

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5148795号
(P5148795)

(45) 発行日 平成25年2月20日 (2013. 2. 20)

(24) 登録日 平成24年12月7日 (2012. 12. 7)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 39/395 E

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 39/395 Y

請求項の数 28 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-546669 (P2001-546669)
 (86) (22) 出願日 平成12年12月19日 (2000. 12. 19)
 (65) 公表番号 特表2003-517829 (P2003-517829A)
 (43) 公表日 平成15年6月3日 (2003. 6. 3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/034755
 (87) 国際公開番号 W02001/045730
 (87) 国際公開日 平成13年6月28日 (2001. 6. 28)
 審査請求日 平成19年12月5日 (2007. 12. 5)
 (31) 優先権主張番号 60/172, 878
 (32) 優先日 平成11年12月20日 (1999. 12. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/203, 347
 (32) 優先日 平成12年5月10日 (2000. 5. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591123609
 イミュネックス・コーポレーション
 IMMUNEX CORPORATION
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9132
 O-1799, サウザンド・オークス, ワ
 ン・アムジェン・センター・ドライブ
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TWEAK受容体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TWEAK受容体アンタゴニストを含む、血管形成の調節が必要な哺乳動物において血管形成を調節するための医薬組成物であって、該TWEAK受容体が配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドであるか、又はそのアミノ酸配列と少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、該TWEAK受容体アンタゴニストが、
 (i) 該TWEAK受容体の細胞外ドメイン又は(ii) 該TWEAK受容体の細胞外ドメインに特異的に結合するアンタゴニスト抗体であり、かつ、血管形成を抑制するものであり、並びに、該細胞外ドメインが、配列番号7のアミノ酸28~79を含むポリペプチドであるか、又は該配列番号7のアミノ酸28~79と少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドである、上記医薬組成物。

【請求項 2】

製薬上許容される担体をさらに含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記哺乳動物がヒトである、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記アンタゴニストがFcポリペプチドもしくはロイシンジッパードメインをさらに含む、請求項1~3のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記アンタゴニストが、前記TWEAK受容体の細胞外ドメインに融合されたFcポリ

ペプチドを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記アンタゴニストが配列番号 7 のアミノ酸 28 ~ 309 を含むポリペプチドである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記アンタゴニスト抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、トランスジェニック抗体、及びヒト抗体からなる群より選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記アンタゴニスト抗体が、放射性同位体に、植物、真菌、もしくは細菌由来のトキシンに、又は他の化学毒物にコンジュゲートされている、請求項 1 ~ 3 及び 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記トキシンが、リシン A 若しくはジフテリアトキシンである、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記アンタゴニストが前記 TWEAK 受容体と TRAF 分子との相互作用を破壊する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記哺乳動物が、血管形成により媒介される疾患もしくは症状を有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記疾患もしくは症状が眼の新生血管形成により特性づけられる、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記疾患もしくは症状が固形腫瘍である、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記哺乳動物をさらに放射線で処置する、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記哺乳動物をさらに第 2 の化学療法剤で処置する、請求項 11 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記第 2 の化学療法剤が、アルキル化剤、代謝拮抗物質、ビンカアルカロイド及び他の植物由来化学療法剤、ニトロソウレア、抗腫瘍抗生物質、抗腫瘍酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、白金類似体、副腎皮質抑制剤、ホルモン、ホルモン作動薬、ホルモン拮抗薬、抗体、免疫療法剤、血液細胞因子、放射線療法剤、並びに生物学的応答調節剤からなる群より選択される、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記第 2 の化学療法剤が、シスプラチン、シクロホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ブレオマイシン、カルボプラチン、フルオロウラシル、5 - フルオロデオキシウリジン、メトトレキセート、タキソール、アスパラギナーゼ、ピンクリスチン、及びビンブラスチン、インターロイキン、インターフェロン (、 、 もしくは) を含む、及び TNF を含むリンホカイン及びサイトカイン、クロラムブシル、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、シタラビン、メルカプトプリン、チオグアニン、ビンデシン、エトポシド、テニポシド、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、マイトマイシン、L - アスパラギナーゼ、ヒドロキシウレア、メチルヒドラジン、ミトタン、タモキシフェン、並びにフルオキシメステロンからなる群より選択される、請求項 15 に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

前記第2の化学療法剤が、F l t 3リガンド、C D 4 0リガンド、インターロイキン - 2、インターロイキン - 1 2、4 - 1 B Bリガンド、抗4 - 1 B B抗体、T N Fアンタゴニスト及びT N F受容体アンタゴニスト、T R A I L、C D 1 4 8アゴニスト、V E G Fアンタゴニスト、V E G F受容体アンタゴニスト、並びにT e kアンタゴニストからなる群より選択される、請求項 1 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

医療に使用するための可溶性のT W E A K受容体断片を含むアンタゴニストであって、該アンタゴニストが、T W E A K受容体の細胞外ドメインであり、ただし該T W E A K受容体が配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドであるか、又はそのアミノ酸配列と
少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、並びに、該細胞外ドメインが配列番号7のアミノ酸28~79を含むポリペプチドであるか、又は該配列番号7のアミノ酸28~79と少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドである、上記アンタゴニスト。

10

【請求項 20】

F cポリペプチドもしくはロイシンジッパードメインをさらに含む、請求項 1 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 21】

前記アンタゴニストが配列番号7のアミノ酸28~309を含むポリペプチドである、
請求項 1 9 又は 2 0 に記載のアンタゴニスト。

20

【請求項 22】

請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか1項に記載のアンタゴニストをコードする核酸。

【請求項 23】

請求項 2 2 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 24】

請求項 2 2 に記載の核酸又は請求項 2 3 に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項 25】

T W E A K受容体アンタゴニストの産生方法であって、該アンタゴニストの発現を促進する条件下で請求項 2 4 に記載の宿主細胞を培養することを含んでなる、上記方法。

【請求項 26】

血管形成の調節が必要な哺乳動物において血管形成を調節する医薬品を調製するための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか1項に記載のT W E A K受容体アンタゴニストもしくはT W E A K受容体アンタゴニストを含む組成物の使用。

30

【請求項 27】

血管形成を調節しうる化合物を同定する方法であって、T W E A KとT W E A K受容体の細胞外ドメインとの相互作用に影響を及ぼす試験化合物を同定することを含んでなる、ただし該T W E A K受容体が配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドであるか、又はそのアミノ酸配列と少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、該細胞外ドメインが配列番号7のアミノ酸28~79を含むポリペプチドであるか、又は該配列番号7のアミノ酸28~79と少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドである、上記方法。

40

【請求項 28】

T W E A K受容体へのT W E A Kの結合の調節が必要な哺乳動物においてT W E A K受容体へのT W E A Kの結合を調節するための医薬組成物であって、該T W E A K受容体が配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドであるか、又はそのアミノ酸配列と少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、該組成物が、

(a) 該T W E A K受容体の可溶性細胞外ドメイン、及び

(b) 該T W E A K受容体の可溶性細胞外ドメインに結合するアンタゴニスト抗体、からなる群より選択されたT W E A K受容体アンタゴニストを含み、かつ、該アンタゴニストが血管形成を抑制するものである、ただし該可溶性細胞外ドメインが配列番号7のア

50

ミノ酸 28 ~ 79 を含むポリペプチドであるか、又は該配列番号 7 のアミノ酸 28 ~ 79 と少なくとも 90 % 同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドである、上記医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の参照)

本願は、1999年12月20日出願の米国仮出願第60/172,878号および2000年5月10日出願の米国仮出願第60/203,347号の優先権を主張する。これらの仮出願はいずれも、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【0002】

10

(発明の分野)

本発明は、TWEAKタンパク質に対する機能性受容体(TWEAKR)の発見に関するものである。より特定的には、本発明は、治療法におけるTWEAKRアゴニストおよびアンタゴニストの使用、ならびにTWEAKRおよびTWEAK-TWEAKR相互作用に基づくスクリーニング方法に関する。

【0003】

(発明の背景)

A. 血管形成

血管形成は、既存の血管から最終的に新しい血管が形成される多段階発生過程である。この空間的かつ時間的に制御された過程には、既存の血管中のマトリックス接触および支持細胞相互作用のプロテアーゼによる弱体化、それに続く協調運動、形態学的変化、ならびに既存の血管の平滑筋および内皮細胞の増殖が関与する。次に、新生細胞は標的組織へと拡張し、続いて細胞間相互作用が生じて、内皮細胞は平滑筋細胞に囲まれた管を生成する。協調的に、血管の細胞外マトリックスタンパク質の分泌および内皮周囲支持細胞の補充が行われて、構造的な一体性が確保され維持される(たとえば、Daniel et al., Ann. Rev. Physiol. 2000(62):649, 2000を参照されたい)。血管形成は、常態および病態の両方の生理機能で重要な役割を果たす。

20

【0004】

正常な生理学的条件下では、血管形成は、胎児および胚の発生、創傷治癒、器官再生、ならびに女性生殖系リモデリング過程、たとえば、子宮内膜、黄体、および胎盤の形成、に関与する。血管形成は、特に成体動物において、常態下で厳しく制御されており、調節制御が混乱すると病的血管形成を起こす可能性がある。

30

【0005】

病的血管形成は、炎症性疾患、特定の眼障害、および癌の発症および/または進行への関与が示唆されてきた。特に、血管形成は固形腫瘍の増殖および存続ならびにその転移に不可欠であるという考えを支持するいくつかの証拠がある(たとえば、Folkman, N. Engl. J. Med. 285:1182, 1971; Folkman et al., Nature 339:58, 1989; Kim et al. Nature 362:841, 1993; Hori et al., Cancer Res., 51:6180, 1991を参照されたい)。したがって、血管形成阻害剤は、癌の予防(たとえば、前癌状態の治療)、介入(たとえば、小腫瘍の治療)、および退縮(たとえば、大腫瘍の治療)に有用である(たとえば、Bergers et al., Science 284:808, 1999を参照されたい)。

40

【0006】

疾患を予防、排除、および軽減すべく血管形成の調節を行うためのさらなる組成物および方法が必要である。

【0007】

B. TWEAK

TREPAおよびApo3Lとも呼ばれてきたTWEAKタンパク質は、腫瘍壊死因子(TNF)ファミリーのメンバーであり、多種多様なヒト組織中で発現される(Chicheportiche et al., J. Biol. Chem., 272(51):32401, 1997; このほかにWiley, PCT公開WO 98/35061号, 1998年8月13日を参照されたい)。ほとんどのTNFファミリーメンバーと同様に、TWEAKは、細胞外C末端ドメインを有するタイプII膜タンパク質である。当初、TWEAKはアポトーシスの弱い誘導

50

物質であるとみなされたが、あとになって、こうした細胞死の誘導は間接的なものであることが示された(Schneider et al., Eur. J. Immunol. 29:1785, 1999)。

【 0 0 0 8 】

Lynchらは、TWEAKが内皮細胞増殖および血管形成を直接誘発することを実証した(J. Biol. Chem., 274 (13):8455, 1999)。ピコモル濃度の組換え可溶性TWEAKは、多数の内皮細胞系および大動脈平滑筋細胞で増殖を誘発し、培養時の血清および増殖因子に対する要件を緩和する。さらに、TWEAKは、ラット角膜ポケットアッセイで強力な血管形成応答を誘発する。TNFファミリーメンバーはTNF受容体ファミリーのメンバーを介したシグナル伝達によって生物学的応答を開始するので、TWEAK受容体の同定および特性づけに大きな関心が払われてきた。

10

【 0 0 0 9 】

TWEAKは、DR3、Apo3、WSL-1、TRAMP、もしくはLARDとしてさまざまな名称で知られる死ドメイン含有受容体に結合して、該受容体を介してシグナルを伝達するとMarstersらは報告した(Marsters et al., Current Biology 8(9):525, 1998)。しかしながら、TWEAKはKym-1細胞に結合して該細胞中でシグナル伝達を行うが、Kym-1細胞は受容体DR3を発現しないことをSchneiderらは明らかにした(Schneider et al., Eur. J. Immunol. 29:1785, 1999)。これらの結果から、まだ同定されていないTWEAK受容体の存在が示唆される。

【 0 0 1 0 】

TWEAKはin vivoで血管形成を誘発するので、主要な機能性TWEAK受容体を同定することが特に必要である。ひとたび同定されれば、TWEAK受容体を用いて、血管形成の調節およびヒト疾患の治療を行うためのTWEAK受容体アゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニングおよび開発を行うことができる。

20

【 0 0 1 1 】

(発明の概要)

本発明は、主要な機能性TWEAK受容体の同定および生物学的特性づけに基づくものである。以下に記載するように、TWEAK受容体をコードするcDNAが、ヒト内皮細胞発現ライブラリーから分子クローン化された。

【 0 0 1 2 】

ここで同定したTWEAK受容体に対応するDNAおよび推定アミノ酸配列は報告されたものであるが(たとえば、Katoら、PCT公開WO 98/55508号、1998年12月10日およびIncyte、PCT公開WO 99/61471号、1999年12月2日)、これらの配列がTWEAKに対する受容体をコードすることも、コードされたポリペプチドが血管形成の調節に関与することも、これまで認識されていなかった。同様に、最近、研究者らは、TWEAK受容体アンタゴニストの作製方法および免疫疾患を治療するための該アンタゴニストの使用法を特許請求したが、主要なTWEAK受容体の同定も、血管形成におけるその役割の同定も行っていない(Rennert, PCT公開WO 00/420730号、2000年7月20日)。これらの欠陥は、本明細書に記載するように、主要なTWEAK受容体(TWEAKR)の同定およびその生物学的活性の特性づけを行うことによって解決された。TWEAKRを同定した結果として、血管形成を調節するための組成物の開発が可能になるとともに、診断剤および治療剤を同定するためのスクリーニングツールの提供も行えるようになった。

30

40

【 0 0 1 3 】

本発明は、血管形成の調節をそのような処置の必要な哺乳動物で行う方法を提供する。この方法には、TWEAK受容体アンタゴニストもしくはTWEAK受容体アゴニストを含む治療上有効な量の組成物を投与することが含まれる。組成物は、好ましくは、製薬上許容される担体を含有し、そして哺乳動物は、好ましくはヒトである。

【 0 0 1 4 】

いくつかのより好ましい実施形態では、組成物は、血管形成を抑制し、そしてTWEAK受容体アンタゴニスト、たとえば、可溶性のTWEAK受容体断片、アンタゴニスト性抗体、もしくはTWEAK受容体とTRAF分子との相互作用を破壊するアンタゴニスト、を含有する。いくつかの最も好ましい実施形態では、アンタゴニストは、配列番号7のアミノ酸28~79もし

50

くは配列番号7のアミノ酸28～309を含有する。TWEAK受容体アンタゴニストは、好ましくは血管形成により媒介される疾患もしくは症状、より好ましくは眼の新生血管形成もしくは固形腫瘍により特性づけられる疾患もしくは症状を有する哺乳動物を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、放射線もしくは第2の化学療法剤でさらに処置される。

【0015】

いくつかのより好ましい実施形態では、組成物は、血管形成を促進し、そしてアゴニスト性抗体のようなTWEAK受容体アゴニストを含有する。TWEAK受容体アゴニストは、好ましくは、心臓組織もしくは末梢組織における血管新生不全を治療するために、創傷治癒もしくは臓器移植を促進するために、またはバイパス手術もしくは血管形成術と組み合わせて、

10

【0016】

本発明はまた、医療に使用するための可溶性TWEAK受容体断片を含むアンタゴニスト、好ましくは配列番号7のアミノ酸28～79もしくは配列番号7のアミノ酸28～309を含むアンタゴニスト、および可溶性TWEAK受容体断片をコードする核酸を提供する。また、本発明は、血管形成の調節をそのような処置の必要な哺乳動物で行う医薬品を調製するための、TWEAK受容体アンタゴニストもしくはTWEAK受容体アゴニストを含む組成物の使用を提供する。

