

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 543151**

(P2002 - 543151A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	U 2 G 0 4 5 G 4 B 0 2 4
	38/00		4 B 0 6 4
	45/00	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00		31/12	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全297数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 615040(P2000 - 615040)

(86)(22)出願日 平成12年5月4日(2000.5.4)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月2日(2001.11.2)

(86)国際出願番号 PCT/US00/12041

(87)国際公開番号 W000/66156

(87)国際公開日 平成12年11月9日(2000.11.9)

(31)優先権主張番号 60/132,498

(32)優先日 平成11年5月4日(1999.5.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/133,238

(32)優先日 平成11年5月7日(1999.5.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ヒューマン ジノーム サイエンスーズ,  
インコーポレイテッド

HUMAN GENOME SCIENCE  
S, INC.

アメリカ合衆国 メリーランド 20850,ロ  
ックビル, キー ウェスト アベニュー  
9410

(72)発明者 ニ, ジアン

アメリカ合衆国 メリーランド 20853,  
ロックビル, マナーフィールド ロード  
5502

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 死ドメイン含有レセプター5

(57)【要約】

本発明は、腫瘍壊死因子 ( T N F ) レセプターファミリーのメンバーであり、そして現在、 T R A I L に結合することが示されている、新規な死ドメイン含有レセプター5 ( D R 5 ) タンパク質に関する。詳細には、ヒト D R 5 タンパク質をコードする単離された核酸分子が提供される。 D R 5 ポリペプチドもまた、 D R 5 ポリペプチドを作製するためのベクター、宿主細胞、および組換え方法と同様に提供される。本発明はさらに、 D R 5 活性のアゴニストまたはアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法に関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 対宿主性移植片病、ウイルス感染、癌、白血病、免疫不全または自己免疫障害を処置するための方法であって、該方法は、治療有効量の以下：

(a) 配列番号2のアミノ酸 - 51 ~ 360 からなるポリペプチドに結合する抗体を含有する、第1の治療薬剤；ならびに

(b) 以下からなる群より選択される、第2の治療薬剤：

(i) T R A I L ；

(i i) 腫瘍壊死因子；

(i i i) 腫瘍壊死因子遮断薬

(i v) 免疫抑制剤；

(v) 抗生物質；

(v i) 抗炎症剤；

(v i i) 化学療法剤；および

(v i i i) サイトカイン；

を個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記第1の治療薬剤が配列番号2のアミノ酸1 ~ 133からなるポリペプチドに結合する抗体を含有する、方法。

【請求項3】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記抗体がモノクローナル抗体である、方法。

【請求項4】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記抗体がポリクローナル抗体である、方法。

【請求項5】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記抗体がキメラ抗体である、方法。

【請求項6】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記抗体がヒト化抗体である、方法。

【請求項7】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記抗体が単鎖Fv抗体である、方法。

【請求項8】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記抗体がF a b抗体フラグメントである、方法。

【請求項9】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記第1の治療薬剤および第2の治療薬剤が、同時に前記個体へ投与される、方法。

【請求項10】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記第1の治療薬剤および第2の治療薬剤が、異なるときに前記個体へ投与される、方法。

【請求項11】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記第2の治療薬剤がT R A I Lである、方法。

【請求項12】 請求項1に記載の方法であって、ここで前記腫瘍壊死因子遮断薬が以下：

- ( a ) T N F - ;
- ( b ) T N F - ;
- ( c ) T N F - ;
- ( d ) T N F - - ; および
- ( e ) T N F - -

からなる群より選択されるタンパク質に結合する抗体を含有する、方法。

【請求項13】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記免疫抑制剤が以下：

- ( a ) シクロスポリン；
- ( b ) シクロホスファミド；
- ( c ) メチルプレドニゾン；
- ( d ) プレドニゾン；
- ( e ) アザチオプリン；
- ( f ) F K - 5 0 6 ； および
- ( g ) 1 5 - デオキシスペルグアリン

からなる群より選択される、方法。

【請求項14】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記サイトカインが以下：

- ( a ) I L - 2 ；

- (b) I L - 3 ;
- (c) I L - 4 ;
- (d) I L - 5 ;
- (e) I L - 6 ;
- (f) I L - 7 ;
- (g) I L - 10 ;
- (h) I L - 12 ;
- (i) I L - 13 ;
- (j) I L - 15 ; および
- (k) I F N -

からなる群より選択される、方法。

【請求項15】 組成物であって、以下：

(a) 配列番号2のアミノ酸 - 51 ~ 360 からなるポリペプチドに結合する抗体を含有する、第1の治療薬剤；ならびに

(b) 以下からなる群より選択される、第2の治療薬剤：

- (i) T R A I L ；
- (i i) 腫瘍壊死因子；
- (i i i) 腫瘍壊死因子遮断薬；
- (i v) 免疫抑制剤；
- (v) 抗生物質；
- (v i) 抗炎症剤；
- (v i i) 化学療法剤；および
- (v i i i) サイトカイン

を含有する、組成物。

【請求項16】 請求項15に記載の組成物であって、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含有する、組成物。

【請求項17】 配列番号2のアミノ酸1 ~ 133に少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含有する単離されたポリペプチドであって；

ここで該ポリペプチドは、ポリエチレングリコールに共有結合され、該ポリエ

チレングリコールは、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、15,000および20,000からなる群より選択される平均分子量を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項18】 配列番号2のアミノ酸1～133に少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含有する、請求項17に記載のポリペプチド。

【請求項19】 請求項18に記載のポリペプチドであって、前記アミノ酸配列が配列番号2のアミノ酸1～133を含有する、ポリペプチド。

【請求項20】 請求項17に記載のポリペプチドであって、ここで前記ポリペプチドは、ポリエチレングリコールと、1～3、2～4、3～5、4～6、5～7、6～8、7～9、8～10、9～11および10～12からなる群より選択される範囲内にある平均置換度を有する、ポリペプチド。

【請求項21】 組換え宿主細胞によって産生される、請求項17に記載のポリペプチド。

【請求項22】 前記組換え宿主細胞が真核生物宿主細胞である、請求項21に記載のポリペプチド。

【請求項23】 異種ポリペプチドを含有する、請求項17に記載のポリペプチド。

【請求項24】 請求項23に記載のポリペプチドであって、前記異種ポリペプチドが抗体のFc部分を含有する、ポリペプチド。

【請求項25】 請求項17に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含有する、組成物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、レセプターの腫瘍壊死因子ファミリーの新規なメンバーに関する。より詳細には、ヒト死ドメイン含有レセプター5（すなわち、単純に「DR5」）をコードする単離された核酸分子が提供される。DR5ポリペプチドもまた提供され、ベクター、宿主細胞、およびこれらを産生するための組換え方法も提供される。本発明はさらに、DR5活性のアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法に関する。

**【0002】**

(関連分野)

多数の生物学的作用（例えば、特定の刺激への応答および天然の生物学的プロセス）は、サイトカインのような因子によって制御される。多くのサイトカインは、レセプターを係合し、そして細胞内応答を産生することによって、レセプターを通して作用する。

**【0003】**

例えば、腫瘍壊死因子（TNF）および はサイトカインであり、これは多数の生物学的プロセスを制御するTNFレセプターを通して作用し、このプロセスとしては、感染およびショックの導入および炎症性疾患に対する防御が挙げられる。TNF分子は、「TNFリガンド」スーパーファミリーに属し、そしてそれらのレセプターまたは対抗リガンド「TNFレセプター」スーパーファミリーとともに作用する。従来、TNFリガンドスーパーファミリーの9のメンバーが同定されており、そしてTNFレセプタースーパーファミリーの10のメンバーが特徴付けられている。

**【0004】**

リガンドとしては、TNF、リンホトキシン（LT-、TNFとして  
もまた公知である）、LT-（複合体異種三量体のLT-2-に見出される）、FasL、CD40L、CD27L、CD30L、4-1BBL、OX4

0 L、および神経成長因子 (NGF) が挙げられる。TNFレセプターのスーパーファミリーとしては、p55 TNFレセプター、p75 TNFレセプター、TNFレセプター関連タンパク質、FAS抗原、またはAPO-1、CD40、CD27、CD30、4-1BB、OX40、低親和性p75、およびNGFレセプターが挙げられる (Meager, A., *Biologicals*, 22: 291-295 (1994))。

#### 【0005】

TNFリガンドスーパーファミリーの多くのメンバーは、活性化T細胞によって発現され、このことは、細胞個体発生および機能の基礎となる他の細胞型とのT細胞相互作用に必要であることを意味する。(Meager, A., 前出)。

#### 【0006】

TNFレセプターファミリーのいくつかのメンバーの必須の機能に関する考慮すべき見識は、これらのタンパク質の発現を回避する変異体の同定および創生から得られている。例えば、FAS抗原およびそのリガンドに天然に存在する変異は、リンパ球増殖性疾患を引き起こし (Watanabe-Fukunaga, R., *Nature* 356: 314 (1992))、これはおそらく、プログラムされた細胞死の失敗を反映する。CD40リガンドの変異は、血漿中の高レベルの免疫グロブリンMおよび低レベルの免疫グロブリンGによって特徴付けられるX関連免疫欠損状態を引き起こし、これは欠陥のあるT細胞依存性B細胞活性化を引き起こす (Allen, R.C. *ら*, *Science* 259: 990 (1993))。低親和性神経成長因子レセプターの標的化変異は、末梢構造の欠陥のある感覚性新機軸 (sensory innervation) によって特徴付けられる障害を引き起こす (Lee, K.F. *ら*, *Cell* 69: 737 (1992))。

#### 【0007】

TNFおよびLT- は、2つのTNFレセプター (55 kdおよび75 kdのTNFレセプター) に結合し得る。TNFおよびLT- によって誘発される (それらのレセプターを通じて作用する) 多数の生物学的効果としては、移植された腫瘍の出血性壊死、細胞傷害性、内毒素ショックにおける役割、炎症、免疫

調節、増殖および抗ウイルス応答、ならびに電離放射線の有害な効果に対する防御が挙げられる。TNFおよびLT- は、広範な疾患の病原性に関与し、これには、内毒素ショック、大脳マラリア、腫瘍、自己免疫疾患、AIDS、および移植片-宿主拒絶が挙げられる(Beutler, BおよびVon Huf fel, C., Science 264:667-668(1994))。p55レセプターにおける変異は、微生物感染に対する感受性を増加させる。

【0008】

さらに、TNFR-1(p55)およびFasのC末端付近の約80アミノ酸ドメインが、「死ドメイン」として報告され、これはプログラムされた細胞死についての形質導入シグナル伝達を担う(Tartagliaら、Cell 74:845(1993))。

【0009】

アポトーシスまたはプログラムされた細胞死は、多細胞生物の正常な発生および恒常性に必須の生理学的プロセスである(H.Steller, Science 267:1445-1449(1995))。アポトーシスの攪乱は、ガン、神経変性疾患、および後天性免疫疾患症候群を含むいくつかのヒト疾患の病原性に寄与する(C.B.Thompson, Science 267:1456-1462(1995))。近年、多くの注目が、2つの細胞表面死レセプターFas/APO-1およびTNFR-1のシグナル形質導入および生物学的機能に集中している(J.L.Clevelandら、Cell 81:479-482(1995);A.Fraserら、Cell 85:781-784(1996);S.Nagataら、Science 267:1449-56(1995))。両方とも、TNFレセプターファミリーのメンバーであり、これらはまた、とりわけ、TNFR-2、低親和性NGFR、CD40、およびCD30を含む(C.A.Smithら、Science 248:1019-23(1990);M.Tewariら、Modular Texts in Molecular and Cell Biology M.Purton, Hel din, Carl編、(Chapman and Hall, London, 1995))。ファミリーメンバーは、それらの細胞外ドメインにおけるシステイ

ンリッチ反復の存在によって規定されるが、Fas/APO-1およびTNFR-1もまた、細胞内相同性の領域(適切には「死ドメイン」と称され、これは*Drosophila* suicide遺伝子reaperの遠縁にあたる)を共有する(P. Golsteinら、Cell 81:185-186(1995); K. Whiteら、Science 264:677-83(1994))。この共有された死ドメインは、両方のレセプターが、最近まで未確認のままの、関連セットのシグナル伝達形質導入分子と相互作用することを示唆する。Fas/APO-1の活性化は、死ドメイン含有アダプター分子FADD/MORT1(A. M. Chinnaiyanら、Cell 81:505-12(1995); M. P. Boldinら、J. Biol Chem 270:7795-8(1995); F. C. Kischkelら、EMBO 14:5579-5588(1995))を補充し、これは順に、FLICE/MACH1(プロアポトーシスプロテアーゼのICE/CED-3ファミリーのメンバー)に結合し、そしておそらく活性化する(M. Muzioら、Cell 85:817-827(1996); M. P. Boldinら、Cell 85:803-815(1996))。Fas/APO-1の中心の役割は、細胞死を引き起こすことであるが、TNFR-1は、その多くがNF-kBを活性化する能力に由来する多様な生物学的活性の整列をシグナル伝達し得る(L. A. Tartagliaら、Immunol Today 13:151-3(1992))。従って、TNFR-1は、多価アダプター分子TRADDを補充し、これはFADDに類似し、死ドメインもまた含む(H. Hsuら、Cell 81:495-504(1995); H. Hsuら、Cell 84:299-308(1996))。FADD、TRAF2、およびRIPを含む多くのシグナル伝達分子との関連を通じて、TRADDは、アポトーシスおよびNF-kB活性化の両方をシグナル伝達し得る(H. Hsuら、Cell 84:299-308(1996); H. Hsuら、Immunity 4:387-396(1996))。

#### 【0010】

近年、新たなアポトーシス誘導性TNFリガンドが発見されている。S. R. Wileyら(Immunity 3:673-682(1995))は、この

分子を「TNF関連アポトーシス誘導性リガンド」または単純に「TRAIL」と命名した。この分子はまた、「Apo-2リガンド」または「Apo-2L」とも称された。R. M. Pittら、J. Biol. Chem. 271: 12687-12690 (1996)。便宜上、この分子は、本明細書中でTRAILとして称される。

#### 【0011】

FASリガンド（この転写物は、刺激されたT細胞に非常に制限されるようである）とは異なり、有意なレベルのTRAILが、多くのヒト組織（例えば、脾臓、肺、前立腺、胸腺、卵巣、小腸、結腸、末梢血リンパ球、胎盤、腎臓）において検出され、そしていくつかの細胞株によって連続的に転写される。TRAILはFasリガンドから独立して作用することが示されている（Wileyら、前出）。TRAILはFas/Apo-1Lによる死伝達と同様の時間枠内で、迅速にアポトーシスを活性化するが、TNF誘導性アポトーシスより早いこともまた示されている。S. A. Marstersら、Current Biology 6: 750-752 (1996)。TRAILのTNFR-1、Fas、または近年同定されたDR3への結合の不能性は、TRAILは、独特のレセプターと相互作用し得ることを示唆する。

#### 【0012】

TNFファミリーリガンドおよびTNFファミリーレセプターの効果は変化し、そして哺乳動物系の生物学的プロセスにおいて正常および異常の両方の多数の機能に影響する。それゆえ、正常および疾患状態の両方において生物学的活性に影響するようなレセプターおよびリガンドの同定および特徴づけのための明確な必要性が存在する。特に、TRAILに結合するさらなる新規なレセプターを単離および特徴付ける必要性が存在する。

#### 【0013】

##### （発明の要旨）

本発明は、単離された核酸分子を提供し、これは、図1（配列番号2）に示されるアミノ酸配列または1997年3月7日にATCC受託番号97920として寄託されたcDNAによってコードされるアミノ酸配列をコードする核酸配列

を含むか、またはそれからなる。

【0014】

本発明はまた、組換えベクター（本発明の単離された核酸分子を含む）を提供し、そして組換えベクターを含む宿主細胞、ならびにこのようなベクターおよび宿主細胞を作製する方法、およびDR5ポリペプチドまたはペプチドの組換え技術による産生のためにそれらを使用するための方法を提供する。

【0015】

本発明はさらに、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を有する単離されたDR5ポリペプチドを提供する。

【0016】

本発明はまた、DR5タンパク質のレベルを検出するための定量的および診断用アッセイのような診断用アッセイを提供する。従って、例えば、正常なコントロール組織サンプルと比較してDR5またはその可溶性形態の過剰発現を検出するための本発明による診断用アッセイが、腫瘍の存在を検出するのに使用され得る。

【0017】

腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーリガンドは、最も多面性のサイトカインの中にあることが公知であり、これは、細胞毒性、抗ウイルス活性、免疫調節活性、およびいくつかの遺伝子の転写調節を含む大多数の細胞性応答を含む。TNFファミリーリガンドに対する細胞性応答は、正常な生理学的応答だけでなく、増加したアポトーシスに関連する疾患またはアポトーシスの阻害も含む。アポトーシス（プログラムされた細胞死）は、免疫系の末梢Tリンパ球の欠失に關与する生理学的機構であり、そしてその調節不全は、多数の異なる病原性プロセスを導き得る。増加した細胞生存に関連する疾患、またはアポトーシスの阻害としては、ガン、自己免疫疾患、ウイルス感染、炎症、移植片対宿主疾患、急性移植片拒絶、および慢性移植片拒絶が挙げられる。増加したアポトーシスに関連する疾患としては、AIDS、神経変性障害、脊髄形成異常症候群、虚血性障害、毒素誘導性肝臓疾患、敗血症性ショック、悪液質、および摂食障害が挙げられる。

【0018】

従って、本発明はさらに、TNFファミリーリガンドによって誘導されるアポトーシスを増強するための方法を提供し、これは、DR5ポリペプチドを発現する細胞に、DR5媒介性シグナル伝達を増加し得る有効量のアゴニストを投与する工程を包含する。好ましくは、DR5媒介性シグナル伝達は、疾患を処置および/または予防するために増加され、ここで減少したアポトーシスが示される。

【0019】

さらなる局面において、本発明は、TNFファミリーリガンドによって誘導されるアポトーシスを阻害するための方法に関し、これはDR5ポリペプチドを発現する細胞に、DR5媒介性伝達を減少し得る有効量のアンタゴニストを投与する工程を包含する。好ましくは、DR5媒介性伝達は、疾患を処置および/または予防するために減少され、ここで増加したアポトーシスが示される。

【0020】

本発明のいずれの候補体「アゴニスト」または「アンタゴニスト」がアポトーシスを増強または阻害し得るかどうかが、当該分野で公知のTNFファミリーリガンド/レセプター細胞応答アッセイを用いて決定され得、これには以下により詳細に記載されるものが挙げられる。従って、さらなる局面において、候補体アゴニストまたはアンタゴニストがTNFファミリーリガンドに対する細胞応答を増強または阻害し得るかどうかを決定するためのスクリーニング方法が提供される。この方法は、DR5ポリペプチドを発現する細胞を、候補体化合物およびTNFファミリーリガンドと接触させる工程、細胞応答をアッセイする工程、ならびに細胞応答を標準的な細胞応答と比較する工程を含み、この標準は、候補体化合物の非存在下でリガンドとの接触がなされる場合にアッセイされ、それにより、標準を超える増加した細胞応答は、候補化合物がリガンド/レセプター伝達経路のアゴニストであることを示し、そして標準に比べて減少した細胞応答は、候補体化合物が、リガンド/レセプター伝達経路のアンタゴニストであることを示す。本発明によって、DR5ポリペプチドを発現する細胞は、内因性または外因的に投与されたTNFファミリーリガンドのいずれかと接触させられ得る。

【0021】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明は、図1（配列番号2）で示されるアミノ酸配列を有するDR5ポリペプチド、またはこのポリペプチドのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むかまたはそれからなる、単離された核酸分子を提供する。本発明のDR5ポリペプチドは、TNFRファミリーの、他の既知の死ドメイン含有レセプター（図2のヒトTNFR-1、DR3、およびFasを含む）と配列相同性を共有する。図1（配列番号1）に示されるヌクレオチド配列は、HLYBX88のようなcDNAクローンの配列決定によって得られ、このクローンは、1997年3月7日にAmerican Type Culture, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209に寄託され、そして受託番号97920が与えられた。寄託されたcDNAは、pSport 1プラスミド（Life Technologies, Gaithersburg, MD）に含まれる。

#### 【0022】

（核酸分子）

他に示されない限り、本明細書中でDNA分子を配列決定することによって決定されたすべてのヌクレオチド配列は、自動化DNA配列決定機（例えば、Applied Biosystems, Inc.のModel 373）を用いて決定され、そして本明細書中で決定されたDNA分子によってコードされるポリペプチドのすべてのアミノ酸配列は、上記のように決定されるDNA配列の翻訳によって推定された。従って、この自動化アプローチによって決定された任意のDNA配列について当該分野において公知のように、本明細書中で決定される任意のヌクレオチド配列はいくつかの誤りを含み得る。自動化によって決定されるヌクレオチド配列は、配列決定されるDNA分子の実際のヌクレオチド配列に対して、代表的には少なくとも約90%同一、より代表的には少なくとも約95%～少なくとも約99.9%同一である。実際の配列は、当該分野において周知の手動DNA配列決定方法を含む他のアプローチによってさらに正確に決定され得る。当該分野においてまた公知のように、実際の配列と比較して、決定されたヌクレオチド配列における単一の挿入または欠失は、ヌクレオチド配列の翻訳においてフレームシフトを引き起こし、その結果、決定されたヌクレオチド配列によ

ってコードされる推定アミノ酸配列は、配列決定されたDNA分子によって実際にコードされるアミノ酸配列（このような挿入または欠失の点にて始まる）とは完全に異なる。

#### 【0023】

本明細書中で提供される情報（例えば、配列番号1に示される核酸配列）を使用して、DR5ポリペプチドをコードする本発明の核酸分子は、出発物質としてmRNAを使用してcDNAをクローニングするための手順のような、標準的なクローニングおよびスクリーニング手順を使用して得られ得る。本発明の例示となる、本発明の核酸分子は、以下の組織のcDNAライブラリーで同定された：一次樹状細胞、内皮組織、脾臓、慢性リンパ性白血病、およびヒト胸腺間質細胞。

#### 【0024】

配列番号1のDR5 cDNAの決定されたヌクレオチド配列は、約411アミノ酸残基のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含み、その開始コドンは、約51アミノ酸残基のリーダー配列を有する、図1（配列番号1）に示されるヌクレオチド配列の130～132位にある。公知のTNFレセプターファミリーのメンバーの、本発明のDR5ポリペプチドは、複数のシステインリッチドメインにわたって有意な配列相同性を含む、図2に示されるヒトTNFR-1、FAS、およびDR3ポリペプチドと高度な相同性を共有する。DR5が、他の死ドメイン含有レセプターに対して示す相同性は、DR5もまたアポトーシスを誘導する能力を有する死ドメイン含有レセプターであることを強く示す。DR5はまた現在、TRAILを結合することが示されている。

#### 【0025】

示されるように、本発明はまた、本発明のDR5タンパク質の成熟形態を提供する。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞によって分泌されるタンパク質は、粗面小胞体を横切る伸長中のタンパク質鎖の搬出が一旦開始されると、成熟タンパク質から切断される、シグナルまたは分泌リーダー配列を有する。大半の哺乳動物細胞および昆虫細胞でさえも、分泌タンパク質を同じ特異性で切断する。しかし、いくつかの場合では、分泌タンパク質の切断は完全には均一ではなく、タ

ンパク質において2つ以上の成熟種を生じる。さらに、分泌タンパク質の切断特異性は、究極的には完全タンパク質の一次構造によって決定され、すなわち、それはポリペプチドのアミノ酸配列に固有なものであることが長い間知られていた。

#### 【0026】

従って、本発明は、ATCC受託番号97920として同定されるプラスミド中に含まれるcDNAによってコードされ、そして図1（配列番号2）に示されるようなアミノ酸配列を有する、成熟DR5ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を提供する。ATCC受託番号97920として同定されるプラスミド中に含まれるcDNAによってコードされるアミノ酸配列を有する成熟DR5タンパク質とは、寄託されたプラスミドに含まれるヒトDNAによってコードされる完全オープンリーディングフレームの、哺乳動物細胞（例えば、以下に記載するようなCOS細胞）中での発現によって産生されるDR5タンパク質の成熟形態を意味する。以下に示すように、ATCC受託番号97920に含まれるcDNAによってコードされるアミノ酸配列を有する成熟DR5は、コンピュータ分析に基づいて推定された切断部位の正確さに依存して、配列番号2に示された推定「成熟」DR5タンパク質（アミノ酸約1～約360）と異なっても、異ならなくとも良い。

#### 【0027】

タンパク質が、分泌リーダーならびにリーダー配列の切断点を有するか否かを推定する方法が利用可能である。例えば、McGeoch (Virus Res. 3: 271-286 (1985)) および von Heinje (Nucleic Acids Res. 14: 4683-4690 (1986)) の方法が使用され得る。これらの各方法の公知の哺乳動物分泌タンパク質の切断点の推定の正確さは、75～80%の範囲内にある。von Heinje、前出。しかし、2つの方法は、所定のタンパク質に対して常に同じ推定切断点を生成するわけではない。

#### 【0028】

本発明の場合、本発明の完全DR5ポリペプチドの推定アミノ酸配列は、コン

ピュータープログラム(「PSORT」)によって分析された。K. Nakai およびM. Kanehisa, Genomics 14:897-911(1992)を参照のこと。PSORTは、アミノ酸配列に基づいてタンパク質の細胞性位置を推定するためのエキスパートシステムである。この位置付けのコンピューター推定の一部として、McGeochおよびvon Heinjeの方法が援用される。PSORTプログラムによる分析は、図1におけるアミノ酸51と52の間(配列番号2の-1と1の間)の切断部位を推定した。その後、完全アミノ酸配列を目視検査によってさらに分析し、von Heinjeの(-1, -3)規則の単純形態を適用した。von Heinje、前出。従って、DR5タンパク質のリーダー配列は、図1の下線を付したアミノ酸残基約1~約51(配列番号2の約-51~約1のアミノ酸残基に対応する)からなると推定され、一方で、推定成熟DR5タンパク質は、図1の残基約52~約411(配列番号2の約1~約360のアミノ酸残基に対応する)からなる。

#### 【0029】

当業者が理解するように、配列決定誤差の可能性および異なる既知のタンパク質におけるリーダーについての切断部位の可変性に起因して、寄託されたcDNAによってコードされる推定DR5レセプターポリペプチドは、約411アミノ酸を含むが、401~421アミノ酸の範囲中のいずれかであってもよい；そして、このタンパク質の推定リーダー配列は、約51アミノ酸であるが、約41~約61アミノ酸の範囲中のいずれかであってもよい。本明細書中に記載されるドメインは、コンピューター分析によって推定されており、従って、種々の機能的ドメインを同定するために使用される分析判断基準に依存して、例えば、DR5の細胞外ドメイン、細胞内ドメイン、死ドメイン、システインリッチモチーフ、および膜貫通ドメインの正確な「所在地(address)」は、わずかに異なり得ることがさらに理解される。例えば、図1(配列番号2)におけるDR5細胞外ドメインの正確な位置は、ドメインを規定するために使用される判断基準に依存して、わずかに変化し得る(例えば、所在地は、約1~約20残基、より可能性があるには、約1~約5残基程度「シフト」し得る)。いずれにせよ、以下でさらに考察するように、本発明はさらに、完全DR5のN末端および/または

C末端から種々の残基を欠失したポリペプチドを提供し、これには、DR5ポリペプチドの細胞外ドメインの可溶性形態を構築する、本明細書中に記載の細胞外ドメインのN末端から1以上のアミノ酸を欠失したポリペプチドが含まれる。

【0030】

示されるように、本発明の核酸分子は、RNA（例えば、mRNA）の形態、またはDNAの形態（例えば、クローニングによって得られるか、または合成的に生成されるcDNAおよびゲノムDNAを含む）であり得る。DNAは、二本鎖または一本鎖であり得る。一本鎖DNAは、コード鎖（センス鎖としても公知）であり得るか、または非コード鎖（アンチセンス鎖とも呼ばれる）であり得る。

【0031】

「単離された」核酸分子とは、そのネイティブな環境から取り出された核酸分子（DNAまたはRNA）を意図する。例えば、ベクター中に含まれる組換えDNA分子は、本発明の目的のために、単離されたとみなされる。単離されたDNA分子のさらなる例としては、異種宿主細胞において維持される組換えDNA分子、または溶液中の（部分的または実質的に）精製されたDNA分子が挙げられる。

【0032】

しかし、混合されたクローンのライブラリー（例えば、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリー）のメンバーであって、ライブラリーの他のクローンから単離されていない（例えば、ライブラリーの他のメンバーを伴わずに、クローンを含む均質な溶液の形態で）クローン中に含まれる核酸分子、あるいは細胞または細胞溶解産物から単離されたか、または取り出された染色体（例えば、核型におけるような「染色体スプレッド（chromosome spread）」）は、本発明の目的のためには、「単離され」ていない。単離されたRNA分子としては、本発明のDNA分子のインビボまたはインビトロでのRNA転写物が挙げられる。本発明に従って単離された核酸分子にはさらに、合成的に生成されるような分子が含まれる。

【0033】

本発明の単離された核酸分子としては、以下が挙げられる：配列番号1に示されるオープンリーディングフレーム(ORF)を含むか、あるいはそれからなるDR5 DNA分子；成熟DR5タンパク質のコード配列を含むか、あるいはそれからなる、DNA分子；および、上記のDNA分子とは実質的に異なるが、遺伝暗号の縮重に起因して、なおDR5タンパク質をコードする配列を含むか、あるいはそれからなる、DNA分子。当然のことながら、遺伝暗号は、当該分野において周知である。従って、当業者にとって、このような縮重改変体を生成することは慣用的である。

【0034】

さらに、本発明は、以下の関連cDNAから決定された、配列番号1の広範な部分に関連するヌクレオチド配列を有する核酸分子を提供する：HAPBU13R(配列番号6)およびHSBBU76R(配列番号7)。HAPBU13RおよびHSBBU76Rのヌクレオチド配列を、図4に示す。

【0035】

Genbank登録番号Z66083を割り当てられた、さらなる関連のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、配列番号14に示す。

【0036】

別の局面において、本発明は、1997年3月7日にATCC受託番号97920として寄託されたプラスミド中に含まれるcDNAによってコードされるアミノ酸配列を有するDR5ポリペプチドをコードする、単離された核酸分子を提供する。さらなる実施形態では、N末端メチオニンを欠いた、成熟DR5ポリペプチドまたは全長DR5ポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。本発明はさらに、配列番号1に示されるヌクレオチド配列、もしくは上記の寄託されたプラスミド中に含まれるDR5 cDNAのヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子、または上記の配列の1つに対して相補的な配列を有する核酸分子を提供する。このような単離された分子(特に、DNA分子)は、例えば、染色体を用いたインサイチュハイブリダイゼーションによる遺伝子地図作製のためのプローブとして、そしてヒト組織におけるDR5遺伝子の発現を検出する(例えば、ノーザンブロット分析による)ためのプローブとしての用途が挙げられるが、

これらに限定されない用途を有する。

【0037】

本発明はさらに、本明細書中に記載される単離された核酸分子のフラグメントに関する。配列番号1に示されるヌクレオチド配列を有する単離されたDNA分子のフラグメント、または寄託されたcDNA(ATCC受託番号97920として寄託されたプラスミド中に含まれるcDNA)のヌクレオチド配列を有する単離されたDNA分子のフラグメントとは、少なくとも20nt、そしてより好ましくは少なくとも30nt長、そしてさらにより好ましくは、少なくとも約40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、または1200ヌクレオチド長のDNAフラグメントを意図する。これは、上記で考察したように、DNAプローブとして有用である。当然のことながら、配列番号1に示されるヌクレオチド配列のすべてではなくとも大部分に対応するDNAフラグメントもまた、DNAプローブとして有用である。例えば、少なくとも約20nt長のフラグメントとは、寄託されたDNAのヌクレオチド配列または配列番号1に示されるようなヌクレオチド配列由来の20個以上連続した塩基を含むフラグメントを意図する。この文脈において「約(おおよそ)」は、特に示されるサイズ、いずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個(5、4、3、2、または1個)のヌクレオチドだけ大きいかまたは小さなサイズを含む。

【0038】

本発明のDR5ポリヌクレオチドフラグメントの代表的な例としては、例えば、おおよそヌクレオチド1~130、130~180、181~231、232~282、283~333、334~384、385~435、436~486、487~537、538~588、589~639、640~681、682~732、733~753、754~804、805~855、856~906、907~957、958~1008、1009~1059、1060~1098、1099~1149、1150~1200、1201~1251、1252~1302、1303~1353、1354~1362および1363~配列番

号1の末端までの配列、もしくはこれらに対して相補的なDNA鎖、または寄託されたプラスミド中に含まれるcDNAを含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる。この文脈において「約(おおよそ)」は、特に示される範囲、いずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個(5、4、3、2、または1個)のヌクレオチドだけ大きいかまたは小さな範囲を含む。これらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドもまた、本発明によって包含される。

#### 【0039】

本発明はさらに、DR5のドメインをコードする単離された核酸分子を含むか、あるいはそれらからなるポリヌクレオチドに関する。1つの局面では、本発明は、表Iに示されるDR5タンパク質のシート領域をコードする核酸分子を含むか、あるいはそれらからなるポリヌクレオチドを提供する。このようなポリヌクレオチドの代表的な例としては、配列番号2において約-16位~約-2位のアミノ酸残基、約2位~約9位のアミノ酸残基、約60位~約67位のアミノ酸残基、約135位~約151位のアミノ酸残基、約193位~約199位のアミノ酸残基、そして約302位~約310位のアミノ酸残基からなる群から選択される1個、2個、3個、4個、5個、またはそれより多くのアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドをコードする核酸分子が挙げられる。この文脈において「約(おおよそ)」は、特に示される値、これより数個(5、4、3、2、または1個)のアミノ酸残基だけ大きいかまたは小さな値を含む。これらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドもまた、本発明によって包含される。

#### 【0040】

特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドフラグメントは、DR5の機能的活性を示すポリペプチドをコードする。DR5の「機能的活性」を示すポリペプチドとは、完全(全長)DR5ポリペプチドまたは成熟DR5ポリペプチド、ならびにDR5の分泌形態に関連した1以上の既知の機能的活性を示し得るポリペプチドを意味する。このような機能的活性としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 生物学的活性(例えば、ポリペプチドを発現する細胞に

においてアポトーシスを誘導する能力（例えば、実施例5を参照のこと）；抗原性（抗DR5抗体に結合する（すなわち、結合について、DR5ポリペプチドと競合する）能力）、免疫原性（DR5ポリペプチドに結合する抗体を産生する能力）、マルチマーを形成する能力、およびDR5ポリペプチドについてのレセプターまたはリガンドに結合する能力（例えば、TRAIL；Wileyら、*Immunity* 3、673-682（1995））。

#### 【0041】

DR5ポリペプチド、ならびにそれらのフラグメント、改変体、誘導體、およびアナログの機能的活性を、種々の方法によってアッセイし得る。

#### 【0042】

例えば、抗DR5抗体に結合するか、または抗DR5抗体への結合について全長（完全）DR5ポリペプチドと競合する能力についてアッセイする、1つの実施形態では、当該分野で公知の種々のイムノアッセイが使用され得る。このようなアッセイとしては、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合イムノソルベント検定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュイムノアッセイ（例えば、金コロイド、酵素または放射性同位体標識を用いる）、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ（例えば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ）、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどのような技術を用いる競合的および非競合的アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態では、抗体結合は、一次抗体の標識を検出することによって検出される。別の実施形態では、一次抗体は、この一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態では、二次抗体が標識される。多くの手段が、イムノアッセイにおける結合の検出について当該分野で公知であり、そして本発明の範囲内にある。

#### 【0043】

DR5リガンド（例えば、TRAIL）を同定するか、または本発明のポリペプチドフラグメント、改変体、もしくは誘導體が多量体化する能力を評価する別

の実施形態において、結合は、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、ならびにアフィニティブロットティングのような当該分野で周知の手段によってアッセイされ得る。一般には、Phizickyら、Microbiol. Rev. 59:94-123 (1995)を参照のこと。別の実施形態では、その基質へのDR5結合の生理学的相関(シグナル伝達)をアッセイし得る。

