

(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2008-531746

(P2008-531746A)

(43) 公表日 平成20年8月14日(2008.8.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 T	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 V	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 11/08 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 37/08 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-500768 (P2008-500768)	(71) 出願人	507202770
(86) (22) 出願日	平成18年3月2日 (2006.3.2)		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19年11月6日 (2007.11.6)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/007547		80, サウス サンフランシスコ, ディー
(87) 国際公開番号	W02006/096487		エヌエー ウェイ 1, エムエス 49
(87) 国際公開日	平成18年9月14日 (2006.9.14)	(74) 代理人	100109726
(31) 優先権主張番号	60/659,339		弁理士 園田 吉隆
(32) 優先日	平成17年3月7日 (2005.3.7)	(74) 代理人	100101199
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 義教
		(72) 発明者	アシュケナジ, アヴィ, ジェー.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
			02, サン マテオ, タリータウン
			ストリート 1456
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 TWEAK及びFN14活性を調節するための方法及び組成物

## (57) 【要約】

TWEAK及びTWEAKレセプターの活性を調節するアゴニスト及びアンタゴニストを提供する。本発明の方法、組成物及びキットは、癌や免疫関連疾患などの疾患の治療に用いられる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

哺乳動物の癌細胞を有効量のアンタゴニスト分子に曝すことを含む癌の治療方法であって、該アンタゴニストは、

- q) 抗 T W E A K 抗体；
- r) 抗 T W E A K レセプター抗体；
- s) T W E A K レセプターイムノアドヘシン；及び
- t) T W E A K レセプターの細胞内シグナル伝達をブロックする又は妨げる薬剤又は分子からなる群から選択されるものである、治療方法。

**【請求項 2】**

前記 T W E A K レセプターイムノアドヘシンが免疫グロブリンの F c 領域に融合した T W E A K レセプター配列を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記 T W E A K レセプター配列が F N 1 4 レセプターの細胞外ドメイン配列を含んでなる、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記抗 T W E A K 抗体が、図 1 1 (配列番号1)のアミノ酸 9 4 - 2 4 9 を含んでなるヒト T W E A K ポリペプチドを結合する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記抗 T W E A K 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記抗 T W E A K レセプター抗体が、図 1 2 (配列番号2)のアミノ酸配列を含んでなるヒト F N 1 4 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記抗 T W E A K レセプター抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記哺乳動物の癌細胞が、化学療法剤、放射線、プロドラッグ、細胞障害性剤又は増殖阻害剤にも曝される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

哺乳動物に有効量のアンタゴニスト分子が投与されることを含む、哺乳動物の N K 細胞活性を亢進する方法であって、該アンタゴニストは、

- u) 抗 T W E A K 抗体；
- v) 抗 T W E A K レセプター抗体；
- w) T W E A K レセプターイムノアドヘシン；及び
- x) T W E A K レセプターの細胞内シグナル伝達をブロックする又は妨げる薬剤又は分子からなる群から選択されるものである、方法。

**【請求項 10】**

前記 T W E A K レセプターイムノアドヘシンが免疫グロブリンの F c 領域に融合した T W E A K レセプター配列を含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 T W E A K レセプター配列が F N 1 4 レセプターの細胞外ドメイン配列を含んでなる、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記抗 T W E A K 抗体が、図 1 1 (配列番号1)のアミノ酸 9 4 - 2 4 9 を含んでなるヒト T W E A K ポリペプチドを結合する、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記抗 T W E A K 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 12 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 14】**

前記抗 T W E A K レセプター抗体が、図 1 2 (配列番号2)のアミノ酸配列を含んでなるヒト F N 1 4 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記抗 T W E A K レセプター抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

哺乳動物に有効量のアンタゴニスト分子が投与されることを含む、哺乳動物の先天性 T<sub>H</sub> 1 応答又は活性を亢進する方法であって、該アンタゴニストは、

y) 抗 T W E A K 抗体；

z) 抗 T W E A K レセプター抗体；

aa) T W E A K レセプターイムノアドヘシン；及び

bb) T W E A K レセプターの細胞内シグナル伝達をブロックする又は妨げる薬剤又は分子からなる群から選択されるものである、方法。

**【請求項 17】**

前記 T W E A K レセプターイムノアドヘシンが免疫グロブリンの F c 領域に融合した T W E A K レセプター配列を含んでなる、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記 T W E A K レセプター配列が F N 1 4 レセプターの細胞外ドメイン配列を含んでなる、請求項 17 に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記抗 T W E A K 抗体が、図 1 1 (配列番号1)のアミノ酸 9 4 - 2 4 9 を含んでなるヒト T W E A K ポリペプチドを結合する、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記抗 T W E A K 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 19 に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記抗 T W E A K レセプター抗体が、図 1 2 (配列番号2)のアミノ酸配列を含んでなるヒト F N 1 4 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記抗 T W E A K レセプター抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 21 に記載の方法。

**【請求項 23】**

哺乳動物に有効量のアンタゴニスト分子が投与されることを含む、哺乳動物の先天性 T<sub>H</sub> 2 媒介性疾患の治療方法であって、該アンタゴニストは、

cc) 抗 T W E A K 抗体；

dd) 抗 T W E A K レセプター抗体；

ee) T W E A K レセプターイムノアドヘシン；及び

ff) T W E A K レセプターの細胞内シグナル伝達をブロックする又は妨げる薬剤又は分子からなる群から選択されるものである、方法。

**【請求項 24】**

前記 T W E A K レセプターイムノアドヘシンが免疫グロブリンの F c 領域に融合した T W E A K レセプター配列を含んでなる、請求項 23 に記載の方法。

**【請求項 25】**

前記 T W E A K レセプター配列が F N 1 4 レセプターの細胞外ドメイン配列を含んでなる、請求項 24 に記載の方法。

**【請求項 26】**

前記抗 T W E A K 抗体が、図 1 1 (配列番号1)のアミノ酸 9 4 - 2 4 9 を含んでなるヒト T W E A K ポリペプチドを結合する、請求項 23 に記載の方法。

**【請求項 27】**

10

20

30

40

50

前記抗 T W E A K 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記抗 T W E A K レセプター抗体が、図 1 2 (配列番号2)のアミノ酸配列を含んでなるヒト F N 1 4 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記抗 T W E A K レセプター抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 T<sub>H</sub> 2 媒介性疾患がアレルギー又は喘息である、請求項 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 3 1】

哺乳動物に有効量のアゴニスト分子が投与されることを含む、免疫関連疾患の治療方法であって、該アゴニストは、

- a) 抗 T W E A K レセプター抗体；
  - b) T W E A K ポリペプチド；及び
  - c) T W E A K ポリペプチド変異体
- からなる群から選択されるものである、方法。

【請求項 3 2】

前記抗 T W E A K レセプター抗体が、図 1 2 (配列番号2)のアミノ酸配列を含んでなるヒト F N 1 4 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 3 1 に記載の方法。

20

【請求項 3 3】

前記抗 T W E A K レセプター抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記免疫関連疾患が自己免疫性疾患である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記自己免疫性疾患が、クローン病、炎症性腸疾患、多発性硬化症又は関節炎である、請求項 3 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

30

【0 0 0 1】

(出願について)

この出願は、出典明記によりその内容が本明細書に援用される、2 0 0 5 年 3 月 7 日出願の米国特許仮出願番号第 6 0 / 6 5 9 , 3 3 9 号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は、T W E A K 及び T W E A K レセプターの活性を調節するアゴニスト及びアンタゴニストを提供する。より具体的には、本発明は、癌や免疫関連疾患などの疾患の治療のため、並びに、免疫細胞上の T W E A K 及び / 又は T W E A K レセプターの活性を調節するために用いられうる方法、組成物及びキットを提供する。

40

【0 0 0 3】

(発明の背景)

腫瘍壊死因子(T N F)スーパーファミリーに属する様々なリガンド及びレセプターが当分野で同定されている。そのようなリガンドの中には、腫瘍壊死因子- (「T N F-」)、腫瘍壊死因子- (「T N F-」又は「リンホトキシン-」)、リンホトキシン- (「L T-」)、C D 3 0 リガンド、C D 2 7 リガンド、C D 4 0 リガンド、O X - 4 0 リガンド、4 - 1 B B リガンド、L I G H T、A p o - 1 リガンド(F a s リガンド又は C D 9 5 リガンドとも称される)、A p o - 2 リガンド(A p o 2 L 又は T R A I L とも称される)、T W E A K (A p o - 3 リガンドとも称される)、A P R I L、O P G リガンド(R A N K リガンド、O D F 又は T R A N C E とも称される)、及び T A L L - 1 (B l y S、B A F

50

F 又は T H A N K と称される)が含まれる。[例えば、Ashkenazi, *Nature Review*, 2:420-430 (2002); Ashkenazi 及び Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi 及び Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:255-260 (2000); Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997) Wallach, *Cytokine Reference*, Academic Press, 2000, pages 377-411; Locksley 等, *Cell*, 104:487-501 (2001); Gruss 及び Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Schmid 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry 等, *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987); Pitti 等, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley 等, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning 等, *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage 等 *Nature*, 357:80-82 (1992); 1997年1月16日公開の国際公開公報97/01633; 1997年7月17日公開の国際公開公報97/25428; Marsters等, *Curr. Biol.*, 8:525-528(1998); Chicheportiche等, *Biol. Chem.*, 272:32401-32410(1997); Hahne等, *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190(1998); 1998年7月2日公開の国際公開公報98/28426; 1998年10月22日公開の国際公開公報98/46751; 1998年5月7日公開の国際公開公報/98/18921; Mooreら, *Science*, 285:260-263(1999); Shu等, *J. Leukocyte Biol.*, 65:680(1999); Schneiderら, *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756(1999); Mukhopadhyay等, *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981(1999) 参照]。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 0 4 】

このような T N F ファミリーリガンドによって媒介される様々な細胞性応答の誘導は、一般的に特定の細胞レセプターへの結合によって開始される。今日までに同定された T N F レセプタースーパーファミリーのメンバーには、TNFR1、TNFR2、TACI、GITR、CD27、OX-40、CD30、CD40、HVEM、Fas (Apo-1又はCD95とも称される)、DR4 (TRAIL-R1とも称される)、DR5 (Apo-2又はTRAIL-R2とも称される)、DcR1、DcR2、破骨細胞分化抑制因子(OPG)、RANK及びApo-3 (DR3又はTRAMPとも称される)が含まれる。(例えば、Ashkenazi, *Nature Reviews*, 2:420-430 (2002); Ashkenazi 及び Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi 及び Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:255-260 (2000); Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997) Wallach, *Cytokine Reference*, Academic Press, 2000, 377-411 頁; Locksley 等, *Cell*, 104:487-501 (2001); Gruss 及び Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Hohman 等, *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989); Brockhaus 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3127-3131 (1990); 1991年3月20日出願の欧州特許第417,563; Lotscher 等, *Cell*, 61:351 (1990); Schall 等, *Cell*, 61:361 (1990); Smith 等, *Science*, 248:1019-1023 (1990); Lewis 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:2830-2834 (1991); Goodwin 等, *Mol. Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991); Stamenkovic 等, *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989); Mallett 等, *EMBO J.*, 9:1063-1068 (1990); Anderson 等, *Nature*, 390:175-179 (1997); Chicheportiche 等, *J. Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Pan 等, *Science*, 276:111-113 (1997); Pan 等, *Science*, 277:815-818 (1997); Sheridan 等, *Science*, 277:818-821 (1997); Degli-Esposti 等, *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); Marsters 等, *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Tsuda 等, *BBRC*, 234:137-142 (1997); Nocentini 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:6216-6221 (1997); vonBulow 等, *Science*, 278:138-141 (1997))。

#### 【 0 0 0 5 】

これら T N F レセプターファミリーメンバーの多くは、細胞外領域、膜貫通領域及び細胞内領域を含む細胞表面レセプターの典型的な構造を共有しており、一方、他のメンバーは膜貫通領域と細胞内ドメインを欠いた可溶性タンパク質として天然にみられる。典型的な T N F R の細胞外部位には、N H<sub>2</sub>-末端から始まる複数のシステインリッチドメイン(C R D)の反復性のアミノ酸配列パターンを含有する。

T N F リガンドファミリーメンバーのそれらのそれぞれのレセプター(一又は複数)との相互作用は、免疫系内の様々な機能に影響しうる。このようなりガンド/レセプター相互作用の例には、例えばB細胞の抗体産生細胞への分化を促進するためのC D 4 0 レセプターと結合するC D 4 0 リガンド(Grewal 等, *Immunol. Res.*, 16:59-70 (1997))、例えば濾胞性樹状細胞の分化状態を制御することによる体液性免疫応答に影響するためのリンホトキシン- レセプターと結合するリンホトキシン- リガンド(Mackay 及び Browning, N

ature, 395:26-27 (1998))、及び、例えばT細胞シグナルへのB細胞の応答を制御するためのOX40レセプターを結合するOX40リガンド(Flynn 等, J. Exp. Med., 188:297-304 (1998))がある。免疫系における働きが報告されている他のリガンド/レセプター対には、TNF- / TNFR-1やFasリガンド/Fasがある。

#### 【0006】

「TWEAK」又は「Apo-3リガンド」と称するTNFファミリーリガンドは文献に記述されている(例として、国際公開公報98/05783、国際公開公報98/35061、国際公開公報99/19490、米国特許公開2002/0015703を参照)。TWEAKリガンドは形質転換細胞系における相対的に弱いアポトーシスの誘導因子として文献で報告された(Chicheportiche 等, J. Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997)、Marsters 等, Curr. Biol., 8:525-528 (1998))。精製された可溶性TWEAKタンパク質は、HT29腺癌細胞、HeLa子宮頸癌細胞及びA375メラノーマ細胞を含むいくつかの腫瘍細胞株の分化及び/又は死を誘導するために用いられた。また、TWEAKは、HT29及びA375細胞株にケモカインIL-8を分泌させ、線維芽細胞細胞株であるWI-38に対して同じ効果を示した(Chicheportiche 等, J. Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997))。加えて、TWEAKは、様々な正常な内皮細胞株の増殖及びラット角膜の血管新生を誘導することによって、血管新生調節機能に関係しているとされている(Lynch 等, J. Interferon Cytokine Res. 18: A-46 (1998))、Jakubowski 等, J. Cell. Sci., 115:267-274 (2002)、Lynch 等, J. Biol. Chem., 274:8455-8459 (1999))。

#### 【0007】

他の組織の中でも心臓、脳、肺、肝臓などのマウス及びヒトの組織、及び脾臓などの二次リンパ系器官、及びリンパ節において、TWEAK mRNAの発現が記述されている。また、TWEAKはヒト末梢血単球に発現されており、IFN- 刺激の後にその発現が増す(Nakayama 等, J. Exp. Med., 192:1373-1380 (2000))。

TWEAKの推定されるレセプターは文献において、既に記載された(Marsters 等, Curr. Biol. 8: 525-528 (1998))。TRAMP、Apo-3、WSL-1、DR3、又はLARDと称されるこのレセプターは、TNFRファミリーのメンバーである。TRAMPの活性化は、NF-kBシグナル伝達経路を介する細胞の活性化ないしはカススペース依存性細胞死シグナル伝達経路の何れかを連動させることによって、アポトーシスを誘導することが報告された(Ashkenazi及びDixit, Science, 281:1305-1308 (1998))。現在、TRAMP / Apo-3 / DR3が実際はTWEAKの生理学的な、高親和性レセプターでないと思われる。

また、Fn-14と呼ばれているTWEAKを結合する他のレセプターが同定された。Fn-14は、線維芽細胞増殖因子誘導性の14kDaのタンパク質であり(Wiley 等, Immunity, 15:837-846 (2001))、細胞内ドメインのTRAF結合モチーフとともに、細胞外ドメインのシステインリッチドメインを1つだけ含有する、離れて関連するTNFRファミリーメンバーである。このレセプターを介して働くTWEAKは、NF-KB2p100プロセッシングと長く続くNF-KB活性化を誘導する(Saitoh 等, J. Biol. Chem., 278:36005-36012 (2003))。

#### 【0008】

(発明の概要)

TNFRリガンドファミリーメンバーであるTWEAKは、炎症誘発性サイトカインとして作用すると考えられている。下記の実施例に示すように、TWEAKは、先天性炎症応答並びに先天性免疫からT<sub>H</sub>1適応免疫への移行を抑制する際に重要な役割を果たすことが明らかにされた。したがって、アゴニストの様式又はアンタゴニストの様式の何れかでこのような活性(一又は複数)を調整することによって、様々な疾患、例として癌又は免疫関連疾患が治療されうる。

本発明は、TWEAK及び/又はTWEAKレセプターを結合して、例えば、アゴニストの様式又はアンタゴニストの様式で、TWEAK及び/又はTWEAKレセプターの活性を調整する組成物を提供する。TWEAK又はTWEAKレセプターアンタゴニストは

、例えば、TWEAK及び/又はTWEAKレセプターの活性をブロックする又は中和するために用いられうる。このような組成物及び該組成物を用いた方法は、癌及び自己免疫性疾患を含む様々な疾患を治療するために使用されてもよい。例として、TWEAKを結合して、免疫細胞上のTWEAKの活性を中和する又はブロックするアンタゴニスト抗体は、過剰な先天性及び/又は適応の免疫系疾患と関係する症状を阻害するために哺乳動物のナチュラルキラー(NK)細胞の数と作用を亢進するために用いられうる。本発明の組成物は、TWEAK及び/又はTWEAKレセプターを結合するモノクローナル抗体、可溶性TWEAK-レセプター-Ig融合タンパク質、又はTWEAK及び/又はTWEAKレセプターの活性を拮抗しうる他の分子を含む。

【0009】

本発明は、治療的有効量のTWEAKアンタゴニストと受容可能な担体含有してなる組成物が投与されることを含む、癌又は感染症などの疾患の治療方法を提供する。TWEAKアンタゴニストは、TWEAKリガンドに対する抗体、TWEAKレセプターに対する抗体、TWEAKレセプターへのTWEAKリガンドの結合を修飾する薬剤、及び、TWEAKレセプターの細胞内シグナル伝達を阻害しうる薬剤でありうる。好ましい実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。より好ましい実施態様では、モノクローナル抗体はTWEAKリガンドに対するものである。TWEAKアンタゴニストは、TWEAKリガンドに選択的に結合しうるリガンド結合ドメインを有する可溶性TWEAKレセプターでありうる。一実施態様では、可溶性TWEAKレセプターは、ヒト免疫グロブリンIgGドメインを含みうる。

本発明は、有効量のTWEAKアンタゴニストと、場合によって、薬学的に有効な担体含有してなる組成物が投与されることを含む、哺乳動物の先天性 $T_H1$ 応答又は活性を亢進するための方法を更に含む。

【0010】

さらに、本発明は、有効量のTWEAKアンタゴニストと、場合によって、薬学的に有効な担体含有してなる組成物が投与されることを含む、哺乳動物のNK細胞活性を亢進するための方法を含む。

更なる実施態様では、例えば、TWEAK及び/又はTWEAKレセプターの活性を刺激するか又は亢進するために、TWEAK又はTWEAKレセプターアゴニストが用いられうる。本発明は、TWEAK及び/又はTWEAKレセプターを結合して、TWEAK及び/又はTWEAKレセプターの活性を刺激するか又は亢進する組成物を提供する。このような組成物及び該組成物を用いた方法は、自己免疫性疾患などの免疫関連疾患を含む様々な疾患を治療するために使用されうる。例として、TWEAKレセプターを結合して、TWEAKレセプターの活性を刺激するか又は亢進するアゴニスト抗体は、 $T_H1$ 作動性自己免疫性疾患、例としてクローン病、炎症性腸疾患、多発性硬化症及び関節炎を寛解するために用いられうる。

本発明は、治療的有効量のTWEAK又はTWEAKレセプターアゴニストと受容可能な担体含有してなる組成物が投与されることを含む、免疫関連症状の治療方法を提供する。TWEAKアゴニストは、TWEAKレセプターに対する抗体でありうる。好ましい実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。より好ましい実施態様では、モノクローナル抗体はTWEAKレセプターに対するものである。

【0011】

更なる実施態様は、限定する目的のものではない以下の特許請求の範囲の例により説明する：

1. 哺乳動物の癌細胞を有効量のアンタゴニスト分子に曝すことを含む癌の治療方法であって、該アンタゴニストは、

- a) 抗TWEAK抗体；
- b) 抗TWEAKレセプター抗体；
- c) TWEAKレセプターイムノアドヘシン；及び
- d) TWEAKレセプターの細胞内シグナル伝達をブロックする又は妨げる薬剤又は分子

からなる群から選択されるものである、治療方法。

2. 前記 TWEAK レセプター-イムノアドヘシンが免疫グロブリンの Fc 領域に融合した TWEAK レセプター配列を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

3. 前記 TWEAK レセプター配列が FN14 レセプターの細胞外ドメイン配列を含んでなる、請求項 2 に記載の方法。

4. 前記抗 TWEAK 抗体が、図 11 のアミノ酸 94 - 249 を含んでなるヒト TWEAK ポリペプチドを結合する、請求項 1 に記載の方法。

5. 前記抗 TWEAK 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 4 に記載の方法。

6. 前記抗 TWEAK レセプター-抗体が、図 12 のアミノ酸配列を含んでなるヒト FN14 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 1 に記載の方法。

7. 前記抗 TWEAK レセプター-抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 6 に記載の方法。

8. 前記哺乳動物の癌細胞が、化学療法剤、放射線、プロドラッグ、細胞障害性剤又は増殖阻害剤にも曝される、請求項 1 に記載の方法。

#### 【0012】

9. 哺乳動物に有効量のアンタゴニスト分子が投与されることを含む、哺乳動物の NK 細胞活性を亢進する方法であって、該アンタゴニストは、

e) 抗 TWEAK 抗体；

f) 抗 TWEAK レセプター-抗体；

g) TWEAK レセプター-イムノアドヘシン；及び

h) TWEAK レセプターの細胞内シグナル伝達をブロックする又は妨げる薬剤又は分子からなる群から選択されるものである、方法。

10. 前記 TWEAK レセプター-イムノアドヘシンが免疫グロブリンの Fc 領域に融合した TWEAK レセプター配列を含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

11. 前記 TWEAK レセプター配列が FN14 レセプターの細胞外ドメイン配列を含んでなる、請求項 10 に記載の方法。

12. 前記抗 TWEAK 抗体が、図 11 のアミノ酸 94 - 249 を含んでなるヒト TWEAK ポリペプチドを結合する、請求項 9 に記載の方法。

13. 前記抗 TWEAK 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 12 に記載の方法。

14. 前記抗 TWEAK レセプター-抗体が、図 12 のアミノ酸配列を含んでなるヒト FN14 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 9 に記載の方法。

15. 前記抗 TWEAK レセプター-抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 14 に記載の方法。

#### 【0013】

16. 哺乳動物に有効量のアンタゴニスト分子が投与されることを含む、哺乳動物の先天性 T<sub>H</sub>1 応答又は活性を亢進する方法であって、該アンタゴニストは、

i) 抗 TWEAK 抗体；

j) 抗 TWEAK レセプター-抗体；

k) TWEAK レセプター-イムノアドヘシン；及び

l) TWEAK レセプターの細胞内シグナル伝達をブロックする又は妨げる薬剤又は分子からなる群から選択されるものである、方法。

17. 前記 TWEAK レセプター-イムノアドヘシンが免疫グロブリンの Fc 領域に融合した TWEAK レセプター配列を含んでなる、請求項 16 に記載の方法。

18. 前記 TWEAK レセプター配列が FN14 レセプターの細胞外ドメイン配列を含んでなる、請求項 17 に記載の方法。

19. 前記抗 TWEAK 抗体が、図 11 のアミノ酸 94 - 249 を含んでなるヒト TWEAK ポリペプチドを結合する、請求項 16 に記載の方法。

20. 前記抗 TWEAK 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 1

10

20

30

40

50



9 に記載の方法。

21. 前記抗 TWEAK レセプター抗体が、図 12 のアミノ酸配列を含んでなるヒト FN14 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 16 に記載の方法。

22. 前記抗 TWEAK レセプター抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 21 に記載の方法。

【0014】

23. 哺乳動物に有効量のアンタゴニスト分子が投与されることを含む、哺乳動物の先天性 T<sub>H</sub>2 媒介性疾患の治療方法であって、該アンタゴニストは、

m) 抗 TWEAK 抗体；

n) 抗 TWEAK レセプター抗体；

o) TWEAK レセプターイムノアドヘシン；及び

p) TWEAK レセプターの細胞内シグナル伝達をブロックする又は妨げる薬剤又は分子からなる群から選択されるものである、方法。

24. 前記 TWEAK レセプターイムノアドヘシンが免疫グロブリンの Fc 領域に融合した TWEAK レセプター配列を含んでなる、請求項 23 に記載の方法。

25. 前記 TWEAK レセプター配列が FN14 レセプターの細胞外ドメイン配列を含んでなる、請求項 24 に記載の方法。

26. 前記抗 TWEAK 抗体が、図 11 のアミノ酸 94 - 249 を含んでなるヒト TWEAK ポリペプチドを結合する、請求項 23 に記載の方法。

27. 前記抗 TWEAK 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 26 に記載の方法。

28. 前記抗 TWEAK レセプター抗体が、図 12 のアミノ酸配列を含んでなるヒト FN14 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 23 に記載の方法。

29. 前記抗 TWEAK レセプター抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 28 に記載の方法。

30. 前記 T<sub>H</sub>2 媒介性疾患がアレルギー又は喘息である、請求項 23 に記載の方法。

【0015】

31. 哺乳動物に有効量のアゴニスト分子が投与されることを含む、免疫関連疾患の治療方法であって、該アンタゴニストは、

a) 抗 TWEAK レセプター抗体；

b) TWEAK ポリペプチド；及び

c) TWEAK ポリペプチド変異体

からなる群から選択されるものである、方法。

32. 前記抗 TWEAK レセプター抗体が、図 12 のアミノ酸配列を含んでなるヒト FN14 レセプターポリペプチドを結合する、請求項 31 に記載の方法。

33. 前記抗 TWEAK レセプター抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 32 に記載の方法。

