \tau \|F_{\text{obs}}(hkl)\|}$$

ここで反射の τ セットは精密化プロセスから省かれる。
データの10%は R_{rec} の計算のために τ セットに含まれ、精密化には含まれない。
括弧内の値は最も高い解像度の殻に対するもの。

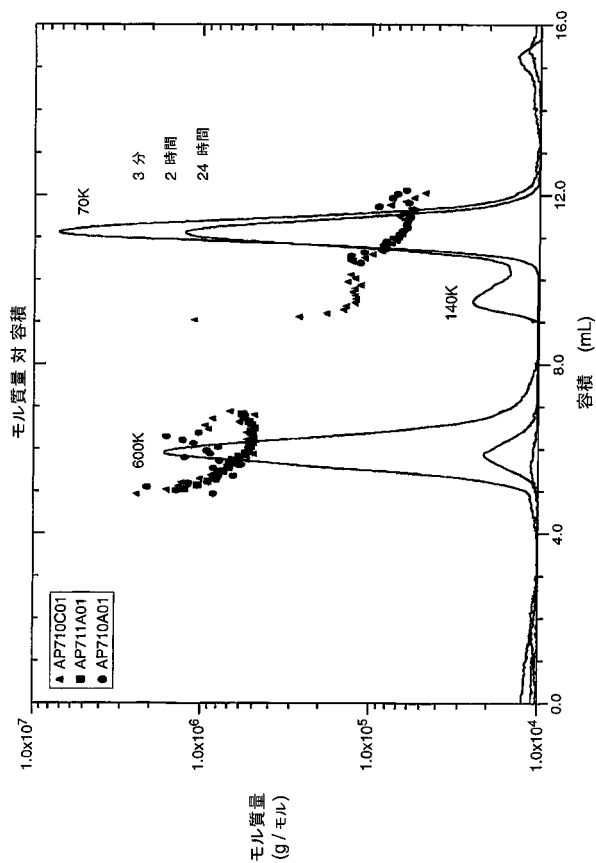
【図 3】



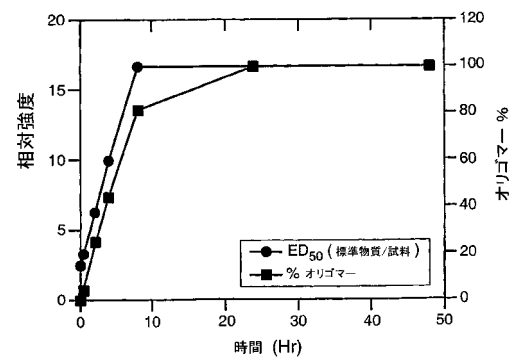
【図 4】



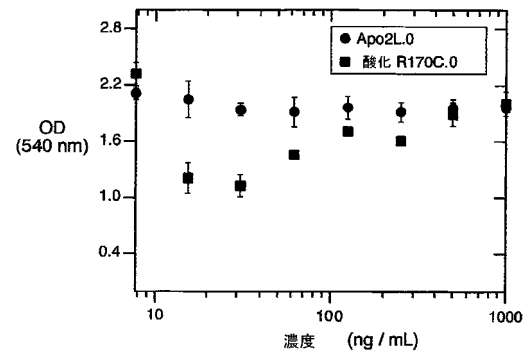
【図 5】



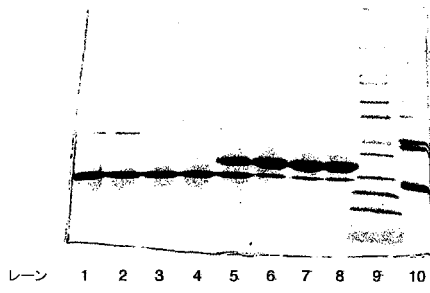
【図 6】



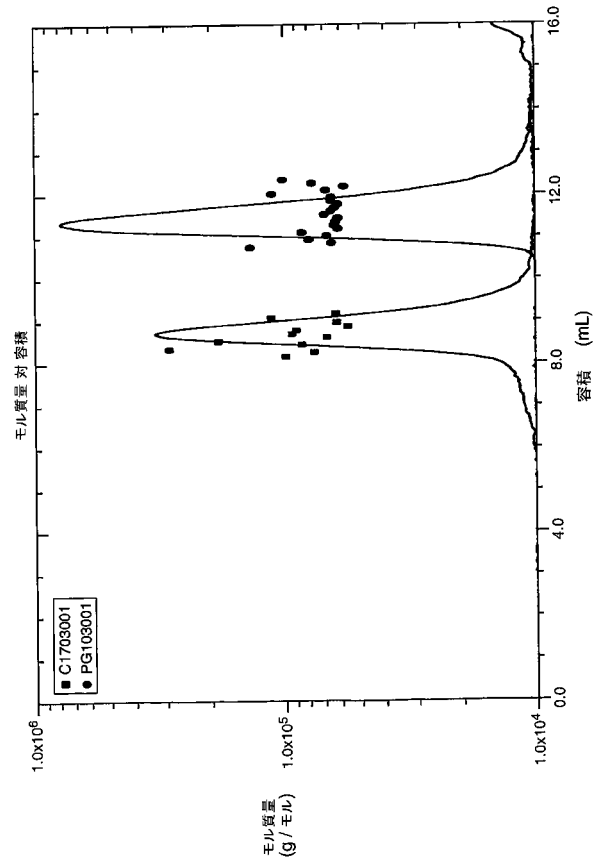
【図 7】



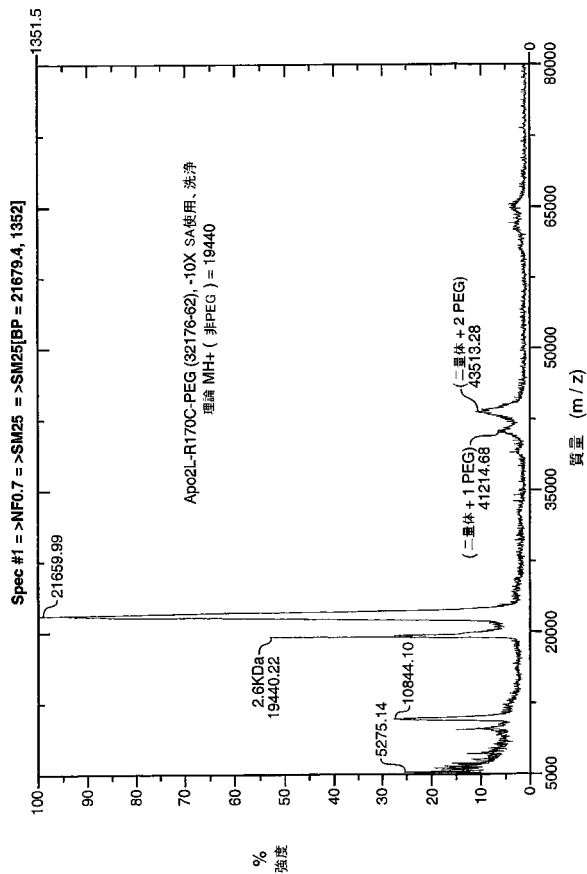
【図 8】



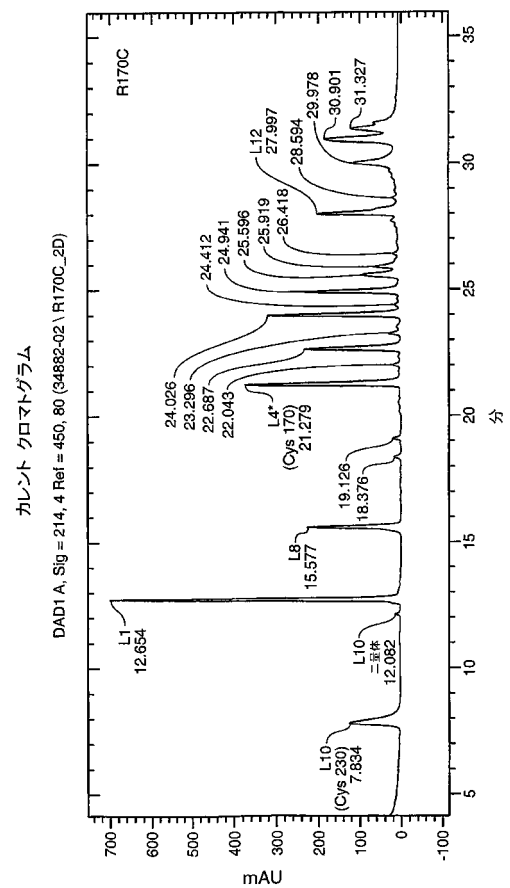
【図 9】



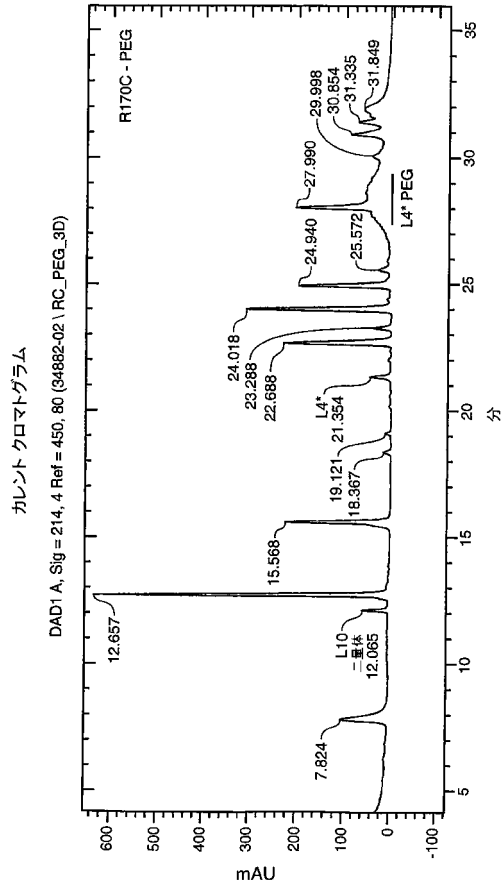
【図 10】



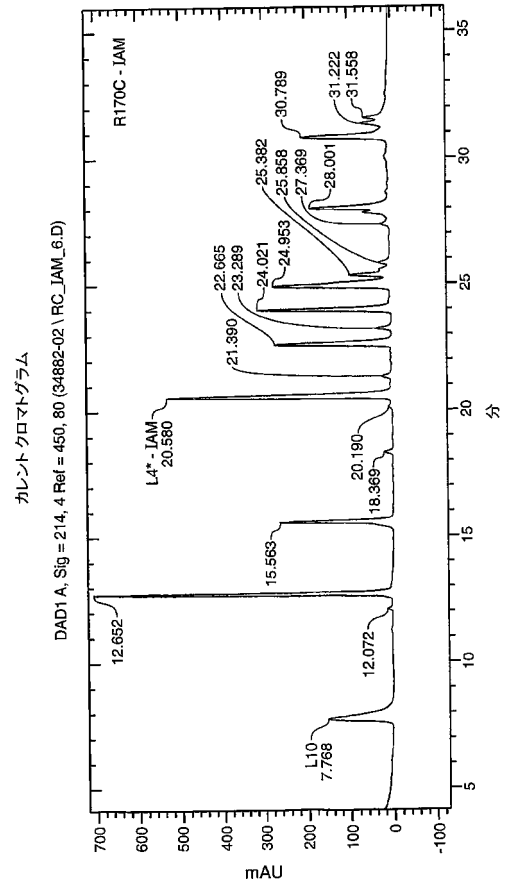
【図 11 A】



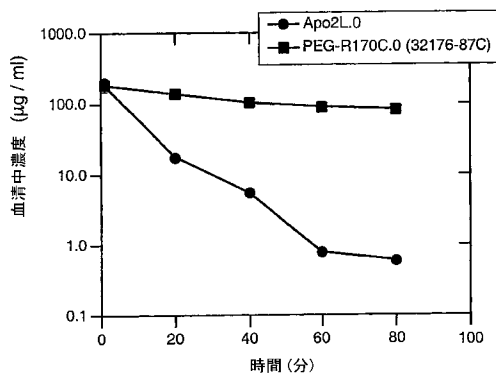
【図 1 1 B】



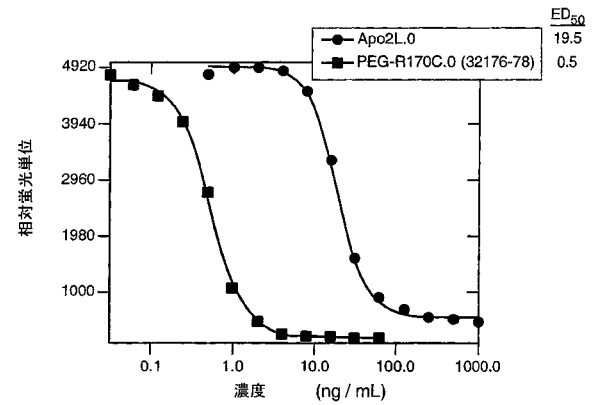
【図 1 1 C】



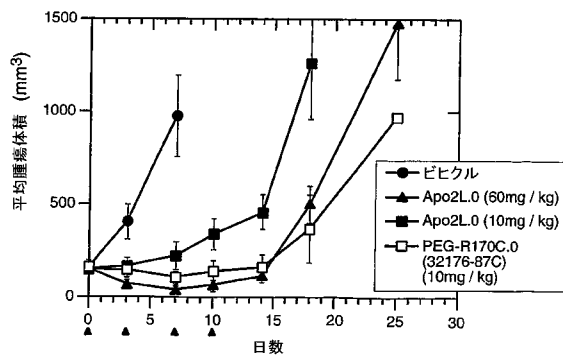
【図 1 2】



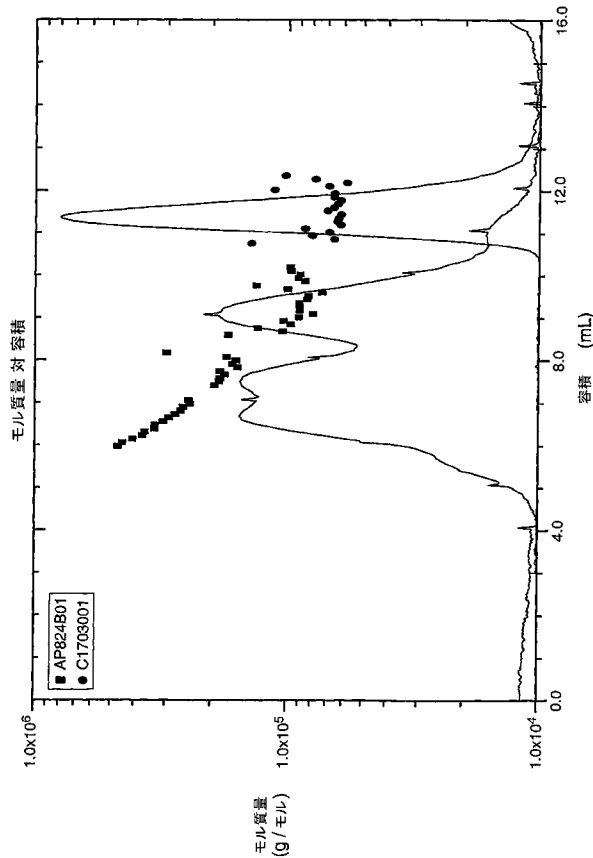
【図 1 4】



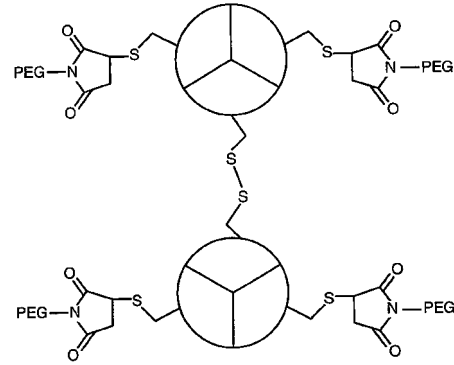
【図 1 3】



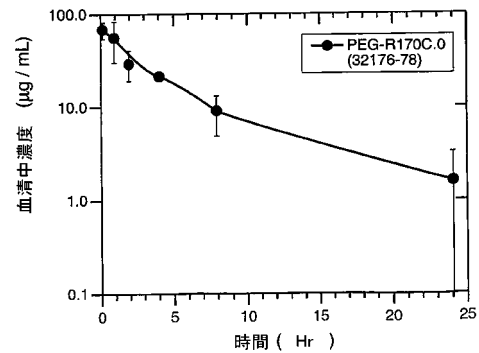
【図 15】



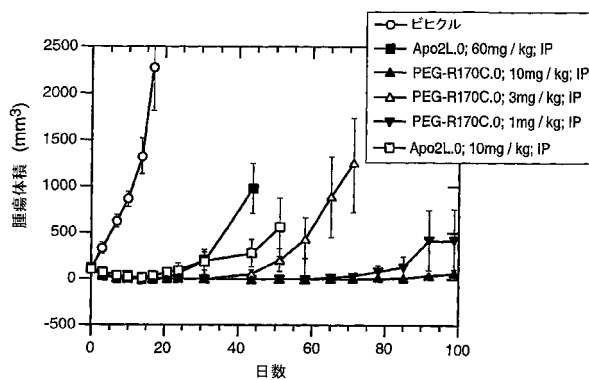
【図 16】



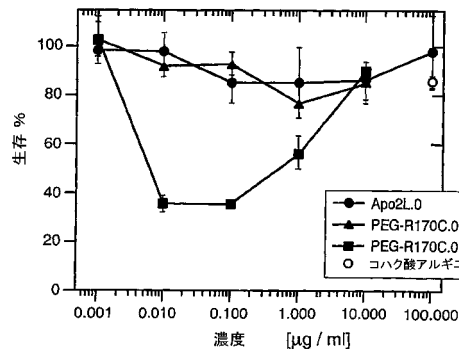
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【図 20 A】

1 ATGGCGCCAC CACGAGTAG AGTACATCTA GGTGCGTTC TGGCAGTGAC
TACCGCGGTG GTGGTCGATC TCATGTAGAT CCACGCAAGG ACCGTCACTG
1 MetAlaProP roProAlaAr gValHisLeu GlyAlaPheL euAlaValTh

51 TCCGAATCCC GGGAGCGCAG CGAGTGGGAC AGAGCGAGCG GCGGCCACAC
AGGCTTAGGG CCTCGCGTC GCTCACCCTG TCTCCGTCGG CGCCGTGTG
rProAsnPro GlySerAlaA laSerGlyTh

101 CCAGCAAAGT GTGGGGCTCT TCCGCGGGGA GGATGAACG ACGAGGCGGG
GGTGGTTTCA CACCCGAGGA AGGCGCCCTT CCTAACTTGG TGCTCCGCCC
35 SerLysVa lTrpGlySer SerAlaGlyA rgIleGluPr oArgGlyGly

151 GGCCGAGGAG CGCTCCCTAC CTCCATGGGA CAGCAGGAC CCACTGCCCG
CCGGCTCCTC GCGAGGGATG GAGGTACCTT GTCTGCTCTG GGTACGCGGC
GlyArgGlyA laLeuProTh rSerMetGly GlnHisGlyP roSerAlaArg

201 GCGCCGGGCA GGGCGCGCCC CAGGACCCAG GCCCGCGCGG GAAGCCAGCC
CCGGCCCGGT CCGCGCGCGG GTCTCTGGTC CGCGCGCGCC CTTCGTCTCG
68 AlaArgAla GlyArgAlaP roGlyProAr gProAlaArg GluAlaSerF

251 CTCGGCTCCG GGTCCACAAG ACCTTCAAGT TTGTCTCTGT CCGGTCCTGT
GAGCCGAGGC CCAGGTGTTC TGGAGTTTCA AACAGCAGCA GCCCCAGGAC
roArgLeuAr gValHisLys ThrPheLysP heValValVa lGlyValLeu

301 CTGAGGTCG TACCTAGCTC AGCTGCAACC ATGATCAATC AATTGGCACA
GAGCTCCAGC ATGGATCGAG TCGAGCTTGG TAGTTTGAAG TACTAGTTAG
101 LeuGlnValV alProSerSe rAlaAlaThr lIleLysLeuH isAspGlnSe

351 AATTGGCACA CAGCAATGGG AACATAGCCC TTTGGGAGAG TTGTGTCCAC
TTAACCCTGT GTCGTTACCC TTGTATCGGG AAACCTCTCT AACACAGGTG
rIleGlyThr GlnGlnTrpG luHisSerPr oLeuGlyGlu LeuCysProPro

401 CAGGATCTCA TAGATCAGAA CGTCTGGAG CCTGTAACCG GTGCACAGAG
GTCCTAGAGT ATCTAGTCTT GCAGGACCTC GGACATTGGC CAGCTGTCTC
135 GlySerHi sArgSerGlu ArgProGlyA laCysAsnAr gCysThrGlu

451 GGTGTGGGTT ACACCAATGC TTCCACAAT TTGTTTGTCT GCTCCCAATG
CCACACCCAA TGTGTTTACG AAGGTTGTTA AACAAACGAA CGGAGGGTAC
GlyValGlyT yrThrAsnAl aSerAsnAsn LeuPheAlaC ysLeuProCys

501 TACAGCTTGT AAATCAGATG AAGAAGAGAG AAGTCCCTGC ACCACGACCA
ATGTGGAACA TTTAGTCTAC TTCTTCTCTC TTCAGGGACG TGGTGTCTGT
168 ThrAlaCys LysSerAspG luGluGluAr gSerProCys ThrThrThr

551 GGAACACAGC ATGTCAAGTG AAACAGGAA CTTTCCGGAA TGACAAITCT
CCTTGTGTGC TACAGTCACG TTTGTCTCTT GAAAGCCCTT ACTGTTAAGA
rgAsnThrAl aCysGlnCys LysProGlyT hrPheArgA nAspAsnSer

601 GCTGAGATGT GCCGGAAGTG CAGCACAGGG TGCCCCAGAG GGAATGTCAC
CGACTCTACA CGGCTTTCAC GTCTGTCTCC ACGGGTCTCT CCTACAGTT
201 AlaGluMetC ysArgLysCy sSerThrGly CysProArgG lyMetVally

651 GGTCAAGGAT TGTACGCCCT GAGGTGACAT CGAGTGTGTC CACAAGAAT
CCAGTTCTCA ACATGCGGGA CTTCACTGTA GTCACACAGG GTGTTCTTCA
aValLysAsp CysThrProT rpSerAsp11 eGluCysVal HisLysGluSer

【図 20 B】

701 CAGGCAATGG ACATAATATA TGGGTGATTT TGGTTGTGAC TTTGGTTGTT
 GTCCGTTACC TGTATTATAT ACCCACTAAA ACCAACACTG AACCCACAAA
 235 GlyAsnG1 yHisAsn1le TrpVal1leL euValValTh rLeuValVal

751 CCGTGTCTGT TGGTGGCTGT GCTGATTGTC TGTGTGTGCA TCGGCTCAGG
 GGCAACGACA ACCACCGACA CGACTAACAG ACAACACAGT AGCCGAGTCC
 ProLeuLeuL euValAlaVa lLeu1leVal CysCysCysI leGlySerGly

801 TGTGGAGGG GACCCCAAGT GCATGGACAG GGTGTGTTTC TGCGGCTTGG
 AACACCTCCC CTGGGGTTCA CGTACCTGTC CCACACAAAG ACCCGAACC
 268 CysGlyGly AspProLysC ysMetAspAr gValCysPhe TrpArgLeuG

851 GTCTCTACG AGGCGCTGGG GCTGAGGACA ATGCTCACAA CGAGATTCTG
 CAGAGGATGC TCCCGGACCC GCACTCCTGT TACGAGTGT TCTCTAAGAC
 lyLeuLeuAr gGlyProGly AlaGluAspA snAlaHisAs nGlu1leLeu

901 AGCAACGACG ACTCGCTGTC CACTTTCGTC TCTGAGCAGC AATGGGAAG
 TCGTGGGTC TGAGCGACAG GTGAAAGCAG AGACTCGTCG TTTACCTTTC
 301 SerAsnAlaA spSerLeuSe rThrPheVal SerGluGlnG lnMetGluSe

951 CCAGGAGCGG GCAGATTGGA CAGGTGTGTC TGTACAGTCC CCAOAGGAGG
 GGTCTCTGGC CGTCTAACT GTCCACATGT ACATGTGAGG GGTCCCTCC
 rGlnGluPro AlaAspLeuT hrGlyValTh rValGlnSer ProGlyGluAla

1001 CACAGTGTCT GCTGGGACCG GCAGAAGCTG AAGGCTCTCA GAGGAGGAGG
 GTGTACAGCA CGACCTTGGC CGTCTTCGAC TTCCACAGAG CTCCTCCTCC
 335 GlnCysLe uLeuGlyPro AlaGluAlaG luGlySerG1 nArgArgArg

1051 CTGCTGGTTC CAGCAATGG TGTGACCCC ACTGAGACTC TGATGCTGTT
 GACGACCAAG GTCTTTTACC ACGACTGGGG TGACTCTGAG ACTACAGCAA
 LeuLeuValP roAlaAsnG1 yAlaAspPro ThrGluThrL euMetLeuPhe

1101 CTITGACAAG TTTGCAACA TCGTGCCCTT TGACTCCTGG GACCAGCTCA
 GAACTGTTC AAACGTTTGT AGCACGGGAA ACTGAGGACC CTGTGCGAGT
 368 PheAspLys PheAlaAsnI leValProPh eAspSerTrp AspGlnLeuM

1151 TGAGGCAGCT GGACCTCAGC AAAAATGAGA TCGATGTGGT CAGAGCTGGT
 ACTCCGTCGA CCGGAGTGC TTTTACTCT AGCTACACCA GTCTCGACCA
 etArgGlnLe uAspLeuThr LysAsnGluI leAspValVa lArgAlaGly

1201 ACAGCAGGCC CAGGGGATGC CTTGTATGCA ATGCTGATGA AATGGGTCAA
 TGTCTGCGG GTCCCTTACG GAACATACGT TACGACTACT TTACCCAGTT
 401 ThrAlaGlyP roGlyAspAl aleuTyrAla MetLeuMetL ysTrpValAs

1251 CAAAACTGGA CGAAGCGCT CGATCCACAC CCTGCTGGAT GCCTTGAGA
 GTTTTGACCT GCCTTCGGA GCTAGGTGNG GGACGACCTA CGGAACCTCT
 nLysThrGly ArgAsnAlaS erIleHisTh rLeuLeuAsp AlaLeuGluArg

1301 GGATGGAAGA GAGACATGCA AAAGAGAAGA TTCAGGACCT CTTGTGGAC
 CCTACCTTCT CTCTGTACGT TTTCTTCTT AAGTCTGGA GAACCACTG
 435 MetGluG1 uArgHisAla LysGluLysI leGlnAspLe uLeuValAsp