#### 【0044】

さらに、本明細書中に記載されるアッセイ(実施例5および6を参照のこと)さもなくば当該分野で公知のアッセイが、DR5ポリペプチドおよびそのフラグメント、改変体、誘導体、およびアナログが、DR5に関連した生物学的活性を誘発する能力(例えば、このポリペプチドを発現する細胞においてアポトーシスを誘導する能力(例えば、実施例5を参照のこと)、およびインビトロまたはインビボにおいて、リガンド(例えば、TRAIL)に結合する能力(例えば、実施例6を参照のこと))を測定するために慣用的に適用され得る。例えば、生物学的活性は、本質的に、以前に記載されたように(Chinnaiyanら、Cell 81:505-512(1995); Boldinら、J. Biol. Chem. 270:7795-8(1995); Kischkelら、EMBO 14:5579-5588(1995); Chinnaiyanら、J. Biol. Chem. 271:4961-4965(1996))、そして以下の実施例5において示されたように実施される細胞死アッセイを使用して、慣用的に測定され得る。MCF7細胞の関与する1つの実施形態では、全長DR5またはレセプターを含む候補細胞死ドメインをコードするプラスミドを、グリーン蛍光タンパク質をコードするpLanternレセプター構築物と共に同時トランスフェクトする。DR5をトランスフェクトされた細胞の核は、DAPI染色によって評価される場合に、アポトーシス形態を示す。

#### 【0045】

他の方法は、当業者に公知であり、そして本発明の範囲内である。

#### 【0046】

本発明の好ましい核酸フラグメントとしては、以下が挙げられるが、これらに

限定されない：DR5細胞外ドメイン（図1のアミノ酸残基約52～約184（配列番号2のアミノ酸残基約1～約133））を含むか、あるいはそれからなるポリペプチド；DR5膜貫通ドメイン（図1のアミノ酸残基約185～約208（配列番号2のアミノ酸残基約134～約157））を含むか、あるいはそれからなるポリペプチド；DR5のシステインリッチドメイン（図1のアミノ酸残基約84～約179（配列番号2の約33～約128））を含むか、あるいはそれからなるポリペプチド；DR5細胞内ドメイン（図1のアミノ酸残基約209～約411（配列番号2のアミノ酸残基約158～約360））を含むか、あるいはそれからなるポリペプチド；推定成熟DR5ポリペプチドのフラグメント（ここで、このフラグメントは、DR5の機能的活性（例えば、抗原性活性または生物学的活性）を有する）を含むか、あるいはそれからなるポリペプチド；膜貫通ドメインのすべてまたは一部分が欠失した、DR5レセプターの細胞外ドメインおよび細胞内ドメインを含むか、あるいはそれからなるポリペプチド；DR5死ドメイン（図1のアミノ酸残基約324～約391（配列番号2の約273～約340））を含むか、あるいはそれからなるポリペプチド；ならびに、DR5レセプタータンパク質の1個、2個、3個、4個、またはそれより多くのエピトープ保有部分を含むか、あるいはそれからなるポリペプチド。さらなる実施形態では、本発明のポリヌクレオチドフラグメントは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、または8個すべての上記メンバーの任意の組合せを含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドをコードする。これらのドメインの位置は、コンピューターグラフィックスによって推定されたので、当業者は、これらのドメインを構成するアミノ酸残基が、各ドメインを規定するために使用された判断基準に依存して、わずかに（例えば、約1～15残基程度）変動し得ることを理解する。これらの核酸分子によってコードされるポリペプチドもまた、本発明によって包含される。

#### 【0047】

図1に開示されるDR5の細胞外システインリッチモチーフの1つまたは両方が、DR5とそのリガンド（例えば、TRAIL）との間の相互作用に重要であると考えられる。従って、本発明の特定の実施形態は、図1に示されるDR5配

列のアミノ酸残基84～131、および/またはアミノ酸残基132～179（配列番号2のアミノ酸残基33～80、および/またはアミノ酸残基81～128）からなる群から選択される、1つまたは両方のアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。特定の実施形態では、本発明のDR5ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、図1に開示される細胞外システインリッチモチーフの両方を含むか、あるいはそれからなる。

#### 【0048】

特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、上記のシステインリッチドメインをコードするポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはそれらからなる。本発明はまた、異種ポリヌクレオチド配列に融合された上記ポリヌクレオチド配列を包含する。これらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドもまた、本発明によって包含される。参照ポリヌクレオチド配列に対するポリヌクレオチド配列のパーセント同一性を測定するための方法は、以下に記載される。

#### 【0049】

別の実施形態では、本発明は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、上記のポリヌクレオチドをコードするシステインリッチドメインに相補的な核酸にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むか、あるいはそれらからなる、単離された核酸分子を提供する。本明細書中で使用される場合、句「ストリンジェントな条件」の意味は、以下に説明される。このようなポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドもまた、本発明によって包含される。

#### 【0050】

本発明の好ましい核酸フラグメントは、アミノ末端メチオニンをコードするヌクレオチドを欠く全長DR5ポリペプチド（配列番号1のヌクレオチド130～132）をコードする。なぜなら、メチオニンは天然で切断されることが公知であり、そしてこのような配列は、DR5発現ベクターを遺伝子操作するにおいておそらく有用であるからである。このようなポリヌクレオチドによってコードさ

れるポリペプチドもまた、本発明によって意図される。

#### 【0051】

さらなる実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、DR5の機能的特性をコードする。この点に関して、本発明の好ましい実施形態は、1、2、3、4、またはそれより多くの以下の機能ドメインを含むか、あるいはそれらからなるフラグメントを含む：DR5の $\alpha$ -ヘリックスおよび $\beta$ -ヘリックス形成領域（「 $\alpha$ -領域」）、 $\alpha$ -シートおよび $\beta$ -シート形成領域（「 $\beta$ -領域」）、ターンおよびターン形成領域（「ターン-領域」）、コイルおよびコイル形成領域（「コイル-領域」）、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、可撓性領域、表面形成領域および高抗原性指標領域。

#### 【0052】

上記のように、図3および/または表Iに示されるDR5の構造的特性もしくは機能的特性を表わすデータを、デフォルトパラメータに設定したDNA\*STARの種々の同定されたモジュールおよびアルゴリズムを使用して作成した。好ましい実施形態において、表Iの欄VII、IX、XII、およびXIVに示されるデータを使用して、抗原性について高い程度の可能性を示すDR5の領域を決定し得る。高抗原性の領域は、抗原認識が免疫応答の開始のプロセスにおいて生じ得る環境で、ポリペプチドの表面に露出される可能性が高いポリペプチドの領域を示す値を選択することによって、欄VII、IX、XII、および/またはXIVに示されるデータから決定される。

#### 【0053】

これらに関して特定の好ましい領域を図3に示すが、これは、表Iに示されるように、図3に示されるデータの表計算表示を使用することによって、提示または同定されてもよい。図3を作成するために使用されたDNA\*STARコンピュータアルゴリズム（最初のデフォルトパラメータに設定された）を使用して、表計算形式（表Iを参照のこと）で図3のデータを示した。図3におけるデータの表計算形式を使用して、好ましい領域の特定の境界を容易に決定し得る。

#### 【0054】

図3および表Iに示される上記の好ましい領域は、配列番号2に示されるアミ

ノ酸配列の分析によって同定される上述の型の領域を含むが、これらに限定されない。図3および表Iに示されるように、そのような好ましい領域としては、Garnier-Robson - 領域、 - 領域、ターン - 領域、およびコイル - 領域 (表Iにおける欄I、III、V、およびVII)、Chou-Fasman - 領域、 - 領域、およびターン - 領域 (表Iにおける欄II、IV、およびVI)、Kyte-Doolittle 親水性領域 (表Iの欄VIII)、Hopp-Woods 疎水性領域 (表Iの欄IX)、Eisenberg - 両親媒性領域およびEisenberg - 両親媒性領域 (表Iにおける欄XおよびXI)、Karplus-Schulz 可撓性領域 (表Iの欄XII)、高抗原性指標のJameson-Wolf 領域 (表Iの欄XIII)、およびEmini 表面形成領域 (表Iの欄XIV) が挙げられる。

【0055】

【表1】

表 I  
残基位置

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Met	A	.	.	.	.	.	.	1.11	-0.70	.	.	*	.	1.29	2.18
Glu	A	.	.	.	.	.	.	1.50	-0.70	.	.	*	.	1.63	1.69
Gln	A	.	.	.	.	T	.	1.89	-0.73	.	.	*	.	2.17	2.28
Arg	.	.	.	.	T	T	.	1.69	-0.76	.	.	*	.	2.91	3.71
Gly	.	.	.	.	T	T	.	1.87	-0.87	.	.	*	F	3.40	2.17
Gln	.	.	.	.	T	T	.	1.88	-0.44	.	.	*	F	2.76	1.93
Asn	.	.	.	.	.	.	C	1.29	-0.34	.	.	*	F	1.87	1.00
Ala	.	.	.	.	.	.	C	0.99	0.16	.	.	*	F	1.08	1.02
Pro	.	.	.	.	.	.	.	0.53	0.11	.	.	*	.	0.44	0.79
Ala	A	.	.	.	.	.	.	0.29	0.14	.	.	*	.	-0.10	0.48
Ala	A	.	.	.	.	T	.	0.40	0.24	.	.	*	.	0.10	0.48
Ser	A	.	.	.	.	T	.	0.44	-0.26	.	.	*	F	0.85	0.61
Gly	A	.	.	.	.	T	.	1.14	-0.69	.	.	*	F	1.30	1.22
Ala	A	.	.	.	.	T	.	1.32	-1.19	.	.	*	F	1.30	2.36
Arg	A	.	.	.	T	.	.	1.57	-1.19	.	.	*	F	1.50	2.39
Lys	.	.	.	.	T	.	.	1.94	-1.14	.	.	*	F	1.50	2.39
Arg	.	.	.	.	T	.	.	1.90	-1.14	.	.	*	F	1.80	3.66
His	.	.	.	.	T	.	.	2.03	-1.21	*	.	*	F	1.90	1.85
Gly	.	.	.	.	.	T	C	2.73	-0.79	*	.	*	F	2.40	1.43
Pro	.	.	.	.	.	T	C	2.62	-0.79	*	.	*	F	2.70	1.43
Gly	.	.	.	.	.	T	C	1.99	-0.79	*	.	*	F	3.00	1.82
Pro	.	.	.	.	.	T	C	1.99	-0.79	.	.	*	F	2.70	1.86
Arg	.	A	.	.	.	.	C	1.68	-1.21	*	.	.	F	2.30	2.35
Glu	.	A	B	.	.	.	.	1.43	-1.21	*	.	.	F	2.10	2.35
Ala	.	A	.	.	T	.	.	1.76	-1.14	*	.	.	F	2.50	1.54
Arg	.	A	.	.	T	.	.	1.89	-1.57	*	.	.	F	2.50	1.54
Gly	.	.	.	.	T	.	.	1.76	-1.14	*	.	.	F	3.00	1.37
Ala	.	.	.	.	T	.	C	1.43	-0.71	*	.	*	F	2.70	1.35
Arg	.	.	.	.	.	T	C	1.54	-0.79	*	.	*	F	2.66	1.06
Pro	.	.	.	.	.	T	C	1.28	-0.79	*	.	*	F	2.62	2.10
Gly	.	.	.	.	.	T	C	0.96	-0.57	*	.	*	F	2.58	1.54
Pro	.	.	.	.	.	T	C	1.34	-0.64	*	.	*	F	2.54	1.22

表 I (続き1)

残基位置

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Arg	.	.	.	.	.	.	C	1.62	-0.64	*	*	*	F	2.60
Val	.	.	.	.	.	.	C	0.70	-0.59	*	*	*	F	2.34
Pro	.	.	B	.	.	.	.	0.06	-0.33	*	*	*	F	1.58
Lys	.	.	B	B	.	.	.	-0.41	-0.11	*	.	.	F	0.97
Thr	.	.	B	B	.	.	.	-1.06	0.57	*	*	*	F	-0.19
Leu	.	.	B	B	.	.	.	-2.02	0.57	*	*	*	F	-0.60
Val	.	.	B	B	.	.	.	-1.76	0.79	.	.	.	.	-0.60
Leu	A	.	.	B	.	.	.	-2.13	1.29	.	.	.	.	-0.60
Val	A	.	.	B	.	.	.	-3.03	1.30	.	.	.	.	-0.60
Val	A	.	.	B	.	.	.	-3.53	1.26	.	.	.	.	-0.60
Ala	A	.	.	B	.	.	.	-3.53	1.30	.	.	.	.	-0.60
Ala	A	.	.	B	.	.	.	-3.49	1.30	.	.	.	.	-0.60
Val	A	.	.	B	.	.	.	-3.53	1.34	.	.	.	.	-0.60
Leu	A	.	.	B	.	.	.	-2.98	1.34	.	.	.	.	-0.60
Leu	A	.	.	B	.	.	.	-2.71	1.23	.	.	.	.	-0.60
Leu	A	.	.	B	.	.	.	-2.12	1.23	.	.	.	.	-0.60
Val	A	.	.	B	.	.	.	-1.83	0.59	.	.	.	.	-0.60
Ser	A	.	.	B	.	.	.	-1.57	0.29	.	*	.	.	-0.30
Ala	A	A	.	.	.	.	.	-1.57	0.10	.	.	.	.	-0.30
Glu	A	A	.	.	.	.	.	-1.64	0.10	.	.	.	.	-0.30
Ser	A	A	.	B	.	.	.	-1.14	0.14	.	.	.	.	-0.30
Ala	A	A	.	B	.	.	.	-0.29	0.24	.	.	.	.	-0.30
Leu	A	A	.	B	.	.	.	0.01	0.14	.	.	.	.	-0.30
Ile	A	A	.	B	.	.	.	0.60	0.54	.	.	.	.	-0.60
Thr	A	A	.	B	.	.	.	-0.21	0.16	.	.	.	F	-0.15
Gln	A	A	.	B	.	.	.	-0.50	0.34	.	.	.	F	-0.15
Gln	A	A	.	B	.	.	.	-0.12	0.16	.	.	.	F	0.00
Asp	A	A	.	B	T	.	.	0.69	-0.10	.	.	.	F	1.00
Leu	.	A	.	B	.	.	.	1.58	-0.19	.	*	.	F	0.80
Ala	.	A	.	.	.	.	.	2.00	-0.19	.	*	.	F	0.80
Pro	.	A	.	.	.	.	C	1.41	-0.59	.	*	.	F	1.10
Gln	.	A	.	.	T	.	.	0.82	-0.09	.	*	.	F	1.00

表 I (続き2)  
残基位置

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Gln	65	A	.	.	.	.	.	0.61	-0.27	.	.	*	F	0.60
Arg	66	A	.	.	.	.	.	1.42	-0.34	-	.	*	F	0.60
Ala	67	A	.	.	.	.	.	2.01	-0.37	.	.	*	F	0.94
Ala	68	A	.	.	.	.	.	2.27	-0.37	*	.	*	F	1.28
Pro	69	A	.	.	T	.	.	2.38	-0.77	*	.	*	F	1.92
Gln	70	A	.	.	T	T	.	2.08	-0.77	*	.	.	F	2.66
Gln	71	.	.	.	T	T	.	1.67	-0.89	*	.	*	F	3.40
Lys	72	.	.	.	T	T	.	2.04	-1.00	.	.	.	F	5.58
Arg	73	.	.	.	T	T	.	2.33	-1.00	.	.	.	F	4.84
Ser	74	.	.	.	T	C	.	2.54	-1.01	.	.	.	F	2.97
Ser	75	.	.	.	T	C	.	2.20	-1.41	.	.	.	F	4.32
Pro	76	.	.	.	T	.	.	2.59	-0.99	.	.	.	F	2.68
Ser	77	.	.	.	T	.	.	1.39	-0.99	.	.	.	F	2.59
Glu	78	.	.	.	T	T	.	0.68	-0.30	.	.	.	F	2.70
Gly	79	.	.	.	T	T	.	0.36	-0.11	.	.	.	F	1.46
Leu	80	.	.	.	T	.	.	0.44	-0.07	.	.	.	F	2.50
Cys	81	.	.	.	T	.	.	0.40	-0.07	.	.	.	F	0.90
Pro	82	.	.	.	T	.	.	0.58	-0.03	.	.	.	F	2.25
Pro	83	.	.	.	T	T	.	0.84	0.47	*	.	.	F	0.36
Gly	84	.	.	.	T	T	.	-0.04	0.54	*	.	.	F	1.55
His	85	.	.	.	T	T	.	0.00	0.54	*	.	.	F	0.95
His	86	.	.	.	T	T	.	0.81	0.36	*	.	.	F	0.24
Ile	87	.	.	.	.	.	.	1.48	-0.07	*	.	.	F	0.15
Ser	88	.	.	.	.	.	.	1.34	-0.50	*	.	.	F	0.33
Glu	89	.	.	.	T	.	.	1.67	-0.50	*	.	.	F	0.35
Asp	90	.	.	.	T	.	.	2.01	-1.00	*	.	.	F	0.20
Gly	91	.	.	.	T	T	.	1.38	-1.50	*	.	.	F	0.70
Arg	92	.	.	.	T	T	.	0.52	-1.61	*	.	.	F	0.61
Asp	93	.	.	.	T	T	.	1.11	-1.31	*	.	.	F	0.70
Cys	94	.	.	.	T	T	.	0.74	-0.93	.	.	.	F	1.19
Ile	95	.	.	.	T	T	.	0.79	-0.36	.	.	.	F	1.53
Ser	96	.	.	.	T	.	.	0.54	-0.79	.	.	.	F	0.84
					T	.	.	0.54	-0.03	.	.	.	F	2.52
					T	.	.						F	1.21
					T	.	.						F	2.86
					T	.	.						F	3.40
					T	.	.						F	1.15
					T	.	.						F	2.88
					T	.	.						F	2.91
					T	.	.						F	0.47
					T	.	.						F	2.57
					T	.	.						F	0.37
					T	.	.						F	1.78
					T	.	.						F	0.20
					T	.	.						F	1.54
					T	.	.						F	0.21
					T	.	.						F	1.18
					T	.	.						F	0.19

表 I (続表3)

残基	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Cys 97	.	.	.	.	T	T	.	0.43	0.40	.	*	*	.	0.76
Lys 98	.	.	.	.	T	T	.	0.43	0.23	.	.	.	.	1.34
Tyr 99	.	.	.	.	T	T	.	0.86	-0.46	.	*	*	.	2.52
Gly 100	.	.	.	.	T	T	.	1.44	-0.09	.	*	F	F	2.80
Gln 101	.	.	.	.	T	T	.	1.43	-0.27	*	.	F	F	2.52
Asp 102	.	.	.	.	T	T	.	2.07	0.21	*	*	F	F	1.64
Tyr 103	.	.	.	.	T	T	.	1.73	-0.04	*	*	F	F	1.96
Ser 104	.	.	.	.	T	T	.	1.98	0.44	*	.	F	F	0.78
Thr 105	.	.	.	.	T	T	.	2.32	0.44	*	.	F	F	0.30
His 106	.	.	.	.	T	T	.	1.51	0.44	*	.	.	.	0.15
Trp 107	.	.	.	.	T	T	.	0.70	0.37	*	.	.	.	0.65
Asn 108	.	.	.	.	T	T	.	0.24	0.67	*	.	.	.	0.20
Asp 109	.	.	.	.	T	T	.	-0.12	0.97	*	.	.	.	0.20
Leu 110	A	.	.	.	T	T	.	-0.62	1.04	*	*	.	.	-0.20
Leu 111	.	.	.	B	T	T	.	-0.48	0.81	*	*	.	.	-0.20
Phe 112	.	.	.	B	T	T	.	-0.86	0.41	*	*	.	.	-0.20
Cys 113	.	.	.	B	T	T	.	-1.17	0.99	*	*	.	.	-0.20
Leu 114	.	.	.	B	T	T	.	-1.06	0.79	*	*	.	.	-0.20
Arg 115	.	.	.	B	T	T	.	-0.91	0.10	.	*	.	.	0.10
Cys 116	.	.	.	B	T	T	.	-0.10	-0.11	.	.	.	.	0.70
Thr 117	.	.	.	B	T	T	.	0.30	-0.69	.	*	.	.	1.00
Arg 118	.	.	.	B	T	T	.	0.62	-0.99	.	.	F	F	1.49
Cys 119	.	.	.	.	T	T	.	1.43	-0.56	*	.	F	F	2.23
Asp 120	.	.	.	.	T	T	.	0.47	-1.13	*	.	F	F	2.57
Ser 121	.	.	.	.	T	T	.	1.13	-0.97	.	*	F	F	2.91
Gly 122	.	.	.	.	T	T	.	0.63	-0.97	.	*	F	F	3.40
Glu 123	.	A	.	.	T	T	.	0.22	-0.86	.	*	F	F	2.51
Val 124	A	A	.	.	T	T	.	0.68	-0.47	.	*	F	F	1.47
Glu 125	.	A	.	.	T	T	.	0.01	-0.43	.	*	.	.	1.38
Leu 126	.	A	.	.	T	T	.	0.00	-0.29	.	*	.	.	1.04
Ser 127	.	.	.	.	T	T	C	0.03	0.20	.	*	F	F	0.45
Pro 128	.	.	.	.	T	T	.	-0.28	0.04	.	*	F	F	0.93
Cys 129	.	.	.	.	T	T	.	0.69	0.53	.	*	F	F	0.91

表 I (続き4)

残基	位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Thr	130	.	.	.	.	T	T	.	0.69	-0.16	.	.	*	F	2.24
Thr	131	.	.	.	.	T	T	.	1.19	-0.14	.	.	*	F	2.32
Thr	132	.	.	.	.	T	T	.	0.63	-0.09	.	.	*	F	2.80
Arg	133	.	.	.	.	T	T	.	0.18	-0.01	.	.	*	F	2.52
Asn	134	.	.	.	.	T	T	.	0.84	0.07	.	.	*	F	1.49
Thr	135	.	.	.	.	T	T	.	0.49	-0.01	.	.	*	F	1.81
Val	136	.	.	.	.	T	T	C	0.80	0.07	*	.	*	.	0.58
Cys	137	.	A	.	.	T	.	.	1.11	0.07	*	.	*	.	0.10
Gln	138	.	A	B	.	T	.	.	0.66	-0.33	*	.	*	.	0.30
Cys	139	.	A	.	.	T	.	.	0.34	-0.39	.	.	*	.	0.70
Glu	140	A	A	.	.	.	.	.	-0.04	-0.54	*	.	*	F	0.75
Glu	141	A	A	.	.	.	.	.	0.92	-0.33	*	.	*	F	0.45
Gly	142	.	A	.	.	T	.	.	1.59	-0.73	.	.	*	F	1.30
Thr	143	A	A	.	.	.	.	.	1.59	-1.30	.	.	*	F	0.90
Phe	144	A	A	.	.	.	.	.	2.26	-1.30	.	.	*	F	0.90
Arg	145	A	A	.	.	.	.	.	1.96	-1.30	.	.	*	F	0.90
Glu	146	A	A	.	.	.	.	.	1.74	-1.34	.	.	*	F	0.90
Glu	147	A	A	.	.	.	.	.	2.09	-1.40	.	.	*	F	0.90
Asp	148	A	A	.	.	.	.	.	1.80	-2.19	.	.	*	F	0.90
Ser	149	A	A	.	.	.	.	.	1.83	-1.57	.	.	*	F	0.90
Pro	150	A	.	.	.	.	T	.	1.83	-1.00	.	.	*	F	1.30
Glu	151	A	.	.	.	.	T	.	1.88	-1.00	*	.	*	F	1.15
Met	152	A	.	.	.	.	T	.	1.21	-1.00	*	.	*	.	1.49
Cys	153	A	.	.	.	.	T	.	1.32	-0.81	*	.	*	.	1.68
Arg	154	A	.	.	.	.	T	.	1.31	-1.24	*	.	*	.	2.02
Lys	155	.	.	.	.	T	T	.	1.18	-0.76	*	.	*	F	2.91
Cys	156	.	.	.	.	T	T	.	0.51	-0.94	*	.	*	F	3.40
Arg	157	.	.	.	.	T	T	.	0.90	-0.94	*	.	*	F	2.71
Thr	158	.	.	.	.	T	.	.	1.68	-0.51	*	.	*	F	2.37
Gly	159	.	.	.	.	T	.	.	1.22	-0.51	*	.	*	F	2.43
Cys	160	.	.	.	.	T	T	C	0.58	-0.66	.	.	*	F	2.19
Pro	161	.	.	.	.	T	T	.	0.39	-0.04	.	.	*	F	2.00
Arg	162	.	.	.	.	T	T	.	0.32	0.11	.	.	*	F	1.65

表 I (続き)

残基位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Gly 163	.	.	.	.	T	T	.	-0.22	-0.31	*	*	*	.	2.50
Met 164	.	.	B	B	.	.	.	-0.22	-0.24	*	*	*	.	1.30
Val 165	.	.	B	B	.	.	.	0.44	-0.24	*	*	*	.	1.30
Lys 166	.	.	B	B	.	.	.	-0.01	-0.24	*	*	*	.	1.30
Val 167	.	.	B	.	.	T	.	-0.43	-0.10	*	*	*	F	1.85
Gly 168	.	.	.	.	T	T	.	-0.30	-0.23	.	.	.	F	2.25
Asp 169	.	.	.	.	T	T	.	0.01	-0.44	.	.	.	F	2.50
Cys 170	.	.	.	.	T	T	.	0.57	0.47	*	*	*	F	1.35
Thr 171	.	.	.	.	T	T	C	0.52	0.21	.	.	.	F	1.20
Pro 172	.	.	.	.	T	T	.	0.49	-0.21	.	.	.	F	1.75
Trp 173	.	.	.	.	T	T	.	0.83	0.47	.	*	*	F	0.60
Ser 174	A	.	.	.	T	T	.	0.17	-0.10	.	*	*	F	1.00
Asp 175	A	A	.	.	.	.	.	-0.02	-0.01	.	.	.	F	0.45
Ile 176	A	A	.	.	.	.	.	0.26	0.20	*	*	*	.	-0.30
Glu 177	A	A	.	.	.	.	.	0.51	-0.21	*	.	.	.	0.30
Cys 178	A	A	.	.	.	.	.	0.80	-0.60	*	*	*	.	0.60
Val 179	A	A	.	.	.	.	.	0.80	-0.60	*	*	*	.	0.60
His 180	A	A	.	.	.	.	.	0.46	-0.90	.	*	*	.	0.60
Lys 181	A	A	.	.	.	.	.	0.46	-0.47	*	.	.	F	0.60
Glu 182	A	.	.	.	.	T	.	-0.43	-0.36	*	.	.	F	1.00
Ser 183	A	.	.	.	.	T	.	-0.66	-0.31	.	.	.	F	0.85
Gly 184	A	.	.	.	T	T	.	-0.14	-0.13	.	.	.	F	1.25
Ile 185	A	.	.	.	T	T	.	-0.97	0.30	.	.	.	.	0.10
Ile 186	.	.	B	B	.	.	.	-1.32	0.94	.	*	*	.	-0.60
Ile 187	.	.	B	B	.	.	.	-2.18	1.04	.	.	.	.	-0.60
Gly 188	.	.	B	B	.	.	.	-2.47	1.26	.	*	*	.	-0.60
Val 189	.	.	B	B	.	.	.	-2.71	1.07	.	*	*	.	-0.60
Thr 190	A	.	.	B	.	.	.	-2.68	0.89	.	*	*	.	-0.60
Val 191	A	.	.	B	.	.	.	-2.64	0.84	.	.	.	.	-0.60
Ala 192	A	.	.	B	.	.	.	-2.57	1.06	.	*	*	.	-0.60
Ala 193	A	.	.	B	.	.	.	-3.11	1.10	.	.	.	.	-0.60
Val 194	A	.	.	B	.	.	.	-3.11	1.30	.	.	.	.	-0.60
Val 195	A	.	.	B	.	.	.	-3.39	1.30	.	.	.	.	-0.60

表 I (続き6)

残基位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Leu 196	A	.	.	B	.	.	.	-3.39	1.30	.	.	.	.	-0.60
Ile 197	A	.	.	B	.	.	.	-3.50	1.44	.	.	.	.	-0.60
Val 198	A	.	.	B	.	.	.	-3.77	1.59	.	.	.	.	-0.60
Ala 199	A	.	.	B	.	.	.	-3.58	1.59	.	.	.	.	-0.60
Val 200	A	.	.	B	.	.	.	-2.68	1.47	.	.	.	.	-0.60
Phe 201	A	.	.	B	.	.	.	-2.17	0.79	.	.	.	.	-0.60
Val 202	A	.	.	B	.	.	.	-2.09	0.53	.	.	.	.	-0.60
Cys 203	A	.	.	.	.	T	.	-2.04	0.71	.	.	.	.	-0.20
Lys 204	A	.	.	.	.	T	.	-1.74	0.76	.	.	.	.	-0.20
Ser 205	A	.	.	.	.	T	.	-0.84	0.89	.	.	.	.	-0.20
Leu 206	A	.	.	.	.	T	.	-0.10	0.24	.	.	.	.	0.10
Leu 207	A	A	.	.	.	.	.	-0.10	-0.33	.	.	.	.	0.30
Trp 208	A	A	.	.	.	.	.	-0.24	0.31	.	.	.	.	-0.30
Lys 209	A	A	.	.	.	.	.	-0.50	0.61	.	.	.	.	-0.60
Lys 210	A	A	.	.	.	.	.	-0.44	0.36	*	.	.	.	-0.30
Val 211	A	A	.	.	.	.	.	-0.44	0.43	*	*	.	.	-0.45
Leu 212	.	A	B	.	.	.	.	0.41	0.20	*	*	.	.	-0.30
Pro 213	.	A	B	.	.	.	.	0.36	0.20	*	.	.	.	-0.30
Tyr 214	.	.	.	B	T	.	.	-0.58	0.63	*	.	.	.	-0.20
Leu 215	.	.	.	B	T	.	.	-1.29	0.67	*	*	.	.	-0.20
Lys 216	.	.	.	B	T	.	.	-0.73	0.56	*	*	.	.	-0.20
Gly 217	.	.	B	B	.	.	.	-0.27	0.51	*	.	.	.	-0.60
Ile 218	.	.	B	B	.	.	.	-0.40	0.19	*	.	.	.	-0.30
Cys 219	.	.	B	.	.	T	.	-0.50	-0.07	*	.	.	.	0.70
Ser 220	.	.	.	.	T	T	.	-0.03	0.36	.	*	.	F	0.65
Gly 221	.	.	.	.	T	T	.	-0.08	0.36	.	.	.	F	0.65
Gly 222	.	.	.	.	T	T	.	0.06	-0.33	.	.	.	F	1.25
Gly 223	.	.	.	.	T	.	C	0.94	-0.47	.	.	.	F	0.85
Gly 224	.	.	.	.	.	.	C	1.72	-0.86	*	.	.	F	1.15
Asp 225	.	.	.	.	.	T	C	1.17	-1.29	*	*	.	F	1.50
Pro 226	.	.	.	.	.	T	C	1.51	-1.07	*	.	.	F	1.84
Glu 227	.	.	B	.	.	T	C	1.97	-1.50	*	.	.	F	1.98
Arg 228	.	.	B	.	.	T	.	2.01	-1.93	*	.	.	F	2.32

表 I (続き 7)

残基位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Val	229	.	.	.	T	.	.	2.06	-1.54	*	.	.	F	2.86
Asp	230	.	.	.	T	T	.	2.06	-1.59	*	.	.	F	3.40
Arg	231	.	.	.	T	T	.	2.38	-1.19	*	*	.	F	3.06
Ser	232	.	.	.	T	T	.	2.17	-1.19	*	.	.	F	2.72
Ser	233	.	.	.	T	T	.	1.71	-1.40	*	*	.	F	2.72
Gln	234	.	.	.	.	T	C	1.98	-0.97	*	*	.	F	2.32
Arg	235	.	.	.	.	T	C	1.98	-0.47	*	*	.	F	2.22
Pro	236	.	.	.	.	T	C	1.87	-0.86	*	*	.	F	2.86
Gly	237	.	.	.	T	T	.	2.17	-1.24	.	*	.	F	3.40
Ala	238	.	.	.	.	T	C	1.61	-1.24	.	*	.	F	2.86
Glu	239	A	.	.	.	.	.	0.80	-0.60	.	*	.	F	1.97
Asp	240	A	.	.	.	.	.	0.69	-0.34	.	*	.	F	1.33
Asn	241	A	.	.	.	.	.	0.90	-0.37	*	.	.	.	0.99
Val	242	A	.	.	.	.	.	0.36	-0.87	*	.	.	.	1.05
Leu	243	A	.	.	.	.	.	0.09	-0.19	*	.	.	.	0.50
Asn	244	A	.	B	.	.	.	-0.21	0.46	*	.	.	.	0.44
Glu	245	A	.	B	.	.	.	-1.10	0.44	*	.	.	.	0.20
Ile	246	A	.	B	.	.	.	-1.91	0.49	*	.	.	.	0.37
Val	247	A	.	B	.	.	.	-1.06	0.49	*	.	.	.	0.31
Ser	248	.	B	B	.	.	.	-0.46	0.49	*	.	.	.	0.16
Ile	249	.	B	B	.	.	.	-0.77	0.91	*	.	.	.	0.16
Leu	250	.	.	B	.	.	C	-0.77	0.71	.	.	.	.	0.35
Gln	251	.	.	.	.	T	C	-0.73	0.47	.	.	.	F	0.15
Pro	252	.	.	.	.	T	C	-0.09	0.73	.	.	.	F	0.15
Thr	253	.	.	.	.	T	C	0.21	0.47	.	.	.	F	0.30
Gln	254	.	.	.	.	T	C	1.10	-0.21	.	.	.	F	1.20
Val	255	.	A	.	.	.	C	1.91	-0.21	.	.	.	F	0.80
Pro	256	.	A	.	.	.	C	1.31	-0.64	.	.	.	F	1.10
Glu	257	A	A	.	.	.	.	1.52	-0.51	.	*	.	F	0.90
Gln	258	A	A	.	.	.	.	0.98	-0.91	.	*	.	F	0.90
Glu	259	A	A	.	.	.	.	0.98	-0.91	.	*	.	F	0.90
Met	260	A	A	.	.	.	.	1.83	-0.94	.	*	.	F	0.90
Glu	261	A	A	.	.	.	.	1.83	-0.94	.	*	.	.	0.75

表 I (続き8)

残基	位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Val	262	A	A	.	.	.	.	.	1.24	-0.91	.	.	*	F	0.90
Gln	263	A	A	.	.	.	.	.	1.24	-0.41	.	.	*	F	0.60
Glu	264	A	A	.	.	.	.	.	1.03	-1.03	.	.	*	F	0.90
Pro	265	A	A	.	.	.	.	.	1.32	-0.60	.	.	*	F	1.18
Ala	266	A	A	.	.	.	.	.	0.98	-0.76	.	.	*	F	1.46
Glu	267	A	.	.	.	.	T	.	0.98	-0.73	.	.	*	F	2.14
Pro	268	A	.	.	.	.	T	.	0.98	-0.09	.	.	.	F	1.97
Thr	269	.	.	.	.	T	T	.	0.38	-0.11	.	.	.	F	2.80
Gly	270	A	.	.	.	T	T	.	-0.22	0.00	.	.	.	F	1.37
Val	271	A	.	.	.	.	.	.	0.07	0.69	.	.	.	.	0.44
Asn	272	.	.	B	.	.	.	.	-0.14	0.64	.	.	.	.	0.16
Met	273	.	.	B	.	.	.	.	-0.28	0.59	.	.	.	.	0.18
Leu	274	.	.	.	.	.	.	C	0.03	0.59	.	.	.	.	0.40
Ser	275	.	.	.	.	.	T	C	0.08	-0.06	.	.	.	F	1.95
Pro	276	.	.	.	.	.	T	C	0.93	-0.07	.	.	.	F	2.25
Gly	277	.	.	.	.	.	T	C	0.90	-0.69	.	.	.	F	3.00
Glu	278	A	.	.	.	.	T	.	0.69	-0.87	.	.	.	F	1.92
Ser	279	A	A	.	.	.	.	.	0.69	-0.57	.	.	.	F	1.80
Glu	280	A	A	.	.	.	.	.	0.99	-0.31	.	.	.	F	1.05
His	281	A	A	.	.	.	.	.	0.99	-0.74	.	.	.	F	1.05
Leu	282	A	A	.	.	.	.	.	0.74	-0.31	.	.	.	.	0.30
Leu	283	A	A	.	.	.	.	.	0.74	-0.20	.	.	.	.	0.30
Glu	284	A	A	.	.	.	.	.	0.46	-0.20	.	.	.	F	0.45
Pro	285	A	A	.	.	.	.	.	0.46	-0.20	.	.	.	F	0.45
Ala	286	A	A	.	.	.	.	.	0.60	-0.89	.	.	.	F	0.90
Glu	287	A	A	.	.	.	.	.	1.11	-1.57	.	.	.	F	0.90
Ala	288	A	A	.	.	.	.	.	1.92	-1.19	.	.	.	F	0.90
Glu	289	A	A	.	.	.	.	.	2.03	-1.21	*	.	.	F	0.90
Arg	290	A	A	.	.	.	.	.	2.36	-1.71	*	.	.	F	0.90
Ser	291	A	.	.	.	.	T	.	3.06	-1.71	*	.	.	F	1.30
Gln	292	A	.	.	.	.	T	.	2.24	-2.21	*	.	.	F	1.30
Arg	293	A	.	.	.	.	T	.	2.02	-1.53	.	.	.	F	1.30
Arg	294	A	.	.	.	.	T	.	1.17	-0.84	.	.	.	F	1.30



