

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4898049号  
(P4898049)

(45) 発行日 平成24年3月14日 (2012.3.14)

(24) 登録日 平成24年1月6日 (2012.1.6)

(51) Int. Cl.

F 1

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

C O 7 K 14/525 (2006.01)

C O 7 K 14/525

C O 7 K 17/10 (2006.01)

C O 7 K 17/10

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

請求項の数 27 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-552725 (P2001-552725)  
 (86) (22) 出願日 平成13年1月24日 (2001.1.24)  
 (65) 公表番号 特表2003-520214 (P2003-520214A)  
 (43) 公表日 平成15年7月2日 (2003.7.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/002256  
 (87) 国際公開番号 W02001/052664  
 (87) 国際公開日 平成13年7月26日 (2001.7.26)  
 審査請求日 平成20年1月23日 (2008.1.23)  
 (31) 優先権主張番号 60/178,038  
 (32) 優先日 平成12年1月24日 (2000.1.24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/215,580  
 (32) 優先日 平成12年6月30日 (2000.6.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501322302  
 ユニバーシティ オブ ルイビル リサー  
 チ ファウンデーション, インコーポレイ  
 ティド  
 アメリカ合衆国, ケンタッキー 4029  
 2, ルイビル, ジュエット ホール, ユニ  
 バーシティ オブ ルイビル  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100092624  
 弁理士 鶴田 準一  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100082898  
 弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デスレセプター誘導アポトーシスによる免疫調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) アポトーシス誘導分子、及び(ii) アビジン、及びストレプトアビジンから成る群から選択される結合対のメンバーを含んで成るキメラタンパク質であって、ここで、該アポトーシス誘導分子は、デスレセプターを発現する選択細胞に結合することができ、Fas L、TNF、TWEAK及びTRAILから成る群から選択されるキメラタンパク質。

【請求項 2】

キメラタンパク質が 4 量体を形成する、請求項 1 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 3】

デスレセプターを発現する選択細胞が活性化リンパ球である、請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 4】

デスレセプターを発現する選択細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、当該細胞を有効量の請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質に生体外で暴露させることを含んで成る前記方法。

【請求項 5】

前記選択細胞が活性化リンパ球である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

デスレセプターを発現するヒト以外の哺乳動物の選択細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、当該細胞を有効量の請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質にイン

10

20

ピボで暴露させることを含んで成る前記方法。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質を含んで成る、活性化リンパ球のアポトーシスによって緩和される症状を持つ哺乳動物において免疫調節を誘導するための医薬組成物。

【請求項 8】

前記症状が喘息、アレルギー、食中毒、自己免疫症状および同種もしくは異種の細胞片、臓器片又は組織片の移植から成る群から選択される、請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記症状が糖尿病、多発性硬化症、エリテマトーデス、類肉腫症および関節リュウマチから成る群から選択される請求項 7 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 10】

請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質で修飾されたビオチン化細胞を含むエフェクター細胞。

【請求項 11】

前記選択細胞を請求項 10 に記載のエフェクター細胞に暴露する、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質に結合したビオチン化固体マトリックスを含んで成る基材。

20

【請求項 13】

前記固体マトリックスはアガロースビーズである請求項 12 に記載の基材。

【請求項 14】

(a) ヒト以外の哺乳動物からのリンパ球の除去；  
(b) 当該リンパ球の、請求項 10 に記載のエフェクター細胞又は請求項 12 に記載の基材への暴露；および  
(c) 当該ヒト以外の哺乳動物へのリンパ球の戻し；  
を含んで成るヒト以外の哺乳動物における免疫寛容の誘導方法。

【請求項 15】

結合対のメンバーがデスレセプターを発現する細胞に結合する、請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質。

30

【請求項 16】

デスレセプターを発現する選択細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、当該細胞を有効量の請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質と生体外で接触させることを含んで成る、前記方法。

【請求項 17】

デスレセプターを発現するヒト以外の哺乳動物の選択細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、当該細胞を有効量の請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質とインピボで接触させることを含んで成る、前記方法。

【請求項 18】

40

結合対のメンバーがストレプトアビジンである、請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 19】

ストレプトアビジンがコアストレプトアビジンである、請求項 18 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 20】

アポトーシス誘導分子がFasLである、請求項 1 又は 2 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 21】

FasLがmFasLである、請求項 20 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 22】

50

前記細胞が脾臓細胞である、請求項 10 に記載のエフェクター細胞。

【請求項 23】

請求項 10 に記載のエフェクター細胞を含む医薬組成物。

【請求項 24】

同種抗原をさらに含む、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記同種抗原が、脾小島細胞、組織、又は器官である、請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記エフェクター細胞が骨髄細胞である、請求項 23 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 27】

前記細胞が組織又は器官の一部である、請求項 26 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は選択細胞におけるアポトーシス誘導による免疫系を調節するための方法に関連する。

【0002】

発明の背景

免疫系は、病原性微生物に満ちた環境において、脊椎動物の生存のために重要である。先天性の遺伝子欠損、化学療法剤への暴露を通じ、またはヒト免疫不全ウイルス(HIV)のようなウイルスによる感染を通じ、免疫応答を欠く個体は健全な免疫系を有する個体が容易に生き延びるであろう感染により死ぬ。しかしながら、免疫系は常に生物に利益をもたらすわけでない。その調整不能は、自己免疫及び腫瘍等の、様々な病原状態に導く。免疫系は外来移植片、例えば他の個体から得た細胞、組織又は器官を含んで成るものの移植、即ち、様々な病原性疾患、例えば、自己免疫疾患を処置することができ、終末疾患における不良器官を置換することができ、また骨髄移植を介して様々な造血障害を処置することができる工程である移植の障害としても働く。これらの用途は、免疫系の抑制または、自己免疫の場合の自己抗原や移植の場合の外来抗原に対して反応しないようにする免疫系の“教育”の両方を要する。

20

【0003】

現在では、自己免疫および移植分野における大部分の治療方法は主として、免疫抑制薬の慢性的な利用を介する免疫系の抑制を頼りとする。これらの薬は、自己免疫および拒絶現象の症度の軽減において効果的であるが、それらは非特異的でありかつ恒常的な抗原特異的寛容状態を作り出すことができない。それらの持続的使用はそれゆえに、当該病原性反応を調節下に維持することが要求される。しかしながら、これら免疫抑制剤への個体の持続的暴露は、日和見感染および悪性腫瘍の危険性の著しい増加に結びつく。更に、これら非特異的免疫抑制剤は、その宿主において、重篤かつ所望されない薬理学的副作用を誘導する。それゆえ、自己免疫の治療および移植寛容の誘導のため、免疫系に注目の選択抗原に対する寛容を“教える”ことができることが非常に望ましい。免疫反応を制御するために更に選択的かつ持続する方法を開発させる必要性が残る。