【0017】

本発明はさらに、血管形成を調節しうる化合物を同定する方法を提供する。この方法には、(a) TWEAK受容体細胞外ドメインに結合する試験化合物を同定すること、ここで該試験化合物はTWEAKでない、(b) TWEAKとTWEAK受容体との相互作用に影響を及ぼす試験化合物を同定すること、および(c) TWEAK受容体とTRAFとの相互作用を調節する試験化合物を同定すること、が含まれる。本発明には、これらの方法に従って同定された化合物が含まれる。

20

【0018】

本発明はまた、検出可能な標識もしくは化学療法剤を血管組織にターゲッティングする方法を提供する。この方法には、TWEAK受容体に結合する抗体を血管組織に接触させることが含まれる。いくつかの好ましい実施形態では、抗体は、放射性同位体、化学発光性もしくは蛍光性化合物、または酵素にコンジュゲートされている。いくつかの好ましい実施形態では、抗体は、サイトトキシンにコンジュゲートされている。

30

【0019】

(本発明の詳細な説明)

本発明は、TWEAK受容体と、TWEAK受容体に対するアゴニストおよびアンタゴニストを同定および使用する方法と、に関する。本発明は、アゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングする方法ならびに血管形成により媒介される疾患もしくは症状を治療する方法を提供する。

【0020】

A. 本明細書で使用した略語および用語

「4-1BB」および「4-1BBリガンド」(4-1BB-L)とは、特に米国特許第5,674,704号に記載されているポリペプチドであり、それらの可溶性形態を含む。

40

「bFGF」とは、塩基性繊維芽細胞増殖因子である。

「BSA」とは、ウシ血清アルブミンである。

「CD40リガンド」(CD40L)とは、特に米国特許第5,716,805号に記載されているポリペプチドであり、その可溶性形態を含む。

「CHO」とは、チャイニーズハムスター卵巣細胞系である。

「DMEM」とは、Dulbeccoの改変イーグル培地(市販されている細胞培養培地)である。

「ELISA」とは、酵素結合免疫吸着アッセイである。

「Flt3L」とは、Flt3リガンド(特に米国特許第5,554,512号に記載されているポリペプチド)であり、その可溶性形態を含む。

50

「HRMEC」とは、一次ヒト腎臓微小血管内皮細胞である。

「HUVEC」とは、ヒト臍静脈内皮細胞系統である。

「PBS」とは、リン酸緩衝食塩水である。

「PMA」とは、ホルボール12-ミリスレート-13-アセテートである。

「RTK」とは、受容体チロシンキナーゼである。

「Tek」(Tie2およびorkとも呼ばれてきた)とは、主に血管内皮で発現されるRTKである。

ヒトTek(ork)の分子クローニングについては、Zieglerの米国特許第5,447,860号に記載されている。「Tekアンタゴニスト」については、特に、Cerrettiら、PCT公開WO 00/75323号、2000年12月14日に記載されている。

「TNFR」とは、腫瘍壊死因子受容体であり、その可溶性形態を含む。「TNFR/Fc」とは、腫瘍壊死因子受容体-Fc融合ポリペプチドである。

「TRAIL」とは、TNF関連アポトーシス誘発性リガンド(特に米国特許第5,763,223号に記載されているTNFファミリーのタイプII膜貫通ポリペプチド)であり、その可溶性形態を含む。

「VEGF」とは、VPFもしくは血管透過性因子としても知られている血管内皮増殖因子である。

【0021】

B. 可溶性TWEAK受容体ポリペプチド

以下の実施例に記載するように、天然のヒトTWEAK受容体cDNAは、129残基ポリペプチド(配列番号4)をコードする配列番号3の配列を有する。このDNA配列を検討すると、約78アミノ酸の細胞外ドメイン(シグナルペプチドを含む配列番号4の残基1~78)、約23アミノ酸の膜貫通ドメイン(配列番号4の残基79~101)、および約28アミノ酸の細胞内ドメイン(配列番号4の残基102~129)を有するポリペプチドであることが予測される。TWEAK受容体配列はまた、Katoら、PCT公開WO 98/55508号、1998年12月10日およびIncyte、PCT公開WO 99/61471号、1999年12月2日にも報告されている。本明細書中で使用する場合、「TWEAKR」には、これらの配列を有するポリペプチド、特に、配列番号7のアミノ酸28~79を含むポリペプチド、ならびにそれらの天然に存在する変異体が包含される。

【0022】

本発明の1態様において、可溶性TWEAK受容体断片は、血管形成の抑制および/またはTWEAKRへのTWEAKリガンドの結合の阻害を行うTWEAKRアンタゴニストとして使用される。

【0023】

可溶性ポリペプチドは、それらを発現する細胞から分泌させることができる。可溶性形態のポリペプチドの使用は、特定の用途に有利である。このポリペプチドは分泌されるので、組換え宿主細胞からのポリペプチドの精製は容易である。また、一般的には、可溶性タンパク質は非経口投与に適している。所望のポリペプチドを発現するインタクトな細胞を遠心分離などによって培地から分離して、培地(上清)中の所望のポリペプチドの存在をアッセイすることにより、分泌された可溶性ポリペプチドの同定(およびその非可溶性膜結合対応物との識別)を行うことが可能である。培地中に所望のポリペプチドが存在すれば、ポリペプチドが細胞から分泌されたことになり、したがって、可溶性形態のポリペプチドであることがわかる。可溶性ポリペプチドは、いくつかの従来法のいずれかを用いて調製することが可能である。所望の可溶性ポリペプチドをコードするDNA配列を、ポリペプチド産生用の発現ベクター中にサブクローン化してもよいし、または所望のコードDNA断片を化学的に合成してもよい。

【0024】

可溶性TWEAKRポリペプチドは、TWEAKR細胞外ドメインの全部もしくは一部分を含むが、一般的には、細胞表面に該ポリペプチドを保持させる膜貫通ドメインを欠失している。可溶性ポリペプチドは、膜貫通ドメインの一部分または細胞質ドメインの全部もしくは一部分を含んでいてもよいが、ただし、ポリペプチドは、それが産生される細胞から分泌されるものでなければならない。細胞からの分泌を促進するために、可溶性TWEAKRポリペプチドは、有利には、最初に合成されたときに天然もしくは異種のシグナルペプチドを含むが、

シグナル配列は分泌時に開裂される。「TWEAKR細胞外ドメイン」という用語は、天然のTWEAKR細胞外ドメインの全部もしくは一部分、ならびに関連した形態、たとえば、限定されるものではないが、(a)断片、(b)変異体、(c)誘導体、および(d)融合ポリペプチド、を包含するものである。血管形成もしくは他のTWEAKR媒介応答を抑制するこれらの関連形態の能力は、以下に例示されるような方法を用いて、または当技術分野で公知の他のアッセイを用いて、*in vitro*もしくは*in vivo*で調べることが可能である。可溶性TWEAKRポリペプチドの例を以下に提示する。本発明のいくつかの実施形態では、血管形成もしくは他のTWEAKR媒介応答を抑制するために、TWEAKRへのTWEAKの結合を阻止するアンタゴニストとして多量体形態の可溶性TWEAKRポリペプチド(「可溶性TWEAKR多量体」)を使用する。

【0025】

可溶性TWEAKR多量体は、共有結合もしくは非共有結合された多量体であり、二量体、三量体、もしくはより高次の多量体を包含する。多量体は、異なる可溶性TWEAKRポリペプチド上のシステイン残基間で形成されたジスルフィド結合によって結合されていてもよい。本発明の1実施形態は、可溶性TWEAKRポリペプチドに融合されたペプチド部分間の共有結合もしくは非共有結合相互作用を介して連結された複数の可溶性TWEAKRポリペプチドを含む多量体に関する。そのようなペプチドは、ペプチドリinker(スペーサー)、もしくは多量体化を促進する性質を有するペプチドであってもよい。ロイシンジッパー、および抗体に由来する特定のポリペプチドは、以下でより詳細に記載するように、それに結合した可溶性TWEAKRポリペプチドの多量体化を促進することのできるペプチドに属する。特定の実施形態では、多量体は2~4個の可溶性TWEAKRポリペプチドを含む。

【0026】

いくつかの実施形態では、可溶性TWEAKR多量体は、免疫グロブリンに由来するポリペプチドを用いて調製される。抗体由来のポリペプチドの種々の部分(Fcドメインを含む)に融合された特定の異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の調製については、たとえば、Ashkenaziら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535, 1991); Byrnら(Nature 344:677, 1990);ならびにHollenbaughおよびAruffo(「免疫グロブリン融合タンパク質の構築」, Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11, 1992)によって報告されている。

【0027】

本発明の好ましい1実施形態は、可溶性TWEAKRをFcポリペプチドに融合させることにより形成された2個の融合タンパク質を含むTWEAKR-Fc二量体に関する。TWEAKR-Fc融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を適切な発現ベクター中に挿入する。組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞中でTWEAKR-Fc融合タンパク質を発現させ、そして抗体分子のように集合させる。このようにすると、鎖間ジスルフィド結合がFc部分間に形成されて2価の可溶性TWEAKRを生じる。「Fcポリペプチド」という用語には、本明細書中で使用する場合、抗体のFc領域に由来するポリペプチドの天然形態およびムテイン形態が含まれる。二量体化を促進するヒンジ領域を含有するようなポリペプチドのランケート形態も含まれる。

【0028】

PCT出願WO 93/10151号に記載されている1種の好適なFcポリペプチドは、ヒトIgG1抗体のN末端ヒンジ領域からFc領域の天然C末端まで伸長する1本鎖ポリペプチドである。他の有用なFcポリペプチドは、米国特許第5,457,035号およびBaum et al., EMBO J. 13:3992, 1994に記載されているFcムテインである。このムテインのアミノ酸配列は、WO 93/10151に提示された天然Fc配列のものと同等であるが、ただし、アミノ酸19はLeuからAlaに変更され、アミノ酸20はLeuからGluに変更され、そしてアミノ酸22はGlyからAlaに変更されている。このムテインは、Fc受容体に対する親和性が低減されている。Fc部分を含む融合ポリペプチドおよびそれから形成された多量体は、プロテインAもしくはプロテインGカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーによって容易に精製されるという利点をもつ。またFc融合ポリペプチドは、未改変ポリペプチドよりも長い*in vivo*半減期を提供しうるので、治療用途に有用である。

10

20

30

40

50

【0029】

他の実施形態では、抗体の重鎖もしくは軽鎖の可変部分を可溶性TWEAKRポリペプチドで置換してもよい。抗体の重鎖および軽鎖の両方を用いて融合タンパク質を作製する場合、4個もの可溶性TWEAKRポリペプチドを有する可溶性TWEAKR多量体を形成することが可能である。

【0030】

このほかに、可溶性TWEAKR多量体としては、ペプチドリンカー(スペーサー)もしくは多量体化を促進する性質を有するペプチドを含有するかもしれない、複数の可溶性TWEAKRポリペプチドを含む融合タンパク質がある。好適なペプチドリンカーとしては、米国特許第4,751,180号、同第4,935,233号、および同第5,073,627号に記載されているものが挙げられる。当技術分野で公知の従来の方法を用いて、所望のペプチドリンカーをコードするDNA配列を、TWEAKRをコードするDNA配列間にそれと同一のリーディングフレームで挿入することが可能である。たとえば、リンカーをコードする化学合成されたオリゴヌクレオチドを、可溶性TWEAKRをコードする配列間に連結させてもよい。特定の実施形態では、融合タンパク質は、ペプチドリンカーによって分離された2~4個の可溶性TWEAKRポリペプチドを含有する。

【0031】

可溶性TWEAKR多量体を調製する他の方法では、ロイシンジッパードメインが使用される。ロイシンジッパードメインは、それが見いだされるタンパク質の多量体化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、当初いくつかのDNA結合性タンパク質で同定され(Land schulz et al., Science 240:1759, 1988)、それ以来多種多様なタンパク質中に見いだされた。既知のロイシンジッパーの中には、二量体化もしくは三量体化する天然のペプチドおよびそれらの誘導体が含まれる。可溶性多量体タンパク質を産生するのに好適なロイシンジッパードメインの例は、PCT出願WO 94/10308号に記載されている。また肺表面活性物質プロテインD(SPD)に由来するロイシンジッパーがHoppe et al. FEBS Lett. 344:191, 1994に記載されている。Fanslow et al., Semin. Immunol. 6:267, 1994には、ロイシンジッパーに融合された異種タンパク質の安定な三量体化を可能にする改変ロイシンジッパーの使用についての記載がある。ロイシンジッパーペプチドに融合された可溶性TWEAKRポリペプチドを含む組換え融合タンパク質は、好適な宿主細胞中で発現され、そして生成した可溶性TWEAKR多量体は、培養液上清から回収される。

【0032】

いくつかの用途では、本発明の可溶性TWEAKR多量体は、単量体形態を使用するよりも優れた特定の利点を提供すると考えられる。たとえば、Fc融合ポリペプチドは典型的には、未改変ポリペプチドと比較して増加したin vivo半減期を呈する。

【0033】

本発明には、血管形成もしくは他のTWEAKR媒介応答を抑制する能力を保有する種々の形態の可溶性TWEAKR多量体の使用が包含される。「可溶性TWEAKR多量体」という用語は、天然のTWEAKR細胞外ドメインの全部もしくは一部分を含有する多量体だけでなく関連形態をも包含するものとみなされる。関連形態としては、可溶性TWEAKRの(a)断片、(b)変異体、(c)誘導体、および(d)融合ポリペプチドからなる多量体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。血管形成もしくは他のTWEAKR媒介応答を抑制するこれらの関連形態の能力は、実施例に例示されるような方法を用いてまたは当技術分野で公知の他のアッセイを用いて、in vitroもしくはin vivoで調べる事が可能である。

【0034】

本発明を実施するのに有用な可溶性TWEAKRポリペプチドおよび可溶性TWEAKR多量体の中には、リガンドに結合する能力および/または血管形成もしくは他のTWEAKR媒介応答を抑制する能力を保有するTWEAKR変異体が含まれる。そのようなTWEAKR変異体としては、天然のTWEAKRに実質的に相同であるが1つ以上の欠失、挿入もしくは置換を有するという点で天然のTWEAKRのものとは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。特定の実施形態には、天然のTWEAKR配列と比較したときに1~10個のアミノ酸残基の欠失、挿入も

10

20

30

40

50

しくは置換を含むTWEAKRポリペプチドが包含されるが、これらに限定されるものではない。TWEAKRポリペプチドの変異体としては、対立形質形態および選択的スプライス形態のような天然に存在する変異体、ならびにTWEAKRポリペプチドのアミノ酸配列もしくはTWEAKRポリペプチドをコードする核酸のヌクレオチド配列を改変することにより構築された変異体が挙げられる。

【0035】

一般的には、天然のポリペプチド中に存在する1個以上のアミノ酸の置換は、保存的に行わなければならない。保存的置換の例としては、活性ドメイン(複数可)の外側のアミノ酸の置換ならびにTWEAKRの2次および/または3次構造を改変しないアミノ酸の置換が挙げられる。このほかの例としては、Ile、Val、Leu、もしくはAlaを互いと置換する場合のように1個の脂肪族残基を他の脂肪族残基で置換すること、またはLysとArg、GluとAsp、もしくはGlnとAsnを置換する場合のように1個の極性残基を他の極性残基で置換すること、あるいはPhe、Trp、もしくはTyrを互いと置換する場合のように1個の芳香族残基を他の芳香族残基で置換することが挙げられる。他のそのような保存的置換、たとえば、類似の疎水的特性を有する全領域の置換などは、当技術分野で公知である。