表 I (続きD)

残基	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Leu	A	A	.	.	.	.	.	0.63	-0.36	*	.	.	.	0.45
Met	A	A	.	.	.	.	.	0.59	-0.59	*	.	.	.	0.60
Arg	A	A	.	.	.	.	.	0.07	-0.16	*	.	.	.	0.30
Lys	A	A	.	.	.	.	.	-0.53	0.10	*	.	.	.	-0.30
Leu	A	A	.	.	.	.	.	-0.32	0.03	*	.	.	.	-0.30
Gly	A	A	.	.	.	.	.	0.49	-0.59	*	.	.	.	0.60
Leu	A	A	.	.	.	.	.	1.09	-0.19	*	.	.	.	0.30
Met	A	A	.	.	.	.	.	0.09	-0.19	*	.	.	.	0.30
Asp	A	A	.	.	.	.	.	0.09	-0.19	*	.	.	F	0.45
Asn	A	A	.	.	.	.	.	0.04	-0.61	*	.	.	F	0.90
Glu	A	A	.	.	.	.	.	-0.20	-0.66	*	.	.	F	0.90
Ile	A	A	.	.	.	.	.	0.66	-0.77	*	.	.	F	0.75
Lys	A	A	.	.	.	.	.	0.67	-0.77	*	.	.	F	0.75
Val	A	A	.	.	.	.	.	0.67	-0.67	*	.	.	.	0.60
Ala	A	A	.	.	.	.	.	0.08	-0.67	*	.	.	.	0.75
Lys	A	A	.	.	.	.	.	-0.51	-0.86	*	.	.	.	1.20
Ala	A	A	.	.	.	.	.	0.03	-0.36	*	.	.	.	0.60
Glu	A	A	.	.	.	.	.	-0.04	-0.57	*	.	.	.	0.30
Ala	A	A	.	.	.	.	.	0.92	-0.57	*	.	.	.	0.60
Ala	A	A	.	.	.	.	.	1.51	-0.57	*	.	.	.	0.60
Gly	A	A	.	.	.	.	.	1.16	-1.07	*	.	.	.	1.07
His	A	A	.	.	.	.	.	0.93	-0.59	*	.	.	.	0.95
Arg	A	A	.	.	.	T	.	0.69	-0.40	*	.	.	.	1.15
Asp	A	A	.	.	.	T	.	0.97	-0.14	*	.	.	F	1.00
Thr	A	A	.	.	.	T	.	0.96	-0.09	*	.	.	F	1.00
Leu	A	A	.	B	.	.	.	0.49	0.03	*	.	.	.	2.02
Tyr	A	A	.	B	.	.	.	-0.37	0.71	*	.	.	.	1.02
Thr	A	A	.	B	.	.	.	-0.43	1.40	*	.	.	.	-0.60
Met	A	A	.	B	.	.	.	-0.72	0.91	*	.	.	.	0.50
Leu	A	A	.	B	.	.	.	-1.27	1.14	*	.	.	.	-0.60
Ile	A	A	.	B	.	.	.	-0.46	1.03	*	.	.	.	0.40
Lys	A	A	.	B	.	.	.	-0.17	0.94	*	.	.	.	-0.60
Trp	A	A	.	B	.	.	.	-0.17	0.33	*	.	.	.	0.33
											*	.	.	0.00
											*	.	.	0.81

表 I (続き II)

残基	位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Val	361	A	.	.	.	.	.	.	0.09	0.13	*	*	*	.	0.45
Asn	362	.	.	.	C	.	T	C	1.01	-0.13	*	*	.	F	1.95
Lys	363	.	.	.	C	.	T	C	1.90	-0.13	*	*	.	F	2.40
Thr	364	.	.	.	C	.	T	C	1.27	-1.04	*	.	.	F	3.00
Gly	365	.	.	.	C	.	T	C	1.26	-1.19	*	.	.	F	2.70
Arg	366	.	.	.	C	T	.	C	1.26	-1.20	*	.	.	F	2.20
Asp	367	.	.	.	C	.	.	C	1.22	-0.56	*	.	.	F	1.55
Ala	368	A	.	.	.	.	.	.	0.87	-0.54	.	.	.	F	1.20
Ser	369	A	.	.	.	.	.	.	0.37	-0.49	.	.	.	.	0.30
Val	370	A	.	.	.	.	.	.	-0.10	0.20	.	.	.	.	-0.30
His	371	A	.	.	.	.	.	.	-0.21	0.89	.	.	.	.	-0.60
Thr	372	A	.	.	.	.	.	.	-0.80	0.39	*	*	*	.	-0.30
Leu	373	A	.	.	.	.	.	.	-0.80	0.50	*	*	*	.	-0.60
Leu	374	A	.	.	.	.	.	.	-1.02	0.54	*	*	*	.	-0.60
Asp	375	A	.	.	.	.	.	.	-0.72	0.04	*	*	*	.	-0.30
Ala	376	A	.	.	.	.	.	.	-0.18	0.04	*	*	*	.	-0.30
Leu	377	A	.	.	.	.	.	.	-0.96	0.04	*	*	*	.	-0.30
Glu	378	A	.	.	.	.	.	.	-0.99	0.04	*	*	*	.	-0.30
Thr	379	A	.	.	.	.	.	.	-0.18	-0.21	*	*	*	.	0.30
Leu	380	A	.	.	.	.	.	.	0.74	-0.21	*	*	*	F	0.45
Gly	381	A	.	.	.	.	.	.	-0.07	-0.71	*	*	*	F	0.90
Glu	382	A	.	.	.	.	.	.	-0.07	-0.71	*	*	*	F	0.75
Arg	383	A	.	.	.	.	.	.	0.79	-0.21	*	*	*	F	0.45
Leu	384	A	.	.	.	.	.	.	0.79	-0.70	*	*	*	F	0.90
Ala	385	A	.	.	.	.	.	.	1.14	-0.99	*	*	*	F	0.90
Lys	386	A	.	.	.	.	.	.	1.07	-1.41	*	*	*	F	0.90
Gln	387	A	.	.	.	.	.	.	1.41	-0.73	*	*	*	F	0.75
Lys	388	A	.	.	.	.	.	.	1.41	-0.73	*	*	*	F	0.90
Ile	389	A	.	.	.	.	.	.	1.27	-1.41	*	*	*	F	0.90
Glu	390	A	.	.	.	.	.	.	1.27	-1.41	*	*	*	F	0.90
Asp	391	A	.	.	.	.	.	.	1.04	-0.73	*	*	*	F	0.90
His	392	A	.	.	.	.	.	.	0.70	-0.44	*	*	*	F	0.45
Leu	393	A	.	.	.	.	.	.	0.40	-0.06	*	*	*	.	0.30
		A	.	.	.	.	.	.	0.01	-0.36	*	*	*	.	0.30

表 I (続き 12)

残基位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Leu 394	A	A	.	.	.	.	.	0.94	0.07	*	*	*	F	-0.15
Ser 395	A	.	.	.	.	T	.	0.24	0.07	*	*	*	F	0.25
Ser 396	A	.	.	.	.	T	.	-0.36	0.36	*	*	*	F	0.25
Gly 397	.	.	.	.	T	T	.	-0.57	0.29	.	.	.	F	0.65
Lys 398	A	.	.	.	.	T	.	-0.57	0.36	.	.	.	F	0.25
Phe 399	A	A	.	.	.	.	.	0.24	0.66	.	.	.	.	-0.60
Met 400	.	A	B	.	.	.	.	0.20	0.27	.	.	*	.	-0.30
Tyr 401	.	A	B	.	.	.	.	0.50	0.27	.	.	*	.	-0.30
Leu 402	A	A	.	.	.	.	.	0.26	0.67	.	.	*	.	-0.60
Glu 403	A	A	.	.	.	.	.	0.21	0.39	.	.	*	.	-0.30
Gly 404	A	.	.	.	.	.	.	0.61	-0.23	.	.	*	F	0.65
Asn 405	A	.	.	.	.	T	.	0.62	-0.60	.	.	*	F	1.30
Ala 406	A	.	.	.	.	T	.	0.27	-0.79	.	*	*	F	1.15
Asp 407	A	.	.	.	.	T	.	0.78	-0.17	.	*	*	F	0.65
Ser 408	A	.	.	.	.	T	.	0.39	-0.21	.	*	*	F	0.85
Ala 409	A	.	.	.	.	.	.	0.34	-0.19	.	*	*	.	0.50
Met 410	A	.	.	.	.	.	.	-0.04	-0.26	.	.	.	.	0.50
Ser 411	A	.	.	.	.	.	.	0.16	0.17	.	.	.	.	-0.10

この点において非常に好ましいフラグメントは、いくつかの構造的特徴（例えば、上記のいくつかの特徴）を組合せるDR5の領域を含むか、またあるいはこれらからなるフラグメントである。本発明の好ましい核酸フラグメントとしてはまた、DR5タンパク質の1個、2個、3個、4個、5個、またはそれより多くのエピトープ保有部分を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチドをコー

ドする核酸分子が挙げられるが、これらに限定されない。特に、本発明のそのような核酸フラグメントとしては、以下のポリペプチドをコードする核酸分子が挙げられる：以下からなる群から選択される1、2、3またはそれより多くのアミノ酸配列を含むか、またあるいはそれらからなるポリペプチド：図1のおよそ62～およそ110のアミノ酸残基（配列番号2のアミノ酸残基およそ11～およそ59）；図1のアミノ酸残基およそ119～およそ164（配列番号2のアミノ酸残基およそ68～およそ113）を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド；図1のアミノ酸残基およそ224～およそ271（配列番号2のアミノ酸残基およそ173～およそ220）を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド；および図1のアミノ酸残基およそ275～370（配列番号2のアミノ酸残基およそ224～およそ319）を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド。本発明者らは、上記ポリペプチドフラグメントが、DR5タンパク質の抗原領域であることを決定した。DR5のタンパク質のそのようなエピートープ保有部分を決定するための方法が、以下に詳細に記載される。この文脈において、「およそ（約）」とは、特に列挙されたいくつか（5、4、3、2または1）のアミノ酸残基だけ大きいかまたは小さい値（単数または複数）を意味する。これらの核酸にコードされるポリペプチドもまた、本発明に含まれる。

#### 【0056】

さらに、本発明は、配列番号1の残基283～1,362、好ましくは283～681のうち、少なくとも約30ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約50ヌクレオチドの任意の部分を含むか、またはこれらからなるポリペプチドを含む。これらのポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドもまた本発明に含まれる。

#### 【0057】

特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、10000kb長未満、50000kb長未満、10000kb長未満、1000kb長未満、500kb長未満、400kb長未満、350kb長未満、300kb長未満、250kb長未満、200kb長未満、175kb長未満、150kb長未満、125kb長未満、100kb長未満、75kb長未満、50kb長未満、40k

b長未満、30kb長未満、25kb長未満、20kb長未満、15kb長未満、10kb長未満、7.5kb長未満、または5kb長未満である。

【0058】

さらなる実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、DR5コード配列の少なくとも15個、少なくとも30個、少なくとも50個、少なくとも100個、または少なくとも250個、少なくとも500個、または少なくとも1000個連続するヌクレオチドを含むか、あるいはそれらからなるが、図1（配列番号1）に示される5'コードヌクレオチドまたは3'コードヌクレオチドに隣接するゲノムDNAのうちの1000kb以下、500kb以下、250kb以下、200kb以下、150kb以下、100kb以下、75kb以下、50kb以下、30kb以下、25kb以下、20kb以下、15kb以下、10kb以下、または5kb以下からなる。さらなる実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、DR5コード配列の少なくとも15個、少なくとも30個、少なくとも50個、少なくとも100個、または少なくとも250個、少なくとも500個、または少なくとも1000個連続するヌクレオチドを含むか、あるいはそれらからなるが、いかなるDR5イントロンの全てまたは一部も含まないか、またはそれらからならない。別の実施形態において、DR5コード配列を含むか、あるいはそれらからなる、核酸は、ゲノム隣接遺伝子（すなわち、ゲノムにおけるDR5遺伝子に対して5'側または3'側）のコード配列を含まない。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、1000個より多く、500個より多く、250個より多く、100個より多く、50個より多く、25個より多く、20個より多く、15個より多く、10個より多く、5個より多く、4個より多く、3個より多く、2個より多く、または1個より多くのゲノム隣接遺伝子のコード配列を含まない。

【0059】

別の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載されるように、本発明の核酸分子におけるポリヌクレオチドの一部に、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むか、あるいはそれらからなる、単離された核酸分子、例えば、配列番号1に示されるコー

ド配列および/または非コード配列(すなわち転写された配列、転写されていない配列)と相補的な配列、ATCC登録番号97920に含まれるcDNAならびにDR5ドメインをコードする配列またはポリヌクレオチドフラグメントを提供する。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、50%ホルムアミド、5×SSC(750mM NaCl、75mM クエン酸三ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸、および20μg/ml 変性剪断サケ精子DNAを含むか、あるいはそれらからなる溶液中で42℃にて一晩インキュベーションし、続いて約65℃において0.1×SSCでそのフィルターを洗浄することが意図される。これらのポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドもまた、本発明に含まれる。

#### 【0060】

ポリヌクレオチドの「部分(一部)」とハイブリダイズするポリヌクレオチドとは、少なくとも参照ポリヌクレオチドの約15ヌクレオチド(nt)、およびより好ましくは少なくとも約20nt、さらにより好ましくは少なくとも約30nt、およびさらにより好ましくは約30~70nt、または80~150nt、あるいは全長とハイブリダイズするポリヌクレオチド(DNAまたはRNAのいずれか)が意図される。「少なくとも約20nt長」のポリヌクレオチドの一部とは、例えば、参照ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列(例えば、寄託されたcDNAまたは配列番号1に示されるヌクレオチド配列)由来の20個以上連続するヌクレオチドを意図する。この文脈において、「およそ(約)」とは、特に列挙されたサイズ(いずれかの末端または両方の末端において、いくつか(5、4、3、2または1)のヌクレオチドだけ大きいかまたは小さいサイズ)を含む。これらは、上記および以下に詳細に議論されるような診断プローブおよびプライマーとしての使用が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0061】

もちろん、ポリA配列(例えば、図1(配列番号1)に示されるDR5cDNAの3'末端ポリ(A)トラクト(tract))、あるいはT(またはU)残基の相補ストレッチにのみハイブリダイズするポリヌクレオチドは、本発明の核

酸の一部とハイブリダイズさせるために使用される本発明のポリヌクレオチドに含まれない。なぜなら、そのようなポリヌクレオチドは、ポリ(A)ストレッチまたはその相補体(例えば、特に、オリゴdTでプライムされたcDNAライブラリーから生成された任意の二本鎖cDNA)を含む任意の核酸分子とハイブリダイズするためである。

#### 【0062】

示されるように、DR5ポリペプチドをコードする本発明の核酸分子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：成熟ポリヌクレオチドのアミノ酸配列を単独でコードする配列；成熟ポリペプチドおよびさらなる配列のコード配列(例えば、アミノ酸リーダー配列または分泌配列(例えば、プレタンパク質配列、もしくはプロタンパク質配列もしくはプレプロタンパク質配列)をコードする配列)；さらなる非コード配列(例えば、転写、mRNAプロセッシング(スプライシング、およびポリアデニル化シグナルを含む)において役割(例えば、リボソーム結合およびmRNAの安定性)を果たす転写された非翻訳配列のようなイントロンおよび非コード5'および3'配列が挙げられるが、これらに限定されない)と共に、上述のさらなるコード配列を含むか、または含まない成熟ポリペプチドのコード配列；さらなるアミノ酸(例えば、さらなる機能性を提供するアミノ酸)をコードするさらなるコード配列。従って、例えばポリペプチドは、マーカー配列(例えば、融合ポリペプチドの精製を促進するペプチドをコードする配列)と融合され得る。本発明のこの局面の特定の好ましい実施形態において、マーカー配列は、ヘキサヒスチジンペプチド(例えば、pQEベクター(Qiagen, Inc.)において提供されるタグ)であり、中でも、これらの多くは市販されている。Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989)に記載されるように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。「HA」タグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する、精製のための有用な別のペプチドであり、これは、Wilsonら、Cell 37:767-778(1984)によって記載されている。以下に議論されるように、他のそのような融合タンパク質としては、N末端またはC末端でFcと融合

されたDR5レセプターが挙げられる。

【0063】

本発明はさらに、本発明の核酸分子の改変体に関し、その改変体は、DR5レセプターの部分、アナログまたは誘導体をコードする。改変体は、例えば、天然の対立遺伝子改変体として天然に存在し得る。「対立遺伝子改変体」によって、生物体の染色体上の所定の遺伝子座を占める遺伝子のいくつかの代替形態の中の一つが意図される。Genes II、Lewin, B. 編、John Wiley & Sons、New York (1985)。天然に存在しない改変体は、当該分野で公知の変異誘発技術を使用して作製され得る。

【0064】

そのような改変体としては、ヌクレオチド置換、欠失または付加によって産生される改変体が挙げられる。置換、欠失または付加は、一つ以上のヌクレオチドを含み得る。これらの改変体は、コード領域、非コード領域または両方において変更され得る。コード領域における変更は、保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失または付加を生じ得る。これらの中で特に好ましいのは、サイレントな置換、付加および欠失であり、これらはDR5レセプターまたはそれら部分の特性ならびに機能的活性を変更しない。この点において特に好ましいのは、保存的置換である。

【0065】

本発明のさらなる実施形態は、以下：(a) 配列番号2のアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(b) アミノ末端メチオニンを欠く(配列番号2のアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c) 配列番号2において、およそ1位~およそ360位アミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(d) ATCC登録番号97920に含まれるcDNAによってコードされるアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなる、DR5ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(e) ATCC登録番号97920に含まれるcDNAによってコードされるアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなる成熟DR5ポリペプチドをコード

するヌクレオチド配列；(f)配列番号2のおよそ1～133位のアミノ酸配列、またはATCC登録番号97920に含まれるcDNAによりコードされるDR5細胞外ドメインを含むか、あるいはそれらからなる、DR5細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列；(g)配列番号2のおよそ33～およそ128位のアミノ酸配列、またはATCC登録番号97920に含まれるcDNAによりコードされるDR5システインリッチドメインを含むか、あるいはそれらからなるDR5システインリッチドメインをコードするヌクレオチド配列；(h)配列番号2のおよそ134～およそ157位のアミノ酸配列、またはATCC登録番号97920に含まれるcDNAによりコードされるDR5膜貫通ドメインを含むか、あるいはそれらからなるDR5膜貫通ドメインをコードするヌクレオチド配列；(i)配列番号2のおよそ158～およそ360位のアミノ酸配列、またはATCC登録番号97920に含まれるcDNAによりコードされるDR5細胞内ドメインを含むか、あるいはそれらからなるDR5細胞内ドメインをコードするヌクレオチド配列；(j)全てまたは一部削除された膜貫通ドメインを有するDR5レセプター細胞外ドメインおよび細胞内ドメインをコードするヌクレオチド配列；(k)配列番号2のおよそ273～およそ340位のアミノ酸配列、またはATCC登録番号97920に含まれるcDNAによりコードされるDR5デスドメインを含むか、あるいはそれらからなるDR5デスドメインをコードするヌクレオチド配列；(l)DR5機能活性(例えば、抗原性活性または生物学的活性)を有する(c)のポリペプチドのフラグメントをコードするヌクレオチド配列；および(m)上記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)、(k)、または(l)におけるヌクレオチド配列のいずれかと相補的なヌクレオチド配列と、少なくとも80%同一、そしてより好ましくは、少なくとも85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%または99%同一である単離された核酸分子を含む。これらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドもまた、本発明によって含まれる。

#### 【0066】

DR5ポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列に、例えば、少なくと

も95%「同一」なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとは、そのポリヌクレオチド配列が、DR5をコードする参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたり5つまでのミスマッチを含み得ることを除いて、そのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、参照配列に対して同一であることを意図する。換言すれば、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、その参照配列のヌクレオチドの5%までが、欠失され得るかまたは別のヌクレオチドで置換され得、あるいは、その参照配列中の総ヌクレオチドの5%までの数のヌクレオチドが、その参照配列に挿入され得る。本明細書に記載されるように、参照(照会(query))配列は、図1(配列番号1)または任意のポリヌクレオチドフラグメント(例えば、本明細書に記載されるようなDR5のN末端および/またはC末端欠失のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド)に示されるような全DR5ヌクレオチド配列であり得る。

#### 【0067】

実際問題として、任意の特定の核酸分子が、例えば、配列番号1に示されるヌクレオチド配列、または寄託されたcDNAのヌクレオチド配列に対して、少なくとも80%同一、85%同一、90%同一、92%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、または99%同一であるか否かは、Bestfitプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix(登録商標)用バージョン8、Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)のような公知のコンピュータプログラムを使用して従来通りに決定され得る。Bestfitは、2つの配列間で相同性の最も高いセグメントを見出すために、SmithおよびWaterman(Advances in Applied Mathematics 2:482-489(1981))の局所的相同性アルゴリズムを使用する。特定の配列が本発明に従う参照配列に対して、例えば、95%同一であるか否かを決定するために、Bestfitまたは任意の他の配列整列プログラムを使用する場合、当然のことながら、同一性のパーセ

ンテージが参照ヌクレオチド配列の全長にわたって計算され、そして参照配列内のヌクレオチドの総数の5%までの相同性におけるギャップが許容されるようにパラメーターを設定する。

【0068】

特定の実施形態では、参照（照会）配列（本発明の配列）と対象配列との間の同一性（全体的な配列整列ともいわれる）は、Brutlagら（Comp. App. Biosci. 6: 237-245 (1990)）のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータープログラムを使用して決定される。同一性パーセントを算定するためにDNA配列のFASTDB整列において使用される好ましいパラメーターは：Matrix=Unitary、k-tuple=4、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=30、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty 0.05、Window Size=500または対象ヌクレオチド配列の長さ（いずれかより短い方）である。この実施形態に従って、同一性パーセントを計算する場合に、FASTDBプログラムが対象配列の5'および3'の短縮を考慮しないという事実を考慮するために、対象配列が、5'または3'欠失のために（内部欠失が理由ではなく）、照会配列より短い場合、手動の補正が結果に対してなされる。照会配列に対して、5'末端または3'末端で短縮化された対象配列について、同一性パーセントは、照会配列の総塩基のパーセントとして、一致/整列されない対象配列の5'および3'である照会配列の塩基の数を計算することによって補正される。ヌクレオチドが一致/整列されるか否かの決定は、FASTDB配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントが、特定のパラメーターを用いて上記のFASTDBプログラムによって算定された同一性パーセントから差し引かれ、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この補正されたスコアが、本実施形態の目的に使用されるものである。FASTDB整列によって示される場合、照会配列と一致/整列されていない、対象配列の5'および3'塩基の外側の塩基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的で算定される。例えば、90塩基の対象配列は、同一

性パーセントを決定するために100塩基の照会配列に整列される。欠失は、対象配列の5'末端で生じ、従って、FASTDB整列は、5'末端の最初の10塩基で一致/整列を示さない。10個の不对合塩基は、配列の10%（一致していない5'および3'末端での塩基の数/照会配列の塩基の総数）を表し、そのため10%は、FASTDBプログラムによって算定される同一性パーセントのスコアから差し引かれる。残りの90塩基が完全に一致する場合は、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例では、90塩基の対象配列が、100塩基の照会配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、その結果、照会と一致/整列しない対象配列の5'または3'の塩基は存在しない。この場合、FASTDBによって算定される同一性パーセントは手動で補正されない。再び、照会配列と一致/整列しない対象配列の5'および3'の塩基のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本実施形態の目的のためにはなされない。

#### 【0069】

本願は、配列番号1に示される核酸配列、寄託されたcDNAの核酸配列またはそのフラグメントに対して、それらがDR5の機能的活性を有するポリペプチドをコードするか否かに関わらず、少なくとも80%同一、85%同一、90%同一、92%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、または99%同一である核酸分子に関する。これらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドはまた、本発明によって包含される。特定の核酸分子が、DR5機能活性を有するポリペプチドをコードしない場合ですら、当業者はこの核酸分子を使用する方法（例えば、ハイブリダイゼーションプローブまたはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーとして）をなお知っているからである。DR5機能活性を有するポリペプチドをコードしない本発明の核酸分子の使用は、特に、（1）cDNAライブラリー中のDR5遺伝子またはその対立遺伝子改変体を単離する工程；（2）Vermaら（Human Chromosomes : A Manual of Basic Techniques、Pergamon Press、New York（1988））に記載されるような、DR5遺伝子の正確な染色体位置を提供するための、分裂中期染色体スプレッド（spread）に対するインサイチュハイブリダイゼーション（例えば、「FIS

H」) ; および ( 3 ) 特定の組織におけるDR5のmRNA発現を検出するためのノーザンブロット分析が挙げられる。

【0070】

しかし、配列番号1に示される核酸配列、寄託されたcDNAの核酸配列、またはそれらのフラグメントに対して、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%または99%同一な配列を有する核酸分子が好ましい。これらは、事実、DR5タンパク質の機能的活性を有するポリペプチドをコードする。「DR5の機能的活性を有するポリペプチド」によって、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるように、本発明のDR5タンパク質(全長(すなわち、完全)タンパク質または好ましくは成熟タンパク質のいずれか)の機能活性と類似する活性(しかし、同一である必要はない)を示すポリペプチドが意図される。例えば、DR5ポリペプチド機能活性は、本明細書中に記載されるポリペプチド配列が完全DR5とマルチマー(例えば、ホモダイマーおよびホモトリマー)を形成して、そしてDR5リガンド(例えば、TRAIL)を結合する能力によって測定され得る。DR5ポリペプチド機能活性はまた、例えば、このポリペプチドを発現している細胞でアポトーシスを誘導する能力を決定することによって測定され得る。これらの機能活性は、本明細書中に記載される技術および当該分野で公知のそれ以外の技術を使用して慣用的に行われ得る。

【0071】

例えば、DR5タンパク質機能活性(例えば、生物学的活性)は、本質的に以前に記載されたように(A.M.Chinnaiyanら、Cell 81:505~512(1995);M.P.Boldinら、J.Biol.Chem.270:7795~8(1995);F.C.Kischkelら、EMBO 14:5579~5588(1995);A.M.Chinnaiyanら、J.Biol.Chem.271:4961~4965(1996))、および以下の実施例5に示されるように行われる細胞死アッセイを使用して測定され得る。MCF7細胞では、全長DR5、または候補となるデスドメイン含有レセプターをコードするプラスミドが、緑色蛍光タンパク質をコードするpLanter reporter構築物とともに同時トランスフェクトされる。DR5をトランス

フェクトされた細胞の核は、DAPI染色によってアッセイされるようなアポトーシスの形態を示す。TNFR-1およびFas/APO-1 (M. Muzioら、Cell 85:817~827 (1996); M. P. Boldinら、Cell 85:803~815 (1996); M. Tewariら、J. Biol. Chem. 270:3255~60 (1995))と同様に、DR5誘導性アポトーシスは、ICE様プロテアーゼのインヒビター (CrmAおよびz-VAD-fmk) によって好ましくはブロックされる。

#### 【0072】

もちろん、遺伝コードの縮重に起因して、当業者は、例えば、寄託されたcDNAの核酸配列、もしくは配列番号1に示される核酸配列、またはそれらのフラグメントに対して、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%または99%同一な配列を有する多くの核酸分子が「DR5タンパク質の機能的活性を有する」ポリペプチドをコードすることを直ちに認識する。事実、これらのヌクレオチド配列の縮重改変体は全て、同じポリペプチドをコードするので、多くの場合において、これは、上記の比較アッセイを行うことなく、なお当業者に明らかである。縮重改変体ではないこのような核酸分子については、妥当な数がまたDR5タンパク質機能活性を有するポリペプチドをコードすることは当該分野でさらに認識される。これは、以下にさらに記載されるように、当業者が、タンパク質機能をあまり有意にもたらずようではないまたはもたらさないようであるかのいずれかであるアミノ酸置換 (例えば、1つの脂肪族アミノ酸を第2の脂肪族アミノ酸と置換すること) を十分認識しているためである。

#### 【0073】

例えば、表現型的にサイレントなアミノ酸置換の作製方法に関するガイダンスは、Bowie, J. U.ら、「Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions」Science 247:1306-1310 (1990)に提供される。ここで、著者らは、タンパク質がアミノ酸置換に驚くほど許容性であることを示す。

## 【0074】

(ポリヌクレオチドアッセイ)

本発明はまた、相補的なポリヌクレオチドを検出するためのDR5ポリヌクレオチド(例えば、診断試薬として)の使用に関する。機能不全と関連するDR5の変異形態の検出は、DR5またはその可溶性形態の発現の低下、過剰発現、または発現の変更から生じる、疾患(例えば、腫瘍または自己免疫疾患など)または疾患に対する感受性の診断を加え得るか、または定義し得る診断ツールを提供する。

## 【0075】

DR5遺伝子に変異を保有する個体は、種々の技術により、DNAレベルで検出され得る。診断のための核酸は、患者の細胞(例えば、血液、尿、唾液、組織生検および剖検材料に由来する)から得られ得る。ゲノムDNAは、検出のために直接使用され得るか、または分析の前に、PCRを用いることにより酵素的に増幅され得る(Saikiら、Nature、324:163-166(1986))。RNAまたはcDNAはまた同じ目的のために使用され得る。例として、DR5をコードする核酸に相補的なPCRプライマーを使用して、DR5の発現および変異を同定および分析し得る。例えば、欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較した際に、増幅産物のサイズの変化により検出され得る。点変異は、放射性標識されたDR5 RNAまたは代替的に、放射性標識されたDR5アンチセンスDNA配列に対して、増幅されたDNAがハイブリダイズすることにより同定され得る。完全に一致した配列は、RNase A消化または融解点の差異により一致しなかった二重鎖から区別され得る。

## 【0076】

参照遺伝子と変異を有する遺伝子との間の配列の差異もまた、直接的なDNA配列決定によって示され得る。さらに、クローニングされたDNAセグメントは、特定のDNAセグメントを検出するプローブとして用いられ得る。このような方法の感度は、PCRまたは別の増幅方法の適切な使用によって大いに増強され得る。例えば、配列決定プライマーは、改変PCRによって作製された、二本鎖PCR産物または一本鎖鋳型分子を用いて使用される。配列の決定は、放射性標

識ヌクレオチドを用いる従来の手順によってか、または蛍光タグを用いる自動配列決定手順によって行われる。

【0077】

DNA配列の差異に基づく遺伝子試験は、変性剤を含むか、または含まないゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動度における変化の検出により達成され得る。小さな配列の欠失および挿入は、高い分解能のゲル電気泳動により可視化され得る。異なる配列のDNAフラグメントは、異なるDNAフラグメントの移動度が、それらの特異的な融解温度または部分融解温度により異なる位置でゲルにおいて遅延される変性ホルムアミド勾配ゲルにおいて区別され得る（例えば、Myersら、Science、230:1242(1985)を参照のこと）。

【0078】

特定の位置での配列変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、RNaseおよびS1保護、または化学切断方法）により明らかにされ得る（例えば、Cottonら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、85:4397-4401(1985)）。

【0079】

従って、特定のDNA配列の検出は、例えば、ハイブリダイゼーション、RNase保護、化学切断、直接DNA配列決定または制限酵素の使用（例えば、制限フラグメント長多型（「RFLP」）、およびゲノムDNAのサザンブロットイング）を含むが、これらに限定されない方法により達成され得る。

【0080】

より従来のゲル電気泳動およびDNA配列決定に加えて、変異はまた、インサイチュ分析により検出され得る。

【0081】

（ベクターおよび宿主細胞）

本発明はまた、本発明のDNA分子を含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作された宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生に関する。

## 【0082】

宿主細胞は、遺伝子操作されて核酸分子を組み込み得、そして本発明のポリペプチドを発現し得る。ポリヌクレオチドは、単独または他のポリヌクレオチドと共に導入され得る。このような他のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドから独立して導入されるか、本発明のポリペプチドと共に導入されるか、または本発明のポリペプチドに結合して導入され得る。

## 【0083】

本発明のこの局面に従って、このベクターは、例えばプラスミドベクター、一本鎖または二本鎖ファージベクター、一本鎖または二本鎖RNAまたはDNAウイルスベクターであり得る。このようなベクターは、DNAおよびRNAを細胞に導入するための周知の技術によって、ポリヌクレオチド、好ましくはDNAとして細胞に導入され得る。ウイルスベクターは、複製適格性または複製欠損であり得る。後者の場合、一般的にウイルス増殖は、相補的な宿主細胞においてのみ起こる。

## 【0084】

特定の観点においては、ベクターの中でも、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現のためのベクターが好ましい。一般的に、このようなベクターは、発現されるべきポリヌクレオチドに作動可能に結合した宿主における発現のために有効なシス作用制御領域を含む。適切なトランス作用因子は、宿主によって供給されるか、相補ベクターによって供給されるか、または宿主への導入の際にベクター自身によって供給されるかのいずれかである。

## 【0085】

非常に様々な発現ベクターを使用して、本発明のポリペプチドを発現し得る。このようなベクターとしては、染色体ベクター、エピソームベクター、およびウイルス誘導ベクター（例えば、細菌プラスミド、バクテリオファージ、酵母エピソーム、酵母染色体要素、ウイルス（例えば、バキュロウイルス、パポバウイルス（例えば、SV40）、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス）由来のベクターならびにこれらの組み合わせ由来のベクター（例えば、プラスミドおよびバクテリオファージ遺伝

子要素（例えば、コスミドおよびファージミド）由来のベクター）が挙げられ、すべて本発明のこの局面に従う発現のために使用され得る。一般的に、宿主においてポリペプチドを発現するために維持し、増殖し、またはポリヌクレオチドを発現するのに適した任意のベクターは、この点において発現のために使用され得る。

#### 【0086】

発現ベクターにおけるDNA配列は、適切な発現制御配列（例えば、直接的なmRNA転写に対するプロモーターを含む）に作動可能に連結される。このようなプロモーターの例としては、周知のプロモーターのうちのほんの少しの名前を挙げると、ファージ PLプロモーター、E. coli lac、trpおよびtacプロモーター、SV40初期および後期プロモーターならびにレトロウイルスLTRのプロモーターが挙げられる。一般的に、発現構築物は、転写開始および終止に関する部位、ならびに転写された領域中に、翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。この構築物により発現された成熟転写産物のコード部分は、翻訳されるポリペプチドの先頭で翻訳開始AUGおよび翻訳されるポリペプチドの末端に適切に配置された終止コドン（UAA、UGA、またはUAG）を含む。

#### 【0087】

さらに、構築物は、発現を調節し、そして発現を引き起こす制御領域を含み得る。一般的に、このような領域は、転写を制御することによって、例えば、リプレッサー結合部位およびエンハンサーなどを操作する。