30

【0004】

発明の概要

本発明は、選択細胞におけるアポトーシスを誘導するための構築体及び方法を提供する。選択細胞に結合可能な結合対の一つと融合したアポトーシス誘導タンパク質を含んで成るキメラタンパク質の構造は教示される。当該結合対は、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、細胞表層タンパク質/当該細胞表層タンパク質に対する抗体、又は細胞表層タンパク質/かかる抗体の断片、例えばFabまたはHvLvであってよい。好ましくは、当該結合対はビオチン/ストレプトアビジンである。エフェクター細胞をビオチンに暴露し、有効な量の当該キメラタンパクで修飾し、そして殺すべき細胞を前記エフェクター細胞

40

50

に暴露させることによりエフェクター細胞を構築する方法が供される。当該アポトーシスを誘導する方法はin vivoまたはex vivoにおいて実施して良い。当該方法がex vivo時は、ビオチン化固体マトリクスに当該キメラタンパクを結合させることが好適である。当該好適な固体マトリクスはビオチンアガロースビーズである。

#### 【0005】

##### 発明の詳細な説明

免疫調節の重要な側面は、自己免疫の治療および外来移植拒絶反応の予防のため自己抗原および外来移植抗原に対して、寛容を誘導することである。外来移植片拒絶および自己免疫はどちらもそれぞれ、移植片上の外来組織適合性抗原に、および宿主の自己抗原にT細胞が応答することによって、免疫学的現象を主として誘発される。この応答はT細胞レセプター(TCRs)をクローン的に発現する細胞の活性化につながる。活性化T細胞はそして分化、増殖し、様々なサイトカインを合成し、それは反応を延長させ増強する。先天性の免疫欠損もしくは実験的操作のどちらかのために、T細胞が欠損している実験動物は、自己免疫を発達せず、無期限に渡り著しい組織適合相違を示す同種移植片を受け入れる。T細胞の活性化は明らかな2つの異なるシグナルに依存する。シグナル1および2である。シグナル1は、TCRとMHC/ペプチド複合体との相互作用を介して変換され、および、抗原特異的である一方、シグナル2は抗原非特異的において抗原提示細胞(APCs)によって供される。シグナル2不在におけるシグナル1の変換は、ナイーブT細胞の機能的サイレンシング(アネルギー)または物理的除去(アポトーシス)をもたらす。活性化により、T細胞は1200倍迄のクローン的な増殖を可能にする抗原由来の増殖状態に入る。当該活性化T細胞の95%超がアポトーシス(プログラムされた細胞死)に入り、一方残っている細胞は系内の抗原の量の減少に従い記憶細胞へと分化する死の時間が引き続いて起きる。

#### 【0006】

アポトーシスは多細胞器官の発達と恒常性の両方において中心的役割を果たす。腫瘍壊死因子(TNF)レセプター/リガンドスーパーファミリーに属しているいくつかの「デスレセプター」およびそれらのリガンド間の多数の反応からなる、最終エフェクター機構へと集中する多数の独立のシグナリング経路によってアポトーシスは誘導できる。最も良く特性決定されたデスレセプターはCD95(“Fas”), TNFR1(p55)、デスレセプター3(DR3またはApo3/TRAM2)、DR4及びDR5(apo2-TRAIL-R2)である。アポトーシスの最終エフェクター機構はカスパーゼと命名された一連のタンパク分解酵素の活性化である。これらカスパーゼの活性化は、一連の生きた細胞タンパク質の分裂と細胞の死をもたらす。我々の同時係属中の2000年12月18日提出の国際特許出願、PCT/US00/34554は、その教示内容は引用することで本明細書に組み入れる、カスパーゼはアポトーシスを誘導する有効な手段として開示する。

#### 【0007】

現在では、Fas-/FasL-誘導アポトーシスは、例えば、中枢神経系や精巣および眼球といった免疫学的恩恵を受ける部位の免疫攻撃からの保護において、中心的な役割を果たしていることが発見されている。例えば、これらの部位に移植された同種及び異種組織は拒絶に抵抗する。アポトーシスの当該主要な役割の重要性は、活性誘導化細胞死(AICD)経由の免疫システムにおけるホメオスタシスの維持にある。AICDは主に、Fas/FasL相互作用により変換されるアポトーシスシグナルによって仲介される。Fas I型は45kDaであり、システインリッチな細胞外ドメインからなる細胞表面タンパク質であり、デスシグナルを変換する。FasはFasL、およそ40kDaのII型膜タンパクとの相互作用によってエフェクター機能を仲介する。T細胞は体内において、活性化によりFasLを発現する一次細胞型である。この分子の発現は活性化T細胞をアポトーシスに対して感受性とする。抗原による繰り返し刺激で、活性化T細胞はFasおよびFasL双方の細胞表面での発現をアップレギュレーションさせ、オートクリンアポトーシスに敏感になり、そこでFasは同じ細胞上で処理されるFasLと結合する。アポトーシスはまた、活性化T細胞のFasが他の細胞上で発現したFasLと相互作用する、パラクリン型においても誘導される。これらアポトーシスT細胞死の2つの様式は抗原活性型T細胞クローンのサイズをコントロールし、免疫恒常性を維持する。B細胞を含

む全てのリンパ球および樹状細胞はFasL-制御免疫恒常性に委ねられうる。AICDの調節不能は変性及び自己免疫疾患を含む、一連の病理生理学的状態に関与する。例えば、ヒトにおける自己免疫リンパ球増加現象(ALPS)はリンパ球恒常性先天性疾患および不完全アポトーシスである。FasレセプターまたはFasLにおけるI型およびII型のALPS欠損はどちらにおいても、これら病原性疾患の原因である。同様にはlprおよびgldマウスにおいて、Fas及びFasLの発現欠如又は低レベルの原因となっている先天性突然変異は、それぞれ、重篤なリンパ球増殖型および自己免疫型疾患と関連する。これらのマウスはまた、細胞の抗原誘導型末梢クローン欠失を欠いている。lpr/lprマウスにおけるFasのトランスジェニック発現は、自己免疫の改善およびT細胞のAICD誘導化クローン欠失の回復をもたらし、自己抗原に対する抹消寛容におけるFas/FasL仲介型アポトーシスの重要性の直接的証拠を与える。FasLがAICDにおいて働く重要な役割および末梢寛容におけるAICDの当該重要性は、当該デスリガンドを自己免疫の治療及び外来移植片拒絶の予防のための自己および外来抗原の両方に対する寛容性を誘導する免疫調節因子として使用するため本特許出願の基礎を成す。

10

#### 【0008】

デスレセプター/リガンド誘導型アポトーシスの分子機構は、かなり詳細な点において明らかにされてきた。例えば、Fas/FasL仲介型アポトーシスはC末端デスドメイン(DDs)經由のFasレセプターのトリメリゼーション誘導する3つのFasL分子の結合によって誘導されるDDsは、アダプタータンパクであるFADD(デスドメインFas結合タンパク)およびカスパーゼ8(図1)を補充する。この3分子複合体Fas/FAIDD/カスパーゼ-8の当該オリゴマー化は酵素前駆体カスパーゼ-8の活性化カスパーゼ-8に至るタンパク質分解裂をもたらし、カスパーゼ-3を含む、タンパク質分解を介するその他の下流カスパーゼの活性化によりアポトーシスプロセスを開始させる。デスリガンドは概して、3量体またはより高次元な構築体を形成に入ったときアポトーシス様である。単量体の場合に、それらはデスレセプターに結合するため当該3量体と競い合うことによって抗アポトーシス剤として働く。