1351 TCTGAAAGT TCATCTACT AGAAGATGGC ACAGGCTCTG CCGTGTCTT
 AGACCTTTCA AGTAGATGAA TCTTCTACCG TGTCCGAGAC GGCAACGAA
 SerGlyLysP heIleTyrLe uGluAspGly ThrGlySerA laValSerLeu

1401 GGAAGTGA
 CCTCACT
 468 GluOP*

【図 22 A】

Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys
 1 5 10 15

Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro
 20 25 30

Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu
 35 40 45

Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln
 50 55 60

Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
 65 70 75 80

Cys Pro Pro Gly His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser
 85 90 95

Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe
 100 105 110

Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro
 115 120 125

Cys Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe
 130 135 140

Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys
 145 150 155 160

Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
 165 170 175

Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro
 180 185 190

Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro
 195 200 205

Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val
 210 215 220

Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val
 225 230 235 240

Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Asp Pro Glu
 245 250 255

Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu
 260 265 270

Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu
 275 280 285

【図 21】

1 MEORGONAPASGARKRHGPGPREARGARPGLEVEKTLVLVVAALLVLSAESALITQOD
 61 LAPQORAAAPQQRSSPSEGLCPGHHHISEDGRDCISCKYGDYSTHWNLLFLCRLCTRCD
 121 SGEVELSPCTTTRNTVCCCEGTFREEDSPEMCRKCRKTCGPRGMVFKVGDCTPWSDEICVH
 181 KESGIIIGVTVAAVVLIVAVEVCKSLLLKKVLFYLLKICSGGGGDPFVRDSSQRPAGED
 241 NVLNEIVSILQTOVPEQEMEVQEPAPETGVNMLSPGESEHLEPAEAERSQRRRLVFA
 301 NEGDPFTLRQCFFDADLVFPDSWEPLMRKLGIMDNELKVAKEAAGERTLYTHLIKW
 361 VNKTGRDASVHTLLDALETGERLAKQKIEDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

【図 22 B】

Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser
 290 295 300

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

Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu
 325 330 335

Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp
 340 345 350

Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile
 355 360 365

Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr
 370 375 380

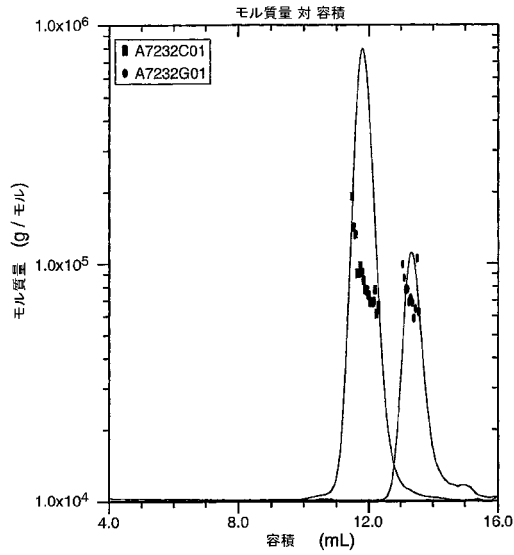
Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln
 405 410 415

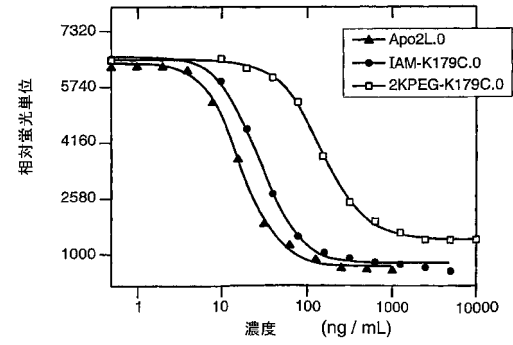
Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu
 420 425 430

Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser *
 435 440

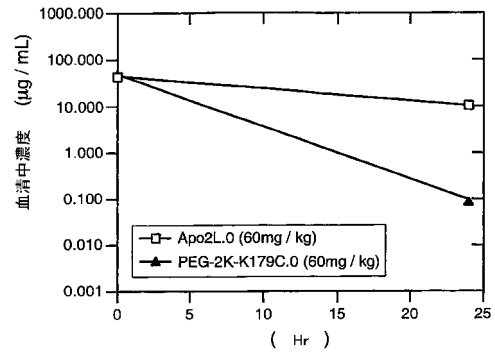
【図 2 3】



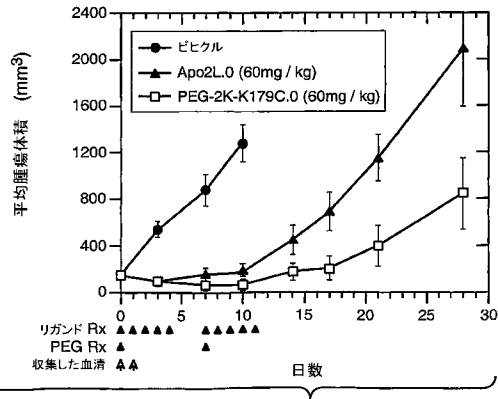
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 April 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/029420 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
(21) International Application Number: PCT/US02/31210
(22) International Filing Date: 1 October 2002 (01.10.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/326,622 2 October 2001 (02.10.2001) US
(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KELLEY, Robert F. [US/US]; 1029 San Felipe Avenue, San Bruno, CA 94066 (US). LINDSTROM, Stephanie H. [US/US]; 196 Rock Harbor Lane, Foster City, CA 94404 (US).
(74) Agents: MARSCHANG, Diane L. et al.; GENENTECH, INC., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/029420 A2

(54) Title: APO-2 LIGAND VARIANTS AND USLS THERIOI

(57) Abstract: The disclosure provides Apo-2 ligand variant polypeptides. Methods of making and chemically modifying Apo-2 ligand variant polypeptides are also provided. In addition, formulations of Apo-2 ligand variant polypeptides are provided.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

APO-2 LIGAND VARIANTS AND USES THEREOF

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to Apo-2 ligand variants, particularly Apo-2 ligand substitution variants, and to chemically modified forms thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Control of cell numbers in mammals is believed to be determined, in part, by a balance between cell proliferation and cell death. One form of cell death, sometimes referred to as necrotic cell death, is typically characterized as a pathologic form of cell death resulting from some trauma or cellular injury. In contrast, there is another, "physiologic" form of cell death which usually proceeds in an orderly or controlled manner. This orderly or controlled form of cell death is often referred to as "apoptosis" [see, e.g., Barr et al., *Bio/Technology*, 12:487-493 (1994); Steller et al., *Science*, 267:1445-1449 (1995)]. Apoptotic cell death naturally occurs in many physiological processes, including embryonic development and clonal selection in the immune system [Itch et al., *Cell*, 66:233-243 (1991)].

Various molecules, such as tumor necrosis factor-alpha ("TNF-alpha"), tumor necrosis factor-beta ("TNF-beta" or "lymphotoxin-alpha"), lymphotoxin-beta ("LT-beta"), CD30 ligand, CD27 ligand, CD40 ligand, OX-40 ligand, 4-1BB ligand, Apo-1 ligand (also referred to as Fas ligand or CD95 ligand), Apo-2 ligand (also referred to as Apo2L or TRAIL), Apo-3 ligand (also referred to as TWEAK), APRIL, OPG ligand (also referred to as RANK ligand, ODF, or TRANCE), and TALL-1 (also referred to as BlyS, BAFF or THANK) have been identified as members of the tumor necrosis factor ("TNF") family of cytokines [See, e.g., Gruss and Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Schmid et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry et al., *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987); Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley et al., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning et al., *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage et al. *Nature*, 357:80-82 (1992), WO 97/01633 published January 16, 1997; WO 97/25428 published July 17, 1997; Marsters et al., *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Chicheportiche et al., *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne et al., *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); WO98/28426 published July 2, 1998; WO98/46751 published October 22, 1998; WO98/18921 published May 7, 1998; Moore et al., *Science*, 285:260-263 (1999); Shu et al., *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); Schneider et al., *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay et al., *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)]. Among these molecules, TNF-alpha, TNF-beta, CD30 ligand, 4-1BB ligand, Apo-1 ligand, Apo-2 ligand (Apo2L/TRAIL) and Apo-3 ligand (TWEAK) have been reported to be involved in apoptotic cell death.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

Apo2L/TRAIL was identified several years ago as a member of the TNF family of cytokines [see, e.g., Wiley et al., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690 (1996); US Patent 6,284,236 issued September 4, 2001]. The full-length human Apo2L/TRAIL polypeptide is a 281 amino acid long, Type II transmembrane protein. Some cells can produce a natural soluble form of the polypeptide, through enzymatic cleavage of the polypeptide's extracellular region [Mariani et al., *J. Cell. Biol.*, 137:221-229 (1997)]. Crystallographic studies of soluble forms of Apo2L/TRAIL reveal a homotrimeric structure similar to the structures of TNF and other related proteins [Hymowitz et al., *Molec. Cell*, 4:563-571 (1999); Hymowitz et al., *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)]. Apo2L/TRAIL, unlike other TNF family members however, was found to have a unique structural feature in that three cysteine residues (at position 230 of each subunit in the homotrimer) together coordinate a zinc atom, and that the zinc binding is important for trimer stability and biological activity. [Hymowitz et al., *supra*; Bodmer et al., *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637 (2000)]

It has been reported in the literature that Apo2L/TRAIL may play a role in immune system modulation, including autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis [see, e.g., Thomas et al., *J. Immunol.*, 161:2195-2200 (1998); Johnsen et al., *Cytokine*, 11:664-672 (1999); Griffith et al., *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999); Song et al., *J. Exp. Med.*, 191:1095-1103 (2000)].

Soluble forms of Apo2L/TRAIL have also been reported to induce apoptosis in a variety of cancer cells *in vitro*, including colon, lung, breast, prostate, bladder, kidney, ovarian and brain tumors, as well as melanoma, leukemia, and multiple myeloma [see, e.g., Wiley et al., *supra*; Pitti et al., *supra*; Rieger et al., *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998); Ashkenazi et al., *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999); Walczak et al., *Nature Med.*, 5:157-163 (1999); Keane et al., *Cancer Research*, 59:734-741 (1999); Mizutani et al., *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612 (1999); Gazitt, *Leukemia*, 13:1817-1824 (1999); Yu et al., *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759 (2000)]. *In vivo* studies in murine tumor models further suggest that Apo2L/TRAIL, alone or in combination with chemotherapy or radiation therapy, can exert substantial anti-tumor effects [see, e.g., Ashkenazi et al., *supra*; Walczak et al., *supra*; Gliniak et al., *Cancer Res.*, 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan et al., *supra*; Roth et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265:1999 (1999)]. In contrast to many types of cancer cells, most normal human cell types appear to be resistant to apoptosis induction by certain recombinant forms of Apo2L/TRAIL [Ashkenazi et al., *supra*; Walczak et al., *supra*]. Jo et al. has reported that a polyhistidine-tagged soluble form of Apo2L/TRAIL induced apoptosis *in vitro* in normal isolated human, but not non-human, hepatocytes [Jo et al., *Nature Med.*, 6:564-567 (2000); see also, Nagata,

WO 03/029420

PCT/US02/31210

Nature Med., 6:502-503 (2000)]. It is believed that certain recombinant Apo2L/TRAIL preparations may vary in terms of biochemical properties and biological activities on diseased versus normal cells, depending, for example, on the presence or absence of a tag molecule, zinc content, and % trimer content [See, Lawrence et al., Nature Med., Letter to the Editor, 7:383-385 (2001); Qin et al., Nature Med., Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)].

Induction of various cellular responses mediated by such TNF family cytokines is believed to be initiated by their binding to specific cell receptors. Two distinct TNF receptors of approximately 55-kDa (TNFR1) and 75-kDa (TNFR2) have been identified [Hohman et al., J. Biol. Chem., 264:14927-14934 (1989); Brockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3127-3131 (1990); EP 417,563, published March 20, 1991] and human and mouse cDNAs corresponding to both receptor types have been isolated and characterized [Loetscher et al., Cell, 61:351 (1990); Schall et al., Cell, 61:361 (1990); Smith et al., Science, 248:1019-1023 (1990); Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88:2830-2834 (1991); Goodwin et al., Mol. Cell. Biol., 11:3020-3026 (1991)]. Extensive polymorphisms have been associated with both TNF receptor genes [see, e.g., Takao et al., Immunogenetics, 37:199-203 (1993)]. Both TNFRs share the typical structure of cell surface receptors including extracellular, transmembrane and intracellular regions. The extracellular portions of both receptors are found naturally also as soluble TNF-binding proteins [Nophar, Y. et al., EMBO J., 9:3269 (1990); and Kohno, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:8331 (1990)]. The cloning of recombinant soluble TNF receptors was reported by Hale et al. [J. Cell. Biochem. Supplement 15F, 1991, p. 113 (P424)].

The extracellular portion of type 1 and type 2 TNFRs (TNFR1 and TNFR2) contains a repetitive amino acid sequence pattern of four cysteine-rich domains (CRDs) designated 1 through 4, starting from the NH₂-terminus. Each CRD is about 40 amino acids long and contains 4 to 6 cysteine residues at positions which are well conserved [Schall et al., *supra*; Loetscher et al., *supra*; Smith et al., *supra*; Nophar et al., *supra*; Kohno et al., *supra*]. In TNFR1, the approximate boundaries of the four CRDs are as follows: CRD1- amino acids 14 to about 53; CRD2- amino acids from about 54 to about 97; CRD3- amino acids from about 98 to about 138; CRD4- amino acids from about 139 to about 167. In TNFR2, CRD1 includes amino acids 17 to about 54; CRD2- amino acids from about 55 to about 97; CRD3- amino acids from about 98 to about 140; and CRD4- amino acids from about 141 to about 179 [Banner et al., Cell, 73:431-435 (1993)]. The potential role of the CRDs in ligand binding is also described by Banner et al., *supra*.

A similar repetitive pattern of CRDs exists in several other cell-surface proteins, including the p75 nerve growth factor receptor (NGFR) [Johnson et al., Cell, 47:545 (1986); Radeke et al., Nature, 325:593 (1987)], the B cell antigen CD40 [Stamenkovic et al., EMBO J., 8:1403

WO 03/029420

PCT/US02/31210

(1989)], the T cell antigen OX40 [Mallet et al., *EMBO J.*, 9:1063 (1990)] and the Fas antigen [Yonehara et al., *J. Exp. Med.*, 169:1747-1756 (1989) and Itoh et al., *Cell*, 66:233-243 (1991)]. CRDs are also found in the soluble TNFR (sTNFR)-like T2 proteins of the Shope and myxoma poxviruses [Upton et al., *Virology*, 160:20-29 (1987); Smith et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176:335 (1991); Upton et al., *Virology*, 184:370 (1991)]. Optimal alignment of these sequences indicates that the positions of the cysteine residues are well conserved. These receptors are sometimes collectively referred to as members of the TNF/NGF receptor superfamily. Recent studies on p75NGFR showed that the deletion of CRD1 [Welcher, A.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:159-163 (1991)] or a 5-amino acid insertion in this domain [Yan, H. and Chao, M.V., *J. Biol. Chem.*, 266:12099-12104 (1991)] had little or no effect on NGF binding [Yan, H. and Chao, M.V., *supra*]. p75 NGFR contains a proline-rich stretch of about 60 amino acids, between its CRD4 and transmembrane region, which is not involved in NGF binding [Pestire, C. et al., *Eur. J. Hematol.*, 41:414-419 (1988); Seckinger, P. et al., *J. Biol. Chem.*, 264:11966-11973 (1989); Yan, H. and Chao, M.V., *supra*]. A similar proline-rich region is found in TNFR2 but not in TNFR1.

The TNF family ligands identified to date, with the exception of lymphotoxin- α , are type II transmembrane proteins, whose C-terminus is extracellular. In contrast, most receptors in the TNF receptor (TNFR) family identified to date are type I transmembrane proteins. In both the TNF ligand and receptor families, however, homology identified between family members has been found mainly in the extracellular domain ("ECD"). Several of the TNF family cytokines, including TNF- α , Apo-1 ligand and CD40 ligand, are cleaved proteolytically at the cell surface; the resulting protein in each case typically forms a homotrimeric molecule that functions as a soluble cytokine. TNF receptor family proteins are also usually cleaved proteolytically to release soluble receptor ECDs that can function as inhibitors of the cognate cytokines.

Recently, other members of the TNFR family have been identified. Such newly identified members of the TNFR family include CAR1, HVEM and osteoprotegerin (OPG) [Brojatsch et al., *Cell*, 87:845-855 (1996); Montgomery et al., *Cell*, 87:427-436 (1996); Marsters et al., *J. Biol. Chem.*, 272:14029-14032 (1997); Simonet et al., *Cell*, 89:309-319 (1997)]. Unlike other known TNFR-like molecules, Simonet et al., *supra*, report that OPG contains no hydrophobic transmembrane-spanning sequence. OPG is believed to act as a decoy receptor, as discussed below.

Pan et al. have disclosed another TNF receptor family member referred to as "DR4" [Pan et al., *Science*, 276:111-113 (1997)]. The DR4 was reported to contain a cytoplasmic death domain capable of engaging the cell suicide apparatus. Pan et al. disclose that DR4 is believed to be a receptor for the ligand known as Apo-2 ligand or TRAIL.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

In Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997) and Pan et al., Science, 277:815-818 (1997), another molecule believed to be a receptor for Apo2L/TRAIL is described [see also, WO98/51793 published November 19, 1998; WO98/41629 published September 24, 1998]. That molecule is referred to as DR5 (it has also been alternatively referred to as Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 or KILLER [Screaton et al., Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak et al., EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu et al., Nature Genetics, 17:141-143 (1997); WO98/35986 published August 20, 1998; EP870,827 published October 14, 1998; WO98/46643 published October 22, 1998; WO99/02653 published January 21, 1999; WO99/09165 published February 25, 1999; WO99/11791 published March 11, 1999]. Like DR4, DR5 is reported to contain a cytoplasmic death domain and be capable of signaling apoptosis. The crystal structure of the complex formed between Apo-2L/TRAIL and DR5 is described in Hymowitz et al., Molecular Cell, 4:563-571 (1999).

A further group of recently identified TNFR family members are referred to as "decoy receptors," which are believed to function as inhibitors, rather than transducers of signaling. This group includes DCR1 (also referred to as TRID, LIT or TRAIL-R3) [Pan et al., Science, 276:111-113 (1997); Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997); McFarlane et al., J. Biol. Chem., 272:25417-25420 (1997); Schneider et al., FEBS Letters, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti et al., J. Exp. Med., 186:1165-1170 (1997); and Mongkolsapaya et al., J. Immunol., 160:3-6 (1998)] and DCR2 (also called TRUND or TRAIL-R4) [Marsters et al., Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997); Pan et al., FEBS Letters, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti et al., Immunity, 7:813-820 (1997)], both cell surface molecules, as well as OPG [Simonet et al., supra] and DCR3 [Pitti et al., Nature, 396:699-703 (1998)], both of which are secreted, soluble proteins. Apo2L/TRAIL has been reported to bind those receptors referred to as DcR1, DcR2 and OPG.

Apo2L/TRAIL is believed to act through the cell surface "death receptors" DR4 and DR5 to activate caspases, or enzymes that carry out the cell death program. [See, e.g., Salvesen et al., Cell, 91:443-446 (1997)]. Upon ligand binding, both DR4 and DR5 can trigger apoptosis independently by recruiting and activating the apoptosis initiator, caspase-8, through the death-domain-containing adaptor molecule referred to as FADD/Mort1 [Kischkel et al., Immunity, 12:611-620 (2000); Sprick et al., Immunity, 12:599-609 (2000); Bodmer et al., Nature Cell Biol., 2:241-243 (2000)]. In contrast to DR4 and DR5, the DcR1 and DcR2 receptors do not signal apoptosis.

For a review of the TNF family of cytokines and their receptors, see Ashkenazi and Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi and Dixit, Curr. Opin. Cell Biol., 11:255-260 (2000); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997); Gruss and Dower, supra, and Nagata, Cell, 88:355-365 (1997); Locksley et al., Cell, 104:487-501 (2001).

WO 03/029420

PCT/US02/31210

While zinc binding sites have been shown to play structural roles in protein-protein interactions in certain proteins involving diverse interfaces [Feese et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:3544-3548 (1994); Somers et al., *Nature*, 372:478-481 (1994); Raman et al., *Cell*, 95:939-950 (1998)], none of the previously structurally-characterized members of the TNF family (CD40 ligand, TNF-alpha, or TNF-beta) bind metals. The use of metal ions, such as zinc, in formulations of various hormones, such as human growth hormone (hGH), has been described in the literature. [See, e.g., WO 92/17200 published October 15, 1992]. Zinc involvement in hGH binding to receptors was likewise described in WO 92/03478 published March 5, 1992. The roles of zinc binding in interferon-alpha dimers and interferon-beta dimers were reported in Walter et al., *Structure*, 4:1453-1463 (1996) and Karpusas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:11813-11818 (1997), respectively. The structures and biological roles of various metal ions such as zinc have been reviewed in the art, see, e.g., Christianson et al., *Advances in Protein Chemistry*, 42:281-355 (1991).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides Apo-2 ligand variants. Particularly, the invention provides Apo-2 ligand variants comprising one or more amino acid substitutions in the native sequence of Apo-2 ligand (Figure 1). Optionally, the Apo-2 ligand variants may comprise cysteine, lysine and serine substitutions, such as provided in Table I below. A representative embodiment of the invention includes an isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C. A related embodiment of the invention includes such Apo-2 ligand variant polypeptides that are conjugated or linked to one or more polyol groups such as poly(ethylene glycol). Highly preferred embodiments of the invention include Apo-2 ligand variant polypeptides that have such substitution(s) and further bind to a death receptor selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor and/or induce apoptosis in one or more mammalian cells.

A related embodiment of the invention includes isolated nucleic acids comprising a nucleotide sequence encoding such Apo-2 ligand variants, vectors containing such nucleic acids and host cells containing these vectors (e.g. *E. coli*). A related embodiment includes a method of making Apo-2 ligand variant polypeptides by culturing a host cell containing a vector encoding a Apo-2 ligand variant polypeptide in culture media under conditions sufficient to express the Apo-2 ligand variant polypeptide and then recovering and purifying the Apo-2 ligand variant polypeptide.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

Yet another embodiment of the invention is an Apo-2 ligand trimer which includes at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more amino acid substitutions at the following residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179; D234; E249; R255; E263; H264. A related embodiment of the invention includes Apo-2 ligand trimers conjugated or linked to one or more polyol groups such as poly(ethylene glycol). In preferred embodiments of the invention these trimers bind to a death receptor selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

Yet another embodiment of the invention is an isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more amino acid substitutions at a residue position identified from an x-ray crystal structure of the DR5•Apo2L complex as shown in Figure 3. In preferred embodiments, the residue position is both outside of the receptor contact region of the DR5•Apo2L complex and displays high solvent accessibility. In highly preferred embodiments, the residue position of such isolated Apo-2 ligand variant polypeptides is located on one face of the Apo2L monomer from top to bottom as shown in the crystal structure of the DR5•Apo2L complex provided in Figure 3. A related embodiment of the invention includes such Apo-2 ligand variant polypeptides conjugated or linked to one or more polyol groups such as poly(ethylene glycol). Highly preferred embodiments of the invention include Apo-2 ligand variant polypeptides that have such substitution(s) and further bind to a death receptor selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor and/or induce apoptosis in one or more mammalian cells.

Yet another embodiment of the invention includes Apo-2 ligand trimer oligomers comprising at least two Apo-2 ligand trimers, wherein at least one Apo-2 ligand monomer in each Apo-2 ligand trimer comprises an Apo-2 ligand variant polypeptide having a cysteine amino acid substitution at amino acid residue position 170 in Figure 1 (SEQ ID NO:1), and wherein the Apo-2 ligand trimers are linked by disulfide bonds between the cysteine amino acid residues at position 170 in the Apo-2 ligand variant polypeptides.

In another embodiment, the invention provides a formulation comprising Apo-2 ligand variant polypeptide. In particular, the invention provides compositions comprising one or more Apo-2 ligand variant polypeptides and a carrier, such as a pharmaceutically-acceptable carrier, and optionally one or more divalent metal ions. In one embodiment, such composition may be included in an article of manufacture or kit. The composition may be a pharmaceutically acceptable formulation useful, for instance, in inducing or stimulating apoptosis in mammalian cancer cells or

WO 03/029420

PCT/US02/31210

for treating an immune related disorder, such as arthritis or multiple sclerosis.

In addition, therapeutic methods for using Apo-2 ligand variant polypeptides are provided.

Particular embodiments of the invention include isolated Apo-2 ligand variant polypeptides comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C. Isolated nucleic acids, vectors and host cells comprising a nucleotide sequence encoding such Apo-2 ligand variants are further provided. Methods of making Apo-2 ligand variant polypeptide, comprising the steps of: providing such host cell(s), providing culture media; culturing the host cell(s) in the culture media under conditions sufficient to express the Apo-2 ligand variant polypeptide; recovering the Apo-2 ligand variant polypeptide from the host cell or culture media; and purifying the Apo-2 ligand variant polypeptide. Optionally, the Apo-2 ligand variant polypeptides are conjugated or linked to one or more polyol groups that increase the actual molecular weight of the Apo-2 ligand variant polypeptide. Optionally, such Apo-2 ligand variant polypeptide is conjugated or linked to one molecule of poly(ethylene glycol) having a molecular weight of 2000 Daltons or about 2000 Daltons.

Further embodiments of the invention include Apo-2 ligand trimers comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more amino acid substitutions at the following residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179; D234; E249; R255; E263; H264.

Further embodiments of the invention include isolated Apo-2 ligand variant polypeptides comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more amino acid substitutions at a residue position identified from an x-ray crystal structure of the DR5•Apo2L complex as shown in Figure 3 such that the residue position is:

(a) outside of the receptor contact region of the DR5•Apo2L complex as shown in Figure 3; and

(b) displays high solvent accessibility in the crystal structure of the DR5•Apo2L complex as shown in Figure 3. Optionally, such Apo-2 ligand variant polypeptides have one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179;

WO 03/029420

PCT/US02/31210

D234; E249; R255; E263; E264. Optionally, such Apo-2 ligand variant polypeptides is conjugated or linked to one or more polyol groups.

Further embodiments of the invention include pharmaceutical compositions comprising an effective amount of isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; and H264C, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier. Optionally, such pharmaceutical compositions comprise one or more divalent metal ions.