#### 【0088】

増殖および発現のためのベクターは、一般的に選択マーカを含む。このようなマーカはまた、増殖のために適切であり得るか、またはこのベクターは、この目的のためにさらなるマーカを含み得る。この点において、発現ベクターは、好ましくは、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型特徴を提供するために、1以上の選択マーカ遺伝子を含む。このようなマーカとしては、真核生物細胞培養のためにはジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性、ならびにE. coliおよび他の細菌を培養するためにはテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0089】

本明細書中のいずれかに記載されるような適切なDNA配列、ならびに適切なプロモーターおよび他の適切な制御配列を含むベクターは、所望のポリペプチドをそこにおいて発現するために適切な種々の周知の技術を用いて、適切な宿主に導入され得る。適切な宿主の代表的な例には、細菌細胞（例えば、E. coli、StreptomycesおよびSalmonella typhimurium細胞）；真菌細胞（例えば、酵母細胞）；昆虫細胞（例えば、Drosophila S2およびSpodoptera Sf9細胞）；動物細胞（例えば、CHO、COS、およびBowes melanoma細胞）；および植物細胞が挙げられる。上記の宿主細胞のために適切な培養培地および条件は、当該分野において公知である。

## 【0090】

細菌における使用に好ましいベクター中には、pQE70、pQE60およびpQE-9（Qiagenから入手可能）；pBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A（Stratageneから入手可能）；ならびにptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5（Pharmaciaから入手可能）が挙げられる。好ましい真核生物ベクターの中には、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG（Stratageneから入手可能）；ならびにpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL（Pharmaciaから入手可能）がある。これらのベクターは、当業者が利用可能な多くの市販ベクターおよび周知のベクターの例示のみの目的で列挙される。

## 【0091】

宿主細胞における発現のための適切なベクターおよびプロモーターの選択は、周知の手順であり、そしてベクター構築物の発現のため、ベクターの宿主への導入のためおよび宿主における発現のために必要な技術は、当該分野における慣用的な技術である。

## 【0092】

本発明はまた、本明細書中に記載される上記のベクター構築物を含む宿主細胞に関し、そしてさらに、当該分野において公知の技術を用いて1以上の異種制御領域（例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー）に作動可能に結合する本発明のヌクレオチド配列を含む宿主細胞を包含する。この宿主細胞は、高等真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞（例えば、ヒト由来細胞））、もしくは下等真核生物細胞（例えば、酵母細胞）であり得るか、またはこの宿主細胞は、原核生物細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。宿主鎖は、所望の特定の様式で、挿入された遺伝子配列の発現を調節するかまたは遺伝子産物を修飾および処理するように選択され得る。特定のプロモーターからの発現は、特定の誘導因子の存在下で増大され得；従って遺伝子操作されたポリペプチドの発現が制御され得る。さらに、異なる宿主細胞は、翻訳プロセッシングおよび翻訳後プロセッシングならびにタンパク質の改変（例えば、リン酸化、切断）のための特徴および特定の機構を有する。適切な細胞株は、発現された外来タンパク質の所望の改変およびプロセッシングを確実にするために選択され得る。

#### 【0093】

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染または他の方法によってもたらされ得る。このような方法は、多くの標準的研究室マニュアルに記載されている（例えば、Davisら、Basic Methods in Molecular Biology（1986））。

#### 【0094】

本明細書において議論されるベクター構築物を含む宿主細胞を含むことに加えて、本発明はまた、脊椎動物起源（特に、哺乳動物起源）の一次（primary）宿主細胞、二次（secondary）宿主細胞、および不死化宿主細胞を含む。これらの宿主細胞は、内因性の遺伝物質（例えば、DR5コード配列）を欠失または置換するように操作されており、そして/または本発明のDR5ポリヌクレオチドと作動可能に連結された遺伝物質（例えば、異種ポリヌクレオチド配列）を含むように操作され、そして内因性のDR5ポリヌクレオチドを活性化

、変更、および/または増幅する。例えば、当該分野で公知の技術は、相同組換えを介して、異種制御領域（例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー）ならびに内因性DR5ポリヌクレオチド配列を作動可能に連結するために使用され得る（例えば、1997年6月24日に発行された米国特許第5,641,670号；1996年9月26日に公開された国際公開第WO 96/29411号；1994年8月4日に公開された国際公開第WO 94/12650号；Kollerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989)；およびZijlstraら, Nature 342:435-438 (1989)を参照のこと。これらの開示の各々は、それら全体において参考として援用される）。

#### 【0095】

本発明のポリペプチドは、改変された形態（例えば、融合タンパク質（ペプチド結合を介して（異なるタンパク質の）異種タンパク質配列に結合したポリペプチドを含む）で発現され得、そして分泌シグナルのみならず、さらなる異種機能領域をも含み得る。このような融合タンパク質は、当該分野において公知の方法によって、適切なリーディングフレームにおいて、本発明のポリヌクレオチドおよび所望のアミノ酸配列をコードする所望の核酸配列を互いに連結させる工程、ならびに当該分野において公知の方法によって、この融合タンパク質産物を発現させる工程により作製され得る。あるいは、このような融合タンパク質は、例えば、ペプチド合成装置を使用することにより、タンパク質合成技術によって作製され得る。従って、例えば、さらなるアミノ酸（特に、荷電アミノ酸）の領域が、精製の間または引き続き取り扱いおよび保存の間の宿主細胞における安定性および持続性を改善するために、ポリペプチドのN末端に付加され得る。また、領域はまた、精製を容易にするためにポリペプチドに付加され得る。このような領域は、ポリペプチドの最終的な調製の前に除去され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明のDR5ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、グラム陰性細菌においてこのようなポリペプチドの発現および精製の効率を増加するためにp e l Bペクチン酸リアーゼシグナル配列に融合され得る。米国特許第5,576,195号および同第5,846,818号（これらの内容は、本明

細書中でその全体が参考として援用される)を参照のこと。

【0096】

あるいは、このような融合タンパク質は、例えば、ペプチド合成装置を使用することにより、タンパク質合成技術によって作製され得る。従って、例えば、さらなるアミノ酸(特に、荷電アミノ酸)の領域が、精製の間または引き続き取り扱いおよび保存の間の宿主細胞における安定性および持続性を改善するために、ポリペプチドのN末端に付加され得る。さらに、領域はまた、精製を容易にするためにポリペプチドに付加され得る。このような領域は、ポリペプチドの最終的な調製の前に除去され得る。特に、分泌または排出を生じさせるため、安定性を改善するため、および精製を容易にするためにポリペプチドにペプチド部分を付加することは、当該分野でよく知られておりかつ慣用的な技術である。好ましい融合タンパク質は、タンパク質の可溶化に有用な免疫グロブリン由来の異種領域を含む。例えば、EP-A-O 464 533(カナダ国対応出願2045869)は、別のヒトタンパク質またはその一部とともに免疫グロブリン分子の定常領域の種々の部分を含む、融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質中のFc部分は、治療および診断における使用に十分に有利であり、従って、例えば改善された薬物動態学的特性を生じる(EP-A 0232 262)。一方、いくつかの使用について、融合タンパク質が、記載される有利な様式で発現、検出、および精製された後に、Fc部分が欠失され得ることが望ましい。これは、Fc部分が、治療および診断における使用の障害であると判明する場合(例えば、融合タンパク質が免疫のための抗原として使用されるべき場合)である。薬物探索において、例えばhIL-5レセプターのようなヒトタンパク質が、hIL-5のアンタゴニストを同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されている。D. Bennettら、Journal of Molecular Recognition, 8: 52-58(1995)およびK. Johansonら、The Journal of Biological Chemistry, 270: 9459-9471(1995)を参照のこと。

【0097】

本発明のポリペプチドは、天然に精製された産物、化学合成手順の生成物および組換え技術によって原核生物宿主または真核生物宿主（例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞を含む）から産生された産物を含む。組換え産生手順において使用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、グリコシル化されていてもグリコシル化されていなくてもよい。さらに、本発明のポリペプチドはまた、いくつかの場合において宿主媒介プロセスの結果として、初期改変メチオニン残基を含み得る。

（トランスジェニックおよび「ノックアウト」）

本発明のDR5ポリペプチドはまた、トランスジェニック動物中で発現され得る。任意の種の動物（マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、マイクロピッグ（micro-pig）、ヤギ、ヒツジ、ウシ、および非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、サル、およびチンパンジー）を含むがこれらに限定されない）が、トランスジェニック動物を作製するために使用され得る。特定の実施形態において、本明細書中に記載されるかさもなくば当該分野の公知の技術が、遺伝子治療プロトコルの一部として、ヒトにおいて本発明のポリペプチドを発現するために使用される。

#### 【0098】

当該分野で公知の任意の技術が、導入遺伝子（すなわち、本発明の核酸）を動物に導入して、トランスジェニック動物の創始系統を作製するために使用され得る。このような技術としては、前核マイクロインジェクション（Patersonら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:691-698 (1994)；Carverら、Biotechnology (NY) 11:1263-1270 (1993)；Wrightら、Biotechnology (NY) 9:830-834 (1991)；およびHoppeら、米国特許第4,873,191号 (1989)）；生殖系列へのレトロウイルス媒介遺伝子移入（Van der Puttenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152 (1985)）、胚盤胞または胚へのレトロウイルス媒介遺伝子移入；胚性幹細胞における遺伝子標的化（Thompsonら、Cell 56:313-321 (1989)）；細胞または胚の

エレクトロポレーション (Lo, Mol Cell Biol. 3:1803-1814 (1983)); 遺伝子銃を用いた本発明のポリヌクレオチドの導入 (例えば、Ulmerら、Science 259:1745 (1993)を参照のこと); 胚性多能性幹細胞への核酸構築物の導入および胚盤胞へのこの幹細胞の再移入; ならびに精子媒介遺伝子移入 (Lavitranoら、Cell 57:717-723 (1989)); などを含むがこれらに限定されない。このような技術の総説については、本明細書中にその全体が参考として援用される、Gordon、「Transgenic Animals」、Intl. Rev. Cytol. 115:171-229 (1989)を参照のこと。米国特許第5,464,764号 (Capecchiら、Positive-Negative Selection Methods and Vectors); 米国特許第5,631,153号 (Capecchiら、Cells and Non-Human Organisms Containing Predetermined Genomic Modifications and Positive-Negative Selection Methods and Vectors for Making Same); 米国特許第4,736,866号 (Lederら、Transgenic Non-Human Animals); ならびに米国特許第4,873,191号 (Wagnerら、Genetic Transformation of Zygotes); もまた参照のこと (これらの各々は、本明細書中にその全体が参考として援用される)。さらに、この段落に列挙された資料の各々の内容が、本明細書中でその全体が参考として援用される。

#### 【0099】

当該分野で公知の任意の技術が、本発明のポリヌクレオチドを含むトランスジェニッククローンを作製するために使用され得、そのような技術は、例えば、徐核した卵母細胞への、休止期に誘導された培養した、胚性 (embryonic) 細胞由来の核、胎児細胞由来の核または成体細胞由来の核の、核移入である (Campbellら、Nature 380:64-66 (1996); Wilmutら、Nature 385:810-813 (1997)、これらのそれぞれ

れは、本明細書中でその全体が参考として援用される)。

【0100】

本発明は、その全ての細胞に導入遺伝子を有するトランスジェニック動物、ならびにいくつかの細胞(しかしその全ての細胞ではない)に導入遺伝子を有する動物(すなわち、モザイクまたはキメラ動物)を提供する。導入遺伝子は、1つの導入遺伝子としてまたはコンカテマー(例えば、頭-頭タンデム型または頭-尾タンデム型)のような複数のコピーとして組み込まれ得る。この導入遺伝子はまた、例えば、Laskoらの教示(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236(1992))に従って特定の細胞型に選択的に導入され得、そして活性化され得る。このような細胞型特異的活性化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そしてそれらは当業者に明らかである。ポリヌクレオチド導入遺伝子が、内在性遺伝子の染色体部位に組み込まれることが所望される場合、遺伝子の標的化が好ましい。手短かに言えば、このような技術が利用される場合、内在性遺伝子に対して相同ないくつかのヌクレオチド配列を含むベクターが、染色体配列との相同な組換えを介して内在性遺伝子のヌクレオチド配列に組み込まれ、そのヌクレオチド配列の機能を破壊することを目的として設計される。導入遺伝子はまた、特定の細胞型に選択的に導入され得、従って、例えば、Guら(Science 265:103-106(1994))の教示に従って、導入された細胞型においてのみ内在性遺伝子が不活化される。そのような細胞型特異的不活化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そしてそれらは当業者に明らかである。この段落に列挙された資料の各々の内容が、本明細書中でその全体が参考として援用される。

【0101】

一旦トランスジェニック動物が作製されると、その組換え遺伝子の発現は、標準的な技術を利用してアッセイされ得る。最初のスクリーニングは、サザンブロット分析またはPCR技術によって達成されて、導入遺伝子の組み込みが起きたことを動物組織の分析により確認し得る。トランスジェニック動物の組織における導入遺伝子のmRNA発現レベルはまた、動物由来の組織サンプルのノーザンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析、および逆転写酵素P

CR ( r t - PCR ) を含むがこれらに限定されない技術を用いて評価され得る。トランスジェニック遺伝子発現組織のサンプルはまた、導入遺伝子産物に特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的または免疫組織化学的に評価され得る。

#### 【0102】

一旦、創始動物が生成されると、それらは、交配され、同系交配され、異系交配されるかまたは交雑されて、特定の動物のコロニーを生成し得る。そのような交配戦略の例は、以下を含むがこれらに限定されない：別の系統を樹立するための1つより多くの組み込み部位を有する創始動物の異系交配；各導入遺伝子の相加的発現効果によって、より高いレベルで導入遺伝子を発現する複合トランスジェニックを生成するための別々の系統の同系交配；発現の増強およびDNA分析による動物のスクリーニングの必要性の排除の両方のための、所定の組み込み部位に対してホモ接合性の動物を生成するヘテロ接合性トランスジェニック動物の交雑；複合ヘテロ接合性またはホモ接合性系統を生成するための別々のホモ接合系統の交雑；ならびに目的の実験モデルに適切な異なるバックグラウンド上に導入遺伝子を配置するための交配。

#### 【0103】

本発明のトランスジェニックおよび「ロックアウト」動物は、DR5ポリペプチドの生物学的機能の詳述、異常なDR5発現に関連する状態および/または障害の研究、ならびにこのような状態および/または障害の改善に有効な化合物についてのスクリーニングに有用な動物モデル系を含むがこれらに限定されない用途を有する。

#### 【0104】

本発明のさらなる実施形態において、本発明のタンパク質を発現するために遺伝子操作される細胞、あるいは本発明のタンパク質を発現しないように遺伝子操作された細胞（例えば、ロックアウト）を、インビボで患者に投与する。このような細胞は、患者（すなわち、ヒトを含む動物）またはMHC適合性ドナーから入手され得、そして線維芽細胞、骨髄細胞、血球（例えば、リンパ球）、脂肪細胞、筋細胞、内皮細胞などを含み得るが、それらに限定されない。この細胞を、例えば、形質導入（ウイルスベクターおよび好ましくは細胞ゲノム中に導入遺伝

子を組み込むベクターを使用する)、またはトランスフェクション手順(プラスミド、コスミド、YAC、裸のDNA、エレクトロポレーション、リポソームなどの使用を含むが、これらに限定されない)によって、細胞中に本発明のポリペプチドのコード配列を導入するために、あるいは本発明のポリペプチドに結合しているコード配列および/または内因性の調節配列を破壊するために、組換えDNA技術を使用してインビトロで遺伝子操作する。本発明のポリペプチドのコード配列を強力な構成的プロモーターもしくは誘導性プロモーターまたはプロモーター/エンハンサーの制御下に配置し、本発明のポリペプチドの発現および好ましくは分泌を達成し得る。本発明のポリペプチドを発現および好ましくは分泌する操作した細胞を、例えば、循環中において、または腹腔内で患者中へ全身的に導入し得る。あるいは、この細胞をマトリックスに組み込み得、そして身体に移植し得る(例えば、遺伝子操作した線維芽細胞を皮膚移植片の一部として移植し得る); 遺伝子操作した内皮細胞をリンパ移植片または脈管移植片の一部として移植し得る(例えば、Andersonら、米国特許第5,399,349号; ならびにMulliganおよびWilson、米国特許第5,460,959号を参照のこと。これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される)。

#### 【0105】

投与される細胞が非自己または非MHC適合性細胞である場合、それらを、この導入細胞に対する宿主免疫応答の発生を妨害する周知の技術を使用して投与し得る。例えば、この細胞をカプセル性の形態で導入し得、この形態は、構成成分と即時の細胞外環境との交換を可能にしつつ、導入細胞が宿主免疫系によって認識されることを可能にしない。

#### 【0106】

(DR5タンパク質およびフラグメント)

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列を含むタンパク質を提供する。

#### 【0107】

本発明のDR5タンパク質は、モノマーまたはマルチマー(すなわち、ダイマ

一、トリマー、テトラマーおよびより高度のマルチマー)であり得る。従って、本発明は、モノマーおよびマルチマーの本発明のDR5タンパク質、それらの調製物ならびにそれらを含む組成物(好ましくは薬学的組成物)に関する。特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、モノマー、ダイマー、トリマーまたはテトラマーである。さらなる実施形態では、本発明のマルチマーは、少なくともダイマー、少なくともトリマー、または少なくともテトラマーである。

#### 【0108】

本発明によって含まれるマルチマーは、ホモマーまたはヘテロマーであり得る。本明細書中で用いられる場合、用語ホモマーは、本発明のDR5タンパク質(本明細書中に記載されるDR5フラグメント、改変体、および融合タンパク質を含む)のみを含むマルチマーをいう。これらのホモマーは、同一または異なるポリペプチド配列を有するDR5タンパク質を含み得る。特定の実施形態では、本発明のホモマーは、同一のポリペプチド配列を有するDR5タンパク質のみを含むマルチマーである。別の特定の実施形態では、本発明のホモマーは、異なるポリペプチド配列を有するDR5タンパク質を含むマルチマーである。特定の実施形態では、本発明のマルチマーは、ホモダイマー(例えば、同一または異なるポリペプチド配列を有するDR5タンパク質を含む)あるいはホモトリマー(例えば、同一または異なるポリペプチド配列を有するDR5タンパク質を含む)である。さらなる実施形態では、本発明のホモマー性マルチマーは、少なくともホモダイマー、少なくともホモトリマーまたは少なくともホモテトラマーである。

#### 【0109】

本明細書中で用いられる場合、用語ヘテロマーとは、本発明のDR5タンパク質に加えて異種タンパク質(すなわち、DR5遺伝子によりコードされるポリペプチド配列に対応しないポリペプチド配列のみを含むタンパク質)を含むマルチマーをいう。特定の実施形態では、本発明のマルチマーは、ヘテロダイマー、ヘテロトリマーまたはヘテロテトラマーである。さらなる実施形態では、本発明のヘテロマー性マルチマーは、少なくともヘテロダイマー、少なくともヘテロトリマーまたは少なくともヘテロテトラマーである。

#### 【0110】

本発明のマルチマーは、疎水性、親水性、イオン性および/もしくは共有結合的な結合の結果であり得、そして/または例えば、リポソーム形成によって間接連結され得る。従って、1つの実施形態では、本発明のマルチマー（例えば、ホモダイマーまたはホモトリマーなど）は、本発明のタンパク質が溶液中で互いに接触する場合に形成される。別の実施形態では、本発明のヘテロマルチマー（例えば、ヘテロトリマーまたはヘテロテトラマーなど）は、本発明のタンパク質が、溶液中で本発明のポリペプチドに対する抗体（本発明の融合タンパク質における異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）と接触した場合に形成される。他の実施形態では、本発明のマルチマーは、本発明のDR5タンパク質との、および/または本発明のDR5タンパク質間での共有結合によって形成される。このような共有結合は、タンパク質のポリペプチド配列（例えば、配列番号2に記載されるポリペプチド配列に含まれるか、または寄託されたcDNAによってコードされるポリペプチド）に含まれる1以上のアミノ酸残基を含み得る。1例では、この共有結合は、ネイティブ（すなわち、天然に存在する）ポリペプチドにおいて相互作用するタンパク質のポリペプチド配列内に存在するシステイン残基間での架橋である。別の例では、この共有結合は、化学的操作または組換え操作の結果である。あるいは、このような共有結合は、DR5融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列において含まれる1以上のアミノ酸残基を含み得る。1例では、共有結合は、本発明の融合タンパク質に含まれる異種配列間にある（例えば、米国特許第5,478,925号を参照のこと）。特定の例では、この共有結合は、（本明細書中に記載されるような）本発明のDR5-Fc融合タンパク質に含まれる異種配列間にある。別の特定の例では、本発明の融合タンパク質の共有結合は、共有結合したマルチマーを形成し得る別のTNFファミリーリガンド/レセプターメンバー（例えば、オステオプロテゲリン（osteoprotegerin）など）由来の異種ポリペプチド配列間にある（例えば、国際公開番号WO 98/49305号（この内容はその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。別の実施形態では、2以上の本発明のDR5ポリペプチドは、合成リンカー（例えば、ペプチド、炭水化物、または可溶性ポリマーリンカー）を通して連結される。例としては、米国特許第5,073,627号

(本明細書中に参考として援用される)に記載されるペプチドリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。ペプチドリンカーによって隔てられた複数のDR5ポリペプチドを含むタンパク質は、従来の組換えDNA技術を用いて生成され得る。

#### 【0111】

本発明のマルチマーDR5ポリペプチドを調製するための別の方法は、ロイシンジッパーポリペプチド配列またはイソロイシンジッパーポリペプチド配列に融合されたDR5ポリペプチドの使用を含む。ロイシンジッパードメインおよびイソロイシンジッパードメインは、そのドメインが見出されるタンパク質のマルチマー形成を促進するポリペプチドである。ロイシンジッパーは元々、いくつかのDNA結合タンパク質において同定され(Landschulzら, Science 240:1759、(1988))、そしてそれ以来種々の異なるタンパク質において見出されている。とりわけ公知のロイシンジッパーは、ダイマー形成またはトリマー形成をする、天然に存在するペプチドおよびその誘導体である。可溶性マルチマーDR5タンパク質を生成するために適切なロイシンジッパードメインの例は、本明細書中に参考として援用されるPCT出願WO 94/10308に記載されるロイシンジッパードメインである。溶液中でダイマー形成またはトリマー形成をするペプチドに融合された可溶性DR5ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質は、適切な宿主細胞中で発現され、そして得られる可溶性マルチマーDR5は、当該分野で公知の技術を用いて培養上清から回収される。

#### 【0112】

TNFファミリーの特定のメンバーは、トリマーの形態で存在すると考えられる(BeutlerおよびHuffel, Science 264:667、1994; Bannerら, Cell 73:431(1993))。従って、トリマーDR5は、増強された生物学的活性の利点を提供し得る。好ましいロイシンジッパー部分は、有線的な形態のトリマーである。1例は、肺界面活性剤タンパク質D(SPD)由来のロイシンジッパーであり、Hoppeら(FEBS Letters 344:191(1994))および米国特許出願番号第08/

446、922に記載され、本明細書中において参考として援用される。天然に存在するトリマータンパク質由来の他のペプチドは、トリマーDR5を調製する際に使用され得る。

【0113】

別の例において、本発明のタンパク質は、Flag（登録商標）DR5に含まれるFlag（登録商標）ポリペプチド配列または本発明のFlag（登録商標）DR5融合タンパク質の間の相互作用によって結合する。さらなる実施形態において、本発明の結合タンパク質は、Flag（登録商標）DR5に含まれる異種ポリペプチド配列または本発明のFlag（登録商標）DR5融合タンパク質と抗Flag（登録商標）抗体との間の相互作用によって結合される。

【0114】

本発明のマルチマーは、当該分野で公知の化学技術を使用して生成され得る。例えば、本発明のマルチマーに含まれることが所望されるタンパク質は、当該分野で公知のリンカー分子およびリンカー分子長最適化技術を使用して、化学的に架橋され得る（例えば、米国特許第5,478,925号（これは本明細書中でその全体が参考として援用される）を参照のこと）。さらに、本発明のマルチマーは、当該分野で公知の技術を使用して生成されて、マルチマー中に含まれることが所望されるタンパク質のポリペプチド配列内に位置するシステイン残基間に、1つ以上の分子間架橋を形成し得る（例えば、米国特許第5,478,925号（これは、本明細書中にその全体が参考として援用される）を参照のこと）。

【0115】

さらに、本発明のタンパク質は、このタンパク質のポリペプチド配列のC末端またはN末端へのシステインまたはビオチンの付加により慣用的に改変され得、当該分野で公知の技術が、1つ以上のこれらの改変されたタンパク質を含むマルチマーを生成するために適用され得る（例えば、米国特許第5,478,925号（これはその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。さらに、当該分野で公知技術は、本発明のマルチマーに含まれることを所望されるタンパク質成分を含むリポソームを生成するために適用され得る（例えば、米国特許第5,478,925号（これはその全体が本明細書中で参考として援用さ

れる)を参照のこと)。

【0116】

あるいは、本発明のマルチマーは、当該分野で公知の遺伝子操作技術を用いて生成され得る。1つの実施形態では、本発明のマルチマーに含まれるタンパク質は、本明細書中に記載されるかさもなくば当該分野で公知の融合タンパク質技術を用いて組換え生成される(例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第5,478,925号を参照のこと)。特定の実施形態では、本発明のホモダイマーをコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、リンカーポリペプチドをコードする配列に連結し、次いでさらに元々のC末端からN末端の方向とは逆方向でポリペプチドの翻訳産物をコードする合成ポリヌクレオチド(リーダー配列を欠く)に連結することによって生成される(例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第5,478,925号を参照のこと)。別の実施形態では、本明細書中に記載されるかさもなくば当該分野で公知の組換え技術を適用して、膜貫通ドメインを含み、そして膜再構成技術によってリポソームに取り込まれ得る、本発明の組換えポリペプチドを生成する(例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第5,478,925号を参照のこと)。

【0117】

本発明のポリペプチドは、好ましくは、単離された形態で提供される。「単離されたポリペプチド」によって、そのネイティブ環境から取り出されたポリペプチドが意図される。従って、組換え宿主内で産生されるポリペプチドおよび/または組換え宿主細胞内に含まれるポリペプチドは、本発明の目的のために単離されたと考えられる。「単離されたポリペプチド」としてまた意図されるのは、組換え宿主から、部分的または実質的に精製されたポリペプチドである。例えば、DR5ポリペプチドの組換え産生されたバージョンは、SmithおよびJohnson(Gene 67:31-40(1988))に記載される一工程法によって実質的に精製され得る。

【0118】

1つの実施形態では、本発明は、寄託されたcDNAによりコードされるアミ

ノ酸配列、もしくは配列番号2のアミノ酸配列を有する単離されたDR5ポリペプチド、あるいは上記ポリペプチドの一部(すなわち、フラグメント)を含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドまたはペプチドを提供する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

【0119】

本発明のポリペプチドフラグメントは、以下を含むか、またあるいは以下からなる、ポリペプチドを含む：配列番号2に含まれるアミノ酸配列、寄託されたプラスミドに含まれるcDNAによりコードされるアミノ酸配列、あるいは寄託されたプラスミドに含まれるヌクレオチド配列に(例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で)ハイブリダイズする核酸によりコードされるアミノ酸配列か、または図1(配列番号1)に示されるアミノ酸配列か、またはそれらの相補鎖。タンパク質フラグメントは、「自立構造(free-standing)」であり得るか、あるいはより大きなポリペプチド内(そのフラグメントが、部分または領域を、最も好ましくは単一の連続した領域として形成する)に含まれ得る。本発明のポリペプチドフラグメントの代表的な例としては、例えば、以下を含むかあるいは以下からなる、フラグメントが挙げられる：配列番号2のコード領域のアミノ酸残基およそ-51~-1、1~27、28~40、41~60、61~83、84~100、101~127、128~133、134~157、158~167、168~180、181~200、201~220、221~240、241~260、261~272、273~310、311~340および341~360からなる群より選択されるメンバー、ならびにこれらのポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。さらなる本発明のポリペプチドフラグメントの代表的な例としては、例えば、以下を含むかあるいは以下からなる、フラグメントが挙げられる：配列番号2のコード領域のアミノ酸残基1~60、11~70、21~80、31~90、41~100、51~110、61~120、71~130、81~140、91~150、101~160、111~170、121~180、131~190、141~200、151~210、161~220、171~230、181~240、191~250、201~260、211~270、221~280、231~290

、241～300、251～310、261～320、271～330、281～340、291～350および301～360からな群より選択されるメンバー、ならびに、これらのポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドはまた、本発明に含まれる。

#### 【0120】

さらに、ポリペプチドフラグメントは、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150アミノ酸長であり得る。この文脈における、「およそ」とは、いずれかの末端もしくは両末端において、特に列挙された範囲のいくつか(5、4、3、2もしくは1)のアミノ酸だけ大きいか、もしくは小さい範囲を含む。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた本発明に含まれる。

#### 【0121】

本発明の好ましいポリペプチドフラグメントは、以下の群から選択される1、2、3、4、5またはそれ以上のアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドを含む：DR5レセプター細胞外ドメイン(配列番号2のアミノ酸残基およそ1～およそ133を構成すると推定される)を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド；DR5のシステインリッチドメイン(配列番号2のアミノ酸残基33～128を構成すると推定される)を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド；DR5レセプター膜貫通ドメイン(配列番号2のアミノ酸残基およそ134～およそ157を構成すると推定される)を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド；推定成熟DR5ポリペプチドのフラグメントを含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド(ここで、そのフラグメントは、DR5機能活性(例えば、抗原性活性もしくは生物学的活性)を有する)；DR5レセプター細胞内ドメイン(配列番号2のアミノ酸残基およそ158～およそ360を構成すると推定される)を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド；欠失した膜貫通ドメインの全てか、もしくは部分を有する、DR5レセプター細胞外ドメインおよび細胞内ドメインを含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド；DR5レセプターデスドメイン(配列番号2のアミノ酸残基およそ273～およそ340を構成すると推定される)を含むか、あるいは

それらからなる、ポリペプチド；およびDR5レセプタータンパク質の1、2、3、4個以上のエピトープ含有部分を含むか、あるいはそれらからなる、ポリペプチド。さらなる実施形態において、本発明のポリペプチドフラグメントは、上記のメンバーの1、2、3、4、5、6、7または8個全ての任意の組み合わせを含むか、あるいはそれらからなる。上記のように、リーダー配列と共に、DR5レセプター細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを構成するアミノ酸残基がコンピュータ分析によって推定される。従って、当業者が理解するように、これらのドメインを構成するアミノ酸残基は、各ドメインを定義するために使用される判定基準に依存して、わずかに変動し得る（例えば、およそ1～およそ15アミノ酸残基）。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明に含まれる。

#### 【0122】

上記で議論されるように、DR5の1つまたは両方の細胞外システインリッチモチーフが、DR5とそのリガンドとの間の相互作用のために重要であると考えられる。従って、好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドフラグメントは、配列番号2のアミノ酸残基33～80および/または81～128を含むか、あるいはそれらからなる。特定の実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号2に開示される両方の細胞外システインリッチモチーフを含むか、あるいはこれらからなる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた本発明に含まれる。

#### 【0123】

とりわけ、特に好ましい本発明のフラグメントは、DR5の構造的特性もしくは機能的特性を含むか、あるいはそれらからなる、フラグメントである。そのようなフラグメントは、DR5の $\alpha$ -ヘリックスおよび $\beta$ -ヘリックス形成領域（「 $\alpha$ 領域」）、 $\beta$ -シートおよび $\beta$ -シート形成領域（「 $\beta$ 領域」）、ターンおよびターン形成領域（「ターン領域」）、コイルおよびコイル形成領域（「コイル領域」）、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、表面形成領域、および高抗原性指標領域（すなわち、Jameson-Wolfプログラムのデフォルトパラメータを使用して同定されるように、1.5以上の抗原

性指標を有するアミノ酸残基を構成するポリペプチドの領域)を含むアミノ酸残基を含むか、あるいは、これらの機能的ドメインの1、2、3、4、またはそれ以上からなるアミノ酸残記載を含む。

#### 【0124】

特定の好ましい領域は、図3および表1に開示される領域であり、そして、図1に示されるアミノ酸配列の分析によって同定される上述の型の領域を含むが、それらに限定されず、そのような好ましい領域としては、これらのコンピュータプログラムのデフォルトパラメーターを使用して推定されるような、Garnier-Robson推定領域、領域、ターン領域、およびコイル領域；Chou-Fasman推定領域、領域、ターン領域およびコイル領域；Kyte-Doolittle推定親水性領域および疎水性領域；Eisenberg両親媒性領域および両親媒性領域；Karplus-Schulz可撓性領域；Emini表面形成領域ならびにJameson-Wolf高抗原性指標領域が挙げられる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明により含まれる。

#### 【0125】

別の局面において、本発明は、1、2、3、4、5またはそれ以上の本発明のポリペプチドのエピトープ保有部分を含むか、あるいはそれらからなるペプチドまたはポリペプチドを提供する。このポリペプチド部分のエピトープは、本明細書中に記載のポリペプチドの免疫原性または抗体性エピトープをである。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

#### 【0126】

抗原性エピトープを保有するペプチドまたはポリペプチド(すなわち、抗体が結合し得るタンパク質分子の領域を含む)の選択について、タンパク質配列の一部に模倣する比較的短い合成ペプチドが、部分的に模倣されたタンパク質と反応する抗血清を慣用的に誘発し得ることが、当該分野で周知である。例えば、Sutcliffe, *Antibodies that react with predetermined sites on proteins*. *Science* 219: 660~666 (1983)を参照のこと。タンパク質反応性の

血清を誘発し得るペプチドは、タンパク質の一次配列においてしばしば示され、一組の単純な化学法則によって特徴付けられ得、そしてインタクトなタンパク質の免疫優性領域（すなわち、免疫原性エピトープ）にもアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれにも制限されない。

#### 【0127】

従って、本発明の抗原性エピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体を含む）を惹起するために有用である。例えば、Wilsonら、Cell 37:767-778 (1984)の777頁を参照のこと。本発明の抗原性エピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドは、好ましくは本発明のポリペプチドのアミノ酸配列内に含まれる少なくとも7つ、より好ましくは少なくとも9つ、そして最も好ましくは少なくとも約15～約30の間のアミノ酸の配列を含む。本発明において、抗原性エピトープは、好ましくは、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、より好ましくは少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、そして最も好ましくは約15～約30個の間のアミノ酸の配列を含む。免疫原性または抗原性のエピトープを含むか、またはこれらからなる好ましいポリペプチドは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100のアミノ酸残基長である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

#### 【0128】

抗原性エピトープは、例えば、このエピトープに特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体を含む）を惹起するために有用である。さらに、抗原性エピトープは、イムノアッセイにおける標的分子として使用され得る（例えば、Wilsonら、Cell 37:767-778 (1984)；Sutcliffeら、Science 219:660-666 (1983)を参照のこと）。

#### 【0129】

DR5レセプター特異的抗体を作製するために使用され得る抗原性ポリペプチ

ドまたはペプチドの非限定的な例としては、以下が挙げられる：配列番号2における約11～約59のアミノ酸残基、配列番号2における約68～約113のアミノ酸残基、配列番号2における約173～約220のアミノ酸残基、および配列番号2における約224～約319のアミノ酸残基を含むか、あるいはこれらからなるポリペプチド。この文脈において、「約」は、いずれかの末端または両方の末端で、いくつか(5、4、3、2または1)のアミノ酸残基だけ大きいかまたは小さい、特定の列挙された範囲を含む。上記に示されるように、本発明者らは、上記のポリペプチドフラグメントがDR5レセプタータンパク質の抗原性領域であることを決定した。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

#### 【0130】

本発明のエピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドは、従来の任意の手段によって産生され得る。R. A. Houghten, 「General Method for the Rapid Solid-Phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of Individual Amino Acids,」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135 (1985)。この「Simultaneous Multiple Peptide Synthesis (SMPS)」プロセスは、Houghtenら(1986)の米国特許第4,631,211号においてさらに記載される。

#### 【0131】

免疫原性エピトープは、例えば、当該分野で周知の方法に従って抗体を誘導するために使用され得る(例えばSutcliffeら、前出;Wilsonら、前出;Chowら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914;およびBittleら、J. Gen. Virol. 66:2347-2354 (1985)を参照のこと)。好ましい免疫原性エピトープは、分泌されたタンパク質を含む。1つ以上の免疫原性エピトープを含むポリペプチド