【0036】

いくつかの好ましい実施形態では、TWEAKR変異体は、天然のTWEAKRのアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも約70%同一であり、いくつかの好ましい実施形態では、TWEAKR変異体は、天然のTWEAKRのアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも約80%同一である。いくつかのより好ましい実施形態では、TWEAKR変異体は、天然のTWEAKRのアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも約90%同一であり、いくつかのより好ましい実施形態では、TWEAKR変異体は、天然のTWEAKRのアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも約95%同一である。いくつかの最も好ましい実施形態では、TWEAKR変異体は、天然のTWEAKRのアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも約98%同一であり、いくつかの最も好ましい実施形態では、TWEAKR変異体は、天然のTWEAKRのアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも約99%同一である。同一性パーセントは、ポリペプチドおよび核酸のいずれについても、目視検査により決定することができる。また、同一性パーセントは、SmithおよびWaterman (Adv. Appl. Math 2:482, 1981)によって改訂されたNeedlemanおよびWunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970)のアライメント法を用いて決定してもよい。好ましくは、同一性パーセントは、コンピュータープログラム、たとえば、Genetics Computer Groupから入手可能なGAPコンピュータープログラムのバージョン10.xなどを用いて決定される (GCG; Madison, WI、このほか、Devereux, et al., Nucl. Acids Res. 12:387, 1984も参照されたい)。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターとしては、次のものが挙げられる: (1)ヌクレオチドに対して単項比較マトリクス(同一のときは1、同一でないときは0の値を有する)を使用し、アミノ酸に対して、SchwartzおよびDayhoff編, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979で説明されているようにGribskovおよびBurgess (Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986)の重み付き比較マトリクスを使用する; (2)各ギャップに対して30(アミノ酸)もしくは50(ヌクレオチド)のペナルティーを使用し、各ギャップ中のそれぞれのシンボルに対してさらに1(アミノ酸)もしくは3(ヌクレオチド)のペナルティーを使用する; (3)エンドギャップに対してペナルティーを使用しない; (4)ロングギャップに対して最大ペナルティーを使用しない。当業者により用いられている他の配列比較用プログラムを使用してもよい。TWEAKRの断片の場合には、断片中に存在するTWEAKRの該当部分を基準にして同一性パーセントが計算される。

【0037】

本発明にはさらに、関連する天然パターンのグリコシル化を受けたかもしくは受けていない可溶性TWEAKRポリペプチドの使用が包含される。酵母もしくは哺乳動物の発現系(たとえば、COS-1もしくはCOS-7細胞)で発現されたTWEAKRは、発現系の選択に応じて、分子量およびグリコシル化パターンが天然のTWEAKRポリペプチドと類似していることもあるし、著しく異なることもある。大腸菌のような細菌の発現系でTWEAKRポリペプチドを発現させ

10

20

30

40

50

ると、非グリコシル化分子が得られる。また、異なる宿主細胞はポリペプチドを示差的にプロセシングする可能性があるため、結果として、さまざまなNもしくはC末端を有するポリペプチドの不均一混合物が得られることもある。

【0038】

誘導体を作製するために、グリコシル基、脂質、ホスフェート、アセチル基などのような他の化学部分を用いて共有結合型もしくは凝集型コンジュゲートを形成することにより、可溶性TWEAKRポリペプチドの1次アミノ酸構造を改変してもよい。TWEAKRの共有結合型誘導体は、特定の官能基をTWEAKRアミノ酸の側鎖またはTWEAKRポリペプチドのN末端もしくはC末端に結合させることにより調製することが可能である。

【0039】

本発明を実施するのに有用な可溶性TWEAKRの融合ポリペプチドとしては、このほかに、新規な多官能性物質を提供する他のポリペプチドが付加されたTWEAKRポリペプチドの共有結合型もしくは凝集型コンジュゲートが挙げられる。

【0040】

C. TWEAK受容体抗体

本発明の1態様は、TWEAKR細胞外ドメインの抗原エピトープに関する。そのようなエピトープは、抗体、特に以下に詳述されている阻止モノクローナル抗体を作製するのに有用である。そのようなエピトープもしくはその変異体は、固相合成、ポリペプチドの化学的もしくは酵素的開裂などの当技術分野で周知の方法を用いて、または組換えDNA技術を用いて作製することができる。

【0041】

特許請求の範囲に記載された発明には、TWEAKRポリペプチドとの免疫反応を生じる抗体の組成物および用途が含まれる。そのような抗体は、TWEAKRポリペプチドに「特異的に結合する」。このことは、抗体が、非特異的結合による相互作用ではなく抗体の抗原結合部位を介して結合することを意味する。「抗体」という用語は、本明細書中では最も広義に使用され、たとえば、インタクトなモノクローナルおよびポリクローナル抗体、さらにはFv、Fab、およびF(ab')₂フラグメントのようなフラグメント、scFvのような1本鎖抗体、および種々の鎖状結合体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体は、好ましくは、ヒト化抗体、より好ましくはヒト抗体である。抗体は、さまざまな周知の方法を用いて調製することが可能である。たとえば、天然のもしくはトランスジェニック免疫レパートリーを有する動物の免疫化、ファージディスプレイ、ハイブリドーマおよび組換え細胞培養、ならびにトランスジェニック植物および動物バイオリアクターにより調製することが可能であるが、これらに限定されるものではない。

【0042】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体はいずれも、従来により調製することが可能である。たとえば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses. Kennetら(編), Plenum Press, New York (1980);およびAntibodies: A Laboratory Manual, HarlowおよびLand(編), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)を参照されたい。

【0043】

本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系も、本発明の対象とみなされる。そのようなハイブリドーマは、従来により作製することが可能である。そのようなハイブリドーマ細胞系を作製する方法には、ポリペプチドで動物を免疫すること、免疫された動物から脾臓細胞を採取すること、該脾臓細胞を骨髓腫細胞系に融合してハイブリドーマ細胞を生成すること、および使用したポリペプチドと結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系を同定することが含まれる。ハイブリドーマにより生産されたモノクローナル抗体は、従来により回収することが可能である。

【0044】

本発明のモノクローナル抗体としては、キメラ抗体(たとえば、マウスもしくは他の非ヒ

10

20

30

40

50

ト生物種で最初に生産された抗体を「ヒト化した」抗体)が挙げられる。ヒト化抗体とは、典型的には、非ヒト(たとえば、マウス)抗体の可変領域もしくは少なくともその相補性決定領域(CDR)を含み、残りがヒト抗体由来の免疫グロブリン部分である、操作された抗体を指す。キメラ抗体およびさらなる遺伝子操作モノクローナル抗体を生産する手順については、Riechmannら(Nature 332:323, 1988)、Liuら(PNAS, 84:3439, 1987)、Larrickら(Bio/Technology 7:934, 1989)、ならびにWinterおよびHarris(TIPS 14:139, May, 1993)に報告されている。そのようなヒト化抗体は、公知の方法により調製することが可能であり、こうした抗体をヒトに投与する場合、免疫原性低下の利点を得られる。

【0045】

非ヒト動物中でヒト抗体を生成するために開発されてきた手法を、本発明の抗体の製造に利用することが可能である。抗体は、部分的にヒト抗体であってもよく、好ましくは完全にヒト抗体である。たとえば、1つ以上のヒト免疫グロブリン鎖をコードする遺伝物質が導入されたトランスジェニックマウスを利用することが可能である。そのようなマウスは、さまざまな方法で遺伝子的に改変されうる。遺伝子操作を行えば、免疫時に動物により生産される抗体の少なくとも一部、好ましくは実質的に全部において、内因性免疫グロブリン鎖がヒト免疫グロブリンポリペプチド鎖と交換されることになる。

【0046】

1つ以上の内因性免疫グロブリン遺伝子が種々の手段によって不活性化されたマウスが調製されている。ヒト免疫グロブリン遺伝子は、不活性化されたマウス遺伝子を交換するようにマウスに導入されている。動物中で生産される抗体には、動物に導入されたヒト遺伝物質によりコードされるヒト免疫グロブリンポリペプチド鎖が組み込まれている。抗体を作製するためにそのようなトランスジェニック動物を生産および使用する方法(「トランスジェニック抗体」と呼ばれることもある)については、たとえば、米国特許第5,814,318号、同第5,569,825号、および同第5,545,806号に記載されている。これらの特許は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【0047】

D. 抑制性アンチセンス、リボザイムおよび三重らせん法

周知のアンチセンス、遺伝子「ノックアウト」、リボザイム、および/または三重らせん法と組み合わせてTWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子配列を使用して、TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子発現のレベルを減少させることによりTWEAKR遺伝子発現および/またはTWEAK受容体-リガンド相互作用のレベルを減少させることによって、組織もしくは細胞集団における血管形成の調節を改善することが可能である。血管形成を調節する能力を含めてTWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子の活性、発現もしくは合成を調節する能力を呈しうる化合物としては、アンチセンス、リボザイムおよび三重らせん分子が挙げられる。そのような分子は、欠陥のない標的遺伝子もしくは適切な場合には突然変異のある標的遺伝子のいずれかの活性を低減もしくは阻害するように設計することが可能である。そのような分子を生産および使用する方法は、当業者には周知である。

【0048】

E. TWEAK受容体ポリペプチドの組換え生産

本発明で使用されるTWEAKRポリペプチド、たとえば、可溶性TWEAKRポリペプチド、断片、融合ポリペプチドなどは、組換えの発現系を用いて調製することが可能である。TWEAKRポリペプチドをコードする組換え発現ベクターを用いて形質転換した宿主細胞(「組換え宿主細胞」)をTWEAKRの発現を促進する条件下で培養し、そしてTWEAKRを回収する。トランスジェニック植物もしくは動物中で、または化学合成によって、TWEAKRポリペプチドを生産することもできる。

【0049】

本発明には、本発明で使用されるTWEAKRポリペプチドをコードする核酸分子が包含される。そのような核酸分子としては、(a)配列番号7の残基28~79をコードする核酸およびTWEAKに結合するその断片; (b) (a)の核酸と少なくとも70%、80%、90%、95%、98%、もしくは99%同一であり、かつTWEAKに結合しうるポリペプチドをコードする核酸;および(c)中程度

10

20

30

40

50

のストリンジェンシーで(a)の核酸にハイブリダイズし、かつTWEAKRに結合しうるポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。

【0050】

遺伝暗号の縮重により、同一のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にかなりの変動がありうる。本発明に係る実施形態としては、中程度のストリンジェンシー条件下(たとえば、5×SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0)の前洗浄溶液、および50℃、5×SSC、一晩のハイブリダイゼーション条件)でTWEAKRをコードするDNA配列にハイブリダイズ可能な核酸配列が挙げられる。当業者であれば、中程度のハイブリダイゼーションストリンジェンシーを構成する塩および温度のさらなる組み合わせを決定することができる(Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982; およびAusubel, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, 1989ならびに改訂版も参照されたい。これらの文献は参照により本明細書に組み入れられるものとする)。より高いストリンジェンシーの条件としては、ハイブリダイゼーション温度およびハイブリダイゼーション後の洗浄温度をより高くすること、ならびに/あるいは塩濃度をより低くすることが挙げられる。核酸の同一性パーセントは、ポリペプチドに対して先に記載した方法を用いて、すなわち、目視検査による方法およびGAPのようなコンピュータープログラムを用いる方法により、決定することが可能である。

【0051】

組換えTWEAKRを生産するために、任意の好適な発現系を利用することが可能である。組換え発現ベクターとしては、たとえば、哺乳動物、微生物、ウイルス、もしくは昆虫の遺伝子に由来する好適な転写および翻訳調節ヌクレオチド配列と機能しうる形で連結された、TWEAKRポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。調節配列がTWEAKR DNA配列と機能的に関係する場合、ヌクレオチド配列は機能しうる形で連結されている。したがって、プロモーターヌクレオチド配列がTWEAKR DNA配列の転写を制御するならば、プロモーターヌクレオチド配列はTWEAKR DNA配列に機能しうる形で結合されている。調節配列としては、たとえば、転写プロモーター、オペレーター、もしくはエンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、ならびに転写および翻訳の開始および終了を制御する適切な配列が挙げられる。適切なシグナルペプチドをコードする配列(天然もしくは異種)を発現ベクター中に組み入れることができる。シグナルペプチドを含む融合タンパク質としてTWEAKRポリペプチドが最初に翻訳されるように、シグナルペプチドに関するDNA配列(分泌リーダー、リーダーペプチド、もしくはリーダーを含めてさまざまな名称で呼ばれている)は、TWEAKR配列とフレーム枠をあわせて融合させることが可能である。対象の宿主細胞中で機能的であるシグナルペプチドは、TWEAKRポリペプチドの細胞外分泌を促進する。シグナルペプチドは、細胞からのTWEAKRの分泌時にTWEAKRポリペプチドから切断される。

【0052】

TWEAKRポリペプチドの発現に好適な宿主細胞としては、原核細胞、酵母およびより高等な真核細胞、たとえば、昆虫および哺乳動物の細胞が挙げられる。細菌、真菌、酵母、昆虫、および哺乳動物の細胞宿主と併用するのに適切なクローニングおよび発現ベクターについては、たとえば、Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985に記載されている。

【0053】

原核生物としては、グラム陰性もしくはグラム陽性の生物、たとえば、大腸菌もしくは桿菌が挙げられる。形質転換に好適な原核宿主細胞としては、たとえば、大腸菌、枯草菌、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、ならびにシュードモナス属、ストレプトミセス属、およびスタフィロコッカス属のさまざまな他の種が挙げられる。大腸菌のような原核宿主細胞の場合、原核宿主細胞中での組換えポリペプチドの発現を促進するために、TWEAKRポリペプチドはN末端メチオニン残基を含んでいてもよい。N末端Metは、発現された組換えポリペプチドから切断することが可能である。

【0054】

原核宿主細胞で使用される発現ベクターは、一般的には、表現型選択が可能なマーカー遺伝子を1つ以上含んでいる。表現型選択が可能なマーカー遺伝子は、たとえば、抗生物質耐性を付与するかもしくは独立栄養要求性を補完するタンパク質をコードする遺伝子である。原核宿主細胞に有用な発現ベクターとしては、たとえば、クローニングベクターpBR322(ATCC 37017)のような市販のプラスミドから誘導されたものが挙げられる。pBR322は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を含っており、したがって、形質転換細胞を同定するための単純な手段を提供する。適切なプロモーターおよびTWEAKR DNA配列を、pBR322ベクター中に挿入する。他の市販のベクターとしては、たとえば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)およびpGEM1 (Promega Biotec. Madison, WI, USA)が挙げられる。

10

【0055】

組換え原核宿主細胞用発現ベクターに一般に使用されるプロモーター配列としては、 β -ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)、ラクトースプロモーター系(Chang et al., Nature 275: 615, 1978; Goeddel et al., Nature 281:544, 1979)、トリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980; EP-A-36776)およびtacプロモーター(Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p.412, 1982)が挙げられる。特に有用な原核宿主細胞発現系は、ファージ P_L プロモーターおよびcl857ts熱不安定性リプレッサー配列を利用する。American Type Culture Collectionから入手可能で P_L プロモーターの誘導体が組み込まれているプラスミドベクターとしては、プラスミドpHUB2 (大腸菌JMB9株, ATCC 37092に内在)およびpPLc28(大腸菌RRI株, ATCC 53082に内在)が挙げられる。