34. 前記免疫関連疾患が自己免疫性疾患である、請求項 31 に記載の方法。

35. 前記自己免疫性疾患が、クローン病、炎症性腸疾患、多発性硬化症又は関節炎である、請求項 34 に記載の方法。

【0016】

(発明の詳細な説明)

本明細書中に記載又は参照の技術及び手順は一般的に十分理解されるものであり、例えば Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. に記載の広く利用される分子クローニング方法論などの、当分野の技術者による従来の方法論を用いて通常行われるものである。好ましくは、市販のキットや試薬の使用を伴う手順は、特に明記しない限り、プロトコール及び/又はパラメータを定義する製造者に従って一般的に行われる。

本方法及びアッセイを開示する前に、本発明は、ここに記載の特定の方法論、プロトコール、細胞株、動物種や属、コンストラクト及び試薬に限定されるものではなく、変更さ

10

20

30

40

50

れてもよいことを理解されたい。また、本明細書中で用いる用語は特定の実施態様のみを開示するためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の権利範囲を限定するものでないことを理解されたい。

#### 【0017】

本明細書で用いられる及び添付の特許請求の範囲中の単数形「a」、「and」及び「the」には、明らかな記載がない限り複数形も含まれる。ゆえに、例えば「一般的な変更」なる用語には複数の変更が含まれ、「プローブ」なる用語には、一ないし複数のプローブの言及及び当分野の技術者に公知のその等価物、並びに前述のものが含まれる。

本明細書中で引用するすべての出版物は、該出版物が引用される方法及び／又は材料を開示及び記載するために、出典明記によって本明細書中に組み込まれる。本明細書中で引用する出版物は、本出願の提出日前の開示について言及するものである。早い優先日又はより前の発明日によって刊行物に先行する権利が発明者にはないことを自認していると解釈されるべきではない。さらに、実際の出版日は明記されているものと異なり、個々に実証が必要であろう。

#### 【0018】

##### I. 定義

「TWEAK」又は「TWEAKリガンド」なる用語は、図11のアミノ酸残基1-249、図11のアミノ酸残基47-249又は図11のアミノ酸残基94-249を含有してなるポリペプチド配列、並びに、生物学的に活性な断片、上記の配列の欠失、挿入ないしは置換した変異体を包括的に指すために、本明細書において使われる。一実施態様では、ポリペプチド配列は、図11の残基47-249を含んでなり、場合によって、図11の残基94-249から成る。他の実施態様では、前記の断片ないし変異体は生物学的に活性であり、上記した配列の何れか一と少なくともおよそ80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性及びさら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。場合によって、TWEAKポリペプチドは、TWEAKコード化ポリヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる。また、この定義には、TWEAK供与源から単離されたか又は組換え法ないし合成方法により調製された天然配列のTWEAKを包含する。特別に言及しない限り、TWEAK配列において、指し示すアミノ酸残基のすべての番号付けは図11に記載の番号付けを使用する。

#### 【0019】

「細胞外ドメイン」又は「ECD」なる用語は、膜貫通及び細胞質ドメインが本質的にない、TWEAKなどのタンパク質の形態を称する。通常、ECDはこのような膜貫通及び細胞質ドメインを1%未満、好ましくはこのようなドメインを0.5%未満有している。本発明のポリペプチドとして同定される任意の膜貫通ドメイン(一又は複数)は、疎水性ドメインのタイプのものを同定するのに、当該分野で常套的に用いられている基準に従い同定されると理解されるであろう。膜貫通ドメインの正確な境界は異なるが、多くの場合は、最初に同定されたドメインのいずれか末端の約5アミノ酸を超えない程度の違いであると思われる。好ましい実施態様では、ECDは、膜貫通及び細胞質又は細胞内ドメインのない(膜結合性でない)ポリペプチドの、可溶性の細胞外ドメイン配列からなる。TWEAKの具体的な細胞外ドメイン配列は、Marsters 等, Curr. Biol., 8:525-528 (1998)、Chicheportiche 等, JBC, 272:32401-32410 (1997)において、記述される。

「TWEAKリガンド」又は「TWEAK」なる用語は、TWEAK単量体、重合体、又はそのヘテロマーないしその誘導体を指す。

#### 【0020】

「TWEAKレセプター」は、上記のTWEAKリガンド結合できる一又は複数のレセプターを指す。本明細書中の「TWEAKレセプター」には、「Fn-14」又は「FN14」と当分野で称されるレセプター及び図12に示されるアミノ酸1-129を含んでなるそのポリペプチド配列が含まれる。また、Fn14レセプターは、Wiley 等, Immunity, 15:837-846 (2001)に記述される。本明細書中で用いられる「TWEAKレセプター

」なる用語は天然配列レセプター及びレセプター変異体を包含する。これらの用語は、ヒトを含む様々な哺乳動物において、発現される T W E A K レセプターを包含する。T W E A K レセプターは、様々なヒト組織系統に天然に生じるように内生的に発現されうるか、又は組換え法ないし合成法により発現されうる。「天然配列 T W E A K レセプター」は、天然由来の T W E A K レセプターと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。ゆえに、天然配列 T W E A K レセプターは、任意の哺乳動物から天然に生じる T W E A K レセプターのアミノ酸配列を有しうる。このような天然配列 T W E A K レセプターは、天然から単離されうるか、又は組換え手段ないし合成手段により産生されうる。「天然配列 T W E A K レセプター」なる用語は、特に、レセプターの天然に生じる切断型ないし分泌型(例えば、細胞外ドメイン配列などを含有している可溶性型)、天然に生じる変異型(例えば選択的スプライシング型)及び天然に生じる対立遺伝子変異体を包含する。レセプター変異体は、天然配列 T W E A K レセプターの断片又は欠失変異体を含みうる。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 2 1 】

「抗 T W E A K 抗体」なる用語は、T W E A K リガンドの少なくとも一のエピトープと結合する任意の抗体を指す。場合によって、T W E A K 抗体は、異種性の配列ないし分子と融合するか又は結合する。好ましくは、異種性の配列は、抗体がより高次の複合体ないしはオリゴマー複合体を形成するのを促すか補助する。場合によっては、T W E A K 抗体は T W E A K に結合するが、任意の付加的な T N F ファミリーリガンド(例えば F a s リガンド、A p o 2 L / T R A I L、T N F - など)と結合又は交差反応をしない。場合によっては、抗体は T W E A K 及び / 又は T W E A K レセプター活性のアゴニスト又はアンタゴニストである。

場合によっては、本発明の T W E A K 抗体は、B I A c o r e 結合アッセイで測定されるように、約 0 . 1 n M から約 2 0 m M の範囲の濃度で T W E A K リガンドに結合する。場合によっては、本発明の T W E A K 抗体は、B I A c o r e 結合アッセイで測定されるように、約 0 . 6 n M から約 1 8 m M の I C 5 0 値を示す。

#### 【 0 0 2 2 】

「抗 T W E A K レセプター抗体」なる用語は、T W E A K レセプターの少なくとも一のエピトープと結合する任意の抗体を指す。場合によって、T W E A K レセプター抗体は、異種性の配列ないし分子に融合するか又は結合する。好ましくは、異種性の配列は、抗体がより高次の複合体ないしはオリゴマー複合体を形成するのを促すか補助する。場合によっては、T W E A K レセプター抗体は T W E A K レセプターに結合するが、任意の付加的な T N F ファミリーレセプター(例えば F A S、D R 4、D R 5、T N F R I、T N F R I I など)と結合又は交差反応をしない。場合によって、抗体は、T W E A K レセプター活性のアゴニスト又はアンタゴニストである。

場合によって、本発明の T W E A K レセプター抗体は、B I A c o r e 結合アッセイで測定されるように、約 0 . 1 n M から約 2 0 m M の範囲の濃度で T W E A K レセプターに結合する。場合によって、本発明の T W E A K レセプター抗体は、B I A c o r e 結合アッセイで測定されるように、約 0 . 6 n M から約 1 8 m M の I C 5 0 値を示す。

#### 【 0 0 2 3 】

「アンタゴニスト」なる用語は広義で用いられ、T W E A K ないし T W E A K レセプターのインビトロ、インサイツないしインビボでの一又は複数の生物学的活性を部分的又は完全に遮断(ブロック)、阻害又は中和する任意の分子を含む。T W E A K ないし T W E A K レセプターのこのような生物活性の例には、T W E A K レセプターへの T W E A K の結合、N F - k B リン酸化の活性化ないしは S T A T - 1 リン酸化の阻害、I L - 8 産生、I F N - 及び I L - 1 2 分泌の阻害、N K 細胞 A I C D の促進、血管新生の促進、又は腫瘍成長の促進などがある。アンタゴニストは直接的ないし間接的形式で機能しうる。例えば、アンタゴニストは、T W E A K レセプターへ直接結合する T W E A K の代わりに、T W E A K ないし T W E A K レセプターのインビトロ、インサイツないしインビボでの一又は複数の生物学的活性を部分的又は完全に遮断(ブロック)、阻害又は中和するように機能しうる。また、アンタゴニストは、例えば他のエフェクター分子を遮断ないし阻害する代わ

りに、TWEAKないしTWEAKレセプターのインビトロ、インサイツないしインビボでの一又は複数の生物学的活性を部分的又は完全に遮断(ブロック)、阻害又は中和するように間接的に機能しうる。アンタゴニスト分子には、分子がTWEAK及びTWEAKレセプターの生物学的活性を部分的又は完全に遮断、阻害又は中和できる「二重」アンタゴニスト活性が含まれうる。

#### 【0024】

「TWEAKアンタゴニスト」なる用語は、TWEAKないしTWEAKレセプターのそれぞれ、又はTWEAK及びTWEAKレセプターの両方の生物学的活性を部分的又は完全に遮断(ブロック)、阻害又は中和する任意の分子を指し、限定するものではないが、TWEAKレセプターの可溶性型、例えばTWEAKレセプターの細胞外ドメイン配列、TWEAKレセプターイムノアドヘシン、TWEAKレセプター融合タンパク質、TWEAKレセプターの共有結合修飾型、TWEAKレセプター抗体、及びTWEAK抗体が含まれる。TWEAKアンタゴニスト分子がTWEAKないしTWEAKレセプターの生物学的活性を部分的又は完全に遮断(ブロック)、阻害又は中和するかどうかを決定するために、例えば、TWEAKレセプターへのTWEAKの結合、又はNF- $\kappa$ Bリン酸化の活性化ないしはSTAT-1リン酸化の阻害、又はIFN- $\gamma$ 又はIL-12産生の阻害、又は細胞死の活性化に対するアンタゴニスト分子の影響(一又は複数)を評価するためにアッセイを行ってもよい。このようなアッセイは、例えば、NK細胞、マクロファージ及び樹状細胞の公知のインビトロ又はインビボアッセイ様式で実行されうる。一実施態様では、TWEAKアンタゴニストは、モノクローナル抗体又は可溶性TWEAKレセプターECD-Fc融合タンパク質を含んでなる。

10

20

#### 【0025】

「アゴニスト」なる用語は広義で用いられ、TWEAKないしTWEAKレセプターのインビトロ、インサイツないしインビボでの一又は複数の生物学的活性を部分的又は完全に刺激、亢進又は誘導する任意の分子を含む。TWEAKないしTWEAKレセプターのこのような生物活性の例には、TWEAKレセプターへのTWEAKの結合、NF- $\kappa$ Bリン酸化の活性化ないしはSTAT-1リン酸化の阻害、又はIFN- $\gamma$ 又はIL-12産生の阻害、又は細胞死の活性化などがある。アゴニストは、直接的又は間接的な様式で機能しうる。アゴニスト分子には、分子がTWEAK及びTWEAKレセプターの生物学的活性を部分的又は完全に刺激、亢進又は誘導できる「二重」アゴニスト活性が含まれうる。

30

#### 【0026】

「TWEAKアゴニスト」なる用語は、TWEAKないしTWEAKレセプターのそれぞれ、又はTWEAK及びTWEAKレセプターの両方の生物学的活性を部分的又は完全に刺激、亢進又は誘導する任意の分子を指し、限定するものではないが、TWEAKポリペプチド及びその変異体、並びにTWEAKレセプター抗体が含まれる。TWEAKアゴニスト分子がTWEAKないしTWEAKレセプターの生物学的活性を部分的又は完全に刺激、亢進又は誘導するかどうかを決定するために、例えば、IL-8産生、NF- $\kappa$ Bリン酸化、又はIFN- $\gamma$ 又はIL-12産生の阻害に対するアゴニスト分子の影響(一又は複数)を評価するためにアッセイを行ってもよい。このようなアッセイは、公知のインビトロ又はインビボのアッセイ、例えばELISA、細胞内サイトカイン産生又はレポーターアッセイで行われうる。一実施態様では、TWEAKアゴニストは組換えタンパク質を含んでなるであろう。

40

#### 【0027】

本明細書中で用いられる「哺乳動物」なる用語は、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ及びネコを含め、哺乳類として分類される任意の哺乳動物を指す。本発明の好ましい実施態様では、哺乳動物はヒトである。

「核酸」は、任意のDNA又はRNAを含むことを意味する。例えば、染色体性核酸、ミトコンドリア核酸、ウイルス核酸及び/又は細菌性核酸が組織試料中に存在する。「核酸」なる用語は、二本鎖の核酸分子の何れか又は両鎖を包含し、原型の核酸分子の任意の

50

断片又は部分を包含する。

【0028】

「遺伝子」は、タンパク質をコードする又は転写する、あるいは他の遺伝子発現を調節する際に機能的に働く任意の核酸配列又はその一部を意味する。遺伝子は、機能的なタンパク質のコードを担うすべての核酸又はタンパク質のコードあるいは発現を担う核酸の一部のみを構成してもよい。核酸配列は、エクソン、イントロン、開始領域又は終末領域、プロモーター配列、他の調節配列又は遺伝子に近接する特定の領域内に遺伝的な異常を含有してもよい。

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

【0029】

ここで「抗体」なる用語は、広い意味で用いられ、特に無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成した多特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、及び所望の生物学的活性を有する限りにおける抗体断片の範囲にわたる。

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくはその抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及びFv断片；ダイアボディ；線形抗体；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多特異性抗体が含まれる。

「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中であらつきがある。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V<sub>L</sub>)を、他端に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

【0030】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域又は相補性決定領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、FRによって近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら、Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、抗体依存性細胞媒介性障害活性(ADCC)への抗体の関与などの種々のエフェクター機能を表す。

【0031】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')<sub>2</sub>断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

10

20

30

40

50

「F<sub>v</sub>」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つの高頻度可変領域は相互に作用してV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの高頻度可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つの高頻度可変領域のみを含むF<sub>v</sub>の半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

#### 【0032】

またF<sub>a</sub>b断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(C<sub>H</sub>1)を有する。F<sub>a</sub>b'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖C<sub>H</sub>1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でF<sub>a</sub>b断片とは異なる。F<sub>a</sub>b'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも一つの遊離チオール基を担持しているF<sub>a</sub>b'に対するここでの命名である。F<sub>2</sub>(<sub>a</sub>b')<sub>2</sub>抗体断片は、間にヒンジシステインを有するF<sub>a</sub>b'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )及びラムダ( )と呼ばれる2つの明確に区別される型の何れかに分類される。

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体は異なるクラスに分類される。無傷の抗体には5つの主なクラスがある: I g A、I g D、I g E、I g G及びI g M、更にそれらは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、及びI g A 2等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 、及び $\mu$ と呼ばれる。イムノグロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られている。

#### 【0033】

「一本鎖F<sub>v</sub>」又は「s c F<sub>v</sub>」抗体断片は、抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、F<sub>v</sub>ポリペプチドはV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメイン間にポリペプチドリッカーを更に含み、それはs c F<sub>v</sub>が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s c F<sub>v</sub>の概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)内で軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成が可能であるリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号; 国際公報93/11161; 及びHollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

#### 【0034】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在しうる自然に生じる可能性がある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。更に、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体はハイブリドーマ培養により合成され、他のイムノグロブリンの混入がないという利点がある。「モノクローナル」との修飾語句は、実質的に均一な抗体の集団から得たものとしての抗体の性質を表すものであり、抗体が何か特定の方法による生成を必要として構築したものであることを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature, 256:495 (1975)に記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって作ることができ

る(例えば米国特許第4816567号を参照のこと)。また「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson等, *Nature*, 352:624-628 (1991)及びMarks等, *J. Mol. biol.* 222: 581-597 (1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから作製することもできる。

#### 【0035】

ここで言うモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を含み、それは特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体が持つ配列に一致する又は類似する重鎖及び/又は軽鎖の一部を含むものであり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体が持つ配列に一致する又は類似するものである(米国特許第4,816,567号; 及びMorrisonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。ここで対象とするキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば、ヒヒ、アカゲザル又はカニクイザルなどの旧世界サル)由来の可変ドメイン抗原結合配列とヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む(米国特許第5,693,780号)。

#### 【0036】

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒトイムノグロブリン(免疫グロブリン)に由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)由来の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。例として、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFRがヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも1又は一般的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)の一部、一般的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含む。更なる詳細については、Jones等, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature* 332:323-329 (1988); 及びPresta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)を参照のこと。

#### 【0037】

ここで使用されるところの「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合に寄与する抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は一般には「相補性決定領域」又は「CDR」のアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)、及び重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))及び/又は「高頻度可変ループ」のアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変ドメインの残基26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk *J.Mol.Biol.* 196:901-917 (1987))を含む。「フレームワーク」又は「FR」残基はここで定義するように高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

#### 【0038】

ここで用いられているように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列(即ち「異種」)と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列を含む。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIg

G-4 サブタイプ、I g A (I g A-1 及び I g A-2 を含む)、I g E、I g D 又は I g M などの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

抗体の「Fc ドメイン」なる用語は、ヒンジ、CH2 及び CH3 ドメインを含むが、抗原結合部位を欠失してる分子の一部を指す。また、この用語は、I g M 又は他の抗体アイソタイプの等価領域を包含することを意味する。

#### 【0039】

目的の抗原を「結合する」抗体とは、抗体が抗原発現細胞を標的とした治療薬又は診断剤として有用となるように十分な親和性及び / 又は結合活性を有して抗原に結合することができるものである。

ここでの目的のための「免疫療法」とは、抗体を用いた哺乳動物(好ましくはヒト患者)の治療方法を意味し、この抗体はコンジュゲートされたもの又は「ありのままの(裸の)」抗体でもよく、又は一又は複数の細胞障害性剤などの薬剤やヘテロ分子とコンジュゲート又は融合して、それによって「免疫コンジュゲート」を生成してもよい。

#### 【0040】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離され及び / 又は回収されたものを意味する。その自然環境の混入成分は、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様においては、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法により定量して、抗体が95重量%より多くなるほど、最も好ましくは99重量%より多くなるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N末端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも15の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように十分な程度まで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が包含される。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

#### 【0041】

「有効量」という用語は、疑われる疾患又は症状を予防、寛解又は治療するのに効果的な薬剤(例えば、TWEAK 抗体など)の量を意味する。

ここで使用される「処置する」又は「処置」又は「治療」とは、治癒的治療、予防的治療又は防止的治療を称する。連続的治療又は投与とは、一又は複数の日数、治療を中断することなく、少なくとも毎日であることを基本とし治療を行うことを称する。断続的治療又は投与、もしくは断続的な方法での治療又は投与とは、連続させることなく、むしろ事実的には周期的に治療することを称する。

#### 【0042】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。そのようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；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)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)のような糖タンパク質ホルモン；肝増殖因子；繊維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- 及び-；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；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；神経成長因子；血小板増殖因子；TGF- 及びTGF- のようなトランスフォーミング成長因子(TGF)；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイエチン(EPO)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン、例えばインターフェロン、-ガンマ；コロニー刺激因子(CSF)、例えばマクロファージ-CSF(M-CSF)；顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)；及び顆粒球-CSF(G-CSF)；IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、I

10

20

30

40

50



L-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17等のインターロイキン(IL)；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合は、サイトカインなる用語は天然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。

#### 【0043】

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を称する。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 $Re^{186}$ )、化学療法剤、及び細菌性、真菌性、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素等の毒素又はその断片を含むことが意図されている。

10

#### 【0044】

「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<sup>TM</sup>)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(al tretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramid)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)；プリオスタチン；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CBI-TMIを含む)；エレトロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(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(cholophosphamid)、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)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofوسفamid)、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(enediynes)抗生物質等の抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシンガンマ1I及びカリケアマイシンフィーI1、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照のこと)；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン(dynemicin)；ビスホスホナート類、例えばクロドロナート；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン(enediynes)抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aciacinomysins)、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)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カリミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトロビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン(アドリアマイシン<sup>TM</sup>)(モルフォリノ-ドキシソルビシン、シアノモルフォリノ-ドキシソルビシン、2-ピロリノ-ドキシソルビシン及びデオキシドキシソルビシンを含む)、エビルビシン、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(mitomycins)、例えばマイトマイシン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(zin

20

30

40

50

ostaticin)、ゾルピシン(zorubicin)；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(denopterin)、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(frolic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルラシル(eniluracil)；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)；ピラルピシン；ロソキサントロン(losoxantrone)；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K (登録商標)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニウアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(trichothecenes)(特に、T-2トキシシン、ベラキュリンA(verracurin A)、ロリデンA(roridin A)及びアングイデン(anguidine))；ウレタン；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、例えばバクリタキセル(タキソール(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、及びドキセタキセル(タキソテア(登録商標)、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲンシタビン(gemcitabine)(Gemzar<sup>TM</sup>)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ピンブラスチン；プラチナ；エトボシド(V P - 1 6)；イフォスファミド；ミトキサントン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン(navelbine)(Navelbine<sup>TM</sup>)；ノバントロン(novantron)；テニボシド；エダトレキセート(edatrexate)；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 T P - 1 1；トボイソメラーゼインヒビターR F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸等のレチノイド類；カベシタビン(capecitabine)；並びに上述したものの製薬的に許容可能な塩、酸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(Nolvadex<sup>TM</sup>を含む)、ラロキシフェン(raloxifene)、ドロロキシフェン(droloxifene)、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 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びトレミフェン(Fareston<sup>TM</sup>)を含む抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERMs)；副腎におけるエストロゲン生成を調節する、アロマターゼ酵素を阻害するアロマターゼインヒビター、例えば4(5)-イミダゾール類、アミノグルテチミド、酢酸メゲステロール(Megace<sup>TM</sup>)、エグゼメスタン(exemestane)、ホルメスタン(formestane)、ファドロゾール、ボロゾール(vorozole)(Rivisor<sup>TM</sup>)、レトロゾール(letrozole)(Femara<sup>TM</sup>)、及びアナストロゾール(anastrozole)(Arimidex<sup>TM</sup>)；及び抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；並びに上記のものの製薬的に許容可能な塩、酸又は

誘導体が含まれる。

【 0 0 4 5 】

ここで使用される場合の「増殖阻害剤」なる用語は、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて、ここで同定された任意の遺伝子が過剰発現する細胞、特に癌細胞の増殖を阻害する化合物又は組成物を称する。よって、増殖阻害剤とは、S期において、このような遺伝子を過剰発現する細胞のパーセンテージを有意に低減させるものである。増殖阻害剤の例には、細胞分裂周期の進行をブロックする薬剤(S期以外の場所に)、例えばG1停止及びM期停止を誘発する薬剤が含まれる。伝統的なM期ロッカーには、ビンカ(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インヒビター、例えばドキシルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンが含まれる。G1を停止させるこれらの薬剤、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-CがS期停止に溢流する。更なる情報は、Murakamiらにより「細胞分裂周期の調節、オンコジーン、及び抗新生物薬」と題された、癌の分子的基础、Mendelsohn及びIsrael編、第1章(WB Saunders; Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

10

【 0 0 4 6 】

「アポトーシス」及び「アポトーシス活性」という用語は広義に使用され、典型的には、細胞質の凝集、原形質膜の微絨毛の喪失、核の断片化、染色体DNAの分解又はミトコンドリア機能の喪失を含む一又は複数の特徴的な細胞変化を伴う、哺乳動物における細胞死の規則的又はコントロールされた形態を称する。この活性は、当該分野で公知の、例えば細胞生死判別アッセイ(例えばアラマーブルーアッセイ又はMTTアッセイ)、FACS分析、カスパーゼ活性化、DNA断片化(例えば、Nicolettiら, J. Immunol. Methods, 139: 271-279(1991)を参照)、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。

20

【 0 0 4 7 】

ここで使用される場合、「疾患」なる用語は、本明細書に記載の組成物による治療により利益を得る任意の症状を指す。これには、慢性及び急性の疾患、並びに問題の疾患に哺乳動物を罹患させやすくする病理状態が含まれる。ここで治療される疾患の非限定的例には、良性及び悪性の腫瘍;炎症性、感染性、血管新生性及び免疫学的疾患、自己免疫性疾患、関節炎(関節リウマチを含む)、多発性硬化症、及びHIV/AIDSが含まれる。

30

「癌」、「癌性」又は「悪性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を称するか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、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具体的な例には、扁平上皮細胞癌、骨髄腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、消化器系(管)癌、腎臓癌、卵巣癌、肝臓癌、リンパ芽球性白血病、リンパ性白血病、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、脾臓癌、多形成膠芽腫、子宮頸癌、脳癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞腫(hepatoma)、乳癌、結腸癌、及び頭部及び頸部の癌が含まれる。

40

【 0 0 4 8 】

本明細書中で用いる「体液性応答」及び「細胞性応答」なる用語は、哺乳動物の抗原に対する免疫応答を指すものであって、その応答によって、哺乳動物は抗原に対する抗体を産生するか、又は抗原に対する細胞障害性応答を生じるか、又はその両方を産生する。Tヘルパー細胞のTh1クラスは細胞性応答の誘導のために働き、Tヘルパー細胞のTh2クラスは高親和性抗体の効率的な産生のために働く。

本明細書中で用いる「Tヘルパー(Th)細胞」なる用語は、細胞障害性T細胞の生成を促して、B細胞と協働して抗体産生を刺激するT細胞の機能的なサブクラスを指す。ヘルパーT細胞は、クラスII MHC分子と共同して抗原を認識し、エフェクター細胞に接触依存性及び接触非依存性の(サイトカイン及びケモカイン)シグナルを与える。