は、動物系（例えば、ウサギまたはマウス）に抗体応答を誘発するために、アルブミンのようなキャリアタンパク質と一緒に存在し得るか、またはこのポリペプチドが十分な長さ（少なくとも約25アミノ酸）である場合、このポリペプチドはキャリアなしで存在し得る。しかし、8～10程度のアミノ酸を含む免疫原性エピトープは、少なくとも変性ポリペプチドにおける直鎖エピトープに結合し得る（例えば、ウエスタンブロットティングにおいて）抗体を惹起するのに十分であることが示された。

#### 【0132】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、当該分野で周知の方法（インビボ免疫化、インビトロ免疫化、およびファージディスプレイ法が挙げられるがこれらに限定されない）に従って抗体を誘導するために使用され得る。例えば、Sutcliffeら、前出；Wilsonら、前出、およびBittleら、J. Gen. Virol., 66:2347-2354(1985)を参照のこと。インビボ免疫化が使用される場合、動物は、遊離ペプチドで免疫化され得るが；抗ペプチド抗体の力価は、このペプチドの、キーホールインプレットヘモシアニン（KLH）または破傷風トキソイドのような高分子キャリアーとの結合によってブーストされ得る。例えば、システイン残基を含むペプチドは、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）のようなリンカーを使用してキャリアーと結合され得、一方、他のペプチドはグルタルアルデヒドのようなより一般的な連結剤を使用してキャリアーに結合され得る。例えばウサギ、ラット、およびマウスのような動物は、遊離ペプチドまたはキャリアー結合ペプチドのいずれかで、例えば、約100マイクログラムのペプチドまたはキャリアータンパク質および Freund アジュバントまたは免疫応答を刺激することが公知の他の任意のアジュバントを含むエマルジョンの腹腔内および/または皮内注射によって免疫化される。例えば、固体表面に吸着された遊離ペプチドを使用する ELISA アッセイで検出され得る抗ペプチド抗体の有用な力価を提供するために、例えば約2週間の間隔で、いくつかのブースターの注射が必要とされ得る。免疫化動物由来の血清における抗ペプチド抗体の力価は、例えば、固体支持体上のペプチドへの吸着および当該分野で周知の方法に従う選択された抗体の

溶出による、抗ペプチド抗体の選択によって増加され得る。

### 【0133】

当業者に理解されるように、本発明のDR5レセプターポリペプチドおよび本明細書中に記載されるそのエピトープ保有フラグメント（例えば、配列番号2のアミノ酸残基1～133のような細胞外ドメインの部分に対応する）は、異種ポリペプチド配列と組合わされ得る。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン（IgA、IgE、IgG、IgM）またはその部分（CH1、CH2、CH3、ならびにドメイン全体およびその部分の両方を含むその任意の組合わせ）の定常ドメインに融合され得、キメラポリペプチドを生じる。これらの融合タンパク質は、精製を容易にし、そして増加した半減期を示す。これは、例えば、ヒトCD4-ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている（EP A 394,827; Traunckerら、Nature 331:84-86(1988)）。IgG部分によるジスルフィド結合二量体構造を有する融合タンパク質はまた、単量体DR5タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和においてより効率的であり得る（Fountoulakisら、J. Biochem. 270:3958-3964(1995)）。上記のエピトープをコードする核酸はまた、発現されたポリペプチドの検出および精製を助けるためのエピトープタグ（例えば、赤血球凝集素（「HA」）タグまたはフラッグタグ（flag tag））として、目的の遺伝子と組合わされ得る。例えば、Janknechtらによって記載される系は、ヒト細胞株において発現された未変性の融合タンパク質の迅速な精製を可能にする（Janknechtら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897）。この系において、目的の遺伝子は、この遺伝子のオープンリーディングフレームが6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに翻訳的に融合されるように、ワクシニア組換えプラスミド内にサブクローニングされる。このタグは、融合タンパク質のためのマトリックス結合ドメインとして役立つ。組換えワクシニアウイルスに感染した細胞からの抽出物は、Ni<sup>2+</sup>ニトリロ酢酸-アガロースカラム上にロードされ、

そしてヒスチジンタグ付けされたタンパク質は、イミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出され得る。これらの融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

#### 【0134】

遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および/またはコドンシャッフリング(集合的に「DNAシャッフリング」といわれる)の技術は、DR5の活性を調節するために使用され得、それによってDR5のアゴニストおよびアンタゴニストが効率的に作製される。一般的には、米国特許第5,605,793号;同第5,811,238号;同第5,830,721号;同第5,834,252号;および同第5,837,458号、ならびにPatton, P.A.ら、Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33(1997);Harayama, S. Trends Biotechnol. 16(2):76-82(1998);Hansson, L.O.ら、J. Mol. Biol. 287:265-76(1999);ならびにLorenzo, M.M.およびBlasco, R. Biotechniques 24(2):308-13(1998)を参照のこと(これらの特許および刊行物の各々は、ここで参考として援用される)。1つの実施形態において、DR5ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの変化は、DNAシャッフリングによって達成され得る。DNAシャッフリングは、同種組換えまたは部位特異的組換えによる2つ以上のDNAセグメントの、所望のDR5分子への集合を含む。別の実施形態において、DR5ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドは、組換えの前の誤りがちな(error-prone)PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダムな突然変異誘発に供されることによって変化され得る。

#### 【0135】

別の実施形態において、DR5の1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどは、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどで組換えられ得る。好ましい実施形態において、異種分子は、例えばTNF-、リンホトキシン-(LT-、

TNF - としても公知)、LT - (複合体ヘテロ三量体LT - 2 - において見出される)、OPGL、FasL、CD27L、CD30L、CD40L、4 - 1BBL、DcR3、OX40L、TNF - (国際公開番号WO 96 / 14328)、AIM - I (国際公開番号WO 97 / 33899)、AIM - II (国際公開番号WO 97 / 34911)、APRIL (J. Exp. Med. 188 (6) : 1185 - 1190)、エンドカイン - (国際公開番号WO 98 / 07880)、Neutrokine - (国際公開番号WO 98 / 18921)、OPG、神経成長因子(NGF)、DR3 (国際公開番号WO 97 / 33904)、DR4 (国際公開番号WO 98 / 32856)、TR5 (国際公開番号WO 98 / 30693)、TR6 (国際公開番号WO 98 / 30694)、TRANK、TR9 (国際公開番号WO 98 / 56892)、TR10 (国際公開番号WO 98 / 54202)、312C2 (国際公開番号WO 98 / 06842)、TR12、TNF - R1、TRAMP / DR3 / APO - 3 / WSL / LARD、TRAIL - R1 / DR4 / APO - 2、TRAIL - R2 / DR5、DcR1 / TRAIL - R3 / TRID / LIT、DcR2 / TRAIL - R4、CAD、TRAIL、TRAMP、およびv - FLIPである。さらなる好ましい実施形態において、この異種分子は、例えばFas、CD30、CD27、CD40および4 - 1BBの可溶化形態である。

#### 【0136】

さらに好ましい実施形態において、この異種分子はTNFファミリーの任意のメンバーである。

#### 【0137】

DR5ポリペプチドの特徴を改善または変化させるために、タンパク質工学が使用され得る。当業者に公知の組換えDNA技術は、1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、付加、または融合タンパク質を含む新規な変異体タンパク質または「ムテイン」を生成するために使用され得る。このような改変されたポリペプチドは、例えば、増大した活性または増加した安定性を示し得る。さらに、これらは高収率で精製され得、そして、少なくとも特定の精製条件下および貯蔵条件下で、対応する天然のポリペプチドよりも高い溶解性を示す。

## 【0138】

例えば、膜会合タンパク質または分泌タンパク質の成熟形態の細胞外ドメインを含む多くのタンパク質について、生物学的機能の実質的な損失なく、1つ以上のアミノ酸がN末端またはC末端から欠失され得ることが当該分野において公知である。しかし、タンパク質のN末端またはC末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失がこのタンパク質の1つ以上の生物学的機能の改変または損失を生じたとしても、他のDR5の機能的活性は依然として保持され得る。例えば、多くの場合において、短縮されたタンパク質が、DR5を認識する抗体（好ましくは、DR5に特異的に結合する抗体）を誘導し、および/または結合する能力は、欠失の大きさまたは位置に関係なく保持される。実際、6つのDR5アミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。完全なタンパク質のN末端および/またはC末端の残基を欠く特定のポリペプチドがこのような免疫原性活性を保有するか否かは、本明細書中に記載の、およびさもなくば当該分野で公知の慣用的方法によって、容易に決定され得る。

## 【0139】

上記のように、タンパク質のN末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失がこのタンパク質の1つ以上の生物学的機能の改変または損失を生じたとしても、他の機能的活性（例えば、生物学的活性、多量体化する能力、DR5リガンドに結合する能力）は依然として保持され得る。例えば、短縮されたDR5ムテインが、このポリペプチドの完全形態または成熟形態を認識する抗体を誘導し、および/または結合する能力は、完全または成熟したポリペプチドの大部分未満の残基がN末端から除去される場合、一般的に保持される。完全なポリペプチドのN末端残基を欠く特定のポリペプチドがこのような免疫性の活性を保持しているか否かは、本明細書中に記載され、そしてさもなくば当該分野で公知の慣用的な方法によって容易に決定され得る。おそらく、多数の欠失N末端アミノ酸残基を有するDR5ムテインは、ある程度の生物学的活性または免疫原性の活性を保持し得る。

## 【0140】

DR5のいくつかのアミノ酸配列は、このタンパク質の構造または機能上の有意な効果なく変化され得ることが、当該分野で認識されている。配列におけるこ

のような差異が意図される場合、活性を決定するタンパク質上に重大な領域が存在することを記憶しておくべきである。このような領域は、通常リガンド結合部位または死ドメインを構成する残基、またはこれらのドメインに影響する三次構造を形成する残基を含む。

#### 【0141】

従って、本発明は、図1に示されるDR5アミノ酸配列のアミノ末端から406位のアラニン残基までの1つ以上の残基の欠失を有するポリペプチド、およびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに提供する。詳細には、本発明は、図1の残基 $n^1$ -411のアミノ酸配列を含むか、あるいはこれらからなるポリペプチドを提供し、ここで、 $n^1$ は図1（これは、図1におけるアミノ酸残基がN末端からC末端に1~411まで連続的に番号付けされているが、配列番号2におけるアミノ酸残基は予想されるシグナルペプチドの位置を反映して-51~360まで連続的に番号付けされていることを除いて、配列番号2に示される配列と同一である）におけるアミノ酸残基の位置に対応する2~406の整数である。

#### 【0142】

より詳細には、本発明は、図1（これは、図1におけるアミノ酸残基がN末端からC末端に1~411まで連続的に番号付けされているが、配列番号2におけるアミノ酸残基は予想されるシグナルペプチドの位置を反映して-51~360まで連続的に番号付けされていることを除いて、配列番号2に示される配列と同一である）において示されるDR5の配列の以下の残基からなる群から選択されるメンバーのアミノ酸配列を含むか、あるいはこれらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する：E-2~S-411；Q-3~S-411；R-4~S-411；G-5~S-411；Q-6~S-411；N-7~S-411；A-8~S-411；P-9~S-411；A-10~S-411；A-11~S-411；S-12~S-411；G-13~S-411；A-14~S-411；R-15~S-411；K-16~S-411；R-17~S-411；H-18~S-411；G-19~S-411；P-20~S-411；G-21~S-411；P-22~S-411；R-23~S-411；

E - 24 ~ S - 411 ; A - 25 ~ S - 411 ; R - 26 ~ S - 411 ; G - 27 ~ S - 411 ; A - 28 ~ S - 411 ; R - 29 ~ S - 411 ; P - 30 ~ S - 411 ; G - 31 ~ S - 411 ; P - 32 ~ S - 411 ; R - 33 ~ S - 411 ; V - 34 ~ S - 411 ; P - 35 ~ S - 411 ; K - 36 ~ S - 411 ; T - 37 ~ S - 411 ; L - 38 ~ S - 411 ; V - 39 ~ S - 411 ; L - 40 ~ S - 411 ; V - 41 ~ S - 411 ; V - 42 ~ S - 411 ; A - 43 ~ S - 411 ; A - 44 ~ S - 411 ; V - 45 ~ S - 411 ; L - 46 ~ S - 411 ; L - 47 ~ S - 411 ; L - 48 ~ S - 411 ; V - 49 ~ S - 411 ; S - 50 ~ S - 411 ; A - 51 ~ S - 411 ; E - 52 ~ S - 411 ; S - 53 ~ S - 411 ; A - 54 ~ S - 411 ; L - 55 ~ S - 411 ; I - 56 ~ S - 411 ; T - 57 ~ S - 411 ; Q - 58 ~ S - 411 ; Q - 59 ~ S - 411 ; D - 60 ~ S - 411 ; L - 61 ~ S - 411 ; A - 62 ~ S - 411 ; P - 63 ~ S - 411 ; Q - 64 ~ S - 411 ; Q - 65 ~ S - 411 ; R - 66 ~ S - 411 ; A - 67 ~ S - 411 ; A - 68 ~ S - 411 ; P - 69 ~ S - 411 ; Q - 70 ~ S - 411 ; Q - 71 ~ S - 411 ; K - 72 ~ S - 411 ; R - 73 ~ S - 411 ; S - 74 ~ S - 411 ; S - 75 ~ S - 411 ; P - 76 ~ S - 411 ; S - 77 ~ S - 411 ; E - 78 ~ S - 411 ; G - 79 ~ S - 411 ; L - 80 ~ S - 411 ; C - 81 ~ S - 411 ; P - 82 ~ S - 411 ; P - 83 ~ S - 411 ; G - 84 ~ S - 411 ; H - 85 ~ S - 411 ; H - 86 ~ S - 411 ; I - 87 ~ S - 411 ; S - 88 ~ S - 411 ; E - 89 ~ S - 411 ; D - 90 ~ S - 411 ; G - 91 ~ S - 411 ; R - 92 ~ S - 411 ; D - 93 ~ S - 411 ; C - 94 ~ S - 411 ; I - 95 ~ S - 411 ; S - 96 ~ S - 411 ; C - 97 ~ S - 411 ; K - 98 ~ S - 411 ; Y - 99 ~ S - 411 ; G - 100 ~ S - 411 ; Q - 101 ~ S - 411 ; D - 102 ~ S - 411 ; Y - 103 ~ S - 411 ; S - 104 ~ S - 411 ; T - 105 ~ S - 411 ; H - 106 ~ S - 411 ; W - 107 ~ S - 411 ; N - 108 ~ S - 411 ; D - 109 ~ S - 411 ; L - 110 ~ S - 411 ; L - 111 ~ S - 411 ; F - 112 ~ S - 411 ; C - 113 ~ S - 411 ; L - 114 ~ S - 411 ; R - 115 ~ S - 411 ; C - 116 ~ S - 411 ; T - 11

7 ~ S - 4 1 1 ; R - 1 1 8 ~ S - 4 1 1 ; C - 1 1 9 ~ S - 4 1 1 ; D - 1 2  
0 ~ S - 4 1 1 ; S - 1 2 1 ~ S - 4 1 1 ; G - 1 2 2 ~ S - 4 1 1 ; E - 1 2  
3 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 2 4 ~ S - 4 1 1 ; E - 1 2 5 ~ S - 4 1 1 ; L - 1 2  
6 ~ S - 4 1 1 ; S - 1 2 7 ~ S - 4 1 1 ; P - 1 2 8 ~ S - 4 1 1 ; C - 1 2  
9 ~ S - 4 1 1 ; T - 1 3 0 ~ S - 4 1 1 ; T - 1 3 1 ~ S - 4 1 1 ; T - 1 3  
2 ~ S - 4 1 1 ; R - 1 3 3 ~ S - 4 1 1 ; N - 1 3 4 ~ S - 4 1 1 ; T - 1 3  
5 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 3 6 ~ S - 4 1 1 ; C - 1 3 7 ~ S - 4 1 1 ; Q - 1 3  
8 ~ S - 4 1 1 ; C - 1 3 9 ~ S - 4 1 1 ; E - 1 4 0 ~ S - 4 1 1 ; E - 1 4  
1 ~ S - 4 1 1 ; G - 1 4 2 ~ S - 4 1 1 ; T - 1 4 3 ~ S - 4 1 1 ; F - 1 4  
4 ~ S - 4 1 1 ; R - 1 4 5 ~ S - 4 1 1 ; E - 1 4 6 ~ S - 4 1 1 ; E - 1 4  
7 ~ S - 4 1 1 ; D - 1 4 8 ~ S - 4 1 1 ; S - 1 4 9 ~ S - 4 1 1 ; P - 1 5  
0 ~ S - 4 1 1 ; E - 1 5 1 ~ S - 4 1 1 ; M - 1 5 2 ~ S - 4 1 1 ; C - 1 5  
3 ~ S - 4 1 1 ; R - 1 5 4 ~ S - 4 1 1 ; K - 1 5 5 ~ S - 4 1 1 ; C - 1 5  
6 ~ S - 4 1 1 ; R - 1 5 7 ~ S - 4 1 1 ; T - 1 5 8 ~ S - 4 1 1 ; G - 1 5  
9 ~ S - 4 1 1 ; C - 1 6 0 ~ S - 4 1 1 ; P - 1 6 1 ~ S - 4 1 1 ; R - 1 6  
2 ~ S - 4 1 1 ; G - 1 6 3 ~ S - 4 1 1 ; M - 1 6 4 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 6  
5 ~ S - 4 1 1 ; K - 1 6 6 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 6 7 ~ S - 4 1 1 ; G - 1 6  
8 ~ S - 4 1 1 ; D - 1 6 9 ~ S - 4 1 1 ; C - 1 7 0 ~ S - 4 1 1 ; T - 1 7  
1 ~ S - 4 1 1 ; P - 1 7 2 ~ S - 4 1 1 ; W - 1 7 3 ~ S - 4 1 1 ; S - 1 7  
4 ~ S - 4 1 1 ; D - 1 7 5 ~ S - 4 1 1 ; I - 1 7 6 ~ S - 4 1 1 ; E - 1 7  
7 ~ S - 4 1 1 ; C - 1 7 8 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 7 9 ~ S - 4 1 1 ; H - 1 8  
0 ~ S - 4 1 1 ; K - 1 8 1 ~ S - 4 1 1 ; E - 1 8 2 ~ S - 4 1 1 ; S - 1 8  
3 ~ S - 4 1 1 ; G - 1 8 4 ~ S - 4 1 1 ; I - 1 8 5 ~ S - 4 1 1 ; I - 1 8  
6 ~ S - 4 1 1 ; I - 1 8 7 ~ S - 4 1 1 ; G - 1 8 8 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 8  
9 ~ S - 4 1 1 ; T - 1 9 0 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 9 1 ~ S - 4 1 1 ; A - 1 9  
2 ~ S - 4 1 1 ; A - 1 9 3 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 9 4 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 9  
5 ~ S - 4 1 1 ; L - 1 9 6 ~ S - 4 1 1 ; I - 1 9 7 ~ S - 4 1 1 ; V - 1 9  
8 ~ S - 4 1 1 ; A - 1 9 9 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 0 0 ~ S - 4 1 1 ; F - 2 0  
1 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 0 2 ~ S - 4 1 1 ; C - 2 0 3 ~ S - 4 1 1 ; K - 2 0

4 ~ S - 4 1 1 ; S - 2 0 5 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 0 6 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 0  
7 ~ S - 4 1 1 ; W - 2 0 8 ~ S - 4 1 1 ; K - 2 0 9 ~ S - 4 1 1 ; K - 2 1  
0 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 1 1 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 1 2 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 1  
3 ~ S - 4 1 1 ; Y - 2 1 4 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 1 5 ~ S - 4 1 1 ; K - 2 1  
6 ~ S - 4 1 1 ; G - 2 1 7 ~ S - 4 1 1 ; I - 2 1 8 ~ S - 4 1 1 ; C - 2 1  
9 ~ S - 4 1 1 ; S - 2 2 0 ~ S - 4 1 1 ; G - 2 2 1 ~ S - 4 1 1 ; G - 2 2  
2 ~ S - 4 1 1 ; G - 2 2 3 ~ S - 4 1 1 ; G - 2 2 4 ~ S - 4 1 1 ; D - 2 2  
5 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 2 6 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 2 7 ~ S - 4 1 1 ; R - 2 2  
8 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 2 9 ~ S - 4 1 1 ; D - 2 3 0 ~ S - 4 1 1 ; R - 2 3  
1 ~ S - 4 1 1 ; S - 2 3 2 ~ S - 4 1 1 ; S - 2 3 3 ~ S - 4 1 1 ; Q - 2 3  
4 ~ S - 4 1 1 ; R - 2 3 5 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 3 6 ~ S - 4 1 1 ; G - 2 3  
7 ~ S - 4 1 1 ; A - 2 3 8 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 3 9 ~ S - 4 1 1 ; D - 2 4  
0 ~ S - 4 1 1 ; N - 2 4 1 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 4 2 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 4  
3 ~ S - 4 1 1 ; N - 2 4 4 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 4 5 ~ S - 4 1 1 ; I - 2 4  
6 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 4 7 ~ S - 4 1 1 ; S - 2 4 8 ~ S - 4 1 1 ; I - 2 4  
9 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 5 0 ~ S - 4 1 1 ; Q - 2 5 1 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 5  
2 ~ S - 4 1 1 ; T - 2 5 3 ~ S - 4 1 1 ; Q - 2 5 4 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 5  
5 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 5 6 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 5 7 ~ S - 4 1 1 ; Q - 2 5  
8 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 5 9 ~ S - 4 1 1 ; M - 2 6 0 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 6  
1 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 6 2 ~ S - 4 1 1 ; Q - 2 6 3 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 6  
4 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 6 5 ~ S - 4 1 1 ; A - 2 6 6 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 6  
7 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 6 8 ~ S - 4 1 1 ; T - 2 6 9 ~ S - 4 1 1 ; G - 2 7  
0 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 7 1 ~ S - 4 1 1 ; N - 2 7 2 ~ S - 4 1 1 ; M - 2 7  
3 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 7 4 ~ S - 4 1 1 ; S - 2 7 5 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 7  
6 ~ S - 4 1 1 ; G - 2 7 7 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 7 8 ~ S - 4 1 1 ; S - 2 7  
9 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 8 0 ~ S - 4 1 1 ; H - 2 8 1 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 8  
2 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 8 3 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 8 4 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 8  
5 ~ S - 4 1 1 ; A - 2 8 6 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 8 7 ~ S - 4 1 1 ; A - 2 8  
8 ~ S - 4 1 1 ; E - 2 8 9 ~ S - 4 1 1 ; R - 2 9 0 ~ S - 4 1 1 ; S - 2 9

1 ~ S - 4 1 1 ; Q - 2 9 2 ~ S - 4 1 1 ; R - 2 9 3 ~ S - 4 1 1 ; R - 2 9  
4 ~ S - 4 1 1 ; R - 2 9 5 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 9 6 ~ S - 4 1 1 ; L - 2 9  
7 ~ S - 4 1 1 ; V - 2 9 8 ~ S - 4 1 1 ; P - 2 9 9 ~ S - 4 1 1 ; A - 3 0  
0 ~ S - 4 1 1 ; N - 3 0 1 ~ S - 4 1 1 ; E - 3 0 2 ~ S - 4 1 1 ; G - 3 0  
3 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 0 4 ~ S - 4 1 1 ; P - 3 0 5 ~ S - 4 1 1 ; T - 3 0  
6 ~ S - 4 1 1 ; E - 3 0 7 ~ S - 4 1 1 ; T - 3 0 8 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 0  
9 ~ S - 4 1 1 ; R - 3 1 0 ~ S - 4 1 1 ; Q - 3 1 1 ~ S - 4 1 1 ; C - 3 1  
2 ~ S - 4 1 1 ; F - 3 1 3 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 1 4 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 1  
5 ~ S - 4 1 1 ; F - 3 1 6 ~ S - 4 1 1 ; A - 3 1 7 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 1  
8 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 1 9 ~ S - 4 1 1 ; V - 3 2 0 ~ S - 4 1 1 ; P - 3 2  
1 ~ S - 4 1 1 ; F - 3 2 2 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 2 3 ~ S - 4 1 1 ; S - 3 2  
4 ~ S - 4 1 1 ; W - 3 2 5 ~ S - 4 1 1 ; E - 3 2 6 ~ S - 4 1 1 ; P - 3 2  
7 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 2 8 ~ S - 4 1 1 ; M - 3 2 9 ~ S - 4 1 1 ; R - 3 3  
0 ~ S - 4 1 1 ; K - 3 3 1 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 3 2 ~ S - 4 1 1 ; G - 3 3  
3 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 3 4 ~ S - 4 1 1 ; M - 3 3 5 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 3  
6 ~ S - 4 1 1 ; N - 3 3 7 ~ S - 4 1 1 ; E - 3 3 8 ~ S - 4 1 1 ; I - 3 3  
9 ~ S - 4 1 1 ; K - 3 4 0 ~ S - 4 1 1 ; V - 3 4 1 ~ S - 4 1 1 ; A - 3 4  
2 ~ S - 4 1 1 ; K - 3 4 3 ~ S - 4 1 1 ; A - 3 4 4 ~ S - 4 1 1 ; E - 3 4  
5 ~ S - 4 1 1 ; A - 3 4 6 ~ S - 4 1 1 ; A - 3 4 7 ~ S - 4 1 1 ; G - 3 4  
8 ~ S - 4 1 1 ; H - 3 4 9 ~ S - 4 1 1 ; R - 3 5 0 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 5  
1 ~ S - 4 1 1 ; T - 3 5 2 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 5 3 ~ S - 4 1 1 ; Y - 3 5  
4 ~ S - 4 1 1 ; T - 3 5 5 ~ S - 4 1 1 ; M - 3 5 6 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 5  
7 ~ S - 4 1 1 ; I - 3 5 8 ~ S - 4 1 1 ; K - 3 5 9 ~ S - 4 1 1 ; W - 3 6  
0 ~ S - 4 1 1 ; V - 3 6 1 ~ S - 4 1 1 ; N - 3 6 2 ~ S - 4 1 1 ; K - 3 6  
3 ~ S - 4 1 1 ; T - 3 6 4 ~ S - 4 1 1 ; G - 3 6 5 ~ S - 4 1 1 ; R - 3 6  
6 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 6 7 ~ S - 4 1 1 ; A - 3 6 8 ~ S - 4 1 1 ; S - 3 6  
9 ~ S - 4 1 1 ; V - 3 7 0 ~ S - 4 1 1 ; H - 3 7 1 ~ S - 4 1 1 ; T - 3 7  
2 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 7 3 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 7 4 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 7  
5 ~ S - 4 1 1 ; A - 3 7 6 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 7 7 ~ S - 4 1 1 ; E - 3 7

8 ~ S - 4 1 1 ; T - 3 7 9 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 8 0 ~ S - 4 1 1 ; G - 3 8  
1 ~ S - 4 1 1 ; E - 3 8 2 ~ S - 4 1 1 ; R - 3 8 3 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 8  
4 ~ S - 4 1 1 ; A - 3 8 5 ~ S - 4 1 1 ; K - 3 8 6 ~ S - 4 1 1 ; Q - 3 8  
7 ~ S - 4 1 1 ; K - 3 8 8 ~ S - 4 1 1 ; I - 3 8 9 ~ S - 4 1 1 ; E - 3 9  
0 ~ S - 4 1 1 ; D - 3 9 1 ~ S - 4 1 1 ; H - 3 9 2 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 9  
3 ~ S - 4 1 1 ; L - 3 9 4 ~ S - 4 1 1 ; S - 3 9 5 ~ S - 4 1 1 ; S - 3 9  
6 ~ S - 4 1 1 ; G - 3 9 7 ~ S - 4 1 1 ; K - 3 9 8 ~ S - 4 1 1 ; F - 3 9  
9 ~ S - 4 1 1 ; M - 4 0 0 ~ S - 4 1 1 ; Y - 4 0 1 ~ S - 4 1 1 ; L - 4 0  
2 ~ S - 4 1 1 ; E - 4 0 3 ~ S - 4 1 1 ; G - 4 0 4 ~ S - 4 1 1 ; N - 4 0  
5 ~ S - 4 1 1 ; および A - 4 0 6 ~ S - 4 1 1 。

#### 【0143】

本発明はまた、上記のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはこれらからなる核酸分子に関する。本発明はさらに、上記のポリペプチドに少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはこれらからなる核酸分子に関する。本発明はまた、異種ポリヌクレオチド配列に融合した上記のポリヌクレオチドを含む。これらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドもまた、本発明に含まれる。

#### 【0144】

別の実施形態において、DR5ポリペプチドのN末端欠失は、一般式 $n^2 - 184$ で記載され得、ここで、 $n^2$ は図1において同定されるアミノ酸配列に対応する1~179の数である(または、 $n^2$ は配列番号2において同定されるアミノ酸配列に対応する-51~128の数である)。特定の実施形態において、本発明のDR5のN末端欠失は、図1(これは、図1におけるアミノ酸残基がN末端からC末端に1~411まで連続的に番号付けされているが、配列番号2におけるアミノ酸残基は予想されるシグナルペプチドの位置を反映して-51~360まで連続的に番号付けされていることを除いて、配列番号2に示される配列と

同一である)において示されるDR5細胞外ドメイン配列の以下の残基のアミノ酸残基からなる群から選択されるメンバーを含むか、あるいはこれらからなる:

E - 2 ~ G - 184 ; Q - 3 ~ G - 184 ; R - 4 ~ G - 184 ; G - 5 ~ G - 184 ; Q - 6 ~ G - 184 ; N - 7 ~ G - 184 ; A - 8 ~ G - 184 ; P - 9 ~ G - 184 ; A - 10 ~ G - 184 ; A - 11 ~ G - 184 ; S - 12 ~ G - 184 ; G - 13 ~ G - 184 ; A - 14 ~ G - 184 ; R - 15 ~ G - 184 ; K - 16 ~ G - 184 ; R - 17 ~ G - 184 ; H - 18 ~ G - 184 ; G - 19 ~ G - 184 ; P - 20 ~ G - 184 ; G - 21 ~ G - 184 ; P - 22 ~ G - 184 ; R - 23 ~ G - 184 ; E - 24 ~ G - 184 ; A - 25 ~ G - 184 ; R - 26 ~ G - 184 ; G - 27 ~ G - 184 ; A - 28 ~ G - 184 ; R - 29 ~ G - 184 ; P - 30 ~ G - 184 ; G - 31 ~ G - 184 ; P - 32 ~ G - 184 ; R - 33 ~ G - 184 ; V - 34 ~ G - 184 ; P - 35 ~ G - 184 ; K - 36 ~ G - 184 ; T - 37 ~ G - 184 ; L - 38 ~ G - 184 ; V - 39 ~ G - 184 ; L - 40 ~ G - 184 ; V - 41 ~ G - 184 ; V - 42 ~ G - 184 ; A - 43 ~ G - 184 ; A - 44 ~ G - 184 ; V - 45 ~ G - 184 ; L - 46 ~ G - 184 ; L - 47 ~ G - 184 ; L - 48 ~ G - 184 ; V - 49 ~ G - 184 ; S - 50 ~ G - 184 ; A - 51 ~ G - 184 ; E - 52 ~ G - 184 ; S - 53 ~ G - 184 ; A - 54 ~ G - 184 ; L - 55 ~ G - 184 ; I - 56 ~ G - 184 ; T - 57 ~ G - 184 ; Q - 58 ~ G - 184 ; Q - 59 ~ G - 184 ; D - 60 ~ G - 184 ; L - 61 ~ G - 184 ; A - 62 ~ G - 184 ; P - 63 ~ G - 184 ; Q - 64 ~ G - 184 ; Q - 65 ~ G - 184 ; R - 66 ~ G - 184 ; A - 67 ~ G - 184 ; A - 68 ~ G - 184 ; P - 69 ~ G - 184 ; Q - 70 ~ G - 184 ; Q - 71 ~ G - 184 ; K - 72 ~ G - 184 ; R - 73 ~ G - 184 ; S - 74 ~ G - 184 ; S - 75 ~ G - 184 ; P - 76 ~ G - 184 ; S - 77 ~ G - 184 ; E - 78 ~ G - 184 ; G - 79 ~ G - 184 ; L - 80 ~ G - 184 ; C - 81 ~ G - 184 ; P - 82 ~ G - 184 ; P - 83 ~ G - 184 ; G - 84 ~ G - 184 ; H - 85 ~ G - 184 ; H - 86 ~ G - 184 ; I - 87 ~ G - 184 ; S - 88 ~ G - 184 ; E - 89 ~ G - 184 ; D - 90 ~ G - 184 ; G

- 91 ~ G - 184 ; R - 92 ~ G - 184 ; D - 93 ~ G - 184 ; C - 94  
~ G - 184 ; I - 95 ~ G - 184 ; S - 96 ~ G - 184 ; C - 97 ~ G -  
184 ; K - 98 ~ G - 184 ; Y - 99 ~ G - 184 ; G - 100 ~ G - 18  
4 ; Q - 101 ~ G - 184 ; D - 102 ~ G - 184 ; Y - 103 ~ G - 18  
4 ; S - 104 ~ G - 184 ; T - 105 ~ G - 184 ; H - 106 ~ G - 18  
4 ; W - 107 ~ G - 184 ; N - 108 ~ G - 184 ; D - 109 ~ G - 18  
4 ; L - 110 ~ G - 184 ; L - 111 ~ G - 184 ; F - 112 ~ G - 18  
4 ; C - 113 ~ G - 184 ; L - 114 ~ G - 184 ; R - 115 ~ G - 18  
4 ; C - 116 ~ G - 184 ; T - 117 ~ G - 184 ; R - 118 ~ G - 18  
4 ; C - 119 ~ G - 184 ; D - 120 ~ G - 184 ; S - 121 ~ G - 18  
4 ; G - 122 ~ G - 184 ; E - 123 ~ G - 184 ; V - 124 ~ G - 18  
4 ; E - 125 ~ G - 184 ; L - 126 ~ G - 184 ; S - 127 ~ G - 18  
4 ; P - 128 ~ G - 184 ; C - 129 ~ G - 184 ; T - 130 ~ G - 18  
4 ; T - 131 ~ G - 184 ; T - 132 ~ G - 184 ; R - 133 ~ G - 18  
4 ; N - 134 ~ G - 184 ; T - 135 ~ G - 184 ; V - 136 ~ G - 18  
4 ; C - 137 ~ G - 184 ; Q - 138 ~ G - 184 ; C - 139 ~ G - 18  
4 ; E - 140 ~ G - 184 ; E - 141 ~ G - 184 ; G - 142 ~ G - 18  
4 ; T - 143 ~ G - 184 ; F - 144 ~ G - 184 ; R - 145 ~ G - 18  
4 ; E - 146 ~ G - 184 ; E - 147 ~ G - 184 ; D - 148 ~ G - 18  
4 ; S - 149 ~ G - 184 ; P - 150 ~ G - 184 ; E - 151 ~ G - 18  
4 ; M - 152 ~ G - 184 ; C - 153 ~ G - 184 ; R - 154 ~ G - 18  
4 ; K - 155 ~ G - 184 ; C - 156 ~ G - 184 ; R - 157 ~ G - 18  
4 ; T - 158 ~ G - 184 ; G - 159 ~ G - 184 ; C - 160 ~ G - 18  
4 ; P - 161 ~ G - 184 ; R - 162 ~ G - 184 ; G - 163 ~ G - 18  
4 ; M - 164 ~ G - 184 ; V - 165 ~ G - 184 ; K - 166 ~ G - 18  
4 ; V - 167 ~ G - 184 ; G - 168 ~ G - 184 ; D - 169 ~ G - 18  
4 ; C - 170 ~ G - 184 ; T - 171 ~ G - 184 ; P - 172 ~ G - 18  
4 ; W - 173 ~ G - 184 ; S - 174 ~ G - 184 ; D - 175 ~ G - 18  
4 ; I - 176 ~ G - 184 ; E - 177 ~ G - 184 ; C - 178 ~ G - 18

4 ; および V - 179 ~ G - 184。

【0145】

本発明はまた、上記のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはその配列からなる核酸分子に関する。本発明はさらに、上記のポリペプチドと、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはその配列からなる核酸分子に関する。本発明はまた、異種ポリヌクレオチド配列に融合される上記のポリヌクレオチド配列を含む。これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドはまた、本発明により含まれる。