20

#### 【0009】

本発明は、安定な4量体からなるデスリガンドの作り方、およびカウンターデスレセプターを発現するリンパ球においてアポトーシスを誘導するため精製タンパクとして、又はAPCの表面上で暴露させてこのようなリガンドをどのようにして導入するかを開示する。我々は、同様の生物学的システムからの有効なデータに基づき、デスリガンドは3量体又はより高次元な構造のときにアポトーシス誘導において、更に効果的である仮説を立てた。3量体およびより高次元な構造の形成に関する好適な実施態様は、ストレプトアビジンまたはアビジンであり、どちらもの形態も生理学的条件の下4量体およびより高次元な構造を形成する。ストレプトアビジンの修飾形態が本特許出願において、好適な分子として選択されて、本文書を通してCSAとして言及される。

30

#### 【0010】

活性化T細胞のアポトーシスは、骨髄および他の器官移植等、同種移植片や異種移植片に対する寛容をもたらす。活性化T細胞の除去はまた、アレルギーや他の免疫誘導疾患の兆候を和らげる。後者には多硬性硬化症、エリテマトーデス、類肉腫症、糖尿病およびリュウマトイド関節炎のような自己免疫疾患が挙げられる。腫瘍等、多くの疾患は、当該疾患の持続性を導くリンパ球の機能に従属する。もし、免疫応答が外来幹細胞に対する寛容を誘導するために調節できれば、多くの血液学的疾患は骨髄幹細胞移植で治療できる。とりわけこれら疾患には白血病、リンパ腫、萎縮性貧血、鎌形赤血球およびクーレーの貧血等が挙げられる。これら全ての疾患は持続的もしくは一時的に、T細胞等、活性化免疫細胞のアポトーシスによりコントロールされうる。

40

#### 【0011】

本発明は、アポトーシス誘導分子に作用可能式に連結する4量体形成分子の機能的部分をコードしているキメラcDNAの構築を含んでなる、寛容の誘導のための戦略を開示する。表1は提案した構築の概要である。構築の選択は、適応性免疫を刺激する外来性抗原の性質、軽減の欲求が一時的であるかもしくは持続的か、死滅の傾倒が所望されているかまたは

50

さらに下流のアポトーシス制御が好適か、というようなファクターに基づきうる。列挙された前記構築物は本発明の代表的なものに過ぎず、限定ではないとして解される。過度な実験を要せずに、当業者は容易に、FasL、TNF、TRAIL2(Apo2リガンド)およびTWEAK(Apo3リガンド)等の、4量体形成分子に作用可能式に連結した任意のデスリガンドにより構築体を作ることができる。当業者は多くの製薬の試薬がアポトーシスを高めることを知っている。これらの試薬の中ではビス-インドールマレイミド-8およびクアベインがある。もし所望されれば、これらの試薬は本発明のキメラタンパク質との結合において使用してよい。

【表 1】

表 1

構築物	挿入物	作製	機能	用途
rsFasL	ラットFasLの可溶性細胞外部	+	抗アポトーシス	神経変性疾患の治療および肝臓再生の促進
mFasL	細胞表層上で安定発現するために修飾されたRat FasL	+	アポトーシス	同種、異種および骨髄移植に対する寛容、自己免疫疾患、アレルギー、喘息、敗血ショックおよび他の免疫誘導型疾患や腫瘍等のリンパ球特異的疾患の治療ならびに肝臓再生の促進
wtFasL	ラット野性型分子		化学走性抗アポトーシス	神経変性疾患の治療および肝臓再生の促進
CSA-FasL	コアストレプトアビジンを持つFasLキメラタンパク質のラット細胞外部分	+	アポトーシス	同種、異種および骨髄移植に対する寛容、自己免疫疾患、アレルギー、喘息、敗血ショックおよび他の免疫誘導型疾患や腫瘍等のリンパ球特異的疾患の治療ならびに肝臓再生の促進
CSA-hFasL	コアストレプトアビジンを持つFasLキメラタンパク質のヒト細胞外部分	+	アポトーシス	環状動脈バイパス手術および血管形成後の早期再閉塞予防
CSA-TNF $\alpha$	コアストレプトアビジンを持つTNFキメラタンパク質のヒト細胞外部分	TNF $\alpha$ cDNA クローン	アポトーシス	
CSA-TWEAK	コアストレプトアビジンを持つTWEAKキメラタンパク質のヒト細胞外部分	—	アポトーシス	
CSA-TRAIL	コアストレプトアビジンを持つTRAILキメラタンパク質のヒト細胞外部分	—	アポトーシス	

【0012】

アポトーシスを誘導するために必要な投薬量は、アポトーシス試薬の親和性および特異性

に依存する。細胞あたり10～100分子の好適な態様、CSA/FasLがアポトーシス効果にとって十分であり、他方、1,000から10,000分子の弱い活性の構築体が必要でありうる。当該アポトーシス試薬の選択は所望の活性に依存する。

【0013】

DNA構築体によりコードされたキメラタンパク質の生産のために好適な生産細胞は、商業的に入手できるショウジョウバエ(*Drosophila*)系である。しかしながら、キメラタンパク質生産における当業者は、他の多くの発現系及びベクターは本発明の当該キメラタンパク質生産に適していることを認識するであろう。これら他の系の例は大腸菌(*Escherichia coli*)、酵母および哺乳類細胞培養物である。

【0014】

本明細書に記載されている実験手順は、免疫システムを制御するための方法および組成の代表的なものである。これらの例は、カウンターデスレセプターを発現している病原性免疫細胞を取り除くための好適な態様の適応によって、自己免疫、アレルギーおよび喘息の場合の自己抗原、並びに同種及び異種移植片の場合における外来抗原に対する寛容を誘導するために設計された。さらに、最小限のアポトーシス活性が無いまたは最小限であるモノマーとしてのデスリガンドの可溶性形態は、神経変性疾患におけるアポトーシスを妨害するため及び肝臓再生の促進のために使用される。最も好適な実施態様はキメラタンパク質、CSA-FasL、CSA-TNF、CSA-TRAILおよびCSA-TWEAKであり、これらはストレプトアビジンタンパク質をコードするDNAと、上記デスリガンドをコードするDNAの融合および適切な生産細胞における当該キメラタンパク質の発現によって生産されたものである。次いでこれらの分子は、精製され、精製タンパクとして使用されるか、又は対応のデスレセプターを発現している免疫細胞において、アポトーシスを誘導するため細胞もしくは器官を修飾するのに使用される。例えば、注目の細胞はex vivo又はin vivoで最初ビオチン化され、そしてCSAデスリガンドは標的リンパ球のアポトーシスのため、前記分子が当該細胞表面へ付着するために投与され、例えば、もたらしめていることは、自己免疫および外来移植拒絶の予防に関する抗原特異的寛容の誘導である。代わりに、精製キメラタンパク質はex vivoまたはin vivoで適用されてよく、抗原特異的病原性リンパ球の持続的除去および疾患症状の改善に導いている。FasLの可溶性形態および細胞外ドメインから成る別のデスリガンドは、病原性機構である調整不能なアポトーシスにおける神経変性疾患の治療のために、ニューロンにおけるアポトーシスを妨げる抗アポトーシス機能をもつ精製タンパクとして使用される。前記キメラである本分子はまた、肝臓の再生のために用いられる。これら全てのタンパクはまた、活性型リンパ球が主な役割を果たす、敗血ショック、アレルギー、喘息、並びに、食中毒を防ぐことに使用できる。