「Th1」なる用語は、TNF、インターフェロン 及びIL-2(及び他のサイトカイ

50

ン)を産生するＴヘルパー細胞のサブクラスを指すものであって、抗原刺激に対する細胞性の、すなわち非免疫グロブリンの応答に関連する炎症反応を誘発する。

「Ｔｈ２」なる用語は、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、及び他のサイトカインを産生するＴヘルパー細胞のサブクラスを指すものであって、免疫抗原刺激に対する免疫グロブリン(体液性)応答と関係している。

#### 【００４９】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫系の成分が、哺乳動物の病理学的状態の原因であるか、媒介又は寄与するものである疾患を意味する。また、免疫反応の刺激又は介在により疾患の進行に改善された効果が付与される疾患も含まれる。この用語には、自己免疫疾患、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染症、及び免疫不全症が含まれる。そのうちの一部が免疫又はＴ細胞媒介であり、本発明によって治療することが可能な免疫関連及び炎症性疾患の例には、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、若年型慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症(強皮症)、特発性炎症性筋疾患(皮膚筋炎、多発性筋炎)、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血(免疫性汎血球減少症、発作性夜間ヘモグロビン尿症)、自己免疫性血小板減少症(溶血性血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症)、甲状腺炎(バセドウ病、橋本甲状腺炎、若年型リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)、糖尿病、免疫媒介腎疾患(糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎)、中枢及び末梢神経系の脱髄疾患例えば多発性硬化症、特発性脱髄多発神経障害又はギラン・バレー症候群、及び慢性炎症性脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患例えば感染性肝炎(A、B、C、D、E型肝炎、及び他の非肝親和性ウイルス)、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患等の炎症性及び線維性肺疾患(潰瘍性大腸炎：クローン病)、グルテン過敏性腸疾患、及びウィップル病、水疱性皮膚病を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、多形滲出性紅斑及び接触性皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患例えば好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、拒絶反応及び移植片対宿主病を含む移植関連疾患が含まれる。感染症疾患には、AIDS(HIV感染)、A、B、C、D及びE型肝炎、細菌感染症、真菌感染症、原虫感染症及び寄生虫症が含まれる。

#### 【００５０】

本明細書の「自己免疫性疾患」という語は広義で使用され、一般的な意味で、自己の組織成分に対する個体の体液性又は細胞性の免疫応答から正常又は健康な組織の破壊が生じる、哺乳動物の障害、又は状態を指す。例として、これらに限定するものではないが、エリテマトーデス、甲状腺炎、リウマチ様関節炎、乾癬、多発性硬化症、自己免疫糖尿病、及び炎症性腸疾患(IBD)が挙げられる。

ここで使用される場合の「タグ化」なる用語は、「タグポリペプチド」に融合した、抗体又はポリペプチドを含有するキメラ分子を称す。タグポリペプチドは、その抗体が産生するエピトープを提供するか、又はオリゴマー化(例えば、ロイシンジッパードメインを有するペプチドにより生じる)等の他のいくつかの機能を提供するのに十分な残基を有しているが、その長さは、一般的に抗体又はポリペプチ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、タグ特異性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かなり独特である。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～約50のアミノ酸残基(好ましくは約10～約20のアミノ酸残基)を有する。

#### 【００５１】

「単離された」とは、ここで開示された種々のペプチド又はタンパク質を記述するために使用するとき、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたペプチド又はタンパク質を意味する。その自然環境の混入成分とは、ペプチドないしタンパク質の診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ペプチド又はタンパク質は、(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、N末

端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによって均一性が得られるように十分なほど、又は(3)質量分光分析又はペプチドマッピング技術によって均一性が得られるように十分なほど精製される。単離された材料には、その自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのペプチド又はタンパク質が包含される。しかしながら、通常は、単離されたペプチド又は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。

#### 【0052】

ここで同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、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、参照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により達成可能であり、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要なアルゴリズムの割り当てを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。ここでの目的のために、パーセントアミノ酸配列同一性値は、ジェネンテック社によって作成され、ソースコードは米国著作権庁, Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得ることができる。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, CAを通して公的に入手可能である。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

10

20

#### 【0053】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェント」は、通常、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなればなるほど、適切なアニーリングのために温度を高くする必要があり、プローブが短くなればなるほど、温度を低くする必要が生じる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合、変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション可能な配列との間の所望の相同性の程度が高い場合、使用できる温度が相対的に高くなる。その結果、相対的に温度が高いと、反応条件がよりストリンジェントになり、相対的に温度が低いとストリンジェントが低くなる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェントの更なる詳細及び説明は、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

30

#### 【0054】

ここで定義される「高度のストリンジェント条件」は、(1)洗浄に低イオン強度及び高温を用いる；50 で、0.015 Mの塩化ナトリウム/0.0015 Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いる；(2)ハイブリダイゼーション中に変性剤を用いる；42 で、50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50 mMのpH 6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750 mMの塩化ナトリウム、75 mMのクエン酸ナトリウムを用いる；又は(3)42 で、50%ホルムアミド、5×SSC(0.75 MのNaCl、0.075 Mのクエン酸ナトリウム)、50 mMのリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハート液、超音波処理サケ精子DNA(50 µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸を用いて、42 で0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)及び55 の50%ホルムアミド中にて洗浄、次いでEDTAを含む0.1×SSCにて55 で高ストリンジェントな洗浄を行うことによって同定され得る。

40

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているように同定され、20%ホルムアミド、5×SSC(150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸三ナト

50

リウム)、50 mMリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×デンハート液、10%デキストラン硫酸、及び20 mg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中にて37℃で終夜インキュベーションの後、1×SSC中にておよそ37-50℃でフィルターの洗浄を含む。当業者であれば、プローブ長等の因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

#### 【0055】

「プライマー」又は「複数のプライマー」なる用語は、相補的なRNA又はDNA標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズして、例えばポリメラーゼ連鎖反応で起こるような、ヌクレオチジルトランスフェラーゼの働きによってモノヌクレオチドからポリヌクレオチドの段階的な合成の開始点となるオリゴヌクレオチド配列を指す。

10

「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配列を称す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、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ブ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、「作用可能に結合している」とは、結合した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ことを意味する。しかし、エンハンサーは近接している必要はない。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、従来手法に従って、合成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。

20

#### 【0056】

「抗体依存性細胞障害活性」又は「ADCC」は、Fcレセプター(FcR)を発現する非特異的細胞障害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞を溶解する細胞媒介性反応を指す。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞は、FcγRIIIのみを発現するのに対して、単球はFcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血性細胞でのFcRの発現は、Ravetch及びKinet, Annu.Rev.Immunol., 9:457-92(1991)の464頁の表3に要約されている。対象分子のADCC活性を評価するためには、米国特許第5,500,362号又は第5,821,337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施される。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK)細胞が含まれる。あるいは、又は付加的に、対象分子のADCC活性は、例えばClynes等, PNAS(USA), 95:652-656(1998)に開示されたような動物モデルにおいて、インビボで評価されてもよい。

30

「ヒトエフェクター細胞」とは、1つ又は複数のFcRを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。好ましくは、その細胞が少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行する。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCとNK細胞が好適である。

40

#### 【0057】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを表す。好適なFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(レセプター)に結合し、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcγRIIレセプターは、FcγRIIA(「活性化レセプター」)及びFcγRIIB

50

(「阻害レセプター」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFcγRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン・ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害レセプターFcγRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン・ベース阻害モチーフ(ITIM)を有する(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234(1997)参照)。FcγRはRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capelら, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Hasら, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)において概説されている。将来同定されるものも含む他のFcγRが、ここにおける「FcγR」なる用語によって包含される。この用語は、胎児への母性IgGの移動に寄与する新生児レセプター、FcγRnもまた含む(Guyerら, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKimら, J. Immunol. 24:249 (1994))。本明細書中のFcγRはFcγRIIIaをコードする遺伝子内に遺伝的二形性などの多型を含有し、それによってIgG1に結合するレセプターの領域内に位置するアミノ酸位置158がフェニルアラニン(F)又はバリン(V)となる。ホモ接合体バリンFcγRIIIa(FcγRIIIa-158V)は、ホモ接合体フェニルアラニンFcγRIIIa(FcγRIIIa-158F)又はヘテロ(FcγRIIIa-158F/V)レセプターと比較してインビトロでのADCC媒介を増加し、ヒトIgG1に対する親和性も高いことが示された。

#### 【0058】

「補体依存性細胞障害活性」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。補体活性化経路は補体系(C1q)の第1補体が、同種抗原と結合した分子(例えば、抗体)に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

#### 【0059】

#### II. 本発明の様々な方法及び材料

感染に対する宿主の防御には、哺乳動物の先天性免疫系及び適応免疫系の調整された機能が関与する。NK細胞、樹状細胞、マクロファージ及び好中球を含む先天性免疫系は、感染に対する初期応答だけでなく、T及びB細胞ベースの適応免疫への移行を導く際にも重要な役割を果たす(Diefenbach及びRaulet, Immunol. Rev., 188:9-21 (2002))。先天性免疫細胞は、感染細胞の直接的な死滅及び除去を媒介し、その後、それらは樹状細胞との物理学的な相互作用による適応機能の発達を促し、その結果特定のサイトカインの分泌を促す(Diefenbach及びRaulet, Immunol. Rev., 181:170-184 (2001)、Fernandez 等, Eur. Cytokine Netw., 13:17-27 (2002)、Ikeda 等, Cytokine Growth Factor Rev., 13:95-109 (2002))。INF- $\gamma$  及びIL-12はT<sub>H</sub>1サブタイプに対するヘルパーCD4<sup>+</sup>T細胞の発達を極性化して、CD8<sup>+</sup>エフェクターT細胞応答を活性化する一方、IL-4はT<sub>H</sub>2クラスを誘導して、B細胞媒介性の抗体応答を刺激する(上掲のDiefenbach 及び Raulet, 2002、上掲のFernandez 等, 2002、上掲のIkeda 等, 2002)。

#### 【0060】

先天性免疫は、感染に対する防御の第一線としてだけでなく、適応免疫の発達のために必要な時間の間、宿主を保護するためにも重要である。さらに、先天性応答は、感染性抗原刺激に対する応答の際に発達する適応メカニズムの性質に非常に影響する(Castriconi 等, C R Biol., 327:533-537 (2004)、Lo 等, Immunol. Rev., 169:225-239 (1999)、Palucka 及び Banchereau, J. Clin. Immunol., 19:12-25 (1999)、Palucka 及び Banchereau, Nat. Med., 5:868-870 (1999))。マクロファージ及び樹状細胞とのNK細胞の相互作用は、特定のT細胞及び/又はB細胞の応答の発達を支える特定のサイトカインの分泌を促進する(Palucka 及び Banchereau, J. Clin. Immunol., 19:12-25 (1999)、Palucka 及び Banchereau, Nat. Med., 5:868-870 (1999)、Trinchieri, Semin. Immunol., 7:83-88 (1995))。マクロファージ及び樹状細胞によるNK細胞及びIL-12産生によるINF- $\gamma$  分泌は、適応性T<sub>H</sub>1応答の発達を促進して、細胞障害性T細胞エフェクター機能を引き起こす(Coudert 等, J. Immunol., 169:2979-2987 (2002)、Fujii 等, J. Exp. Med. 40 50

, 198:267-279 (2003)、Gerosa 等, J. Exp. Med., 195:327-333 (2002)、Pan 等, Immunol. Letters, 94:141-151 (2004)、Varma 等, Clin. Diag. Lab Immunol., 9:530-543 (2002))。対照的に、NK 細胞による IL-4 産生は、適応性 T<sub>H</sub> 2 の分化及び B 細胞活性化を促進する(Araujo 等, Int. Immunol., 12:1613-1622 (2000)、Kaneko 等, J. Exp. Med., 191:105-114 (2000)、Leite-De-Moraes 等, J. Immunol., 166:945-951 (2001))。

#### 【0061】

本出願において開示される実施例により、TWEAK が先天性免疫系の重要な調節因子であり、適応免疫との干渉物質(インターフェース)であることが示された。先天性免疫細胞、すなわち、NK 細胞、マクロファージ及び樹状細胞は、TWEAK とそのレセプターである FN14 を発現して、刺激の際に両分子を上方制御した。それに対して、T 細胞及び B 細胞を含む適応免疫系の細胞は、有意なレベルの TWEAK 又は FN14 を発現しなかった。この発現パターンから、先天性免疫細胞における TWEAK シグナル伝達が、先天性免疫機能を調節し、先天性活性のこの制御によって適応免疫応答に間接的に影響していることが示唆される。

下記の実施例の項目にて説明されるように、作製された TWEAK ノックアウトマウスが生存して健康であったことから、TWEAK は正常な発達に重要でないことが示唆される。しかしながら、TWEAK<sup>-/-</sup> マウスは、年齢が一致した野生型同腹仔と比較して、NK 細胞の有意な集積があったことから、NK 細胞の生成及び/又は死の制御に TWEAK が関係している。TWEAK 遺伝子欠失により骨髄中の NK 細胞の量が変化しなかったことから、TWEAK 欠失下では NK 細胞形成が変化しないことが示唆される。逆にいえば、TWEAK の中和により、TNF $\alpha$ 、LPS 又は IFN $\gamma$  によるアポトーシスの誘導からヒトの NK 細胞が保護された。これらの所見から、生成の増加ではなくむしろ AICD の減少によって、TWEAK<sup>-/-</sup> マウスの NK 細胞蓄積が生じることが示唆される。ゆえに、TWEAK の免疫調節における一つの役割は、免疫学的分解の際に活性化された NK 細胞の欠失をサポートすることによって、有害となりうる過剰な先天性応答の発達の予防を助けることでありうる。

#### 【0062】

出願人の実験例では、マウスの TWEAK 欠損はマウスの全身 LPS 注射への感受性を実質的に増やした。これは TWEAK が先天性応答の抑制に関係している。NK 細胞活性が LPS に対する全身性炎症反応の重要な構成成分であるとすれば(Emoto 等, J. Immunol., 169:1426-1432 (2002)、Heremans 等, Eur. J. Immunol., 24:1155-1160 (1994))、TWEAK<sup>-/-</sup> マウスの過敏症は NK 細胞数の増加のためであるといえる。しかしながら、出願人はさらに、TWEAK 欠損 NK 細胞がより多くの IFN $\gamma$  を産生する一方で、TWEAK<sup>-/-</sup> のマクロファージは LPS へのインビボ曝露の後に、IL-12 の生成がより多く、IL-10 の生成がより少なくなることを発見した。さらに、TWEAK 中和により、LPS 刺激性 NK 細胞及びマクロファージによる IFN $\gamma$  及び IL-12 の産生が亢進された。これらの結果から、TWEAK<sup>-/-</sup> マウスの LPS に対する感受性の増加は、その NK 細胞数の増加だけでなく、より多くの先天性免疫細胞の IFN $\gamma$  及び IL-12 の産生に由来することが示唆される。ゆえに、NK AICD のサポートに加えて、TWEAK は、重要な炎症誘発性サイトカインの分泌を抑制することによって、先天性応答を抑制しうる。この点に関して、TWEAK は、IL-12 及び IFN $\gamma$  の分泌を促進する、その相対的な TNF $\alpha$  と著しく異なるため、先天性炎症応答を増やす(D'Andrea 等, J. Exp. Med., 178:1041-1048 (1993)、Oswald 等, Eur. Cytokine Netw., 10:533-540 (1999)、Wilhelm 等, J. Immunol., 166:4012-4019 (2001)、Zhan and Cheers, J. Immunol., 161:1447-1453 (1998))。実際、TWEAK ノックアウトの LPS 過敏症とは逆に、TNF $\alpha$  又は TNFR1 ノックアウトマウスは LPS 誘導性の致死に耐性がある(Pasparakis 等, J. Exp. Med., 184:1397-1411 (1996)、Rothe 等, Circ. Shock, 44:51-56 (1994))。

#### 【0063】

STAT-1 は感染に応答して IFN $\gamma$  及び IL-12 の産生に伴われる重要なシグナ



ル伝達因子である(Dupuis 等, Immunol. Rev., 178:129-137 (2000)、Feinberg 等, Eur. J. Immunol., 34:3276-3284 (2004))。TWEAK<sup>-/-</sup>及び野生型マウスからのNK細胞とマクロファージのホスホ-STAT-1の比較により、高い基礎活性とLPSに応答して亢進した刺激が明らかにされた。この結果から、機能を亢進するTNF- $\alpha$ とは対照的に、TWEAKはSTAT-1活性を阻害することが示された(Chen 等, Immunology, 107:199-208 (2002))。ゆえに、TWEAKによるIFN- $\gamma$ 及びIL-12の産生の抑制に貢献しうる第一のメカニズムは、STAT-1の阻害である。STAT-1のように、NF- $\kappa$ Bもサイトカイン遺伝子転写の制御に重要な役割を果たす(Feinberg 等, Eur. J. Immunol., 34:3276-3284 (2004)、Zhan 及び Cheers, J. Immunol., 161:1447-1453 (1998))。ヒトのNK細胞及びマクロファージでは、TWEAKはNF- $\kappa$ Bの長期にわたるリン酸化を促した。これにより、転写抑制因子HDAC-1とこの因子の結合が誘導された。対照的に、TNF- $\alpha$ は、一時的なNF- $\kappa$ Bリン酸化と転写性補活性化因子p300への結合を誘導した。ゆえに、IFN- $\gamma$ 及びIL-12の合成のTWEAKによる抑制に貢献する第二のメカニズムは、NF- $\kappa$ BとHDAC-1間の結合の誘導でありうる。NF- $\kappa$ Bの調節に関するTWEAKとTNF- $\alpha$ との間の相違は、他の転写制御因子とのこの因子の結合に影響するNF- $\kappa$ Bリン酸化の動態によるものであるといえるので、一時的なリン酸化がp300との相互作用に有利に働く一方で、持続した修飾によりHDAC-1への結合が促進される。この所見とTNF- $\alpha$ によるc-Jun N末端キナーゼ(JNK)経路のコントロールとが類似しているようである。この場合の持続的なJNKリン酸化に対する一時的なリン酸化は細胞死に対する細胞生存の割合に相関している(Varfolomeev 及び Ashkenazi, Mol. Cell Biol., 24:997-1006 (2004))。

#### 【0064】

出願人の所見から、感染に応答したNK細胞及びマクロファージによるTWEAKの発現が、NK AICDを促進すること並びにNK細胞及びマクロファージによるIFN- $\gamma$ 及びIL-12の産生を抑制することによって、先天性炎症応答を抑制するのを促すことが示唆される。IFN- $\gamma$ 及びIL-12は先天性炎症応答を上げるだけではなく、細胞性T<sub>H</sub>1タイプ応答に有利に働くように適応免疫に変化を促す。出願人の所見から、TWEAKの非存在下において、老齢のマウスがNK細胞(それは、脾細胞の非常に小さい分画を構成する)だけでなくT<sub>H</sub>1表現型のT細胞の数が増加している拡大脾臓を発達させたことが観察された。さらに実験的所見から、適応変化のTWEAKによる調節がいえる。マウスB16メラノーマモデルにおいて、野生型の同腹仔が腫瘍の成長に抗しないのに対して、TWEAK<sup>-/-</sup>マウスは、中程度に悪性のB16.F10サブクローンを成長させなかった。TWEAK<sup>-/-</sup>マウスのNK細胞数の増加から腫瘍拒絶能がいえる一方で、これらマウスの抗腫瘍応答はCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖(expansion)も関係しており、これはT<sub>H</sub>1応答の増強と一致する。また、TWEAK<sup>-/-</sup>マウスは野生型のコントロールよりもより活発なB16.BL6サブクローンの成長を抑制し、生体外(エキスピボ)の腫瘍細胞の再投与により、CD8<sup>+</sup>T細胞とNK細胞が有意に多いIFN- $\gamma$ を産生するのに対して、マクロファージは対応するコントロールよりも多いIL-12を産生した。

#### 【0065】

したがって、この所見から、TWEAKがIFN- $\gamma$ 及びIL-12の産生を抑制して、T<sub>H</sub>1媒介性の細胞性応答の結果として生じる発達を抑制し続けることによって、先天性免疫から適応免疫への境界を調整することが示唆される。出願人は免疫調節において、TWEAKが重要な役割を果たすことを発見した。それは構造的に関連性のあるTNF- $\alpha$ の機能と著しく異なる。TNF- $\alpha$ は、先天性細胞刺激及び炎症誘発性サイトカイン分泌を促進することによって、先天性炎症応答の促進において重要な役割を果たす。対照的に、TWEAKは、NK AICDの媒介並びにNK細胞及びマクロファージによるIFN- $\gamma$ 及びIL-12の産生の抑制を介して、先天性応答を抑制するために重要なものである。TNF- $\alpha$ が、STAT-1活性化及びp300とのNF- $\kappa$ B結合を促進することによって、免疫調節性遺伝子の転写を活性化するのに対して、TWEAKはSTAT-1活性を抑制して、HDAC-1に対するNF- $\kappa$ Bの結合を誘導する。これは遺伝子

転写を阻害する。重要なことに、TWEAKは、先天性の応答から適応性の $T_H1$ 免疫応答への移行の減少に重要な役割も有する。ゆえに、TWEAKの機能は宿主哺乳動物の先天応答及び適応応答の抑制を援助しうる。これによって、過剰な炎症及び自己免疫状態の発達に対して確実に対抗する。この発見から、TWEAK阻害が抗感染及び抗腫瘍の免疫を増大するために臨床的に有用でありうるのに対して、TWEAKレセプター活性化が急性及び慢性の自己免疫性疾患のコントロールに有用でありうることを示唆される。

#### 【0066】

本発明の方法によると、TWEAKないしTWEAKレセプター活性を調整する一又は複数の分子を含有してなる組成物は、様々な疾患の治療のために使用されてもよい。例えば、TWEAKアンタゴニストは癌を治療する際に使用されてもよい。このようなTWEAKアンタゴニストには、TWEAK抗体、TWEAK変異体、TWEAKレセプターイムノアドヘシン、及びTWEAKレセプター抗体がある。TWEAKアンタゴニストはインビボ並びにエキスピボで使われてもよい。場合によって、以下に詳述するように、TWEAKアンタゴニストは医薬組成物の形態で用いられる。

更なる実施態様では、TWEAKアゴニストは、様々な免疫関連の症状を治療する際に使用されてもよい。このようなTWEAKアゴニストには、TWEAKレセプター抗体及びTWEAKポリペプチドがある。TWEAKアゴニストはインビボ並びにエキスピボで使われてもよい。場合によって、以下に詳述するように、TWEAKアゴニストは医薬組成物の形態で用いられる。

下記の説明において、様々な方法及び技術を記述する。これらの方法及び技術が様々なTWEAKアゴニスト及びアンタゴニストを調製するために同様に用いられうることが考慮される。

#### 【0067】

例として、TWEAKポリペプチド及びTWEAKポリペプチド変異体も調製できると考えられる。TWEAK変異体は、コード化DNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び/又は所望のポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシル化部位の数又は位置の変化或いは膜アンカー特性の変化などのアミノ酸変化がTWEAKポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

TWEAKポリペプチドの変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列ポリペプチドと比較してアミノ酸配列が変化するポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも一のアミノ酸が、TWEAKポリペプチドの一又は複数のドメインにおいて任意の他のアミノ酸によって置換されることである。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、TWEAKポリペプチドの配列を相同性のある既知のタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、ロイシンのセリンでの置換のような一のアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を完全長又は成熟天然タンパク質によって提示された活性について試験することにより決定される。

#### 【0068】

TWEAKポリペプチド断片も、本発明の範囲内に含まれる。このような断片は、例えば、完全長天然タンパク質と比較した際に、N-末端又はC-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、TWEAKポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

TWEAKポリペプチド断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法是、酵素的消化、例えば特定のア

ミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、或いは適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによるポリペプチド断片の生成を含む。更に他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することを含む。DNA断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。

具体的な実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換と題する以下の表に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、以下の表に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類で更に記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【0069】

表

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノロイシン	leu
Leu (L)	ノロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノロイシン	leu

【0070】

TWEAKポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又はヘリックス配置、(b)標的部位の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

10

20

30

40

50

- (1)疎水性：ノルロイシン，met，ala，val，leu，ile；
- (2)中性の親水性：cys，ser，thr；
- (3)酸性：asp，glu；
- (4)塩基性：asn，gln，his，lys，arg；
- (5)鎖配向に影響する残基：gly，pro；及び
- (6)芳香族：trp，tyr，phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、好ましくは残された(非保存)部位に導入されうる。

#### 【0071】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスクランニング、及びPCR突然変異誘発[Carter等，Nucl. Acids Res.，13:4331 (1986)；Zoller等，Nucl. Acids Res.，10:6487 (1987)]、カセット突然変異誘発[Wells等，Gene，34:315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発[Wells等，Philos. Trans. R. Soc. London SerA，317:415 (1986)]等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができ、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施してTWEAKポリペプチドの変異体DNAを作成することもできる。

また、隣接配列に沿って一つ又は複数のアミノ酸を同定するのにスクランニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスクランニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスクランニングアミノ酸である[Cunningham及びWells，Science，244:1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。更に、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い[Creighton，The Proteins，(W.H. Freeman & Co.，N.Y.)；Chothia，J. Mol. Biol.，150:1(1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

#### 【0072】

TWEAKポリペプチドの適切な高次構造を維持するのに関与しないシステイン残基はいずれも、通常セリンで置換することができ、よって分子の酸化的安定性を改善し、異常な架橋を防ぐことができる。逆に、システイン結合をTWEAKポリペプチドに加えることにより、その安定性を向上させることができる。

以下の説明は、主として、TWEAKポリペプチドコード化核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりTWEAKポリペプチドを生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いて本明細書中で考慮される様々なTWEAKアゴニスト及びTWEAKアンタゴニストを調製することができると考えられる。例えば、適切なアミノ酸配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい[例えば、Stewart等，Solid-Phase Peptide Synthesis，W.H. Freeman Co.，サンフランシスコ，カリフォルニア(1969)；Merrifield，J. Am. Chem. Soc.，85:2149-2154 (1963)参照]。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機(フォスターシティ、カリフォルニア)を用いて、製造者の指示により実施してもよい。TWEAKポリペプチドの種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて所望のTWEAKポリペプチドを生産してもよい。本明細書に記載する方法及び技術は、TWEAK変異体、TWEAKの修飾形態及びTWEAK抗体の生産にも同様に適用可能である。