【0146】

また上述のように、タンパク質のC末端から1つ以上のアミノ酸の欠失が、タンパク質の1つ以上の生物学的機能の欠損の改変を生じる場合でさえ、他の機能的な活性(例えば、生物学的活性、多量体化する能力、DN4リガンドに結合する能力(例えば、TRAIL))は、なお保持され得る。完全ポリペプチドまたは成熟ポリペプチドの大多数ではない残基がC末端から除去される場合、例えば、ポリペプチドの完全な形態または成熟形態を認識する抗体を誘導および/またはそれに結合する短縮されたDR5ムテインの能力が、一般に保持される。完全ポリペプチドのC末端残基を欠く特定のポリペプチドが、このような免疫学的活性を保持するか否かは、本明細書中に記載される慣例的な方法および当該分野で公知の他の方法により容易に決定され得る。多数の欠失C末端アミノ酸残基を有するDR5ムテインは、おそらく、いくつかの生物学的活性または免疫原性活性を保持し得るだろう。事実、6個ものDR5アミノ酸残基から構成されるペプチドは、しばしば、免疫応答を惹起し得る。

【0147】

従って、本発明はさらに、図1(配列番号2)に示されるDR5ポリペプチドのアミノ酸配列のカルボキシ末端から、位置番号52のグルタミン酸残基まで、欠失される1つ以上の残基を有するポリペプチドおよびこのようなポリペプチド

をコードするポリヌクレオチドを提供する。特に、本発明は、図1（すなわち、配列番号2）の残基52 - m<sup>1</sup>のアミノ酸配列を含むか、あるいはそのアミノ酸からなるポリペプチドを提供し、ここでm<sup>1</sup>は、図1（または、ここでm<sup>1</sup>は、配列番号2におけるアミノ酸残基の位置に対応する6から360までの整数である）におけるアミノ酸残基の位置に対応する57から410までの整数である。より特に、本発明は、図1において示されるDR5配列の以下の残基からなる群より選択されるメンバーを含むか、あるいはそのメンバーからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する（これは、図1におけるアミノ酸残基がN末端～C末端まで、1～411まで連続して番号を付けられる他は、配列番号2として示される配列と同一であり、一方配列番号2におけるアミノ酸残基は、51～360まで連続して番号を付けられ、予測されたシグナルペプチドの位置に反映する）：

【0148】

【化1】

E-52 ~ M-410; E-52  
 ~ A-409; E-52 ~ S-408; E-52 ~ D-407; E-52 ~ A-406; E-52 ~ N-405; E-52  
 ~ G-404; E-52 ~ E-403; E-52 ~ L-402; E-52 ~ Y-401; E-52 ~ M-400; E-52  
 ~ F-399; E-52 ~ K-398; E-52 ~ G-397; E-52 ~ S-396; E-52 ~ S-395; E-52  
 ~ L-394; E-52 ~ L-393; E-52 ~ H-392; E-52 ~ D-391; E-52 ~ E-390; E-52  
 ~ I-389; E-52 ~ K-388; E-52 ~ Q-387; E-52 ~ K-386; E-52 ~ A-385; E-52  
 ~ L-384; E-52 ~ R-383; E-52 ~ E-382; E-52 ~ G-381; E-52 ~ L-380; E-52  
 ~ T-379; E-52 ~ E-378; E-52 ~ L-377; E-52 ~ A-376; E-52 ~ D-375; E-52  
 ~ L-374; E-52 ~ L-373; E-52 ~ T-372; E-52 ~ H-371; E-52 ~ V-370; E-52  
 ~ S-369; E-52 ~ A-368; E-52 ~ D-367; E-52 ~ R-366; E-52 ~ G-365; E-52  
 ~ T-364; E-52 ~ K-363; E-52 ~ N-362; E-52 ~ V-361; E-52 ~ W-360; E-52  
 ~ K-359; E-52 ~ I-358; E-52 ~ L-357; E-52 ~ M-356; E-52 ~ T-355; E-52  
 ~ Y-354; E-52 ~ L-353; E-52 ~ T-352; E-52 ~ D-351; E-52 ~ R-350; E-52  
 ~ H-349; E-52 ~ G-348; E-52 ~ A-347; E-52 ~ A-346; E-52 ~ E-345; E-52  
 ~ A-344; E-52 ~ K-343; E-52 ~ A-342; E-52 ~ V-341; E-52 ~ K-340; E-52  
 ~ I-339; E-52 ~ E-338; E-52 ~ N-337; E-52 ~ D-336; E-52 ~ M-335; E-52  
 ~ L-334; E-52 ~ G-333; E-52 ~ L-332; E-52 ~ K-331; E-52 ~ R-330; E-52  
 ~ M-329; E-52 ~ L-328; E-52 ~ P-327; E-52 ~ E-326; E-52 ~ W-325; E-52  
 ~ S-324; E-52 ~ D-323; E-52 ~ F-322; E-52 ~ P-321; E-52 ~ V-320; E-52  
 ~ L-319; E-52 ~ D-318; E-52 ~ A-317; E-52 ~ F-316; E-52 ~ D-315; E-52  
 ~ D-314; E-52 ~ F-313; E-52 ~ C-312; E-52 ~ Q-311; E-52 ~ R-310; E-52  
 ~ L-309; E-52 ~ T-308; E-52 ~ E-307; E-52 ~ T-306; E-52 ~ P-305; E-52  
 ~ D-304; E-52 ~ G-303; E-52 ~ E-302; E-52 ~ N-301; E-52 ~ A-300; E-52  
 ~ P-299; E-52 ~ V-298; E-52 ~ L-297; E-52 ~ L-296; E-52 ~ R-295; E-52  
 ~ R-294; E-52 ~ R-293; E-52 ~ Q-292; E-52 ~ S-291; E-52 ~ R-290; E-52  
 ~ E-289; E-52 ~ A-288; E-52 ~ E-287; E-52 ~ A-286; E-52 ~ P-285; E-52  
 ~ E-284; E-52 ~ L-283; E-52 ~ L-282; E-52 ~ H-281; E-52 ~ E-280; E-52  
 ~ S-279; E-52 ~ E-278; E-52 ~ G-277; E-52 ~ P-276; E-52 ~ S-275; E-52  
 ~ L-274; E-52 ~ M-273; E-52 ~ N-272; E-52 ~ V-271; E-52 ~ G-270; E-52  
 ~ T-269; E-52 ~ P-268; E-52 ~ E-267; E-52 ~ A-266; E-52 ~ P-265; E-52  
 ~ E-264; E-52 ~ Q-263; E-52 ~ V-262; E-52 ~ E-261; E-52 ~ M-260; E-52

([比1]の続き)

~E-259; E-52 ~ Q-258; E-52 ~ E-257; E-52 ~ P-256; E-52 ~ V-255; E-52  
 ~Q-254; E-52 ~ T-253; E-52 ~ P-252; E-52 ~ Q-251; E-52 ~ L-250; E-52  
 ~I-249; E-52 ~ S-248; E-52 ~ V-247; E-52 ~ I-246; E-52 ~ E-245; E-52 ~  
 N-244; E-52 ~ L-243; E-52 ~ V-242; E-52 ~ N-241; E-52 ~ D-240; E-52 ~  
 E-239; E-52 ~ A-238; E-52 ~ G-237; E-52 ~ P-236; E-52 ~ R-235; E-52 ~  
 Q-234; E-52 ~ S-233; E-52 ~ S-232; E-52 ~ R-231; E-52 ~ D-230; E-52 ~  
 V-229; E-52 ~ R-228; E-52 ~ E-227; E-52 ~ P-226; E-52 ~ D-225; E-52 ~  
 G-224; E-52 ~ G-223; E-52 ~ G-222; E-52 ~ G-221; E-52 ~ S-220; E-52 ~  
 C-219; E-52 ~ I-218; E-52 ~ G-217; E-52 ~ K-216; E-52 ~ L-215; E-52 ~  
 Y-214; E-52 ~ P-213; E-52 ~ L-212; E-52 ~ V-211; E-52 ~ K-210; E-52 ~  
 K-209; E-52 ~ W-208; E-52 ~ L-207; E-52 ~ L-206; E-52 ~ S-205; E-52 ~  
 K-204; E-52 ~ C-203; E-52 ~ V-202; E-52 ~ F-201; E-52 ~ V-200; E-52 ~  
 A-199; E-52 ~ V-198; E-52 ~ I-197; E-52 ~ L-196; E-52 ~ V-195; E-52 ~  
 V-194; E-52 ~ A-193; E-52 ~ A-192; E-52 ~ V-191; E-52 ~ T-190; E-52 ~  
 V-189; E-52 ~ G-188; E-52 ~ I-187; E-52 ~ I-186; E-52 ~ I-185; E-52 ~ G-  
 184; E-52 ~ S-183; E-52 ~ E-182; E-52 ~ K-181; E-52 ~ H-180; E-52 ~ V-  
 179; E-52 ~ C-178; E-52 ~ E-177; E-52 ~ I-176; E-52 ~ D-175; E-52 ~ S-  
 174; E-52 ~ W-173; E-52 ~ P-172; E-52 ~ T-171; E-52 ~ C-170; E-52 ~ D-  
 169; E-52 ~ G-168; E-52 ~ V-167; E-52 ~ K-166; E-52 ~ V-165; E-52 ~ M-  
 164; E-52 ~ G-163; E-52 ~ R-162; E-52 ~ P-161; E-52 ~ C-160; E-52 ~ G-  
 159; E-52 ~ T-158; E-52 ~ R-157; E-52 ~ C-156; E-52 ~ K-155; E-52 ~ R-  
 154; E-52 ~ C-153; E-52 ~ M-152; E-52 ~ E-151; E-52 ~ P-150; E-52 ~ S-  
 149; E-52 ~ D-148; E-52 ~ E-147; E-52 ~ E-146; E-52 ~ R-145; E-52 ~ F-  
 144; E-52 ~ T-143; E-52 ~ G-142; E-52 ~ E-141; E-52 ~ E-140; E-52 ~ C-  
 139; E-52 ~ Q-138; E-52 ~ C-137; E-52 ~ V-136; E-52 ~ T-135; E-52 ~ N-  
 134; E-52 ~ R-133; E-52 ~ T-132; E-52 ~ T-131; E-52 ~ T-130; E-52 ~ C-  
 129; E-52 ~ P-128; E-52 ~ S-127; E-52 ~ L-126; E-52 ~ E-125; E-52 ~ V-  
 124; E-52 ~ E-123; E-52 ~ G-122; E-52 ~ S-121; E-52 ~ D-120; E-52 ~ C-  
 119; E-52 ~ R-118; E-52 ~ T-117; E-52 ~ C-116; E-52 ~ R-115; E-52 ~ L-  
 114; E-52 ~ C-113; E-52 ~ F-112; E-52 ~ L-111; E-52 ~ L-110; E-52 ~ D-

(【化1】の続き)

109; E-52 ~ N-108; E-52 ~ W-107; E-52 ~ H-106; E-52 ~ T-105; E-52 ~ S-104; E-52 ~ Y-103; E-52 ~ D-102; E-52 ~ Q-101; E-52 ~ G-100; E-52 ~ Y-99; E-52 ~ K-98; E-52 ~ C-97; E-52 ~ S-96; E-52 ~ I-95; E-52 ~ C-94; E-52 ~ D-93; E-52 ~ R-92; E-52 ~ G-91; E-52 ~ D-90; E-52 ~ E-89; E-52 ~ S-88; E-52 ~ I-87; E-52 ~ H-86; E-52 ~ H-85; E-52 ~ G-84; E-52 ~ P-83; E-52 to P-82; E-52 ~ C-81; E-52 ~ L-80; E-52 ~ G-79; E-52 ~ E-78; E-52 ~ S-77; E-52 ~ P-76; E-52 ~ S-75; E-52 ~ S-74; E-52 ~ R-73; E-52 ~ K-72; E-52 ~ Q-71; E-52 ~ Q-70; E-52 ~ P-69; E-52 ~ A-68; E-52 ~ A-67; E-52 ~ R-66; E-52 ~ Q-65; E-52 ~ Q-64; E-52 ~ P-63; E-52 ~ A-62; E-52 ~ L-61; E-52 ~ D-60; E-52 ~ Q-59; E-52 ~ Q-58; および E-52 ~ T-57

本発明はまた、上記のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはこのポリヌクレオチド配列からなる核酸分子に関する。本発明はさらに、上記のポリペプチドと、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはその配列からなる核酸分子に関する。本発明はまた、異種ポリヌクレオチド配列に融合される上記のポリヌクレオチド配列を含む。これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドはまた、本発明により含まれる。

#### 【0149】

別の実施形態において、DR5ポリペプチドのC末端欠失は、一般式52 - m<sup>2</sup>により記載され得、ここでm<sup>2</sup>は、図1(配列番号2)に同定されるアミノ酸配列に対応する57~183の数である。特定の実施形態において、本発明のDR5のC末端欠失は、図1(配列番号2)において示されるDR5細胞外ドメイン配列の以下の残基からなる群より選択されるメンバーを含むか、あるいはそのメンバーからなる：

#### 【0150】

#### 【化2】

E-52 ~S-183; E-52 ~E-182; E-52 ~K-181; E-52 ~H-180; E-52 ~V-179; E-52 ~C-178; E-52 ~E-177; E-52 ~I-176; E-52 ~D-175; E-52 ~S-174; E-52 ~W-173; E-52 ~P-172; E-52 ~T-171; E-52 ~C-170; E-52 ~D-169; E-52 ~G-168; E-52 ~V-167; E-52 ~K-166; E-52 ~V-165; E-52 ~M-164; E-52 ~G-163; E-52 ~R-162; E-52 ~P-161; E-52 ~C-160; E-52 ~G-159; E-52 ~T-158; E-52 ~R-157; E-52 ~C-156; E-52 ~K-155; E-52 ~R-154; E-52 ~C-153; E-52 ~M-152; E-52 ~E-151; E-52 ~P-150; E-52 ~S-149; E-52 ~D-148; E-52 ~E-147; E-52 ~E-146; E-52 ~R-145; E-52 ~F-144; E-52 ~T-143; E-52 ~G-142; E-52 ~E-141; E-52 ~E-140; E-52 ~C-139; E-52 ~Q-138; E-52 ~C-137; E-52 ~V-136; E-52 ~T-135; E-52 ~N-134; E-52 ~R-133; E-52 ~T-132; E-52 ~T-131; E-52 ~T-130; E-52 ~C-129; E-52 ~P-128; E-52 ~S-127; E-52 ~L-126; E-52 ~E-125; E-52 ~V-124; E-52 ~E-123; E-52 ~G-122; E-52 ~S-121; E-52 ~D-120; E-52 ~C-119; E-52 ~R-118; E-52 ~T-117; E-52 ~C-116; E-52 ~R-115; E-52 ~L-114; E-52 ~C-113; E-52 ~F-112; E-52 ~L-111; E-52 ~L-110; E-52 ~D-109; E-52 ~N-108; E-52 ~W-107; E-52 ~H-106; E-52 ~T-105; E-52 ~S-104; E-52 ~Y-103; E-52 ~D-102; E-52 ~Q-101; E-52 ~G-100; E-52 ~Y-99; E-52 ~K-98; E-52 ~C-97; E-52 ~S-96; E-52 ~I-95; E-52 ~C-94; E-52 ~D-93; E-52 ~R-92; E-52 ~G-91; E-52 ~D-90; E-52 ~E-89; E-52 ~S-88; E-52 ~I-87; E-52 ~H-86; E-52 ~H-85; E-52 ~G-84; E-52 ~P-83; E-52 ~P-82; E-52 ~C-81; E-52 ~L-80; E-52 ~G-79; E-52 ~E-78; E-52 ~S-77; E-52 ~P-76; E-52 ~S-75; E-52 ~S-74; E-52 ~R-73; E-52 ~K-72; E-52 ~Q-71; E-52 ~Q-70; E-52 ~P-69; E-52 ~A-68; E-52 ~A-67; E-52 ~R-66; E-52 ~Q-65; E-52 ~Q-64; E-52 ~P-63; E-52 ~A-62; E-52 ~L-61; E-52 ~D-60; E-52 ~Q-59; E-52 ~Q-58; E-52 ~T-57

本発明はまた、上記のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはその配列からなる核酸分子に関する。本発明はさらに、上記のポリペプチドと、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはその配列からなる核酸分子に関する。本発明はまた、異種ポリヌクレオチド配

列に融合される上記のポリヌクレオチド配列を含む。これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドはまた、本発明により含まれる。

#### 【0151】

本発明はまた、DR5ポリペプチドのアミノ末端およびカルボキシ末端の両方から欠失される1つ以上アミノ酸を有するポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、図1（すなわち、配列番号2）の残基 $n^1 - m^1$ および/または $n^2 - m^2$ を有するとして一般に記載され得、ここで、 $n^1$ 、 $n^2$ 、 $m^1$ 、および $m^2$ は、上記のように整数である。

#### 【0152】

ATCC受託番号97920に含まれるcDNAクローンによりコードされる完全DR5アミノ酸配列の部分からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列もまた含まれ、ここで、この部分はATCC受託番号97920に含まれるcDNAによりコードされる完全アミノ酸配列のアミノ末端由来の1～約78のアミノ酸、またはカルボキシル末端由来の1～約233のアミノ酸、あるいはATCC受託番号97920に含まれるcDNAによりコードされる完全アミノ酸配列の上記のアミノ末端欠失およびカルボキシル末端欠失の任意の組合せを除外する。上記の欠失変異ポリペプチド形態の全てをコードするポリヌクレオチドもまた提供される。

#### 【0153】

N末端欠失変異体およびC末端欠失変異体のなかで好ましいのは、細胞外ドメインの部分のみを含むか、あるいはそれのみからなる変異体である；すなわち、残基52～184である。なぜなら、その任意の部分は、可溶性であると予測されるからである。

#### 【0154】

DR5のいくつかのアミノ酸配列が、タンパク質の構造または機能に有意な効果なしに変化され得ることが、当該分野で認識される。配列中でのこのような差違を意図する場合、活性を決定するタンパク質の決定的な領域が存在することに留意すべきである。そのような領域は、通常、リガンド結合部位、もしくは死ドメインを構成するか、またはこれらのドメインに影響する3次構造を形成する残

基を含む。

【0155】

従って、本発明はさらに、実質的なDR5タンパク質活性を示すDR5タンパク質の改変体、または以下で議論されるタンパク質部分のようなDR5の領域を含むDR5タンパク質改変体を含む。このような変異体は、欠失、挿入、反転、反復、および、型置換を含む。先に示されるように、どのアミノ酸変化が表現型的にサイレントであるようであるかに関するガイダンスは、Bowie, J. U.ら、Science 247:1306-1310(1990)で見い出され得る。

【0156】

従って、配列番号2のポリペプチドのフラグメント、誘導体またはアナログ、あるいは寄託されたcDNAによりコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導体またはアナログは、(i)少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が保存アミノ酸残基もしくは非保存アミノ酸残基(好ましくは保存アミノ酸残基、そしてより好ましくは少なくとも1個であるが10個より少ない保存アミノ酸残基)で置換され、そしてこのような置換されたアミノ酸残基は、遺伝コードによりコードされるものであってもよいしそうでなくともよいもの、または(ii)1つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または(iii)成熟ポリペプチドが、ポリペプチドの半減期を増加させるための化合物(例えば、ポリエチレングリコール)のような別の化合物と融合したもの、または(iv)さらなるアミノ酸が成熟ポリペプチド(例えば、IgG Fc融合領域ペプチド配列)、またはリーダー配列もしくは分泌配列、または成熟ポリペプチドもしくはプロタンパク質配列の精製に使用される配列と融合されたものであり得る。このようなフラグメント、誘導体およびアナログは、本明細書中の教示より当業者の範囲内であると考えられる。これらのフラグメント、誘導体またはアナログをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明により含まれる。

【0157】

特に興味深いのは、荷電したアミノ酸の、別の荷電したアミノ酸、および中性のアミノ酸、または負に荷電したアミノ酸との置換である。後者は、正の電荷が

減少したタンパク質を生じてDR5タンパク質の特徴を改善する。さらに、本発明の1つ以上のアミノ酸残基(例えば、アルギニン残基およびリジン残基)は、欠失されるかまたは別の残基で置換され得、プロテアーゼ(例えば、フリンまたはケキシンのような)による望まないプロセッシングを排除し得る。凝集の防止は非常に望ましい。タンパク質の凝集は活性を減少させるだけではなく、凝集体は免疫原性であり得ることから薬学的処方物を調製する場合にまた、問題であり得る(Pinckardら、Clin. Exp. Immunol. 2:331-340(1967); Robbinsら、Diabetes 36:838-845(1987); Clelandら、Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377(1993))。

#### 【0158】

アミノ酸の置換はまた、細胞表面のレセプターに対する結合の選択性を変化させ得る。Ostadeら、Nature 361:266-268(1993)は、TNF-レセプターの2つの公知の型の1つのみに対するTNF-の選択的な結合を生じる特定の変異を記載する。従って、本発明のDR5レセプターは、天然の変異または人工操作のいずれかに由来する1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、または付加を含み得る。

#### 【0159】

示されるように、タンパク質の折り畳みまたは活性に有意には影響を与えない保存的アミノ酸置換のような、重要でない性質の変化が好ましい(表IIを参照のこと)。

#### 【0160】

#### 【表2】

表II 保存的アミノ酸置換

芳香族	フェニルアラニン トリプトファン チロシン
疎水性	ロイシン イソロイシン バリン
極性	グルタミン アスパラギン
塩基性	アルギニン リシン ヒスチジン
酸性	アスパラギン酸 グルタミン酸
小さい	アラニン セリン トレオニン メチオニン グリシン

特定の実施形態において、図1のアミノ酸配列および/または本明細書中に記載されるポリペプチドフラグメント（例えば、細胞外ドメインまたは細胞内ドメイン）のいずれかにおける置換、付加または欠失の数は、75、70、60、50、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1あるいは30~20、20~15、20~10、15~10、10~1、5~10、1~5、1~3、または1~2である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明によって包含される。

## 【0161】

機能に必須である、本発明のDR5タンパク質のアミノ酸は、当該分野において公知の方法（例えば、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャン変異誘発（

CunninghamおよびWells、Science 244:1081~1085(1989))によって同定され得る。後者の手順は、分子中の各残基に1個のアラニン変異を導入する。次いで、得られた変異体分子は、生物学的活性(例えば、レセプター結合、またはインビトロもしくはインビボでの増殖活性)について試験される。リガンド-レセプター結合に重要である部位はまた、結晶化、核磁気共鳴または光親和性標識のような構造分析(Smithら、J.Mol.Biol.224:899~904(1992)およびde Vosら、Science 255:306~312(1992))によって決定され得る。

#### 【0162】

さらに、タンパク質工学を使用して、DR5ポリペプチドの特徴を改善または変更し得る。当業者に公知の組換えDNA技術を使用して、単一または複数のアミノ酸の置換タンパク質、欠失タンパク質、付加タンパク質または融合タンパク質を含む、新規な変異体タンパク質またはムテインを作製し得る。このような改変ポリペプチドは、例えば、増強された活性または増加された安定性を示し得る。さらに、それらは、少なくとも特定の精製条件下および保存条件下でより高い収量で生成され得、そして対応する天然のポリペプチドよりも上昇した溶解度を示し得る。

#### 【0163】

天然に存在しない改変体は、当該分野で公知の変異誘発技術を用いて生成され得る。これらの技術としては、オリゴヌクレオチド媒介変異誘発、アラニンスキヤニング、PCR変異誘発、部位特異的変異誘発(例えば、Carterら、Nucl.Acids Res.13:4331(1986);およびZollerら、Nucl.Acids Res.10:6487(1982)を参照のこと)、カセット変異誘発(例えば、Wellsら、Gene 34:315(1985)を参照のこと)、制限選択変異誘発(例えば、Wellsら、Philos.Trans.R.Soc.London SerA 317:415(1986)を参照のこと)が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0164】

従って、本発明はまた、選択された宿主細胞において、発現、スケールアップなどにより良好に適したDR5ポリペプチドを生成するために欠失、付加または置換された1以上のアミノ酸残基を有する、DR5の誘導体およびアナログを包含する。例えば、システイン残基は、ジスルフィド架橋を除去するために欠失され得るか、または別のアミノ酸残基で置換され得る；N結合型グリコシル化部位は、例えば、N結合部位を高グリコシル化する(hyperglycosylate)ことが公知である酵母宿主から、より容易に回収および精製される均質な産物の発現を達成するために、改変または除去され得る。この目的のために、本発明のDR5ポリペプチドの任意の1以上のグリコシル化認識配列上の第1または第3のアミノ酸位置の1つあるいは両方での種々のアミノ酸置換、および/または任意の1以上のこのような認識配列の第2の位置でのアミノ酸欠失は、その改変トリペプチド配列でのDR5のグリコシル化を妨げる(例えば、Miyajimora、EMBO J 5(6):1193-1197を参照のこと)。

#### 【0165】

本発明のポリペプチドはまた、リーダーを含む寄託されたcDNA(ATCC受託番号97920を有する寄託物)によってコードされるポリペプチド；リーダーを有しない寄託されたcDNAによってコードされる成熟ポリペプチド(すなわち、成熟タンパク質)；配列番号2において約-51~約360のアミノ酸を含むか、あるいはこのアミノ酸からなるポリペプチド；配列番号2において約-50~約360のアミノ酸を含むか、あるいはこのアミノ酸からなるポリペプチド；配列番号2において約1~約360のアミノ酸を含むか、あるいはこのアミノ酸からなるポリペプチド；DR5細胞外ドメインを含むか、あるいはこのドメインからなるペプチド；DR5システインリッチドメインを含むか、あるいはこのドメインからなるポリペプチド；DR5膜貫通ドメインを含むか、あるいはこのドメインからなるポリペプチド；DR5細胞内ドメインを含むか、あるいはこのドメインからなるポリペプチド；欠失した膜貫通ドメインの全てまたは一部を有する細胞外ドメインおよび細胞内ドメインを含むか、あるいはこのポリペプチドからなるポリペプチド；およびDR5死ドメインを含むか、あるいはこのドメインからなるポリペプチド；ならびに上記のポリペプチドに対して少なくとも

80%同一であるポリペプチド、より好ましくは少なくとも90%または95%同一であるポリペプチド、なおより好ましくは少なくとも96%、97%、98%または99%同一であるポリペプチドを含み、そしてまた、少なくとも30個のアミノ酸およびより好ましくは少なくとも50個のアミノ酸を有するこのようなポリペプチドの一部を含む。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明によって包含される。

#### 【0166】

DR5ポリペプチドの参照アミノ酸配列に、少なくとも例えば、95%「同一な」アミノ酸配列を有するポリペプチドによって、そのポリペプチドのアミノ酸配列が、DR5ポリペプチドの参照アミノ酸の各100アミノ酸あたり5つまでのアミノ酸変異を含み得るポリペプチド配列を除いて、参照配列に同一である、このポリペプチドのアミノ酸配列が意図される。言い換えれば、参照アミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列において5%までのアミノ酸残基が欠失され得るか、もしくは別のアミノ酸で置換され得るか、または参照配列において全アミノ酸残基の5%までの多数のアミノ酸が、参照配列中に挿入され得る。参照配列のこれらの変異は、参照配列における残基中、もしくは参照配列内の1つ以上連続する群における残基中のいずれかで個々に散在して、この参照アミノ酸配列のアミノ末端位置またはカルボキシ末端位置で、またはこれらの末端位置間のどこかで起こり得る。

#### 【0167】

実際には、例えば、任意の特定のポリペプチドが、図1（配列番号2）に示されるアミノ酸配列、寄託されたcDNAによりコードされるアミノ酸配列、またはそのフラグメントに少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるかどうかは、Bestfitプログラムのような公知のコンピュータプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package、Version 8 for Unix（登録商標）、Genetics Computer Group、University Research Park、575 Science

Drive、Madison、WI 53711)を使用して慣習的に決定され得る。例えば、特定の配列が本発明に従う参照配列に95%同一であるか否かを決定するために、Bestfitまたは任意の他の配列アライメントプログラムを使用する場合、パラメータは、当然、同一性のパーセンテージが参照アミノ酸配列の全長に対して算定され、そして参照配列中のアミノ酸残基の総数の5%までの、相同性におけるギャップが許容されるように設定される。

【0168】

特定の実施形態において、全体的な配列アライメントともいわれる、参照(問合せ)配列(本発明の配列)と対象配列との間の同一性は、Brutlagら(Comp. App. Biosci. 6:237~245(1990))のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定される。FASTDBアミノ酸アライメントにおいて使用される好ましいパラメータは、以下である: Matrix=PAM 0、k-tuple=2、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=20、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Window Size=配列の長さ、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty=0.05、Window Size=500または対象アミノ酸配列の長さ(いずれかの短い方)。この実施形態に従うと、対象配列が、内部の欠失のためではなく、N末端またはC末端の欠失に起因して問合せ配列よりも短い場合、全体的なパーセント同一性を算定する場合に、FASTDBプログラムが対象配列のN末端およびC末端の短縮型を説明しない事実を考慮に入れて、手動の補正が、結果に対してなされる。問合せ配列に対してN末端およびC末端にて短縮した対象配列について、パーセント同一性は、対応する対象残基と一致/整列しない、対象配列のN末端およびC末端である問合せ配列の残基数を、問合せ配列の総塩基のパーセントとして算定することによって補正される。残基が一致/整列されるか否かの決定は、FASTDB配列アライメントの結果によって決定される。次いで、このパーセントは、特定のパラメータを使用する上記のFASTDBプログラムによって算定されるパーセント同一性から差し引かれ、最終的なパーセント同一性スコアに至る。この最終パーセント同

一性スコアは、この実施形態の目的のために使用されるものである。問合せ配列と一致/整列されない、対象配列のN末端およびC末端の残基のみが、パーセント同一性スコアを手動で調整する目的のために考慮される。すなわち、対象配列の最も遠いN末端残基およびC末端残基の外側の問合せ残基位置のみである。例えば、90アミノ酸残基の対象配列が、パーセント同一性を決定するために、100残基の問合せ配列と整列される。この欠失は、対象配列のN末端にて生じ、従って、FASTDBアライメントは、N末端の最初の10残基に一致/整列を示さない。10個の非対残基は、10%の配列（一致されないN末端およびC末端の残基数/問合せ配列中の残基の総数）を表す。その結果、10%が、FASTDBプログラムによって算定されるパーセント同一性スコアから差し引かれる。残りの90残基が、完全に一致された場合に、最終的なパーセント同一性は、90%である。別の例において、90残基の対象配列が、100残基の問合せ配列と比較される。今回この欠失が内部欠失であり、対象配列のN末端またはC末端に、この問合せと一致/整列しない残基が存在しない。この場合、FASTDBによって算定されるパーセント同一性が手動で補正されない。もう一度、FASTDBアライメントにおいて示されるような、問合せ配列と一致/整列しない、対象配列のN末端およびC末端の外側の残基位置のみが、手動で補正される。他の手動の補正は、この実施形態の目的のためになされない。

#### 【0169】

本発明のポリペプチドは、SDS-PAGEゲルまたは分子ふるいゲル濾過カラムにおける分子量マーカーとして、および当業者に周知の方法を使用して本発明のポリペプチドを結合する抗体を生成するための供給源としての用途を含むが、これらに限定されない用途を有する。

#### 【0170】

本願はまた、 $n^1 - m^1$ 、および/または $n^2 - m^2$ として本明細書中で示されるDR5ポリペプチド配列に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチドを含むタンパク質に関する。好ましい実施形態において、本願は、本明細書中に記載した特定のDR5のN末端欠失およびC末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプ

チドに対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチドを含むタンパク質に関する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明によって包含される。

#### 【0171】

特定の好ましい実施形態において、本発明のDR5タンパク質は、上記の融合タンパク質を含み、ここでこのDR5ポリペプチドは、本明細書中で $n^1 - m^1$ 、および $n^2 - m^2$ として記載されるポリペプチドである。好ましい実施形態において、本願は、本明細書中に記載した特定のN末端欠失およびC末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である核酸分子に関する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明によって包含される。

#### 【0172】

DR5ポリペプチドが、3つの主な構造ドメインを示す、411残基のタンパク質であることが、本発明者らに発見された。第1に、リガンド結合ドメイン(細胞外ドメイン)は、図1の約52~約184の残基(配列番号2における約1~約133のアミノ酸残基)内であると同定された。第2に、膜貫通ドメインは、図1の約185~約208の残基(配列番号2における約134~約157のアミノ酸残基)内であると同定された。第3に、細胞内ドメインは、図1の約209~約411の残基(配列番号2における約158~約360のアミノ酸残基)内であると同定された。重要なことには、この細胞内ドメインは、約324~約391の残基(配列番号2における約273~約340のアミノ酸残基)の死ドメインを含む。図1に示されているこのポリペプチドのさらなる好ましいフラグメントとしては、約52~約411の残基(配列番号2における約1~約360のアミノ酸残基)の成熟タンパク質および細胞外ドメインもしくは細胞内ドメインの全てまたは一部を含むが、膜貫通ドメインを欠失する可溶性ポリペプチドが挙げられる。

#### 【0173】

本発明はさらに、リーダーを含む寄託されたcDNAによってコードされるDR5ポリペプチドおよび成熟タンパク質、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン、死ドメイン、およびそれらの全ての組み合わせから選択されるDR5ポリペプチドフラグメントを提供する。

【0174】

さらに、本発明のタンパク質は、当該分野で公知の技術を用いて化学合成され得る(例えば、Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y. およびHunkapiller, Mら, *Nature* 310:105-111(1984)を参照のこと)。例えば、本発明のDR5ポリペプチドのフラグメントに対応するペプチドは、ペプチド合成機の使用により合成され得る。さらに、所望の場合、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸のアナログが、置換または付加としてこのDR5ポリペプチド配列に導入され得る。非古典的アミノ酸としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 一般的なアミノ酸のD異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 $g$ -Abu、 $e$ -Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 $t$ -ブチルグリシン、 $t$ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 $b$ -アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸(例えば、 $b$ -メチルアミノ酸)、 $Ca$ -メチルアミノ酸、 $Na$ -メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸アナログ。さらに、アミノ酸は、D(右旋性)またはL(左旋性)であり得る。

【0175】

天然に存在しない改変体は、当該分野で公知の変異誘発技術を使用して作製され得、それらの技術としては、オリゴヌクレオチド媒介変異誘発、アラニンスキヤニング、PCR変異誘発、部位特異的変異誘発(例えば、Carterら、*Nucl. Acids Res.* 13:4331(1986); およびZollerら、*Nucl. Acids Res.* 10:6487(1982)を参照のこと)。

と)、カセット変異誘発(例えば、Wellsら、Gene 34:315(1985)を参照のこと)、制限選択変異誘発(例えば、Wellsら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A 317:415(1986)を参照のこと)が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0176】

本発明はさらに、翻訳の間または翻訳後に、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子または他の細胞性リガンドへの結合などによって示差的に改変されたDR5ポリペプチドを包含する。多数の化学的改変のうちのいずれも、以下を含むがこれらに限定されない公知の技術によって実施され得る：臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、 $\text{NaBH}_4$ による特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシンの存在下での代謝合成；など。

#### 【0177】

本発明によって包含されるさらなる翻訳後修飾としては、例えば、以下などが挙げられる：N結合型もしくはO結合型の糖鎖(N末端またはC末端のプロセッシング)、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N結合型もしくはO結合型の糖鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加もしくは欠失。このポリペプチドはまた、検出可能な標識(例えば、酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識)を用いて改変して、このタンパク質の検出および単離を可能にし得る。

#### 【0178】

本発明によってまた、さらなる利点(例えば、このポリペプチドの溶解度、安定性および循環時間の増加、または免疫原性の減少)を提供し得る、DR5の化学修飾誘導体が提供される(米国特許第4,179,337号を参照のこと)。誘導体化のための化学部分は、水溶性ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなど)から選択され得る。このポリペプチドは、この分子内のランダムな位置でか、またはこの分子内の所定