Further embodiments of the invention include methods of inducing apoptosis in mammalian cells comprising exposing mammalian cells expressing a receptor selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor to a therapeutically effective amount of isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

Further embodiments of the invention include methods of treating cancer in a mammal, comprising administering to said mammal an effective amount of isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C. Optionally, in the methods, the cancer is lung cancer, breast cancer, colon cancer or colorectal cancer.

Further embodiments of the invention include methods of treating an immune-related disease in a mammal comprising administering to said mammal an effective amount of isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C. Optionally, in the methods, the immune-related disease is arthritis or multiple sclerosis.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:2) of human Apo-2 ligand cDNA and its derived amino acid sequence (SEQ ID NO:1). The "N" at nucleotide position 447 is used to indicate the nucleotide base may be a "T" or "G".

Figures 2A-2C relate to the crystal structure of Apo-2L. Figure 2A shows a view of the trimer along the three fold axis. Each monomer is identical. The ordered protein structure commences at residue 120, residues 131-141 are disordered, as are residues 195-201 (marked as dashed lines). The zinc binding site including the three symmetry related cysteines and the solvent ligand are shown as space filling diagrams. Figure 2B provides cross-eyed stereo close up view of the zinc binding site; the angles between Sy-zinc-Sy are 112° and the Sy-zinc-solvent angles are 107° with 2.3 Angstrom zinc-sulfur and 2.3 Angstrom zinc-solvent bond distances. Figure 2 was made with the programs Molscript [Kraulis et al., *J. Appl. Cryst.*, 24:946-950 (1991)] and Raster3D [Meritt et al., *Acta Cryst.*, D50:869-873 (1994)]. Figure 2C provides a summary of the crystallographic data.

Figure 3 shows a x-ray structure of the DR5•Apo2L complex.

Figure 4 shows the apoptosis-inducing activity of R170C-Apo2L.0 on SK-MES lung carcinoma cells. The increased activity of the R170C variant appears to be related to oxidation of Cys170 during incubation in the bioassay media. Prior alkylation of Cys170 with N-ethylmaleimide (NEM) (Table I) or iodoacetamide blocked the activity increase.

Figure 5 shows an analysis of R170C-Apo2L.0 oligomers by size exclusion chromatography (SEC) on a Superdex 200 column (Amersham Biotech) using a chromatographic system equipped with an on-line light scattering detector (MALS) (Wyatt Technology, Inc.). Solid lines represent the UV trace and symbols indicate the molar mass calculated from the light scattering data. With only 3 minutes of air oxidation R170C-Apo2L.0 is found predominantly in the trimeric form with a calculated molecular weight of 70,000 D (elution volume=11 mLs). At 2 hours significant amounts of higher molecular weight forms are found. The three peaks at 2 hours have calculated molecular weights of 70,000 D, 140,000 D (9.5 mL elution volume) and 600,000 D (6 mL elution volume). After 24 hours only the 600,000 D molecular weight species is found.

Figure 6 shows the kinetics of oligomerization and bioactivity increase for R170C-Apo2L.0. The time course of the increase in bioactivity is concomitant with the accumulation of oligomeric forms.

Figure 7 shows the effects of oxidized R170C-Apo2L.0 on cynomolgous monkey hepatocytes.

Figure 8 shows a SDS-PAGE analysis of PEGylation reactions. Lanes (left to right) 1,2 - R170C-Apo2L.0, 3 - No PEG-maleimide added, 4 - NEM modified R170C-Apo2L.0, 5 - 1:1 PEG:R170C-Apo2L.0, 6 - 2:1 PEG:R170C-

WO 03/029420

PCT/US02/31210

Apo2L.0, 7 - 5:1 PEG:R170C-Apo2L.0, 8 - 10:1 PEG:R170C-Apo2L.0, 9 - Molecular weight standards, 10 - air oxidized R170C-Apo2L.0. SDS-PAGE indicates an approximately 2000 Dalton shift in the monomer molecular weight upon treatment of R170C-Apo2L.0 with PEG-maleimide. Reactions using PEG:protein ratios of 2:1 or greater gave a similar extent of modification. For these reactions, residual unmodified monomer was observed. Visual inspection of the Coomassie blue-stained gel suggests that unmodified monomer accounts for <10% of the total protein. At PEG:protein molar ratios less than 2:1, less modification was obtained. The reactions appeared to go to completion within 2 hours since no apparent change in the product was observed with a 24 hour reaction time.

Figure 9 shows the analysis of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) by SEC-MALS. A curve for carboxyamidomethyl-R170C-Apo2L.0, with a peak elution volume of 11.3 mL, is shown for comparison. PEGylation causes a decrease in elution volume and increase in apparent molecular weight.

Figure 10 shows the analysis of PEG-R170C-Apo2L.0 by mass spectroscopy. MALDI-TOF-MS indicated the presence of a small amount of unmodified monomer (MW=19,440 D) and a major peak corresponding to protein having a single attached PEG. PEG molecules are well known to have mass heterogeneity, differing in molecular weight by increments of the polymer unit ethylene glycol (MW=44). As a consequence, a broad mass range centered about 21,660 D is observed for the protein with a single PEG attached. The difference in average mass between the pegylated and non-pegylated R170C-Apo2L.0 indicates that the average mass of the PEG is 2200 D.

Figure 11 shows peptide mapping used to confirm the site of PEG attachment. Samples of pegylated and non-pegylated R170C-Apo2L.0 were digested with Lys-C protease and the resulting peptides were separated by reverse phase HPLC. The pattern of peptides produced was compared to the map previously determined for Apo2L.0. A peptide labeled L4, produced by cleavage after Lys150 and Lys179, contains the Cys170 residue in the digest of R170C-Apo2L.0. This peak disappears and is replaced by a broad, later eluting peak (L4*), in the pegylated protein.

Figure 12 shows the pharmacokinetics of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) in the mouse. Mice were given tail vein injections of Apo2L.0 (10 mg/kg) or PEG-R170C-Apo2L.0 (10 mg/kg) at time zero. Plasma samples were collected at 1, 20, 40, 60, and 80 minutes. Apo2L concentrations were determined by ELISA. These data show that PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) has a longer half-life than Apo2L.0.

Figure 13 shows the effect of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) on the growth of human COLO205 tumors in a mouse xenograft model. Athymic nude mice (Jackson Laboratories) were injected subcutaneously with 5×10^6 COLO205 human colon carcinoma cells (NCI). Tumors were allowed to form and grow to a volume of about 150 mm³ as judged by caliper measurement. Mice (8

WO 03/029420

PCT/US02/31210

per group) were given i.v. injections of vehicle (2x/week), Apo2L.0 (60 mg/kg, 2x/week), Apo2L.0 (10 mg/kg, 2x/week), or PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) (10 mg/kg, 2x/week). Tumor volume was measured every third day and treatment was stopped after two weeks. Treatment with 10 mg/kg PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) caused a greater reduction in tumor volume than an equivalent dose of Apo2L.0.

Figure 14 shows the apoptosis-inducing activity of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) on SK-MES lung carcinoma cells. The activity of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) is increased 39-fold relative to Apo2L.0.

Figure 15 shows the analysis of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) by SEC-MALS. PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) elutes from the column in 3 main peaks. The first peak has a calculated molecular weight of 315,000 D and accounts for 30% of the material injected. The second peak has a calculated molecular weight of 194,000 D and represents 23% of the total. The third peak has a calculated molecular weight of 108,000 D and accounts for 46% of the total mass.

Figure 16 is a schematic drawing of the proposed structure of the "hexameric" component of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78). Two Apo2L trimers are shown in disulfide linkage through Cys170 with the remaining subunits of the trimer having a PEG chain attached to Cys170.

Figure 17 shows the pharmacokinetics of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) in the mouse. Mice were given tail vein injections of Apo2L.0 (10 mg/kg) or PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) (10 mg/kg) at time zero. Plasma samples were collected at 10 minutes, and 1, 2, 4, 8, and 24 hours. Apo-2L concentrations were determined by ELISA. These data show that PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) has a 48-fold longer half-life than Apo2L.0.

Figure 18 shows the effect of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) on the growth of human COLO205 tumors in a mouse xenograft model. Athymic nude mice (Jackson Laboratories) were injected subcutaneously with 5×10^6 COLO205 human colon carcinoma cells (NCI). Tumors were allowed to form and grow to a volume of about 150 mm³ as judged by caliper measurement. Mice (8 per group) were given i.p. injections of vehicle (5x/week), Apo2L.0 (60 mg/kg, 5x/week), Apo2L.0 (10 mg/kg, 2x/week), PEG-R170C-Apo2L.0 (10 mg/kg, 2x/week), PEG-R170C-Apo2L.0 (3 mg/kg, 2x/week), or PEG-R170C-Apo2L.0 (1 mg/kg, 2x/week). Tumor volume was measured every third day and treatment was stopped after two weeks. All three doses of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) caused complete tumor regression in all 8 animals of each group.

Figure 19 shows the effect of PEG-R170C-Apo2L.0 on survival of normal hepatocytes from the cynomolgus monkey. Lot 32176-78 shows the effects at intermediate concentrations whereas lot 32176-87C has no effect on hepatocyte survival.

Figures 20A and 20B show the nucleotide sequence (SEQ ID NO:4) of a cDNA for full length human DR4 and its derived amino acid sequence (SEQ ID

WO 03/029420

PCT/US02/31210

NO:3). The respective nucleotide and amino acid sequences for human DR4 are also reported in Pan et al., *Science*, 276:111 (1997).

Figure 21 shows the 411 amino acid sequence (SEQ ID NO:5) of human DR5 (also referred to as Apo-2) as published in WO 98/51793 on November 19, 1998. A splice variant of human DR5 is known in the art. This DR5 splice variant encodes the 440 amino acid sequence (SEQ ID NO:6) of human DR5 shown in Figures 22A and 22B.

Figures 22A and 22B show the 440 amino acid sequence (SEQ ID NO:6) of human DR5 as published in WO 98/35986 on August 20, 1998.

Figure 23 shows the analysis of 2K PEG-K179C-Apo2L.0 by SEC-MALS.

Figure 24 shows apoptosis-inducing activity of 2K PEG-R179C-Apo2L.0 (referred to in the figures as "2KPEG-K179.0") on SK-MES lung carcinoma cells.

Figure 25 shows the pharmacokinetics of 2KPEG-R179C-Apo2L.0 in the Colo205 mouse model. Plasma samples were collected at the times indicated, and concentrations of the indicated protein were determined by ELISA.

Figure 26 shows the effect of 2K PEG-R179C-Apo2L.0 on the growth of human COLO205 tumors in a mouse xenograft model.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

I. Definitions

The terms "Apo-2 ligand", "Apo2L", "Apo-2L", and "TRAIL" are used herein to refer to a polypeptide sequence which includes amino acid residues 114-281, inclusive, 95-281, inclusive, residues 92-281, inclusive, residues 91-281, inclusive, residues 41-281, inclusive, residues 15-281, inclusive, or residues 1-281, inclusive, of the amino acid sequence shown in Figure 1, as well as biologically active fragments, deletional, insertional, or substitutional variants of the above sequences. In one embodiment, the polypeptide sequence comprises residues 114-281 of Figure 1 (SEQ ID NO:1). Optionally, the polypeptide sequence comprises residues 95-281, residues 92-281 or residues 91-281 of Figure 1. The Apo-2L polypeptides may be encoded by the native nucleotide sequence shown in Figure 1. Optionally, the codon which encodes residue Pro119 (Figure 1) may be "CCT" or "CCG". In another preferred embodiment, the fragments or variants are biologically active and have at least about 80% amino acid sequence identity, more preferably at least about 90% sequence identity, and even more preferably, at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity with any one of the above sequences. The definition encompasses substitutional variants of Apo-2 ligand in which at least one of its native amino acids are substituted by another amino acid residue, such as a cysteine residue. Preferred substitutional variants include one or more of the residue substitutions identified in Table I below. The definition also encompasses a native sequence Apo-2 ligand isolated from an Apo-2 ligand

WO 03/029420

PCT/US02/31210

source or prepared by recombinant or synthetic methods. The Apo-2 ligand of the invention includes the polypeptides referred to as Apo-2 ligand or TRAIL disclosed in WO97/01633 published January 16, 1997, WO97/25428 published July 17, 1997, and WO 01/00832 published January 4, 2001. The terms "Apo-2 ligand", "Apo2L" or "Apo-2L" are used to refer generally to forms of the Apo-2 ligand which include monomer, dimer or trimer forms of the polypeptide. All numbering of amino acid residues referred to in the Apo-2L sequence use the numbering according to Figure 1 (SEQ ID NO:1), unless specifically stated otherwise. For instance, "D203" or "Asp203" refers to the aspartic acid residue at position 203 in the sequence provided in Figure 1 (SEQ ID NO:1).

The term "Apo-2 ligand extracellular domain" or "Apo-2 ligand ECD" refers to a soluble form of Apo-2 ligand which is essentially free of transmembrane and cytoplasmic domains. Ordinarily, the ECD will have less than 1% of such transmembrane and cytoplasmic domains, and preferably, will have less than 0.5% of such domains.

The term "Apo-2 ligand monomer" or "Apo-2L monomer" refers to a covalent chain of an extracellular domain sequence of Apo-2L.

The term "Apo-2 ligand dimer" or "Apo-2L dimer" refers to two Apo-2L monomers joined in a covalent linkage via a disulfide bond. The term as used herein includes free standing Apo-2L dimers and Apo-2L dimers that are within trimeric forms of Apo-2L (i.e., associated with another Apo-2L monomer).

The term "Apo-2 ligand trimer" or "Apo-2L trimer" refers to three Apo-2L monomers that are non-covalently associated.

The term "Apo-2L.0" or "Apo2L.0" refer to a polypeptide consisting of amino acids 114 to 281 of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and not linked or conjugated to any epitope tag sequences.

The term "DR4 receptor" as used herein refers to the full length and extracellular domain forms of the receptor described in Pan et al., *Science*, 276:111-113 (1997)]. The full length amino acid sequence of DR4 receptor is provided in Figs. 20A-20B (SEQ ID NO:4).

The term "DR5 receptor" as used herein refers to the full length and extracellular domain forms of the receptor described in Sheridan et al., *Science*, 277:818-821 (1997); Pan et al., *Science*, 277:815-818 (1997), WO98/51793 published November 19, 1998; WO98/41629 published September 24, 1998; Srean et al., *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak et al., *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu et al., *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); WO98/35986 published August 20, 1998; EP 870,827 published October 14, 1998; WO98/46643 published October 22, 1998; WO99/02653 published January 21, 1999; WO99/09165 published February 25, 1999; WO99/11791 published March 11, 1999. The DR5 receptor has also been referred to in the art as Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 or KILLER. The term DR5 receptor used herein includes the full length 411 amino acid polypeptide

WO 03/029420

PCT/US02/31210

provided in Fig. 21 (SEQ ID NO:5) and the full length 440 amino acid polypeptide provided in Figs. 22A-B (SEQ ID NO:6).

The term "polyol" when used herein refers broadly to polyhydric alcohol compounds. Polyols can be any water-soluble poly(alkylene oxide) polymer for example, and can have a linear or branched chain. Preferred polyols include those substituted at one or more hydroxyl positions with a chemical group, such as an alkyl group having between one and four carbons. Typically, the polyol is a poly(alkylene glycol), preferably poly(ethylene glycol) (PEG). However, those skilled in the art recognize that other polyols, such as, for example, poly(propylene glycol) and polyethylene-polypropylene glycol copolymers, can be employed using the techniques for conjugation described herein for PEG. The polyols of the invention include those well known in the art and those publicly available, such as from commercially available sources.

The term "conjugate" is used herein according to its broadest definition to mean joined or linked together. Molecules are "conjugated" when they act or operate as if joined.

The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising Apo-2 ligand, or a portion thereof, fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the Apo-2 ligand. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 to about 50 amino acid residues (preferably, between about 10 to about 20 residues).

The term "divalent metal ion" refers to a metal ion having two positive charges. Examples of divalent metal ions for use in the present invention include but are not limited to zinc, cobalt, nickel, cadmium, magnesium, and manganese. Particular forms of such metals that may be employed include salt forms (e.g., pharmaceutically acceptable salt forms), such as chloride, acetate, carbonate, citrate and sulfate forms of the above mentioned divalent metal ions. A preferred divalent metal ion for use in the present invention is zinc, and more preferably, the salt form, zinc sulfate. Divalent metal ions, as described herein, are preferably employed in concentrations or amounts (e.g., effective amounts) which are sufficient to, for example, (1) enhance storage stability of Apo-2L trimers over a desired period of time, (2) enhance production or yield of Apo-2L trimers in a recombinant cell culture or purification method, (3) enhance solubility (or reduce aggregation) of Apo-2L trimers, or (4) enhance Apo-2L trimer formation.

"Isolated," when used to describe the various proteins disclosed herein, means protein that has been identified and separated and/or

WO 03/029420

PCT/US02/31210

recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the protein, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the protein will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated protein includes protein in situ within recombinant cells, since at least one component of the Apo-2 ligand natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated protein will be prepared by at least one purification step.

An "isolated" Apo-2 ligand nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the Apo-2 ligand nucleic acid. An isolated Apo-2 ligand nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated Apo-2 ligand nucleic acid molecules therefore are distinguished from the Apo-2 ligand nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated Apo-2 ligand nucleic acid molecule includes Apo-2 ligand nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express Apo-2 ligand where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to the sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the Apo-2 ligand sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including assigning algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length sequences being compared. For purposes herein, percent amino acid identity values can be obtained using the sequence comparison computer program, ALIGN-2, which was authored by Genentech, Inc. and the source code of which has been filed with user documentation in the US Copyright Office, Washington, DC, 20559, registered under the US Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, CA. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

The term "cytokine" is a generic term for proteins released by one cell population which act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines, monokines, and traditional polypeptide hormones. Included among the cytokines are growth hormone such as human growth hormone, N-methionyl human growth hormone, and bovine growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; prolaxin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); hepatic growth factor; fibroblast growth factor; prolactin; placental lactogen; tumor necrosis factor- α and - β ; mullerian-inhibiting substance; mouse gonadotropin-associated peptide; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor; integrin; thrombopoietin (TPO); nerve growth factors; platelet-growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF- α and TGF- β ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons such as interferon- α , - β , and - γ ; colony stimulating factors (CSFs) such as macrophage-CSF (M-CSF); granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF); and granulocyte-CSF (G-CSF); interleukins (ILs) such as IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; and other polypeptide factors including LIF and kit ligand (KL). As used herein, the term cytokine includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the native sequence cytokines.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of

WO 03/029420

PCT/US02/31210

cells. The term is intended to include radioactive isotopes (e.g., ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y and ^{186}Re), chemotherapeutic agents, and toxins such as enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, or fragments thereof.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide (CYTOXAN[®]); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzedopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylenamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolmelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan); bryostatins; calystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CBI-TMI); eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosoureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e.g. calicheamicin, especially calicheamicin gammaII and calicheamicin phiII, see, e.g., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dynemicin, including dynemicin A; bisphosphonates, such as clodronate; an esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antibiotic chromophores); aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carabacin, carminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin (Adriamycin[™]) (including morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitioestanol, mepitioestane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as

WO 03/029420

PCT/US02/31210

frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; eniluracil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK[®]; razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2, 2',2''-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verrucarins A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepe; taxoids, e.g. paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) and doxorubicin (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); chlorambucil; gemcitabine (Gemzar[™]); 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine (Navelbine[™]); novantrone; teniposide; edatrexate; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT-11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid; capecitabine; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen (including Nolvadex[™]), raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (Fareston[™]); aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, megestrol acetate (Megace[™]), exemestane, formestane, fadrozole, vorozole (Rivisor[™]), letrozole (Femara[™]), and anastrozole (Arimidex[™]); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell, especially cancer cell overexpressing any of the genes identified herein, either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth inhibitory agent is one which significantly reduces the percentage of cells overexpressing such genes in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxol, and topo II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that

WO 03/029420

PCT/US02/31210

arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13.

"Biologically active" or "biological activity" for the purposes herein means (a) having the ability to induce or stimulate apoptosis in at least one type of mammalian cancer cell or virally-infected cell *in vivo* or *ex vivo*; (b) capable of raising an antibody, i.e., immunogenic; (c) capable of binding and/or stimulating a receptor for Apo2L/TRAIL; or (d) retaining the activity of a native or naturally-occurring Apo2L/TRAIL polypeptide. Assays for determining biological activity of the Apo2L/TRAIL can be conducted using methods known in the art, such as cell cytotoxicity, DNA fragmentation (see, e.g., Marsters et al., *Curr. Biology*, 6: 1669 (1996)), caspase inactivation, DR4 binding, DR5 binding (see, e.g., WO 98/51793, published Nov. 19, 1998), DcR1 (see, e.g., WO 98/58062, published Dec. 23, 1998), DcR2 (see, e.g., WO 99/10484, published March 4, 1999) as well as the assays described in PCT Publication Nos. WO97/01633, WO97/25428, WO 01/00832, and WO 01/22987.

The terms "apoptosis" and "apoptotic activity" are used in a broad sense and refer to the orderly or controlled form of cell death in mammals that is typically accompanied by one or more characteristic cell changes, including condensation of cytoplasm, loss of plasma membrane microvilli, segmentation of the nucleus, degradation of chromosomal DNA or loss of mitochondrial function. This activity can be determined and measured, for instance, by cell viability assays (such as Alamar blue assays or MTT assays), FACS analysis, DNA fragmentation (see Nicoletti et al., *J. Immunol. Methods*, 139:271-279 (1991), or poly-ADP ribose polymerase, "PARP", cleavage assay.

As used herein, the term "disorder" in general refers to any condition that would benefit from treatment with the compositions described herein, including any disease or disorder that can be treated by effective amounts of polypeptides such as Apo2L/TRAIL. This includes chronic and acute disorders, as well as those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question. Non-limiting examples of disorders to be treated herein include benign and malignant cancers; inflammatory, angiogenic, and immunologic disorders, autoimmune disorders, arthritis (including rheumatoid arthritis), multiple sclerosis, and HIV/AIDS.

The terms "cancer", "cancerous", or "malignant" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include but are not limited to, carcinoma, lymphoma, leukemia, blastoma, and sarcoma. More particular

WO 03/029420

PCT/US02/31210

examples of such cancers include squamous cell carcinoma, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, glioma, gastrointestinal cancer, renal cancer, ovarian cancer, liver cancer, colorectal cancer, endometrial cancer, kidney cancer, prostate cancer, thyroid cancer, neuroblastoma, pancreatic cancer, glioblastoma multiforme, cervical cancer, stomach cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon carcinoma, and head and neck cancer.

The terms "treating", "treatment" and "therapy" as used herein refer to curative therapy, prophylactic therapy, and preventative therapy.

The term "mammal" as used herein refers to any mammal classified as a mammal, including humans, cows, horses, dogs and cats. In a preferred embodiment of the invention, the mammal is a human.

II. Compositions and Methods of the Invention

A cytokine related to the TNF ligand family, the cytokine identified herein as "Apo-2 ligand" has been described. The predicted mature amino acid sequence of human Apo-2 ligand contains 281 amino acids, and has a calculated molecular weight of approximately 32.5 kDa. The absence of a signal sequence and the presence of an internal hydrophobic region suggests that Apo-2 ligand is a type II transmembrane protein. Soluble extracellular domain Apo-2 ligand polypeptides have also been described. See, e.g., WO97/25428 published July 17, 1997. Apo-2L substitutional variants have further been described. Alanine scanning techniques have been utilized to identify various substitutional variant molecules having biological activity. Particular substitutional variants of the Apo-2 ligand include those in which at least one amino acid is substituted by a cysteine residue. Substitutional variants are identified, for example, as "R115C", "R116C" and "R170C." This nomenclature is used to identify Apo-2 ligand variants wherein the residues at positions 115, 116, and/or 170 (using the numbering shown in Figure 1), respectively, are substituted by cysteine residues. Optionally, the Apo-2L variants may comprise one or more of the substitutions which are recited in Table I below.

The x-ray crystal structure of the extracellular domain of Apo-2 ligand is provided, and alanine-scanning mutagenesis has been performed to provide the mapping of its receptor contact regions. The structure obtained for Apo-2 ligand reveals a homotrimeric protein which contains a novel divalent metal ion (zinc) binding site that coordinates the interaction of the Apo-2 ligand trimer molecule's three subunits.

The x-ray structure of Apo-2L was determined by molecular replacement using a model of TNF-alpha [Eck et al., *J. Biol. Chem.*, 264:17595-17605 (1989)] and refined to 3.9 Angstrom (for the 114-281 residue form) and 1.3 Angstrom (for the D218A variant; 91-281 form). Like other members of the TNF family, Apo-2L appears to comprise a compact trimer formed of three jelly roll monomers which bury approximately 5100 Angstrom² (1700 Angstrom²

WO 03/029420

PCT/US02/31210

per monomer) to form the globular trimer (See Figure 2A). The position of the core beta-strands was well conserved compared to the other structurally characterized members of the TNF family, TNF-alpha [Eck et al., *supra*; Jones et al., *Nature*, 338:225-228 (1989)], TNF-beta [Eck et al., *J. Biol. Chem.*, 267:2119-2122 (1992)], and CD40L [Karpusas et al., *Structure*, 3:1031-1039 (1995)], with a r.m.s.d. of 0.8 Angstrom when compared to the core strands of TNF-alpha or TNF-beta. None of the residues in the Apo-2L trimer interface appear to be absolutely conserved across the sequences of the all the presently known human TNF family members; however, the hydrophobic chemical nature of these residues is preserved. The conserved residues in the Apo-2L trimer interface cluster near the base (the widest part of the trimer) and along the three-fold axis. Near the top of the Apo-2L trimer interface in the vicinity of Cys230, the structures appear to diverge, and the conformation of the 190's and 230's loops are variable in each structure.

In contrast to the beta-scaffold core, the structure of the loops and receptor binding surfaces varies considerably among the TNF family members. One difference between the structure of Apo-2 ligand and the structures of TNF-alpha, TNF-beta, and CD40L is the connections between strands A and A'. In TNF-alpha, TNF-beta, and CD40L, strand A is followed by a compact loop. In Apo-2 ligand, a 15-residue insertion lengthens this loop and alters its conformation. The first part of the loop (residues 131 to 141) is disordered while the second part of the loop (residues 142 to 154) crosses the surface of the molecule from one monomer-monomer interface to the next (see Figure 2A) with a conformation that resembles CD40L in its C-terminal portion.