#### 【0073】

##### 1. TWEAKポリペプチドをコードするDNAの単離

TWEAKポリペプチドをコードするDNAは、TWEAKポリペプチドmRNAを保有してそ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cDNA

10

20

30

40

50

ライブラリから得ることができる。従って、ヒト T W E A K ポリペプチド D N A は、ヒトの組織から調製された c D N A ライブラリから簡便に得ることができる。また T W E A K ポリペプチド-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又は既知の合成手順(例えば、自動核酸合成)により得ることもできる。

ライブラリは、対象となる遺伝子或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プローブ(少なくとも約 20 - 80 塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。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のスクリーニングは、例えば Sambrook 等, 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。T W E A K ポリペプチ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 等, 上掲 ; Dieffenbach 等, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995) ]。

10

#### 【 0 0 7 4 】

c D N A ライブラリのスクリーニング技術は本技術分野において周知である。プローブとして選択されるオリゴヌクレオチド配列は、偽陽性を最少化するために長さ及び明白さが十分でなければならない。好適には、スクリーニングするライブラリの D N A にハイブリダイズした場合にすぐに検出できるように、オリゴヌクレオチドを標識する。標識の方法は本技術分野で周知あり、それらには <sup>32</sup>P - 標識化 A T P のような放射標識、ビオチニン化又は酵素標識が含まれる。中程度のストリンジェント条件及び高度のストリンジェント条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、Sambrook 等、上掲に開示されている。

20

このようなライブラリのスクリーニング法において同定された配列を、GenBank のような公的データベース又はその他の私的な配列データベースに登録されて使用可能な他の既知の配列と比較し、整列させることができる。分子又は完全長配列の定義領域内における配列同一性(アミノ酸又はヌクレオチドのレベルで)を、当技術分野において既知の、本明細書に記載する方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、c D N A に逆転写されていない m R N A の生成中間体及び先駆物質を検出する上掲の Sambrook 等、に記述されているような従来のプライマー伸長法を使用して選択された c D N A 又はゲノムライブラリをスクリーニングすることによって得られる。

30

#### 【 0 0 7 5 】

##### 2 . 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載した T W E A K ポリペプチド生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、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する遺伝子を増幅するために適当に修正された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、p H 等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler 編 (IRL Press, 1991) 及び Sambrook 等、上掲に見出すことができる。

真核細胞の形質移入及び原核細胞の形質転換の方法、例えば、C a C l <sub>2</sub>、C a P O <sub>4</sub>、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その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 等、に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、一般的に、原核生物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 (Agrobacterium tumefaciens) による感染が、Shaw 等, Gene, 23:315 (1983) 及び 1989 年 6 月 29 日公開の W O 89/05859 に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham 及び van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質移入の一般的な態様は米国特許第 4,399,216 号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen 等, J. Bact., 130:946 (1977) 及び Hsiao

40

50

等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。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、無傷の細胞との細菌プロトプラスト融合、又は、例えばポリブレン、ポリオルニチン等のポリカチオン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等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及び Mansour等, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

#### 【0076】

ここに記載のベクターにDNAをクローニング或いは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。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、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公に利用可能であり、例えば、大腸菌 K 1 2 株 M M 2 9 4 (A T C C 3 1 , 4 4 6) ; 大腸菌 X 1 7 7 6 (A T C C 3 1 , 5 3 7) ; 大腸菌株 W 3 1 1 0 (A T C C 2 7 , 3 2 5) 及び K 5 7 7 2 (A T C C 5 3 , 6 3 5) である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E.coli、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス(Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・スブチルス(B. subtilis)及びバチルス・リチェニフォルミス(B. licheniformis)(例えば、1989年4月12日発行のDD266,710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス 4 1 P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス、などの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株 W 3 1 1 0 は、組換え DNA 生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。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る。例えば、株 W 3 1 1 0 は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 tonA を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 1 A 2 ; 完全な遺伝子型 tonA ptr3 を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 9 E 4 ; 完全な遺伝子型 tonA prt3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan<sup>r</sup> を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 2 7 C 7 (A T C C 5 5 , 2 4 4) ; 完全な遺伝子型 tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup> を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 3 7 D 6 ; 非カナマイシン耐性 d e g P 欠失変異を持つ 3 7 D 6 株である大腸菌 W 3 1 1 0 株 4 0 B 4 ; 及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。或いは、クローニングのインビトロ法、例えば P C R 又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

#### 【0077】

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、T W E A K ポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレビシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・プロンプ(Schizosaccharomyces pombe)(Beach及びNurse, Nature, 290:140 [1981] ; 1985年5月2日発行のEP139,383) ; クルベロミセス宿主(Kluyveromyces hosts)(米国特許第4,943,529号 ; Fleer等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991))、例えばクルベロミセスラクチス(K. lactis)(MW98-8C, CBS683, CBS4574 ; Louvencourt等, J. Bacteriol.154(2) :737-742 [1983])、クルベロミセス・フラギリス(K. fragilis)(A T C C 1 2 , 4 2 4) 、クルベロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus)(A T C C 1 6 , 0 4 5) 、クルベロミセス・ウィケラミイ(K. wickerhamii)(A T C C 2 4 , 1 7 8) 、クルベロミセスワルチイ(K. waltii)(A T C C 5 6 , 5 0 0) 、クルベロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilum)(A T C C 3 6 , 9 0 6 ; Van den Berg等, Bio/Technology, 8:135 (1990)) 、クルベロミセス・テモトレランス(K. thermotolerans)及びクルベロミセス・マルキシアナス(K. marxianus) ; ヤロウィア(yarrowia)(EP402,226) ; ピチア・パストリス(Pichia pastoris)(EP183,070 ; Sreekrishna等, J. Basic Microbiol, 28:265-278 [1988]) ; カンジダ ; トリコデル・マレーシア(Trichoderma reesia)(EP244,234) ; アカパンカピ(Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]) ; シュワニオマイセス(Schwann

iomycetes)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日発行のEP394,538); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolypocladium*) (1991年1月10日発行の国際公開公報91/00357); 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス(*Balance*等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; *Tilburn*等, *Gene*, 26:205-221 [1983]; *Yelton*等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1470-1474 [1984])、及びアスペルギルス・ニガー(*Kelly*及び*Hynes*, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985])が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(C 1 化合物資化性、*Methylotropic*)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピチア(*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス(*Torulopsis*)、及びロドトルラ(*Rhodotorula*)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、*C. Anthony*, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 7 8 】

グリコシル化 T W E A K ポリペプチドの発現に適切な宿主細胞が多細胞生物から得られる。無脊椎動物細胞の例には、ショウジョウバエ S 2 及びスボドスペラ S f 9 等の昆虫細胞、並びに綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコ等の細胞培養物等の植物細胞が含まれる。多数のパキウウイルス株及び変異体、並びに、スボドスペラフルギペルダ(毛虫)、ネッタシマカ(蚊)、ヒトスジシマカ(蚊)、キイロショウジョウバエ(ショウジョウバエ)、及びカイコ等の宿主由来の対応する許容昆虫宿主細胞が同定された。形質移入に使用できる様々なウイルス株、例えば、オートグラファカリフォルニア N P V の L - 1 変異体及びカイコ N P V の B m - 5 株が公に使用可能であり、そのようなウイルスを、本発明により、特にスボドスペラフルギペルダ細胞の形質移入にウイルスとして使用することができる。

しかしながら、脊椎動物細胞に最も関心が向けられており、培養物(組織培養物)における脊椎動物細胞の増殖は常套の手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、S V 4 0 によって形質転換されたサル腎臓 C V 1 株(C O S - 7 , A T C C C R L 1 6 5 1 ); ヒト胚腎臓株(懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された 2 9 3 又は 2 9 3 細胞、*Graham*等, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); 仔ハムスターの腎臓細胞(B H K 、 A T C C C C L 1 0 ); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - D H F R (C H O , *Urlaub*等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞(T M 4 , *Mather*, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); サル腎臓細胞(C V 1 A T C C C C L 7 0 ); アフリカミドリザル腎臓細胞(V E R O - 7 6 、 A T C C C R L - 1 5 8 7 ); ヒト子宮頸癌細胞(H E L A 、 A T C C C C L 2 ); イヌ腎臓細胞(M D C K 、 A T C C C C L 3 4 ); バッファローラット肝細胞(B R L 3 A 、 A T C C C R L 1 4 4 2 ); ヒト肺細胞(W 1 3 8 、 A T C C C C L 7 5 ); ヒト肝細胞(H e p G 2 、 H B 8 0 6 5 ); マウス乳房腫瘍細胞(M M T 0 6 0 5 6 2 、 A T C C C C L 5 1 ); T R I 細胞(*Mather*等, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); M R C 5 細胞; F S 4 細胞; 及びヒト肝細胞腫株(H e p G 2 )を含む。

宿主細胞を、T W E A K ポリペプチド生成のために上記発現ベクター又はクローニングベクターで形質転換し、プロモーターの誘発、形質転換体の選択、又は所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適するように修正した従来の栄養培地で培養する。

#### 【 0 0 7 9 】

##### 3 . 複製可能なベクターの選択及び使用

T W E A K ポリペプチドをコードする核酸(例えば、c D N A 又はゲノム D N A )は、クローニング(D N A 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。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、D N A はこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。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、一つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、一つ又は複数のマーカー

遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一つ又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

T W E A K ポリペプチドは組換え手法によって直接生産されるだけでなく、シグナル配列又は、成熟タンパク質ないしポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるT W E A K ポリペプチド-コード化D N Aの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1 p p 或いは熱安定性エンテロトキシンI E リーダーの群から選択された原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(サッカロミセス(*Saccharomyces*)及びクルイベロマイシス(*Kluyveromyces*) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(*C.albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行のEP362179)、又は1990年11月15日に公開された国際公開公報90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一或いは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

#### 【0080】

発現及びクローニングベクターは、共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドp B R 3 2 2 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2  $\mu$  プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V 又はB P V)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

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

#### 【0081】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの例は、D H F R 或いはチミジンキナーゼのようにT W E A K ポリペプチドをコードする核酸を取り込むことのできる細胞成分の同定を可能にするものである。野生型D H F R を用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているように調製され増殖された、D H F R 活性に欠陥のあるC H O 株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドY R p 7 に存在するt r p 1 遺伝子である[Stinchcomb等, Nature, 282:39 (1979); Kingsman等, Gene, 7:141 (1979); Tschemper等, Gene, 10:157 (1980)]。t r p 1 遺伝子は、例えば、A T C C 番号4 4 0 7 6 或いはP E P 4 - 1 のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

発現及びクローニングベクターは、通常、T W E A K ポリペプチドコード化核酸配列に作用可能に結合し、m R N A 合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは、-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系[Chang等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系[Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばt a c プロモーター[deBoer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたT W E A K ポリペプチドをコードするD N A と作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ(S . D . )配列を有する。



## 【 0 0 8 2 】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターはEP73,657に更に記載されている。

## 【 0 0 8 3 】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクター由来のTWEAKポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(1989年7月5日公開のUK2,211,504)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及びヒートショックプロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞株に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による所望のTWEAKポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、TWEAKポリペプチドコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

## 【 0 0 8 4 】

また、真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、TWEAKポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのTWEAKポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); EP117,060; 及びEP117,058に記載されている。

## 【 0 0 8 5 】

## 4. 宿主細胞の培養

本発明のTWEAKポリペプチドを産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、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)が宿主細胞の培養に好適である。また、Hamら, Meth. E

10

20

30

40

50

nz. 58:44 (1979年), Barnesら, Anal. Biochem. 102:255 (1980年), 米国特許第4,767,704号; 同4,657,866号; 同4,927,762号; 同4,560,655号; 又は同5,122,469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国再発行特許第30,985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の増殖因子(例えばインスリン、トランスフェリン、又は上皮増殖因子)、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H E P E S)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCIN<sup>TM</sup>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等価な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既に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

10

#### 【0086】

##### 5. 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅及び/又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、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)、半定量的PCR、DNAアレイ遺伝子発現分析又はインサイツ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。或いは、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。次いで、抗体を標識し、アッセイ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、その結果表面での二本鎖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。

20

或いは、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、例えば細胞又は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アッセイによって、測定することもできる。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、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列TWEAK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TWEAK 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

#### 【0087】

##### 6. TWEAKポリペプチドの精製

TWEAKポリペプチドの形態(一又は複数)は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン(登録商標)-X100)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。TWEAKポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

TWEAKポリペプチドを、組換え細胞タンパク質又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される: すなわち、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によるクロマトグラフィー; 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; 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; 及びTWEAKポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methodes in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のTWEAKポリペプチドの性質に依存する。

40

#### 【0088】

50

T W E A Kの可溶性型を本方法において使用することができる。このようなT W E A Kの可溶性型は、以下に示すような変形を含む(イムノグロブリン、エピトープタグ又はロイシンジッパーへの融合によるものなど)。イムノアドヘシン分子は、ここに開示の方法におけるさらなる使用が考慮される。T W E A Kレセプターイムノアドヘシンは、完全長ポリペプチド、並びにT W E A Kレセプターの可溶性型又はその断片等の、T W E A Kレセプターの様々な形態を含んでもよい。ある実施態様において、分子は、T W E A Kレセプターポリペプチドと免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定の領域との融合体を含んでもよい。イムノアドヘシンの二価の形態に対して、そのような融合は、I g G分子のF c領域に対して行われてもよい。I g融合は、好適には、I g分子の少なくとも1の可変領域に代えて、ポリペプチドの可溶性型(膜貫通ドメイン欠失又は不活性化型)で置換することを含む。特に好適な実施態様において、イムノグロブリンの融合は、I g G 1分子のヒンジ、C H 2及びC H 3、又はヒンジ、C H 1、C H 2及びC H 3領域を含む。イムノグロブリン融合体の生産については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号、及びChamow等, TIBTECH, 14:52-60(1996)も参照のこと。

10

最も単純で最も直接的なイムノアドヘシン設計は、アドヘシン(例えばT W E A KないしT W E A Kレセプター)の結合ドメインと免疫グロブリン重鎖のF c領域を組み合わせる。通常、本発明のイムノアドヘシンを調整する場合、アドヘシンの結合ドメインをコードする核酸をC末端でイムノグロブリン定常ドメイン配列のN末端をコードする核酸に融合させるが、N末端融合は不可能である。

20

#### 【0089】

典型的には、そのような融合において、コード化されるキメラポリペプチドは免疫グロブリン重鎖の定常ドメインの機能的に活性なヒンジ、C<sub>H</sub> 2及びC<sub>H</sub> 3ドメインを保持する。融合はまた定常ドメインのF c領域のC末端、又は重鎖のC<sub>H</sub> 1又は軽鎖の対応する領域にN末端に直ぐになされる。融合がなされる正確な部位は重要なものではない；特定の部位がよく知られており、イムノアドヘシンの生物活性、分泌、又は結合特性を最適化するために選択されうる。

好ましい実施態様では、アドヘシン配列が免疫グロブリンG<sub>1</sub>(I g G<sub>1</sub>)のF c領域のN末端に融合される。アドヘシン配列に重鎖定常領域全体を融合させることができる。しかし、より好ましくは、I g GのF cを化学的に定めるババイン切断部位の直ぐ上流のヒンジ領域に始まる配列(すなわち、重鎖定常領域の最初の残基を114として残基216)、又は他の免疫グロブリンの類似部位が融合において使用される。特に好適な実施態様では、アドヘシンアミノ酸配列はI g G重鎖の(a)ヒンジ領域及びC<sub>H</sub> 2及びC<sub>H</sub> 3又は(b)C<sub>H</sub> 1、ヒンジ、C<sub>H</sub> 2及びC<sub>H</sub> 3ドメインに融合される。

30

#### 【0090】

二重特異的イムノアドヘシンについては、イムノアドヘシンは多量体として、特にヘテロ二量体又はヘテロ四量体として組み立てられる。一般には、これらの組み立てられた免疫グロブリンは既知の単位構造を有している。基本的な四鎖構造単位はI g G、I g D及びI g Eが存在する型である。四鎖単位はより高分子量の免疫グロブリンにおいて繰り返される；I g Mは一般にジスルフィド結合によって一緒に保持される四つの基本単位の五量体として存在する。I g Aグロブリン、そして時折I g Gグロブリンが血清中に多量体

40

で存在しうる。多量体の場合、四つの単位の各々は同じでも異なってもよい。ここに記載した範囲内の様々な組み立てられたイムノアドヘシンの例は以下に概略的に模式化される：

- (a) A C<sub>L</sub> - A C<sub>L</sub> ；
- (b) A C<sub>H</sub> - (A C<sub>H</sub>, A C<sub>L</sub> - A C<sub>H</sub>, A C<sub>L</sub> - V<sub>H</sub> C<sub>H</sub>, 又は V<sub>L</sub> C<sub>L</sub> - A C<sub>H</sub>) ；
- (c) A C<sub>L</sub> - A C<sub>H</sub> - (A C<sub>L</sub> - A C<sub>H</sub>, A C<sub>L</sub> - V<sub>H</sub> C<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> C<sub>L</sub> - A C<sub>H</sub>, 又は V<sub>L</sub> C<sub>L</sub> - V<sub>H</sub> C<sub>H</sub>) ；
- (d) A C<sub>L</sub> - V<sub>H</sub> C<sub>H</sub> - (A C<sub>H</sub>, 又は A C<sub>L</sub> - V<sub>H</sub> C<sub>H</sub>, 又は V<sub>L</sub> C<sub>L</sub> - A C<sub>H</sub>) ；
- (e) V<sub>L</sub> C<sub>L</sub> - A C<sub>H</sub> - (A C<sub>L</sub> - V<sub>H</sub> C<sub>H</sub>, 又は V<sub>L</sub> C<sub>L</sub> - A C<sub>H</sub>) ；及び
- (f) (A - Y)<sub>n</sub> - (V<sub>L</sub> C<sub>L</sub> - V<sub>H</sub> C<sub>H</sub>)<sub>2</sub> ；

50

ここで、各 A は同一又は異なったアドヘシニアミノ酸配列を示し；

$V_L$  は免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり；

$V_H$  は免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり；

$C_L$  は免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり；

$C_H$  は免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；

$n$  は 1 より大きい整数であり；

$Y$  は共有結合架橋剤の残基を示す。

#### 【0091】

簡略化のために、先の構造はキーとなる特徴を示しているのみである；これらは、免疫グロブリンの結合する(J)又は他のドメインを示していないジスルフィド結合も示していない。しかし、そのようなドメインが結合活性に対して必要である場合は、それらを構築して、免疫グロブリン分子にそれらが占める通常の位置に存在させることができる。

或いは、アドヘシン配列は、キメラ重鎖を含んでなる免疫グロブリンが得られるように、免疫グロブリン重鎖と軽鎖配列の間に挿入することができる。この実施態様では、アドヘシン配列は免疫グロブリンの各アームの免疫グロブリンの重鎖の3'末端に、ヒンジと $CH_2$ ドメインの間、又は $CH_2$ と $CH_3$ ドメインの間の何れかで融合される。同様な作成物がHoogenboom等, Mol. Immunol. 28:1027-1037(1991)によって報告されている。

#### 【0092】

免疫グロブリン軽鎖の存在は本発明のイムノアドヘシンにおいて必要ではないけれども、免疫グロブリン軽鎖はアドヘシン-免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有結合的に結合するか、アドヘシンに直接的に融合されるかもしれない。前者の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは典型的にはアドヘシン-免疫グロブリン重鎖融合タンパク質をコードするDNAと同時発現される。分泌時にハイブリッドの重鎖及び軽鎖が共有結合的に結合されて、二つのジスルフィド結合で結合した免疫グロブリン重鎖-軽鎖対を含んでなる免疫グロブリン様構造を提供する。そのような構造の調製に好適な方法は、例えば1989年3月28日に発行された米国特許第4,816,567号に開示されている。

イムノアドヘシンは最も簡便には免疫グロブリンcDNA配列にインフレームでアドヘシン部分をコードするcDNA配列を融合させることにより構築される。しかし、ゲノム免疫グロブリン断片への融合もまた使用することができる(例えば、Aruffo等, Cell 61:1303-1313(1990)；及びStamenkovic等, Cell 66:1133-1144(1991)を参照されたい)。融合の後者のタイプは、発現に対してIg調節配列の存在を必要とする。IgG重鎖定常領域をコードするcDNAは、脾臓又は抹消血リンパ球から取り出されたcDNAライブラリーからの公開されている配列に基づいて、ハイブリダイゼーションにより、又はポリメラーゼ鎖反応(PCR)法により単離することができる。「アドヘシン」をコードするcDNAとイムノアドヘシンの免疫グロブリンが、選ばれた宿主細胞において効率的な発現を指示するプラスミドベクター内にタンデムに挿入される。

#### 【0093】

他の実施態様では、TWEAKアゴニスト又はTWEAKアンタゴニストは、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法で、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンのうちの一つに、又はポリグルタミン酸のような同様の分子に、分子を連結させることにより共有結合的に修飾される。このようなペグ化形態は当該技術分野において既知の方法を用いて調製してもよい。

また、これらの分子のロイシンジッパー形態も本発明によって考慮される。「ロイシンジッパー」は当該技術分野において、その融合相手(例えば、ロイシンジッパーが融合するか、又は連結する配列又は分子)の二量体化又は三量体化を増強し、促進し、又は引き起こすロイシンに富む配列のことを意味するために使用される語句である。様々なロイシンジッパーポリペプチドは当該分野において記述されている。例えば、Landschulz等, Science 240:1759 (1988)；米国特許第5,716,805号；国際公開公報94/10308；Hoppe等, FEB

10

20

30

40

50

S Letters 344:1991 (1994) ; Maniatis等, Nature, 341:24 (1989) ; Maniatis等, Nature 341:24 (1989)を参照されたい。当業者であれば、ロイシンジッパー配列を前記分子の 5'末端又は3'末端に融合しうことは理解するであろう。

#### 【0094】

また、本発明のTWEAKアゴニスト及びTWEAKアンタゴニストは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に該ポリペプチドを融合することによりキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。好ましくは、そのような異種性ポリペプチド又はアミノ酸配列は、キメラ分子をオリゴマー化するように作用するものである。一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグとポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には本発明のポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(poly-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体[Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体[Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド[Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド[Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド[Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ[Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]を含む。

#### 【0095】

また、抗TWEAK又は抗TWEAKレセプター抗体は現在開示される方法に使用できると考えられる。これらの抗体はモノクローナル抗体であってもよい。当分野の技術者は当分野で公知の方法、及び本明細書中に記載の方法を利用して、TWEAK又はTWEAKレセプター活性のアゴニスト又はアンタゴニストとして作用するTWEAK抗体又はTWEAKレセプター抗体を同定することができる。

モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)等により記載されたハイブリドーマ法によって調製することができる。ハイブリドーマ法においては、免疫剤を用いてマウス、ハムスター又はその他の適当な宿主動物通常通りに免疫し、免疫剤と特異的に結合する抗体を産生するか、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。

#### 【0096】

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

R T 欠乏性細胞の増殖を阻止する。

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、H A T 培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髓腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやヴァージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫株化細胞も開示されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク, (1987) pp. 51-63]。

【0097】

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、T W E A K ないし T W E A K レセプターに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。場合によって、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ (RIA) や酵素結合免疫測定法 (ELISA) 等のインビトロ結合アッセイによって、好ましくは BIAcore アッセイによって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば Munson 及び Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) によるスキャッチャード解析法によって測定することができる。

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

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

【0098】

また、モノクローナル抗体は、組換え DNA 法、例えば米国特許第 4,816,567 号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードする DNA は、常套的な方法を用いて (例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのような DNA の好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNA は発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、或いは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNA は、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [Morrissonら, Proc. Nat. Acad. Sci. 81, 6851 (1984)]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾

することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、或いは本発明の抗体の 1 つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、T W E A K ないし T W E A K レセプターの特異性を持つ 1 つの抗原結合部位、及び異なる抗原に対する特異性を持つ部位を有するキメラ性二価抗体を生成する。

【0099】

キメラ又はハイブリッド抗体も、架橋剤を用いる合成タンパク質化学における既知の方法を用いてインビトロで調製できる。例えば、ジスルフィド交換反応を用いることにより、又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を構築できる。この目的のための適切な試薬の例は、イミノチオラート及びメチル - 4 - メルカプトブチルイミダートで

ある。

一本鎖 F v 断片を、Iliades等, FEBS Letters, 409:437-441 (1997)に記載に従って生産できる。様々なリンカーを使用したこのような一本鎖断片の結合は、Kortt等, Protein Engineering, 10:423-433 (1997)に開示されている。抗体の組換え生産及び操作の様々な技術が当技術分野において既知である。当業者によって利用されるそのような技術の例示的实施例を以下に詳述する。

#### 【0100】

##### (i) ヒト化抗体

一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は、基本的に、ウィンター(Winter)及び共同研究者(Jonesら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, Science, 239:1534-1536 (1988))の方法に従って、齧歯類 C D R 又は C D R 配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。

よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの C D R 残基及び場合によっては幾つかの F R 残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

#### 【0101】

更に、抗体を、抗原に対する高結合親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親配列及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、F R 残基をコンセンサス及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、C D R 残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

#### 【0102】

##### (ii) ヒト抗体

ヒトモノクローナル抗体はハイブリドーマ法により作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の生成のためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫の細胞株は、例えば、Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984), 及びBrodeur他, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク, 1987)に記載されている。

内在性の免疫グロブリン産生がない状態で、免疫化によりヒト抗体のレパートリーを生産することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域( $J_H$ )遺伝子の同型接合除去が内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子列の移入は、抗原刺激時にヒト抗体の産生をもたらす。Jakobovitsら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovitsら, Nature 362:255-258 (1993)を参照のこと。