20

【0056】

TWEAKRポリペプチドはまた、酵母宿主細胞中で、好ましくはサッカロミセス属(たとえば、*S. セレビシエ*)由来の酵母宿主細胞中で、発現させることも可能である。ピヒア属もしくはクルイベロミセス属のような他の属の酵母を利用することも可能である。酵母ベクターは、多くの場合、2 μ 酵母プラスミド由来の複製起点配列、自己複製配列(ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化のための配列、転写終止配列、および選択可能なマーカー遺伝子を含むであろう。酵母ベクターに好適なプロモーター配列としては、特に、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255: 2073, 1980)もしくは他の解糖酵素(Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; Holland et al., Biochem. 17:4900, 1978)、たとえば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホ-グルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼ、に対するプロモーターが挙げられる。酵母発現に使用される他の好適なベクターおよびプロモーターについては、Hitzeman、EPA-73、657に詳細に記載されている。このほかに、Russellら(J. Biol. Chem. 258:2674, 1982)およびBeierら(Nature 300:724, 1982)により報告されたグルコース抑制性ADH2プロモーターがある。大腸菌中で選択および複製を行うためのpBR322由来DNA配列(Amp^r遺伝子および複製開始点)を上記の酵母ベクターに挿入することにより、酵母と大腸菌の両方で複製可能なシャトルベクターを構築することが可能である。

30

40

【0057】

組換えポリペプチドの分泌を指令するために、酵母 α -因子リーダー配列を利用することが可能である。 α -因子リーダー配列は、多くの場合、プロモーター配列と構造遺伝子配列との間に挿入される。たとえば、Kurjan et al., Cell 30:933, 1982; Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330, 1984を参照されたい。酵母宿主からの組換えポリペプチドの分泌を促進するために好適な他のリーダー配列は、当業者に公知である。1つ以上の制限部位を含むように、リーダー配列の3'末端近傍を改変してもよい。このようにすると、構造遺伝子へのリーダー配列の融合が容易となる。

【0058】

50

酵母形質転換プロトコルは、当業者に公知である。そのような1つのプロトコルは、Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978に記載されている。Hinnenらのプロトコルでは、0.67%酵母窒素塩基、0.5%カザミノ酸、2%グルコース、10 µg/ml アデニンおよび20 µg/ml ウラシルからなる選択培地中でTrp⁺形質転換体が選択される。

【0059】

ADH2プロモーター配列を含有するベクターにより形質転換された酵母宿主細胞は、「富栄養」培地中で発現を誘導するために増殖させることが可能である。富栄養培地の例は、1%酵母抽出物、2%ペプトン、および1%グルコースに、80 µg/ml アデニンおよび80 µg/ml ウラシルを添加してなる培地である。グルコースが培地から枯渇すると、ADH2プロモーターの抑制解除が起こる。

10

【0060】

可溶性TWEAKRポリペプチドなどの組換えTWEAKRポリペプチドを発現させるために、昆虫宿主細胞培養系を利用することも可能である。昆虫細胞で異種ポリペプチドを生産するためのバキュロウイルス系について、Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47, 1988に概説されている。

【0061】

哺乳動物細胞は、宿主細胞として使用するのに特に好ましい。好適な哺乳動物宿主細胞系としては、たとえば、サル腎細胞のCOS-7系(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., Cell 23:175, 1981)、L細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、およびBHK(ATCC CRL 10)細胞系、ならびにMcMahanら(EMBO J. 10:2821, 1991)に記載されているようなアフリカミドリザル腎細胞系CV 1(ATCC CCL 70)由来のCV1/EBNA細胞系が挙げられる。治療用ポリペプチドを生産する場合、動物性タンパク質を含有していない培地中で増殖するように適応させた哺乳動物宿主細胞系を使用することが特に有利である。

20

【0062】

哺乳動物細胞にDNAを導入するための確立された方法が、Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69に記載されている。Lipofectamine(Gibco/BRL)もしくはLipofectamine-Plusのような市販の試薬を用いる他のプロトコルを細胞のトランスフェクションに使用することもできる(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987)。このほか、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989に記載されているような従来の手順を用いて哺乳動物細胞をトランスフェクトすべくエレクトロポレーションを使用することもできる。安定な形質転換体の選択は、当技術分野で公知の方法を用いて、たとえば、細胞傷害性薬物に対する耐性を利用して行なうことができる。Kaufman et al., Meth. in Enzymology 185:487, 1990には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)耐性などのいくつかの選択スキームが記載されている。DHFR選択に好適な宿主株は、DHFRを欠損するCHO DX-B11株であってもよい(Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980)。DHFR cDNAを発現するプラスミドをDX-B11株に導入することができる。そしてそのプラスミドを含有している細胞だけが適切な選択培地中で増殖することができる。発現ベクターに組み入れることのできる選択可能なマーカーの他の例としては、G418およびヒグロマイシンBのような抗生物質に対する耐性を付与するcDNAが挙げられる。このベクターを保有する細胞は、これらの化合物に対する耐性に基づいて選択することができる。

30

40

【0063】

哺乳動物宿主細胞用発現ベクターに対する転写および翻訳制御配列は、ウィルスゲノムから切り出すことができる。一般に使用されるプロモーター配列およびエンハンサー配列は、ポリオーマウィルス、アデノウイルス2、シミアンウィルス40(SV40)、およびヒトサイトメガロウィルスに由来する。SV40ウィルスゲノムに由来するDNA配列、たとえば、SV40起点、初期および後期プロモーター、エンハンサー、スプライス部位、ならびにポリアデニル化部位は、哺乳動物宿主細胞中で構造遺伝子配列を発現させるための他の遺伝的エレメントを提供すべく使用することができる。ウィルスの初期および後期プロモーターは

50

、いずれもウィルスゲノムから断片として容易に取得されるので特に有用であり、ウィルスの複製起点を含有することもある(Fiers et al., Nature 273:113, 1978 ; Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990)。SV40ウィルス複製起点部位に位置するBgl I部位の方向にHind III部位から伸長する約250bpの配列が含まれている限り、より小さいかもしくはより大きいSV40断片を使用することもできる。

【 0 0 6 4 】

哺乳動物発現ベクターからの異種遺伝子の発現を改良することが実証されている他の制御配列としては、CHO細胞由来の発現増強配列エレメント(EASE)のようなエレメント(Morris et al., Animal Cell Technology, 1997, pp. 529-534)ならびにアデノウイルス2由来の三分節リーダー(TPL)およびVA遺伝子RNA (Gingeras et al., J. Biol. Chem. 257:13475, 1982)が挙げられる。ウィルス起源の内部リボソームエンタリー部位(IRES)配列は、ジシストロン性mRNAの効率的な翻訳を可能にする(Oh and Sarnow, Current Opinion in Genetics and Development 3:295, 1993 ; Ramesh et al., Nucleic Acids Research 24:2697, 1996)。ジシストロン性mRNAの一部として異種cDNAを発現させ、それに続いて選択可能なマーカー(たとえば、DHFR)の遺伝子を発現させるようにすると、宿主のトランスフェクション能および異種cDNAの発現が改良されることが実証されている(Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990)。ジシストロン性mRNAを利用する例示的な発現ベクターは、Mosser et al., Biotechniques 22:150, 1997に記載されているpTR-DC/GFP、およびMorris et al., Animal Cell Technology, 1997, pp. 529-534に記載されているp2A5Iである。

【 0 0 6 5 】

有用な高発現ベクターpCAVNOTが、Mosley et al., Cell 59:335, 1989に記載されている。哺乳動物宿主細胞で使用される他の発現ベクターは、OkayamaおよびBerg(Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983)により開示されたように構築することができる。C127マウス乳房上皮細胞中で哺乳動物cDNAを安定に高レベルで発現させるのに有用な系は、実質的にCosmanら(Mol. Immunol. 23:935, 1986)の報告に従って構築することができる。Cosman et al., Nature 312:768, 1984に記載されている有用な高発現ベクター(PMLSV N1/N4)は、ATCC 39890として寄託されている。他の有用な哺乳動物発現ベクターは当技術分野で公知である。

【 0 0 6 6 】

TWEAKRポリペプチドを生産するのに利用しうるシグナルペプチドに関して、天然のTWEAKRシグナルペプチドを使用してもよいし、所望により、それを異種のシグナルペプチドもしくはリーダー配列と交換してもよい。シグナルペプチドもしくはリーダーの選択は、組換えTWEAKRの生産が行われる宿主細胞のタイプのような因子に依存しうる。哺乳動物宿主細胞において機能性である異種シグナルペプチドとしては、たとえば、米国特許第4,965,195号に記載されているインターロイキン-7(IL-7)のシグナル配列、Cosman et al., Nature 312:768 (1984)に記載されているインターロイキン-2受容体のシグナル配列；EP 367,566に記載されているインターロイキン-4受容体シグナルペプチド；米国特許第4,968,607号に記載されているI型インターロイキン-1受容体シグナルペプチド；およびEP 460,846に記載されているII型インターロイキン-1受容体シグナルペプチドが挙げられる。

【 0 0 6 7 】

突然変異誘発およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む組換えDNA法を用いて、当業者は、アミノ酸残基もしくは配列の種々の付加もしくは置換、あるいは末端もしくは内部の残基または配列の欠失を含むTWEAKRポリペプチド(例えば、TWEAKR断片、変異体、誘導体、および融合ポリペプチド)をコードするDNA配列を生産することができる。

【 0 0 6 8 】

マウス、ヤギ、ヒツジ、ブタなどのトランスジェニック動物、およびタバコ、トマト、マメ科植物、イネ科植物、穀物などのトランスジェニック植物は、可溶性TWEAKRポリペプチドなどのTWEAKRポリペプチドを生産するためのバイオリアクターとして使用することが可能である。トランスジェニック動物の場合、乳および/または他の体液に可溶性TWEAKRの発現を促進するシス作用性調節配列に機能しうる形で連結されたTWEAKRコード配列を含むキメラDNAを構築することが特に有利である(たとえば、米国特許第5,843,705号；米国特

10

20

30

40

50

許第5,880,327号を参照されたい)。トランスジェニック植物の場合、特定の細胞型、組織、もしくは器官でTWEAKRを生産することが特に有利である(たとえば、米国特許第5,639,947号; 米国特許第5,889,189号を参照されたい)。

【0069】

当業者であれば、発現された可溶性TWEAKRポリペプチドを精製する手順が、利用する宿主系により、また組換えポリペプチドが分泌されるか否かにより変化することはわかるであろう。可溶性TWEAKRポリペプチドは、当技術分野で公知の方法を用いて、たとえば、濃縮、塩析、イオン交換、疎水的相互作用、アフィニティー精製、HPLC、もしくはサイズ排除クロマトグラフィーのうち1つ以上のステップを用いて精製することが可能である。Fc部分を含む融合ポリペプチド(およびそれから形成される多量体)には、プロテインAもしくは

10

【0070】

F. 治療方法

以下に記載されているのは、標的組織中もしくは細胞集団中で血管形成を促進もしくは抑制するために、TWEAK受容体もしくはリガンド、またはTWEAK受容体もしくはリガンドをコードする遺伝子を利用する方法および組成物である。「処置する」、「処置すること」、「処置」、「治療」、「治療用」などの用語は、防止的治療、予防的治療、改善的治療、および治癒的治療を含むものとする。

【0071】

開示したポリペプチド、組成物、および方法は、血管形成もしくは他のTWEAKR媒介応答の阻害を、そのような処置の必要な哺乳動物で行うために使用される。「TWEAKR媒介応答」という用語には、少なくともTWEAKRにTWEAKリガンドが結合することが一因となって惹起されるか、またはTWEAKがTWEAKRに結合するのを阻止するとそのことがすべての原因もしくは一因となって阻害もしくは抑制されうる、任意の細胞的、生理学的、もしくは他の生物学的応答が包含される。治療は、有利には、血管形成により媒介される疾患もしくは症状の発症もしくは再発を防止するか、または血管形成により媒介される疾患もしくは症状を有する哺乳動物を治療するために行われる。血管形成により媒介される疾患および症状としては、眼障害、悪性および転移状態、ならびに炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0072】

本発明により治療しうる眼障害の中には、眼新生血管形成を特徴とする眼疾患が包含され、具体的には、糖尿病性網膜症(糖尿病の主要な併発症)、未熟児網膜症(しばしば慢性視力障害に陥り盲目になる危険性の高いこの壊滅的な眼状態は、未熟児のケア中に生じる重度の併発症である)、血管新生緑内障、網膜芽細胞腫、水晶体後繊維増殖症、皮膚潮紅、葡萄膜炎、黄斑変性、および角膜移植新生血管形成が挙げられるが、これらに限定されるものではない。このほかの眼炎症性疾患、眼腫瘍、および脈絡膜もしくは虹彩新生血管形成に伴う疾患も、本発明により治療することができる。

【0073】

本発明はまた、固形腫瘍のような悪性および転移状態を治療するために使用することもできる。固形腫瘍には、原発性および転移性の肉腫および癌腫の両方が包含される。

40

【0074】

本発明はまた、炎症性疾患、たとえば、限定されるものではないが、関節炎、リウマチ、乾癬などを治療するために使用することもできる。

【0075】

本発明により治療することのできる他の疾患および症状としては、良性腫瘍および前新生物状態、心筋血管形成、血友病性関節、強皮症、血管癒着、アテローム斑新生血管形成、毛細管拡張症、および創傷肉芽化が挙げられる。

【0076】

血管形成依存性の疾患状態としては、心臓、肝臓、脳などのような任意の組織もしくは器

50

官の冠状動脈もしくは末梢動脈アテローム性硬化症および虚血が挙げられる。これらのタイプの疾患は、血管形成を促進する組成物で治療することができる。

【0077】

TWEAKR細胞外ドメインの断片を含むポリペプチド、可溶性TWEAKR多量体、およびTWEAKR細胞外ドメインに結合する抗体のほかに、他の形のTWEAKRアンタゴニストを投与することにより治療効果を達成することもできる。他の形のTWEAKRアンタゴニストとしては、たとえば、TWEAKに対する抗体のような他の抗体、アンチセンス核酸、リボザイム、ムテイン、アプタマー、およびTWEAKRもしくはTWEAKを標的とする小分子が挙げられる。

【0078】

所望の予防もしくは治療活性を確認するために、またヒトに投与する前に最適治療用量を決定するために、本発明に係る方法をin vivo動物モデルで試験することもできる。

10

【0079】

特定の治療方法に有効な特定のTWEAKRアンタゴニストの量は、年齢、処置される症状のタイプおよび重症度、体重、所望の治療期間、投与方法、ならびに他のパラメーターに依存する。有効量は、医師もしくは資格を有する他の医療専門家によって決定される。典型的な有効量は、約0.01mg/kg体重～約100mg/kg体重である。いくつかの好ましい実施形態では、用量は約0.1～50mg/kgであり；いくつかの好ましい実施形態では、用量は約0.5～10mg/kgである。局所的投与の用量は、典型的には、全身的投与のときよりも低い。いくつかの実施形態では、1回投与で十分であり；いくつかの実施形態では、TWEAKRアンタゴニストは1日以上にわたって多数回投与される。

20

【0080】

TWEAKRアンタゴニストは、典型的には、1種以上の薬理的に許容される担体を含む医薬組成物の形で投与される。製薬上許容される担体としては、希釈剤、充填剤、佐剤、賦形剤、ならびに投与経路に関して薬学的に許容されるビヒクルであってもよいし、また、好適な分散剤、湿潤剤、および懸濁化剤を用いて配合された水性もしくは油性の懸濁液であってもよい。

【0081】

製薬上許容される担体は、一般的には、無菌で発熱物質を含まず、例としては、水、油、溶媒、塩、糖および他の炭水化物、乳化剤、緩衝剤、抗菌剤、ならびにキレート化剤が挙げられる。特定の製薬上許容される担体、および活性化化合物と担体との比は、組成物の溶解度および化学的性質、投与の形態、ならびに標準的な医薬品の取扱いによって決定される。