の位置で改変され得、そして1、2、3以上の結合した化学部分を含み得る。

【0179】

このポリマーは、任意の分子量のポリマーであり得、そして分枝状であっても非分枝状であってもよい。ポリエチレングリコールに関しては、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の容易さのために、約1kDaと約100kDaとの間（用語「約（およそ）」は、ポリエチレングリコールの調製において、いくつかの分子は示した分子量よりも重く、いくつかは示した分子量よりも軽いことを示す）である。所望の治療プロフィール（例えば、所望される持続放出の時間、（存在する場合には）生物学的活性に対する効果、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または抗原性の欠如、および治療タンパク質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知の効果）に依存して、他のサイズが用いられ得る。例えば、ポリエチレングリコールは、約200、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、15,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、19,500、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、80,000、85,000、90,000、95,000、または100,000kDaの平均分子量を有し得る。

【0180】

上記のように、ポリエチレングリコールは、分枝構造を有し得る。分枝ポリエチレングリコールは、例えば、米国特許第5,643,575号；Morpurgoら、Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996)；Vorobjevら、Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999)；およびCalicetiら、Bioconj. Chem. 10:638-646 (1999)（これら

の各々の開示が、本明細書中で参考として援用される)において記載される。

【0181】

ポリエチレングリコール分子(または他の化学的部分)は、このタンパク質の機能的ドメインまたは抗原性ドメインに対する効果を考慮してこのタンパク質に結合されるべきである。当業者に利用可能な多数の結合方法が存在する(例えば、本明細書中に参考として援用される、EP 0 401 384 (G-CSFにPEGを結合する)、Malikら, Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992) (塩化トレシル(tresyl chloride)を用いたGM-CSFのペグ化を報告する)もまた参照のこと)。例えば、ポリエチレングリコールは、反応性基(例えば、遊離のアミノ基またはカルボキシル基)を介してアミノ酸残基により共有結合され得る。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合し得る基である。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、リジン残基およびN末端アミノ酸残基が挙げられ得る; 遊離のカルボキシル基を有するアミノ酸残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC末端アミノ酸残基が挙げられ得る。スルフヒドリル基もまた、ポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として用いられ得る。治療目的のために好ましいのは、アミノ基での結合、例えば、N末端またはリジン基での結合である。

【0182】

上記で示唆されるように、ポリエチレングリコールは、任意の多くのアミノ酸残基への連結を介して、タンパク質に結合され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、リジン残基、ヒスチジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、またはシステイン残基への共有結合を介して、タンパク質に連結され得る。1つ以上の反応化学が使用されて、タンパク質の特定のアミノ酸残基(例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはシステイン)またはタンパク質の1より多い型のアミノ酸残基(例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはシステイン、およびそれらの組み合わせ)にポリエチレングリコールを結合させ得る。

【0183】

N末端で化学修飾されたタンパク質が特に所望され得る。ポリエチレングリコールを本発明の組成物の例示として用いて、種々のポリエチレングリコール分子から（分子量、分枝などによって）、反応混合物中でのタンパク質（または、ポリペプチド）分子に対するポリエチレングリコール分子の比、行われるべきペグ化反応の型、および選択されたN末端ペグ化タンパク質の獲得方法が選択され得る。N末端ペグ化調製物の獲得方法（すなわち、必要な場合、この部分を他のモノペグ化部分から分離すること）は、ペグ化タンパク質分子の集団からの、N末端ペグ化物質の精製により行われ得る。N末端修飾で化学修飾された選り抜きのタンパク質は、特定のタンパク質における誘導体化に利用可能な異なる型の第1級アミノ基（リジン対N末端）の示差的反応性を利用する還元的アルキル化によって達成され得る。適切な反応条件下では、カルボニル基含有ポリマーを用いた、N末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

#### 【0184】

上記で示されたように、本発明のタンパク質のペグ化は、かなり多数の手段によって達成され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、直接的または介在リンカーによってのいずれかで、タンパク質に結合され得る。タンパク質にポリエチレングリコールを結合させるためのリンカーレス（linkerless）系は、Delgadoら、Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9: 249 - 304 (1992); Francisら、Intern. J. of Hematol. 68: 1 - 18 (1998); 米国特許第4,002,531号; 米国特許第5,349,052号; WO95/06058; およびWO98/32466（これらの各々の開示は、本明細書中で参考として援用される）に記載される。

#### 【0185】

介在するリンカーを伴わずに、タンパク質のアミノ酸残基に直接的にポリエチレングリコールを結合させる1つの系は、トレシル化（tresylated）MPEG（これは、塩化トレシル（tresylchloride）（ $\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ ）を使用して、モノメトキシ（monmethoxy）ポリエチレングリコール（MPEG）を改変することによって生成される）を使用する。ト

レシル化MPEGとのタンパク質の反応に際して、ポリエチレングリコールは、タンパク質のアミン基に直接結合される。従って、本発明は、本発明のタンパク質と2,2,2-トリフルオロエタン(trifluoroethane)スルホニル基を有するポリエチレングリコール分子とを反応させることによって生成されるタンパク質-ポリエチレングリコール結合体を含む。

【0186】

ポリエチレングリコールはまた、多くの異なる介在リンカーを使用して、タンパク質に結合され得る。例えば、米国特許第5,612,460号(この開示全体が、本明細書中で参考として援用される)は、タンパク質にポリエチレングリコールを結合させるためのウレタンリンカーを開示する。ポリエチレングリコールが、リンカーによってタンパク質に結合されるタンパク質-ポリエチレングリコール結合体はまた、MPEG-スクシンイミジルスクシネート(succinimidylsuccinate)、1,1'-カルボニルジイミダゾールで活性化されたMPEG、MPEG-2,4,5-トリクロロフェニルカルボネート(trichloropenylcarbonate)、MPEG-p-ニトロフェノールカルボネート、および種々のMPEG-スクシネート誘導体のような化合物とのタンパク質の反応によって生成され得る。さらなる多くのポリエチレングリコール誘導体およびタンパク質にポリエチレングリコールを結合させるための反応化学が、WO98/32466(この開示全体が、本明細書中で参考として援用される)に記載される。本明細書中に示される反応化学を使用して生成されるペグ化タンパク質産物は、本発明の範囲内に含まれる。

【0187】

本発明の各タンパク質に結合されたポリエチレングリコール部分の数(すなわち、置換の程度)もまた、変動し得る。例えば、本発明のペグ化タンパク質は、平均して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、17、20またはそれより多いポリエチレングリコール分子を連結し得る。同様に、平均の置換の程度は、タンパク質1分子あたり1~3、2~4、3~5、4~6、5~7、6~8、7~9、8~10、9~11、10~12、11~13、12~14、13~15、14~16、15~17、16~18、17~19、または

18～20ポリエチレングリコール部分のような範囲内である。置換の程度を決定する方法は、例えば、Delgadoら、Crit.Rev.Thera.Drug Carrier Sys.9:249-304(1992)において考察される。

【0188】

上記のように、DR5ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングのような天然のプロセスによって、または当該技術分野で周知の化学的改変技術のいずれかによって、改変され得る。同じ型の改変が、所定のDR5ポリペプチド中のいくつかの部位で、同じまたは種々の程度で存在し得ることが理解される。また、所定のDR5ポリペプチドは多くの型の改変を含み得る。DR5ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝状であり得、そしてそのポリペプチドは、分枝を含むかまたは含まない、環状であり得る。環状、分枝状および分枝した環状のDR5ポリペプチドは、天然の翻訳後プロセスから生じ得るか、または合成方法によって作製され得る。改変としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol)の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 $\alpha$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化(pegylation)、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介付加、およびユビキチン化が挙げられる。(例えば、PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES、第2版、T.E.Creighton、W.H.Freeman and Company、New York(1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS、B.C.Johnson編、Academic Press、New York、1-12頁(1983); Se

ifterら、Meth Enzymol . 182 : 626 - 646 ( 1990 ) ; Rattanら、Ann . N . Y . Acad . Sci . 663 : 48 - 62 ( 1992 ) を参照のこと)。

#### 【0189】

DR5ポリペプチドは、以下に挙げられるが、これらに限定されない標準方法により、化学合成および組み換え細胞培養から修復かつ精製され得る：硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレシチンクロマトグラフィー。最も好ましくは、高性能液体クロマトグラフィー(「HPLC」)は、精製のために使用され得る。タンパク質を再折り畳みするための周知の技術が使用され、ポリペプチドが単離および/または精製の間に変性される場合に、活性なコンホメーションを再産生し得る。

#### 【0190】

DR5ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、種々の適用、特に、DR5の化学的かつ生物学的特性を使用する種々の適用について本発明に従って使用され得る。これらのうちの1つは、腫瘍、寄生虫感染、細菌感染、ウイルス感染、再狭窄、および移植片対宿主疾患の処置および/または予防の際の適用であり、寄生虫、細菌およびウイルスに対する耐性を誘導し；T細胞、内皮細胞および特定の造血性細胞の増幅を誘導し；抗ウイルス応答を調節し；そしてアゴニストによるDR5の刺激の後特定の自己免疫疾患を処置および/または予防する。さらなる適用は、細胞、組織および器官の診断、処置および/または予防に関する。本発明のこれらの局面は、さらに以下に議論される。

#### 【0191】

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのエピトープまたはATCC寄託番号97920として寄託されたcDNAに含まれるポリヌクレオチド配列によってコードされるかまたは前出に規定されたようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件または低ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号1の配列の相補体にハイブリダイズするかもしくはA

TCC寄託番号97920として寄託されたcDNA中に含まれるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列のエピトープを含むかあるいはこれらからなるポリペプチドを含む。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号1に開示される配列）、本発明のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列の相補鎖のポリヌクレオチド配列、および前出に規定されるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件または低ストリンジェンシーなハイブリダイゼーション条件下で相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む。

#### 【0192】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるポリペプチドのエピトープ保有部分を含むペプチドまたはポリペプチドを提供する。このポリペプチド部分のエピトープは、本発明のポリペプチドの免疫原性または抗原性エピトープである。本明細書中で使用される場合、用語「エピトープ」とは、動物において、好ましくは、哺乳動物において、そして最も好ましくはヒトにおいて抗原性または免疫原性活性を有するポリペプチドの部分を用いる。好ましい実施形態において、本発明は、エピトープを含むポリペプチドおよびこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。「免疫原性エピトープ」は、タンパク質全体が免疫原である場合、抗体応答を誘導する、タンパク質の一部として定義される。一方、抗体が結合し得るタンパク質分子の領域は、「抗原性エピトープ」として定義され得る。タンパク質の免疫原性エピトープの数は、一般に、抗原性エピトープの数よりも少ない。例えば、Geysen, H. M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998~4002(1983)を参照のこと。

#### 【0193】

エピトープとして機能するフラグメントは、任意の従来の方法によって産生され得る。（例えば、Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135(1985)を参照のこと。これはさらに、米国特許第4,631,211号に記載される）。

#### 【0194】

抗原性エピトープを有するペプチドまたはポリペプチド（すなわち、抗体が結合し得るタンパク質分子の領域を含むもの）の選択に関して、比較的短い合成ペプチド（タンパク質配列の部分を模倣する）が、その部分的に模倣されたタンパク質と反応する抗血清を慣用的に惹起し得ることは当該分野において周知である（例えば、Sutcliffe、J.G.ら、Science、219:660-666（1983）を参照のこと）。タンパク質反応性の血清を誘発し得るペプチドは、しばしば、タンパク質の一次配列において示され、単純な化学的規則のセットによって特徴付けられ得、そしてインタクトなタンパク質の免疫優性領域（すなわち、免疫原性エピトープ）にも、アミノ末端もしくはカルボキシル末端にも拘束されない。

#### 【0195】

DR-5特異的抗体を産生するために使用され得る、抗原性ポリペプチドまたはペプチドの非限定の例としては、以下が挙げられる：図1（配列番号2における約11～約59）中の約62～約110のアミノ酸残基を含むかあるいはこれらからなるポリペプチド；図1（配列番号2における約68～約113）中の約119～約164のアミノ酸残基を含むかまたはこれらからなるポリペプチド；図1（配列番号2における約173～約220）中の約224～約271のアミノ酸残基を含むかまたはこれらからなるポリペプチド；ならびに図1（配列番号2における約224～約319）中の約275～約370のアミノ酸残基を含むかまたはこれらからなるポリペプチド。上記に示されるように、本発明者らは、上記のポリペプチドフラグメントは、DR5タンパク質の抗原領域であると決定した。

#### 【0196】

本発明のエピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドは、任意の従来的手段により生成され得る。Houghten, R.A., 「General Method for the Rapid Solid-Phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of Individual Amin

o Acids」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 5131 - 5135 (1985)。この「Simultaneous Multiple Peptide Synthesis (SMPS)」プロセスは、Houghtenらに対する米国特許第4,631,211号(1986)でさらに記載される。当業者が理解するように、本発明のDR5ポリペプチドおよび上記のそのエピトープ保有フラグメントは、免疫グロブリン(IgG)の定常ドメインの一部と合わされ得、キメラポリペプチドを生じる。これらの融合タンパク質は、精製を促進し、そしてインビボで半減期の増加を示す。これは、例えば、ヒトCD4 - ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物免疫グロブリンのH鎖またはL鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている(EPA 394,827; Traunckerら、Nature 331:84 - 86(1988))。IgG部分によるジスルフィド結合二量体構造を有する融合タンパク質はまた、他の分子との結合および中和において、単量体DR5タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも効率的であり得る(Fountoulakisら、J Biochem 270:3958 - 3964(1995))。

#### 【0197】

##### (抗体)

さらに、本発明のポリペプチドは、(特異的な抗体抗原結合をアッセイするための当該分野で周知のイムノアッセイによって決定されるような)本発明の配列番号2の、ポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、または改変体、および/またはエピトープに免疫特異的に結合する抗体およびT細胞抗原レセプター(TCR)に関する。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって産生されるフラグメント、抗イデオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを含むが、限定されない。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわ

ち、免疫特異的に抗原に結合する抗原結合部位を含む分子をいう。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意の型（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、およびI g Y）、任意のクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2）または任意のサブクラスであり得る。

【0198】

最も好ましくは、この抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体フラグメントであり、これには、F a b、F a b ' およびF ( a b ' ) 2、F d、単鎖F v s ( s c F v )、単鎖抗体、ジスルフィド結合F v s ( s d F v )ならびにV LまたはV Hドメインのいずれかを含むフラグメントが挙げられるがこれらに限定されない。単鎖抗体を含む抗原結合抗体フラグメントは、可変領域を単独で、または以下の全体もしくは部分と組み合わせて含む得る：ヒンジ領域、C H 1ドメイン、C H 2ドメインおよびC H 3ドメイン。また、可変領域とヒンジ領域、C H 1ドメイン、C H 2ドメインおよびC H 3ドメインとの任意の組み合わせもまた含む抗原結合フラグメントがまた本発明に含まれる。本発明の抗体は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起点由来であり得る。好ましくは、この抗体は、ヒト、ネズミ ( m u r i n e )、ロバ、シップウサギ ( s h i p r a b b i t )、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。本明細書中で使用される場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、そしてヒト免疫グロブリンライブラリーまたは1つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックであり、そして内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離した抗体（下に記載のように、そして例えば、K u c h e r l a p a t i らによる米国特許第5,939,598号において記載のような）を含む。

【0199】

本発明の抗体は、一重特異的、二重特異的、三重特異的またはより多くの多重特異性の抗体であり得る。多重特異的な抗体は、本発明のポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であり得るか、または本発明のポリペプチドおよび異種のエピトープ（例えば、異種ポリペプチドもしくは固体支持体物質）、の両方

に特異的であり得る。例えば、PCT公開WO 93/17715；同WO 92/08802；同WO 91/00360；同WO 92/05793；Tuttら、J. Immunol. 147:60-69(1991)；米国特許第4,474,893号、同第4,714,681号、同第4,925,648号、同第5,573,920号、同第5,601,819号；Kostelnyら、J. Immunol. 148:1547-1553(1992)を参照のこと。

#### 【0200】

本発明の抗体は、これらが認識または特異的に結合する、本発明のポリペプチドのエピトープまたは部分に関して記載または特定化され得る。このエピトープまたはポリペプチドの部分は、例えば、N末端およびC末端位置によって、連続するアミノ酸残基におけるサイズによって本明細書中に記載されるように、または表および図に列挙されるように、特定化され得る。本発明の任意のエピトープまたはポリペプチドに特異的に結合する抗体はまた、排除され得る。従って、本発明は、本発明のポリペプチドを特異的に結合し、そして本発明のポリペプチドの排除を可能にする抗体を含む。

#### 【0201】

本発明の抗体はまた、その交差反応性について記載または特定化され得る。本発明のポリペプチドの任意の他のアナログ、オルソログまたはホモログを結合しない抗体が、含まれる。本発明のポリペプチドに対して少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%および少なくとも50%の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書中に記載される方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドを結合する抗体もまた、本発明に含まれる。本発明のポリペプチドに対して95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満および50%未満の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書中に記載される方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドを結合しない抗体もまた、本発明に含まれる。さらに、ハイブリダイゼーション条件下（本明細書中で記載されるような）で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポ

リヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを結合する抗体が、本発明に含まれる。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドに対するそれらの結合親和性について記載または特定化され得る。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-2}$  M未満、 $10^{-2}$  M未満、 $5 \times 10^{-3}$  M未満、 $10^{-3}$  M未満、 $5 \times 10^{-4}$  M未満、 $10^{-4}$  M未満、 $5 \times 10^{-5}$  M未満、 $10^{-5}$  M未満、 $5 \times 10^{-6}$  M未満、 $10^{-6}$  M未満、 $5 \times 10^{-7}$  M未満、 $10^{-7}$  M未満、 $5 \times 10^{-8}$  M未満、 $10^{-8}$  M未満、 $5 \times 10^{-9}$  M未満、 $10^{-9}$  M未満、 $5 \times 10^{-10}$  M未満、 $10^{-10}$  M未満、 $5 \times 10^{-11}$  M未満、 $10^{-11}$  M未満、 $5 \times 10^{-12}$  M未満、 $10^{-12}$  M未満、 $5 \times 10^{-13}$  M未満、 $10^{-13}$  M未満、 $5 \times 10^{-14}$  M未満、 $10^{-14}$  M未満、 $5 \times 10^{-15}$  M未満または $10^{-15}$  M未満の解離定数すなわち $K_d$ を有する親和性が挙げられる。

#### 【0202】

本発明はまた、競合性結合を決定するための当該分野で公知の任意の方法（例えば、本明細書中で記載されるイムノアッセイ）によって決定されるような、本発明のエピトープに対する抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。好ましい実施形態において、この抗体は、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%、エピトープへの結合を競合的に阻害する。

#### 【0203】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る。例えば、本発明は、本発明のポリペプチドとのレセプター/リガンド相互作用を部分的または完全にのいずれかで破壊する抗体を含む。本発明は、レセプター特異的抗体およびリガンド特異的抗体の両方の特徴を有する。本発明はまた、リガンド結合を妨害しないがレセプター活性化を妨害するレセプター特異的抗体の特徴を有する。レセプター活性化（すなわち、シグナル伝達）は、本明細書中に記載の技術、そうでなければ、当該分野で公知の技術により決定され得る。例えば、レセプター活性化は、レセプターのリン酸化（例えば、チロシンまたはセリン/トレオニン）、または免疫沈降それに続くウェスタンブロット分析（例えば、上記のような）によってその基質を検出することにより、決定

され得る。特定の実施形態において、この抗体の非存在下で、リガンド活性またはレセプター活性を、その活性の少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%阻害する抗体が提供される。

#### 【0204】

本発明はまた、リガンド結合およびレセプター活性化の両方を妨げるレセプター特異的抗体、ならびにレセプターリガンド複合体を認識し、そして好ましくは、結合していないレセプターまたは結合していないリガンドを特異的に認識しない抗体の特徴を有する。同様に、本発明は、リガンドと結合し、そしてレセプターへのリガンドの結合を妨げる中和抗体、およびリガントと結合し、それによりレセプター活性化を妨げるが、リガンドがレセプターを結合することを妨げない抗体を含む。さらに、本発明は、レセプターを活性化する抗体を含む。これらの抗体は、レセプターアゴニストとして作用し得、すなわち、例えば、レセプターの二量化を誘発することによってリガンド媒介レセプター活性化の生物学的活性化の全てまたはサブセットのいずれかを増強するかまたは活性化し得る。この抗体は、本明細書中に開示される本発明のペプチドの特異的生物学的活性を含む生物学的活性についてのアゴニスト、アンタゴニストまたは逆アゴニストとして特定化され得る。したがって、本発明はさらに、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する抗体に関する。上記抗体アゴニストは、当該分野で公知の方法を用いて作製され得る。例えば、PCT公開WO96/40281；米国特許第5,811,097号；Dengら、Blood 92(6)：1981-1988(1998)；Chenら、Cancer Res. 58(16)：3668-3678(1998)；Harropら、J. Immunol. 161(4)：1786-1794(1998)；Zhuら、Cancer Res. 58(15)：3209-3214(1998)；Yoonら、J. Immunol. 160(7)：3170-3179(1998)；Pratら、J. Cell. Sci. 111(Pt 2)：237-247(1998)；Pitardら、J. Immunol. Methods 205(2)：177-190(1997)；Liautardら、Cytokine 9(4)

: 233 - 241 (1997); Carlsonら、J. Biol. Chem. 272 (17): 11295 - 11301 (1997); Tarymanら、Neuron 14 (4): 755 - 762 (1995); Mullerら、Structure 6 (9): 1153 - 1167 (1998); Bartunekら、Cytokine 8 (1): 14 - 20 (1996) (これらは全て、その全体が参考として本明細書中に援用される)を参照のこと。

#### 【0205】

本発明の抗体は、例えば、これらに限定されないが、本発明のポリペプチドを精製し、検出し、そして標的化するために使用され得る。これらは、インビトロおよびインビボの両方での診断方法および治療方法を含む。例えば、この抗体は、生物学的サンプルにおける本発明のポリペプチドのレベルを定性的におよび定量的に測定するためのイムノアッセイにおける用途を有する。例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988) (本明細書中でその全体が参照として援用される)を参照のこと。

#### 【0206】

以下にさらに詳細に議論されるように、本発明の抗体は、単独または他の化合物との組み合わせのいずれかで使用され得る。この抗体はさらに、ポリペプチドまたは他の化合物へN末端でもしくはC末端で異種ポリペプチドに組換え的に融合され得るか、または化学的に結合(共有結合および非共有結合を含む)され得る。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子および異種ポリペプチド、薬剤、放射性核種、または毒素のようなエフェクター分子へ組換え的に融合または結合され得る。例えば、PCT公開WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; 米国特許第5,314,995号; および欧州特許第396,387号を参照のこと。

#### 【0207】

本発明の抗体は、改変された(すなわち、共有結合性付着(covalent attachment))が、抗体が抗イディオタイプ応答を産生するのを妨げ

ないような、抗体に対する任意の型の分子の共有結合性付着による)誘導体を含む。例えば、制限されないが、抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化(pegylation)、リン酸化(phosphorylation)、アミド化、既知の保護基/ブロック基(blocking group)による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって改変された抗体が挙げられる。多数の任意の化学的改変が、特異的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含むが、これらに制限されない公知の技術によって実行され得る。さらに、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含み得る。

#### 【0208】

本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適切な方法によって産生され得る。目的の抗原に対するポリクローナル抗体は、当該分野で周知の種々の手順によって産生され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、種々の宿主動物(ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない)に投与されて、抗原に対して特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導し得る。種々のアジュバントが、宿主種に依存して、免疫学的応答を増加させるために使用され得、そしてこれにはフロイント(完全および不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル(mineral gel)、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニック(pluronic)ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG(カルメット-ゲラン杆菌)およびcorynebacterium parvumのような潜在的に有用なヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない。このようなアジュバントはまた、当該分野で周知である。

#### 【0209】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む、当該分野で公知の広範な種々の技術を用いて調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、当該分野で公知の以下に挙げられるハイブリドーマ技術を使用して産生され得、例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual,

(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版、1988); Hammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y. 1981) (上記の参考文献は、その全体が参考として援用される)に教示される。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ技術を通して生成された抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」とは、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む単一のクローンに由来する抗体をいい、そしてそれが生成される方法に由来する抗体ではない。従って、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術を通じて産生される抗体に限定されない。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマおよび組換えならびにファージディスプレイ技術の使用を含む、当該分野で公知の広範な種々の技術を使用して調製され得る。

#### 【0210】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生およびスクリーニングする方法は、当該分野で慣用的かつ周知であり、そして実施例11に詳細に議論される。手短かに言えば、マウスは、本発明のポリペプチドまたはそのようなペプチドを発現する細胞を用いて免疫され得る。一旦免疫応答が検出される(例えば、抗原に特異的な抗体がマウスの血清中に検出される)と、マウスの脾臓を収集しそして脾細胞を単離する。次に、その脾細胞を周知の技術によって任意の適切な骨髓腫細胞(例えば、ATCCから入手可能な細胞株SP20由来の細胞)に融合させる。ハイブリドーマを限界希釈によって選択およびクローン化する。次に、ハイブリドーマクローンを、本発明のポリペプチドを結合し得る抗体を分泌する細胞について、当該分野で公知の方法によってアッセイする。一般的に高いレベルの抗体を含む腹水(ascites fluid)が、陽性ハイブリドーマクローンをを用いてマウスを免疫させることによって、産生され得る。

#### 【0211】

従って、本発明は、モノクローナル抗体ならびに本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する工程を包含する方法によって産生される抗体を、生成する方法を提供し、ここで、好ましくは、このハイブリドーマは、骨髓腫細胞と

本発明の抗原で免疫したマウスから単離された脾細胞とを融合させ、次いで本発明のポリペプチドを結合し得る抗体を分泌するハイブリドーマクローンについて、融合物から生じるハイブリドーマをスクリーニングすることによって生成される。

#### 【0212】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術によって生成され得る。例えば、本発明のFabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、(Fabフラグメントを生成するために)パパインまたは(F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを産生するために)ペプシンのような酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって産生され得る。F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のCH1ドメインを含む。

#### 【0213】

例えば、本発明の抗体はまた、当該分野で公知の種々のファージディスプレイ方法を用いて産生され得る。ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特に、そのようなファージは、レパートリー(repertoire)またはコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用され得る。目的の抗原を結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて選択または同定され得る(例えば、標識した抗原あるいは固体表面またはビーズに結合または捕捉された抗原を使用する)。これらの方法において用いられるファージは、代表的には、ファージ遺伝子IIIタンパク質またはファージ遺伝子VIIITタンパク質のいずれかに組換え的に融合されたFab、Fvまたはジスルフィド安定化されたFvの抗体ドメインを有するファージから発現されたfdおよびM13結合ドメインを含む糸状ファージ(filamentous phage)である。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられる: Brinkmanら、J. Immunol. Methods 182: 41-50 (1995); Amesら、J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995);

Kettleboroughら、Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persicら、Gene 187:9-18 (1997); Burtonら、Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT出願番号PCT/GB91/01134; PCT公開WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; ならびに米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,908号; 同第5,750,753号; 同第5,821,047号; 同第5,571,698号; 同第5,427,908号; 同第5,516,637号; 同第5,780,225号; 同第5,658,727号; 同第5,733,743号および同第5,969,108号(これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される)。

#### 【0214】

上記参考文献に記載されるように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体をコードする領域は、ヒト抗体を含む抗体の全体または任意の他の所望の抗原結合フラグメントを生成するために単離されかつ用いられ得、そして例えば、以下に詳細が記載されるように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主において発現され得る。例えば、Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを組換え的に産生するための技術はまた、当該分野で公知の方法を用いて使用され得、このような方法は、以下に開示される: PCT公開WO 92/22324; Mullinaxら、BioTechniques 12(6):864-869(1992); およびSawaiら、AJRI 34:26-34(1995); およびBetterら、Science 240:1041-1043(1988)(これらの参考文献は、その全体が参考として援用される)。

#### 【0215】

単鎖のFvsおよび抗体を産生するために用いられ得る技術の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号; Huston

ら、Methods in Enzymology 203:46-88(1991); Shuら、PNAS 90:7995-7999(1993); および Skerraら、Science 240:1038-1040(1988)に記載される技術が挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボの使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の使用が好ましくあり得る。キメラ抗体とは、抗体の異なる部分が、異なる動物種に由来する分子(例えば、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体)である。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野において公知である。例えば、Morrison, Science 229:1202(1985); Oiら、BioTechniques 4:214(1986); Gilliesら、(1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; 米国特許第5,807,715号; 同第4,816,567号; および同第4,816,397号を参照のこと(これらはそれらの全体が、参考として本明細書中に援用される)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つ以上の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望された抗原を結合する非ヒト種抗体由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基(framework residue)は、抗原結合を変化させるため(好ましくは改善させるために)CDRドナー抗体由来の対応残基と置換される。これらフレームワークの置換は、当該分野で周知の方法によって同定され、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較による。(例えば、Queenら、米国特許第5,585,089号; Riechmannら、Nature 332:323(1988)を参照のこと(これらはそれらの全体が参考として本明細書中に援用される)。)抗体は、以下を含む当該分野で公知の種々の技術を用いてヒト化され得る: 例えば、CDR-移植(欧州特許第239,400号; PCT公開WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号; 同第5,530,101号および同第5,585,089号)、ベニヤリング(

venering) またはリサーフェイシング (resurfacing) (欧州特許第592,106号; 同第519,596号; Padlan、Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991); Studnickaら、Protein Engineering 7(6):805-814(1994); Roguskaら、PNAS 91:969-973(1994))、およびチェーンシャッフリング (chain shuffling) (米国特許第5,565,332号)。

#### 【0216】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置に対して特に所望される。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記のファージディスプレイ法を含む当該分野で公知の種々の方法により作製され得る。米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号; ならびにPCT公開WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、およびWO 91/10741; (これらの各々はその全体が参考として本明細書中に援用される) もまた参照のこと。

#### 【0217】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンの発現は出来ないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いて産生され得る。例えば、ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子およびヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子の複合体は、無作為にまたは相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入され得る。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域 (diversity region) は、ヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子に加えて、マウスの胚性幹細胞に導入され得る。マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子およびマウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別々にまたは同時に非機能的にされ得る。特に、JH領域のホモ接合性の欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。改変された胚性幹細胞を拡張させ、そしてキメラマウスを産生するために胚盤胞中に微量注入する。次いで、キメラマウスを、ヒト抗体を発現するホモ接合性の子孫を産生するために繁殖させる。トランスジ

ジェニックマウスを、選択された抗原（例えば、本発明のポリペプチドの全体または部分）を用いて通常の様式で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いた免疫したトランスジェニックマウスから得られ得る。トランスジェニックマウスに保持されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、そしてその後、クラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。従って、そのような技術を使用して、治療的に有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体およびIgE抗体の産生が可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、LonbergおよびHuszar、1995、Int. Rev. Immunol. 13: 65 - 93を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術ならびにそのような抗体を産生するためのプロトコールの詳細な議論については、例えば、PCT公開WO98/24893；WO96/34096；WO96/33735；米国特許第5,413,923号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,569,825号；同第5,661,016号；同第5,545,806号；同第5,814,318号；および同第5,939,598号を参照のこと（これらはその全体が本明細書中に参考として援用される）。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) および Gen Pharm (San Jose, CA) のような企業は、上記の技術に類似した技術を用いて選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに従事し得る。

#### 【0218】

選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体を、「誘導された(guided)選択」といわれる技術を用いて産生し得る。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）は、同じエピトープを完全に認識するヒト抗体の選択を誘導するために使用される（Jespersら、Bio/technology 12: 899 - 903 (1988)）。

#### 【0219】

さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、当業者に周知の技術を用いて本発明のポリペプチドを「模倣する」抗イディオタイプ抗体を産生するために順々に利用され得る。（例えば、GreenspanおよびBona、FASEB

J. 7 ( 5 ) : 4 3 7 - 4 4 4 ; ( 1 9 8 9 ) および N i s s i n o f f , J . I m m u n o l . 1 1 4 7 ( 8 ) : 2 4 2 9 - 2 4 3 8 ( 1 9 9 1 ) を参照のこと。) 例えば、結合し、そしてポリペプチドの多量体化 ( m u l t i m e r i z a t i o n ) および / またはリガンドに対する本発明のポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体が、ポリペプチドの多量体化ドメインおよび / または結合ドメインを「模倣する」抗イディオタイプを産生するために使用され得、そして結果としてポリペプチドおよび / またはそのリガンドに結合し、そして中和する。このような抗イディオタイプまたはそのような抗イディオタイプの F a b フラグメントの中和は、ポリペプチドリガンドを中和するための治療的レジメンに使用され得る。例えば、そのような抗イディオタイプ抗体は、本発明のポリペプチドを結合するためおよび / またはそのリガンド / レセプターを結合するために使用され得、そしてそれによってその生物学的活性がブロックされる。

#### 【 0 2 2 0 】

( A . 抗体をコードするポリヌクレオチド )

本発明はさらに、本発明の抗体およびそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ストリンジェントな、またはより低いストリジェンシーなハイブリダイゼーション条件下で ( 例えば、上記に定義されるような ) 抗体 ( 好ましくは、本発明のポリペプチドと特異的に結合する、好ましくは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する抗体 ) をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

#### 【 0 2 2 1 】

ポリヌクレオチドが、当該分野で公知の任意の方法によって得られ得、そしてそのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定される。例えば、抗体のヌクレオチド配列が知られている場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから構築され得 ( 例えば、 K u t m e i e r ら、 B i o T e c h n i q u e s 1 7 : 2 4 2 ( 1 9 9 4 ) に記載されるような ) 、これは、簡単にいうと、以下の工程を包含する : この抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリ

ゴヌクレオチドのアニールリングおよび連結、次いでPCRによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅。

#### 【0222】

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源からの核酸から生成され得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、その免疫グロブリンをコードする核酸は、適切な供給源（例えば、抗体cDNAライブラリー、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成されたcDNAライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリA+RNA））から、例えば、その抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定するために、配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得られ得る。PCRによって生成された増幅された核酸は、次いで、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

#### 【0223】

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えDNA技術、部位特異的変異誘発、PCRなど（例えば、Sambrookら、1990、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY およびAusubelら編、1998、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。))を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および/または挿入を作製するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成し得る。

## 【0224】

特定の実施形態において、重鎖および/または軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域(CDR)の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって(例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖、および軽鎖の可変領域を既知のアミノ酸配列と比較することによって)調べられ得る。慣用的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRが、前述のようにフレームワーク領域内に(例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に)挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る(例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothiaら、J. Mol. Biol. 278:457-479(1998)を参照のこと)。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドを特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に關与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

## 【0225】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」を産生するために開発された技術(Morrisonら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neubergerら、1984、Nature 312:604-608; Takedaら、1985、Nature 314:452-454)が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、このような分子は、マウスモノクローナル抗体およびヒト免疫グロブリンの定常領

域由来の可変領域を有する（例えば、ヒト化抗体）。

【0226】

あるいは、単鎖抗体の産生に関する記載された技術（米国特許第4,694,778号；Bird、1988、Science 242:423-42；Houstonら、1988、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883；およびWardら、1989、Nature 334:544-554）が、単鎖抗体の産生に適応され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E.coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る（Skerraら、1988、Science 242:1038-1041）。

【0227】

（B．抗体を産生する方法）

本発明の抗体は、抗体を合成するための当該分野で公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。

【0228】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ（例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖）の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分（好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法には、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本

発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域（例えば、PCT公開 WO86/05807；PCT公開 WO89/01036；および米国特許第5,122,464号を参照のこと）をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

#### 【0229】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、そしてこのトランスフェクトされた細胞は、次いで、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結した、本発明の抗体、またはその重鎖もしくは軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子の全体の発現のために宿主細胞において同時発現され得る。

#### 【0230】

種々の宿主発現ベクター系は、本発明の抗体分子を発現させるために利用され得る。このような宿主発現系は、目的のコード配列が産生され、かつ続いて精製され得るビヒクルを表すが、また、適切なヌクレオチドをコードする配列で形質転換またはトランスフェクトされる場合には、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞を表わす。これらには、抗体をコードする配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌（例えば、*E. coli*、*B. subtilis*）のような微生物；抗体をコードする配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；抗体をコードする配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、*CaMV*；タバコモザイクウイルス、*TMV*）に感染した植