#### 【0103】

Mendez他(Nature Genetics 15: 146-156 [1997年])はこの技術をさらに改良し、抗原を投与すると親和性の高い完全ヒト抗体を生成する「ゼノマウスII(Xenomouse II)」と称する系列のトランスジェニックマウスを生成した。これは、上述のように、内因性 $J_H$ セグメントに欠陥を有するマウスに、メガベースのヒト重鎖遺伝子座及び軽鎖遺伝子座を生殖系統合組み込みすることにより達成された。ゼノマウスIIは、約66 $V_H$ 遺伝子、完全な

D<sub>H</sub> 及び J<sub>H</sub> 領域及び 3 つの異なる定常領域 (μ、 $\delta$  及び  $\kappa$ ) を含む 1,020kb のヒト重鎖遺伝子座を有し、また 3' 2' V 遺伝子、J セグメント及び C 遺伝子を含む 800kb のヒト遺伝子座を有する。これらのマウスに生成された抗体は、遺伝子再配列、構成、及びレパートリーを含め、ヒトに見られる抗体に全ての面で非常に類似している。ヒト抗体は、好ましくは、マウス遺伝子座における遺伝子再配列を抑制する内因性 J<sub>H</sub> セグメントの欠損により、内因性抗体全体にわたって発現する。

#### 【0104】

別法として、ファージディスプレイ技術 (McCafferty ら, Nature 348 : 552-553, 1990) を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変 (V) ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を生産させることができる。この技術によれば、抗体 V ドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えば M13 又は fd の、メジャー又はマイナーコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖 DNA コピーを含むので、抗体の機能特性に基づく選択によっても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージは B 細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる ; 例えば Johnson, Kevin S. 及び Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3 : 564-571 (1993) を参照せよ。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson ら, Nature, 352 : 624-628 (1991) は、免疫化したマウス脾臓由来の V 遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーの V 遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原 (自己抗原を含む) に対する抗体は、Marks ら, J. Mol. Biol. 222 : 581-597 (1991)、又は Griffiths ら, EMBO J. 12 : 725-734 (1993) に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。自然な免疫応答において、抗体遺伝子は高い率で突然変異を蓄積する (体細胞過剰変異)。導入された変化の一部は高い親和性を提供し、親和性の高い表面免疫グロブリンを示す B 細胞は、その後の抗原曝露の間に優先的に複製され、分化される。このような自然の工程を、「チェーンシャフリング」として知られる技術 (Marks 他, Bio/Technol. 10, 779-783, 1992) を使用することにより模倣することができる。この方法では、重鎖 V 領域遺伝子と軽鎖 V 領域遺伝子を、順に、非免疫化ドナーから取得した V ドメイン遺伝子の自然に生じる変異体 (レパートリー) のレパートリーで置換することにより、ファージディスプレイによって得られた「一次」ヒト抗体の親和性を改善することができる。この技術により、nM 範囲での親和性を有する抗体及び抗体断片の生産が可能である。非常に大きなファージ抗体のレパートリー (「マザーオブオール ライブラリー (the Mother-of-all libraries)」とも呼ばれる) を作る方法が、Waterhouse らによる Nucl. Acids Res. 21, 2265-2266 (1993) に開示されている。また、遺伝子シャフリングは、ヒト抗体が元になっている齧歯類の抗体と類似した親和性及び特性を有している場合、齧歯類の抗体からヒト抗体を得るために使用することもできる。「エピトープインプリンティング」と呼ばれるこの方法により、ファージディスプレイ技術により得られた齧歯類抗体の重鎖 V ドメイン遺伝子と軽鎖 V ドメイン遺伝子をヒト V ドメイン遺伝子のレパートリーで置換し、齧歯類-ヒトキメラを作成する。抗原を選択することにより、機能的抗原結合部位を回復することができるヒト可変部が単離される、つまり、エピトープがパートナーの選択をつかさどる (インプリントする)。残りの齧歯類 V ドメインを置換するためにこの工程を繰り返すと、ヒト抗体が得られる (1993 年 4 月 1 日公開の PCT 特許出願国際公開公報 93/06213 を参照)。伝統的な CDR 移植による齧歯類抗体のヒト化と異なり、この技術により、齧歯類起源のフレームワーク又は CDR 残基を全く持たない完全なヒト抗体が得られる。

#### 【0105】

後述するように、本発明の抗体は、状況に応じて、一量体抗体、二量体抗体、ならびに抗体の多価形態を含んでよい。当業者は、当分野で既知の技術により、そのような二量体又は多価形態を構築することができる。一価抗体を調製する方法もまた、当技術分野で周

10

20

30

40

50



知である。例えば、一方法では、免疫グロブリン軽鎖と修飾された重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般にFc領域の任意の点で切断され、重鎖の架橋が形成されることが防止される。或いは、関連するシステイン残基を別のアミノ酸残基で置換するか、又は削除し、よって架橋結合を防止する。

#### 【 0 1 0 6 】

##### (iii) 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合、結合特異性の一方はTWEAKないしTWEAKレセプターに対するものである。

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

#### 【 0 1 0 7 】

さらに好ましい別の方法により、所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコード化するDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所最適な収率をもたらす実施態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性をもたらされる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率があまり影響がないときは、2又は3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。この手法の好ましい実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、1994年3月3日公開の国際公開第94/04690号に開示されている。

二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照されたい。

#### 【 0 1 0 8 】

##### (iv) ヘテロ抱合抗体

ヘテロ抱合抗体も本発明の範囲に含まれる。ヘテロ抱合抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため(米国特許第4,676,980号)及びHIV感染の治療のために(国際公開公報91/0360; 国際公開公報92/200373; 欧州特許第03089号)提案されている。ヘテロ抱合抗体は、任意の簡便な架橋法を使用して、調製することができる。適切な架橋剤は当該技術分野において既知であり、複数の架橋技術と共に、米国特許第4,676,980号に開示されている。

#### 【 0 1 0 9 】

##### (v) 抗体断片

一部の実施態様においては、抗TWEAKないし抗TWEAKレセプター抗体(マウス

抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、及び抗体変異体を含む)は抗体断片である。抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されている(例えば、Morimotoら, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992)及びBrennanら, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、F a b'-S H断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF (a b')<sub>2</sub>断片を形成することができる(Carterら, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他の実施態様では、ロイシンジッパー-GCN4を使用してF (a b')<sub>2</sub>を形成し、F (a b')<sub>2</sub>分子の構築を促進する。別の実施態様では、組換え宿主細胞の培地からF v、F a b又はF (a b')<sub>2</sub>断片を直接分離することができる。抗体断片を生産するための他の技術は当業者には明らかである。例えば、パパインを使用して消化を行うことができる。パパイン消化の例は、1994年12月22日公開の国際公開公報94/29348及び米国特許第4,342,566号に開示されている。抗体のパパイン消化は、通常、F a b断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を生成する。各F a b断片は単一の抗原結合部位、及び残存性F c断片を持つ。ペプシン処理により、2つ抗原結合部位を持ち、抗原に架橋結合する能力のあるF (a b')<sub>2</sub>が生成される。

抗原消化で生成されるF a b断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一定常ドメイン(CH<sub>1</sub>)も含む。F a b'断片は、それに加えて、抗原ヒンジ領域由来の1以上のシステインを含む重鎖のCH<sub>1</sub>ドメインのカルボキシ末端に少数の残基を持つ点においてF a b断片と異なる。本発明では、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を持つF a b'として、ここではF a b'-S Hと記載する。F (a b')<sub>2</sub>抗体断片は、もともとそれらの間にヒンジシステインを有するF a b'断片の対として生成されたものである。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

#### 【0110】

抗体をその定常領域の保存位置でグリコシル化する(Jefferis及びLund, Chem. Immunol. 65:111-128, 1997年; Wright及びMorrison, TibTECH 15:26-32, 1997)。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖は、タンパク質の機能(Boyd他, Mol. Immunol. 32:1311-1318, 1996年; Wittwe及びHoward, Biochem. 29:4175-4180, 1990)、及び、糖タンパク質の高次構造及び提示される3次元表面に影響しうる糖タンパク質の部分同士の分子内相互作用(Hefferis及びLund, 上掲; Wyss and Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416, 1996)に作用する。オリゴ糖はまた、特異的な認識構造に基づいて任意の糖タンパク質を特定の分子に標的化するのに役立つ。例えば、ガラクトシル化IgGにおいて、オリゴ糖部分はCH<sub>2</sub>内空間の外に「とび出し(flip)」、末端N-アセチルグリコサミン残基がマンノース結合タンパク質に結合できるようになることが報告されている(Malhotra他, Nature Med. 1:237-243, 1995)。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において、オリゴ糖のグリコペプチダーゼによるCAMPATH-1H(ヒトリンパ球のCDw52抗原を認識する組換えヒト化マウスモノクローナルIgG1抗体)からの除去を実行した結果、補体媒介性溶解(CMC<sub>L</sub>)が完全に低減したが(Boyd他, Mol. Immunol. 32:1311-1318, 1996)、ノイラミニダーゼを使用してシアル酸残基を選択的に除去した結果、DMC<sub>L</sub>の低減は見られなかった。抗体のグリコシル化はまた、抗体依存性の細胞の細胞障害性(ADCC)に影響することが報告されている。特に、バイセクティングGlcNAcの形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII)のテトラサイクリン制御発現を持つCHO細胞で、ADCC活性が向上したことが報告されている(Umana他, Mature Biotech. 17:176-180, 1999)。

抗体のグリコシル化変異体は、抗体のグリコシル化のパターンが変更された変異体である。変更するとは、抗体に見られる1以上の炭水化物部分を除去し、抗体に1以上の炭水化物部分を加え、グリコシル化の組成(グリコシル化パターン)、グリコシル化の範囲、その他を変更することを意味する。グリコシル化変異体は、例えば、抗体をコードする核酸配列について、1以上のグリコシル化部位の、除去、変更、及び/又は付加を行うことにより調製することができる。

10

20

30

40

50

## 【0111】

抗体のグリコシル化は、通常、N - 結合かO - 結合である。N - 結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物成分の付与を指す。トリペプチド配列のアスパラギン - X - セリン及びアスパラギン - X - スレオニン(ここで、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸)は、炭水化物成分のアスパラギン側鎖への酵素的付与の認識配列である。したがって、ポリペプチド中にこれらトリペプチド配列のいずれかが存在することにより、潜在的グリコシル化部位が創造される。O - 結合のグリコシル化とは、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンへの、N - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの糖類うち1つの付着を指す。5 - ヒドロキシプロリン、又は5 - ヒドロキシリジンを使用してもよい。

10

抗体へのグリコシル化部位の付加は、(N - 結合グリコシル化部位について)上述のトリペプチド配列の1又は複数を有するようにアミノ酸配列を変更することにより常套的に達成される。変更は、また、(O - 結合グリコシル化部位について)元の抗体の配列に対して1以上のセリン又はスレオニン残基を付加又は置換することにより行ってもよい。

## 【0112】

抗体のグリコシル化(グリコシル化パターンを含む)は、内在するヌクレオチド配列を変更することなく変更可能である。グリコシル化は抗体を発現するために使用される宿主細胞に大きく依存する。潜在的治療剤としての、抗体などの組換え糖タンパク質の発現に使用される細胞の種類が、まれに天然細胞であることから、抗体のグリコシル化パターンは大きく変化することが予想される(例えばHse他, J. Biol. Chem. 272:9062-9070, 1997年参照)。宿主細胞の選択に加えて、抗体の組換え生産の間のグリコシル化に影響を与える因子には、増殖形態、培地組成、培養密度、酸素添加、pH、精製スキームなどが含まれる。オリゴ等製造に関わるある種の酵素の導入又は過剰発現を含む、特定の宿主生物においてなされたグリコシル化パターンを変えるための様々な方法が提案されている(米国特許第5,047,335号、米国特許第5,510,261号及び米国特許第5,278,299号)。グリコシル化、又は特定の種類のグリコシル化は、例えばエンドグリコシダーゼH(Endo H)の使用により、糖タンパク質から酵素学的に除去することができる。加えて、組換え宿主細胞を遺伝学的に設計することができ、例えば多糖類の特定種のプロセッシングにおいて欠損をつくることのできる。これら同様の技術は当技術分野において既知である。

20

## 【0113】

抗体のグリコシル化構造は、レクチンクロマトグラフィー、NMR、質量分析、HPLC、GPC、単糖成分分析、連続酵素消化、及び高pHアニオン交換クロマトグラフィーを使用して電荷に基づきオリゴ糖を分離するHPAEC-PADなどの、炭水化物分析を行う従来技術により容易に分析できる。分析的な目的のためにオリゴ糖を遊離させる方法も知られており、それらには、限定はしないが、酵素的処理(通常ペプチド - N - グリコシダーゼF / エンド - - ガラクトシダーゼを使用して行う)、主にO - 結合構造を遊離するために強アルカリ環境を使用しての除去、及びN - 結合とO - 結合両方のオリゴ糖を遊離させるための無水ヒドラジンを使用する化学的方法が含まれる。

30

三重特異性抗体も本発明の範囲に含まれる。そのような抗体は、例えばIliades等、上掲のKortt等、上掲に記載されている。

40

## 【0114】

本発明の抗体は、細胞障害剤(例えば毒素分子)又はプロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公開公報81/01145号を参照)を活性な抗ガン剤に転化させるプロドラッグ活性化酵素に抗体をコンジュゲートさせることにより、修飾することができる。例えば国際公開公報88/07378及び米国特許第4,975,278号を参照されたい。この技術は「抗体依存性酵素媒介プロドラッグ療法」(ADEPT)とも呼ばれる。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性な細胞毒形態に転化するように、プロドラッグに作用し得る任意の酵素が含まれる。限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転

50

化するのに有用なアリールスルファターゼ；非毒性 5-フルオロシトシンを抗ガン剤 5-フルオロウラシルに転化するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシン B 及び L)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なもの；カスパーゼ - 3 などのカスパーゼ；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの転化に有用な D-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ；ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化させるのに有用なラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化するのに有用なペニシリン V アミダーゼ又はペニシリン G アミダーゼが含まれる。或いは、「アブザイム」としてもまた公知の、酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを転化させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328:457-458(1987)を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞群にアブザイムを送達するために調製することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0115】

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

さらなる抗体の修飾を考慮する。例えば、抗体を様々な非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、又はポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールのコポリマー、或いはポリグルタミン酸等のその他の分子の 1 つに結合させることができる。または抗体を、例えばコアセルベーション技術又は界面重合(例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリル酸)マイクロカプセル)により、コロイド性薬剤送達系(例えばリポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)に調製したマイクロカプセルに封入することができる。このような技術は Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> edition, Osol, A., Ed., (1980) に開示されている。抗体の血清半減期を増加させるため、例えば、米国特許第 5,739,277 号に記載のように、サルベージレセプター結合エピトープを抗体(特に抗体断片)に包含してもよい。ここで使用する「サルベージレセプター結合エピトープ」という用語は、インビボで IgG 分子の血清半減期を増加させる IgG 分子(例えば IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、又は IgG<sub>4</sub>)の Fc 領域のエピトープを指す。

#### 【0116】

あるいは又は付加的に、変更した FcRn 結合を有する変異形を産生するために抗体の Fc 領域のアミノ酸配列を変更することによって血清半減期を延長又は短縮しうる。FcRn 結合及び/又は血清半減期を変更した抗体は国際公報 00/42072(Presta, L)に記載されている。

本発明の抗体は重合によって安定しうる。これは、多官能価のポリマーを介して直接的又は間接的に、多官能性架橋剤にて単量体鎖を架橋することによって達成しうる。通常、2 つの実質的に同一のポリペプチドは、二機能性架橋剤によってそれらの C-又は N-末端で架橋される。薬剤は、末端アミノ及び/又はカルボキシル基を架橋するために用いられる。通常、両方の末端カルボキシル基又は両方の末端アミノ基は互いに架橋されるが、適当な架橋剤の選別によって、一方のポリペプチドのアミノは他方のポリペプチドの末端カルボキシル基に架橋される。好ましくは、ポリペプチドはその C 末端でシステイン置換される。公知技術の条件下で、ジスルフィド結合が末端システインの間に形成され、それによって、ポリペプチド鎖を架橋する。例えば、遊離システインの金属触媒性酸化によって、又は、適切に修飾されたシステイン残基の求核置換によってジスルフィド架橋が都合

よく形成される。架橋剤は、ポリペプチドに存在するアミノ酸の作用側鎖の同一性に依存して選択する。例えば、ポリペプチド内のシステインがC末端以外の付加部位に存在する場合、ジスルフィド架橋は好ましくない。また、メチレン基架橋によって架橋されるペプチドも包含される。

#### 【0117】

抗体上の適切な架橋部位は、N末端アミノ及びC末端カルボキシル基を除いて、ペプチドの内部残基又は隣接配列に導入される残基の側鎖に位置する水酸基、スルフヒドリル、カルボキシル、イミノ、アミノ、並びにリジン残基上にみられるイプシロンアミノ基を含む。外部から添加する架橋剤による架橋は、例えば当分野で公知の多くの試薬のうちの何れかを用いるなどして、ポリペプチドのカルボジイミド処理を経て好適に達成される。適切な多官能価(通常二機能性)の架橋剤の他の例は、文献に示される。

10

#### 【0118】

ここでの一般的な製剤の調製において、使用される成分の推奨される質又は「等級」は、製剤の最終的な用途に依存する。治療用途において、成分(群)は製薬品への添加剤として許容可能な等級(例えば「GRAS」)のものであることが好ましい。

ある実施態様では、アンタゴニスト又はアゴニストと、溶解度及び/又は安定性を高めるのに十分なイオン強度を付与する賦形剤を含有する組成物が提供され、その組成物は6(又は約6)~9(又は約9)のpHを有する。アンタゴニスト又はアゴニストは、例えば上述した方法のような、所望の純度を達成するのに適した任意の方法で調製され得る。ある実施態様では、アンタゴニスト又はアゴニストは、宿主細胞において組換え的に発現されるか、化学的合成法により調製される。製剤中のアンタゴニスト又はアゴニストの濃度は、例えば製剤の意図される用途に応じて変わりうる。当業者であれば、過度の実験をすることなく、アンタゴニスト又はアゴニストの所望の濃度を決定することができる。

20

#### 【0119】

アンタゴニスト又はアゴニストの溶解度及び/又は安定性を高めるのに十分なイオン強度を付与する製剤中の一又は複数の賦形剤は、場合によってはポリイオン性の有機又は無機酸、アスパラギン酸塩、硫酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、カプチソール(Captisol)<sup>TM</sup>、Tris、アルギニン塩、又は他のアミノ酸、糖、及びポリオール類、例えばトレハロース及びスクロースである。好ましくは、十分なイオン強度を付与する製剤中の一又は複数の賦形剤は塩である。使用され得る塩には、限定されるものではないが、ナトリウム塩及びアルギニン塩が含まれる。使用される塩の種類及び塩の濃度は、製剤中でアンタゴニスト又はアゴニストが安定可能なように、製剤が比較的高いイオン強度を有するようになされることが好ましい。場合によっては、塩は約20mM~約0.5Mの濃度で製剤中に存在する。

30

組成物は、好ましくは6(又は約6)~9(又は約9)、より好ましくは約6.5~約8.5、さらに好ましくは約7~約7.5のpHを有する。この実施態様の好ましい側面では、組成物は、組成物のpHを少なくとも約6~約8に保持するためのバッファーをさらに含有する。使用され得るバッファーの例には、限定されるものではないが、Tris、HEPES及びヒスチジンが含まれる。Trisを使用する場合、pHは、場合によっては約7~約8.5に調節され得る。Hepes又はヒスチジンを使用する場合は、pHは、場合によっては約6.5~7に調節され得る。場合によっては、バッファーは、製剤中で約5mM~約50mMの濃度で使用される。

40

#### 【0120】

特に液体製剤(又は再構成された凍結乾燥製剤)においては、組成物に一又は複数の界面活性剤を含有せしめることが望ましい場合がある。このような界面活性剤は、例えば非イオン性界面活性剤、中でもトゥイーン(TWEEN)<sup>TM</sup>又はプルロニクス(PLURONICS)<sup>TM</sup>(例えばポリソルベート又はポロキサマー)を含みうる。好ましくは、界面活性剤はポリソルベート20(「トゥイーン20」)を含む。界面活性剤は、場合によっては約0.005%~約0.2%の濃度で使用される。

本発明の製剤は、アンタゴニスト又はアゴニストに加えて、上述した成分、さらには種

50

々の例えばの賦形剤又は成分を含有していてもよい。場合によっては、製剤は、非経口投与のために、製薬的又は非経口的に許容可能な担体、すなわち使用される濃度及び用量で受容者に対して毒性がなく、製剤の他の成分と融和性のあるものを含有してよい。場合によっては、担体は非経口用担体、例えば受容者の血液と等張な溶液である。このような担体ビヒクルの例には、水、生理食塩水、又は緩衝溶液、例えばリン酸緩衝液(PBS)、リンガー液及びデキストロス液が含まれる。種々の任意の製薬的に許容可能な担体、賦形剤又は安定剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th, Osol, A. 編(1980)に、さらに記載されている。

#### 【0121】

ここで、製剤は一又は複数の保存料を含有してよい。具体例には、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンズアルコニウムクロリド(アルキル基が長鎖の化合物である、アルキルベンジルジメチルアンモニウムクロリドの混合物)、塩化ベンゼトニウムが含まれる。他の種類の保存料には、芳香族アルコール、メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン、及びm-クレゾールが含まれる。酸化防止剤には、アスコルビン酸及びメチオニン；保存料(例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；塩化ベンゼトニウム；ブチルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；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等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；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、又はリジン等のアミノ酸；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；又はポリエチレングリセロール(PEG)が含まれる。

#### 【0122】

このような担体のさらなる例には、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、塩化ナトリウム、ポリビニルピロリドン、及びセルロースベースの物質が含まれる。ゲルベースの形態をした担体には、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、ポリアグレート、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が含まれる。従来のデポー形態には、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、及び除放性製剤が含まれる。

本発明の組成物は、TWEAKアンタゴニスト又はTWEAKアゴニストが結晶又は非晶質の沈殿物の形態をした、液体製剤(液状溶液又は液状懸濁液)、及び凍結乾燥製剤、並びに懸濁製剤でありうる。

#### 【0123】

最終製剤が液体である場合、好ましくは20℃で凍らせて保存される。また、製剤は凍結乾燥することもでき、場合によっては2~30℃で保存されうる注射用の水で再構成されるパウダーとして提供することができる。

治療投与に使用される製剤は無菌でなければならない。滅菌は、滅菌濾過膜(例えば0.2ミクロンの膜)を通した濾過により容易に達成される。治療用組成物は、一般的に無菌のアクセスポート、例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルを具備する容器に配されている。

組成物は通常、単位毎又は多数回用量容器、例えば封入されたアンプル又はバイアルに、水溶液、又は再構成用の凍結乾燥された製剤として貯蔵される。容器は、当該分野で任意の入手可能な容器で、常法を用いて充填されるものであってよい。場合によっては、製剤は、注射ペン装置(又は、ペン装置に嵌合するカートリッジ)、例えば製剤の治療的送達に適した、当該分野で入手可能なもの(例えば、米国特許第5,370,629号を参照)に収容さ

10

20

30

40

50

れうる。注射用溶液は、例えば注射用の水を使用し、凍結乾燥されたアンタゴニスト又はアゴニスト製剤を再構成することにより調製することができる。

#### 【0124】

本明細書中に記載の、TWEAKないしTWEAKレセプター活性を調節する組成物は、様々な治療的手段に用いることができる。TWEAKアンタゴニストは、例えば、癌の治療方法に用いられうる一方で、TWEAKアゴニストは様々な免疫関連の症状の治療に有用性が見つけられている。

そのような疾患を治療する本発明の方法では、アンタゴニスト又はアゴニストの製剤は、注入又は注射を含む任意の適切な技術により、哺乳動物に直接投与することができる。特定の投与経路は、アンタゴニスト又はアゴニストの使用による、知覚又は予想される任意の副作用を含む、患者の医薬履歴、及び是正する特定の疾患などに依存するであろう。非経口投与の例には、組成物の皮下、筋肉内、静脈内、動脈内及び腹膜内投与が含まれる。製剤は、好ましくは繰り返し静脈内(i.v.)、皮下(s.c.)、又は筋肉内(i.m.)注射又は注入、頭蓋内注入として、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、例えば欧州特許第257,956号を参照)。

注射の浸透圧は、皮下及び筋肉内注射において重要であり得る。注射用溶液が低張又は高張であると、注入時に、患者に痛みが生じるおそれがある。通常、ここで治療用の注射用製剤は、注射用溶液の相対浸透圧が約300mOsm~約600mOsmになるようにされることが好ましい。

#### 【0125】

また、前記の製剤は、経口又は徐放性製剤の形態で投与することもできる。徐放性製剤の好適な例は、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を含み、当該マトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例は、セルロース誘導体(例えば、カルボキシメチルセルロース)、非水性媒体にスクロース-アセタート-イソブチラート(SABER<sup>TM</sup>)が入ったもの、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリラート)(Langer等, J. Biomed. Mater. Res., 1981, 15: 167-277 及びLanger, Chem. Tech., 1982, 12: 98-105又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号、欧州特許第58,481号)、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタマートのコポリマー(Sidman等, Biopolymers, 1983, 22: 547-556)、非分解性エチレン-酢酸ビニル(Langer等, 上掲)、分解性乳酸-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及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能な微小球)、及びポリ-D-( )-3-ヒドロキシブチル酸(欧州特許第133,988号)を含む。全身作用性の薬剤を送達せしめる任意の一方法は、連続注入(例えば、徐放性装置又はミニポンプ、例えば浸透圧ポンプ又は皮膚パッチ)、又は注射(例えば、単一ボラス投与を含む、静脈内又は皮下手段を使用する)による投与に係る。

#### 【0126】

組成物は、個々の患者の臨床的状態、組成物の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び実務者に公知の他の要因を考慮に入れ、良好な医療行為に矛盾することのない様式で調製され、投薬されるであろう。