A divalent metal ion (zinc) binding site is buried near the top of the trimerization interface. The TNF family members can be divided by sequence analysis into three groups with respect to Cys230: (1) proteins such as TNF-alpha and Fas ligand in which a cysteine residue at the position corresponding to Cys230 is accompanied by another cysteine in the adjacent loop (the 194-203 loop in Apo-2L) with which it can form a disulfide bridge precluding it from interacting with a metal ion, (2) proteins without a cysteine corresponding to Cys230 (such as TNF-beta and OPG), and (3) proteins which have only one cysteine residue corresponding to Cys230. Apo-2L and its orthologs in other species meet the latter criteria (i.e., proteins which have only Cys230) and are expected to bind divalent metal ions at the trimer surface. The conformation of the main chain immediately prior to Cys230 in Apo-2L differs from the disulfide containing TNF family members such as TNF-alpha and CD40L. In Apo-2L, the side chain of Cys230 is oriented towards the interface instead of away from it.

The Cys230 residue in each Apo-2L monomer point inward toward the trimer axis and coordinate a divalent metal ion in conjunction with an

WO 03/029420

PCT/US02/31210

interior solvent molecule. This divalent metal ion binding site exhibits slightly distorted tetrahedral geometry with bonds and angles appropriate for a zinc binding site and is completely inaccessible to solvent (see Figure 2B). The identity of the bound metal was confirmed using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). In a quantitative analysis for Cd, Co, Zn, Ni, and Cu using ICP-AES, 0.79 moles of Zn and 0.06 moles of Co per molecule of Apo-2L trimer were detected demonstrating that the bound ion in the structure was zinc at approximately a one to one molar ratio. The importance of this site was demonstrated by the observation that alanine substitution of Cys230 resulted in a >8-fold decreased apoptotic activity. Furthermore, removal of the bound metal from Apo-2L by dialysis against chelating agents resulted in a 7-fold decrease in DR5 affinity and a >90-fold decrease in apoptotic activity. Upon removal of the Zn, the cysteines became prone to oxidation and disulfide-linked Apo-2L dimers were formed which had decreased apoptotic activity. Since the metal binding site appears to be buried in the Apo-2L trimer structure and is not expected to contact receptor, the data suggests that divalent metal ion binding may be important to maintain the trimer structure and stability of Apo-2L.

The crystal structure of the complex between Apo-2 ligand and an extracellular domain sequence of Apo-2 receptor (DR5) has been determined. (see, Hymowitz et al., *Mol. Cell.*, 4:563-571 (1999)). Apo-2 resembles TNFR1 in overall structure with relatively little defined secondary structure. It is tethered into an elongated shape by a series of seven disulfide bridges, six of which are found in subdomains of Apo-2 (residues 43-84 and 85-130, respectively) that correspond structurally to the second and third CRDs of the TNFR1 receptor.

The interface of the Apo-2 ligand/Apo-2 complex is divided into two patches- patch A and patch B. The dominant characteristic of patch B in the Apo-2L/Apo-2 interface is the interaction between Tyr 216 of Apo-2L (using the numbering of the amino acid sequence for Apo-2L provided in Figure 1) and the 50s loop of the Apo-2 receptor. Residue Tyr 216 is conserved in many of the TNF superfamily ligands (including TNF-alpha, TNF-beta, FasL and OPGL), while other members have a similar large hydrophobic residue at this position. Mutagenesis studies on TNF-alpha, TNF-beta, FasL and Apo-2L have all shown that this residue is critical for binding (Schneider et al., *J. Biol. Chem.*, 272:18827-18833 (1997); Goh et al., *Protein Eng.*, 4:785-791 (1991); Yamagishi et al., *Protein Eng.*, 3:713-719 (1990); Van Ostade et al., *Protein Eng.*, 7:5-22 (1990); Hymowitz et al., personal communication). The interactions of the tyrosine side chain are conserved between the Apo-2L/Apo-2 and TNF-beta-TNFR1 complexes. Moreover, the backbone conformation of the 50s loop of the receptor, which forms the binding pocket for the side chain, is virtually identical between Apo-2 and the TNFR1 (rmsd of only 0.35 between the C-alpha atoms of residues 51 to

WO 03/029420

PCT/US02/31210

62). Additionally, the length of this loop is conserved among the different TNF receptor superfamily members. It is believed that this loop may function as a general hydrophobic binding patch interacting with conserved hydrophobic features on the ligand which may help properly orient the upper part of the receptor for more specific contacts mediated by CRD3.

In contrast to the conserved interactions in patch B, patch A near the bottom of the interface involves interactions made by the 90s loop on CRD3 of Apo-2, which has a completely different conformation than the corresponding loop in the TNFR1.

In patch B, it is believed that the 50s loop of the receptor and Apo-2 ligand residue 216 provide a hydrophobic patch generally important for binding, whereas in patch A, the receptor 90s loop and the Apo-2 ligand residue at or near position 205 control the specificity and cross-reactivity. The 50s loop and the 90s loop of the Apo-2 receptor are believed to carry most of the ligand-binding determinants. The histidine and phenylalanine residues at positions 53 and 59, respectively, of the Apo-2 sequence are both relatively large residues. These two residues are believed to contact residues Asp218 and Ser159 of the Apo-2 ligand; thus introducing larger side chains at the 53 and 59 positions of the Apo-2 sequence may adversely affect Apo-2L affinity for Apo-2 (but improve affinity for DR4).

In order to characterize Apo-2 ligand receptor binding and activity, sites for amino acid substitution were chosen on the basis of examination of the x-ray structure of the DR5-Apo-2L complex (Figure 3). To avoid loss of activity upon mutation or subsequent modification of substituted cysteine amino acid residues, sites outside of the receptor contact region were considered for mutagenesis. In order to ensure efficient chemical modification of the cysteine side chain, residues that displayed high solvent accessibility in the crystal structure were selected. Residues that matched these criteria include, but are not limited to, Glu144, Asn152, Ser153, Arg170, Asp234, Glu249, Arg255, Glu263, and His264. In addition, Val114, Arg115, Glu116, Asn134 and Asn140 were chosen as sites for cysteine substitution. These residues are in disordered parts of the molecule in the Apo-2L-DR5 crystal structure and thus are presumed to be solvent accessible and do not contribute to receptor binding. As shown in Figure 3, this set of residues spans one face of the Apo-2L monomer from top to bottom. Of the cysteine-substituted Apo-2L proteins experimentally tested, E116C gave significantly reduced apoptotic activity on SK-MES cells (see Table I). The R170C variant exhibited about a 10-fold increased potency. In addition, Apo-2L variants having Arg170 substituted with either Ala, Lys, or Ser residues had activities comparable to the Apo-2L.0 polypeptide. It is believed that in certain embodiments of the invention, preferred Apo-2L variants will comprise native residues (i.e., will not be

WO 03/029420

PCT/US02/31210

mutated) at positions corresponding to E116, N134, N140 and/or R255 in the Apo-2L sequence of Figure 1.

The description below relates to methods of producing Apo-2 ligand variants by culturing host cells transformed or transfected with a vector containing Apo-2 ligand variant encoding nucleic acid and recovering the polypeptide from the cell culture.

The DNA encoding Apo-2 ligand may be obtained from any cDNA library prepared from tissue believed to possess the Apo-2 ligand mRNA and to express it at a detectable level. Accordingly, human Apo-2 ligand DNA can be conveniently obtained from a cDNA library prepared from human tissues, such as the bacteriophage library of human placental cDNA as described in WO97/25428. The Apo-2 ligand-encoding gene may also be obtained from a genomic library or by oligonucleotide synthesis.

Libraries can be screened with probes (such as antibodies to the Apo-2 ligand or oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate the gene encoding Apo-2 ligand is to use PCR methodology [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Amino acid sequence fragments or variants of Apo-2 ligand can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the Apo-2 ligand DNA, or by synthesis of the desired Apo-2 ligand polypeptide. Such fragments or variants represent insertions, substitutions, and/or deletions of residues within or at one or both of the ends of the intracellular region, the transmembrane region, or the extracellular region (such as the 114-281 amino acid form), or of the amino acid sequence shown for the full-length Apo-2 ligand in Figure 1. Any combination of insertion, substitution, and/or deletion can be made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses, for instance, a desired biological activity or apoptotic activity as defined herein. In a preferred embodiment, the fragments or variants have at least about 80% amino acid sequence identity, more preferably, at least about 90% sequence identity, and even more preferably, at least 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity with the sequences identified herein for the intracellular, transmembrane, or extracellular domains of Apo-2 ligand, or the full-length sequence for Apo-2 ligand. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the Apo-2 ligand, such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

Variations in the Apo-2 ligand sequence as described above can be made using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth in U.S. Pat. No. 5,364,934. These include oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis.

Scanning amino acid analysis can be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant. [Cunningham et al., *Science*, 244:1081 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., NY); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)].

Particular Apo-2L variants of the present invention include those Apo-2L polypeptides which include one or more of the recited substitutions provided in TABLE I below. Such Apo-2L variants will typically comprise a non-naturally occurring amino acid sequence which differs from a native sequence Apo-2L (such as provided in Figure 1; for a full length or mature form of Apo-2L or an extracellular domain sequence thereof) in at least one or more amino acids. Optionally, the one or more amino acids which differ in the Apo-2L variant as compared to a native sequence Apo-2L will comprise amino acid substitution(s) such as those indicated in Table I. Apo-2L variants of the invention include soluble Apo-2L variants comprising residues 91-281, 92-281, 95-281 or 114-281 of Figure 1 and having one or more amino acid substitutions recited in TABLE I. Preferred Apo-2L variants will include those variants comprising residues 91-281, 92-281, 95-281 or 114-281 of Figure 1 and having one or more amino acid substitutions recited in TABLE I, and which further have a desired biological activity, such as described herein.

Variations in the Apo-2 ligand sequence also included within the scope of the invention relate to amino-terminal derivatives or modified forms. Such Apo-2 ligand sequences include any of the Apo-2 ligand variants described herein having a methionine or modified methionine (such as formyl methionyl or other blocked methionyl species) at the N-terminus of the polypeptide sequence.

The nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) encoding native or variant Apo-2 ligand may be inserted into a replicable vector for further cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and

WO 03/029420

PCT/US02/31210

a transcription termination sequence, each of which is described below. Optional signal sequences, origins of replication, marker genes, enhancer elements and transcription terminator sequences that may be employed are known in the art and described in further detail in WO97/25428.

Expression and cloning vectors usually contain a promoter that is recognized by the host organism and is operably linked to the Apo-2 ligand variant nucleic acid sequence. Promoters are untranslated sequences located upstream (5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription and translation of a particular nucleic acid sequence, such as the Apo-2 ligand variant nucleic acid sequence, to which they are operably linked. Such promoters typically fall into two classes, inducible and constitutive. Inducible promoters are promoters that initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, e.g., the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. At this time a large number of promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. These promoters are operably linked to Apo-2 ligand variant encoding DNA by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the isolated promoter sequence into the vector. Both the native Apo-2 ligand promoter sequence and many heterologous promoters may be used to direct amplification and/or expression of the Apo-2 ligand DNA.

Promoters suitable for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are known in the art, and are described in further detail in WO97/25428.

A preferred method for the production of Apo-2L in *E. coli* employs an inducible promoter for the regulation of product expression. The use of a controllable, inducible promoter allows for culture growth to the desirable cell density before induction of product expression and accumulation of significant amounts of product which may not be well tolerated by the host.

Three inducible promoter systems (T7 polymerase, trp and alkaline phosphatase (AP)) have been evaluated by Applicants for the expression of Apo-2L (form 114-261). The use of each of these three promoters resulted in significant amounts of soluble, biologically active Apo-2L trimer being recovered from the harvested cell paste. The AP promoter is preferred among these three inducible promoter systems tested because of tighter promoter control and the higher cell density and titers reached in harvested cell paste.

Construction of suitable vectors containing one or more of the above-listed components employs standard ligation techniques. Isolated plasmids or DNA fragments are cleaved, tailored, and re-ligated in the form desired to generate the plasmids required.

For analysis to confirm correct sequences in plasmids constructed, the ligation mixtures can be used to transform *E. coli* K12 strain 294 (ATCC 31,446) and successful transformants selected by ampicillin or tetracycline

WO 03/029420

PCT/US02/31210

resistance where appropriate. Plasmids from the transformants are prepared, analyzed by restriction endonuclease digestion, and/or sequenced using standard techniques known in the art. [See, e.g., Messing et al., Nucleic Acids Res., 9:309 (1981); Maxam et al., Methods in Enzymology, 65:499 (1980)].

Expression vectors that provide for the transient expression in mammalian cells of DNA encoding Apo-2 ligand variant may be employed. In general, transient expression involves the use of an expression vector that is able to replicate efficiently in a host cell, such that the host cell accumulates many copies of the expression vector and, in turn, synthesizes high levels of a desired polypeptide encoded by the expression vector [Sambrook et al., *supra*]. Transient expression systems, comprising a suitable expression vector and a host cell, allow for the convenient positive identification of polypeptides encoded by cloned DNAs, as well as for the rapid screening of such polypeptides for desired biological or physiological properties. Thus, transient expression systems are particularly useful in the invention for purposes of identifying analogs and variants of Apo-2 ligand that are biologically active.

Other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of Apo-2 ligand variant in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes for this purpose include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, *Enterobacteriaceae* such as *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescans*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. Preferably, the host cell should secrete minimal amounts of proteolytic enzymes.

E. coli is the preferred host cell for use in the present invention. *E. coli* is particularly well suited for the expression of Apo-2 ligand (form 114-281), a polypeptide of under 20kd in size with no glycosylation requirement. As a production host, *E. coli* can be cultured to relatively high cell density and is capable of producing relatively high levels of heterologous proteins.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for Apo-2 ligand-encoding vectors. Suitable host cells for the expression of glycosylated Apo-2 ligand are derived from multicellular organisms. Examples of all such host cells, including CHO cells, are described further in WO97/25428.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

Host cells are transfected and preferably transformed with the above-described expression or cloning vectors for Apo-2 ligand production and cultured in nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

Transfection refers to the taking up of an expression vector by a host cell whether or not any coding sequences are in fact expressed. Numerous methods of transfection are known to the ordinarily skilled artisan, for example, CaPO_4 and electroporation. Successful transfection is generally recognized when any indication of the operation of this vector occurs within the host cell.

Transformation means introducing DNA into an organism so that the DNA is replicable, either as an extrachromosomal element or by chromosomal integrant. Depending on the host cell used, transformation is done using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook et al., *supra*, or electroporation is generally used for prokaryotes or other cells that contain substantial cell-wall barriers. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. In addition, plants may be transfected using ultrasound treatment as described in WO 91/00358 published 10 January 1991.

For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978) may be employed. General aspects of mammalian cell host system transformations have been described in U.S. Pat. No. 4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130:946 (1977) and Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, e.g., polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) and Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

Prokaryotic cells used to produce Apo-2 ligand variant may be cultured in suitable culture media as described generally in Sambrook et al., *supra*. Mammalian host cells used to produce Apo-2 ligand may be cultured in a variety of culture media.

Examples of commercially available culture media include Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ("DMEM", Sigma). Any such media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium

WO 03/029420

PCT/US02/31210

chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleosides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GentamycinTM drug), trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

In general, principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of mammalian cell cultures can be found in Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

Optionally, the Apo-2 ligand polypeptide compositions described herein include divalent metal ions such as Zinc. The presence of divalent metal ions in the methods and formulations described herein may protect against disulfide bond formation. It appears that inclusion of divalent metal ions during the process of synthesis and assembly of Apo-2L trimers may further improve accumulation and recovery of properly folded, homotrimeric Apo-2L. Accordingly, in accordance with another aspect of the present invention, one or more divalent metal ions will typically be added to or included in the culture media for culturing or fermenting the host cells. The divalent metal ions are preferably present in or added to the culture media at a concentration level sufficient to enhance storage stability, enhance solubility, or assist in forming stable Apo-2L trimers coordinated by one or more zinc ions. The amount of divalent metal ions which may be added will be dependent, in part, on the host cell density in the culture or potential host cell sensitivity to such divalent metal ions. At higher host cell densities in the culture, it may be beneficial to increase the concentration of divalent metal ions. If the divalent metal ions are added during or after product expression by the host cells, it may be desirable to adjust or increase the divalent metal ion concentration as product expression by the host cells increases. It is generally believed that trace levels of divalent metal ions which may be present in typical commonly available cell culture media may not be sufficient for stable trimer formation. Thus, addition of further quantities of divalent metal ions is preferred.

The divalent metal ions are preferably added to the culture media at a concentration which does not adversely or negatively affect host cell growth, if the divalent metal ions are being added during the growth phase of the host cells in the culture. In shake flask cultures, it was observed that ZnSO₄ added at concentrations of greater than 1 mM can result in lower host cell density. Those skilled in the art appreciate that bacterial cells can sequester metal ions effectively by forming metal ion complexes

WO 03/029420

PCT/US02/31210

with cellular matrices. Thus, in the cell cultures, it is preferable to add the selected divalent metal ions to the culture media after the growth phase (after the desired host cell density is achieved) or just prior to product expression by the host cells. To ensure that sufficient amounts of divalent metal ions are present, additional divalent metal ions may be added or fed to the cell culture media during the product expression phase.

The divalent metal ion concentration in the culture media should not exceed the concentration which may be detrimental or toxic to the host cells. In the methods of the invention employing the host cell, *E. coli*, it is preferred that the concentration of the divalent metal ion concentration in the culture media does not exceed about 1mM (preferably, $\leq$ 1mM). Even more preferably, the divalent metal ion concentration in the culture media is about 50 micromolar to about 250 micromolar. Most preferably, the divalent metal ion used in such methods is zinc sulfate. It is desirable to add the divalent metal ions to the cell culture in an amount wherein the metal ions and Apo-2 ligand trimer can be present at a one to one molar ratio.

The divalent metal ions can be added to the cell culture in any acceptable form. For instance, a solution of the metal ion can be made using water, and the divalent metal ion solution can then be added or fed to the culture media.

In one embodiment of the invention, the selected Apo-2L variant is expressed in *E. coli*, and during the culturing or fermentation of the cell culture, the process parameters are set such that cellular activities are conducted at oxygen uptake rates of approximately 1.0 to 3.0 mmoles/L-min for cultures at approximately 40-50 gm/L dry cell weight. It is preferred that the newly synthesized nascent Apo-2L polypeptides have sufficient time for proper protein folding and trimerization of Apo-2L monomers. The growth phase of the fermentation process is preferably conducted at 30°C. Just prior to the commencement of product expression, the process temperature control set-point may remain at 30°C or be down-shifted to 25°C for the rest of the fermentation. Optionally, it may be desired to increase cell density in the cell culture, and the above-mentioned parameters may be adjusted (or increased) accordingly. For instance, it may be advantageous to increase cell density in the cell culture to increase volumetric yield. One skilled in the art can, by using routine techniques known in the art, incrementally increase the cell density and incrementally increase the above-mentioned parameters, if desired.

Expression of the Apo-2L may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or in situ hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Various labels may be employed, most commonly radioisotopes, and

WO 03/029420

PCT/US02/31210

particularly ^{32}P . However, other techniques may also be employed, such as using biotin-modified nucleotides for introduction into a polynucleotide. The biotin then serves as the site for binding to avidin or antibodies, which may be labeled with a wide variety of labels, such as radionucleotides, fluorescers or enzymes. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. With immunohistochemical staining techniques, a cell sample is prepared, typically by dehydration and fixation, followed by reaction with labeled antibodies specific for the gene product coupled, where the labels are usually visually detectable, such as enzymatic labels, fluorescent labels, luminescent labels, and the like.

Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native Apo-2 ligand polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to Apo-2 ligand DNA and encoding a specific antibody epitope.

Apo-2 ligand preferably is recovered from the culture medium as a secreted polypeptide, although it also may be recovered from host cell lysates when directly produced without a secretory signal. If the Apo-2 ligand is membrane-bound, it can be released from the membrane using a suitable detergent solution (e.g. Triton-X 100) or its extracellular region may be released by enzymatic cleavage.

When Apo-2 ligand is produced in a recombinant cell other than one of human origin, the Apo-2 ligand is free of proteins or polypeptides of human origin. However, it is usually necessary to recover or purify Apo-2 ligand from recombinant cell proteins or polypeptides to obtain preparations that are substantially homogeneous as to Apo-2 ligand. As a first step, the culture medium or lysate may be centrifuged to remove particulate cell debris. Apo-2 ligand thereafter is purified from contaminant soluble proteins and polypeptides, with the following procedures being exemplary of suitable purification procedures: by fractionation on an ion-exchange column; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE or CM; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for example, Sephadex G-75; diafiltration and protein A Sepharose columns to remove contaminants such as IgG.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

In a preferred embodiment, the Apo-2 ligand can be isolated by affinity chromatography. Apo-2 ligand fragments or variants in which residues have been deleted, inserted, or substituted are recovered in the same fashion as native Apo-2 ligand, taking account of any substantial changes in properties occasioned by the variation. For example, preparation of an Apo-2 ligand fusion with another protein or polypeptide, e.g., a bacterial or viral antigen, facilitates purification; an immunoaffinity column containing antibody to the antigen can be used to adsorb the fusion polypeptide.

A protease inhibitor such as phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) also may be useful to inhibit proteolytic degradation during purification, and antibiotics may be included to prevent the growth of adventitious contaminants. One skilled in the art will appreciate that purification methods suitable for native Apo-2 ligand may require modification to account for changes in the character of Apo-2 ligand or its variants upon expression in recombinant cell culture.

During any such purification steps, it may be desirable to expose the recovered Apo-2L to a divalent metal ion-containing solution or to purification material (such as a chromatography medium or support) containing one or more divalent metal ions. In a preferred embodiment, the divalent metal ions and/or reducing agent is used during recovery or purification of the Apo-2L. Optionally, both divalent metal ions and reducing agent, such as DTT or BME, may be used during recovery or purification of the Apo-2L. It is believed that use of divalent metal ions during recovery or purification will provide for stability of Apo-2L trimer or preserve Apo-2L trimer formed during the cell culturing step.

A preferred method of recovering and purifying the expressed Apo-2L from prokaryotic host cells (most preferably from bacterial host cells) comprises the following steps: (a) extracting Apo-2L (intracellular) from *E. coli* cells; (b) stabilizing the properly folded Apo-2L in a buffer solution comprising divalent metal ions and/or reducing agent; (c) purifying the Apo-2L by chromatography using, sequentially, a cationic exchanger, a hydroxyapatite and a hydrophobic interaction chromatograph, and (d) selectively eluting Apo-2L in a buffer solution comprising divalent metal ions and/or reducing agent from each such chromatographic support. The divalent metal ions and the reducing agent utilized in such methods may include a Zn sulfate, Zn chloride, Co sulfate, DTT and BME, and more preferably, a Zn sulfate or DTT.

The description below also relates to methods of producing Apo-2 ligand variants covalently attached (hereinafter "conjugated") to one or more chemical groups. Chemical groups suitable for use in an Apo-2L conjugate of the present invention are preferably not significantly toxic or immunogenic. The chemical group is optionally selected to produce an

WO 03/029420

PCT/US02/31210

Apo-2L variant conjugate that can be stored and used under conditions suitable for storage. A variety of exemplary chemical groups that can be conjugated to polypeptides are known in the art and include for example carbohydrates, such as those carbohydrates that occur naturally on glycoproteins, and non-proteinaceous polymers, such as polyols (see, e.g., U.S. Patent No. 6,245,901).

A polyol, for example, can be conjugated to polypeptides such as an Apo-2L variant at one or more amino acid residues, including lysine residues, as is disclosed in WO 93/00109, *supra*. The polyol employed can be any water-soluble poly(alkylene oxide) polymer and can have a linear or branched chain. Suitable polyols include those substituted at one or more hydroxyl positions with a chemical group, such as an alkyl group having between one and four carbons. Typically, the polyol is a poly(alkylene glycol), such as poly(ethylene glycol) (PEG), and thus, for ease of description, the remainder of the discussion relates to an exemplary embodiment wherein the polyol employed is PEG and the process of conjugating the polyol to a polypeptide is termed "pegylation." However, those skilled in the art recognize that other polyols, such as, for example, poly(propylene glycol) and polyethylene-polypropylene glycol copolymers, can be employed using the techniques for conjugation described herein for PEG.

The average molecular weight of the PEG employed in the pegylation of the Apo-2L variant can vary, and typically may range from about 500 to about 30,000 daltons (D). Preferably, the average molecular weight of the PEG is from about 1,000 to about 25,000 D, and more preferably from about 2,000 to about 5,000 D. In one embodiment, pegylation is carried out with PEG having an average molecular weight of about 2,000 D. Preferably, the PEG homopolymer is unsubstituted, but it may also be substituted at one end with an alkyl group. Preferably, the alkyl group is a C1-C4 alkyl group, and most preferably a methyl group. PEG preparations are commercially available, and typically, those PEG preparations suitable for use in the present invention are nonhomogeneous preparations sold according to average molecular weight. For example, commercially available PEG(5000) preparations typically contain molecules that vary slightly in molecular weight, usually ± 500 D.

The Apo-2 ligand variants of the invention may be in monomer form or trimer form (comprising three monomers). Optionally, an Apo-2L variant trimer will be pegylated in a manner such that a PEG molecule is linked or conjugated to each of the three monomers that make up the trimeric Apo-2L variant. In such an embodiment, it is preferred that the PEG employed have an average molecular weight of about 2,000 to about 5,000 D. It is also contemplated that the Apo-2L variant trimers may be "partially" pegylated, i.e., wherein only one or two of the three monomers that make up the trimer are linked or conjugated to PEG. In such a "partially" pegylated Apo-2L

WO 03/029420

PCT/US02/31210

variant, it is preferred that the PEG employed have an average molecular weight of about 5,000 D or greater than 5,000 D.

A variety of methods for pegylating proteins are known in the art. Specific methods of producing proteins conjugated to PEG include the methods described in U.S. Pat. No. 4,179,337, U.S. Pat. No. 4,935,465 and U.S. Patent No. 5,849,535. Typically the protein is covalently bonded via one or more of the amino acid residues of the protein to a terminal reactive group on the polymer, depending mainly on the reaction conditions, the molecular weight of the polymer, etc. The polymer with the reactive group(s) is designated herein as activated polymer. The reactive group selectively reacts with free amino or other reactive groups on the protein. The PEG polymer can be coupled to the amino or other reactive group on the protein in either a random or a site specific manner. It will be understood, however, that the type and amount of the reactive group chosen, as well as the type of polymer employed, to obtain optimum results, will depend on the particular protein or protein variant employed to avoid having the reactive group react with too many particularly active groups on the protein. As this may not be possible to avoid completely, it is recommended that generally from about 0.1 to 1000 moles, preferably 2 to 200 moles, of activated polymer per mole of protein, depending on protein concentration, are employed. The final amount of activated polymer per mole of protein is a balance to maintain optimum activity, while at the same time optimizing, if possible, the circulatory half-life of the protein.