【0015】

実施例1 . FasLの野生型のクローニングおよびその膜結合型の作製、哺乳動物細胞における発現並びにアポトーシス機能の試験

完全なFasL cDNAはConA-活性化ラットT細胞又はヒト末梢血球細胞から、RT-PCRにおける当該FasL mRNAの最端5'-および3'非翻訳領域に特異性を持つプライマーを用いてクローニングされた。増幅産物はそしてTAクローニングベクターにクローニングされ、いくつかの機能的なcDNAクローンがシーケンス解析で決定された。機能的cDNAクローンはそしてpcDNA3真核系発現ベクター(pcDNA3)にサブクローニングされ、センスおよびアンチセンス方向の双方においてcDNAを包含するリコンビナントクローンは制限部位解析によって決定された。図2に示すのはゲル電気泳動によって示されるような異なった細胞型におけるFasLの発現である。全RNAはナイーブ脾臓細胞(カラム2)；C58細胞(カラム3)、内皮細胞(カラム4)およびConA活性化脾臓細胞(カラム4)から単離された。PCR鑄型(カラム1)はネガティブコントロールとして示される。

【0016】

FasLはII型膜タンパク質として合成されるが、それはまた溶解性タンパクとして、環境中に分泌される。可溶性形態は、マトリクスメタロプロテイナーゼによって細胞表面におけるその発現後数分以内に前記膜分子から発生する。FasLはまた、合成され、様々な刺激に

10

20

30

40

50

応答して、選択細胞型における環境に排出される微細小胞中の膜タンパク質として蓄えられる。FasLのこれら3つの異種形態-膜可溶性および小胞-は、アポトーシスおよび免疫制御に関して、それらの機能において違いうる。アポトーシスは主にFasLの小胞および膜形態によって仲介されるのに対して、当該可溶性形態はアポトーシスの仲介において役に立たず、実際は、FasLに対し膜形態と競うことにより抗アポトーシス因子として働く。更に、可溶性FasLは好中球のための化学走性因子として働く一方で、膜および小胞型FasLはこの機能を欠く。それゆえ、可溶性FasLは、I) 移植片反応性T細胞のアポトーシスを妨げるため抗アポトーシス分子として勤めること、II) 当該移植片内への好中球浸潤のための化学走性因子として勤めること、によって移植片拒絶に寄与しうる。それゆえ、FasLを寛容原分子として使用するためFasLの抗アポトーシス及び化学走性機能を、アポトーシス機能から分けることは重要である。

10

#### 【0017】

我々は、細胞表層上で安定して発現されているラットFasLを、推定メタロプロテナーゼ部位を除去することによって発現させた。FasLに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーは、メタロプロテナーゼ部位であると考えられた12アミノ酸残基をコードするヌクレオチドを削除するために、PCRによってデザインされた(図3)。修飾(mFasL)および野生型(wtFasL)のためのDNAクローンは、そしてラット内皮細胞PVG.1UおよびサルCos1細胞へと、発現のためにトランスフェクションされた。安定なトランスフェクション体はG418を使用することで選択され、RT-PCRおよびフローサイトメトリーを使用することで、FasL分子の発現が解析された。RT-PCR解析は、非トランスフェクション細胞においてでないがトランスフェクション細胞においてFasLの高レベルの発現を明らかにした。Cos細胞はwtFasLおよびmFasLで一時的にトランスフェクションされた。全RNAはトランスフェクション後3日後に調製され、FasL特異的プライマーでのRT-PCRに用いられた。PCR産物はXho I 酵素により消化された。最も重要なことには、当該PCR産物の、前記修飾形体のためcDNAへ操作されたXho I 酵素による制限消化は、wtFasLではないがmFasLをトランスフェクションした細胞において2つのバンドをもたらし、当該修飾を確認づけた。タンパク質レベルのFasLの発現はPEラベル化FasLmAb MFL4をフローサイトメトリーにおいて使うことで確かめられた。

20

#### 【0018】

我々は、トランスフェクションCOSおよび内皮細胞表層上で、野生型FasLと比較して、修飾FasLのより高いレベルの発現を得た(4つの個別実験の代表的なものが図4である)。COS細胞は一時的にwtFasL、mFasLおよび緑色蛍光タンパク質(GFP)と共トランスフェクションさせた。細胞はPEラベル化MLF4mAbおよびGFPを用いることでFasLの発現を解析された。GFPはトランスフェクションの効率性のアクセスのための内部コントロールとして用いられた。

30

#### 【0019】

mFasLを発現するトランスフェクション体は、wtFasLを発現するトランスフェクション体に比べ、アポトーシス感受性ヒトジャーカット細胞における、アポトーシス誘導においてよりはるかに一層効果的である(図5)。COS細胞を一時的にwtFasLおよびmFasLでトランスフェクションした。トランスフェクション3日後、トランスフェクション体をジャーカット細胞と一夜共インキュベートし、アポトーシスをフローサイトメトリーにおいてPIを用いることで決定した。非トランスフェクション(ジャーカット)および緑色蛍光タンパク質(GFP)トランスフェクション細胞はネガティブコントロールを担う。死滅細胞の割合はヒストグラフの上段に示されている。データは独立した4実験の最小値の代表的なものである。特異的発現は3.2%から15.4%に増加、特異的アポトーシスは6.5%から23.8%に増えた。

40

#### 【0020】

実施例2. キメラコラストレプトアビジンおよびFasL(CSA-FasL)の構築、その発現並びに機能

我々は次に、図6において概略化されている模式図を使用し、推定メタロプロテナーゼ部位を欠くFasLの細胞外領域とインフレーションにおいて結合したストレプトアビジン(CSA)を