さらに付加的な治療が本方法において使用され得ることを考慮する。一又は複数の他の治療には、限定されるものではないが、放射線治療、サイトカイン(類)、増殖阻害剤(類)、化学治療剤(類)、細胞障害剤(類)、チロシンキナーゼインヒビター、rasファルネシルトランスフェラーゼインヒビター、血管新生阻害剤、サイクリン依存性キナーゼインヒビター、及びヒストンアセチラーゼインヒビター及び/又はメチル化インヒビターなどのクロマチン組織修復剤など、当該分野で公知であり、更に上記に定義されるものであり、TWEAKアンタゴニスト又はTWEAKアゴニストと組み合わせて(例えば、同時に又は連続して)投与しうるものの投与が含まれる。さらに、治療は、CD20抗体(Rituxan<sup>TM</sup>を含む)又はHerレセプター抗体(Herceptin<sup>TM</sup>を含む)等の腫瘍又は他の細胞抗原を標的にする治療用抗体、並びに抗-血管新生抗体、例えば抗VEGF、又はEGFR(Tarceva<sup>TM</sup>など)などの他のレセプターを標的にするか、腫瘍ワクチン接種と組み合わせて用

10

20

30

40

50

いるための抗体をベースにしている。

【0127】

癌などの症状を治療するための方法において、化学治療剤の調製と用量スケジュールは、製造者の指示書に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定されて使用される。また、このような化学治療の調製と用量スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。場合によっては、例えばTWEAKアンタゴニストを投与する前に細胞を一又は複数の化学療法剤に曝すことも有効でありうる。

また、他の抗原に対する抗体、例えばCD20、CD11a、CD18、CD40、Erbb2、EGFR、Erbb3、Erbb4、血管内皮因子(VEGF)、又は他のTNFRファミリーのメンバー(例えば、OPG、DR4、DR5、TNFR1、TNFR2)に結合する抗体を投与することも好ましい。別法として、あるいは付加的に、ここに開示した同一の又は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利である。

【0128】

アンタゴニスト又はアゴニストの製剤は、例えば上述の明細書の定義の項目に特に挙げた他の薬剤、サイトカイン、化学療法剤、抗体等と組み合わせて、例えば同時に又は連続して、本出願に記載の何れかの治療方法で投与されてもよい。例えば、TWEAKアンタゴニスト製剤は前処理(このような任意の他の薬剤の投与前)として、例えば、さもなければ他の治療薬のアポトーシス効果に耐性のある癌細胞の前処理として投与されてもよい。

上記したように、本発明のアンタゴニスト及びアゴニストは様々な有用性を有する。例えば、TWEAKアンタゴニストは、癌などの哺乳動物の病的状態の治療方法に用いてもよい。TWEAKアゴニストは哺乳動物の免疫関連疾患の治療に用いてもよい。ここで記載されている様々な病的状態の哺乳動物の診断は、熟練した専門家によってなされることができる。診断用技術は、例えば、哺乳動物の癌又は免疫関連疾患の診断ないし検出をする分野において有用である。例えば、癌は、限定するものではないが、触診、血液分析、X線、NMRなどを含む技術により同定してもよい。また、免疫関連疾患は直ちに同定されうる。全身エリテマトーデスにおいて、疾患の中心的媒体は、自己タンパク質/組織に対する自己応答性抗体の生成と続いて起こる免疫媒介性炎症である。腎臓、肺、筋骨格系、皮膚粘膜、目、中枢神経系、心血管系、消化管、骨髓及び血液を含む多数の器官及び系が、臨床的に影響を受ける。

【0129】

医師は、免疫及び/又は炎症性反応の介入が有益である多くの疾患に精通している。例えば、リウマチ様関節炎(RA)は、主に複数の関節の滑膜に関連する慢性全身性自己免疫炎症疾患であり、結果として関節軟骨に傷害が生じる。病原はTリンパ球依存性であり、リウマチ因子、自己IgGに対する自己抗体の生成に付随し、結果として滑液及び血液において高レベルに達する免疫複合体を生成する。関節中のこれらの複合体は、滑膜中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；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/液でもしかりである。冒されている組織は、多くの場合対称的なパターンで、主に関節である。しかしながら、二つの主要形態の関節外疾患もまた生じる。一形態は進行中の進行性関節疾患及び肺線維症の典型的病巣、血管炎、及び皮膚潰瘍を伴う関節外障害の発生である。関節外疾患の第二の形態はいわゆるフェルティー症候群であり、これは、RA疾患過程の末期、時には関節疾患が鎮静した後に生じ、好中球減少、血小板減少及び脾肥大の存在に関与する。これには、梗塞、皮膚潰瘍及び壊疽の形成を伴う複数の器官において血管炎が付随する。多くの場合、患者には、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；その小結節は、末期には混合炎症細胞浸潤に包囲された壊死性中心を有する。RAにおいて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

30

40

50



## 【0130】

若年性慢性関節炎は、多くの場合16歳未満で発症する慢性特発性炎症疾患である。その表現型はRAといくつかの類似点があり；リウマチ因子が陽性である患者の中には若年性リウマチ様関節炎に分類されるものもある。この疾患は三つの主要なカテゴリー：小関節(pauarticular)、多関節及び全身性に細分類される。関節炎は重度で典型的には破壊的であり、関節強直症及び遅延成長に至る。他の徴候には慢性前部ブドウ膜炎及び全身性アミロイド症が含まれる。

脊椎関節症は、いくつかの共通した臨床的特徴とHLA-B27遺伝子産物の発現との共通の関連性を持つ疾患のグループである。該疾患には：パセドウ氏病(ankylosing spondylitis)、ライター症候群(反応性関節炎)、炎症性大腸疾患に関連した関節炎、乾癬に関連した脊椎炎、若年発生脊椎関節症及び未分化脊椎関節症が含まれる。顕著な特徴には、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；炎症非対称性関節炎；HLA-B27(クラスI MHCのHLA-B座位にある血清学的に定義された対立遺伝子)との関連；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に関連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導に対する鍵として最も関わっている細胞はCD8+Tリンパ球で、クラスI MHC分子により提示される抗原を標的としている細胞である。CD8+T細胞は、MHCクラスI分子により発現された外来ペプチドであるかのように、クラスI MHC対立遺伝子HLA-B27に対して反応する。HLA-B27のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原性エピトープを模倣し、よってCD8+細胞の反応を誘発すると仮定されている。

## 【0131】

全身性硬化症(強皮症)は病因がよく知られていない。疾患の顕著な特徴は皮膚の硬結であり；これは活性な炎症プロセスにより誘発されると思われる。強皮症は局部的又は全身性であり；血管病巣が共通しており、微小血管系における内皮細胞傷害が全身性硬化症の発達における初期の重要な事象であり；血管傷害は免疫媒介されうる。免疫学的基準は、皮膚病巣における単核細胞浸潤の存在と、多くの患者において抗細胞核抗体の存在によって導かれる。多くの場合、ICAM-1が皮膚病巣の線維芽細胞の細胞表面で上方制御され、これらの細胞とのT細胞の相互作用が疾患の病因においてある役割を担っていることが示唆される。関連する他の器官には：胃腸管：結果的に異常なぜん動/運動性となる平滑筋萎縮症及び線維症；腎臓：小弓形及び小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎皮質の血流が低下し、タンパク尿、高窒素血尿及び高血圧になる同心性内皮下内膜増殖；骨格筋：萎縮、間質性線維症；炎症：肺：間質性肺炎及び間質性線維症；及び心臓：収縮バンド壊死、瘢痕/線維症が含まれる。

皮膚筋炎、多発性筋炎及び他のものを含む特発性炎症性ミオパシーは病因がよく知られていない慢性筋肉炎症疾患であり、筋肉の弱化に至る。筋肉損傷/炎症は多くの場合対照的で進行性である。自己抗体は多くの形態と関連している。これらの筋炎特異的自己抗体は、タンパク質合成に関与する成分、タンパク質及びRNAに対して産生されその機能を阻害する。

## 【0132】

シェーグレン症候群は、免疫媒介炎症と、涙腺及び唾液腺の続く機能破壊によるものである。この疾患は炎症結合組織疾患に関連するか又はそれに伴う場合がある。この疾患は、双方とも小さいRNA-タンパク質複合体であるRo及びLa抗原に対する自己抗体産生に関連している。病巣は乾性角結膜炎、口内乾燥症で、胆汁性硬変、末梢又は感覚ニューロパシー、及び明白な紫斑病を含む他の徴候又は関連を伴うものに至る。

全身性血管炎症は一次病巣が炎症で、続いて血管にダメージを受け、結果として冒された脈管により供給される組織に虚血/壊死/変性が生じ、いくつかのケースでは最終的な末端器官機能障害になるといった疾患である。また、血管炎(vasculitides)は他の免疫炎症媒介疾患、例えばリウマチ様関節炎、全身性硬化症等、特に免疫複合体の生成に関連した疾患等の続発症として又は二次病変として生じる場合がある。原発性全身性血管炎症グループの疾患には：全身壊死性血管炎；多動脈炎結節(polyarteritis nodosa)、アレルギー性脈管炎及び肉芽腫症、多脈管炎；ヴェゲナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症；及び巨

細胞動脈炎が含まれる。その他の血管炎には：粘膜皮膚リンパ節症候群(M L N S又は川崎病)、隔離されたC N S血管炎、ベヘット(Behet's)病、閉塞性血栓性血管炎(バージャー病)及び皮膚壊死性細静脈炎(venulitis)が含まれる。列挙した血管炎のほとんどの種類の発病メカニズムは、主に脈管壁に免疫グロブリン複合体が付着し、続いてA D C C、補体活性又は双方を介して炎症反応が誘発されることによると考えられている。

#### 【0133】

サルコイドーシスは、体内のほとんど全ての組織中における類上皮細胞肉芽腫の存在により特徴づけられる病因がよく知られていない病状であり；肺の関与が最も一般的である。病因は疾患部位に活性マクロファージ及びリンパ球が残留していることに関連しており、続いてこれらの細胞型より放出される局部的又は全身的活性産物の放出の結果として慢性続発症が生じる。

10

自己免疫性溶血性貧血、免疫再生不良性貧血、及び発作性夜間血色素尿を含む自己免疫性溶血性貧血は、赤血球(いくつかの場合においては血小板もまた含む他の血液細胞)表面で発現した抗原と反応する抗体が産出される結果によるものであり、補体媒介溶解及び/又はA D C C / F c -レセプター-媒介メカニズムを介して、その抗体被覆細胞の除去に反映される。

他の臨床的環境における血小板減少性紫斑病及び免疫仲介血小板減少を含む自己免疫性血小板減少では、血小板破壊/除去が、抗体又は補体が血小板に接合し、続いて補体溶解、A D C C又はF c -レセプター-媒介メカニズムにより除去される結果として生じる。

20

#### 【0134】

グレース疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、及び萎縮性甲状腺炎を含む甲状腺炎は、甲状腺内に存在し多くの場合甲状腺に特異的なタンパク質と反応する抗体の産生を伴う、甲状腺抗原に対する自己免疫反応の結果によるものである。自然のモデル：ラット(B U F及びB Bラット)及びチキン(肥満チキン種)；誘導性モデル：サイログロブリン、甲状腺ミクロソーム抗原(甲状腺ペルオキシダーゼ)のいずれかでの動物の免疫化を含む実験用モデルが存在する。

I型真性糖尿病又はインスリン依存性糖尿病は膵臓ランゲルハンス島細胞の自己免疫破壊であり；この破壊は自己抗体及び自己反応性T細胞により媒介される。また、インスリン又はインスリン様レセプターに対する抗体は、インスリン-非反応性の表現型をつくりだすことができる。

30

糸球体腎炎及び尿細管間質性腎炎を含む免疫仲介腎疾患は、腎抗原に対する自己反応性抗体又はT細胞が産生される結果として直接的に、又は他の非腎抗原に対して反応性である、腎臓中の抗体及び/又は免疫複合体の沈着の結果として間接的に、腎組織に抗体又はT細胞媒介傷害が生じることによるものである。よって、免疫複合体の生成をもたらす他の免疫媒介疾患により、間接的続発症として免疫媒介腎疾患も誘発しうる。直接的及び間接的免疫メカニズムの双方により、結果として、器官機能が損なわれ、いくつかの場合では腎臓機能不全に進行する、病巣発達を腎組織に生じさせ/誘発する炎症反応が生じる。体液及び細胞免疫メカニズムの双方が障害の発病に関与しうる。

#### 【0135】

多発性硬化症；特発性脱髄性多発神経障害又はギラン-バレー症候群；及び慢性炎症脱髄性多発神経障害を含む中枢及び末梢神経系の脱髄疾患は、自己免疫に原因を有し、オリゴデンドロサイト又はミエリンに直接的に引き起こされる損傷の結果として神経脱髄が生じると考えられている。M Sにおいては、疾患の誘発及び進行がTリンパ球に依存することを示唆する証拠がある。多発性硬化症は、Tリンパ球依存性であり、再発性弛緩経路又は慢性進行経路のいずれかを有する脱髄疾患である。病因はよく知られていないが、ウィルス感染、遺伝的素因、環境及び自己免疫性の全てが寄与している。病巣は優勢なT細胞媒介小膠細胞の湿潤と、浸潤しているマクロファージを含み；C D 4 + Tリンパ球は病巣における優勢な細胞型である。オリゴデンドロサイトの細胞死と続く脱髄のメカニズムはよく知られていないが、Tリンパ球により推進されていると思われる。

40

好球性肺炎；特発性肺線維症及び過敏性肺炎を含む炎症及び線維症の肺疾患には、調節

50

されない免疫炎症反応が関連している。その反応の阻害は治療的に有益であろう。

水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患は自己抗体により媒介され、その発病はＴリンパ球依存性である。

乾癬はＴリンパ球媒介炎症疾患である。病巣にはＴリンパ球、マクロファージ及び抗原プロセッシング細胞及びある種の好中球の浸潤が含まれる。

#### 【 0 1 3 6 】

喘息；アレルギー性鼻炎；アトピー性皮膚炎；食物過敏症及び蕁麻疹等を含むアレルギー性疾患はＴリンパ球依存性である。これらの疾患はＴリンパ球誘発性炎症、ＩｇＥ媒介炎症、又は双方の組合せにより主に媒介される。

拒絶反応及び移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）を含む移植関連疾患はＴリンパ球依存性であり；Ｔリンパ球の機能を阻害することで改善される。

免疫及び／又は炎症反応への介在が有益である他の疾患は、限定するものではないがウイルス感染（限定するものではないがＡＩＤＳ、Ａ型、Ｂ型、Ｃ型、Ｄ型、Ｅ型肝炎）、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染（ＭＬＲを刺激する分子（又は誘導体／アゴニスト）を治療に利用し、感染要因に対する免疫反応性を増強することができる）を含む感染疾患、ＭＬＲを刺激し、治療に利用し、遺伝性、獲得性、感染誘発性（例えばＨＩＶ感染）、又は医原性（即ち、化学療法からのもの）免疫不全の状態に対する免疫反応を増強するために治療上用いることが可能な免疫不全疾患（分子／誘導体／アゴニスト）、及び異常増殖である。

#### 【 0 1 3 7 】

また本発明は、ここで記載されたアンタゴニスト又はアゴニストを収容するキットを提供する。典型的なキットは、上述した一又は複数の賦形剤にアンタゴニスト又はアゴニストのための容器、好ましくはバイアル；及び使用者にアンタゴニスト又はアゴニスト製剤の使い方を指示する製品挿入物又はラベル等の使用説明書を具備する。これにより、好ましくは製薬用製剤が提供される。好ましくは、製薬用製剤は癌又は免疫に関連した病状を処置するためのものである。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ、及び試験管が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような様々な材料で形成することができる。容器は疾患の診断又は処置に有効なアンタゴニスト又はアゴニスト製剤を収容しており、滅菌したアクセスポートを有している（例えば、容器は皮下注射針により貫通可能なストッパーを具備する静脈溶液用のバック又はバイアルであってよい）。容器上の又は容器に伴うラベルには、製剤が、選択された疾患の診断又は処置に使用されることが示されている。製造品は、注射用水、製薬的に許容可能な溶液、塩水、リンガー液、又はデキストロース溶液を収容する第２の容器をさらに具備する。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用指示書を含むパッケージ挿入物を含む、市販及び使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでいてもよい。

#### 【 0 1 3 8 】

全ての特許、特許出願、出版物、製品についての記載、及びプロトコールは、この出願を通して引用され、その開示は、出典明記によりそれらの全てがここに援用される。本明細書中で使用した項目の表題は単に構造化するためのものであって、記載した内容を制限するためのものではない。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 3 9 】

様々な本発明の態様は、以下に続く実施例としてさらに図と共に説明されるが、それらはいずれも本発明の範囲を制限することを目的としない。

実施例において、指される市販の試薬は、特に明記しない限り製造業者の指示に従って用いた。以下の実施例及び本明細書の全体にわたってＡＴＣＣ寄託番号により示されるこれらの細胞の供与源は、アメリカ培養細胞保存機関、Manassas, VAである。特に明記しない限り、本発明は、本明細書中で上記するもの及び以下の教本に記載されるものなどの組換えＤＮＡ技術の標準的方法を使用する：Sambrook 等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989、Ausubel 等、Current Protocols in

10

20

30

40

50

Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989、Innis 等, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990、Harlow 等, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988、Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984、R.I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987、Coligan 等, Current Protocols in Immunology, 1991。

#### 【0140】

材料及び技術：

ヒトのPBMCにおけるTWEAK及びFN14の発現分析。

ヒトの末梢血液単核細胞(PBMC)は、製造業者の指示に従って、リンパ球分離メディウム(ICN)にて50mlのヒトのドナー全血液から単離した。細胞は、炎症性刺激の存在及び非存在下にてブレフェルジンA(5ug/ml)を添加した完全なIscoves培地に再懸濁して24時間置いた。刺激後、Fcレセプターは、2ug/mlのFcブロック(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)にて室温に20分置いて遮断した。次いで、細胞を、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD11c、CD14、CD20、CD45、CD56、HLA-DR、Lin1 FITC (BD Biosciences, San Jose, CA)及びFN14 (e-Biosciences)に対する蛍光コンジュゲートモノクローナル抗体とともに室温に30分置いて表面を染色して、製造業者の指示に従ってBD FACS溶解溶液にて処理して、-70 に一晩貯蔵した。

細胞を透過させて、室温に30分置いて、TWEAK (e-Biosciences)について染色した。洗浄の後、FACS Calibur(BD Biosciences)にて細胞を分析した。

#### 【0141】

TWEAK欠損マウスの産出。

2.5kbの第一及び5つの下流エクソンすべてを包含するTWEAK遺伝子をPGK-neoカセットに置換して、TNLOX1-3ベクター(Gerber 等, Development, 126:1149-1159(1999))ベースのTWEAKターゲティングベクターを構築した。コンストラクトは、マウスゲノム由来の以下の2つのDNA範囲を含有した：neoカセットの5'を置き換えたTWEAKの第六及び第七エクソンとTWEAKのエクソン1の一部を包含する3.1kb断片、及びPGK-neoカセットの3'を置換した第一及び第二のSMT3IP1エクソンを包含する4.1kbの断片。

R1胚性幹細胞(Nagy 等, Gene Targeting: A Practical Approach, A.L. Joyner, ed., Oxford University Press, Oxford, England, pp. 147-179 (1993))を、エレクトロポレーションによって線状にしたベクターを形質移入して、G418-耐性クローンを5'-及び3'-特異的DNAプローブを用いたサザンブロット分析により予想される組換え現象の有無についてスクリーニングした(図8に示す)。2つの独立したTWEAK<sup>-/-</sup>細胞株をC57BL/6胚細胞にマイクロインジェクションした。C57BL/6雌とキメラ雄を交雑して産出したマウスの生殖細胞系の伝達は毛色で検出して、以下の外部(E)及び内部(I)プライマーセットを用いて2ステップゲノムPCR(図8)によって、確認した：E フォワード、TGCCCTAAGCCAGTCTACACCCAGTATTCCTTC (配列番号3)、E リバーズ、TGGCCTGAAGAAATGCTCAGCTATCACCAAC (配列番号4)、I フォワード、CTTAGAACCAGCCGTAGGAAGGATT (配列番号5)、I リバーズ、GTGCCAGGGCGTCCAGTACATACAA (配列番号6)。

TWEAKノックアウト動物は、C57BL/6バックグラウンドに最低6回戻し交配した。

#### 【0142】

APRIL、TWEAK及びSMT3IP1のmRNA発現の試験。

定量的RT-PCRによるいくつかの組織の分析から、TWEAK<sup>-/-</sup>マウスはTWEAK転写産物を発現しなかったのに対して、ノックアウトでは2つの近傍遺伝子であるAPRIL及びSMT3IP1のmRNA発現は変化しなかった。(Varfolomeev 等, Mol. Cell. Biol., 24:997-1006 (2004))、図9。

#### 【0143】

フローサイトメトリ分析。

網篩と注射器のゴム栓にて単離した組織を解離することによって、造血器官からの単細胞懸濁液を8週齢のマウスから採取した。単細胞懸濁液をFcブロック抗体(2 µg / mL、BD Biosciences)とともにインキュベートして、その後、B220、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD11c、CD19、CD45、DX5、Lin1 FITC (BD Biosciences, San Jose, CA)、CD161及びF4/80 (e-Biosciences) に対する系統特異的コンジュゲートモノクローナル抗体とともに室温で30分間置いて染色した。表面染色後、製造業者の指示に従って、RBCをACK溶解バッファ(Biosource International)にて溶解して、残りの細胞を固定した。TRUカウントビーズ(BD Biosciences)を定量化のためにチューブに加えた。細胞に関連する蛍光を、FACS Calibur計測器及び関連するCell Quest ソフトウェア(BD Biosciences)にて分析した。

10

#### 【0144】

NK細胞AICDアッセイ。

100 mLのヒトのドナー全血液からヒトのPBMCを単離して、抗TWEAK mAb (CARL-1、e-Biosciences)又はFN14-Fc (図12のアミノ酸1-129を含有してなる融合タンパク質)(Genentech)の存在又は非存在下において、TNF- (500 ng / mL)、LPS (5 µg / L)又はIFN- (500 ng / mL)にて24時間刺激した。刺激後、NK細胞をMiltenyi CD56+ビーズを用いて単離して、Maecker 等, Cancer Cell, 2:139-148(2002)の記載のように、sub-G1 DNA含有量について染色した。

20

#### 【0145】

LPS実験。

1グループ当たり10匹のTWEAK<sup>-/-</sup>マウスとTWEAK<sup>+/+</sup>マウスの腹膜内(i.p.)にLPS(大腸菌055:B5、Sigma)を注射した。100 mg / kgから10 mg / kgの範囲のLPS用量を滅菌水に溶解した。5日間にわたって1時間ごとにマウスの生存度をモニターした。1グループ当たり10匹のマウスに30 mg / kgのLPSを腹腔内投与して、24時間後に血液と脾臓を単離することによって、マウスのサイトカイン分析を行った。単細胞浮遊液を、プレフェルジンA (5 µg / mL)の存在下にて6時間インキュベートした。細胞は、このインキュベーションの最後の20分間でFcブロック(2 µg / mL、BD Biosciences)して、系統特異的コンジュゲートモノクローナル抗体であるDX5 (NK細胞を識別するため)、CD11b及びF4/80 (マクロファージを識別するため)並びにCD45 (一般的な白血球抗原)とともに室温で30分間置いて染色した。表面染色後、上記の通りにRBCを溶解した。細胞を透過させて、IFN-、IL-12又はIL-10に対する抗体で染色して、FACS Calibur(BD Biosciences)にて分析した。4人の別々のヒトドナーからPBMCを単離することによって、ヒトのサイトカイン分析を行った。ドナーPBMCを、1 µg / mLのLPSの存在又は非存在下において、インビトロで16時間インキュベートした。刺激の最後の6時間に、プレフェルジンAを、5 µg / mLの終濃度で細胞に加えた。ヒトのPBMCを、Fcブロック(Miltenyi)にて室温に20分間置いてブロックして、室温に30分間置いて表面染色した(CD3、CD56、CD14、CD45、BD Biosciences)。表面染色後、製造業者の指示に従ってRBCを細胞内染色のために溶解した。細胞を固定して、透過させて、IFN- 又はIL-12抗体で染色して、FACS Caliburにて分析した。

30

40

#### 【0146】

STAT-1 活性アッセイ。

それぞれMiltenyi CD56<sup>+</sup>及びCD11b<sup>+</sup>ビーズを用いてヒトのドナーの脾臓からNK細胞及びマクロファージを単離した。1.0 × 10<sup>6</sup>個のNK細胞 / 0.5 mLは、1.0 × 10<sup>6</sup>個のマクロファージ / 0.5 mL マクロファージ-SFMメディアウム(Invitrogen)とともにインキュベートした。細胞を無血清培地中に12時間静置し、その後1 µg / mLのLPSにて刺激した。Perez 及び Nolan (Krutzik 等, Clin. Immunol., 110:206-221 (2004)、Perez 等, Meth. Mol. Biol., 263:67-94 (2004)、Perez and Nolan, Nat. Biotechnol., 20:155-162 (2002))により概説されるように、12時間後、細胞

50

を C D 5 6 及び C D 1 1 b について表面染色した後に、ホスホ-S T A T - 1 について細胞内染色した。

【 0 1 4 7 】

N F - B 分析。

N K 細胞及びマクロファージは、それぞれMiltenyi C D 5 6 <sup>+</sup> 及び C D 1 1 b <sup>+</sup> ビーズを用いてドナーのヒト脾臓から単離した。5 . 0 × 1 0 <sup>6</sup> 個の N K 細胞を、測定時ごとに 5 m L のマクロファージ-S F M メディウム中で 5 . 0 × 1 0 <sup>6</sup> 個のマクロファージとともにインキュベートした。細胞を 1 2 時間静置し、T W E A K ( 1 0 0 n g / m L ) 又は T N F - ( 1 0 0 n g / m L ) にて刺激した。溶解物 ( 2 0 μ g 総タンパク ) 及び免疫沈降物 ( 5 0 μ g 総タンパク ) は、製造業者の指示に従って ( Cell Signaling, Beverly, MA ) 調製した。その後のイムノプロット及び免疫沈降のためにすべての抗体を Cell Signaling から購入して、そのプロトコールに従って実験を行った。