While the residues may be any reactive amino acids on the protein, such as the N-terminal amino acid group, preferably the reactive amino acid is cysteine, which is linked to the reactive group of the activated polymer through its free thiol group as shown, for example, in WO 99/03887, WO 94/12219, WO 94/22466, U.S. Patent No. 5,206,344, U.S. Patent No. 5,166,322, and U.S. Patent No. 5,206,344. Alternatively the reactive group is lysine, which is linked to the reactive group of the activated polymer through its free epsilon-amino group, or glutamic or aspartic acid, which is linked to the polymer through an amide bond. This reactive group can then react with, for example, the α and ϵ amines of proteins to form a covalent bond. Conveniently, the other end of the PEG molecule can be "blocked" with a non-reactive chemical group, such as a methoxy group, to reduce the formation of PEG-crosslinked complexes of protein molecules.

Suitable activated PEGs can be produced by a number of conventional reactions. For example, a N-hydroxysuccinimide ester of a PEG (M-NHS-PEG) can be prepared from PEG-monomethyl ether (which is commercially available from Union Carbide) by reaction with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and N-hydroxysuccinimide (NHS), according to the method of Buckmann and Merr, Makromol. Chem., **182**:1379-1384 (1981). In addition, a PEG terminal hydroxy group can be converted to an amino group, for example, by reaction

WO 03/029420

PCT/US02/31210

with thionyl bromide to form PEG-Br, followed by aminolysis with excess ammonia to form PEG-NH₂. The PEG-NH₂ is then conjugated to the protein of interest using standard coupling reagents, such as Woodward's Reagent K. Furthermore, a PEG terminal -CH₂ OH group can be converted to an aldehyde group, for example, by oxidation with MnO₂. The aldehyde group is conjugated to the protein by reductive alkylation with a reagent such as cyanoborohydride. Alternatively, activated PEGs suitable for use in the present invention can be purchased from a number of vendors. For example, Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala.) sells methoxy-PEG-maleimide, MW 2,000, in addition to a succinimidyl carbonate of methoxy-PEG and methoxy-PEG succinimidyl propionate.

The degree of pegylation of Apo-2L variant of the present invention can be adjusted to provide a desirably increased *in vivo* half-life (hereinafter "half-life"), compared to the corresponding non-pegylated Apo-2L variant. It is believed that the half-life of a pegylated Apo-2L variant typically increases incrementally with increasing degree of pegylation. The degree and sites of pegylation of a protein are determined, e.g., by (1) the number and reactivities of pegylation sites (e.g., primary amines) and (2) pegylation reaction conditions. As some of the pegylation sites in a protein are likely to be relatively unreactive, standard pegylation reactions typically result in less than complete pegylation.

Standard mutagenesis techniques can be used to alter the number of potential pegylation sites in a protein. Thus, to the extent that amino acid substitutions introduce or replace amino acids such as cysteine and lysine, Apo-2L variants of the present invention can contain a greater or lesser number of potential pegylation sites than native sequence Apo-2L (shown in Figure 1). The degree and sites of pegylation can also be manipulated by adjusting reaction conditions, such as the relative concentrations of the activated PEG and the protein as well as the pH. Suitable conditions for a desired degree of pegylation can be determined empirically by varying the parameters of standard pegylation reactions.

Pegylation of Apo-2L variants, such as R170C, is carried out by any convenient method. In an exemplary embodiment, the Cys170 side chain of R170C-Apo2L.0 (i.e., a variant Apo-2L having amino acids 114-281 of Figure 1 and a cysteine residue substituted for the native arginine residue at position 170; such a molecule may alternatively be identified herein as "R170C.0") is covalently modified by reaction with methoxy-PEG-maleimide, MW 2,000 D (Shearwater Polymers). Briefly, R170C-Apo2L.0 is prepared for modification by first reducing with 10 mM DTT at ambient temperature for about 30 minutes followed by passage over a PD-10 gel filtration column, equilibrated and eluted with HIC buffer (0.45 M Na₂SO₄, 25 mM Tris-HCl pH 7.5), to remove the reducing agent. An aliquot of a PEG-maleimide solution (10 mM in dH₂O) is then added immediately. Conditions of time and reagent

WO 03/029420

PCT/US02/31210

concentration necessary to ensure complete reaction can be determined empirically. Molar concentration ratios of PEG-maleimide to R170C-Apo2L.0 monomer ranging from 0.5 to 5-fold and reaction times of 2 or 24 hours can be used. The reactions are terminated by addition of a 10-fold molar excess of iodoacetamide, relative to the R170C-Apo2L.0 monomer concentration, such that any unpegylated Cys170 thiol becomes carboxyamidomethylated. Modification with iodoacetamide is for about 30 minutes and then the excess reagents are removed by gel filtration on a NAP-5 column (Pharmacia) equilibrated and eluted with PBS.

The pegylated proteins can be characterized by SDS-PAGE, gel filtration, NMR, peptide mapping, liquid chromatography-mass spectrophotometry, and in vitro biological assays. The extent of pegylation is typically first shown by SDS-PAGE. Polyacrylamide gel electrophoresis in 10% SDS is typically run in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl as elution buffer. To demonstrate which residue is pegylated, peptide mapping using proteases such as trypsin and Lys-C protease can be performed. Thus, samples of pegylated and non-pegylated R170C-Apo2L.0 can be digested with a protease such as Lys-C protease and the resulting peptides separated by a technique such as reverse phase HPLC. The chromatographic pattern of peptides produced can be compared to a peptide map previously determined for the Apo-2L.0 polypeptide. Each peak can then be analyzed by mass spectrometry to verify the size of the fragment in the peak. The fragment(s) that carried PEG groups are usually not retained on the HPLC column after injection and disappear from the chromatograph. Such disappearance from the chromatograph is an indication of pegylation on that particular fragment that should contain at least one pegylatable amino acid residue. Pegylated Apo-2L variants may further be assayed for ability to interact with an Apo-2L receptor and/or induce apoptosis in mammalian cells and/or other biological activities using known methods in the art.

Formulations comprising such Apo-2 ligand variant polypeptides are also provided by the present invention. It is believed that such formulations will be particularly suitable for storage (and maintain Apo-2L trimerization), as well as for therapeutic administration. Optional formulations will comprise Apo-2L variants and zinc or cobalt. More preferably, the formulation will comprise an Apo-2L variant and zinc or cobalt solution in which the metal is at a <2X molar ratio to the protein. If an aqueous suspension is desired, the divalent metal ion in the formulation may be at a >2X molar ratio to the protein. Those skilled in the art will appreciate that at a >2X molar ratio, there may be an upper range of concentration of the divalent metal ion in the formulation at which the metal can become deleterious to the formulation or would be undesirable as a therapeutic formulation.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

The formulations may be prepared by known techniques. For instance, the Apo-2L variant formulation may be prepared by buffer exchange on a gel filtration column.

Typically, an appropriate amount of a pharmaceutically-acceptable salt is used in the formulation to render the formulation isotonic. Examples of pharmaceutically-acceptable carriers include saline, Ringer's solution and dextrose solution. The pH of the formulation is preferably from about 6 to about 9, and more preferably from about 7 to about 7.5. Preferably, the pH is selected so as to ensure that the zinc remains bound to the Apo-2L. If the pH is too high or too low, the zinc does not remain bound to the Apo-2L variant and as a result, dimers of Apo-2L variant will tend to form. It will be apparent to those persons skilled in the art that certain carriers may be more preferable depending upon, for instance, the route of administration and concentrations of Apo-2 ligand variant and divalent metal ions.

Therapeutic compositions of the Apo-2L variant can be prepared by mixing the desired Apo-2L variant molecule having the appropriate degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations, aqueous solutions or aqueous suspensions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are preferably nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as Tris, HEPES, PIPES, phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG).

Additional examples of such carriers include ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, serum proteins, such as human serum albumin, buffer substances such as glycine, sorbic acid, potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, water, salts, or electrolytes such as protamine sulfate, disodium hydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, sodium chloride, colloidal silica, magnesium trisilicate, polyvinyl pyrrolidone, and cellulose-based substances. Carriers for topical or gel-based forms include polysaccharides such as

WO 03/029420

PCT/US02/31210

sodium carboxymethylcellulose or methylcellulose, polyvinylpyrrolidone, polyacrylates, polyoxyethylene-polyoxypropylene-block polymers, polyethylene glycol, and wood wax alcohols. For all administrations, conventional depot forms are suitably used. Such forms include, for example, microcapsules, nano-capsules, liposomes, plasters, inhalation forms, nose sprays, sublingual tablets, and sustained-release preparations.

Effective dosages of Apo-2 ligand variant in the formulations may be determined empirically, and making such determinations is within the skill in the art. It is presently believed that an effective dosage or amount of Apo-2 ligand variant may range from about 1 microgram/kg to about 100 mg/kg of body weight or more per day. Interspecies scaling of dosages can be performed in a manner known in the art, e.g., as disclosed in Mordenti et al., Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991). Those skilled in the art will understand that the dosage of Apo-2 ligand variant that must be administered will vary depending on, for example, the mammal which will receive the Apo-2 ligand variant, the route of administration, and other drugs or therapies being administered to the mammal.

Apo-2L variants to be used for *in vivo* administration should be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to or following lyophilization and reconstitution. Apo-2L variant ordinarily will be stored in lyophilized form or in solution if administered systemically. If in lyophilized form, Apo-2L variant is typically formulated in combination with other ingredients for reconstitution with an appropriate diluent at the time for use. An example of a liquid formulation of Apo-2L variant is a sterile, clear, colorless unpreserved solution filled in a single-dose vial for subcutaneous injection.

Therapeutic Apo-2L variant formulations generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle. The formulations are preferably administered as repeated intravenous (i.v.), subcutaneous (s.c.), intramuscular (i.m.) injections or infusions, or as aerosol formulations suitable for intranasal or intrapulmonary delivery (for intrapulmonary delivery see, e.g., EP 257,956).

Apo-2L variants can also be administered in the form of sustained-release preparations. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the protein, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (e.g., poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) as described by Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) and Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982) or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919, EP 58,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-

WO 03/029420

PCT/US02/31210

glutamate (Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), non-degradable ethylene-vinyl acetate (Langer et al., *supra*), degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the Lupron Depot (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988).

The Apo-2L variants and its formulations described herein can be employed in a variety of therapeutic and non-therapeutic applications. Among these applications are methods of treating various cancers (provided above), immune related conditions, and viral conditions. Such therapeutic and non-therapeutic applications are described, for instance, in WO97/25428, WO97/01633, WO 01/00832, and WO 01/22987.

The Apo2L variants described herein are useful in treating various pathological conditions, such as immune related diseases or cancer. Diagnosis in mammals of the various pathological conditions described herein can be made by the skilled practitioner. Diagnostic techniques are available in the art which allow, e.g., for the diagnosis or detection of cancer or immune related disease in a mammal. For instance, cancers may be identified through techniques, including but not limited to, palpation, blood analysis, x-ray, NMR and the like. Immune related diseases can also be readily identified. In systemic lupus erythematosus, the central mediator of disease is the production of auto-reactive antibodies to self proteins/tissues and the subsequent generation of immune-mediated inflammation. Multiple organs and systems are affected clinically including kidney, lung, musculoskeletal system, mucocutaneous, eye, central nervous system, cardiovascular system, gastrointestinal tract, bone marrow and blood. Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic autoimmune inflammatory disease that mainly involves the synovial membrane of multiple joints with resultant injury to the articular cartilage. The pathogenesis is T lymphocyte dependent and is associated with the production of rheumatoid factors, auto-antibodies directed against self IgG, with the resultant formation of immune complexes that attain high levels in joint fluid and blood. These complexes in the joint may induce the marked infiltrate of lymphocytes and monocytes into the synovium and subsequent marked synovial changes; the joint space/fluid if infiltrated by similar cells with the addition of numerous neutrophils. Tissues affected are primarily the joints, often in symmetrical pattern. However, extra-articular disease also occurs in two major forms. One form is the development of extra-articular lesions with ongoing progressive joint disease and typical lesions of pulmonary fibrosis, vasculitis, and cutaneous ulcers. The second form of extra-articular disease is the so called Felty's syndrome which occurs late in the RA disease course, sometimes after joint disease has become quiescent, and involves the presence of neutropenia, thrombocytopenia and splenomegaly. This can be accompanied by vasculitis in multiple organs with formations of infarcts,

WO 03/029420

PCT/US02/31210

skin ulcers and gangrene. Patients often also develop rheumatoid nodules in the subcutis tissue overlying affected joints; the nodules late stage have necrotic centers surrounded by a mixed inflammatory cell infiltrate. Other manifestations which can occur in RA include: pericarditis, pleuritis, coronary arteritis, interstitial pneumonitis with pulmonary fibrosis, keratoconjunctivitis sicca, and rheumatoid nodules.

The Apo2L variants can be administered in accord with known methods, such as intravenous administration as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. Optionally, administration may be performed through mini-pump infusion using various commercially available devices.

Effective dosages and schedules for administering Apo2L variants may be determined empirically, and making such determinations is within the skill in the art. Single or multiple dosages may be employed. It is presently believed that an effective dosage or amount of Apo2L variants used alone may range from about 1 µg/kg to about 100 mg/kg of body weight or more per day. Interspecies scaling of dosages can be performed in a manner known in the art, e.g., as disclosed in Mordenti et al., *Pharmaceut. Res.*, 8:1351 (1991).

When *in vivo* administration of an Apo2L variant is employed, normal dosage amounts may vary from about 10 ng/kg to up to 100 mg/kg of mammal body weight or more per day, preferably about 1 µg/kg/day to 10 mg/kg/day, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature; see, for example, U.S. Pat. Nos. 4,657,760; 5,206,344; or 5,225,212. It is anticipated that different formulations will be effective for different treatment compounds and different disorders, that administration targeting one organ or tissue, for example, may necessitate delivery in a manner different from that to another organ or tissue. Those skilled in the art will understand that the dosage of Apo2L variant that must be administered will vary depending on, for example, the mammal which will receive the Apo2L variant, the route of administration, and other drugs or therapies being administered to the mammal.

It is contemplated that yet additional therapies may be employed in the methods. The one or more other therapies may include but are not limited to, administration of radiation therapy, cytokine(s), growth inhibitory agent(s), chemotherapeutic agent(s), cytotoxic agent(s), tyrosine kinase inhibitors, ras farnesyl transferase inhibitors, angiogenesis inhibitors, and cyclin-dependent kinase inhibitors which are known in the art and defined further with particularity in Section I above. In addition, therapies based on therapeutic antibodies that target tumor antigens such as

WO 03/029420

PCT/US02/31210

RituxanTM or HerceptinTM as well as anti-angiogenic antibodies such as anti-VEGF, or antibodies that target Apo2L receptors, such as DR5 or DR4.

Preparation and dosing schedules for chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). The chemotherapeutic agent may precede, or follow administration of the Apo2L variant, or may be given simultaneously therewith.

It may be desirable to also administer antibodies against other antigens, such as antibodies which bind to CD20, CD11a, CD18, CD40, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, vascular endothelial factor (VEGF), or other TNFR family members (such as DR4, DR5, OPG, TNFR1, TNFR2). Alternatively, or in addition, two or more antibodies binding the same or two or more different antigens disclosed herein may be co-administered to the patient. Sometimes, it may be beneficial to also administer one or more cytokines to the patient. In one embodiment, the Apo2L variants herein are co-administered with a growth inhibitory agent. For example, the growth inhibitory agent may be administered first, followed by an Apo2L variant of the present invention.

The Apo2L variant (and one or more other therapies) may be administered concurrently or sequentially. Following administration of Apo2L variant, treated cells *in vitro* can be analyzed. Where there has been *in vivo* treatment, a treated mammal can be monitored in various ways well known to the skilled practitioner. For instance, tumor cells can be examined pathologically to assay for necrosis or serum can be analyzed for immune system responses.

An article of manufacture such as a kit containing Apo-2L variants useful for the diagnosis or treatment of the disorders described herein comprises at least a container and a label. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, and test tubes. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds an Apo-2L variant formulation that is effective for diagnosing or treating the condition and may have a sterile access port (for example, the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The label on, or associated with, the container indicates that the formulation is used for diagnosing or treating the condition of choice. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution, and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with

WO 03/029420

PCT/US02/31210

instructions for use. The article of manufacture may also comprise a second or third container with another active agent as described above.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way. All patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of these cells identified in the following examples, and throughout the specification, by ATCC accession numbers is the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

EXAMPLE 1

Crystallography Analysis of Apo-2L

Crystals of Apo-2L (amino acid residues 114-281) were grown in 70uL sitting drops containing 40uL protein (at 2.6 mg/mL in 20 mM Tris, pH8.0), 20uL 50 mM Tris pH 8.0, and 10uL 8% peg 2K MME over a well solution of 50% peg 2K MME at 20° C and were members of the spacegroup P63 with two monomer in the asymmetric unit and unit cell constants $a=72.5$, $c=140$ Angstrom and diffract to 3.9 Angstrom at room temperature. Crystals of D218A variant grew in 14 uL sitting drops containing 4 uL of 4% MPD and 10 uL protein (1.7 mg/mL in 20 mM Tris pH 7.5) over a well solution of 32% MPD at 4° C and were members of the spacegroup R32 with one monomer per asymmetric unit and unit cell parameters $a=66.4$, $c=197.7$ Angstrom and diffracted to 1.3 Angstrom at -180° C with synchrotron radiation. Data sets diffracting to 3.9 Angstrom for the Apo-2L (residues 114-281) crystals and 1.9 Angstrom for the D218A variant were measured on a Rigaku rotating anode x-ray generator equipped with a MAR detector and processed with DENZO/SCALEPACK [Otwinowski et al., Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing (eds. Sawyer et al.) pp.56-62 Daresbury Laboratory, Daresbury, England, 1993]. A 1.3 Angstrom data set for the D218A variant was measured at the Advanced Photon Source at Argonne National Labs and was processed with HKL2000/SCALEPACK and had a R_{sym} of 6.4% (34% in the 1.35-1.30 shell), with 100% completeness and a redundancy of 12-fold, and $I/\langle I \rangle = 12.4$.

The native Apo-2L structure was solved by molecular placement using a model based on TNF-alpha (pdb code 1TNF) with the program Amore [Acta Cryst., D50:760-763 (1994)] and was refined [Brunger, X-PLOR: version 3.1, Yale Press, New Haven 1987] with strict 2-fold non-crystallographic restraints until a R_{free} of 35%. This structure refined against the 1.9 Angstrom dataset until a R_{free} of 25% and finally was refined against 1.3 Angstrom data with Refmac and SHELXL [Sheldrick et al., Methods in Enzymology, pp. 319-343, Academic Press, San Diego 1997] of R_{free} = 22% and

WO 03/029420

PCT/US02/31210

R_{factor} of 20% with good geometry (rmsd bonds 0.011 Angstrom, rmsd angle 1.7°). All residues fall within the allowed regions of a Ramachandran plot. During refinement, a 2 σ peak of electron density was observed between symmetry related Cys230 on the trimer axis. This density was modeled as a zinc ion and refined with B-factor of 10. It is believed that a chlorine molecule on the trimer axis is present as the fourth ligand to the zinc. The final model consists of residues 120-130, 142-194, 203-281 with 170 solvent molecules and one zinc ion and one chloride ion. Residues 91-119, 131-141, and 195-202 are disordered. N-terminal sequencing of several crystals confirmed that the N-terminus is intact while mass spectrometry of the starting material shows that it is full length.

A summary of the crystallographic data is provided in Figure 2C.

EXAMPLE 2

Design and production of Apo2L cysteine substitution variants

Sites for cysteine substitution were chosen on the basis of examination of the x-ray structure of the DR5•Apo2L complex (Figure 3). To avoid loss of activity upon mutation or subsequent modification of the introduced cysteine residue, only sites outside of the receptor contact region were considered for mutagenesis. In order to ensure efficient chemical modification of the cysteine side chain, only residues that displayed high solvent accessibility in the crystal structure were selected. Residues that matched these criteria include, but are not limited to, Val114, Arg115, Glu116, Asn134, Asn140, Glu144, Asn152, Ser153, Arg170, Asp234, Glu249, Arg255, Glu263 and His264. As shown in Figure 3, this set of residues spans one face of the Apo2L monomer from top to bottom.

Cysteine substitution variants of Apo-2L were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:488-492 (1985); Kunkel, *Methods in Enzymology*, 154:367-382 (1987)) on the single-stranded form of the plasmid pAPOK5.0. This plasmid was designed for the intracellular *E. coli* expression of the 114-281 amino acid form of Apo2L driven by the tryptophan (trp) promoter. pAPOK5.0 was constructed from pAPOK5 (WO 99/36535 published July 22, 1999) by deletion mutagenesis of the DNA segment encoding residues 91-113 of Apo-2L (Figure 1). pAPOK5 was constructed by using PCR to clone the Apo-2L cDNA (encoding residues 91-281 of Figure 1) into plasmid pS1162 which carries the trp promoter. After mutagenesis, the identity of the plasmids was confirmed by dideoxynucleotide sequencing (Sanger) of the entire Apo2L portion of the plasmid.

Plasmids encoding the cysteine-substituted proteins were then transformed into *E. coli* strain 294 for expression. Cultures were grown overnight to saturation at 37°C in Luria broth plus carbenicillin at 50 µg/mL. The saturated cultures were subsequently seeded at a 50-fold

WO 03/029420

PCT/US02/31210

dilution into sterile-filtered media comprised of Na_2HPO_4 (6 g/L), KH_2PO_4 (3 g/L), NaCl (0.5 g/L), NH_4Cl (1 g/L), glucose (4.9 g/L), Casamino acids (4.9 g/L), 27 mM MgSO_4 , 0.003% Thiamine HCl and q.s. with distilled water plus carbenicillin at 40 $\mu\text{g/mL}$. The cultures were grown at 37°C until the A500 was 0.5 - 0.8 and then expression was induced by addition of 3- α -indoleacrylic acid (IAA) (Sigma, St. Louis, MO) to a final concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$. Cells were grown overnight at 30°C with shaking, harvested by centrifugation and stored frozen at -20°C for subsequent recovery of Apo2L as described below.

The Apo-2L proteins were extracted from the frozen *E. coli* cell pellets by homogenization in 10 volumes (wt/vol) of 100mM Tris, pH8.0/200mM NaCl /5mM EDTA/1mM DTT using a model M110-F Microfluidizer (Microfluidics Corporation, Newton, MA). Polyethylenimine (PEI) was added to a final concentration of 0.5% (vol/vol) to the homogenate which was then centrifuged to remove cell debris. Solid ammonium sulfate was added to the extraction supernatant to a final concentration of 45% saturation at ambient temperature with stirring, and the pellet was recovered by centrifugation. The ammonium sulfate pellet was washed with 50% ammonium sulfate solution to remove residual EDTA, then resuspended in 50 volumes (wt/vol) of 50mM HEPES, pH 7.5/0.1% Triton X-100. The resulting solution was clarified by centrifugation and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using a 5 mL HiTrap Chelating Sepharose column (Pharmacia, Piscataway, NJ). The column was charged with nickel in 100mM NiSO_4 /300mM Tris, pH7.5 and equilibrated with 350mM NaCl in phosphate-buffered saline (PBS). After loading, the column was washed with 350mM NaCl in PBS and eluted with 50mM Imidazole/350mM NaCl in PBS. The IMAC eluent was dialyzed against 20mM Tris, pH7.5, clarified by centrifugation, and further purified by cation exchange chromatography using a 5mL HiTrap SP Sepharose column (Pharmacia), which was equilibrated and washed with 20mM Tris, pH7.5. The HiTrap SP column was eluted with 20mM Tris, pH7.5/0.5M NaCl . The SP column eluent was reduced with 2mM DTT and subsequently precipitated by adding solid ammonium sulfate with stirring to a final concentration of 45% saturation at ambient temperature. The ammonium sulfate pellet was resuspended in 3.5 mL of 20mM Tris, pH7.5/100mM NaCl and exchanged into the final buffer of 20mM Tris, pH7.5/100mM NaCl /2mM DTT by gel filtration chromatography using a PD10 column (Pharmacia). The purified Apo-2L cysteine-substituted proteins were characterized by Coomassie-stained SDS-PAGE and mass spectroscopy, and stored frozen at -20°C.

EXAMPLE 3

Apoptotic activity of Apo2L variants *in vitro*

A bioassay which measures cell viability from the metabolic conversion of a fluorescent dye was used to determine the apoptotic

WO 03/029420

PCT/US02/31210

activity of Apo2L variants. Serial 2-fold dilutions of Apo-2L.0, Apo2L.2, or Apo2L variants were made in RPMI-1640 media (Gibco) containing 0.1% BSA, and 50 μ L of each dilution was transferred to individual wells of 96-well Falcon tissue culture microplates. 50 μ L of SK-MES-1 human lung carcinoma cells (ATCC HTB58) (in RPMI-1640, 0.1% BSA) were added at a density of 2×10^4 cells/well. These mixtures were incubated at 37°C for 24 hours. At 20 hours, 25 μ L of alamarBlue (AccuMed, Inc., Westlake, Ohio) was added. Cell number was determined by measuring the relative fluorescence at 590 nm upon excitation at 530 nm. These data were analyzed by using a 4 parameter fit to calculate ED₅₀, the concentration of Apo2L.0 giving a 50% reduction in cell viability.

Of the cysteine-substituted Apo2L variants tested, E116C had a significant (>2-fold) reduction in apoptotic activity on SK-MES cells (Table I). The R170C variant had about a 10-fold increased potency. The increased activity of the R170C variant appears to be related to oxidation of Cys170 during incubation in the bioassay media. In this assay, the protein is diluted in the assay media with concomitant dilution of the reducing agent (2 mM DTT) included in the storage buffer. A decrease in the concentration of the reducing agent could allow disulfide bonds to form. Prior alkylation of Cys170 with N-ethylmaleimide (NEM) (Table I) or iodoacetamide (Figure 4) blocked the activity increase. In addition, Apo2L variants having Arg170 replaced with either Ala, Lys, or Ser residues had activities more comparable to the Apo-2L.0 polypeptide.

WO 03/029420 PCT/US02/31210
 Table I. Effect Of Apo2L Cysteine Substitutions On Apoptosis-Inducing Activity.