50



コードする構築体を製作した。ゲノムDNAをストレプトマイセスアビジニイ (*Streptomyces avidinii*) (ATGC Cat.#27419) から単離し、そしてこのDNAの0.2gを、PCRにおいてコアストレプトアビジンの5'末端(CSA-1)および3'末端(CSA-2)に特異的であるプライマーを使う増幅のための鋳型として使用した。当該5'プライマーは、分泌タンパク質としての発現およびNIアフィニティークラムを用いた精製のため、ショウジョウバエ分泌シグナル(BiP)とのインフレーションにおいてのクローニングを可能にするためBglIIおよび6ヒスチジン残基のための配列を含む。PCR産物をTAクローニングベクターへクローン化し、いくつかのポジティブクローンをPCRによる一次スクリーニングで同定し、そして制限酵素で消化した。我々は次に、メタロプロテナーゼ部位を持たない当該FasLの細胞外ドメインを、PCRにおいて、野生型FasL cDNAクローンを鋳型として、および細胞外領域の5'末端に対するセンスプライマー、EcoRI部位を含むFasL6、並びにFasLの3'末端非翻訳領域に対するアンチセンスプライマー、CSAとインフレーションになっているEcoRI部位を含んでいるFasL2を使用してサブクローニングした。PCR産物はそしてTAクローニングベクターへクローン化され、いくつかのポジティブクローンは制限消化で同定された。そしてコアストレプトアビジンおよび細胞外FasLのクローンはどちらも、シーケンシングされ、そして正確な配列を有するDNA挿入片は、CSAについてはBglII-EcoRIでそして細胞外FasLについてはEcoRIによるTAクローニングベクターの消化により除去した。これらDNA挿入片は次にBglII-EcoRI切断pMT/Bip/V5-ヒスチジンベクターへDESシステム(Invitrogen)を用いる発現のためにサブクローニングされる。

#### 【0021】

S2細胞は、リコンビナントCSA/FasLプラスミドでその製造者の仕様(Invitrogen)に従いリン酸カルシウムウムトランスフェクションを使用することで、一時的にトランスフェクションさせた。S2細胞は、キメラCSA-FasLタンパクの発現のために当該メタロチオネインプロモーター活性化し、トランスフェクション24時間後に硫酸銅でパルスされた。次に培地は、24時間誘導期間を経て集められ、ELISAおよびウェスタンブロットにより解析された。FasL(PharMingen, San Diego, CA)に対するmAb MFL4は、ストリンジェント条件下で行われたウェスタンブロットにおいて、当該キメラタンパク質の予測された分子量に相当する約35kDaのバンドを検出することが認められた。当該キメラタンパク質の同一性は、同じバンドを検出する(データは示さない)、ストレプトアビジン(Zymed Laboratories, San Francisco, CA)に対するポリクローナル抗体の使用で確認された。CSAは60 の以下の温度で1%のSDSおよび10%のメルカプトエタノール溶液中で安定な4量体を形成する。それゆえ培養上清は、キメラタンパク質が4量体を形成するか確かめるためSDS-PAGE開始前、60 および100 に加熱された。図9に示すように、FasL(PharMingen, San Diego, CA)に対するmAb MFL4は60 で~35および>100kDaのバンドを、100 で主に~35kDaのバンドを検出した。これらのバンドは、予期した単量体および4量体と一致した(図7)。これらのバンドは、CSA-FasL構築体(レーンFasL)でトランスフェクションされたS2細胞においてのみ検出され、しかし、機能を持たないFasLでトランスフェクトされた細胞では検出されなかった(レーンS2; クローニングプロセスの間、cDNAの5'末端近傍への、1ヌクレオチドの挿入は読み枠のシフト及びタンパク質発現の欠如を導く)。

#### 【0022】

S2細胞によるCSA-FasLの発現は、ELISAにおいてビオチン被覆されたマイクロウェルストリッププレートを使うことで更に確認される。簡潔に、ビオチン化ウェルは培地上清と45分間室温でインキュベートされ、徹底的に洗浄され、そして、ストレプトアビジンまたはFasL(MFL4)に対する第1抗体の有効濃度で45分間室温でインキュベートされる。そしてウェルは徹底的に洗浄され、第2抗体を結合したアルカリ性フォスファターゼと室温で45分間インキュベートされる。そしてプレートは徹底的に洗浄され、そしてアルカリ性フォスファターゼとインキュベートされる。データはELISAリーダー(Victor, Wallac, Gaithersburg, MD)を用いて解析された。どちらの抗体もCSA-FasL(FasL)を発現しているS2細胞においてCSA-FasLの高レベルを検出したが、ネガティブコントロール(S2)では検出しなかった。最も重要なことは、既知量の純粋なストレプトアビジンを標準(Pierce)として用いるト

ランスフェクション体によって発現されたCSA-FasLの量を我々が定量したこである。トランスフェクション体は培地の1ml当りキメラタンパク質50-100ngを発現した。まとめると、これらのデータは、我々が機能的キメラCSR-FasL構築体の作製およびそのS2細胞においける発現に成功したこと、並びに、当該キメラタンパク質の検出および定量化のための実験方法を開発したことを、明らかに証明している。

#### 【0023】

我々はまた、CSAを伴うFasLのヒト細胞外部分、ラットFasLの細胞外部分からなる構築体(図7b)を作製し、またキメラCSA-TFN を生成するためのTNFのヒト細胞外部分に関するcDNAをクローン化した。

#### 【0024】

実施例3 . アポトーシスにおける機能の解析のため脾臓細胞の表層上でのキメラCSA-FasL分子の発現

キメラCSA-FasLが生理学的条件下で細胞表層上に結合できるかどうか試験するために、 $2.5 \times 10^7$ 個のPVG.R8脾臓細胞を、室温で30分にわたりPBS1ml中で、EZ-Linkスルホ-NHS-LC-ビオチン(15  $\mu$ M)と製造者の仕様(Pieres)に従って結合させた。PBS pH8.0中で数回洗浄の後、 $1 \times 10^6$ 個の細胞を50-100ngCSA-FasLを含む0.3-1mlの培養上清、または無機能FasL構築体をトランスフェクトさせたS2細胞からの上清中において45分間氷上でインキュベーションさせた。細胞は徹底的に洗浄されてFasLの染色またはアポトーシスアッセイに使用された。染色は、フローサイトメトリーにおいて、 $1 \times 10^6$ 個の細胞上でAPCストレプトアビジンまたはPEを接合したモノクローナル抗体(MFL4)を使用することで行われた。当該細胞すべて、CSLFasL(図8a)およびストレプトアビジン(図8b)を発現した。S2コントロールからの上清はFasL染色に対しネガティブであった。ビオチン化しなかった脾臓細胞は同様に、APC-ストレプトアビジンで染色されず、特異性を証明している。