30

【0082】

本明細書に記載の組成物は、バイアル、ボトル、管、シリンジ吸入器または1回もしくは多数回投与用の他の容器に入れることが可能である。そのような容器は、ガラスもしくは高分子材料、たとえば、ポリプロピレン、ポリエチレン、もしくはポリ塩化ビニルなどから作製することが可能である。好ましい容器は、シールもしくは他の閉鎖システム、たとえば、1回用量を取り出すために針を貫通させることが可能であり、次に、針を引き抜いた後、ふたたび密閉しうるゴム栓などを具備する。注射可能な液体、凍結乾燥製剤、再構成用凍結乾燥製剤もしくは当技術分野で公知の再構成可能な注射用粉末に用いられるか、またはエーロゾル化組成物を投与するために用いられるそのような容器はすべて、本発明で開示した組成物および方法に使用されるものとする。

40

【0083】

TWEAKRアンタゴニストは、適応症に適した方法で患者に投与される。したがって、たとえば、TWEAKRアンタゴニスト、もしくはその医薬組成物は、静脈内、経皮、皮内、腹腔内、筋肉内、鼻腔内、硬膜外、経口、局所、皮下、腔内、インプラントからの徐放性放出により、ぜん動経路で、もしくは他の任意の好適な方法によって投与されうる。非経口投与が好ましい。

【0084】

特許請求の範囲に記載の発明の特定の実施形態では、治療にはさらに、1種以上の別の化

50

学療法剤で哺乳動物を処置することが含まれる。別の化学療法剤(複数種も可)は、TWEAKRアンタゴニストの投与前、投与時、もしくは投与後に投与することが可能である。治療対象の哺乳動物が固形腫瘍を有する場合、2種以上の化学療法剤を使用することが特に有利である。特許請求の範囲に記載された本発明のいくつかの実施形態では、治療にはさらに、放射線で哺乳動物を処置することが含まれる。放射線は、近接照射療法や遠隔照射法などで、第2の化学療法剤(複数種も可)および/またはTWEAKRアンタゴニストの投与前、投与時、もしくは投与後に投与することが可能である。

【0085】

治療対象の哺乳動物が固形腫瘍を有する場合、当該方法には、好ましくは、TWEAKRアンタゴニストに加えて、アルキル化剤、代謝拮抗物質、ビンカアルカロイドおよび他の植物由来化学療法剤、ニトロソウレア、抗腫瘍抗生物質、抗腫瘍酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、白金類似体、副腎皮質抑制剤、ホルモン、ホルモン作動薬および拮抗薬、抗体、免疫療法剤、血液細胞因子、放射線療法剤、ならびに生物学的応答調節剤からなる群より選択された1種以上の化学療法剤を投与することが含まれる。

【0086】

いくつかの好ましい実施形態では、当該方法には、TWEAKRアンタゴニストに加えて、シスプラチン、シクロホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ブレオマイシン、カルボプラチン、フルオロウラシル、5-フルオロデオキシウリジン、メトトレキセート、タキソール、アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、およびビンブラスチン、リンフォカインおよびサイトカイン(たとえば、インターロイキン、インターフェロン(、 、もしくはを含む)、およびTNF)、クロラムブシル、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、シタラピン、メルカプトプリン、チオグアニン、ビンデシン、エトポシド、テニポシド、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、マイトマイシン、L-アスパラギナーゼ、ヒドロキシウレア、メチルヒドラジン、ミトタン、タモキシフェン、ならびにフルオキシメステロンからなる群より選択された1種以上の化学療法剤を投与することが含まれる。

【0087】

いくつかの好ましい実施形態では、当該方法には、TWEAKRアンタゴニストに加えて、Flt3リガンド、CD40リガンド、インターロイキン-2、インターロイキン-12、4-1BBリガンド、抗4-1BB抗体、TNFアンタゴニストおよびTNF受容体アンタゴニスト、TRAIL、VEGFアンタゴニスト、VEGF受容体(Flt1およびFlk1もしくはKDRとしても知られるVEGF-R1およびVEGF-R2を含む)アンタゴニスト、Tekアンタゴニスト、およびCD148(DEP-1、ECRTPおよびPTPRJとも呼ばれる。Takahashi et al., J. Am. Soc. Nephrol. 10:2135-45, 1999を参照されたい)アゴニストからなる群より選択された1種以上の化学療法剤(種々のその可溶形態を含む)を投与することが含まれる。いくつかの好ましい実施形態では、本発明のTWEAKRアンタゴニストは、BrowderらおよびKlementら(Cancer Research 60:1878, 2000; J. Clin. Invest. 105(8):R15, 2000; このほかBarinaga, Science 288:245, 2000をも参照されたい)によって報告されているような「調律的(metronomic)治療」の1要素として、もしくはそれと組み合わせて使用される。

【0088】

本発明のポリペプチド、組成物、および方法は、最初に行う処置として、一次治療の後に残留する疾患を治療するために、または他の療法、たとえば、化学療法、外科療法、放射線療法、当技術分野で公知の他の治療法などに対する補助的治療として、使用することが可能である。

【0089】

本発明の核酸配列を本明細書に開示された方法に従って送達する場合、配列が細胞に組み込まれて発現されるような送達機構を使用することが有利である。意図した方法で有利に利用しうる送達系には、たとえば、レトロウイルスおよびアデノウイルスベクターのようなウイルス送達系、ならびに非ウイルス送達系の使用が挙げられる。そのような送達系は

10

20

30

40

50

当業者に周知である。

【0090】

G. スクリーニング方法

本明細書に記載のTWEAK受容体は、たとえば、TWEAKRアゴニストおよびアンタゴニストを単離すべく、さまざまなスクリーニング方法で 사용할 ことが可能である。TWEAKRアゴニストとは、TWEAKRの生物学的活性を促進する化合物であり、そしてTWEAKRアンタゴニストとは、TWEAKRの生物学的活性を阻害する化合物である。以下のスクリーニングアッセイによって同定された化合物は、さまざまな疾患状態を治療すべく血管形成を調節するための組成物および方法で 사용할 ことができる。本発明は、(1)標的組織もしくは細胞においてTWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子発現を調節するか、(2) TWEAK受容体-リガンド相互作用を調節して血管形成を調節するか、(3) TWEAK受容体もしくはリガンドに結合して血管形成に影響を及ぼすか、または(4)血管形成のような下流の事象に及ぼす、結合したTWEAK受容体-リガンド複合体の影響を妨害もしくは調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。

【0091】

TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子の活性を調節する(すなわち、TWEAK遺伝子発現のレベルを調節するおよび/またはTWEAK遺伝子産物活性のレベルを調節する)化合物を同定するように設計されたアッセイを使用することも本発明に包含されるとみなされる。さらに、TWEAK遺伝子調節配列(たとえば、プロモーター配列。Platt, 1994, J. Biol. Chem. 269, 28558-28562などを参照されたい)に結合してTWEAK遺伝子発現のレベルを調節しうる化合物を同定するアッセイを利用することも可能である。

【0092】

そのようなアッセイでは、たとえば、TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子の転写および翻訳が行われる対照系を使用して、TWEAK遺伝子の正常な転写もしくは翻訳に影響を及ぼすことが疑われる試験化合物を含む系と比較することが可能である。たとえば、心臓細胞によって生産されたTWEAK受容体RNAの単位時間あたりの量を測定し、これを用いて、試験化合物がその量に影響を及ぼすかどうかを判定することができる。この正常な転写量に影響を及ぼすことが疑われる試験化合物の影響を評価するために、最初に、たとえば、ノーザンブロット法により心臓細胞培養物中のTWEAK受容体RNAの生産量が決定されるであろう。次に、試験化合物が存在することを除けば対照培養物のときと同一の条件下で、心臓細胞培養物に試験化合物を投与することができる。その後、たとえば、ノーザンブロット法により、試験化合物で処理された培養物中のTWEAK受容体RNAの単位時間あたりの量を測定し、対照培養細胞によって生産されたTWEAK受容体RNAの量と比較することができる。対照細胞と比較して、試験化合物と接触させた細胞中でTWEAK受容体RNAが増加していれば、心臓細胞におけるTWEAK受容体遺伝子の転写および/または翻訳の刺激剤であることが示唆され、減少していれば、心臓細胞におけるTWEAK受容体遺伝子の転写および/または翻訳の阻害剤であることが示唆される。

【0093】

TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子発現のレベルを決定するために使用することができるとともに、TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子発現のレベルに及ぼす試験化合物の影響を決定するためのアッセイで使用するさまざまな他の方法が存在する。たとえば、TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子を発現させることが知られているか、もしくは、その可能性のある細胞型もしくは組織(例えば、心臓等)を、ハイブリダイゼーション法もしくはPCR法を利用して単離および試験することが可能である。単離される細胞は、細胞培養物に由来するものであってもよいし、患者に由来するものであってもよい。培養物から採取された細胞の分析は、細胞ベースの遺伝子療法の一部として使用される細胞を評価したり、TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子の発現に及ぼす化合物の影響を試験したりするのに必要なステップとなりうる。そのような分析を行えば、TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子発現の活性化もしくは不活性化を含めて、TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子の発現パターンの定量的および定性的側面が明らかになる可能性がある。

【0094】

そのような検出スキームの1実施形態では、対象のRNA分子からcDNA分子が合成される(たとえば、RNA分子からcDNAへの逆転写によって)。次に、cDNA内の配列を、PCR増幅反応などのような核酸増幅反応の鋳型として使用する。この方法の逆転写ステップおよび核酸増幅ステップで合成開始試薬(たとえば、プライマー)として使用される核酸試薬は、上記のTWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子核酸セグメントの中から選択される。そのような核酸試薬の好ましい長さは、少なくとも9~30ヌクレオチドである。増幅された生成物の検出を行うために、放射能もしくは非放射能標識ヌクレオチドを用いて核酸増幅を行うことが可能である。このほか、標準的なエチジウムブロミド染色により、もしくは他の任意の好適な核酸染色法を利用することにより生成物を目視観測できるように、十分に増幅された生成物を作製することも可能である。

10

【0095】

このほか、そのようなTWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子発現アッセイを「in situ」で、すなわち、生検もしくは切除により得られた患者組織の組織切片(固定および/または凍結)を用いて直接に行うことが可能であり、その場合、核酸精製の必要はない。先に記載したTWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子核酸セグメントは、そのようなin situ手順においてプローブおよび/またはプライマーとして使用することができる(たとえば、Nuovo, G. J., 1992, "PCR In Situ Hybridization: Protocols And Applications", Raven Press, NYを参照されたい)。

【0096】

本明細書に記載されているようなアッセイにより同定される化合物は、たとえば、TWEAK受容体-リガンド相互作用による影響を受ける血管形成を調節するのに有用であると考えられる。TWEAKの影響下にある血管形成を刺激もしくは阻害するような方法について、本明細書で説明する。

20

【0097】

このほか、本発明のTWEAK受容体もしくはリガンドのポリペプチドに結合しうる化合物を同定するようにアッセイ系をデザインすることにより、この相互作用に起因した血管形成に影響を及ぼすことが可能である。同定された化合物は、たとえば、標的組織もしくは細胞の血管新生を調節するのに有用であるか、正常なTWEAK受容体-リガンド相互作用を破壊する化合物を同定すべくスクリーニングを行うのに利用されるか、またはそれ自体でそのような相互作用を破壊すると考えられる。

30

【0098】

TWEAK受容体もしくはリガンドに結合する化合物を同定するのに使用されるアッセイの原理には、2つの成分が相互作用および結合して回収および/または反応混合物中での検出が可能な複合体を形成するのに十分な条件および時間でTWEAK受容体もしくはリガンドと試験化合物との反応混合物を調製することが含まれる。こうしたアッセイはさまざまな方法で行うことができる。たとえば、TWEAK受容体に結合する化合物をスクリーニングするそのようなアッセイを行う1方法には、TWEAK受容体もしくは試験物質を固相に固着させること、および反応終了時に固相に固着されたTWEAK受容体/試験化合物複合体を検出することが含まれるであろう。そのような方法の1実施形態では、TWEAK受容体を固体表面に固着させ、そして固着させない試験化合物を直接的もしくは間接的に標識してもよい。このほか、受容体ではなくTWEAKリガンドに結合する試験化合物をスクリーニングするために、これと同一の方法を使用することができる。

40

【0099】

實際上、マイクロタイタープレートを固相として便利に利用することができる。固着成分は、非共有結合もしくは共有結合によって固定されうる。非共有結合は、タンパク質の溶液で単に固体表面を被覆して乾燥させることによって形成しうる。このほか、固定化抗体、好ましくは、固定されるタンパク質に特異的なモノクローナル抗体を、固体表面にタンパク質を固定するのに使用することが可能である。あらかじめ表面を調製し保存しておくことも可能である。

50

【0100】

アッセイを行うために、固着成分を含有する被覆表面に非固定成分を添加する。反応終了後、生成した複合体がいずれも固体表面に固定された状態で保持されるような条件下で、未反応成分を除去する(たとえば、洗浄によって)。固体表面に固定された複合体の検出は、いくつかの方法で行うことができる。前固定されない成分が前標識されている場合、表面に固定された標識が検出されれば、複合体が形成されたことが示唆される。事前固定されない成分が前標識されていない場合、間接的標識を用いて、たとえば、事前固定されない成分に特異的な標識抗体を用いて(次に、この抗体を、標識された抗Ig抗体で直接的に標識するかもしくは間接的に標識することが可能である)、表面に固着された複合体を検出することができる。

10

【0101】

このほか、反応を液相中で行い、反応生成物を未反応成分から分離し、そして複合体を検出することができる。たとえば、TWEAK受容体もしくはリガンドまたは試験化合物に特異的な固定化抗体を用いて、溶液中に生成したすべての複合体を固着させ、そしてこうして形成される複合体の他の成分に特異的な標識抗体を用いて、固着された複合体を検出することができる。

【0102】

TWEAK受容体もしくはTWEAKリガンドのいずれかに対する結合剤として同定された化合物が、以下に記載されているようにTWEAK受容体-リガンド相互作用を妨害することにより、TWEAK受容体-リガンド相互作用に起因した血管形成を抑制もしくは促進する能力を、さらに評価することも可能である。その後、血管形成を刺激もしくは阻害すべく、そのような化合物を治療に使用することが可能である。

20

【0103】

開示したTWEAK受容体もしくはリガンドと特異的に相互作用して、これらの分子間の相互作用を阻害(アンタゴナイズ)もしくは増強(アゴナイズ)する化合物および小分子を同定するクリーニングアッセイにおいて、本発明のTWEAK受容体およびリガンドのポリペプチドを使用することが可能である。したがって、たとえば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリー、および天然物混合物に由来するアンタゴニストおよびアゴニストを同定するために、本発明のポリペプチドを使用することも可能である。アンタゴニストおよびアゴニストは、本発明のポリペプチドの天然のもしくは改変された基質、リガンド、酵素、受容体などであってもよいし、本発明のポリペプチドの構造的もしくは機能的模擬体であってもよい。本発明のTWEAK受容体-リガンド相互作用に対する可能性のあるアンタゴニストとしては、ポリペプチドの結合部位に結合して占有することにより、それらが相互作用できないようにし、こうしてそれらの正常な能力を損なうことにより血管形成を調節する小分子、ペプチド、および抗体が挙げられる。他の可能性のあるアンタゴニストは、*in vivo*でmRNAにハイブリダイズしてmRNAから本発明のポリペプチドへの翻訳を阻止しうるアンチセンス分子である。可能性のあるアゴニストとしては、本発明のTWEAKポリペプチドに結合して、本発明のTWEAKポリペプチドの開示された相互作用により惹起される血管形成に影響を及ぼす小分子、ペプチドおよび抗体が挙げられる。