Variant	ED50 ratio
Apo2L.2	15.3
S96C.2	21.1
S101C.2	8.7
S111C.2	2.1
V114C	1.4
R115C	1.2
E116C	3.5
N134C	0.7
N140C	0.7
E144C	1.5
N152C	1.0
S153C	1.3
R170C	0.1
R170C-NEM	1.1
R170K	1.0
R170S	0.4
K179C	1.2
D234C	1.5
E249C	1.6
R255C	1.9
E263C	0.6
H264C	2.1
S96C.2-PEG-2K	51
S101C.2-PEG-2K	14.4
S111C.2-PEG-2K	5.1
V114C-PEG-2K	2.1
R115C- PEG-2K	14.3
E116C- PEG-2K	ND
N134C- PEG-2K	134
N140C- PEG-2K	38
E144C- PEG-2K	7
N152C- PEG-2K	17.1
S153C- PEG-2K	65
R170C- PEG-2K	5.2
K179C-PEG-2K	1.9
D234C- PEG-2K	43
E249C- PEG-2K	13.2
R255C- PEG-2K	ND
E263- PEG-2K	23
H264C- PEG-2K	54

WO 03/029420

PCT/US02/31210

"ND" = Not Determined; All of the Apo-2 ligand variants were produced as the 114-281 form of the protein (Apo2L.0) except for variants S96C.2, S101C.2, and S111C.2 which were produced from the 91-281 form of the protein ("Apo2L.2").

The potential for formation of disulfide bonds between R170C-Apo-2L.0 trimers was further examined by measuring the kinetics of air oxidation. A portion of a 1.4 mg/mL solution of R170C-Apo-2L.0, stored in the presence of 2 mM DTT, was passed over a PD-10 column equilibrated with HIC buffer (0.45 M Na₂SO₄, 25 mM Tris-HCl pH 7.5) in order to remove the DTT. This solution (3.5 mL of 1.1 mg/mL R170C-Apo2L.0) was incubated at ambient temperature in a 15 mL Falcon tube with gentle agitation. Aliquots were removed at varied times and any solvent accessible thiols remaining on R170C-Apo-2L.0 were alkylated with a 10-fold molar excess of iodoacetamide. The first time point was at 3 minutes because this is the amount of time required to elute the protein from the PD-10 column. These samples were assayed for bioactivity on SK-MES cells as described above and were also characterized for molecular weight by size exclusion chromatography with multi-angle light scattering detection (SEC-MALS). Chromatography was performed by using a Superdex 200 column (1.6 x 30 cm), equilibrated and eluted with PBS, operated on a FPLC system equipped with both a UV detector and a light scattering detector (Wyatt Technology, Inc.).

As shown in Figure 5, with only 3 minutes of air oxidation R170C-Apo-2L.0 is found predominantly in the trimeric form with a calculated molecular weight of 70,000 D. At 2 hours, significant amounts of higher molecular weight forms are found. The three peaks at 2 hours have calculated molecular weights of 70,000, 140,000 and 600,000 D. After 24 hours of air oxidation most of the R170C-Apo2L.0 is found as the 600,000 D molecular weight species. A further 24 hour incubation does not result in production of species greater than 600,000 D. Upon SDS-PAGE, the higher molecular weight forms migrate as disulfide-linked dimers. These results suggest that the R170C-Apo2L.0 protein forms oligomeric species in which trimers are linked together via disulfide bonds. The 140,000 D form corresponds to 2 trimers joined together whereas the 600,000 D form has 8-10 trimers covalently linked. Upon denaturation in SDS, these oligomers are resolved into disulfide-linked dimers. After 24 hours of air oxidation, R170C-Apo2L.0 gave a nearly 20-fold decreased ED50 on SK-MES cells in the apoptosis bioassay. The time course of the increase in bioactivity is concomitant with the accumulation of oligomeric forms (Figure 6). Oligomerization through Cys170 disulfide bonds also results in increased affinity for the DR5 receptor.

These results suggest that oligomerization of Apo2L in a fashion that does not preclude receptor binding yields a molecule which produces a more

WO 03/029420

PCT/US02/31210

potent death signal on tumor cells. However, oligomerization through Cys170 may render the molecule toxic to some normal cells. In certain *in vitro* testing on human or cynomolgous monkey hepatocytes, oxidized R170C-Apo2L.0 was more toxic than Apo2L.0 (Figure 7).

EXAMPLE 4

Pegylation of Apo-2L on Cys residues

Cysteine-substituted Apo2L proteins were covalently modified by reaction with methoxy-PEG-maleimide, MW 2,000 D (Shearwater Polymers). The Apo2L variants were prepared for modification by first removing the DTT contained in the storage buffer by passage over a PD-10 gel filtration column. The column was equilibrated and eluted with HIC buffer (0.45 M Na₂SO₄, 25 mM Tris-HCl pH 7.5), or arginine formulation buffer (0.5 M Arg-succinate, 20 mM Tris-HCl pH 7.5). An aliquot of a PEG-maleimide solution (10 mM in dH₂O) was added immediately. Initial experiments used the R170C variant to determine the reaction time and reagent concentration necessary to ensure complete reaction. Molar concentration ratios of PEG-maleimide to R170C-Apo2L.0 monomer of 1:1, 2:1, 5:1 or 10:1 and reaction times of 2 or 24 hours were used. The reactions were terminated by addition of DTT to 2mM, followed by a 30 minute incubation at ambient temperature, and then iodoacetamide was added to 10mM. This quenching procedure ensured that any disulfide bonds formed during the reaction procedure were reduced and any unpegylated Cys170 thiol became carboxyamidomethylated. Modification with iodoacetamide was for 30 minutes and then the excess reagents were removed by gel filtration on a NAP-5 column (Pharmacia) equilibrated and eluted with PBS. These samples were analyzed by SDS-PAGE and SEC-MALS. Apoptosis-inducing activity on SK-MES cells was also assayed as described above. As shown in Figure 8, SDS-PAGE indicates an approximately 2000 Dalton shift in the monomer molecular weight upon treatment of R170C-Apo2L.0 with PEG-2K-maleimide. Reactions using PEG:protein ratios of 2:1 or greater gave a similar extent of modification. For these reactions, residual unmodified monomer was observed. Visual inspection of the Coomassie blue-stained gel suggests that unmodified monomer accounts for <10% of the total protein. At PEG:protein molar ratios less than 2:1, less modification was obtained. The reactions appeared to go to completion within 2 hours since no apparent change in the product was observed with a 24 hour reaction time.

The hydrodynamic properties of PEGylated R170C-Apo2L.0 were evaluated by SEC-MALS as described above except that the running buffer used for the Superdex 200 column was 0.4 M ammonium sulfate, 15 mM sodium phosphate pH 6.5. Use of this higher ionic strength buffer reduces interaction of Apo2L with the column material. R170C-Apo2L.0 having Cys170 blocked with iodoacetamide eluted as a single, symmetrical peak centered at 10.65 mL with a molar mass calculated from light scattering as 60,000 g/mol. PEG-

WO 03/029420

PCT/US02/31210

2K-R170C-Apo2L.0, prepared using a 2:1 PEG ratio and 2 hour reaction time, also eluted as a single, symmetrical peak, but with an elution volume of 9.25 mL and a calculated molar mass of 69,000 g/mol. Taken together with the results from SDS-PAGE these data suggest that this sample has 3 covalently attached PEG chains per trimer with 1 PEG chain per monomer. The calculated molar mass of PEG-2K-R170C-Apo2L.0 (69,000 D) agrees with the expected mass (66,000 D) given the standard error ($\pm 10\%$) in the measurement. This trimeric form of APO-2L having 3 covalently attached PEG chains per trimer with 1 PEG chain per monomer yields a complex represents a preferred embodiment of the invention by exhibiting a number of coexisting optimal characteristics including a significant bioactivity profile and a MW_{app} that is greater than the kidney filtration cutoff. Apparent molecular weights of 50,000 D for IAM-R170C-Apo2L.0 and 100,000 D for PEG-2K-R170C-Apo2L.0 were calculated on the basis of the relative elution volume. A series of proteins of known molecular weight were used to construct a calibration curve relating elution volume to apparent molecular weight. IAM-R170C-Apo2L.0, and also unmodified Apo2L.0, gave molecular weights somewhat smaller than expected but consistent with the compact shape of the trimer. The larger apparent molecular weight calculated for PEG-2K-R170C-Apo2L.0 results from the hydrophilic and extended PEG chain causing a large increase in the hydrodynamic radius of the modified protein.

On the basis of the above results, initial PEGylation experiments with the other cysteine-substituted variants used a 2:1 molar ratio of PEG to monomer and a 2 hour reaction time. These reaction conditions usually produced trimers having 3 attached PEG chains. However, the V114C and R115C variants were found in the experiment to be poorly reactive and required higher PEG ratios and longer reaction times to get a more complete reaction. The R255C variant could not be modified even with higher PEG ratios and longer reaction times. Modification experiments were not performed on the E116C variant.

Many of the cysteine-substituted proteins displayed decreased bioactivity (Table I) when PEGylated as described above. The decrease in bioactivity ranged from 2.1-fold for PEG-V114C to 134-fold for PEG-N134C. R170C-Apo2L.0 retained a relatively high level of activity upon PEGylation, and because the modification proceeded rapidly to completion at low PEG:protein ratios, this variant was chosen for further study.

For production of larger amounts of PEG-R170C-Apo2L.0, a 2:1 molar ratio of PEG:Apo2L monomer and a 24 hour reaction time was used. 70 mg of R170C-Apo2L.0 was gel filtered and then reacted with PEG-maleimide at ambient temperature for 24 hours. The reaction was quenched with a 10-fold molar excess of iodoacetamide and then protein was separated from free PEG by gel filtration chromatography on a column of Sephadex G-25 equilibrated with formulation buffer (Arg-succinate). This preparation had lot number

WO 03/029420 **PCT/US02/31210**
 32176-87C. Purified PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C) displayed binding affinities for DR4, DR5, DcR1, DcR2, and OPG equivalent to that measured for Apo2L.0 (Table II).

Table II. Receptor binding affinities measured for PEG-R170C-Apo2L.0 by ELISA

EC50 (ng/mL)					
Sample	DcR1	DcR2	OPG	DR4	DR5
Apo2L.0	10.8	6.0	85.2	94.3	42.3
PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C)	12.4	4.8	55.7	42.2	43.8
PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-78)	2.7	0.8	6.7	4.5	9.0

PEG-R170C-Apo2L.0 (32176-87C) was then analyzed by mass spectroscopy and peptide mapping. MALDI-TOF-MS (Figure 10) indicated the presence of a small amount of unmodified monomer (MW=19,440) and a major peak corresponding to protein having a single attached PEG. PEG molecules are well known to have mass heterogeneity, differing in molecular weight by increments of the polymer unit ethylene glycol (MW=44). As a consequence, a broad mass range centered about 21,680 is observed for the protein with a single PEG attached. The difference in average mass between the pegylated and non-pegylated R170C-Apo2L.0 indicates that the average mass of the PEG is 2200 D.

The site of PEG attachment was confirmed by peptide mapping. Samples of pegylated and non-pegylated R170C-Apo2L.0 were digested with Lys-C protease and the resulting peptides were separated by reverse phase HPLC (Figure 11). The pattern of peptides produced was compared to the map previously determined for Apo2L.0. A peptide labeled L4, produced by cleavage after Lys150 and Lys179, contains the Cys170 residue in the digest of R170C-Apo2L.0. This peak disappears and is replaced by a broad, later eluting peak (L4*), in the pegylated protein. A MALDI-TOF mass spectrum of this fraction shows a series of peaks separated by 44 Da with a distribution of 1.9-2.6 kDa higher than the predicted peptide mass. Further analysis by in-source fragmentation in MALDI-TOF confirmed L4* as the 151-179 peptide modified on Cys170 with PEG. In contrast to these results, the L10 peptide (225-233) shows a similar peak area in both unmodified and pegylated R170C-Apo2L.0. This indicates that the native Cys230 residue, which is buried and participates in chelation of the zinc ion, is not modified by PEG-maleimide. Significant modification of other functional groups, such as the side chains of Lys residues, was not observed. Taken together with the SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrum of

WO 03/029420 PCT/US02/31210
the intact protein, these data suggest that each monomer has one PEG attached on Cys170. Under native conditions, the R170C-Apo2L.0 trimer would thus have 3 attached PEG molecules.

EXAMPLE 5

Pharmacokinetics of PEG-R170C-Apo2L.0

The effect of PEGylation on the clearance of Apo2L was tested in the mouse. Mice were given tail vein injections of Apo2L.0 (10 mg/kg) or PEG-R170C-Apo2L.0 (10 mg/kg) at time zero. Plasma samples were collected at 1, 20, 40, 60, and 80 minutes. Apo2L concentrations were determined by ELISA.

As shown in Figure 12, Apo2L.0 was rapidly cleared from the circulation whereas PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) was cleared more slowly. At 60 minutes after injection, the plasma concentration of Apo2L.0 was less than 1% of the concentration at 1 minute. In contrast, the plasma concentration of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) only decreased by 50% in this time period. Site-specific attachment of PEG-2000 to Apo2L thus resulted in a significant decrease in the rate of clearance.

EXAMPLE 6

Effect of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) on the growth of human COLO205 tumors in a mouse xenograft model

Athymic nude mice (Jackson Laboratories) were injected subcutaneously with 5×10^6 COLO205 human colon carcinoma cells (NCI). Tumors were allowed to form and grow to a volume of about 150 mm³ as judged by caliper measurement. Mice (8 per group) were given i.v. injections of vehicle (2x/week), Apo2L.0 (60 mg/kg, 2x/week), Apo2L.0 (10 mg/kg, 2x/week), or PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) (10 mg/kg, 2x/week). Tumor volume was measured every third day and treatment was stopped after two weeks. As shown in Figure 13, treatment with 10 mg/kg PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) caused a greater reduction in tumor volume than an equivalent dose of Apo2L.0. The anti-tumor effect of 10 mg/kg PEG-R170C-Apo2L.0(32176-87C) was similar to that observed for the higher dose (60 mg/kg) of Apo2L.0. PEGylation of Apo2L on Cys170 lowers the dose required to achieve efficacy in this xenograft model of human cancer.

EXAMPLE 7

Preparation of partially PEGylated and disulfide crosslinked R170C-Apo2L.0

As described above, overnight air oxidation of R170C-Apo2L.0 yields a 600,000 D molecular weight species that has significantly increased *in vitro* bioactivity on SK-MES cells. However, preliminary results show that this higher molecular weight form does not have a significantly increased half-life in mice. Also, oxidized R170C-Apo2L.0 does not have increased anti-tumor activity in the mouse xenograft model and appears to be toxic towards some normal hepatocytes. In an effort to combine the increased

WO 03/029420

PCT/US02/31210

bioactivity of the disulfide-linked form with the slower clearance of PEGylated Apo2L, PEGylation experiments were conducted using substoichiometric ratios of PEG-maleimide:R170C-Apo2L.0 monomer. This should allow both crosslinking and PEGylation on the same molecule.

R170C-Apo2L.0 (95 mg) was prepared for the PEGylation reaction by removing the DTT on a Sephadex G-25 column equilibrated in HIC buffer. methoxy-PEG-maleimide, MW 2,000 D (Shearwater Polymers) was added to a final ratio of 0.75:1 PEG:R170C-Apo2L.0-monomer. The monomer concentration was 55 μ M. This solution was incubated overnight at ambient temperature and then the reaction was quenched by addition of iodoacetamide to 100 μ M. Excess reagents were removed, and the buffer was exchanged, by gel filtration of the modified protein on a Sephadex G-25 column equilibrated with arginine-succinate formulation buffer. This material is designated PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) and displayed increased receptor affinity (Table II) and in vitro bioactivity (Figure 14).

The hydrodynamic properties of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) were examined by gel filtration chromatography as described above for lot 32176-87C except that the column was equilibrated and eluted with PBS. PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) elutes from the column in 3 main peaks (Figure 15). The first peak has a calculated molecular weight of 315,000 D and accounts for 30% of the material injected. The second peak has a calculated molecular weight of 194,000 D and represents 23% of the total. The third peak has a calculated molecular weight of 108,000 D and accounts for 46% of the total mass. Analysis by SDS-PAGE indicates that all three peaks contain PEGylated monomers as well as disulfide-linked dimers. The ratios of these components suggests that Peak 3 is predominately composed of fully PEGylated trimer, Peak 2 appears to be mostly "hexamer" - 2 trimers joined via a disulfide bond -, and Peak 1 is a "nonamer" having 3 trimers joined via disulfide bonds. A schematic diagram of the hexameric form is shown in Figure 16. Peak 1 has the highest activity in the apoptosis assay giving a relative potency of 50. Peak 2 gave a relative potency of 17 and peak 1 had a relative potency of 3.

The pharmacokinetics of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) in the mouse were determined as described above for lot 32176-87C except that plasma samples were taken at 10 minutes, and 1, 2, 4, 8, and 24 hours. Plasma concentrations of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) are plotted in Figure 17. Analysis of these data according to a two compartment model (Table III) shows that PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) has a 48-fold increased half-life and a 15-fold decreased rate of clearance relative to Apo2L.0.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

Table III. Analysis of pharmacokinetic data according to a two compartment model

Parameter	Apo2L.0	PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78)
AUC (µg*hour/mL)	18.6	283
K10(hour ⁻¹)	12.5	0.258
K12(hour ⁻¹)	0.53	0.166
Cmax (µg/mL) Observed	87.4	67.3
Cmax (µg/mL) Predicted	232	73
Cl (mL/hour/kg)	536	35.3
Vc (mL/kg)	43.0	137
Vss (mL/kg)	66.5	244
K10 half-life(hour)	0.056	2.69

PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) was tested in the mouse xenograft model as described above with the following modifications: 1) All injections were made i.p.; 2) PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) injections were made 2x/week at 1, 3, or 10 mg/kg for 2 weeks; 3) Apo2L.0 injections were made 5x/week at 60 mg/kg or 2x/week at 10 mg/kg, both for 2 weeks. As shown in Figure 18, all three doses of PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) caused complete tumor regression in all 8 animals of each group. Tumor volume was reduced to zero and maintained at that level after treatment was stopped. Both doses of Apo2L.0 caused a reduction in tumor volume but did not cause complete tumor regression in all treated animals. In the three groups of PEG-R170C-Apo2L.0 treatment, none of the animals had tumors after completion of the dosing regimen. There was a dose response in that the higher doses gave a faster elimination of the tumors. The groups treated with Apo2L.0 gave a smaller % of loss of tumors and tumors began to regrow upon cessation of treatment in 8/8 animals given the 60 mg/kg dose and 4/6 that received the 10 mg/kg dose. In the PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) treated groups, tumors took longer to reappear and grew slowly. In the 1, 3, and 10 mg/kg PEG-R170C-Apo2L.0(32176-78) treatment groups tumors reappeared in 2/7, 4/8, and 3/8 animals, respectively. These data show that partially PEGylated and crosslinked R170C-Apo2L.0 has a greater anti-tumor effect at a lower dose than observed with unmodified Apo2L.0.

The effects of lot nos. 32176-78 and 32176-87C of PEG-R170C-Apo2L.0 on normal hepatocytes from cynomolgous monkeys are compared in Figure 19. Lot 32176-87C showed little toxicity towards hepatocytes but lot 32176-78 displayed some toxicity at intermediate, but not high, concentration. It is believed this concentration dependence is consistent with toxicity resulting from a higher order clustering of receptors on the cell surface.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

EXAMPLE 8Preparation of PEGylated K179C-Apo2L.0

Pharmacokinetic and efficacy experiments were also performed with a cysteine variant having a decreased tendency towards oligomerization. The K179C variant (prepared as described in the above Examples) was chosen for these experiments since this variant in its native form has comparable activity to the wild-type (native) Apo-2 ligand molecule and preliminary pegylation studies indicated only a 2-fold loss in activity upon Cys179 modification (see Table I). This variant did not appear to readily form disulfide-linked oligomers (data not shown). K179C-Apo2L.0 (40 mg) was concentrated to 8 mg/mL and reduced with 10 mM DTT for 2 hours at ambient temperature. The reducing agent was removed by gel filtration on a PD-10 column equilibrated with arginine-succinate formulation buffer. Protein concentration was determined by absorbance measurements and then 2K-methoxyPEG-maleimide was added to a final molar concentration ratio of 5:1 PEG:Apo2L monomer. This mixture was incubated overnight at ambient temperature and then the reaction was quenched by adding DTT to 5 mM. After 90 minutes, the reducing agent was blocked by addition of iodoacetamide to a concentration of 20 mM. Alkylation was allowed to proceed for 60 minutes and then the mixture was exchanged into arginine-succinate formulation buffer on a PD-10 column.

The hydrodynamic properties of 2K PEG-K179C-Apo2L.0 were examined by SEC-MALS on a Superdex 200 column equilibrated and eluted with PBS. 2K PEG-K179C-Apo2L.0 eluted as a single peak of elution volume (11.8 mL) with a calculated molar mass of 85,000 (Figure 23). Earlier eluting peaks were not detected, suggesting an absence of disulfide-linked oligomers in this preparation. PEGylation resulted in an increased apparent molecular weight since the iodoacetamide-modified form of K179C-Apo2L.0 eluted at 13.4 mL with a calculated molar mass of 70,000.

Apoptosis-inducing activity on SK-MES cells was measured for 2K PEG-K179C-Apo2L.0 as described in the Examples above. The PEGylated protein was highly active with only a 9-fold reduction in bioactivity relative to unmodified Apo2L.0 (Figure 24).

The effect of 2K PEG-K179C-Apo2L.0 on the growth of human COLO205 tumors was determined by using the mouse xenograft model described above (Example 6). Mice (8 per group) were given intraperitoneal injections of vehicle (5x/week), Apo2L.0 (60 mg/kg, 5x/week), or PEG-K179C-Apo2L.0 (60 mg/kg, 1x/week). Plasma samples were taken at 1 minute and 24 hours after the first injection. Apo2L concentrations in these samples were determined by ELISA. As shown in Figure 25, a much higher fraction of the injected dose was retained in the plasma after 24 hours for the PEGylated protein as compared to Apo2L.0. The tumor volume in the mice was measured every third day and treatment was stopped after two weeks. As shown in Figure 26, the

WO 03/029420

PCT/US02/31210

1x/week dosing of PEG-K179C-Apo2L.0 caused a larger reduction in mean tumor volume than 5x/week treatment with Apo2L.0.

WO 03/029420

PCT/US02/31210

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.
2. An isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding the Apo-2 ligand variant of claim 1.
3. A vector comprising the nucleic acid of claim 2.
4. A host cell comprising the vector of claim 3.
5. The host cell of claim 4 wherein said host cell is *E. coli*, a yeast cell or CHO cell.
6. A method of making Apo-2 ligand variant polypeptide, comprising the steps of: providing a host cell comprising the vector of claim 4; (b) providing culture media; (c) culturing the host cell in the culture media under conditions sufficient to express the Apo-2 ligand variant polypeptide; (d) recovering the Apo-2 ligand variant polypeptide from the host cell or culture media; and (e) purifying the Apo-2 ligand variant polypeptide.
7. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 1, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide is conjugated or linked to one or more polyol groups that increase the actual molecular weight of the Apo-2 ligand variant polypeptide.
8. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 1, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide is conjugated or linked to one or more polyol groups that increase the *in vivo* half-life of the Apo-2 ligand variant polypeptide.
9. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 7, wherein the one or more polyol groups is poly(ethylene glycol).
10. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 9, where the Apo-2 ligand variant polypeptide is conjugated or linked to one molecule of poly(ethylene glycol) having a molecular weight of about 2000 Daltons.
11. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 1, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide is a soluble, extracellular domain Apo-2 ligand polypeptide.
12. An isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C;

WO 03/029420

PCT/US02/31210

E263C; H264C, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

13. An isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide induces apoptosis in one or more mammalian cells.

14. An isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding the Apo-2 ligand variant of claim 12.

15. A vector comprising the nucleic acid of claim 14.

16. A host cell comprising the vector of claim 15.

17. The host cell of claim 16 wherein said host cell is *E. coli*, a yeast cell or CHO cell.

18. A method of making Apo-2 ligand variant polypeptide, comprising the steps of: providing a host cell comprising the vector of claim 15; (b) providing culture media; (c) culturing the host cell in the culture media under conditions sufficient to express the Apo-2 ligand variant polypeptide; (d) recovering the Apo-2 ligand variant polypeptide from the host cell or culture media; and (e) purifying the Apo-2 ligand variant polypeptide.

19. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 12, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide is conjugated or linked to one or more polyol groups that increase the actual molecular weight of the Apo-2 ligand variant polypeptide.

20. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 12, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide is conjugated or linked to one or more polyol groups that increase the *in vivo* half-life of the Apo-2 ligand variant polypeptide.

21. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 19, wherein the one or more polyol groups is poly(ethylene glycol).

22. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 21, where the Apo-2 ligand variant polypeptide is conjugated or linked to one molecule of poly(ethylene glycol) having a molecular weight of about 2000 Daltons.

23. The Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 12, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide is a soluble, extracellular domain Apo-2 ligand polypeptide.

24. A composition comprising an Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has

WO 03/029420

PCT/US02/31210

one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

25. A composition comprising an Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more polyol groups conjugated or linked to an amino acid substitution at the following residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179; D234; E249; R255; E263; H264.

26. A composition comprising an Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more polyol groups conjugated or linked to an amino acid substitution at the following residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

27. The composition of claim 24 wherein the one or more polyol groups is polyethylene glycol.

28. The composition of claim 27 wherein the polyethylene glycol has a molecular weight of about 1,000 to about 25,000 Daltons.

29. The composition of claim 28 wherein the polyethylene glycol has a molecular weight of about 2,000 Daltons.

30. A composition comprising an Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

31. A composition comprising an Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more polyol groups conjugated or linked to an amino acid substitution at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179; D234; E249; R255; E263; H264, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide

WO 03/029420

PCT/US02/31210

binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

32. A composition comprising an Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more polyol groups conjugated or linked to an amino acid substitution at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

33. The composition of claim 30 wherein the one or more polyol groups is polyethylene glycol.

34. The composition of claim 33 wherein the polyethylene glycol has a molecular weight of about 1,000 to about 25,000 Daltons.

35. The composition of claim 34 wherein the polyethylene glycol has a molecular weight of about 2,000 Daltons.

36. An Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more amino acid substitutions at the following residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179; D234; E249; R255; E263; H264.

37. An Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

38. An Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

39. An Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the

WO 03/029420

PCT/US02/31210

residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide induces apoptosis in one or more mammalian cells.

40. The Apo-2 ligand trimer of claim 36, wherein the trimer comprises at least two of said Apo-2 ligand variant polypeptides.

41. The Apo-2 ligand trimer of claim 36, wherein the Apo-2 ligand trimer comprises three of said Apo-2 ligand variant polypeptides.