#### 【0025】

次に我々は、アポトーシスのため修飾した脾臓細胞を試験した。エフェクター脾臓細胞はPBSで3回洗浄され、 $1 \times 10^6$ 個の細胞は $1 \times 10^6$ 個のジャーカット細胞とRPMI培地中で一夜、アポトーシス活性のため共インキュベートされた。ジャーカット細胞におけるアポトーシスは、プロピジウムヨージド(死滅細胞のマーカー)、アネキシンV-FITC(早期アポトーシス事象のマーカー)およびヒト抗-CD3-APCmAb(クローンUCHT1;PharMingen)を用いてフローサイトメトリーを使い、ジャーカット細胞に対して特異的にゲーティングすることで決定された。有意義なアポトーシスは、FasLを伴わないS2上清とインキュベートされたコントロールの培地と比較して、ジャーカット細胞が脾臓細胞FasLと共にインキュベートされた培養において検出された(38%対9%)(図9)。

#### 【0026】

一部の臨床的状況においては、持続的効果を誘導せず患者の活性化T細胞を除くことは得策でありうる。生体から連続して血球を除き、生体の外でそれ进行处理し、その後戻す多くの手法が知られている。白血球を連続的に集め、次いで本発明のリコンビナントタンパク質のいずれかにより治療を行うルーコフォレシス(leukopheresis)から、自己免疫疾患をわずらう患者は特に、恩恵を受けるであろう。アポトーシスを介して殺されたそれら活性化リンパ球は取り除かれ、白血球は患者に戻される。このやり方においては、病原性免疫細胞は、治療の顕著な副作用を伴わず前記患者の体から取り除かれる。それゆえわれわれは、キメラCSA-FasL分子をビオチンアガロースビーズ(ImmunPurer(商標登録)固定化イムノビオチン;Pierce)に接合し、ジャーカット細胞のアポトーシスについて当該機能を試験した。図12において示すように、ジャーカット細胞におけるCSA-FasLが誘導した顕著なアポトーシス(38%)をFasLがない当該ビーズ(15%)と比較した。同様の実験的条件下でマウスA20細胞株の処理は>90%の死滅をもたらし、なぜならこの細胞系はアポトーシスに対し一層敏感であるからである。

#### 【0027】

実施例4 . FasL細胞はターゲットとして用いられた時、同種反応応答を完全に妨害する。  
次に我々は、混合リンパ球培養(MLR)において応答性リンパ球におけるアポトーシスの誘

10

20

30

40

50

導のためCSA-FasLで修飾されている細胞をテストした。この試験はドナーと移植片レシピエント間の抗原適合性の試験のため、および寛容の試験のために臨床状況において頻繁に用いられるテストである。ACI脾臓細胞はEZ-Link スルホ-NHS-LCビオチン(5  $\mu$ M)と、その製造者の仕様(Pieres)に従って、室温で30分にわたりPBS1mlの中において結合された。1  $\times 10^6$ 個の細胞は50-100ngCSA-FasLを含む0.3-1mlの培養上清または、無機能FasL構築体をトランスフェクションされたS2細胞からの上清中において20分間氷上でインキュベーションされた。細胞は徹底的に洗浄され、照射(2000cGy)され、比率1:1(1  $\times 10^5$ 個の細胞/ウェル)でPVG.1Uリンパ節細胞の標的として使用された。培養物は1M/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジンで18時間パルスされた後、様々な日に収穫されて、増殖を評価された。図13に示すように、CSA-FasL修飾化細胞は反応を完全に妨害した。この妨害は、CSA-FasLに特異的であり、なぜならビオチン化細胞は通常の応答を生成したからである。

10

#### 【0028】

実施例5. 標的として使用されたときFasL発現細胞は同種応答を完全に妨害する。

CSA-FasL-脾臓細胞の、in vitro同種応答を妨害するための強力な効果は我々を、in vivoで同種応答を妨害するうえでの、これら細胞の役割のテストに導いた。ラットPVG.1Uを、照射(2000cGy)された1  $\times 10^7$ 個のFasLで修飾されたACI細胞またはS2上清でI.VまたはI.Pと免疫化した。腸間膜リンパ節は注射後7日で収穫され、標準混合リンパ球アッセイにおいてACI細胞に対するレスポンドとして用いられた。ドナー抗原に対する応答の完全な不在があった(図11)。このin vivo免疫非応答はドナー特異性であり、なぜなら第3の抗原(LEW)に対する応答時が完全だったからである。この効果はFasL特異的で、なぜなら、コントロールS2上清で処理されたACI細胞を受容した動物が、ナイーブ動物の応答と比べて、ドナー及び第3抗原に対し普通の応答を発生したからである。

20

#### 【0029】

例6. FasLを発現している細胞は小島同種移植片の拒絶を予防する。

我々は次に、in vitroおよびin vivoにおいて観察されるFasLの強力な免疫抑制効果が小島同種移植片の拒絶の予防に十分であるかどうかをテストした。糖尿病はBALB/cレシピエントにおいて、ストレプトゾシン(260mg/kg)の注射によって誘導された。少なくとも3日連続で血中グルコースレベル > 450mg/dl示す動物は、小+主要組織適合性抗原非対応B10小島のレシピエントとして使用された。標準プロトコールに従って、小島はマウスC57BL/10から収穫されFicoll勾配上で単離された。脾臓細胞はマウスB10から収穫され、ビオチン化(15  $\mu$ M)され、FasL(50-100ng/10<sup>6</sup>個の細胞)またはコントロールS2上清で修飾され、そして照射された(2000rads)。脾臓細胞100万個は糖尿病マウスBALB/cの腎被膜の下に、~400個の小島細胞と共に移植された。数個の小島の生存は、移植3日後に開始する血中グルコースレベルの監視により評価された。FasL修飾化脾臓細胞は同種小島(MST > 56)の~70%の拒絶を防いだ。著しく対照的に、コントロールS2処理された脾臓細胞と同種小島を共移植された全てのレシピエントは、同種移植片を通常の方法(-11日)で拒絶した。FasL処理されたレシピエントの2つは~15日(3連続日血中グルコースレベル > 250mg/dl)において小島を拒絶した一方、6つのレシピエントは広く血中グルコースレベルを250mg/dlより少なく移植の後56日間概ね保っている。この節において提示した結果は、我々の、FasLの存在における同種抗原の認識が異種応答性T細胞の機能的除去および同種移植片生存の延長を導くという仮説を支持する。表2はこれら結果の概要である。

30

40

#### 【表2】

マウスBalb/cにおけるC57BL/10同種小島の生存

グループ	番号	移 植	生存時間、日
A	5	小島	7, 8, 9, 10, 10
B	5	小島+スプレノサイトーS2	3, 3, 8, 10, 10
C	10	小島+スプレノサイトーFasL	15, 17, 21, 38, >56, >56, >56, >56, >56, >56

10

## 【 0 0 3 0 】

## 実施例 7 . 他の有用な構築体。

前記提示したデータは以下を証明する：

- 1表 1 において提示した構築体の大部分の有効なクローニング及び作製；
2. 哺乳類および昆虫細胞系におけるwtFasL、修飾FasL、可溶性FasLおよびCSA-FasLの発現
3. 前記タンパク質の精製
4. FasLを用いた細胞系におけるアポトーシスの誘導
5. 免疫調節因子としてCSA-FasL を用いたin vivo 及びin vitroでの同種応答の妨害
6. 最も重要なことに、CSA-FasLを発現する脾臓細胞は小島同種移植片の拒絶を妨害した；および
7. キメラタンパク質はヒトFasLで製造できる；cDNAはクローン化されており、当該タンパク質は構築中にある。