30

【0104】

小分子のアゴニストおよびアンタゴニストは、通常10K未満の分子量であり、そして細胞透過の促進、分解に対する抵抗、および生理学的半減期の延長を行ういくつかの生理化学的および薬理的性質をもちうる。(Gibbs, "Pharmaceutical Research in Molecular Oncology," Cell, Vol. 79, (1994)). 本発明のポリペプチドに結合してシグナル伝達カスケードの開始を阻止することにより該ポリペプチドを阻害すべく、抗体(インタクトな分子だけでなく、FabおよびF(ab')₂フラグメントのような断片も含まれる)を使用することが可能である。抗体はヒト化抗体であることが好ましく、より好ましくは、抗体はヒト抗体である。本発明の抗体は、さまざまな周知の方法のいずれかを用いて調製することが可能である。

40

【0105】

50

特定のスクリーニング方法が当技術分野で公知であり、そして多くがハイスループット試験システムに広く組み入れられ、短時間内で多数の試験化合物をスクリーニングすることができるようになってきている。アッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、細胞ベースのアッセイなどを含めて、さまざまなフォーマットで行なうことができる。これらのアッセイフォーマットは、当技術分野で周知である。本発明のスクリーニングアッセイは、化学ライブラリーのスクリーニングに適しており、小分子薬物候補化合物、抗体、ペプチドならびに他のアンタゴニストおよびアゴニストの同定に好適である。

【0106】

TWEAK受容体-リガンド相互作用をアンタゴナイズもしくは阻害する分子を同定する方法の1実施形態には、本発明のポリペプチドを発現する細胞を含有している培地に候補化合物分子を添加すること；候補化合物分子が存在しなければポリペプチドが相互作用するように該培地の条件を変化させること；ならびに結合および血管形成阻害を観測することが含まれる。TWEAK受容体とリガンドとの結合は、当技術分野で周知である先に概説した競合結合アッセイにより決定することができる。この結合の血管形成効果は、細胞増殖アッセイにより、たとえば、細胞密度アッセイもしくは当技術分野で周知の他の細胞増殖アッセイにより決定することができる。次に、候補化合物分子に接触させた細胞の活性を、接触させなかった同一の細胞と比較して、本発明のTWEAKポリペプチド相互作用に対するアゴニストおよびアンタゴニストを同定することが可能である。生物学的活性の測定は、存在するタンパク質の量の測定(たとえば、ELISA)もしくはタンパク質の活性の測定のようないくつかの周知の方法によって行なうことが可能である。生物学的刺激もしくは活性化が減少すれば、アンタゴニストであるとみなされるであろう。増加すれば、アゴニストであるとみなされるであろう。

【0107】

さらに、本発明のTWEAKポリペプチド相互作用に起因した生物学的活性を模擬する分子を見いだすべく、スクリーニングアッセイをデザインすることが可能である。ポリペプチドの生物学的活性を模擬する分子は、ポリペプチドの生物学的活性を増強するのに有用であると考えられる。ポリペプチドの生物学的活性を模擬する治療上有効な薬剤であるかについて化合物を同定するために、最初に、候補化合物分子がポリペプチドに結合するかを決定しなければならない。次に、結合する候補化合物分子を生物学的アッセイに付してその生物学的効果を決定する。その後、候補化合物分子の生物学的効果をポリペプチドのものと比較する。

【0108】

このほか、試験化合物と正常なTWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子タンパク質とを含有する反応混合物内の複合体形成を、試験化合物と突然変異のTWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子タンパク質とを含有する反応混合物内の複合体形成と比較することが可能である。この比較は、正常体ではなく突然変異体であるTWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子タンパク質の相互作用を破壊する化合物を同定することが望ましい場合に重要であると考えられる。

【0109】

TWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用を妨害する化合物のアッセイは、不均一もしくは均一フォーマットで行うことができる。不均一アッセイには、TWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物または結合パートナーのいずれかを固相に固着させて固相に固着された複合体を反応終了時に検出することが含まれる。均一アッセイでは、全反応が液相中で行なわれる。いずれの方法においても、反応物の添加順序を変えることにより、試験されている化合物に関するさまざまな情報を得ることができる。たとえば、TWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用を競合などにより妨害する試験化合物は、試験物質の存在下で反応を行うことにより、すなわち、TWEAK受容体およびリガンド遺伝子産物の前にもしくはそれと同時に反応混合物に試験物質を添加することにより、同定することができる。このほか、前形成された複合体を

破壊する試験化合物、たとえば、複合体の成分のうちの1つを置き換える、より高い結合定数を有する化合物は、複合体が形成された後、反応混合物に試験化合物を添加することにより試験することができる。種々のフォーマットについて以下で簡単に説明する。

【0110】

不均一アッセイ系では、TWEAK受容体もしくはリガンドの遺伝子産物のいずれかを固体表面に固着させ、一方、固着させない種を直接的もしくは間接的に標識する。實際上、マイクロタイタープレートを利用するのが便利である。固着させた種は、非共有結合もしくは共有結合によって固定されうる。非共有結合は、TWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物の溶液で単に固体表面を被覆して乾燥させることによって形成しうる。このほか、固着される種に特異的な固定化抗体を、固体表面に種を固着させるのに使用することが可能である。あらかじめ表面を調製し保存しておくことも可能である。

10

【0111】

アッセイを行うために、試験化合物を有するかもしくは有していない被覆表面に固定種のパートナーを暴露する。反応終了後、未反応成分を除去すると(たとえば、洗浄によって)、生成した複合体はいずれも固体表面に固定された状態で保持されるであろう。非固定種が前標識されている場合、固体表面に固着された複合体の検出は、いくつかの方法で行うことができる。表面に固定された標識が検出されれば、複合体が形成されたことが示唆される。非固定種が前標識されていない場合、間接的標識を用いて、たとえば、事前固定されない種に特異的な標識抗体を用いて(次に、この抗体を、標識された抗Ig抗体で直接的に標識するかもしくは間接的に標識することが可能である)、表面に固着された複合体を検出することができる。反応成分の添加順序に依存して、複合体形成を阻害するかもしくは前形成された複合体を破壊する試験化合物を検出することができる。

20

【0112】

このほか、試験化合物の存在下もしくは不在下で反応を液相中で行い、反応生成物を未反応成分から分離し、そして複合体を検出することができる。たとえば、結合性成分のうちの1つに特異的な固定化抗体を用いて、溶液中に生成したすべての複合体を固着させ、そして他のパートナーに特異的な標識抗体を用いて、固着された複合体を検出することができる。この場合にも、液相への反応物の添加順序に依存して、複合化を阻害するかもしくは前形成された複合体を破壊する試験化合物を検出することができる。

30

【0113】

本発明の他の実施形態において、均一アッセイを使用することができる。この方法では、TWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物の前形成複合体が調製される。この場合、TWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物またはその結合パートナーのうちのいずれかを標識するが、標識によって生成されるシグナルは、複合体形成によりクエンチされる(たとえば、この方法をイムノアッセイに利用したRubensteinの米国特許第4,109,496号を参照されたい)。前形成複合体の種のうちの1つと競合し、それを置き換える試験物質を添加すると、バックグラウンドを超えるシグナルが生成されるであろう。このようにして、TWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物相互作用を破壊する試験物質を同定することができる。

【0114】

特定の実施形態では、固定を行うべく組換えDNA法を用いてTWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物を調製することができる。たとえば、得られる融合タンパク質中で結合活性が保持されるように、pGEX-5X-1のような融合ベクターを用いて、TWEAK受容体もしくはリガンドコード領域をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子に融合させることができる。当技術分野で慣用される方法を用いて、相互作用性結合パートナーを精製し、モノクローナル抗体を作製することができる。この抗体は、たとえば、当技術分野で慣用される方法により、放射性同位体 $<125>I$ で標識することができる。不均一アッセイでは、たとえば、GST-TWEAK受容体もしくはリガンド融合タンパク質をグルタチオン-アガロースビーズに固着させることができる。次に、相互作用および結合を生じさせるように、TWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物を試験化合物の存在下もしくは不在下で添加することができる。反応終了時、未結合物質を洗浄除去し、標識されたモノクローナル抗体を系に添

40

50

加することにより、複合化された成分に結合させることができる。TWEAK受容体およびリガンド遺伝子産物の相互作用は、グルタチオン-アガロースビーズに関連づけられた残存する放射エネルギーを測定することにより検出することができる。試験化合物による相互作用阻害があれば、測定される放射能は減少するであろう。

【0115】

このほか、固体グルタチオン-アガロースビーズの不在下で、GST-TWEAK受容体遺伝子融合タンパク質およびTWEAKリガンド遺伝子産物(またはその逆)を液体中で一緒に混合することができる。これらの種の相互作用時もしくは相互作用後、試験化合物を添加することができる。次に、この混合物をグルタチオン-アガロースビーズに添加することができる。そして未結合物質を洗浄除去する。この場合にも、TWEAK受容体-リガンド遺伝子産物相互作用の阻害の程度は、ビーズに関連づけられた放射能を測定することにより検出することができる。

【0116】

本発明の他の実施形態では、一方もしくは両方の全長タンパク質の代わりに、TWEAK受容体および/またはリガンドタンパク質の結合ドメインに対応するペプチド断片を用いて、以上と同一の方法を利用することができる。当技術分野で慣用される任意数の方法を使用して結合部位を同定および単離することができる。こうした方法としては、タンパク質のうちの1つをコードする遺伝子の突然変異誘発および共免疫沈降アッセイによる結合破壊のスクリーニングが挙げられるが、これらに限定されるものではない。次に、複合体中の第2の種をコードする遺伝子の代償性突然変異を選択することができる。それぞれのタンパク質をコードする遺伝子の配列分析を行えば、相互作用結合に関与するタンパク質の領域に対応する突然変異が明らかになるであろう。このほか、先に本節で記載した方法を用いて1種のタンパク質を固体表面に固着させ、そしてトリプシンのようなタンパク質分解酵素であらかじめ処理されている標識されたその結合パートナーと相互作用させてそれに結合させることができる。洗浄後、結合ドメインを含む短鎖標識ペプチドは、固体物質に会合して保持されうる。このペプチドは、単離してアミノ酸配列決定により同定することができる。また、断片をコードする遺伝子に遺伝子工学的処理を施してタンパク質のペプチド断片を発現させるようにできる。その後、その結合活性を試験することができ、さらにその精製もしくは合成を行うことができる。

【0117】

たとえば、限定されるものではないが、先に本節で説明したように、GST-TWEAK受容体もしくはリガンド融合タンパク質を作製してそれをグルタチオン-アガロースビーズに結合させることによって、TWEAK受容体もしくはリガンド遺伝子産物を固体物質に固着させることができる。こうして得られた相互作用性結合パートナーは、 ^{35}S のような放射性同位体で標識して、トリプシンのようなタンパク質分解酵素で開裂させることができる。次に、開裂産物を固着GST-TWEAK受容体融合タンパク質もしくはTWEAKリガンド融合タンパク質に添加して結合させることができる。未結合ペプチドを洗浄除去した後、結合パートナー結合ドメインに相当する標識された結合物質を溶出させ、精製し、そして周知の方法によってアミノ酸配列の分析を行うことができる。このようにして同定されたペプチドは、合成により生産したり、組換えDNA法を用いて適切な促進性タンパク質に融合させたりすることができる。

【0118】

本発明に係るTWEAK受容体-リガンド相互作用がin vivoで生じると、標的となる細胞のグループもしくは組織における血管形成を刺激もしくは抑制する事象のカスケードが開始される。これに続いて、核酸分子、タンパク質、もしくは小分子のような分子は、このカスケードに影響を及ぼす可能性がある。このようにしてTWEAK受容体-リガンド相互作用効果を破壊する化合物は、血管形成を制御するのに有用であると考えられる。

【0119】

TWEAK受容体-リガンド相互作用の血管形成効果もしくは抗血管形成効果を妨害する化合物を同定するのに使用されるアッセイ系の基本原理には、2者を相互作用結合させて複合体

を形成するのに十分な条件および時間で、TWEAK受容体およびリガンドを含有する反応混合物を調製することが含まれる。この相互作用の効果を抑制する化合物の能力を試験するために、試験化合物の存在下および不在下で反応混合物を調製する。最初に試験化合物を反応混合物に導入してもよいし、TWEAK受容体-リガンド複合体の添加後に一度に添加してもよい。対照の反応混合物は、試験化合物なしで、すなわちプラセボと一緒にインキュベートされる。次に、血管新生に及ぼすTWEAK複合体のなんらかの影響を阻害するかもしくは増強するかを検出する。対照の反応では正常な血管形成応答を生じるが、試験化合物を含有する反応混合物では、TWEAK受容体-リガンド相互作用によって開始される事象のカスケードを化合物が妨害するかが示される。試験化合物を含有する培養物中で血管形成が増強されれば、TWEAK受容体-リガンド複合体効果の刺激剤であることが示唆される。

10

【0120】

(実施例)

以下の実施例は、特定の実施形態を例示するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0121】

実施例 1

TWEAK受容体の同定

A. TWEAK受容体cDNAの発現クローニング

TWEAK受容体cDNAをクローン化するために、成長ホルモンリーダー、ロイシンジッパー多量化ドメイン、およびヒトTWEAKのC末端細胞外ドメインをコードする発現ベクター(Chicheportiche et al., J. Biol. Chem. 272 (51):32401, 1997を参照されたい)を構築した。pDC409-LZ-TWEAKと命名されたこの発現ベクターは、配列番号1のDNA配列を含み、配列番号2のポリペプチドをコードしていた。CV1-EBNA細胞中への一過性トランスフェクションにより、pDC409-LZ-TWEAK馴化上清を生産した。ロイシンジッパーに対するマウスモノクローナル抗体と一緒にあらかじめインキュベートされたポリクローナルヤギ抗マウス抗体で被覆された磁気ビーズと一緒にこの上清をインキュベートした。空ベクターでトランスフェクトした細胞から得た上清と被覆ビーズを混合することにより、対照ビーズを作製した。

20

【0122】

T175フラスコ中で増殖させたCOS細胞の単層を、HUVEC cDNA発現ライブラリー由来の複雑度100,000のDNAプール15 µgでトランスフェクトした。2日後、この細胞をフラスコから取り出し、1.5ml結合培地+5%脱脂粉乳中、3時間、4℃、回転ホイール上の条件でインキュベートした。対照ビーズを添加することにより細胞を前清澄化し、4℃でさらに45分間回転させてから、ビーズに結合した細胞を磁石で取り出した。前清澄化を2~3回繰り返し、次に、TWEAK被覆ビーズを細胞に添加して、4℃で30分間回転させた。TWEAKビーズと結合した細胞を磁石により分離し、PBS中で4回洗浄した。0.1% SDS中で溶解させることにより、プラスミドDNAを細胞から抽出し、上清をDH101B細胞にエレクトロポレートした。アンピシリン選択培地上でコロニーを一晩増殖させた。形質転換体をプールし、パニングのさらなるラウンドに用いるためのプラスミドDNAの供給源として使用した。2ラウンドのパニングを行った後、以下の第B節に記載されているようなスライド結合プロトコルを用いて、TWEAKに結合する能力に基づき、得られたプールから陽性クローンを採取した。

30

40

【0123】

ヒトTWEAK受容体(TWEAKRとも呼ばれる)cDNAは配列番号3の配列を有することが判明した。これは129残基ポリペプチド(配列番号4)をコードする。配列検査から、約78アミノ酸細胞外ドメイン(シグナルペプチドを含む配列番号4の残基1~78)、約23アミノ酸膜貫通ドメイン(配列番号4の残基79~101)、および約28アミノ酸細胞内ドメイン(配列番号4の残基102~129)を有するポリペプチドであると予測される。TWEAKRは最も小さな既知のTNF受容体ファミリーメンバーである。それは、他のTNF受容体ファミリーメンバーの3~4リピートと比較して、細胞外ドメイン中に単一の高システインリピート領域を有している。TWEAKRポリペプチドは、以前、ヒト肝臓cDNAクローンによりコードされる膜貫通タンパク質とし