42. An Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

43. An Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more polyol groups conjugated or linked to an amino acid substitution at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

44. The Apo-2 ligand trimer of claim 42, wherein the trimer comprises three of said Apo-2 ligand variant polypeptides conjugated or linked to one or more polyol groups.

45. The Apo-2 ligand trimer of claim 42 wherein the one or more polyol groups is polyethylene glycol.

46. The Apo-2 ligand trimer of claim 45 wherein the polyethylene glycol has a molecular weight of about 1,000 to about 25,000 Daltons.

47. The Apo-2 ligand trimer of claim 46 wherein the polyethylene glycol has a molecular weight of about 2,000 Daltons.

48. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 42, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide induces apoptosis in one or more mammalian cells.

49. An isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more amino acid substitutions at a residue position identified from an x-ray crystal

WO 03/029420

PCT/US02/31210

structure of the DR5•Apo2L complex as shown in Figure 3 such that the residue position is:

(a) outside of the receptor contact region of the DR5•Apo2L complex as shown in Figure 3; and

(b) displays high solvent accessibility in the crystal structure of the DR5•Apo2L complex as shown in Figure 3.

50. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 49, wherein the residue position is located on one face of the Apo2L monomer from top to bottom as shown in the crystal structure of the DR5•Apo2L complex as shown in Figure 3.

51. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 49, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; D234; E249; R255; E263; H264.

52. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 49, wherein the isolated Apo-2 ligand variant polypeptide is conjugated or linked to one or more polyol groups.

53. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 52, wherein the one or more polyol groups is polyethylene glycol.

54. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 53, wherein the polyethylene glycol has a molecular weight of about 1,000 to about 25,000 Daltons.

55. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 54, wherein the polyethylene glycol has a molecular weight of about 2,000 Daltons.

56. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 49, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

57. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 49, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide induces apoptosis in one or more mammalian cells.

58. An isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) by having an amino acid substitution at a residue position in Figure 1 (SEQ ID NO:1) selected from the group consisting of S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; and H264C.

59. A composition comprising an Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to a polyethylene glycol group having a molecular weight of about 2,000 Daltons, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and the

WO 03/029420

PCT/US02/31210

polyethylene glycol group is conjugated or linked to a residue position in Figure 1 (SEQ ID NO:1) selected from the group consisting of S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; and H264C.

60. An Apo-2 ligand trimer comprising three Apo-2 ligand variant polypeptides conjugated or linked to a polyethylene glycol group having a molecular weight of about 2,000 Daltons, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptides comprise an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and the polyethylene glycol group is conjugated or linked to a residue position in Figure 1 (SEQ ID NO:1) selected from the group consisting of S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; and H264C.

61. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 60, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

62. The isolated Apo-2 ligand variant polypeptide of claim 60, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide induces apoptosis in one or more mammalian cells.

63. A pharmaceutical composition comprising an effective amount of isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; and H264C, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.

64. A pharmaceutical composition comprising an effective amount of a composition comprising an Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; and H264C, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the composition binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

65. A pharmaceutical composition comprising an effective amount of Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more amino acid substitutions at the following residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116;

WO 03/029420

PCT/US02/31210

N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179; D234; E249; R255; E263; and H264, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.

66. The pharmaceutical composition of claim 63, wherein said pharmaceutical composition further comprises one or more divalent metal ions.

67. The pharmaceutical composition of claim 63, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide induces apoptosis in one or more mammalian cells.

68. A method of inducing apoptosis in mammalian cells comprising exposing mammalian cells expressing a receptor selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor to a therapeutically effective amount of isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

69. A method of inducing apoptosis in mammalian cells comprising exposing mammalian cells expressing a receptor selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor to a therapeutically effective amount of a composition comprising Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more polyol groups conjugated or linked to an amino acid substitution at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179; D234; E249; R255; E263; H264.

70. A method of inducing apoptosis in mammalian cells comprising exposing mammalian cells expressing a receptor selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor to a therapeutically effective amount of Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

71. The method of claim 68 wherein the mammalian cells are colon or colorectal cancer cells.

72. A method of treating cancer in a mammal, comprising administering to said mammal an effective amount of isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from

WO 03/029420

PCT/US02/31210

the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

73. A method of treating cancer in a mammal, comprising administering to said mammal an effective amount of a composition comprising Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more polyol groups conjugated or linked to an amino acid substitution at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179; D234; E249; R255; E263; H264, wherein the composition binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

74. A method of treating cancer in a mammal, comprising administering to said mammal an effective amount of Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

75. The method of claim 72, wherein said cancer is lung cancer, breast cancer, colon cancer or colorectal cancer.

76. A method of treating an immune-related disease in a mammal comprising administering to said mammal an effective amount of isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

77. A method of treating an immune-related disease in a mammal comprising administering to said mammal an effective amount of a composition comprising Apo-2 ligand variant polypeptide conjugated or linked to one or more polyol groups, wherein the Apo-2 ligand variant polypeptide comprises an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more polyol groups conjugated or linked to an amino acid substitution at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96; S101; S111; V114; R115; E116; N134; N140; E144; N152; S153; R170; K179;

WO 03/029420

PCT/US02/31210

D234; E249; R255; E263; H264, wherein the composition binds to a polypeptide selected from the group consisting of DR4 receptor and DR5 receptor.

78. A method of treating an immune-related disease in a mammal comprising administering to said mammal an effective amount of Apo-2 ligand trimer comprising at least one Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

79. The method of claim 76, wherein said immune-related disease is arthritis or multiple sclerosis.

80. A method of preparing an Apo-2 ligand oligomer, comprising linking at least two Apo-2 ligand trimers, wherein at least one Apo-2 ligand monomer in each Apo-2 ligand trimer comprises an Apo-2 ligand variant polypeptide having a cysteine amino acid substitution at amino acid residue position 170 in Figure 1 (SEQ ID NO:1), and wherein the Apo-2 ligand trimers are linked by disulfide bonds between the cysteine amino acid residues at position 170 in the Apo-2 ligand variant polypeptides.

81. An Apo-2 ligand oligomer comprising at least two Apo-2 ligand trimers, wherein at least one Apo-2 ligand monomer in each Apo-2 ligand trimer comprises an Apo-2 ligand variant polypeptide having a cysteine amino acid substitution at amino acid residue position 170 in Figure 1 (SEQ ID NO:1), and wherein the Apo-2 ligand trimers are linked by disulfide bonds between the cysteine amino acid residues at position 170 in the Apo-2 ligand variant polypeptides.

82. A kit, comprising a container and, within the container, an isolated Apo-2 ligand variant polypeptide comprising an amino acid sequence which differs from the native sequence Apo-2 ligand polypeptide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1) and has one or more of the following amino acid substitutions at the residue position(s) in Figure 1 (SEQ ID NO:1): S96C; S101C; S111C; V114C; R115C; E116C; N134C; N140C; E144C; N152C; S153C; R170C; R170K; R170S; K179C; D234C; E249C; R255C; E263C; H264C.

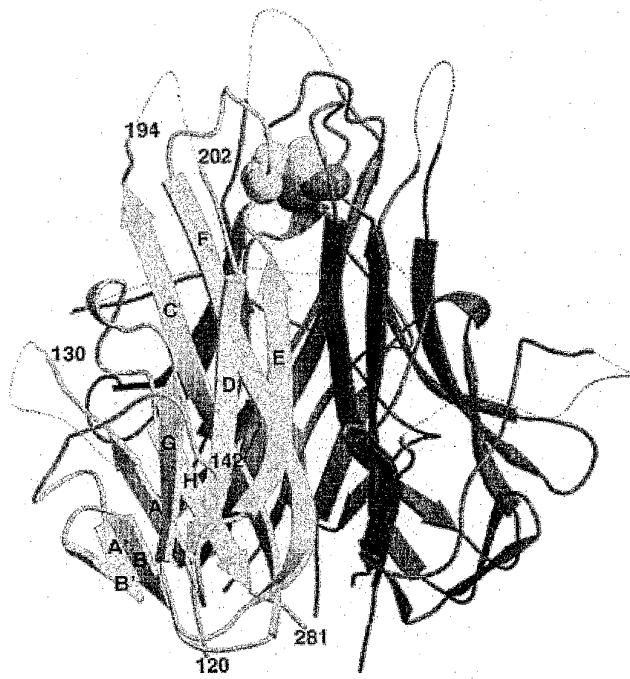
1 / 25

FIG. 1

WO 03/029420

PCT/US02/31210

2 / 25

**FIG._2A**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

3 / 25

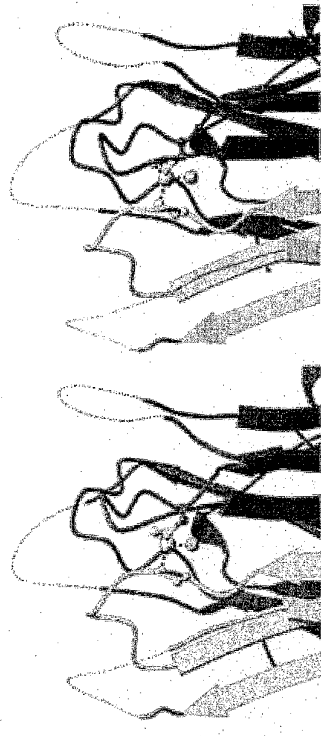


FIG._2B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

4 / 25

Crystallographic Data

	<u>Apo-2L (114-281)</u>	<u>Apo-2L (91-281) D218A</u>	<u>Apo-2L (91-281) D218A</u>
Crystal			
Space Group	P6 ₃	R32	R32
Unit Cell (Å)	a=72.5 c=140	a=66.4 c=197.6	a=66.4 c=197.7
Resolution (Å)	3.9	1.9	1.3
Coverage (%)	94 (96)	93 (99)	100 (100)
<I/σ(I)>	5.9	10.1	12.4
# Unique (hkl)	3589	12680	41840
Redundancy	4.9	4.3	12.1
R _{symm} (%)	15.4 (34)	6.2 (27)	6.4 (34)
# Protomers in ASU	2	1	1
Refinement			
R _{cryst} (%)	33.8	20	
R _{free} (%)	27.6	22	
rmsd Bonds (Å)	0.009	0.015	0.007
rmsd Angles (°)	1.79	2.0	1.41
Average B-Values	—	14	14
# Water Molecules	0	170	

$R_{symm} = \frac{\sum_h \sum_i (I_{hi} - \langle I_h \rangle) / \sum_h I}{\sum_h I}$ where I_h is the mean structure factor intensity of i observations of symmetry-related reflections with Bragg index h . $R_{cryst} = \frac{\sum_h \sum_i |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum_h \sum_i |F_{obs}|}$ where F_{obs} and F_{calc} are the observed and calculated structure factor amplitudes. $R_{free} = \frac{\sum_{(hkl) \in \tau} |F_{obs}(hkl) - k| F_{(hkl)}|}{\sum_{(hkl) \in \tau} |F_{obs}(hkl)|}$ where the τ set of reflections is omitted from the refinement process. 10% of the data were included in the τ set for calculation of R_{free} and not included in refinement. Values in parenthesis are for the highest resolution shell.

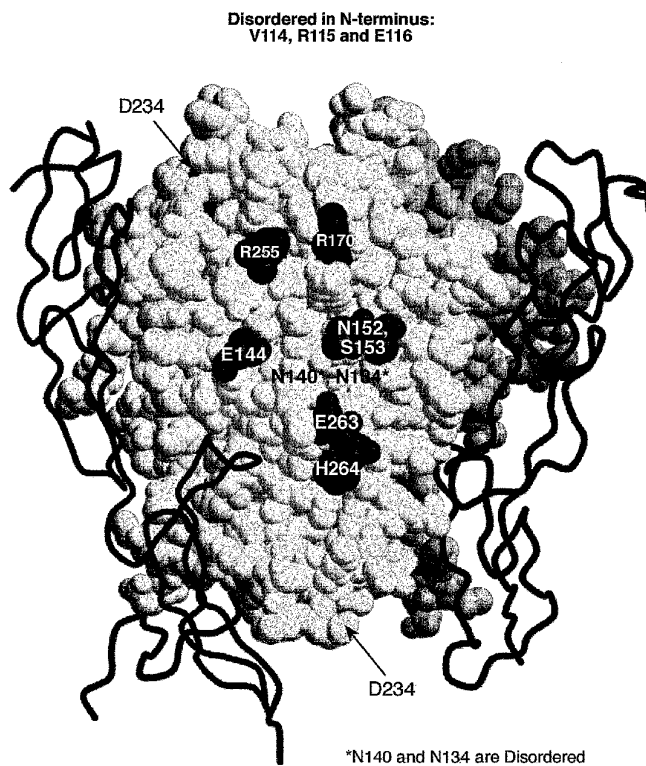
FIG. 2C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

5 / 25

**FIG. 3**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

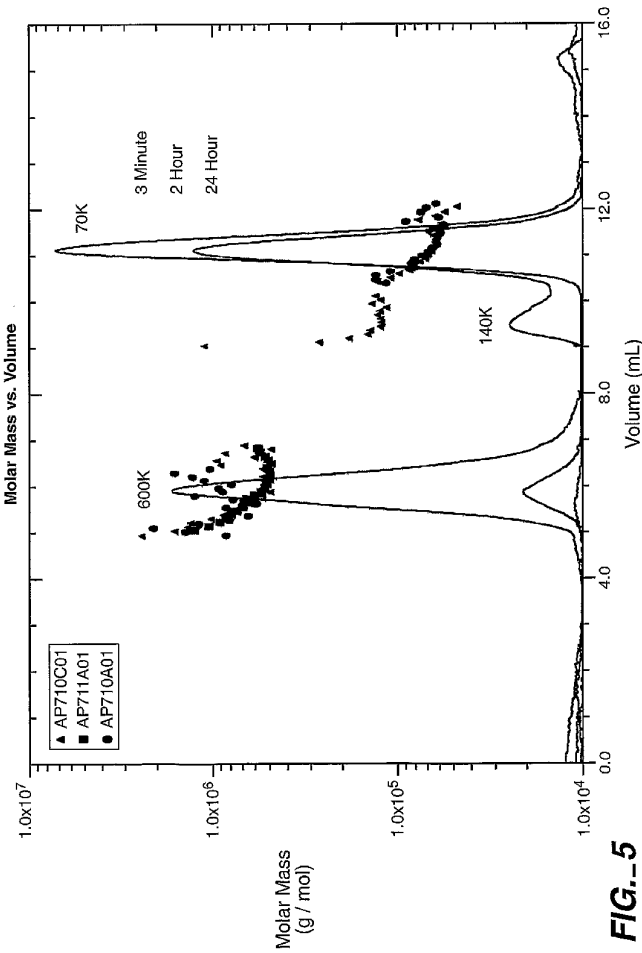
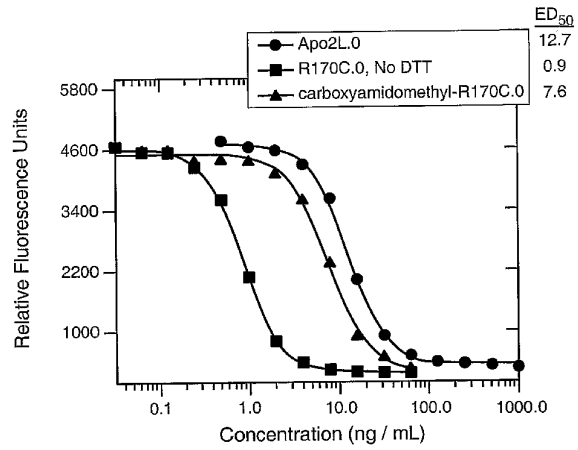
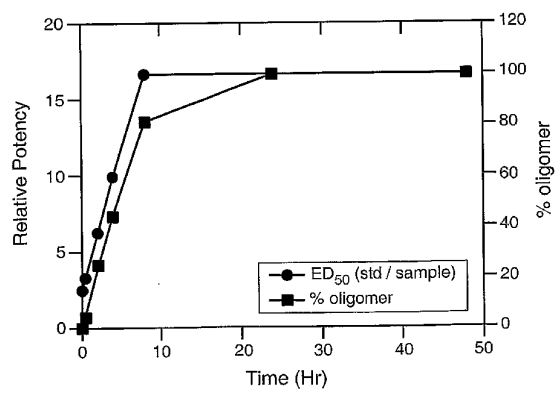


FIG._5

WO 03/029420

PCT/US02/31210

6 / 25

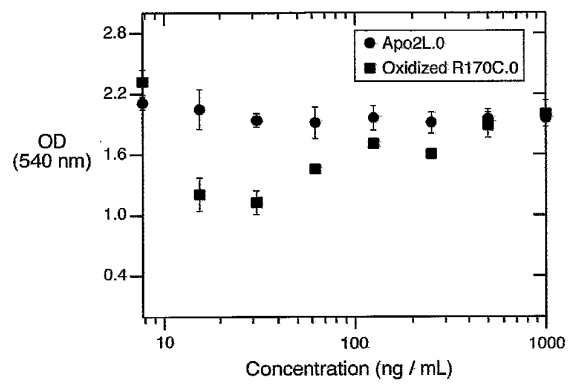
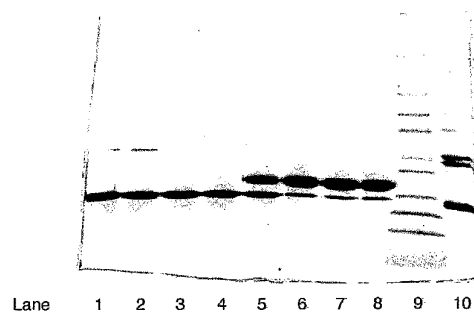
**FIG. 4****FIG. 6**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

8 / 25

**FIG._7****FIG._8**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

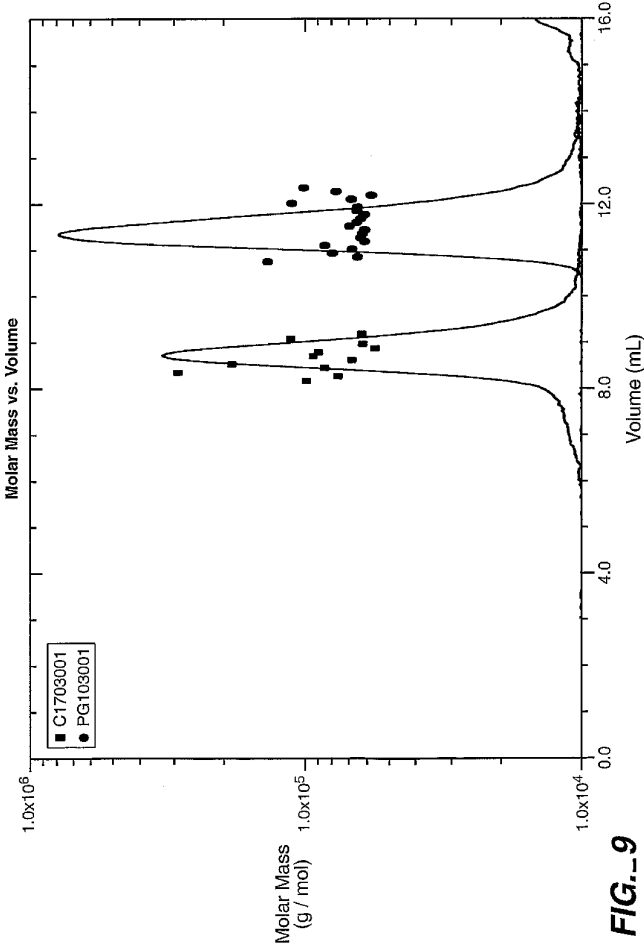


FIG. 9

WO 03/029420

PCT/US02/31210

10 / 25

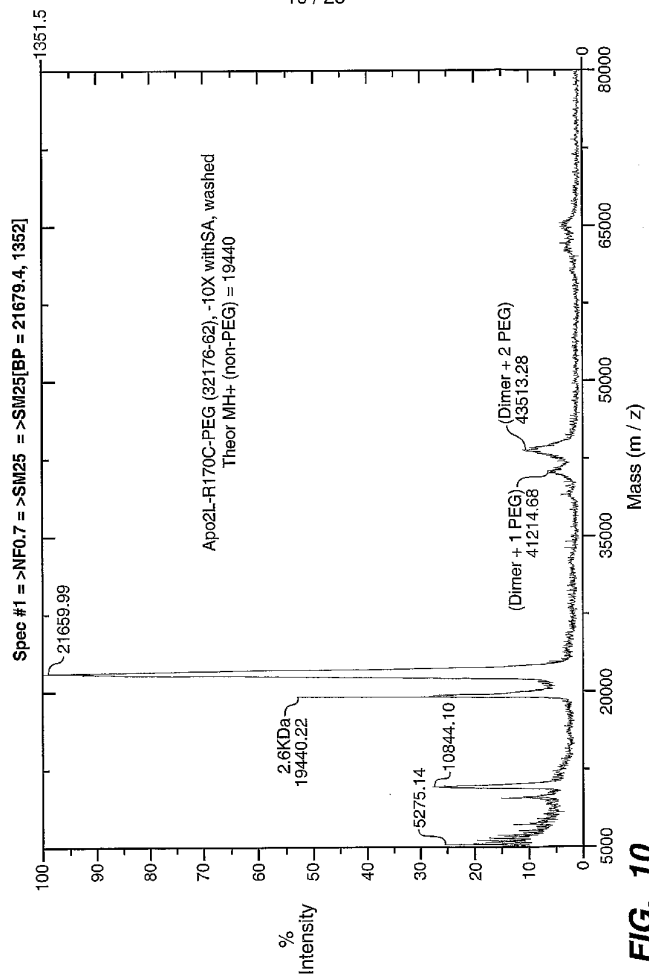


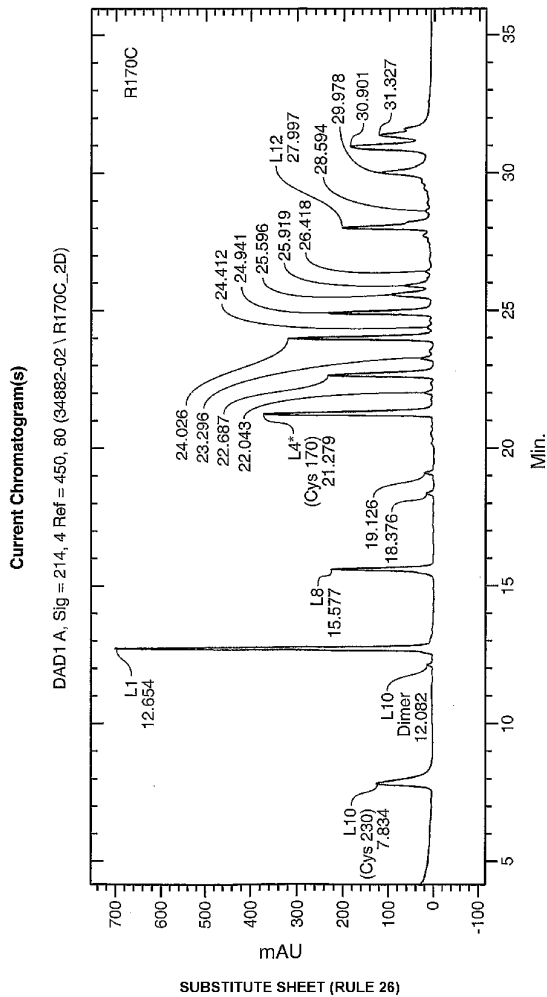
FIG. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

11 / 25



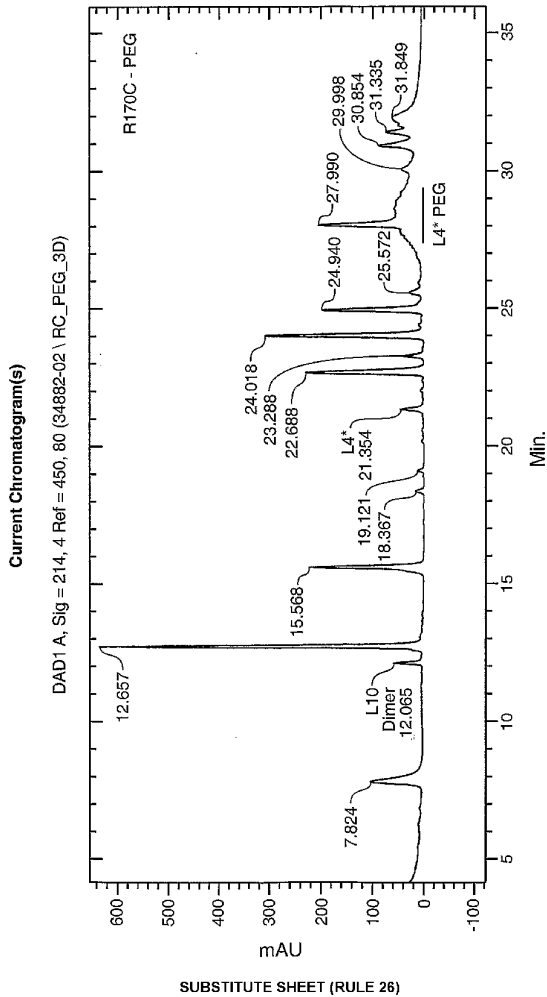


FIG. 11B

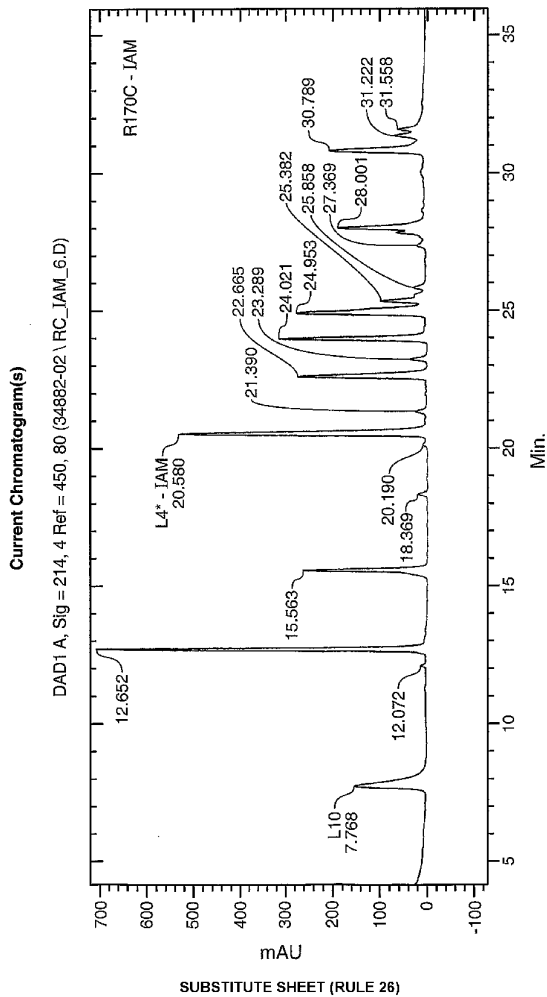
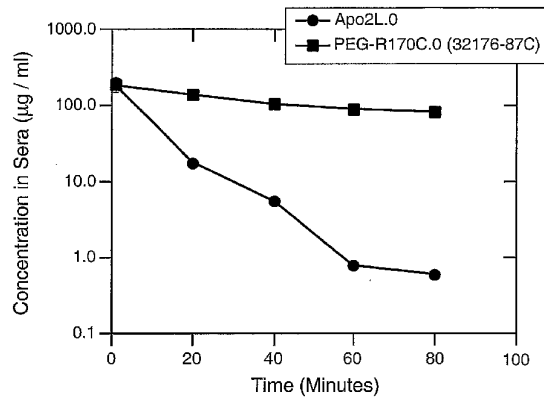
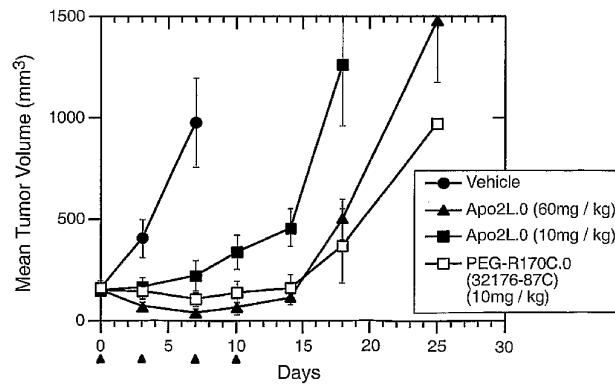