20

## 【 0 0 3 1 】

これらの発見は、4量体を形成しているデスリガンドは自己免疫疾患の治療および外来移植片の拒絶予防のための免疫調節に、効果的に使用できるという仮説の概念の裏付けを供する。我々は、表 1 に列挙した及び本明細書においてほのめかしている疾患の治療のために本研究法の有効な適用を予測した。

30

## 【 0 0 3 2 】

ここにおいて記述した例は、標的細胞のための構築の指針のためビオチン/ストレプトアビジン対を供するが、他のそのような対の存在が良く知られている。アビジンがストレプトアビジンを置換しうる。抗体の結合領域は抗原に特異的である。腫瘍抗原タンパク質のような細胞表面タンパク質に対して特異的な抗体を生産することは当業者の技術の範囲内である。そのような抗体のリコンビナント結合領域(Fabs)もしくは独立可変領域(HvプラスL v)は容易に作成される。本発明の教示に従って、FasLもしくはmFasLを含んでなるキメラタンパク質および、標的細胞に特有である細胞表面タンパク質に対する抗体の結合領域を、過度の実験をしなくとも、バイオテクノロジー技術者はできる。そのようなキメラタンパク質は腫瘍において、アポトーシスを起こすために投与でき、それによって腫瘍の負荷が減る。本発明の多くのその他の改良または変法は本発明の精神および範囲を逸脱することなく容易になされうる。従って、係る全ての改良および変法は、添付した請求の範囲内にあるものとみなす。

40

## 【図面の簡単な説明】

- 【図 1】 Fas/FasL誘導化アポトーシスの機構を示す。
- 【図 2】 活性化脾臓細胞におけるFas/FasLの発現を示す。
- 【図 3】 安定な細胞表面タンパク質の作製のためのFasLの改変の概略図を示す。
- 【図 4】 Cos1細胞におけるFasLの細胞表面発現を示す。
- 【図 5】 mFasLを発現するCos1細胞によるヒトT細胞系の効果的アポトーシスを示す。
- 【図 6】 CSA-FasL構築体の構築を示す。

50

- 【図 7】 ウェスタンブロットによる可溶性およびCSA-FasL発現を示す。  
 【図 8】 脾臓細胞の表層へのCSA-FasLの結合を示す。  
 【図 9】 細胞表層またはCSA-FasLアガロースビーズ境界によるジャーカット細胞のアポトーシスを示す。  
 【図 10】 CSA-FasLで修飾された細胞による、同種反応応答の封鎖を示す。  
 【図 11】 CSA-FasLで修飾された細胞による、in vivo同種反応応答の封鎖を示す。