50

て報告されたが(WO 98/55508さらにはWO 99/61471を参照されたい)、TWEAK受容体としては同定されていなかった。図1中でアライメントにより示されるように、マウス同族体FGF誘導性Fn14(Meighan-Mantha et al., J. Biol. Chem. 274 (46):33166, 1999)は、ヒトタンパク質と約82%同一である。

【0124】

新しく同定されたTWEAK受容体を、TWEAKに結合する能力に関して、DR3(Marsters et al., Current Biology 8:525, 1998によりTWEAK受容体として同定された)と並行して試験した。

【0125】

B. TWEAK受容体はTWEAKに結合する

TWEAKR, DR3を含有している発現ベクターもしくはインサートのないベクター(対照)でCOS細胞のスライドをトランスフェクトした。2日後、ロイシンジッパー-TWEAK細胞外ドメイン融合タンパク質をコードするベクターでトランスフェクトされたCV-1細胞から得た濃縮上清と一緒に細胞をインキュベートした。1時間後、細胞を洗浄し、ロイシンジッパードメインに対するI-125標識抗体でプローブした。スライドを洗浄し、固定し、そしてX線フィルムを用いてオートラジオグラフィーを行った。TWEAKRのトランスフェクトされた細胞は、有意量のTWEAKと結合した。TWEAKは、DR3のトランスフェクトされた細胞にも対照細胞にも結合しなかった。この実験により、TWEAKに対する主要な受容体は、DR3ではなく、先の第A節で同定されたTWEAKRポリペプチドであることが確認された。機能性TWEAK受容体が発見された後、他の研究者もまた、DR3がTWEAKに対する主要な受容体ではないと報告した(Kapteijn et al., FEBS Lett., 485 (2-3):135, 2000)。TWEAK-TWEAKR結合相互作用は、Scatchard分析によってさらに特性づけられた。

【0126】

CV-1細胞をヒト全長TWEAKでトランスフェクトし、TWEAKを発現しないRaji細胞と1:30で混合した。125-I標識ヒトTWEAK受容体-Fcの連続希釈物と一緒に細胞を4℃で2時間インキュベートした。プラスチック管中のファレート油混合物にサンプルを通してマイクロ遠心分離することにより、未結合および結合プローブを分離した。上清およびペレットのガンマ線計数を行った。TWEAK受容体に結合するTWEAKリガンドをScatchard分析にかけたところ、約 $4.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ の結合親和性定数(Ka)を示した。

【0127】

C. TWEAK受容体は心臓組織で強力に発現される

TWEAK受容体の発現パターンを決定するために、ノーザンブロット分析を行った。ヒト多組織ノーザンブロットをClontech(Palo Alto, CA)から購入し、TWEAK受容体コード領域由来のP-32標識ランダムプライムDNAでプローブした。ブロットを洗浄し、X線フィルムを用いてオートラジオグラフィーを行った。その結果、心臓、胎盤、およびいくつかの骨格筋サンプルで成人TWEAKRが強力に発現されることがわかった。さらに、心臓組織中で強力に発現されることから、TWEAKRは心臓疾患の診断および処置に有用であることが裏付けられる。成体とは対照的に、胎児の組織はより遍在してTWEAKRを発現し、TWEAKR転写産物は肺および肝臓で観察された。

【0128】

実施例 2

TWEAKRアンタゴニストおよびアゴニストの調製

TWEAKは血管形成を誘発するので、TWEAKRアゴニスト(アゴニスト抗体など)は、血管形成を促進するために使用することが可能であり、そしてTWEAKRアンタゴニスト(可溶性受容体、アンタゴニスト抗体など)は、血管形成を阻害するために使用することが可能である。

【0129】

A. 可溶性TWEAK受容体-Fc(TWEAKR-Fc)融合ポリペプチドの組換え生産

Fcに融合されたTWEAKR細胞外ドメインをコードする核酸を構築するために、リーダー(シグナルペプチド)を含むTWEAKR由来のN末端79アミノ酸をコードする核酸を、ヒトIgG1由来

10

20

30

40

50

のFc部分をコードする核酸に連結させた。この構築物に対する配列は、配列番号6(核酸)および配列番号7(アミノ酸)として示される。配列番号7において、残基1~27は推定シグナルペプチドであり(細胞からの分泌時に切断されると推定される。実際の切断部位をN末端配列分析により同定した。以下を参照されたい。)、残基28~79は高ス테인TWEAKR細胞外ドメイン由来であり、残基80~81はBgIIIクローニング部位由来であり、そして残りはFc部分である。哺乳動物発現ベクターへの挿入ならびに哺乳動物宿主細胞中での発現および哺乳動物宿主細胞からの分泌の際に、この構築物は、TWEAKR-Fcで表されるポリペプチドを生産した。N末端配列分析の結果、TWEAKR-Fcで表される分泌ポリペプチドは、配列番号7の残基28(Glu)に対応するN末端を有していることがわかった。以下の実施例に記述されているようなアッセイを用いて、TWEAKR-Fcの抗血管形成活性が実証された。マウスTWEAKR細胞外ドメインを用いて、類似のFc融合構築物を調製した。

10

【0130】

B. TWEAKR細胞外ドメインに結合する抗体の生産

BALB/cマウスをTWEAKR細胞外ドメインで免疫し、脾臓細胞を採取し、それを用いて標準的な手順によりハイブリドーマを調製する。TWEAKRに結合する能力に関して、ELISAを用いてハイブリドーマ上清をスクリーニングする。単クローン性を保証すべく陽性物を2回クローン化し、次に、イソタイプ決定を行い、そしてふたたびTWEAKRへの反応性のアッセイを行う。ヒト免疫グロブリンを発現するトランスジェニックマウスを用いてファージディスプレイの使用により、抗体および抗体誘導体の調製も行う。得られた抗体を以下の実施例に記載されているようなアッセイにより試験し、TWEAK-TWEAKR相互作用、TWEAKRシグナル伝達、血管形成、および他の下流の生物学的活性を調節するそれらの能力の特性づけを行う。

20

【0131】

アゴニスト抗体は、血管形成のようなTWEAK誘発生物学的活性を促進するために使用され、そしてアンタゴニスト抗体は、血管形成のようなTWEAK誘発生物学的活性を阻害するために使用される。いくつかの用途では、放射性同位体に、植物、真菌、もしくは細菌に由来するサイトトキシン、たとえば、リシンAもしくはジフテリアトキシンに、または他の化学毒物に、コンジュゲートすることにより、アンタゴニスト抗体の活性を増大させる。また、TWEAKRの組織内分布が限定されるので、TWEAKRに結合する抗体は、イメージング用または治療薬物を血管中へ送達するためのターゲット試薬として特に有用である。TWEAKRに結合する抗体は、たとえば、検出可能な標識もしくは化学療法剤を壁細胞(周細胞および血管平滑筋細胞)にターゲティングするために使用することができる。検出可能な標識としては、放射性同位体、化学発光性化合物および蛍光性化合物、ならびに酵素が挙げられる。これらの方法は、たとえば、新生物の診断、病期決定、および治療に有用である。

30

【0132】

実施例3

創傷閉鎖アッセイにおけるTWEAKR-Fcの活性

in vitroでのTWEAKR-Fcによる血管形成の阻害を定量化するために、平面状内皮細胞移動(創傷閉鎖)アッセイを使用した。このアッセイでは、培養細胞単層中での円形創傷の閉鎖速度として内皮細胞移動を測定する。創傷閉鎖速度は直線的に変化し、そしてin vivoで血管形成を刺激もしくは阻害する物質により動的に制御されている。

40

【0133】

Martin et al., In Vitro Cell Dev Biol 33:261, 1997に記載されているように、一次ヒト腎臓微小血管内皮細胞HRMECを単離し、培養し、そして第3継代で解凍後に使用した。シリコンチップドリルプレスを用いて、融合性HRMEC単層中に円形損傷「創傷」(直径600~800ミクロン)を反復して形成した。創傷形成時、培地(DMEM + 1% BSA)に、20ng/ml PMA(ホルボール-12-ミリスレート-13-アセテート)、EGF(4ng/ml)、および0.150~5 µg/ml TWEAKR-Fc、または40ng/ml EGFと0.150~5 µg/ml TWEAKR-Fcと組み合わせた物を追加した。顕微鏡および画像解析ソフトウェア(Bioquant, Nashville, TN)を用いて、残留創傷面積を

50

時間(0～12時間)の関数として測定した。時間に対してプロットされた残留創傷面積の線形回帰分析を行うことにより、各薬剤および薬剤の組み合わせについて、相対移動速度を計算した。結果を図2～3に示す。

【0134】

huIgGもしくは培地+BSAと比較して、TWEAKR-Fcは、用量に応じてPMA誘発内皮移動を阻害し、5 µg/mlで移動速度を無刺激レベルまで低減させた(図2)。huIgGおよびTWEAKR-Fcはいずれも、基底(非誘発)移動を阻害しなかった。HRMEC移動をEGFで誘発した場合、TWEAKR-Fcは、用量に依存して内皮移動を阻害し、5 µg/mlで移動速度を無刺激レベルまで低減させた(図3)。

【0135】

10

実施例4

角膜ポケットアッセイにおけるTWEAKR-Fcの活性

in vivoでのTWEAKR-Fcによる血管形成の阻害を定量化するために、マウス角膜ポケットアッセイを使用した。このアッセイでは、血管形成もしくは抗血管形成の活性に関して試験される物質をハイドロンペレット中に遅延放出形態で固定し、それを麻酔のかけられたマウスの角膜上皮中に形成されたマイクロポケットに埋植する。血管新生は、血管化角膜縁から通常無血管の角膜への血管内方成長の外観、密度、および範囲として測定される。

【0136】

Kenyon et al., Invest Ophthalmol. & Visual Science 37:1625, 1996に記載されているように、ハイドロンペレットには、bFGF(90ng/ペレット)、bFGFおよびIgG(14 µg/ペレット、対照)、またはbFGFおよびTWEAKR-Fc(14 µg)と共に、スクラルファートが含まれていた。6～8週齢の雄C57BLマウスの外側角膜縁の中央を1mm微小切開して設けられた角膜間質のマイクロポケットにペレットを外科的に埋植した。bFGFに対する新血管応答がピークになる5日後、ペレットを含む経線における極軸から35～50°の初期角でZeissスリットランプを用いて角膜を撮影した。画像をデジタル化して減色フィルターで処理することによって(Adobe Photoshop 4.0)、定着した微小血管をヘモグロビン量により描写した。画像解析ソフトウェア(Bioquant, Nashville, TN)を用いて、血管化した角膜画像の比率、血管化領域内の血管密度、および全角膜内の血管密度を計算した。

20

【0137】

表1に示されているように、TWEAKR-Fc(100 pmol)は、bFGF(3 pmol)誘発角膜血管形成を阻害し、血管密度をFGF単独もしくはFGF+IgGによって誘発された角膜血管形成を50%まで低減させた。

30

【0138】

【表1】

マウス角膜ポケットアッセイにおける

FGF 誘発血管形成に及ぼす TWEAKR の影響

処置	血管の数および長さが 50%超減少 n/合計 n (%)
FGF 単独	0/2 (0%)
FGF+IgG	0/2 (0%)
FGF+TWEAKR-Fc	6/9 (67%)

40

【0139】

実施例5

TWEAK受容体(TWEAKR)細胞質ドメインへの定性的TRAF結合

50

TRAFファミリーのメンバーは、細胞内シグナル伝達分子である。TRAFファミリーのいくつかのメンバーは、NF- κ B経路を活性化するシグナル伝達カスケードを開始して細胞の活性化および増殖を惹起するように、TNF受容体ファミリーのメンバーと会合することが知られている。細胞内シグナル伝達分子のTRAFファミリーのメンバーがTWEAKRの細胞質ドメインに結合するかを試験するために、したがって、TWEAKRの小さな細胞質ドメインがTRAF経路を介して細胞中へのシグナルを媒介することができるかを調べるために、定性的 *in vitro* 結合アッセイを行った。

【0140】

BamHIおよびNotIの部位でpGEX-4T(Amersham Pharmacia Biotech)ベクター中に適切なインサートをサブクローニングすることにより、グルタチオン-S-トランスフェラーゼに融合されたTWEAKRのC末端29アミノ酸からなるGST融合ベクターを作製した。このベクターからの産物をE. coli中で発現させ、Galibert et al., J. Biol. Chem. 273 (51):34120, 1998に記載されるようなセファロースビーズに結合させた。同様に構築したビーズをRANK細胞質ドメイン-GST融合タンパク質で被覆して、正の対照として使用し、GSTだけで被覆されたビーズを負の対照として使用した。製造業者のプロトコルに従って、[35S]メチオニン/システイン標識TRAFタンパク質を網状赤血球溶解物(TNT結合網状赤血球溶解物系, Promega)中で生産した。標識TRAF分子を含有する網状赤血球溶解物を最初に対照ビーズを用いて前清澄化し、続いて、結合緩衝液(50mM HEPES[pH 7.4], 250mM NaCl, 0.25%(v/v) Nonidet P-40, 10%グリセロール, 2mM EDTA)中において記載の融合タンパク質被覆ビーズと一緒に4で2時間インキュベートした。結合緩衝液で4回洗浄した後、結合したTRAF分子をSDS負荷緩衝液中でビーズから溶出させ、SDS-PAGEで分離し、乾燥させ、そしてX線フィルムに感光させた。

【0141】

バックグラウンドレベルを超える結合が、TRAFFS 1、2、および3で観測された。バックグラウンドレベルを超える結合は、TRAFFS 4、5、および6では観測されなかった。TWEAKRがTRAF 1、2、および3に結合することができるということは、TWEAKRがTRAF経路を介して細胞へシグナルを誘導することができ、それによって、宿主細胞中へ増殖シグナルを伝達しうることが実証される。この実験は、TWEAKRがTWEAKに対する機能性受容体であるというさらなる証拠を提供する。この実験はまた、小分子でTRAF-TWEAKR相互作用を破壊することによって、またはTRAF分子のドミナントネガティブ変異体を使用することによって、シグナル伝達を阻害することのできるさらなる手段を提示する。

【0142】

実施例6

内皮細胞増殖アッセイにおけるTWEAKR-Fcの活性

*in vitro*でのTWEAKR-FcによるbFGFもしくはTWEAK誘発増殖の阻害を定量化するために、内皮細胞増殖アッセイを使用した。このアッセイでは、カルセインAMと呼ばれる細胞標識分子を用いてマイクロタイターウェル中で細胞増殖を4日間行った後、内皮細胞増殖を測定する。細胞によって発現されたエステラーゼはカルセインを開裂させる。その結果、485nmで励起したときに蛍光が現れる。未開裂のカルセインは蛍光を発しない。蛍光の量は、培養ウェル中の内皮細胞の数と直接関係する。内皮細胞増殖は、多くの場合、*in vivo*で血管形成を刺激および/または阻害する物質によって制御される。

【0143】

一次HUVEC(ヒト臍静脈内皮細胞)を供給業者(Clonetics, Walkersville, MD)から入手し、培養し、そして継代2~7で使用した。各マイクロタイターウェルに3000 HUVECを添加することにより内皮細胞基本培地(EBM、増殖因子も血清も含有していない内皮細胞基本培地であり、Dr. Richard Ham at the University of Colorado, Cloneticsによって開発された培地処方ベースとする)+0.05%のFBS(ウシ胎児血清)中で重複培養を行った。培養開始時、0.08 μ g/ml ~ 20 μ g/ml(TWEAK誘発に対して0.25 ~ 20 μ g/ml、FGF2誘発に対して0.08 ~ 6.7 μ g/ml)の範囲の濃度のヒトIgG(huIgG、対照)もしくはヒトTWEAKR-Fcの存在下で、FGF-2(繊維芽細胞増殖因子-2, 10ng/ml)もしくはヒトTWEAK(100ng/ml)を培養物に添加した。