FIG. 11C

WO 03/029420

PCT/US02/31210

14 / 25

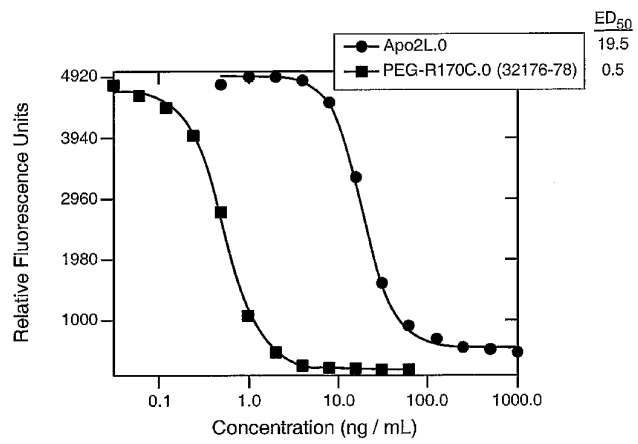
**FIG._12****FIG._13**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

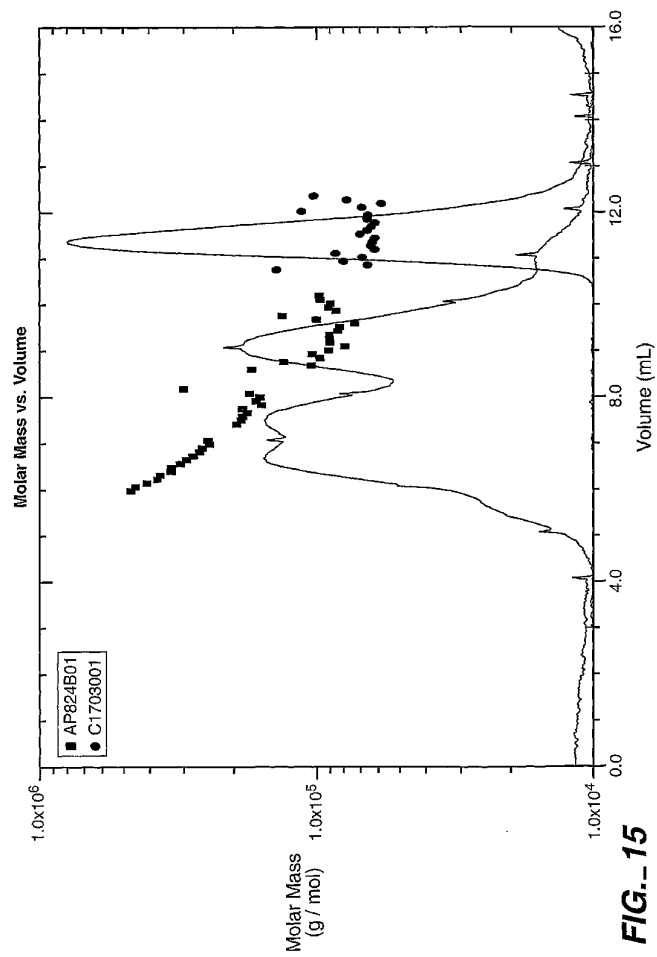
15 / 25

**FIG. 14**

WO 03/029420

PCT/US02/31210

16 / 25

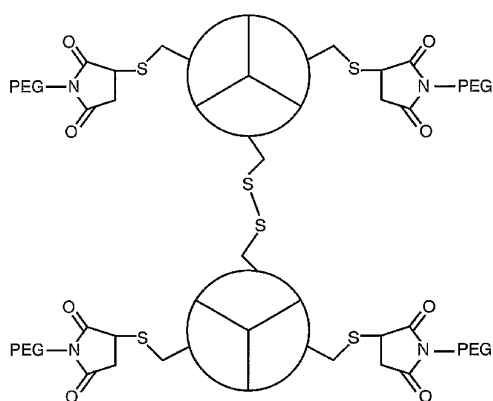
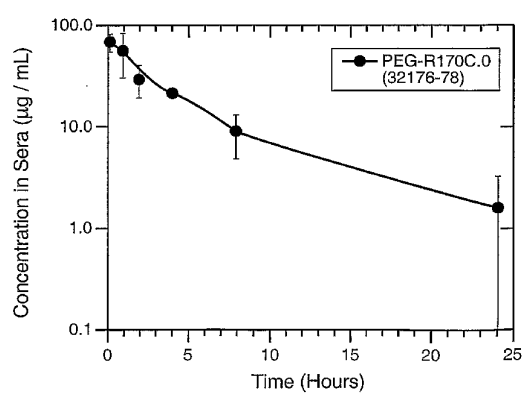


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

17 / 25

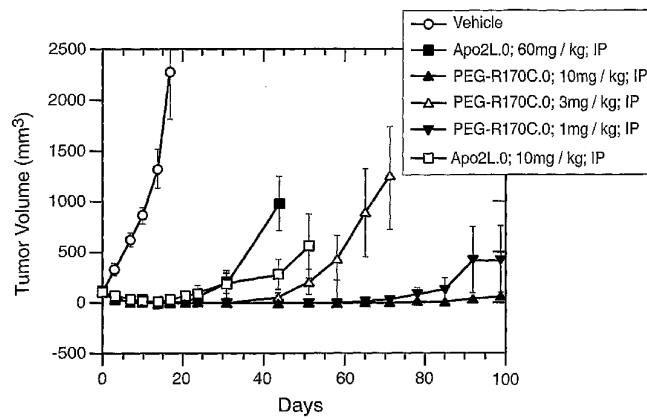
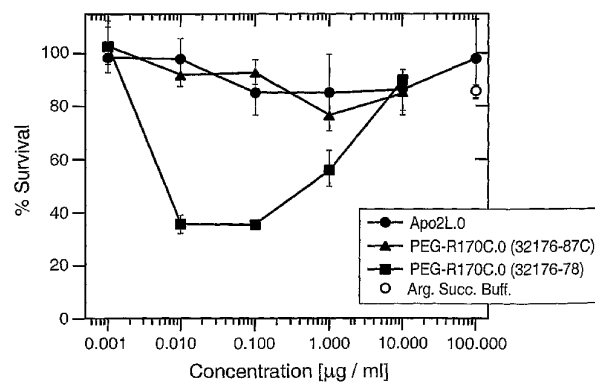
**FIG. 16****FIG. 17**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

18 / 25

**FIG. 18****FIG. 19**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

19 / 25

1 ATGGCGCCAC CACCAGCTAG AGTACATCTA GGTGCGTTCC TGGCAGTGAC
 TACCSCGGTG GTGGTCGATC TCATGTAGAT CCACGCAAGG ACCGTCACTG
 1 MetAlaProP roProAlaPhe gValHisLeu GlyAlaPheL euAlaValTh

 51 TCCGAATCCC GGGAGCGCAG CGAGTGGGAC AGAGGCAGCC GCGGCCACAC
 AGGCITAGGG CCTCGCGTC GCTCACCCCTG TCTCCGTCGG CCGCGGTGTG
 rProAsnPro GlySerAlaA laSerGlyTh rGluAlaAla AlaAlaThrPro

 101 CCAGCAAAAGT GTGGGGCTCT TCCGCGGGGA GGATTGAAOC ACGAGGCGGG
 GGTGCTTTCA CACCCCGAGA AGGCGCCCTT CCTAAGTTGG TGCTCCGCCC
 35 SerLysVa lTrpGlySer SerAlaGlyA rgIleGluPr oArgGlyGly

 151 GCGCGAGGAG CGCTCCCTAC CTCCATGGGA CAGCACGGAC CCAGTGCCCG
 CCGCTCCCTC GCGAGGGATG GAGGTACCCT GTCTGCTGCTG GGTACCGGGC
 GlyArgGlyA laLeuProTh rSerMetGly GlnHisGlyP roSerAlaArg

 201 GGGCCGCGGCA GGGCGCGCCC CAGGACCCAG GCGGCGCGGG GAAGCCAGCC
 CCGGGCCCGT CCGCGCGGGG GTCTGCGTTC CCGCGCGGCC CTTCGCTCGG
 68 AlaArgAla GlyArgAlaP roGlyProAr gProAlaArg GluAlaSerP

 251 CTCGCGTCCG GGTCCACAAG ACCTTCAAGT TTGTCGTCTG CCGGGTCTCT
 GAGCCGAGGC CCAGGTGTTT TGGAACTTCA AACAGCAGCA GCGCCAGGAC
 roArgLeuAr gValHisLys ThrPheLysP heValValVa lGlyValLeu

 301 CTGCAAGTCT TACCTAGCTC AGCTGCAACC ATGATCAATC AATTGGCACA
 GACGTCCAGC ATGGATCGAG TCGACGTTGG TAGTTTGAGG TACTAGTTAG
 101 LeuGlnValV alProSerSe rAlaAlaThr lIleLysLeuH isAspGlnSe

 351 AATTGGCACA CAGCAATGGG AACATAGCCC TTTGGGAGAG TTGTGTCCAC
 TTAACCGTGT GTCTGTTACCC TTGTATCGGG AAACCCCTCT AACACAGGTG
 rIleGlyThr GlnGlnTrpG luHisSerPr oLeuGlyGlu LeuCysProPro

 401 CAGGATCTCA TAGATCAGAA CGTCCCTGGAG CCTGTAAACC GTGCACAGAG
 GTCTTAGAGT ATCTAGTCTT GCAGGACCTC GACATTGGC CACGTGTCTC
 135 GlySerHi sArgSerGlu ArgProGlyA laCysAsnAr gCysThrGlu

 451 GGTGTGGGTT ACACCAATGC TTCCAACAAT TTGTTTGCTT GCCTCCCATG
 CCACACCCAA TGTGTTACG AAGGTTGTTA AACAAACGAA CCGAGGGTAC
 GlyValGlyT yrThrAsnAl aSerAsnAsn LeuPheAlaC ysLeuProCys

 501 TACAGCTTGT AAATCAGATG AAGAAGAGAG AAGTCCCTGC ACCACGACCA
 ATGTGGAACA TTTAGTCTAC TTCTTCTCTC TTCAGGACG TGGTGTGGT
 168 ThrAlaCys LysSerAspG luGluGluAr gSerProCys ThrThrThrA

 551 GGAACACAGC ATGTCACTGC AAACCAAGAA CTTTCCGAA TGACAATTCT
 CCTTGTTCTG TACAGTCAGG TTTGTTCTCT GAAAGGCCTT ACTGTTAAGA
 rgAsnThrAl aCysGlnCys LysProGlyT hrPheArgAs nAspAsnSer

 601 GCTGAGATGT GCCGGAAGTG CAGCACAGGG TGCCCCAGAG GGATGGTCAA
 CGACTCTACA CGGCCTTAC GTCGTGTCCC ACGGGGTCTC CCTACAGTT
 201 AlaGluMetC ysArgLysCy sSerThrGly CysProArgG lyMetVally

 651 GGTCAAGGAT TGTACGCCCT GGAGTGACAT CGAGTGTGTC CACAAAGAAT
 CCAGTTCCIA ACATGCGGGA CCTCACTGTA GCTCACACAG GTGTTTCTTA
 sVallyAsp CysThrProT xpSerAspIl eGluCysVal HisLysGluSer

FIG. 20A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

20 / 25

701 CAGGCAATGG ACATAATATA TGGGTGATT TGGTTGTGAC TTGGTTGTT
 GTCCGTTACC TGTATTATAT ACCCACTAAA ACCAACACTG AACCAACAA
 235 GlyAsnGly yHisAsnIle TrpValIleL euValValTh rLeuValVal
 751 CCGTIGCTGT TGGTGGCTGT GCTGATTGTC TGTGTTGCA TCGGCTCAGG
 GGCAACGACA ACCACCGACA CGACTAACAG ACAACACAGT AGCCGAGTCC
 ProLeuLeuL euValAlaVa lLeuIleVal CysCysCysI leGlySerGly
 801 TTGTGGAGGG GACCCCAAGT GCATGGACAG GGTGTGTTTC TGGCGCTTGG
 AACACCTCCC CTGGGGTTCA CGTACCTGTC CCACACAAAG ACCCGGAAACC
 268 CysGlyGly AspProLysC ysMetAspAr gValCysPhe TrpArgLeuG
 851 GTCTCCTACG AGGCGCTGGG GCTGAGGACA ATGCTCACAA CGAGATTCTG
 CAGAGGATGC TCCCGGACCC CGACTCCTGT TACGAGTGT GCTCTAAGAC
 lyLeuLeuAr gGlyProGly AlaGluAspA snAlaHisAs nGluIleLeu
 901 AGCAACGACG ACTCGCTGTC CACTTTCGTC TCTGAGCAGC AAATGGAAAG
 TCGTTGCGTC TGAGCGACAG GTGAAAGCAG AGACTCGTCG TTTACCTTTC
 301 SerAsnAlaA spSerLeuSe rThrPheVal SerGluGlnG lnMetGluSe
 951 CCAGGAGCCG GCAGATTGTA CAGGTGTCAC TGTACAGTCC CCAGGGGAGG
 GTTCCTCGGC CTTCTAAACT GTCCACATGT ACATGTCAGG GGTCCCTCTCC
 rGlnGluPro AlaAspLeuT hrGlyValTh rValGlnSer ProGlyGluAla
 1001 CACAGTGTCT GCTGGGACCG GCAGAAAGCTG AAGGGTCTCA GAGGAGGAGG
 GTGTCACAGA CGACCTTGGC CGTCTTCGAG TTCCAGAGT CTCCTCTCTCC
 335 GlnCysLe uLeuGlyPro AlaGluAlaG luGlySerGI nArgArgArg
 1051 CTGCTGGTTC CAGCAAAATGG TGCTGACCCC ACTGAGACTC TGATGCTGTT
 GACGACCAAG GTGCTTTACC ACGACTGGGG TGACTCTGAG ACTACGACAA
 LeuLeuValP roAlaAsnGl yAlaAspPro ThrGluThrL euMetLeuPhe
 1101 CTTTGACAAG TTTGCAACA TCGTGCCCTT TGACTCCTGG GACCAAGTCA
 GAAACTGTTC AAACGTTTGT AGCACGGGAA ACTGAGGACC CTGCTCGAGT
 368 PheAspLys PheAlaAsnI leValProPh eAspSerTrp AspGlnLeuM
 1151 TGAGGCAGCT GGACCTCAGC AAAAATGAGA TCGATGTGGT CAGAGCTGGT
 ACTCCGTCCA CCTGGAGTGC TTTTACTCT AGCTACACCA GTCTCGACCA
 etArgGlnLe uAspLeuThr LysAsnGluI leAspValVa lArgAlaGly
 1201 ACAGCAGGCC CAGGGGATGC CTTGTATGCA ATGCTGATGA AATGGGTCAA
 TGTGCTCCGG GTCCCTTACG GAACATACGT TACGACTACT TTACCCAGTT
 401 ThrAlaGlyP roGlyAspAl aLeuTyrAla MetLeuMetL ysTrpValAs
 1251 CAAAACTGGA CGAACGCGCT CGATCCACAC CCGCTGGAT GCCTTGGAGA
 GTTTGACCT GCCTTCCGGA GCTAGGTGTG GGACGACCTA CGAACTCTCT
 nLysThrGly ArgAsnAlaS erIleHisTh rLeuLeuAsp AlaLeuGluArg
 1301 GGATGGAAGA GAGACATGCA AAAGAGAAGA TTCAGGACCT CTTGGTGGAC
 CCTACCTTCT CTCTGTACGT TTTCTCTCT AAGTCTCGGA GAACCCACTG
 435 MetGluGl uArgHisAla LysGluLysI leGlnAspLe uLeuValAsp
 1351 TCTGGAAAAGT TCATCTACTT AGAAGATGGC ACAGGCTCTG CCGTGTCTCT
 AGACCTTTCA AGTAGATGAA TCTTCTACCG TGTCCGAGAC GGCACAGGAA
 SerGlyLysP heIleTyrLe uGluAspGly ThrGlySerA laValSerLeu
 1401 GGAGTGA
 CCTCACT
 468 GluOP*

FIG. 20B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

21 / 25

1 MEQRGONAPAASGARKRHGPGPREARGARPGLEVPKTLVLVVAVLLLVSAESALITQQD
61 LAPQQRAPQQRSSPSEGLCPFGHHISEDGRDCISCKYGODVSTHNDLLFCCLACTRCD
121 SGEVELSPCTTTRNTVQCCEEGTFREEDSPFEMCRKCRGTGCPRGMVKVGDCTFWSDIECVH
181 KESGIIIGVTVAAVVLIVAVFVCKSLMKKVLPLYLKGICSGGGGDPERVDRSSQRFGAED
241 NVLINEIVSILQPTQVFEQEMEVOEPAEPTGVNMLSPGESEHLLLEPAEAERSQRRLLVPA
301 NEGDEPTETLRQCFDDFADLVFPDSWEPLMRKLGMLDNEIKVAKAEAAAGHRDTLYTMLIKW
361 VNKTGRDASVHTLLDALETIGERLAKQKTEDHLLSSGKFMYLEGNADSALS

FIG. 21

WO 03/029420

PCT/US02/31210

22 / 25

```

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

```

FIG. 22A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

23/25

```

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

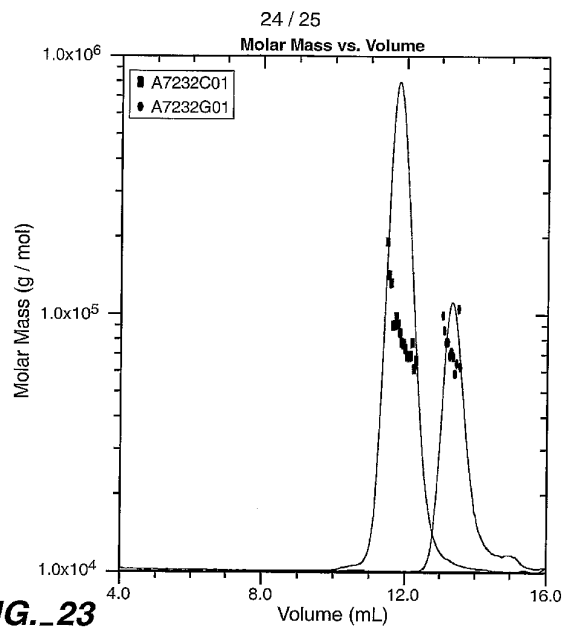
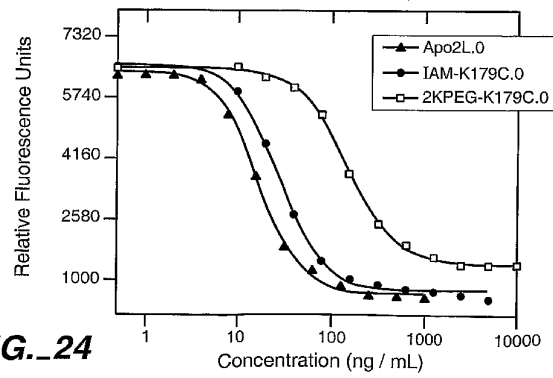
Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser *
 435                440

```

FIG._22B

WO 03/029420

PCT/US02/31210

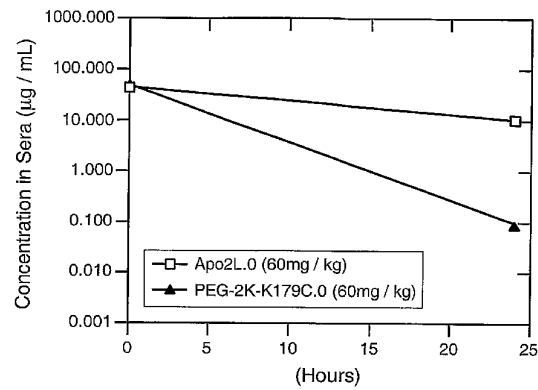
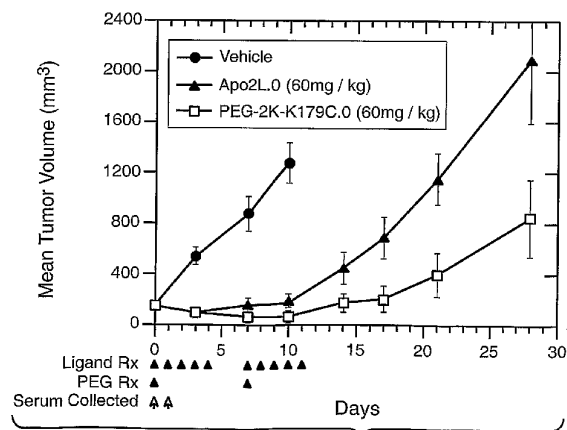
**FIG._23****FIG._24**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/029420

PCT/US02/31210

25 / 25

**FIG. 25****FIG. 26**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 April 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/029420 A3

(51) International Patent Classification: **C07K 14/52**,
A61K 38/19, C07H 21/04, C12N 15/63, 1/21, 1/11, 5/16,
15/12

(21) International Application Number:
PCT/US2002/031210

(22) International Filing Date: 1 October 2002 (01.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/326,622 2 October 2001 (02.10.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-
TECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,
CA 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KELLELY, Robert E.
[US/US]; 1029 San Felipe Avenue, San Bruno, CA 94066
(US); LINDSTROM, Stephanie H. [US/US]; 196 Rock
Harbor Lane, Foster City, CA 94404 (US).

(74) Agents: MARSCHANG, Diane L., et al., GENENTECH,
INC., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990
(US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
4 November 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2003/029420 A3

(54) Title: APO-2 LIGAND VARIANTS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The disclosure provides Apo-2 ligand variant polypeptides. Methods of making and chemically modifying Apo-2
ligand variant polypeptides are also provided. In addition, formulations of Apo-2 ligand variant polypeptides are provided.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/31210																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 14/52; A61K 38/19; C07H 21/04; C12N 15/63, 1/21, 1/19, 5/16, 15/12 US CL : 530/351, 402; 514/12; 536/23.5; 435/320.1, 252.33, 254.2, 358, 69.5 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) U.S. : 530/351, 402; 514/12; 536/23.5; 435/320.1, 252.33, 254.2, 358, 69.5 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>T</td> <td>WO 2004/001009 A2 (GENENTECH, INC.) 31 January 2003 (31.01.2003), see entire document.</td> <td>1-82</td> </tr> <tr> <td>T</td> <td>US 6,740,739 B1 (ASHKENAZI et al) 25 May 2004 (25.05.2004), see entire document.</td> <td>1-82</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 01/00832 A1 (GENENTECH, INC.) 04 January 2001 (04.01.2001), see entire document.</td> <td>1-82</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 5,763,223 A (WILEY et al) 09 June 1998 (09.06.1998), see entire document.</td> <td>1-82</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2003/0050223 A1 (LAM et al) 13 March 2003 (13.03.2003), see entire document.</td> <td>1-82</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	T	WO 2004/001009 A2 (GENENTECH, INC.) 31 January 2003 (31.01.2003), see entire document.	1-82	T	US 6,740,739 B1 (ASHKENAZI et al) 25 May 2004 (25.05.2004), see entire document.	1-82	A	WO 01/00832 A1 (GENENTECH, INC.) 04 January 2001 (04.01.2001), see entire document.	1-82	A	US 5,763,223 A (WILEY et al) 09 June 1998 (09.06.1998), see entire document.	1-82	A	US 2003/0050223 A1 (LAM et al) 13 March 2003 (13.03.2003), see entire document.	1-82
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
T	WO 2004/001009 A2 (GENENTECH, INC.) 31 January 2003 (31.01.2003), see entire document.	1-82																		
T	US 6,740,739 B1 (ASHKENAZI et al) 25 May 2004 (25.05.2004), see entire document.	1-82																		
A	WO 01/00832 A1 (GENENTECH, INC.) 04 January 2001 (04.01.2001), see entire document.	1-82																		
A	US 5,763,223 A (WILEY et al) 09 June 1998 (09.06.1998), see entire document.	1-82																		
A	US 2003/0050223 A1 (LAM et al) 13 March 2003 (13.03.2003), see entire document.	1-82																		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td> "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 "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 "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 "&" document member of the same patent family																
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 "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 "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 "&" document member of the same patent family																			
Date of the actual completion of the international search 19 July 2004 (19.07.2004)		Date of mailing of the international search report 11 AUG 2004																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 872-9306		Authorized officer Elleen O'Hara <i>E. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31210

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST, STN/CAS, MEDLINE
search terms: Apo2, Apo-2, ligand, TRAIL, amino acid substitution
STIC sequence search, SEQ ID NO:1

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/525	
C 0 7 K 14/525	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 リンドストロム, ステファニー エイチ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, ロック ハーバー
レーン 1 9 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 CA01 DA02 DA06 DA12 EA04 GA11 HA01 HA17
4B064 AG20 CA01 CA02 CA06 CA10 CA19 CB30 DA01
4B065 AA26X AA72X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BD27 CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 CA18 CA59 NA14 ZA02 ZA96
ZB07 ZB26
4H045 AA20 BA10 BA57 CA40 DA01 DA50 EA20 FA50 FA74