10

【 0 1 4 8 】

組織学及び免疫組織化学。

3、6 及び 1 2 月齢の雄の T W E A K <sup>- / -</sup> マウス及び T W E A K <sup>+/+</sup> マウスの組織は、重さを量り、固定し、切片化し、病理学的状態について分析した。ヘマトキシリンエオジン染色した切片は、全体の組織学的異常について分析した。ナンキンマメ凝集素 ( Vector Research, Burlingame, CA ) で染色した凍結切片は、胚中心の構造について分析した。1 2 か月齢の雄マウスから 5 つの T W E A K <sup>- / -</sup> 脾臓及び T W E A K <sup>+/+</sup> 脾臓を分離して、染色して、製造業者の指示に従って TruCount ビーズ ( BD Biosciences ) を用いてリンパ球細胞実質の数量化を行った。

20

【 0 1 4 9 】

B 1 6 メラノーマ実験。

1 0 匹の T W E A K <sup>- / -</sup> マウス及び T W E A K <sup>+/+</sup> マウスの右の後横腹に、0 . 1 ~ 0 . 5 × 1 0 <sup>6</sup> 細胞 / 0 . 1 m L 滅菌生理食塩水を皮下投与 ( s . c . ) した。毎日マウスをモニターし、4 週間 ( B 1 6 . B L 6 研究 ) 又は 6 週間 ( B 1 6 . F 1 0 研究 ) 1 日おきに腫瘍の測定を行った。研究終了時に腫瘍を取り出して、重さを量り、まず網篩に通して分離した後に、非酵素的な細胞解離バッファ ( Sigma ) にて 5 分間処理して、単細胞浮遊液を作製した。腫瘍を注入したマウスから脾細胞を入手し、プレフェルジン A の存在下に滅菌生理食塩水ないしは腫瘍細胞浮遊液の何れかとともにインキュベートして、細胞内サイトカイン産生を測定した。

30

【 0 1 5 0 】

実験結果：

様々な造血組織の T W E A K 発現は既に報告された ( Chicheportiche 等, 上掲, Marsters 等, 上掲 ) が、T W E A K を発現するとして既に報告されたリンパ系細胞は単球だけである ( Nakayama 等, J. Exp. Med., 192:1373-1380 ( 2000 ) ) 。 T W E A K の免疫学的標的をさらに説明するために、様々な炎症性刺激の後に、多くのリンパ系集団を T W E A K 及びそのレセプターである F N 1 4 の発現について分析した ( 図 1 A 及び 1 B ) 。

T W E A K 及びそのレセプターである F N 1 4 は、先天性免疫系の細胞により発現されることが示された ( 図 1 を参照 ) 。 N K 細胞、マクロファージ及び樹状細胞だけが T W E A K ( 図 1 A ) 及びそのレセプターである F N 1 4 ( 図 1 B ) を発現することが明らかになった。さらに、レセプターとリガンドの表面発現は、I F N - 又は P M A による刺激の後に上方制御された。N K T 細胞は T W E A K を発現したが F N 1 4 は発現せず、また何れも I F N - 又は P M A によって上方制御されなかった。T 細胞及び B 細胞を含む他のリンパ系の細胞型は、T W E A K 又は F N 1 4 を有意なレベルで発現しなかった ( データは示さない ) 。

40

【 0 1 5 1 】

インビボでの T W E A K の生物学的役割を調べるために、T W E A K 遺伝子ノックアウトマウスを作製した ( 図 8 ) 。詳細な解剖学的及び組織学的な分析から、T W E A K <sup>- / -</sup> マウスの非リンパ系組織において何らかの有意な異常は示されなかった。 ( 図 1 0 ) 。しか

50

しなから、造血組織の分析では、 $TWEAK^{-/-}$ マウスは野生型の年齢が一致する同腹仔と比較して、有意により多くのNK細胞を有したことが明らかとなった(図2A)。この増加は、脾臓、パイエル板、リンパ節及び末梢血液(図2A)を含む二次リンパ系器官において明らかであり、雌(図2A下)よりも雄(図2A上)において多かった。これらの増加したNK数とは対照的に、 $TWEAK^{-/-}$ マウスは、NK細胞(図2B)、並びに $CD4^{+}$ ないし $CD8^{+}$ T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球及び血小板は正常なレベルを示した(データは示さない)。 $TWEAK^{-/-}$ マウス及び野生型マウスの骨髄中のNK細胞の量は同じであり(図2C)、NK数の増加がNK細胞発達における変化によるものではないかもしれないことが示唆された(Kim 等, *Nat. Immunol.*, 3:523-528 (2002))。これに対して、活性化誘導性細胞死(AICD)によるNK細胞の除去の減少は、 $TWEAK$ の欠損におけるNK蓄積を引き起こしうる。ヒトの末梢血液からNK細胞を単離し、AICDに対するそれらの感受性への $TWEAK$ 中和の効果を調べた(図2D)。可溶性FN14-Fcデコイレセプター又は $TWEAK$ -中和抗体による $TWEAK$ 阻害は、TNF- $\alpha$ 、LPS又はIFN- $\gamma$ によるAICDの刺激からNK細胞を保護したことから、AICDによるNK細胞の不十分な除去のために、NK細胞が $TWEAK^{-/-}$ マウスに蓄積しうることを示唆された。

#### 【0152】

インビボでの先天性免疫応答のための $TWEAK$ の重要性を決定するために、全身抗原刺激の確立されたモデルを、グラム陰性細菌内毒素リポポリサッカリド(LPS)の致死用量によって調べた(図3A)。 $TWEAK^{-/-}$ マウスは、LPS用量の広範囲にわたって野生型のコントロールよりLPS誘導性の死に影響されやすかったことから、 $TWEAK$ 非存在下において、より強力な先天性炎症応答が発達することが示唆された。LPS投与マウスの末梢血及び脾臓から単離した $TWEAK^{-/-}$ のNK細胞及びマクロファージは、野生型細胞と比較して、より多くのIFN- $\gamma$ 及びIL-12を産生し、より少ないIL-10を生産した(図3B)。同様に、 $TWEAK$ の抗体による中和により、LPS刺激後に、ヒトの末梢血液NK細胞及びマクロファージによるIFN- $\gamma$ 及びIL-12の産生が増えた(図3C)。ゆえに、 $TWEAK^{-/-}$ マウスはNK細胞数を増加させているからだけでなく、そのNK細胞及びマクロファージが更に炎症応答を促進するIFN- $\gamma$ 及びIL-12をより多く生産するので、LPSに高感受性であると思われる(D'Andrea 等, *J. Exp. Med.*, 178:1041-1048 (1993)、Emoto 等, *J. Immunol.*, 169:1426-1432 (2002)、Heremans 等, *Eur. J. Immunol.*, 24:1155-1160 (1994))。これらの結果から、 $TWEAK$ は先天性炎症応答を減らすように機能することが示唆される。

#### 【0153】

$TWEAK$ の欠失が先天性免疫細胞によってどのようにIFN- $\gamma$ 及びIL-12の産生を促進しうるかについて調査するために、病原体に应答する際にマクロファージにおけるIL-12及びNK細胞におけるIFN- $\gamma$ の発現を誘導する引き金となる、転写のシグナル伝達因子及び活性化因子(STAT-1)の活性を調べた(Marodi 等, *Clin. Exp. Immunol.*, 126:456-460 (2001)、Morrison 等, *J. Immunol.*, 172:1825-1832 (2004)、Nelson 等, *J. Immunol.*, 156:3711-3720 (1996)、Varma 等, *Clin. Diag. Lab Immunol.*, 9:530-543 (2002))。 $TWEAK$ 中和により、NK細胞及びマクロファージでの基礎的STAT-1リン酸化が増え、更にはこれらの細胞でのLPSによるSTAT-1の刺激を亢進した(図4A)。ゆえに、IFN- $\gamma$ 及びIL-12産生の $TWEAK$ の抑制に寄与するあるメカニズムは、STAT-1活性化の減弱でありうる。

#### 【0154】

先天性炎症応答を増やす際に重要な役割を果たすサイトカインであるTNF- $\alpha$ は、標準のNF- $\kappa$ B経路の活性化によってIFN- $\gamma$ 及びIL-12(並びに他の免疫調節性遺伝子)の発現を誘導する(Bonizzi 及び Karin, *Trends Immunol.*, 25:280-288 (2004)、Chen 及び Greene, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5:392-401 (2004)、Chen 等, *J. Immunol.*, 166:270-276 (2001)、D'Andrea 等, *J. Exp. Med.*, 178:1041-1048 (1993)、Zhong 等, *Mol. Cell*, 9:625-636 (2002))。TNF- $\alpha$ はp65/RelA NF- $\kappa$ Bサブユニ

10

20

30

40

50

ットの一過性リン酸化を誘導して、p 5 0 サブユニットとの対合(結合)及び、結果として生じるヘテロマー複合体の核移行を引き起こす。核において、p 6 5 / p 5 0 ヘテロ二量体は、p 3 0 0 / C B P 転写活性化補助因子との対合によって、下流の標的遺伝子、例えば I F N - 及び I L - 1 2 を転写活性化する(Chen 及び Greene, 上掲、Chen 等, J. Immunol., 166:270-276 (2001)、Chen 等, Immunology, 107:199-208 (2002)、Kiernan 等, J. Biol. Chem., 278:2758-2766 (2003)、Zhong 等, supra)。これに対して、N F - B 1 はヒストンデアセチラーゼ(H D A C) - 1、- 2 又は - 3 と相互作用して、標的遺伝子の転写抑制を起こしうる(Ashburner 等, Mol. Cell Biol., 21:7065-7077 (2001)、Kiernan 等, J. Biol. Chem., 278:2758-2766 (2003)、Quivy 及び Van Lint, Biochem. Pharmacol., 68:2507-2515 (2004)、Rahman 等, Biochem. Pharmacol., 68:1255-1267 (2004)、Z hong 等, 上掲)。一方、T N F - は標準の N F - B 1 経路を選択的に活性化する一方で、T W E A K は、標準的な N F - B 1 (Chicheportiche 等, 上掲、Marsters 等, 上掲、Saitoh 等, 上掲)と非標準的な N F - B 2 サブユニット(Saitoh 等, 上掲)の核移行を促進することが可能であるようである。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 5 5 】

また、T W E A K が N F - B 1 の転写相互作用を調整することによって、遺伝子発現に作用しうるかどうかを調べるために、ヒト脾臓の N K 細胞及びマクロファージ中の p 6 5 N F - B 1 のリン酸化に対する T W E A K 及び T N F - の影響を比較した(図 4 B)。0 . 5 時間に検出可能な一過性 p 6 5 修飾を引き起こした T N F - と異なり、T W E A K は長期にわたる p 6 5 リン酸化を誘導した。これは 0 . 2 5 時間から始まって最高 8 時間持続した。次に、刺激された細胞からの p 6 5 N F - B 1 を免疫沈降して、イムノブロット分析によって、p 3 0 0 又は H D A C - 1 との結合を探索した(図 4 C)。T N F - は H D A C - 1 ではなく p 3 0 0 と p 6 5 との強い相互作用を誘導したのに対して、T W E A K は p 3 0 0 ではなく H D A C - 1 と p 6 5 との強い結合を誘導した。ゆえに、S T A T - 1 活性化を阻害することに加えて、T W E A K は、H D A C - 1 と N F - B 1 との相互作用を促すことによって、I F N - 及び I L - 1 2 の転写を抑制しうる。N K 細胞による I F N - 産生及びマクロファージによる I L - 1 2 産生に対する T W E A K の阻害効果は、H D A C インヒビタートリコスタチン A によって逆転した(データは示さない)。

#### 【 0 1 5 6 】

T W E A K 欠失が免疫系の発達を変化させるかどうか調べるために、3、6 及び 1 2 か月齢の T W E A K <sup>-/-</sup> マウスと野生型同腹仔のリンパ系組織を比較した(図 5)。6 か月までは、T W E A K <sup>-/-</sup> マウスはコントロールと比較して、顕著な脾臓及びリンパ節の肥大を示したが(図 5 A、5 B)、胸腺及び肝臓は異ならなかった(データは示さない)。組織学的評価は、T W E A K <sup>-/-</sup> の脾臓は正常な胚中心形成を有しており、悪性腫瘍もなく、リンパ節も同様であった(図 5 C)。しかしながら、脾臓の免疫組織化学的染色は、年齢が一致する同腹仔と比較して、1 2 か月齢の T W E A K <sup>-/-</sup> マウスでは、抗 C D 3 抗体による強いシグナルを示した(図 5 C)。このことから T 細胞区画の増殖(expansion)が示唆される。F A C S 分析では、C D 4 <sup>+</sup> 及び C D 8 <sup>+</sup> の T 細胞が老齢の T W E A K <sup>-/-</sup> マウスにおいて、有意に多いことが確認された(図 5 D)。また、B 細胞、マクロファージ、顆粒球又は血小板の量が同じであるのに対して、脾臓 N K 細胞数は増加した(データは示さない)。N K 細胞が僅かの割合の脾細胞のみを含むと仮定すると、おそらく、増加した脾臓サイズは主に T W E A K の存在しない T 細胞区画の増殖(expansion)によって生じたことになる。さらなる分析では、T W E A K <sup>-/-</sup> マウスにおいて、メモリー T 細胞及び、T<sub>H</sub> 1 特異的転写因子 T - b e t の発現が陽性である T 細胞が著しく増加したことが示された(図 5 E)。これらの結果は、T W E A K が適応 T<sub>H</sub> 1 免疫性質の発達を阻害するように機能することを示唆する。

#### 【 0 1 5 7 】

適応免疫への転移を調節する際の T W E A K の関与を更に調べるために、同系のマウス C 5 7 ブラック 6 B 1 6 メラノーマ細胞ベースの抗腫瘍免疫の確立されたモデルを調べた(Yang 等, Int. J. Cancer, 105:512-519 (2003)、Yang 等, Cell. Immunology, 179:8



4-95 (1997)、Yei 等, Gene Ther., 9:1302-1311 (2002))。このモデルにおいて、NK 細胞及びエフェクター T 細胞は腫瘍拒絶反応に重要である(Prevost-Blondel 等, Eur. J. Immunol., 30:2507-2515 (2000)、Turk 等, J. Exp. Med., 200:771-782 (2004)、Yang 等, Int. J. Cancer, 105:512-519 (2003)、Yang 等, Cell. Immunol., 179:84-95 (1997)、Yei 等, Gene Ther., 9:1302-1311 (2002))。まず、マウスに、B 1 6 細胞株の中程度の悪性の B 1 6 . F 1 0 サブクローンにて抗原刺激した(図 6)。野生型マウスが既に報告されたデータに匹敵する速度で腫瘍を成長させたのに対して、T W E A K<sup>-/-</sup> マウスは B 1 6 . F 1 0 腫瘍の定着と成長に完全に耐性を有していた(図 6 A 及び 6 B) (Yei 等, 上掲)。どの免疫学的相違によって腫瘍拒絶反応におけるこの著しい相違が生じたのかを決定するために、B 1 6 . F 1 0 を注入されたマウスの脾臓リンパ球集団を分析した(図 6 C)。他の所見と一致して、T W E A K 欠失動物は野生型のコントロールより多い脾臓 NK 細胞を有した。驚くべきことに、検出可能な腫瘍の欠失とそれによる大量の腫瘍関連抗原の欠如にもかかわらず、T W E A K<sup>-/-</sup> マウスは、コントロールよりも C D 8<sup>+</sup> T 細胞の有意な増殖(expansion)を示した。この老齢の T W E A K<sup>-/-</sup> マウスの増加したメモリー T 細胞数の所見とこの発見を合わせると、T W E A K の欠如により、おそらくより高いレベルの I F N- $\gamma$  及び I L-12 の存在により促進されるより強力な T 細胞プライミングにより、腫瘍誘導性のメモリー応答の亢進が促されうと思われる。

10

#### 【 0 1 5 8 】

また、マウスは、より悪性の B 1 6 メラノーマサブクローン B 1 6 . B L 6 にて抗原刺激した。1 か月の平均腫瘍重量により示されるように、野生型コントロールと比較して T W E A K<sup>-/-</sup> では、腫瘍成長が有意に減ったにもかかわらず、腫瘍が定着したことが確認された(図 7 A)。T W E A K<sup>-/-</sup> マウスから単離された腫瘍は非常に増加したリンパ球浸潤を表しており、コントロールの 2 ~ 8 倍の T 細胞及び NK 細胞を有していた(図 9)。また、腫瘍を有する T W E A K<sup>-/-</sup> マウスは、コントロールより大きな脾臓を有し(図 7 B)、その結果 NK 細胞及び T 細胞集団が増殖(expansion)していた(図 7 C)。増殖(expansion)したリンパ球集団が特異的な抗腫瘍活性を宿したかどうかを確かめるために、腫瘍を有するマウスから脾細胞を単離して、B 1 6 . B L 6 腫瘍細胞にてエキスピボで再抗原刺激して、特定のサイトカインを産生する能力を測定した。対応する野生型のコントロールよりも、T W E A K 欠失 C D 8<sup>+</sup> T 細胞及び NK 細胞は有意に多くの I F N- $\gamma$  を産生し、T W E A K<sup>-/-</sup> のマクロファージは、腫瘍再抗原刺激により、多くの I L-12 を産生した(図 7 D、7 E)。まとめると、これらの研究から、T W E A K の欠失により先天性の抗腫瘍免疫だけでなく適応性の抗腫瘍免疫が増えることが示された。このことから、T W E A K が両応答を抑制するために生理的に作用することが示唆された。さらに、T W E A K<sup>-/-</sup> マウスにおける T 細胞増殖(expansion)と抗腫瘍サイトカイン産生の亢進の所見から、T W E A K が先天性免疫から適応免疫への境界を調整することが示唆された。

20

30

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 1 5 9 】

【 図 1 A 】 T W E A K 及びそのレセプターである F N 1 4 は、先天性免疫系の細胞に発現される。静止ヒト P B M C (「unstim」)及び、I F N- $\gamma$  ないし P M A の何れかで 1 2 時間活性化したヒト P B M C を、リンパ球系統マーカーに対する抗体にて表面染色して、透過させ、T W E A K 抗体にて染色して、F A C S によって分析した。(マクロファージ(「mac」)、樹状細胞(「DC」)、NK 細胞及び NK T 細胞)。

40

【 図 1 B 】 静止ヒト P B M C 及び活性化ヒト P B M C を、T W E A K レセプターである F N 1 4 について表面染色した。

【 図 2 A 】 T W E A K K O マウスは、二次造血組織に多くの NK 細胞を有する。2 か月齢の T W E A K<sup>+/+</sup> マウス(黒色棒)又は T W E A K<sup>-/-</sup> マウス(白色棒)(1 グループにつき n = 6)から脾臓、末梢血、パイエル板及びリンパ節を単離し、解離して、F A C S 分析によって、NK 細胞を定量化した。(上のグラフ：雄、下のグラフ：雌)。

【 図 2 B 】 T W E A K K O マウスは、二次造血組織に多くの NK 細胞を有する。2 か月

50

齢の  $TWEAK^{+/-}$  マウス(黒色棒)又は  $TWEAK^{-/-}$  マウス(白色棒)(1グループにつき  $n = 6$ )から脾臓、末梢血、パイエル板及びリンパ節を単離し、解離して、FACS分析によって、NK細胞を定量化した。(上のグラフ：雄、下のグラフ：雌)。

【図2C】  $TWEAK^{+/-}$  マウス(黒色棒)又は  $TWEAK^{-/-}$  マウス(白色棒)(1グループにつき  $n = 6$ )の右大腿骨から骨髓(0.5 mL)を吸引して(左のグラフ：雄、右のグラフ：雌)、NK細胞を定量化した。

【図2D】全血からヒトPBMCを単離して、様々な濃度のFN14Fc( )、抗TWEAK mAb( )、EDARFc( )又は抗CD4 mAb( )の存在下において、TNF、LPS又はIFN-による刺激によって、細胞死の誘導を活性化した。次いでNK細胞を単離して、それらのsub-G1内容物について染色した。

【図3A】TWEAK切除又は阻害は、エンドトキシンに対する先天性炎症反応を増やす。 $TWEAK^{+/-}$  マウス及び  $TWEAK^{-/-}$  マウス(1グループにつき  $n = 10$ )に示した用量のLPSを腹腔内投与して、5日間にわたって生存度をモニターした。

【図3B】LPS(30 mg/kg)にてインビボ投与してから24時間後の  $TWEAK^{+/-}$  マウス及び  $TWEAK^{-/-}$  マウスの末梢血及び脾臓からNK細胞及びマクロファージを単離して、IFN-、IL-12及びIL-10の細胞内レベルについて染色した。

【図3C】4人のヒトのドナーからのPBMCを、LPSにて24時間刺激した。その後、NK細胞又はマクロファージ(系統マーカーにより識別される)を、IFN-及びIL-12それぞれの細胞内レベルについて染色した。

【図4A】STAT-1及びNF- $\kappa$ B1の調節におけるTWEAKの関与。STAT-1活性化の分析。ヒトのNK細胞及びマクロファージを、LPS(1  $\mu$ g/mL)によって、インビトロで12時間刺激し、系統マーカーについて表面染色して、透過させ、リン酸化されたSTAT-1の細胞内レベルについて染色した。左側のパネルはNK細胞を表し、右側のパネルはマクロファージを表す(FACS棒グラフを下に示した)。

【図4B】NF- $\kappa$ B1リン酸化の分析。脾臓ヒトNK細胞及びマクロファージを、24時間にわたってTWEAK又はTNF-(100 ng/mL)にて刺激した。示した時間点で細胞溶解物を調製して、イムノプロットによって、リン酸化されたp65 NF- $\kappa$ B1について分析した。

【図4C】NF- $\kappa$ B1相互作用の分析。NF- $\kappa$ B1をTWEAK-刺激細胞又はTNF-刺激細胞の溶解物からp65により免疫沈降して、イムノプロットによって、免疫沈降物をp300及びHDAC-1の存在について分析した。

【図5A】高齢の  $TWEAK^{-/-}$  マウスは、増殖した(エクспанションした)メモリー細胞及びTH1細胞コンパートメントを有するより大きな脾臓を有する。 $TWEAK^{+/-}$  及び  $TWEAK^{-/-}$  の雄マウス同腹子を3、6又は12か月齢まで生育して、それらの脾臓及びリンパ節を調べた。 $TWEAK^{+/-}$  マウス及び  $TWEAK^{-/-}$  マウスからの脾臓の代表的な画像。

【図5B】年齢に対する平均脾臓重量(1グループにつき  $n = 6$ )。

【図5C】CD3抗体によって、染色した12か月齢の  $TWEAK^{+/-}$  マウス及び  $TWEAK^{-/-}$  マウスからの脾臓切片の代表的な画像。

【図5D】12か月齢の野生型マウス及びTWEAK KO同腹子からの脾細胞を、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup> T細胞の数を測定するためにFACSによって分析した。

【図5E】12か月齢の野生型マウス及びTWEAK KO同腹子からの脾細胞を、メモリーT細胞及びTH1 T細胞の数を測定するためにFACSによって分析した。

【図6A】TWEAK欠失は、B16.F10メラノーマの定着と増殖を阻害して、適応CD8<sup>+</sup> T細胞の増殖(エクспанション)を促進する。 $TWEAK^{+/-}$  マウス及び  $TWEAK^{-/-}$  マウスに100,000のB16.F10細胞を皮下投与し、6週間にわたって腫瘍成長をモニターした。

【図6B】  $TWEAK^{+/-}$  マウス及び  $TWEAK^{-/-}$  マウスに100,000のB16.F10細胞を皮下投与し、6週間にわたって腫瘍発生頻度をモニターした。

【図6C】研究終了時に、投与したマウスから脾臓を採取し、示したリンパ球サブセット

10

20

30

40

50

について分析した。

【図 7 A】TWEAK 欠失は、B16.BL6 腫瘍成長を阻害して、抗腫瘍免疫応答の先天性から適応性のプライミングを促す。TWEAK<sup>+/+</sup>マウス及びTWEAK<sup>-/-</sup>マウスに500,000のB16.BL6細胞を皮下投与し、1か月の時点で腫瘍重量を決定した。(\*)は基礎サイトカイン統計的有意差( $p < 0.01$ )を意味する。

【図 7 B】TWEAK<sup>+/+</sup>マウス及びTWEAK<sup>-/-</sup>マウスに500,000のB16.BL6細胞を皮下投与し、1か月の時点で脾臓重量を測定した。(\*)は基礎サイトカイン統計的有意差( $p < 0.01$ )を意味する。

【図 7 C】腫瘍を有するマウスからの脾細胞を、様々な系統集団について染色して、FACSによって分析した。(\*)は基礎サイトカイン統計的有意差( $p < 0.01$ )を意味する。

10

【図 7 D】腫瘍を有するマウスから単離したNK細胞及びマクロファージを、サイトカイン産生について細胞内染色とFACSによって分析した。(\*)は基礎サイトカイン統計的有意差( $p < 0.01$ )を意味する、(\*\*)は腫瘍誘導性サイトカイン統計的有意差( $p < 0.01$ )を意味する。

【図 7 E】腫瘍を有するマウスからのCD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞を、IFN- $\gamma$ 産生について同様に分析した。(\*)は基礎サイトカイン統計的有意差( $p < 0.01$ )を意味する、(\*\*)は腫瘍誘導性サイトカイン統計的有意差( $p < 0.01$ )を意味する。

【図 8 A - C】TWEAK<sup>-/-</sup>マウスの特徴づけ。(図 8 A)マウスTWEAKゲノム遺伝子座の構成。ボックスは、TWEAK遺伝子(白色棒)、APRIL遺伝子(黒色棒)及びSMT3IP1遺伝子(灰色棒)を含有しているゲノム領域に対応する。3つの遺伝子の方位は矢印で示す。(図 8 B)TWEAK遺伝子のエクソン6と7のコード配列をneoカセットに置き換えるように設定したターゲティングコンストラクトの略図。(図 8 C)TWEAK遺伝子の変異した領域の構成。ES細胞のサザンプロット分析に用いる5'及び3'の外的プローブの位置をバーで示す。マウス尾部DNAの遺伝子型分析に用いるプライマー対の位置を、黒色の矢頭(外的)及び灰色の矢頭(内部)で示す。