HUVEC含有培養物を37℃、5% CO₂で4日間インキュベートした。培養第4日目、4 μMカルセイン-AMを培養物に添加し、2時間後にウェルの蛍光を評価した。重複ウェルの平均蛍光(485～530nm)カウント数±SEMで表した結果を、図4および5に示す。

【0144】

TWEAKR-Fcは、用量に依存してTWEAK誘発HUVEC増殖を特異的に阻害したが、それに対して、huIgGは、TWEAK誘発増殖に影響を及ぼさなかった(図4)。このほか、TWEAKR-Fcは、EBM + 0.05% FBS中での培養で観測されたHUVECの基本増殖を阻害したが、それに対して、huIgGは基本増殖を阻害しなかった。興味深いことに、TWEAKR-Fcはまた、2 μg/ml超の濃度でFGF-2媒介HUVEC増殖を阻害したが、それに対して、huIgGは、FGF-2誘発HUVEC増殖応答に影響を及ぼさなかった(図5)。これらの結果は、TWEAKR-Fcが、外因性組換えヒトTWEAKの添加によって誘発されたHUVEC増殖を阻害することを示している。TWEAKR-Fcが血清誘発HUVEC増殖を部分的に阻害するということは、HUVECが、TWEAKRを介してEC(内皮細胞)の増殖/生存を促進する内因性TWEAKを生産することを意味する。FGF-2誘発増殖がTWEAKR-Fcで低下するということは、FGF-2に対するEC応答の少なくとも一部が内因性TWEAK/TWEAKR相互作用に依存することを意味する。

【0145】

実施例7

マウス心臓虚血/接合(engraftment)モデルにおけるTWEAKRアンタゴニストによる新生血管形成の阻害

一方のマウスドナーから他方の遺伝学的に類似したマウスの耳皮膚へ異所的に移植された心臓組織が生存するためには、生存を促進すべく移植心臓および周囲組織による適切な新生血管形成および心筋機能のためのエネルギーが必要である。移植部位の血管が不適切なものであると、過度の虚血を生じて、心臓組織が損傷を受けたり、接合組織が障害を起こしたりする。内皮細胞移動および血管形成に関与する因子をアンタゴナイズする物質は、移植部位における血管形成を減少させるので、移植組織の機能が制限され、最終的には接合自体が制限される。抗体やTWEAKR-FcなどのTWEAKRアンタゴニストが新生血管形成に及ぼす影響を示すために、異所的な心臓同系移植マウスモデルを使用する。

【0146】

雌BALB/c(約12週齢)レシピエントに、同一系統のドナーマウス由来の所与の新生児心臓移植片を提供する。0日目、ドナーの心臓組織をレシピエントの左耳介に移植し、マウスを2つのグループに分ける。対照のグループにはヒトIgG(Hu IgG)を投与し、他方のグループにはTWEAKRアンタゴニストを投与する。いずれも腹腔内投与である。その処置を5日連続して行った。接合後7日目および14日目、目視観察しうる拍動をモニターすることにより、移植片の機能を調べる。TWEAKRアンタゴニストの用量の関数として機能的接合の阻害を調べる。移植部位の浮腫ならびに宿主およびドナー組織の血管に及ぼすTWEAKRアンタゴニストの影響を視覚化すべく、移植心臓を組織学的に検査する。

【0147】

実施例8

TWEAKRアンタゴニストによる腫瘍の治療

抗体およびTWEAKR-FcなどのTWEAKRアンタゴニストを、固形腫瘍を有する動物モデルで試験する。腫瘍の頻度および腫瘍の増殖を測定することにより、TWEAKRアンタゴニストの効果を決定する。

【0148】

本明細書に引用されている刊行物中の関連する開示内容は、参照により具体的に組み込まれるものとする。先に提示した実施例は、本発明の範囲を網羅するものでもなければ限定するものでもない。当業者であれば、以上の教示に照らして変更および修正および変更が可能であることは理解されよう。また、そのような修正および変更は本発明の範囲内に含まれるものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトおよびマウスTWEAK受容体ポリペプチド配列の配列アライメントを示す。

上側の配列は、マウスTWEAK受容体ポリペプチド(配列番号5)であり、下側の配列は、ヒトTWEAK受容体ポリペプチド(配列番号4)である。

【図2】 PMA誘発HRMEC創傷閉鎖に及ぼすTWEAKR-Fcの影響を示す。

【図3】 EGF誘発HRMEC創傷閉鎖に及ぼすTWEAKR-Fcの影響を示す。

【図4】 TWEAK誘発(100 ng/ml)HUVEC増殖に及ぼすヒトTWEAKR-Fcの影響を示す。

【図5】 FGF-2誘発(10 ng/ml)HUVEC増殖に及ぼすヒトTWEAKR-Fcの影響を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> WILEY, Steven R.
IMMUNEX CORPORATION

10

<120> TWEAK Receptor

<130> 2968-WO

<140> to be assigned

<141> 2000-12-19

<150> 60/172,878

<151> 1999-12-20

<150> 60/203,347

<151> 2000-05-10

<160> 7

20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 898

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (52)..(873)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: human TWEAK
fusion protein construct

30

<400> 1

tctcgagggc cagcggttta aacgtcgagg tacctatccc gggccgccac c atg gct 57
Met Ala
1

aca ggc tcc cgg acg tcc ctg ctc ctg gct ttt ggc ctg ctc tgc ctg 105
Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu
5 10 15

ccc tgg ctt caa gag ggc agt gca act agt tct gac cgt atg aaa cag 153
Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Thr Ser Ser Asp Arg Met Lys Gln
20 25 30

ata gag gat aag atc gaa gag atc cta agt aag att tat cat ata gag 201
Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu
35 40 45 50

40

aat gaa atc gcc cgt atc aaa aag ctg att ggc gag cgg act aga tct 249
Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Thr Arg Ser
55 60 65

agt ttg ggg agc cgg gca tcg ctg tcc gcc cag gag cct gcc cag gag 297
Ser Leu Gly Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu
70 75 80

gag ctg gtg gca gag gag gac cag gac ccg tcg gaa ctg aat ccc cag	345	
Glu Leu Val Ala Glu Glu Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln		
85 90 95		
aca gaa gaa agc cag gat cct gcg cct ttc ctg aac cga cta gtt cgg	393	
Thr Glu Glu Ser Gln Asp Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg		
100 105 110		
cct cgc aga agt gca cct aaa ggc cgg aaa aca cgg gct cga aga gcg	441	
Pro Arg Arg Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala		
115 120 125 130		
atc gca gcc cat tat gaa gtt cat cca cga cct gga cag gac gga gcg	489	
Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala		10
135 140 145		
cag gca ggt gtg gac ggg aca gtg agt ggc tgg gag gaa gcc aga atc	537	
Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile		
150 155 160		
aac agc tcc agc cct ctg cgc tac aac cgc cag atc ggg gag ttt ata	585	
Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile		
165 170 175		
gtc acc cgg gct ggg ctc tac tac ctg tac tgt cag gtg cac ttt gat	633	
Val Thr Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp		
180 185 190		
gag ggg aag gct gtc tac ctg aag ctg gac ttg ctg gtg gat ggt gtg	681	
Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val		20
195 200 205 210		
ctg gcc ctg cgc tgc ctg gag gaa ttc tca gcc act gcg gcc agt tcc	729	
Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser		
215 220 225		
ctc ggg ccc cag ctc cgc ctc tgc cag gtg tct ggg ctg ttg gcc ctg	777	
Leu Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu		
230 235 240		
cgg cca ggg tcc tcc ctg cgg atc cgc acc ctc ccc tgg gcc cat ctc	825	
Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu		
245 250 255		
aag gct gcc ccc ttc ctc acc tac ttc gga ctc ttc cag gtt cac tga	873	
Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His		30
260 265 270		
gcggccgcgg atctgttttaa actag	898	

<210> 2

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: human TWEAK
fusion protein construct

<400> 2

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

His

<210> 3
 <211> 868
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS

10

20

30

40

<222> (53)..(442)

<400> 3

gcttgaattc aataactata acggctcctaa ggtagcgaag aggacgtgca ct atg gct 58
 Met Ala
 1

cgg ggc tgg ctg cgc cgg ttg ctg cgg ctc ctc gtg ctg ggg ctc tgg 106
 Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly Leu Trp
 5 10 15

ctg gcg ttg ctg cgc tcc gtg gcc ggg gag caa gcg cca ggc acc gcc 154
 Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly Thr Ala
 20 25 30

ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg 202
 Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met
 35 40 45 50

gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc 250
 Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly
 55 60 65

tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg ccc atc ctt 298
 Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Pro Ile Leu
 70 75 80

ggg ggc gct ctg agc ctg acc ttc gtg ctg ggg ctg ctt tct ggc ttt 346
 Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe Val Leu Gly Leu Leu Ser Gly Phe
 85 90 95

ttg gtc tgg aga cga tgc cgc agg aga gag aag ttc acc acc ccc ata 394
 Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr Pro Ile
 100 105 110

gag gag acc ggc gga gag ggc tgc cca gct gtg gcg ctg atc cag tga 442
 Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Ala Val Ala Leu Ile Gln
 115 120 125 130

caatgtgccc cctgccagcc ggggctcgcc cactcatcat tcattcatcc attctagagc 502

cagtctctgc ctcccagacg cggcgggagc caagctcctc caaccacaag gggggtgggg 562

ggcgggtgaat cacctctgag gcctgggccc aggggttcagg ggaaccttcc aagggtgtctg 622

gttgccctgc ctctggctcc agaacagaaa gggagcctca cgctggctca cacaaaacag 682

ctgacactga ctaaggaact gcagcatttg cacaggggag gggggtgccc tccttcctag 742

aggccctggg ggccaggetg acttgggggg cagacttgac actaggcccc actcactcag 802

atgtcctgaa attccaccac ggggggtcacc ctgggggggtt agggacctat ttttaacact 862

agagggg 868

<210> 4

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
 35 40 45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
 50 55 60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Pro
 65 70 75 80

10

Ile Leu Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe Val Leu Gly Leu Leu Ser
 85 90 95

Gly Phe Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr
 100 105 110

Pro Ile Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Ala Val Ala Leu Ile
 115 120 125

Gln

<210> 5

<211> 129

<212> PRT

<213> Mus sp.

20

<400> 5

Met Ala Pro Gly Trp Pro Arg Ser Leu Pro Gln Ile Leu Val Leu Gly
 1 5 10 15

Phe Gly Leu Val Leu Met Arg Ala Ala Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Thr Ser Pro Cys Ser Ser Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
 35 40 45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Pro Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
 50 55 60

30

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala His Phe Arg Leu Leu Trp Pro
 65 70 75 80

Ile Leu Gly Gly Ala Leu Ser Leu Val Leu Val Leu Ala Leu Val Ser
 85 90 95

Ser Phe Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr
 100 105 110

Pro Ile Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Gly Val Ala Leu Ile
 115 120 125

Gln

<210> 6
 <211> 932
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(930)

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: human TWEAK
 receptor fusion protein construct

<400> 6
 atg gct cgg ggc tgg ctg cgc cgg ttg ctg cgg ctc ctc gtg ctg ggg 48
 Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
 1 5 10 15 10
 ctc tgg ctg gcg ttg ctg cgc tcc gtg gcc ggg gag caa gcg cca ggc 96
 Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
 20 25 30
 acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag 144
 Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
 35 40 45
 tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc 192
 Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
 50 55 60
 ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg aga 240
 Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Arg
 65 70 75 80
 tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc 288
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
 85 90 95
 gag ggc gcg ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc 336
 Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 100 105 110
 ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg 384
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 115 120 125
 agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg 432
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 130 135 140
 gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc 480
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 145 150 155 160
 acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg 528
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 165 170 175

aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc	576	
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
180 185 190		
ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca	624	
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
195 200 205		
cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag	672	
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
210 215 220		
gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc	720	
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
225 230 235 240		10
gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg	768	
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
245 250 255		
cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc	816	
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
260 265 270		
acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc	864	
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
275 280 285		
gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc	912	
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
290 295 300		20
ctg tct ccg ggt aaa tga ac	932	
Leu Ser Pro Gly Lys		
305 310		
<210> 7		
<211> 309		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: human TWEAK		
receptor fusion protein construct		
		30
<400> 7		
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly		
1 5 10 15		
Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly		
20 25 30		
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys		
35 40 45		
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys		
50 55 60		
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Arg		
65 70 75 80		40

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
 85 90 95
 Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 100 105 110
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 115 120 125
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 130 135 140
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 145 150 155 160
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 165 170 175
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 180 185 190
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 195 200 205
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 210 215 220
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 225 230 235 240
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 245 250 255
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 260 265 270
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 275 280 285
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 290 295 300
 Leu Ser Pro Gly Lys
 305

10

20

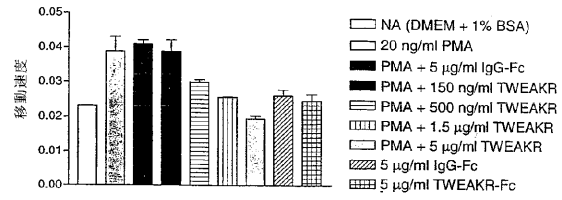
【図 1】

```

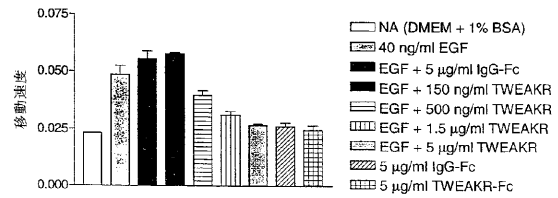
1  MAPGWPSLPQILVLGFLVLMRAAGAQPGTSPCSSGSSNSADLDKCM 50
   || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1  MARGSLRLLRLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSNSADLDKCM 50
   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
51  DCASCPARPHSDFCIGCAAPPAHFRLLPILGGALSLVLVLAIVSSFLV 100
   || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
51  DCASCPARPHSDFCIGCAAPPAHFRLLPILGGALSLTFLVLGSLGFLV 100
   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
101 WRRCRREKFTTPIETTGEGCGPVALIQ 129
   || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
   || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
101 WRRCRREKFTTPIETTGEGCPAVALIQ 129

```

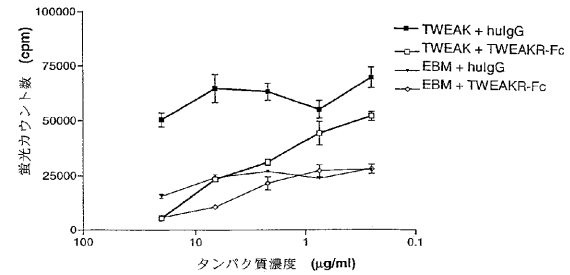
【図 2】



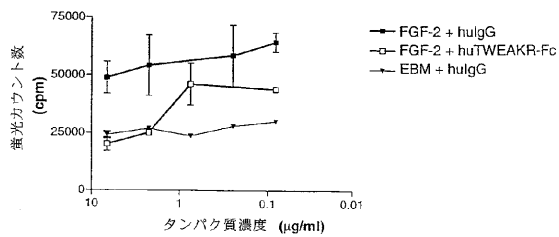
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Z
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	A 6 1 P 9/14	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	C 0 7 K 14/715	

(72)発明者 ウィリー , スティーヴン , アール .

アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 , シアトル , 1 5 1 1 1 1 ティ - エイチ アベニュー
 - ウエスト ナンバー 6

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 3 5 0 6 1 (W O , A 1)

国際公開第 9 8 / 5 5 5 0 8 (W O , A 2)

特表 2 0 0 4 - 5 0 0 3 2 0 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 14/00-16/46

PubMed