【図 1】

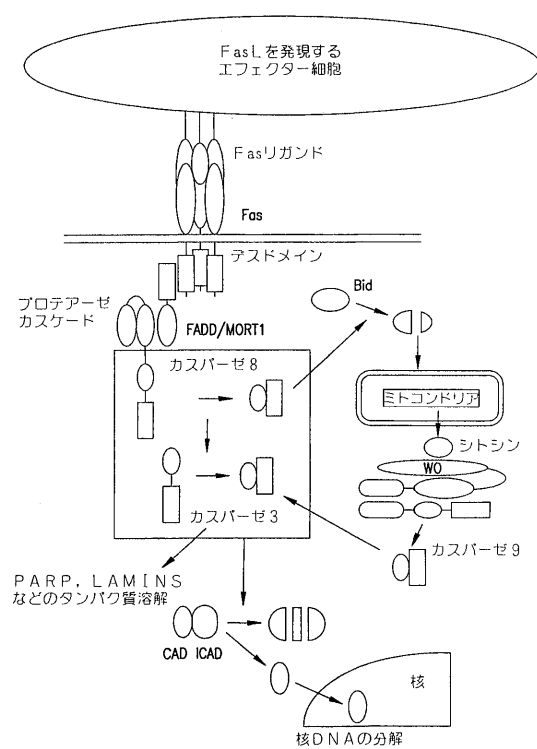


FIG. 1

【図 2】

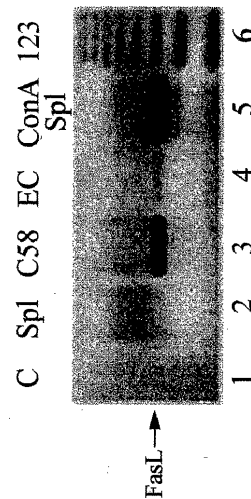


FIG. 2

【図 3】

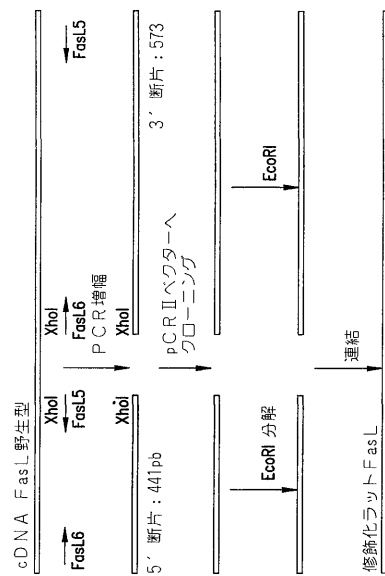


FIG. 3

【図 4】

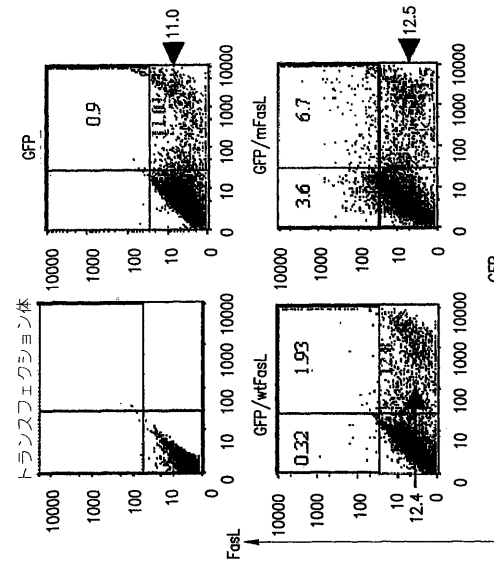


FIG. 4

【図 5】

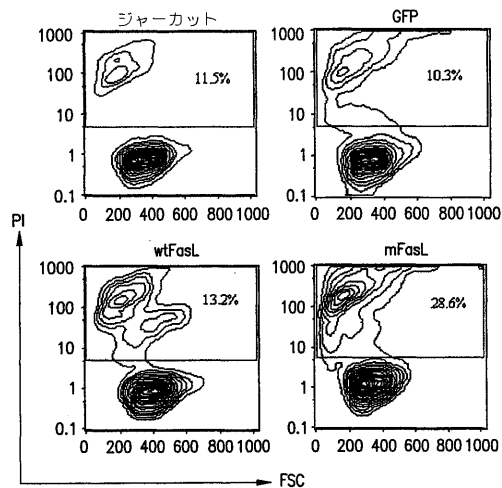


FIG. 5

【図 6】

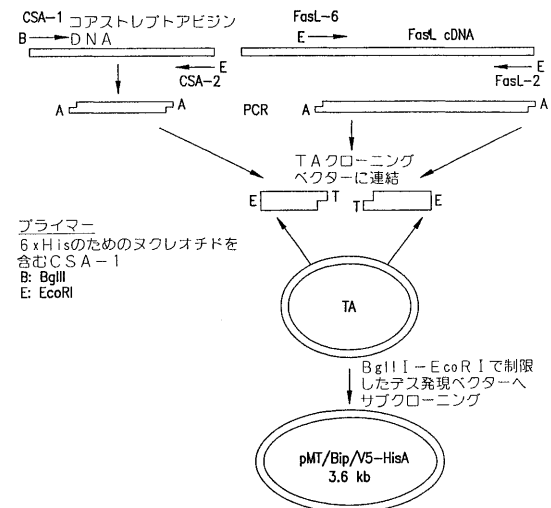


FIG. 6

【図 7 A】

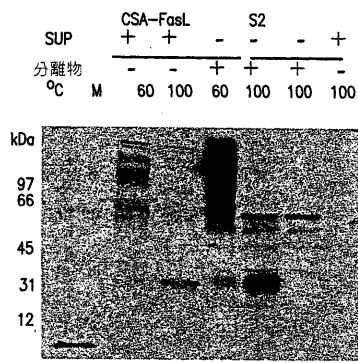


FIG. 7A

【図 7 B】

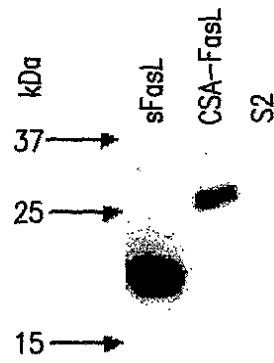


FIG. 7B

【図 8 A】

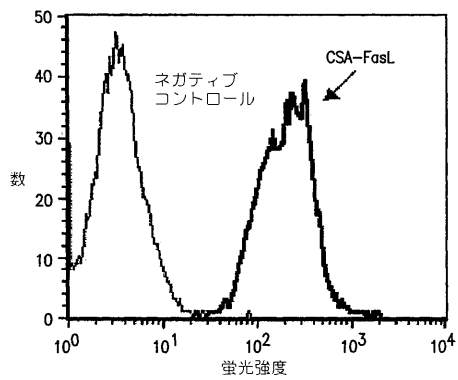


FIG. 8A

【図 8 B】

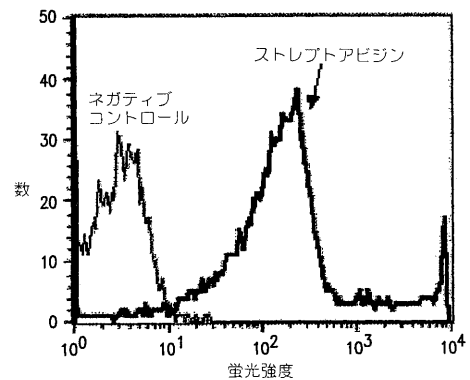


FIG. 8B

【 図 9 】

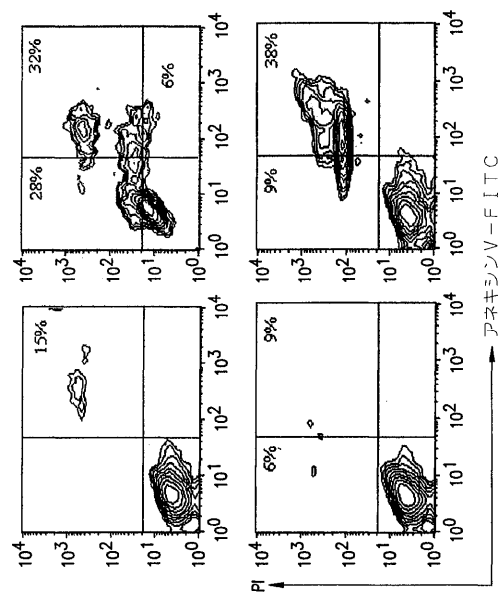


FIG. 9

【 図 10 】

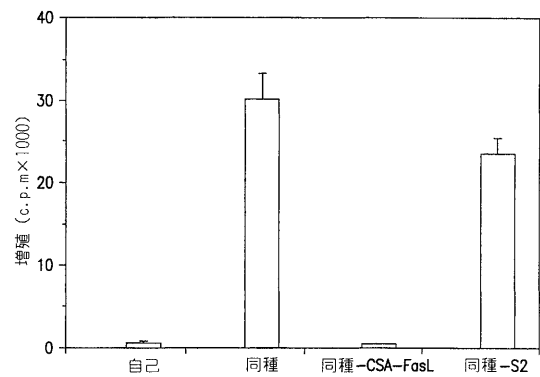


FIG. 10

【 図 11 】

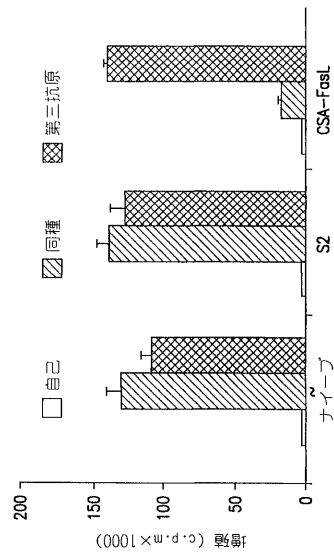


FIG. 11



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	35/28	(2006.01)	A 6 1 K	35/28	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
			A 6 1 P	37/02	

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 シャーワン, ハバル

アメリカ合衆国, ケンタッキー 4 0 2 2 2, ルイビル, コッパー クリーク ドライブ 8 1 4  
1

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第 9 7 / 0 3 3 6 1 7 (WO, A 1)

国際公開第 9 9 / 0 1 7 8 0 1 (WO, A 1)

特表平 1 1 - 5 0 8 4 4 5 (JP, A)

国際公開第 9 8 / 0 2 0 8 9 6 (WO, A 1)

特表 2 0 0 0 - 5 0 0 3 3 6 (JP, A)

国際公開第 9 7 / 0 0 7 8 2 8 (WO, A 1)

Gene Ther., Vol. 4, No. 12 (1997) p. 1350-1360

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 89, No. 5 (1992) p. 1534-1538

J. Immunol. Methods., Vol. 178, No. 2 (1995) p. 201-209

Gene, Vol. 167, No. 1-2 (1995) p. 63-68

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

CA/BIOSIS/WPIDS(STN)

PubMed