20

【図 8 D】TWEAK遺伝子の組換えのサザンプロット分析。いくつかのES細胞クローンから得られるDNAのBsmI(DI)及びNarI(DII)消化の分析。DNAを消化して、0.7%アガロースゲルに分別し、ナイロンメンブレン上へ移し、5'(DI)及び3'(DII)プローブとハイブリダイズさせた。

30

【図 8 E】PCRによるTWEAK<sup>-/-</sup>マウスのジェノタイピング。尾部由来のゲノムDNAを、ネスト化した外部及び内部対のプローブを用いてPCR増幅して、野生型又は欠失変異体のTWEAK遺伝子をそれぞれ4.3kB又は5.3kB断片として可視化した。

【図 8 F】TWEAK<sup>+/+</sup>マウス及びTWEAK<sup>-/-</sup>マウス由来の総脾細胞におけるTWEAKの発現を、抗マウスTWEAKモノクローナル抗体(黒色の線と領域)又はアイソタイプコントロール(灰色の線と領域)を用いたFACSによって示す。

【図 8 G】TWEAK<sup>+/+</sup>マウス、TWEAK<sup>+/+</sup>マウス及びTWEAK<sup>-/-</sup>マウスの脾臓における、TWEAK(白色棒)、APRIL(黒色棒)及びSMT3IP1(灰色棒)のmRNA発現の定量的リアルタイムPCR分析。すべての値は、RPL19 RNA内部コントロールに正規化した。標準偏差は3回の反応結果から算出した。

40

【図 9】TWEAK<sup>-/-</sup>マウスはより大きな腫瘍リンパ球浸潤物を有する。1か月の時点でTWEAK<sup>+/+</sup>マウス及びTWEAK<sup>-/-</sup>マウスからB16.BL6腫瘍を採取し、分離し、RBCを溶解した。Fcブロッキングの後、分離した腫瘍細胞をリンパ球系統マーカーについて染色して、FACSによって分析した。黒色棒は、TWEAK<sup>+/+</sup>マウスの示した腫瘍リンパ球浸潤物を表し、白色棒は、TWEAK<sup>-/-</sup>マウスの示した腫瘍リンパ球浸潤物を表す。

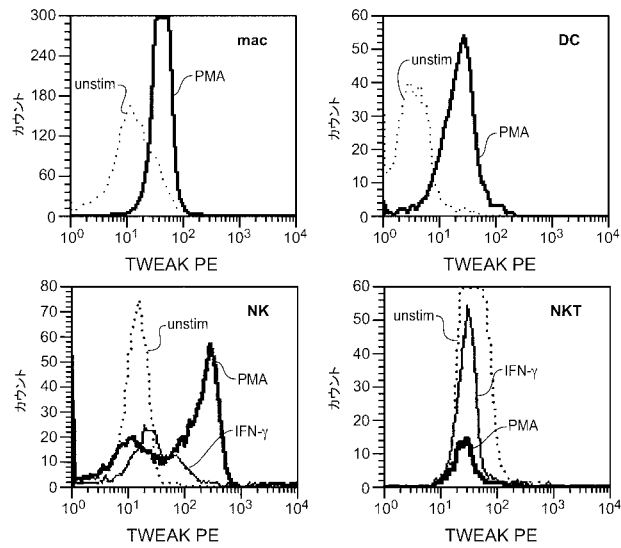
【図 10】2か月齢のTWEAK<sup>+/+</sup>マウス及びTWEAK<sup>-/-</sup>マウスの体重/臓器重量(グラム)を示す。\*示した臓器のIHC分析によって組織学的及び病学的な差異は観察されなかった。

50

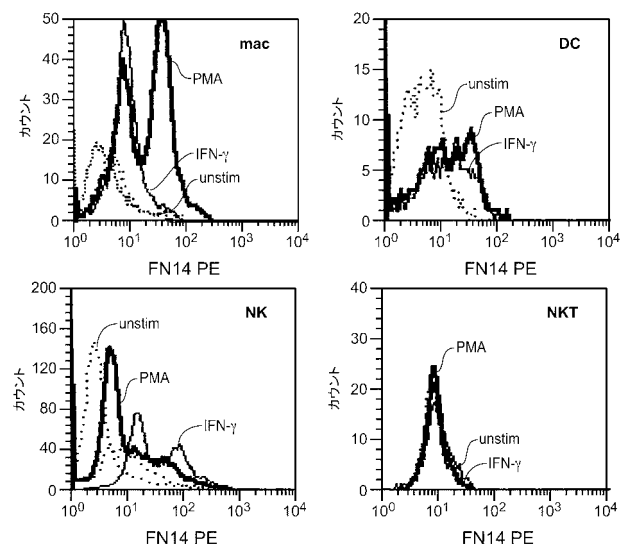
【図 1 1】ヒト T W E A K リガンドのアミノ酸配列 (配列番号 1)。

【図 1 2】ヒト F N 1 4 レセプターのアミノ酸配列 (配列番号 2)。

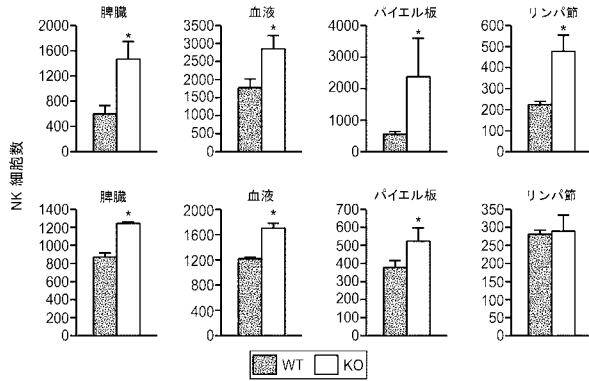
【図 1 A】



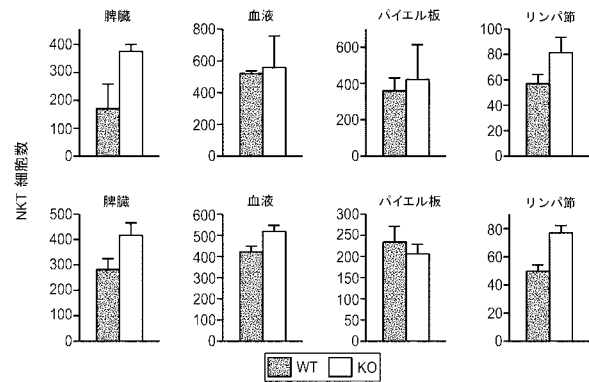
【図 1 B】



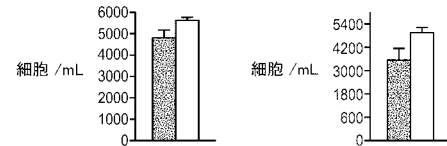
【図 2 A】



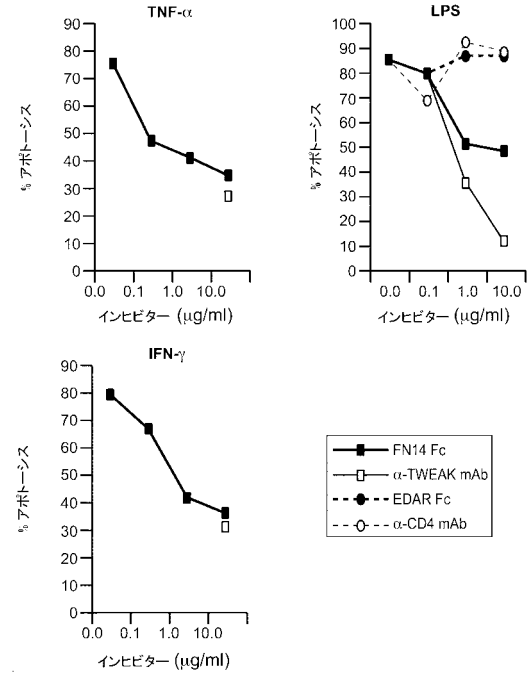
【図 2 B】



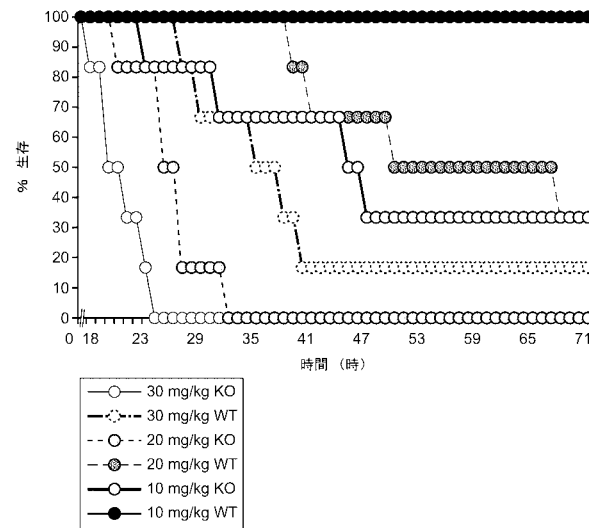
【図 2 C】



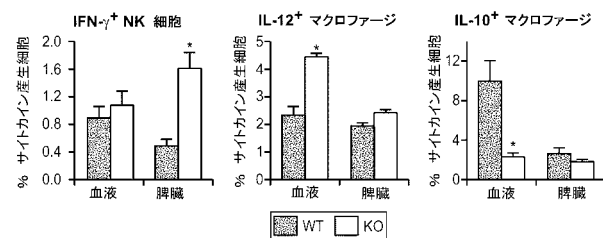
【図 2 D】



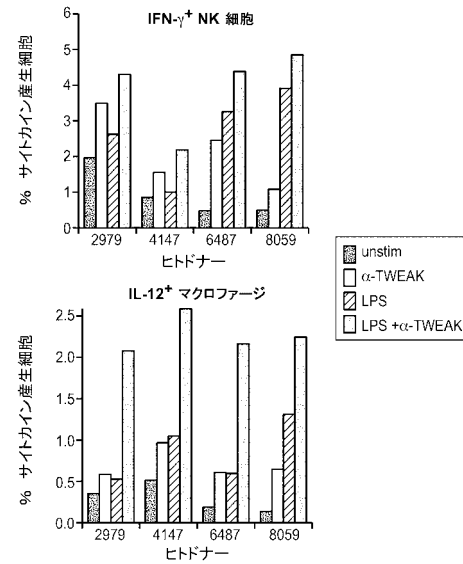
【図 3 A】



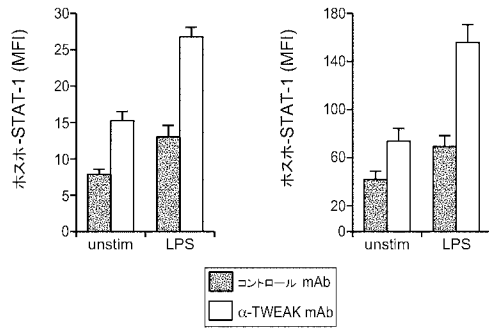
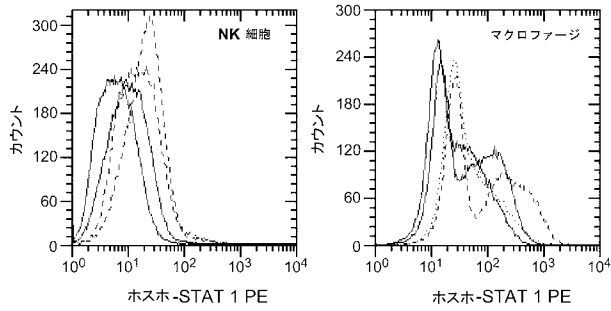
【図 3 B】



【図 3 C】



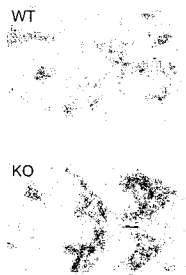
【図 4 A】



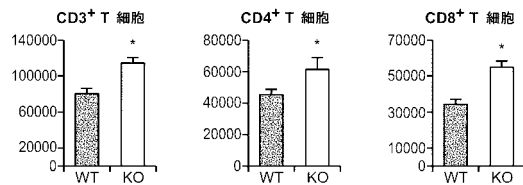
【図 4 B】



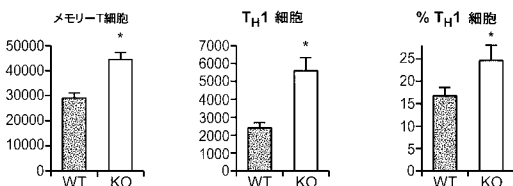
【図 5 C】



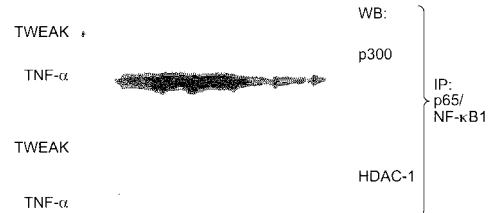
【図 5 D】



【図 5 E】



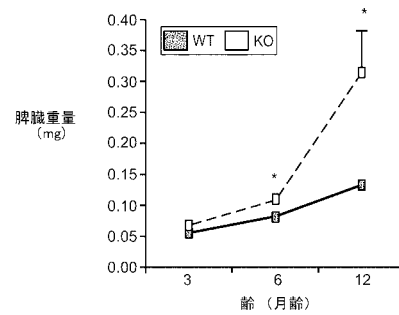
【図 4 C】



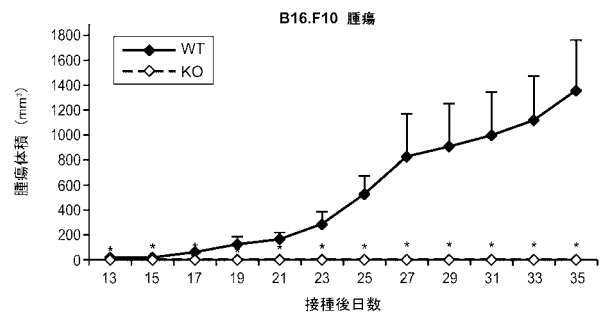
【図 5 A】



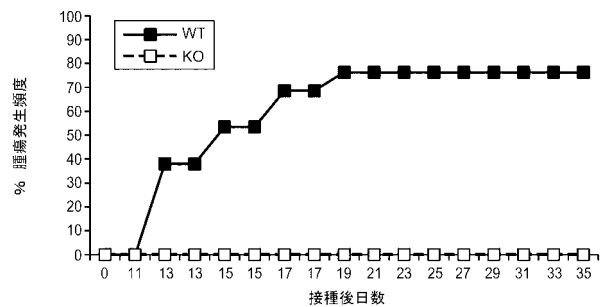
【図 5 B】



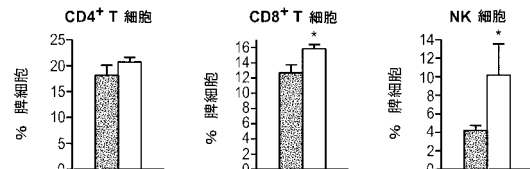
【図 6 A】



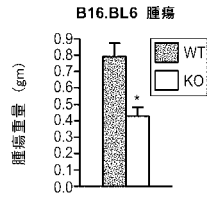
【図 6 B】



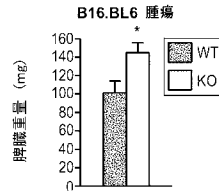
【図 6 C】



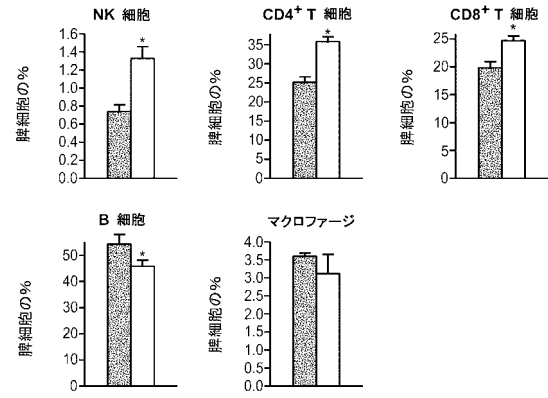
【図 7 A】



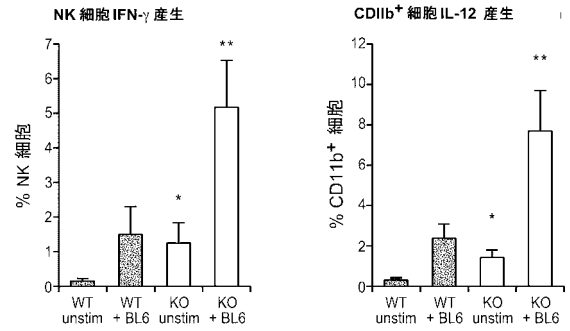
【図 7 B】



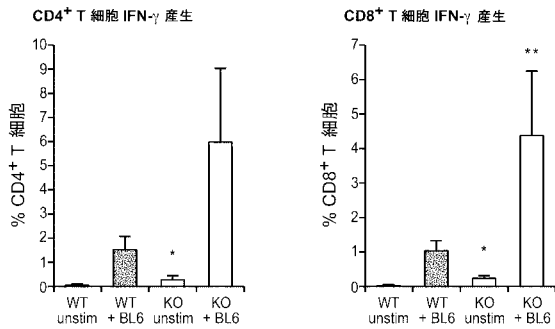
【図 7 C】



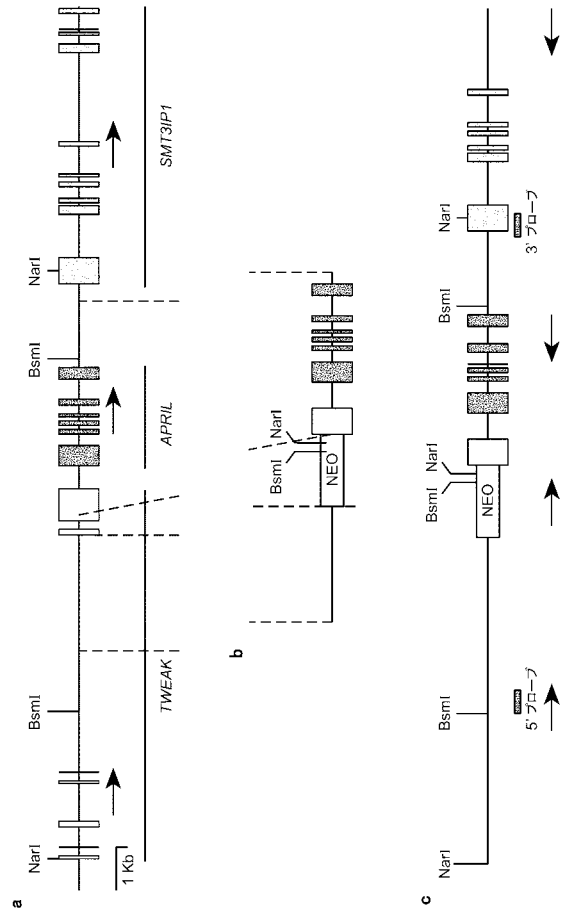
【図 7 D】



【図 7 E】



【図 8 A - C】







## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2006/007547													
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 A61K38/17 ADD. C07K16/28 C07K14/715													
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC													
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C07K													
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched													
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search													
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <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>X</td> <td>WO 01/53486 A (GENENTECH INC [US]; ASHKENAZI AVI J [US]; GODDARD AUDREY [US]; GODOWSK) 26 July 2001 (2001-07-26) page 2 - page 6; claims 31,33; figure 4; example 26; table 7; sequence 4 page 16, line 29 - line 30 page 182, line 10 - line 19 -----</td> <td>1,4,5,8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 6 207 642 B1 (WILEY STEVEN R [US]) 27 March 2001 (2001-03-27) column 8, line 31 - line 38 -----</td> <td>1,4,5,8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2002/015703 A1 (RENNERT PAUL [US]) 7 February 2002 (2002-02-07) cited in the application [0001], [0016], [0017]example 2 ----- -/--</td> <td>1,4,5,8</td> </tr> </tbody> </table>		Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 01/53486 A (GENENTECH INC [US]; ASHKENAZI AVI J [US]; GODDARD AUDREY [US]; GODOWSK) 26 July 2001 (2001-07-26) page 2 - page 6; claims 31,33; figure 4; example 26; table 7; sequence 4 page 16, line 29 - line 30 page 182, line 10 - line 19 -----	1,4,5,8	X	US 6 207 642 B1 (WILEY STEVEN R [US]) 27 March 2001 (2001-03-27) column 8, line 31 - line 38 -----	1,4,5,8	A	US 2002/015703 A1 (RENNERT PAUL [US]) 7 February 2002 (2002-02-07) cited in the application [0001], [0016], [0017]example 2 ----- -/--	1,4,5,8
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.											
X	WO 01/53486 A (GENENTECH INC [US]; ASHKENAZI AVI J [US]; GODDARD AUDREY [US]; GODOWSK) 26 July 2001 (2001-07-26) page 2 - page 6; claims 31,33; figure 4; example 26; table 7; sequence 4 page 16, line 29 - line 30 page 182, line 10 - line 19 -----	1,4,5,8											
X	US 6 207 642 B1 (WILEY STEVEN R [US]) 27 March 2001 (2001-03-27) column 8, line 31 - line 38 -----	1,4,5,8											
A	US 2002/015703 A1 (RENNERT PAUL [US]) 7 February 2002 (2002-02-07) cited in the application [0001], [0016], [0017]example 2 ----- -/--	1,4,5,8											
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.													
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "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  31 October 2006	Date of mailing of the international search report  13. 03. 2007												
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Luyten, Kattie												

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/US2006/007547
**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
 Although claims 1, 4, 5 and 8 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
 1, 4, 5 and 8 (all partially)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006/007547

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 4, 5 and 8 (all partially)

A method of treating cancer using an anti-TWEAK antibody  
---

2. claims: 1, 6, 7 and 8 (all partially)

A method of treating cancer using an anti-TWEAK receptor antibody  
---

3. claims: 1, 2, 3 and 8 (all partially)

A method of treating cancer using a TWEAK receptor immunoadhesin  
---

4. claims: 1, 4, 5 and 8 (all partially)

A method of treating cancer using an agent or molecule which blocks or interrupts intracellular signaling of TWEAK receptor  
---

5. claims: 9, 12 and 13 (all partially)

A method of enhancing NK cell activity using an anti-TWEAK antibody  
---

6. claims: 9, 14 and 15 (all partially)

A method of enhancing NK cell activity using an anti-TWEAK receptor antibody  
---

7. claims: 9-11 (all partially)

A method of enhancing NK cell activity using a TWEAK receptor immunoadhesin  
---

8. claims: 9, 12 and 13

A method of enhancing NK cell activity using an agent or molecule which blocks or interrupts intracellular signaling of TWEAK receptor  
---

9. claims: 16, 19 and 20 (all partially)

International Application No. PCT/US2006/007547

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A method of enhancing innate TH1 responses using an anti-TWEAK antibody  
---

10. claims: 16, 21 and 22 (all partially)

A method of enhancing innate TH1 responses using an anti-TWEAK receptor antibody  
---

11. claims: 16, 17 and 18 (all partially)

A method of enhancing innate TH1 responses using a TWEAK receptor immunoadhesin  
---

12. claims: 16, 19 and 20 (all partially)

A method of enhancing innate TH1 responses using an agent or molecule which blocks or interrupts intracellular signaling of TWEAK receptor  
---

13. claims: 23, 26, 27 and 30 (all partially)

A method of treating a TH2 mediated disorder using an anti-TWEAK antibody  
---

14. claims: 23 and 28-35 (all partially)

A method of treating an immune-related disorder using an anti-TWEAK receptor antibody  
---

15. claims: 23-25 and 30 (all partially)

A method of treating a TH2 mediated disorder using a TWEAK receptor immunoadhesin  
---

16. claims: 23, 26, 27 and 30 (all partially)

A method of treating a TH2 mediated disorder using an agent or molecule which blocks or interrupts intracellular signaling of TWEAK receptor  
---

17. claims: 31, 34 and 35 (all partially)

A method of treating an immune-related disorder using a TWEAK polypeptide or TWEAK polypeptide variant  
---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/007547

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	KADUKA Y ET AL: "TWEAK mediates anti-tumor effect of tumor-infiltrating macrophage" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 331, no. 2, 3 June 2005 (2005-06-03), pages 384-390, XP004867567 ISSN: 0006-291X the whole document -----	1,4,5,8
P,X	MAECKER HEATHER ET AL: "TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity" CELL, vol. 123, no. 5, December 2005 (2005-12), pages 931-944, XP002403317 ISSN: 0092-8674 the whole document -----	1,4,5,8
E	WO 2006/052926 A2 (UNIV MARYLAND [US]; WINKLES JEFFREY A [US]; YEPES MANUEL S [US]) 18 May 2006 (2006-05-18) [0018], [0019] -----	1,4,5,8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/007547

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0153486	A	26-07-2001	AT 348108 T	15-01-2007
			AU 756400 B2	09-01-2003
			AU 2879400 A	31-07-2001
			JP 2004201652 A	22-07-2004
			JP 2004201653 A	22-07-2004
			JP 2004201654 A	22-07-2004
-----				
US 6207642	B1	27-03-2001	CA 2280231 A1	13-08-1998
			EP 0977887 A2	09-02-2000
			JP 2001513626 T	04-09-2001
			WO 9835061 A2	13-08-1998
-----				
US 2002015703	A1	07-02-2002	US 2005008636 A1	13-01-2005
-----				
WO 2006052926	A2	18-05-2006	NONE	
-----				

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b> 37/08
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b> 37/02
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b> 1/04
<b>A 6 1 P</b>	<b>25/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b> 1/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>19/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b> 25/00
<b>C 0 7 K</b>	<b>14/705</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b> 19/02
<b>C 0 7 K</b>	<b>16/28</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b> 14/705 Z N A
<b>C 0 7 K</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b> 16/28
			<b>C 0 7 K</b> 19/00

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

(72)発明者 メッカー , ヘザー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 3 , パロ アルト , ロマ ヴェルデ アヴェニュー  
ー 7 3 3 シー

F ターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZA01 ZA59 ZA66 ZA68 ZA96 ZB07 ZB13 ZB26  
4C085 AA13 AA14 AA16 BB42 EE01 GG04  
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40 DA51 DA75 EA20 EA50