物細胞系または抗体をコードする配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系；あるいは哺乳動物細胞のゲノムから誘導されたプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物のウイルスから誘導されたプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。組換え抗体分子の発現のために、好ましくは、*Escherichia coli*のような細菌細胞、そしてより好ましくは、特に、組換え抗体分子全体の発現のために真核生物細胞が使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組み合わせられた、チャイニーズハムスターの卵巣細胞（CHO）のような哺乳動物細胞が、抗体のための効果的な発現系である（Foelkingら、1986, *Gene* 45:101；Cockettら、1990, *Bio/Technology* 8:2）。

#### 【0231】

細菌系において、多くの発現ベクターが、抗体分子の発現を意図する使用に依存して有利に選択され得る。例えば、多量のこのようなタンパク質が産生される場合、抗体分子の薬学組成物の作製のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指向するベクターが所望され得る。このようなベクターには、抗体をコードする領域がlacZをコードする領域と共にベクターにインフレームで個別に連結され得、その結果、融合タンパク質が産生される*E. coli*発現ベクターpUR278（Rutherfordら、1983, *EMBO J.* 2:1791）；pINベクター（Inouye&Inouye、1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109；Van Heeke&Schuster、1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509）などが挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクターもまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として、外来性ポリペプチドを発現させるために使用され得る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、そして溶解した細胞から、マトリックスグルタ

チオン - アガロースビーズへの吸着および結合、それに続く遊離グルタチオン存在化での溶出によって容易に精製され得る。このpGEXベクターは、トロンビンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、その結果、このクローン化された標的遺伝子産物は、GST部分から放出され得る。

#### 【0232】

昆虫系において、オートグラフィカリフォルニカ核多核体病ウイルス (*Autographa Californica nuclear polyhedrosis virus*) (AcNPV) は、外来性遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 細胞中で増殖する。この抗体をコードする配列は、ウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン (*polyhedrin*) 遺伝子) に個々にクローン化され得、そしてAcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に配置され得る。

#### 【0233】

哺乳動物の宿主細胞において、多くのウイルスベースの発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、抗体をコードする目的の配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体 (例えば、後期プロモーターおよび3部からなるリーダー配列) に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボの組換えによって、アデノウイルスゲノム中に挿入され得る。ウイルスのゲノムの非必須領域 (例えば、領域E1またはE3) への挿入は、感染した宿主において生存し、かつ抗体分子を発現し得る組換えウイルスを生じる。(例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359を参照のこと)。特定の開始シグナルもまた、挿入された抗体をコードする配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、この開始コドンは、挿入物全体の翻訳を保証するように、所望のコード配列のリーディングフレームと同調でなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の種々の起源であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネー

ターなどを含めることによって増大され得る (Bittnerら、1987, Methods in Enzymol. 153: 51-544を参照のこと)。

#### 【0234】

さらに、挿入された配列の発現を調節するか、または遺伝子産物を所望の特定の様式に改変およびプロセスする宿主細胞株が、選択され得る。タンパク質産物のこのような改変 (例えば、グリコシル化) およびプロセッシング (例えば、切断) は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質産物および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび改変について特徴的かつ特定の機構を有する。適切な細胞株または宿主系は、発現した外来性タンパク質の正確な改変およびプロセッシングを保証するように選択され得る。この目的のために、一次転写物の適切なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化、およびリン酸化のための細胞の機構を有する真核生物の宿主細胞が使用され得る。このような哺乳動物の宿主細胞には、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、および、特に、乳癌細胞株 (例えば、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47Dなど)、ならびに正常な乳腺細胞株 (例えば、CRL7030およびHs578Bstなど) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0235】

組換えタンパク質の長期的で高収率の産生のために、安定した発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定して発現する細胞株が操作され得る。宿主細胞は、ウイルスの複製起点を含む発現ベクターの使用ではなく、適切な発現制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアダニル化部位など)、および選択マーカーによって制御されるDNAで形質転換され得る。外来性DNAの導入に続いて、操作された細胞は、濃縮された培地中で1~2日間増殖され得、次いで選択培地に切り換えられる。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択への耐性を与え、そして細胞がプラスミドをそれらの染色体に安定に組み込むことを可能とし、そして増殖し、次いで細胞株にクローニングおよび増殖され得る病巣を形成する。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を操作するために有利に使用され得る。このような操作された細胞株は、抗

体分子と直接的または間接的に相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において特に有用であり得る。

【0236】

多くの選択系が使用され得、それらには、それぞれ tk<sup>-</sup>、hgprt<sup>-</sup>、または aprt<sup>-</sup> 細胞において使用され得る、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら、1977, Cell 11:223)、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 (SzybalskaおよびSzybalski、1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら、1980, Cell 22:817) 遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。また、代謝拮抗物質耐性は、以下の遺伝子の選択の基礎として使用され得る：メトトレキサートへの耐性を与える dhfr (Wiglerら、1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:357)；O'Hareら、1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527；ニコフェノール酸への耐性を与える gpt (MulliganおよびBerg、1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)；アミノグリコシド G-418 への耐性を与える neo (Clinical Pharmacy 12:488-505；WuおよびWu、1991, Biotherapy 3:87-95；Tolstoshev、1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596；Mulligan、1993, Science 260:926-932；ならびにMorganおよびAnderson、1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217；1993年5月, TIB TECH 11(5):155-215)；ならびにハイグロマイシンへの耐性を与える hygro (Santerreら、Gene 1984, 30:147())。当該分野で一般に公知である組換えDNA技術の方法は、所望の組換えクローンの選択に慣用的に適用され得、そしてこのような方法は、例えば、Ausubelら(編)、1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY；Kriegler、199

0, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; ならびに Dracopoli ら (編)、1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY の 12 および 13 章; Colberre-Garapin ら、1981, J. Mol. Biol. 150: 1 に記載され、これらはその全体が本明細書において参考として援用される。

#### 【0237】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加され得る (総説については、Bebbington および Hentschel、The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, 第3巻 (Academic Press, New York, 1987))。抗体を発現するベクター系においてマーカが増幅可能である場合、宿主細胞の培養液において存在するインヒビターのレベルの増加は、マーカ遺伝子のコピーの数を増加する。この増幅された領域が抗体遺伝子と結合しているために、この抗体の産生もまた、増加する (Crouse ら、1983, Mol. Cell. Biol. 3: 257)。

#### 【0238】

その宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター (重鎖から誘導されるポリペプチドをコードする第1のベクターおよび軽鎖から誘導されるポリペプチドをコードする第2のベクター) で同時トランスフェクトされ得る。この2つのベクターは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの等しい発現を可能とする同一の選択マーカを含み得る。あるいは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの両方をコードする単一のベクターが使用され得る。このような状況において、この軽鎖は、過剰の有毒な遊離重鎖を避けるために、重鎖の前に配置されるべきである (Proudfoot、Nature 1986, 322: 52; Kohler、1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197)。重鎖および

軽鎖のコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

【0239】

一旦、本発明の抗体分子が、動物、化学合成、または組換え的に発現されると、この抗体分子は、免疫グロブリン分子の精製についての当該分野で公知の任意の方法によって（例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティー（特にタンパク質Aの後の特異的抗原へのアフィニティーによる）クロマトグラフィー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差示的溶解度によって、またはタンパク質の精製についての他の任意の標準的な技術によって）精製され得る。

【0240】

（C．抗体接合体）

本発明は、融合タンパク質を作製するために、本発明のポリペプチド（またはそれらの一部、好ましくは、ポリペプチドの少なくとも10、20もしくは50個のアミノ酸）と組換え的に融合したか、あるいは化学的に結合（共有結合および非共有結合の両方を含む）した抗体を含む。この融合は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。この抗体は、本発明のポリペプチド（またはそれらの一部、好ましくは、ポリペプチドの少なくとも10、20もしくは50個のアミノ酸）以外の抗原に特異的であり得る。例えば、抗体は、本発明のポリペプチドを、インビトロまたはインビボのいずれかで、特定の細胞表面レセプターに特異的な抗体に融合させるかまたは結合させることによって、本発明のポリペプチドを特定の細胞型に標的化するために使用され得る。本発明のポリペプチドに融合されたかまたは結合された抗体はまた、当該分野で公知の方法を使用してインビトロ免疫アッセイおよび精製方法にて使用され得る。例えば、Harborら、前出およびPCT公開WO 93/21232；EP439,095；Naramuraら、Immunol.Lett.39:91-99(1994)；米国特許第5,474,981号；Gilliesら、PNAS 89:1428-1432(1992)；Fellら、J.Immunol.146:2446-2452(1991)（これらは、それらの全体が参考として援用される）を参照のこと。

## 【0241】

本発明はさらに、可変領域以外の抗体のドメインに融合されたかまたは結合された本発明のポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドを、抗体のFc領域、あるいはその一部に融合または結合され得る。本発明のポリペプチドに融合された抗体部分は、定常領域、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、あるいはそれらのドメイン全体または部分の任意の組合せを含み得る。このポリペプチドはまた、上記の抗体部分に融合または結合し、マルチマーを形成し得る。例えば、本発明のポリペプチドと融合したFc部分は、Fc部分間のジスルフィド結合を介して二量体を形成し得る。より高次のマルチマー形態は、このポリペプチドをIgAおよびIgMの部分に融合することにより作製され得る。本発明のポリペプチドを抗体部分に融合または結合するための方法は、当該分野において公知である。例えば、米国特許第5,336,603号；同第5,622,929号；同第5,359,046号；同第5,349,053号；同第5,447,851号；同第5,112,946号；EP 307,434；EP 367,166；PCT公開WO 96/04388；WO 91/06570；Ashkenaziら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539(1991)；Zhengら、J. Immunol. 154:5590~5600(1995)；およびVilら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337~11341(1992)(上記の参考文献は、それらの全体が参考として援用される)を参照のこと。

## 【0242】

上記で議論されるように、本発明のポリペプチドは、このポリペプチドのインビボの半減期を増加するか、または当該分野で公知の方法を使用するイムノアッセイにおける使用のために、上記の抗体部分と融合または結合され得る。さらに、本発明のポリペプチドは、精製を容易にするために、上記の抗体部分に融合または結合され得る。1つの報告された実施例は、ヒトCD4ポリペプチドの第1の2つのドメインおよび哺乳動物免疫グロブリンの重鎖もしくは軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載する。(EP 394,82

7 ; Trauneckerら、Nature 331 : 84 - 86 (1988) )。ジスルフィド連結した二量体構造 ( I g G に起因する ) を有する抗体に融合または結合した本発明のポリヌクレオチドはまた、単量体分泌タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子との結合および中和においてより効率的であり得る。( Fountoulakisら、J . Biochem . 270 : 3958 - 3964 (1995) )。多くの場合において、融合タンパク質の F c 部分は、治療および診断において有利であり、従って、例えば、改良された薬物動態学的な特性を生じ得る。( E P A 232 , 262 )。あるいは、融合タンパク質が発現、検出、および精製された後の F c 部分の欠損が、好ましい。例えば、この融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、この F c タンパク質は、治療および診断を妨げ得る。薬物の開発において、例えば、ヒトタンパク質 ( 例えば h I L - 5 ) は、h I L - 5 のアンタゴニストを同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイの目的のために、F c タンパク質と融合された。( D . Bennettら、J . Molecular Recognition 8 : 52 - 58 (1995) ; K . Johansonら、J . Biol . Chem . 270 : 9459 - 9471 (1995) を参照のこと)。

#### 【0243】

さらに、本発明の抗体またはそれらのフラグメントは、精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列と融合され得る。好ましい実施形態において、このマーカーアミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター ( Q I A G E N , I n c . , 9259 Eton Avenue , Chatsworth , CA , 91311 ) において提供されるタグのようなヘキサ - ヒスチジンペプチドであり、それらの多くは市販されている。例えば、Gentzら、Proc . Natl . Acad . Sci . USA 86 : 821 - 824 (1984) に記載されるように、ヘキサ - ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグには、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「HA」タグ ( Wilsonら、Cell 37 : 767 (1984) ) および「flag」タグが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0244】

本発明はさらに、診断剤、または試料薬剤に結合する抗体またはそのフラグメントを含む。この抗体は、例えば、臨床試験の手順の一部（例えば、所定の治療レジメおよび/または予防レジメの有効性を決定するための）として、腫瘍の発生または進行をモニターするために診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングすることによって容易にされ得る。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子射出断層撮影法を使用する陽電子射出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。本発明に従う診断薬として使用するための抗体に結合され得る金属イオンとしては、例えば、米国特許第4,741,900号を参照のこと。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例には、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ；適切な放射性物質の例には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ または $^{99}\text{Tc}$ が挙げられる。

## 【0245】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、細胞毒（例えば、細胞増殖抑制剤または細胞破壊剤）、試料薬剤または放射性金属イオンのような治療的な部分と結合され得る。細胞毒または細胞毒性の薬剤は、細胞に有害な任意の薬剤を含む。例には、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド（tenoposide）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびプロマイ

シンならびにそれらのアナログまたはホモログが挙げられる。試料薬剤としては、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6 -メルカプトプリン、6 -チオグアニン、シタラビン、5 -フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン（mechlorethamine）、チオエパ（tioepa）クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン（streptozotocin）、マイトマイシンC、およびシス -ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（anthracycline）（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）、およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前は、アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（anthramycin）（AMC））、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0246】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答の改変のために使用され得、この試料薬剤または薬物部分は、古典的な化学療法剤に制限されると解釈されるべきではない。例えば、この薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素のような毒素；腫瘍壊死因子、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、血栓剤または抗脈管形成剤（例えば、アンジオスタチン（angiostatin）またはエンドスタチン（endostatin））のようなタンパク質；あるいは、生物学的応答改変剤（例えば、リンホカイン、インターロイキン - 1（「IL - 1」）、インターロイキン - 2（「IL - 2」）、インターロイキン - 6（「IL - 6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM - CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G - CSF」）、または他の増殖因子など）が挙げられ得る。

#### 【0247】

抗体はまた、標的抗原のイムノアッセイまたは精製に特に有用な固体支持体に附着され得る。このような固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0248】

このような治療部分を抗体に結合する技術は周知であり、例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら(編)、243-56頁(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery(第2版)、Robinsonら(編)、623-53頁(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら(編)、475-506頁(1985); 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら(編)、303-16頁(Academic Press 1985)、およびThorpeら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev. 62: 119-58(1982)を参照のこと。

【0249】

あるいは、抗体は2次抗体に結合され、米国特許第4,676,980号(これは、その全体が本明細書に参考として援用される)におけるSegalによる記載のような抗体異種結合体(heteroconjugate)を形成し得る。

#### 【0250】

単独、あるいは細胞毒性因子および/またはサイトカインと組み合わせて投与される、抗体に結合される治療部分を有するかまたは有さない抗体が、試料薬剤として使用され得る。

#### 【0251】

##### (D. 抗体結合についてのアッセイ)

本発明の抗体は、当該分野において公知の任意の方法により、免疫特異的結合についてアッセイされ得る。用いられ得る免疫アッセイとしては、(いくつかのものについてだけ名称を挙げると、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイのような技術を用いる競合アッセイ系および非競合アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。このようなアッセイは慣用的であり、そして当該分野において周知である(例えば、その全体が本明細書中に参考として援用される、Ausubelら編,1994,Current Protocols in Molecular Biology,第1巻,John Wiley & Sons,Inc.,New Yorkを参照のこと)。例示的なイムノアッセイが、以下に簡潔に記載される(しかし、これらは限定を目的とすることが意図されない)。

#### 【0252】

免疫沈降プロトコルは一般に、タンパク質ホスファターゼおよび/またはプロテアーゼインヒビター(例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、バナジン酸ナトリウム)を補充したRIPA緩衝液(1% NP-40またはTriton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.

15 M NaCl、pH 7.2での0.01 M リン酸ナトリウム、1% Trasyloy)のような溶解緩衝液中で細胞の集団を溶解する工程、目的の抗体を細胞溶解物に添加する工程、一定時間(例えば、1~4時間)4 でインキュベートする工程、プロテインAおよび/またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解物に添加する工程、約1時間以上4 でインキュベートする工程、溶解緩衝液中でビーズを洗浄する工程、ならびにSDS/サンプル緩衝液中でビーズを再懸濁する工程を含む。目的の抗体の、特定の抗原を免疫沈降する能力は、例えば、ウエスタンブロット分析により、アッセイされ得る。当業者は、抗体の抗原への結合を増加させ、そしてバックグラウンドを減少させるように改変され得るパラメータ(例えば、セファロースビーズを用いて細胞溶解物を事前にきれいにする)に関して、精通している。免疫沈降プロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編, 1994、Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻、John Wiley & Sons, Inc., New York, 10.16.1を参照のこと。

#### 【0253】

ウエスタンブロット分析は、一般に、タンパク質サンプルを調製する工程、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲル(例えば、抗原の分子量に応じた8%~20% SDS-PAGE)中で電気泳動する工程、タンパク質サンプルをそのポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、PVDFまたはナイロンのような膜に移す工程、ブロッキング溶液(例えば、3% BSAまたは脱脂粉乳を有するPBS)中でその膜をブロッキングする工程、その膜を洗浄緩衝液(例えば、PBS-Tween 20)中で洗浄する工程、ブロッキング緩衝液中で希釈された一次抗体(目的の抗体)を有するその膜をブロッキングする工程、その膜を洗浄緩衝液中で洗浄する工程、ブロッキング緩衝液中で希釈された酵素基質(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)あるいは放射性分子(例えば、<sup>32</sup>Pまたは<sup>125</sup>I)に結合した二次抗体(一次抗体を認識する、例えば、抗ヒト抗体)を用いてその膜をブロッキングする工程、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄する工程、ならびにその抗原の存在を検出する工程を含む

。当業者は、検出されるシグナルを増加させ、そしてバックグラウンドノイズを減少させるように改変され得るパラメータに関して、精通している。ウエスタンブロットプロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻、John Wiley & Sons, Inc., New York, 10.8.1を参照のこと。

【0254】

ELISAは、抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルをその抗原でコーティングする工程、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のような検出可能な化合物に結合した目的の抗体をそのウェルに添加し、そして一定時間インキュベートする工程、および抗原の存在を検出する工程を含む。ELISAにおいて、目的の抗体は、検出可能な化合物に結合されている必要はない；その代わりに、検出可能な化合物に結合した二次抗体（目的の抗体を認識する）がウェルに添加され得る。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体がウェルにコーティングされ得る。この場合、検出可能な化合物に結合した二次抗体が、コーティングされたウェルへの目的の抗原の添加に続いて、添加され得る。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように改変され得るパラメータ、および当該分野において公知のELISAの他のバリエーションに関して、精通している。ELISAに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻、John Wiley & Sons, Inc., New York, 11.2.1を参照のこと。

【0255】

抗体の抗原に対する抗体の結合親和性および抗体-抗原相互作用のオフレート(off-rate)が、競合結合アッセイにより決定され得る。競合結合アッセイの一つの例は、ラジオイムノアッセイであり、ラジオイムノアッセイは、漸増量の非標識抗原の存在下での標識した抗原（例えば、 $^3\text{H}$ または $^{125}\text{I}$ ）と目的の抗体とのインキュベーション、および標識した抗原に結合した抗体の検出を含

む。目的の抗体の、特定の抗原に対する親和性、および結合オフレートは、スキッチャードプロット分析によるデータから決定され得る。二次抗体との競合はまた、ラジオイムノアッセイを用いて決定され得る。この場合、抗原は、漸増量の非標識二次抗体の存在下で、標識した化合物（例えば、 $^3\text{H}$ または $^{125}\text{I}$ ）に結合した目的の抗体とともにインキュベートされる。

#### 【0256】

（E．抗体を基礎とした治療）

本発明はさらに、抗体を基礎とした治療に関し、この治療は、本発明の抗体を、本明細書中に記載される1つ以上の障害または状態を処置および/または予防するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトの患者に投与する工程を含む。本発明の治療化合物としては、本発明の抗体（本明細書中に記載するような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む）ならびに本発明の抗体をコードする核酸（本明細書中に記載されるような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む）が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0257】

理論に縛られることを意図しないが、DR5レセプターは、異なるレセプター分子間のデスドメインの会合/架橋を包含するプロセスにより、プログラムされた細胞死を誘導すると考えられる。さらに、DR5媒介性プログラム細胞死を誘導するDR5リガンド（例えば、TRAIL）は、DR5デスドメインの会合/架橋を引き起こすことにより機能すると考えられる。従って、DR5デスドメインの会合/架橋を妨げる薬剤（例えば、抗体）は、DR5媒介性プログラム細胞死を防止し、そしてDR5デスドメインの会合/架橋を促進する薬剤（例えば、抗体）は、DR5媒介性プログラム細胞死を誘導する。

#### 【0258】

上記のように、DR5レセプターは、TRAILに結合することが示されてきた。DR5レセプターはまた、多数の組織中、および多数の細胞型の表面上に存在することが知られている。これらの組織および細胞型には、慢性リンパ性白血病を有する患者の一次樹状細胞、内皮組織、脾臓、リンパ球、およびヒト胸腺間

質細胞が挙げられる。さらに、以下でより詳細に説明されるように、TRAILは、アポトーシスを誘導し、そしてインビボで腫瘍細胞の増殖を阻害することが示されている。さらに、TRAIL活性は、少なくとも部分的に、DR4およびDR5レセプターとの相互作用によって、変調されると考えられる。

#### 【0259】

TRAILは、多くの腫瘍細胞株におけるアポトーシス細胞死を誘導することが示されている、サイトカインのTNFファミリーのメンバーであり、そしてDR4およびDR5レセプターとの相互作用による効果を誘導そのアポトーシスを媒介するようである。これらのデスドメイン含有レセプターは、カスパーゼの切断によりアポトーシスを開始する膜結合自己活性化シグナル伝達複合体を形成すると考えられる。

#### 【0260】

DR4およびDR5レセプターに加えて、TRAILはまた、「おとり(decoy)」レセプターであることが提案されるいくつかのレセプター、DcR2(切断されたデスドメインを有するレセプター)、DcR1(GPI固定ドメイン)、およびOPG(TNFファミリーの別のメンバーに結合する分泌タンパク質、RANKL)に結合する。

#### 【0261】

さらに、最近の研究により、組換え可溶性形態のレセプターに対するTRAILの親和性の順位は、非常に温度依存性であることが示された。特に、37において、DR5は、TRAILに対する最も高い親和性を有し、そしてOPGは最も低い親和性を有する。

#### 【0262】

DR4およびDR5レセプター遺伝子、ならびに2つのおとりレセプターをコードする遺伝子は、ヒト染色体8p21-22上に位置することが示された。さらに、この領域のヒトゲノムは、頭部および頸部癌において頻繁に分裂する。

#### 【0263】

FaDu鼻咽癌細胞株は、異常染色体8p21-22領域を含むことが、最近見出された(Ozorenら、Int.J.Oncol.16:917-925

(2000))。特に、DR5ではなくDR4を含むホモ接合欠損が、これらの細胞において見出された(Ozorenら、Int. J. Oncol. 16: 917-925 (2000))。これらのFaDu細胞中のDR4レセプター遺伝子内のホモ接合欠損は、DR4レセプターデスドメインを含む。DR4レセプターデスドメインのこの分裂は、TRAIL媒介性細胞毒性に対する耐性に関連する。さらに、野生型DR4レセプター遺伝子の再導入は、アポトーシスおよびFaDu細胞のTRAIL感受性の修復の両方を引き起こすことが示された(Ozorenら、Int. J. Oncol. 16: 917-925 (2000))。これらのデータは、DR4レセプター遺伝子が、ヒト癌において不活性化され得、そしてDR4レセプター遺伝子分裂がTRAIL治療に対する耐性に寄与し得ることを示す。DR5遺伝子における類似の欠失を有する細胞において、同様の結果が見出されることが予想される。

#### 【0264】

ヒト乳房、肺、および結腸ガン細胞株におけるDR4レセプターの細胞質ドメインの過剰発現は、カスパーゼの切断を包含するp53非依存性アポトーシス細胞死を引き起こすことも示されている(Xuら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 269: 179-190 (2000))。さらに、DR4細胞質ドメインの過剰発現はまた、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)およびDNA切断因子(すなわち、ICAD-DF45)の両方の切断を引き起こすことが示された(Xuら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 269: 179-190 (2000))。さらに、試験されたガン細胞と比較して同様のレベルのDR4細胞質ドメインタンパク質にもかかわらず、正常な肺線維芽細胞は、DR4細胞質ドメインの過剰発現に対して耐性であることが示され、カスパーゼ切断の証拠を示さないことが示された(Xuら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 269: 179-190 (2000))。また、同様の結果は、DR5の細胞質ドメインを過剰発現する細胞を用いた場合に予想される。従って、DR4およびDR5レセプターの細胞質ドメインは、例えば、ガン細胞において、アポトーシスを誘導するための薬剤として有用である。

## 【0265】

さらに、サイクリン依存性キナーゼインヒビター p21 (WAF1/CIP1)、ならびにこのタンパク質のN末端91アミノ酸の過剰発現は、細胞サイクル阻害活性を有し、そしてDR4細胞質ドメイン依存性カスパーゼ切断を阻害する。従って、DR4レセプターはまた、細胞サイクルの進行の調節に関与する。上記のように、同様の結果が、DR5レセプターを用いた場合に期待される。従って、DR4およびDR5レセプター、ならびにそれらのレセプターのアゴニストおよびアンタゴニストが、細胞サイクルの進行を調節するために有用である。

## 【0266】

DR5レセプターに結合する抗体は、増加または減少したDR5誘導性アポトーシス細胞死に関連する疾患および状態を処置および/または予防するために有用である。さらに、これらの抗体は、それらがDR5レセプターに対して有する効果が異なる。これらの効果は、抗体が結合するDR5レセプターの特定の部分、この抗体分子自体の三次元構造、および/またはそれらがDR5レセプターと相互作用する様式に基づいて異なる。従って、DR5レセプターの細胞外ドメインに結合する抗体は、DR5活性(例えば、アポトーシスの誘導)を刺激するか阻害するかのいずれかであり得る。DR5レセプター活性を刺激する(例えば、DR5レセプターデスドメイン間の会合を促進することによって)抗体はDR5アゴニストであり、そしてDR5レセプター活性を阻害する(例えば、TRAILの結合をブロックし、そして/またはDR5レセプターデスドメイン間の会合を妨げることにより)抗体は、DR5アンタゴニストである。

## 【0267】

DR5レセプターのアゴニストおよびアンタゴニストとして機能する本発明の抗体には、抗原結合抗体フラグメント、例えば、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fd、単鎖Fvs(scFv)、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、およびV<sub>L</sub>またはV<sub>H</sub>ドメインのいずれかを含むフラグメント、ならびにポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびヒト化抗体が挙げられる。二価の抗体は、アゴニストとして好ましい。これらの抗原結合抗体フラグメントおよび抗体の各々は、本明細書の別の場所でより詳細に記載される。

## 【0268】

上記の点から、本発明の抗体、ならびに他のアゴニストは、DR5ドメイン活性を刺激して、DR5レセプターを発現する細胞（例えば、ガン細胞）におけるアポトーシスを促進するために有用である。この型の抗体は、増加した細胞生存および/またはアポトーシス誘導剤（例えば、TRAIL）に対する非感受性に関連する疾患および状態（例えば、充実性組織癌（例えば、皮膚癌、頭部および頸部腫瘍、乳房腫瘍、内皮腫、肺癌、骨芽細胞腫、破骨細胞腫、およびカボージ肉腫）、ならびに白血病）を予防および/または処置するために有用である。

## 【0269】

本発明のアンタゴニスト（例えば、抗DR5抗体）は、DR5媒介性アポトーシスを防止することにより機能し、そして増加したアポトーシス細胞死に関連する疾患を予防および/または処置するために有用である。このような疾患の例には、糖尿病、AIDS、神経変性障害、脊髄形成異常症、虚血性外傷、毒素誘発性肝臓疾患、敗血症ショック、悪液質および食欲不振が挙げられる。

## 【0270】

上記のように、DR5レセプターは、T細胞の表面上に存在する。従って、本発明のアゴニスト（例えば、抗DR5レセプター抗体）はまた、T細胞媒介性免疫応答を阻害し、そして増加したT細胞増殖に関連する疾患および状態を予防および/または処置するために有用である。T細胞媒介性免疫応答および増加したT細胞増殖に関連する疾患および状態には、対宿主性反応および疾患、変形性関節症、乾癬、敗血症、炎症性腸疾患、一般的な炎症、自己免疫疾患、およびT細胞白血病が挙げられる。

## 【0271】

本発明のアゴニストが、増加したT細胞集団または増加した細胞増殖に関連する疾患および状態（例えば、癌）の処置および/または予防のために個体に投与される場合、アンタゴニストが、アポトーシスを誘導する別の薬剤（例えば、TRAIL）、またはそうでなければ細胞増殖を阻害する薬剤（例えば、抗癌剤）と同時に投与され得る。この特徴の組み合わせ治療、ならびに他の組み合わせ治

療は、以下でより詳細に議論される。

【0272】

さらに、本発明のアンタゴニスト（例えば、抗DR5レセプター抗体）はまた、T細胞媒介免疫応答を増強するため、ならびにT細胞増殖の減少に関連した疾患および状態を予防および/または処置するために有用である。DR5レセプターに対するDR5レセプターリガンドの結合をブロックするか、または膜のシグナル伝達に関連する、DR5レセプターの立体構造的な変化を妨害する本発明の抗体は、DR5媒介T細胞アポトーシスを阻害し得る。DR5媒介アポトーシスの阻害は、例えば、インビボでT細胞集団の増殖率の増加を生じ得るか、またはこのような集団のサイズの減少を妨害し得るかのいずれかである。従って、本発明のアンタゴニストは、減少したT細胞集団またはT細胞集団の減少と関連する疾患または状態を予防および/または処置するために使用され得る。このような疾患および状態の例には、後天性免疫不全症候群（AIDS）および関連する苦痛（例えば、AIDS関連複合体）、T細胞免疫欠損、放射線宿酔、ならびに放射線治療および化学療法によるT細胞欠損が挙げられる。

【0273】

本発明のアンタゴニストがT細胞集団の減少と関連した疾患または状態の処置および/または予防のために個体に投与される場合、このアンタゴニストは、リンパ球増殖を活性化および/または誘導する薬剤（例えば、サイトカイン）とともに同時投与され得る。この性質の組み合わせ治療、ならびに他の組み合わせ治療は、以下により詳細に記載される。

【0274】

同様に、本発明のアゴニストおよびアンタゴニスト（例えば、抗DR5レセプター抗体）もまた、単独でまたは別の治療薬剤と組み合わせで投与された場合に、B細胞媒介免疫応答を阻害するためもしくは増強するためのいずれかで、ならびに増加もしくは減少したB細胞増殖に関連した疾患および状態を予防および/もしくは処置するために有用である。

【0275】

従って、抗DR5抗体は、DR5レセプターを発現する組織または細胞型（例

例えば、内皮細胞)が関与する悪性疾患、異常、疾患、および/または状態を処置および/または予防するために有用である。さらに、DR5レセプターを発現する細胞におけるプログラムされた細胞死の誘導によって処置および/または予防され得る悪性疾患、異常、疾患、および/または状態は、本発明のDR5レセプターアゴニストを使用して処置および/または予防され得る。同様に、DR5レセプターを発現する細胞におけるプログラムされた細胞死を阻害することによって処置および/または予防され得る悪性疾患、異常、疾患、および/または状態は、本発明のDR5レセプターアンタゴニストを使用して処置および/または予防され得る。

#### 【0276】

さらに、本発明の抗体ならびに他のアゴニストは、内皮細胞中でDR5死ドメイン活性を刺激するために有用であり、これは、抗血管形成活性を生じる。この型の抗体は、慢性関節リウマチおよび固形組織癌のような過剰血管新生および新生血管形成に関連する疾患および状態(例えば、皮膚癌、頭部および頸部腫瘍、乳癌、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、およびカポジ肉腫)ならびに慢性炎症と関連する疾患および状態を予防および/または処置するために有用である。

#### 【0277】

慢性炎症(例えば、潰瘍性大腸炎およびクローン病)と関連する疾患および状態は、しばしば、炎症を起こした組織中への新規な血管の内部成長と関連する組織学的変化を示す。DR5死ドメインの活性を刺激する本発明のアゴニストは、これらのレセプターを発現する内皮細胞においてアポトーシスを誘導する。結果として、本発明のアゴニストは、血管およびリンパ管の形成を阻害し得、従って、過剰血管形成および新生血管形成に関連する疾患および状態を予防および/または処置するために使用され得る。

#### 【0278】

本発明のアゴニストを使用して予防および/または処置され得る血管形成に関連する他の疾患および状態には、肥大型およびケロイド癬痕、増殖性糖尿病性網膜症、動静脈先天異常、アテローム性動脈硬化症プラーク、血友病性関節、偽関節骨折、オースラー-ウェーバー症候群、乾癬、化膿性肉芽腫、強皮症、トラコ

ーマ ( t r a c o m a )、月経過多、および血管癒着が挙げられる。

【0279】

さらに、DR5死ドメイン活性を阻害する薬剤（例えば、DR5アンタゴニスト）はまた、血管新生の減少に関連する多数の疾患および状態を予防および/または処置するために有用である。上記に示したように、DR5レセプター活性のアンタゴニストの例には、抗FR5レセプター抗体が含まれる。これらの抗体は、例えば、DR5レセプターに結合することおよびDR5死ドメイン活性を刺激するリガンド（例えば、TRAIL）の結合をブロックすること、または膜シグナル伝達に関連するDR5レセプターの立体構造の変化を阻害するかのいずれかによって機能し得る。

【0280】

本発明のアンタゴニストを使用して処置され得る血管新生の減少と関連する状態の例は、創傷治癒の遅延である。特に高齢者は、しばしば、若い個体よりもより遅い速度で治癒する。従って、本発明のアンタゴニストは、創傷部位にある内皮細胞中でアポトーシスが発生することを予防および/または阻害し得、それによって、治癒が損なわれた個体、ならびに「正常な」速度で治癒する個体における創傷治癒を促進する。従って、本発明のアンタゴニストは、創傷治癒を促進および/または加速するために使用され得る。本発明のアンタゴニストはまた、他の疾患および状態（再狭窄、心筋梗塞、末梢動脈疾患、重症四肢虚血（critical limb ischemia）、アンギナ、アテローム性動脈硬化症、虚血、水腫、肝硬変、変形性関節症、および肺線維症を含む）を処置および/または予防するために有用である。

【0281】

本発明のアゴニストおよびアンタゴニストを使用して処置され得る多数のさらなる悪性疾患、異常、疾患、および/または状態は、本明細書中の他の箇所（例えば、以下の「試料薬剤」と題された節）において示される。

【0282】

本発明の抗体は、多数の方法で治療的に使用され得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを結合する抗体は、局所的または全身的のい

れかで個体（例えば、ヒト）に投与され得る。さらに、これらの抗体は、単独で、別の治療薬剤と組み合わせて、または毒素に付随してもしくは毒素に結合されて、投与され得る。

#### 【0283】

抗DR5抗体は、他のモノクローナル抗体またはキメラ抗体、あるいはリンホカイン、腫瘍壊死因子、またはTNF関連分子（例えば、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、TNF- $\gamma$ 、TNF- $\delta$ 、TNF- $\epsilon$ 、およびTRAIL）、または造血増殖因子（例えば、IL-2、IL-3およびIL-7）と組み合わせて利用され得る。例えば、アゴニスト性抗DR5抗体は、本発明のDR5レセプターを発現する細胞においてDR5媒介細胞死を誘導することを求める場合に、TRAILとともに同時投与され得る。この性質の組み合わせ治療および他の組み合わせ治療が、以下でより詳細に議論され得る。

#### 【0284】

本発明の抗体は、単独で、または他の型の処置（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン治療、免疫治療および抗腫瘍剤）との組み合わせで投与され得る。一般的に、（抗体の場合には）患者の種と同じ種である種起源または種反応性の生成物の投与が好ましい。従って、好ましい実施形態においては、ヒト抗体、フラグメント誘導體、アナログ、または核酸が、治療または予防のために、ヒトの患者に投与される。

#### 【0285】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（そのフラグメントを含む）に関する免疫アッセイ、およびそれらに関連した障害の治療の両方のために、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する、高親和性および/または強力な、インビボでの阻害抗体および/または中和抗体、それらのフラグメント、またはそれらの領域を使用することが好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（そのフラグメントを含む）に対して親和性を有する。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $10^{-6} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $10^{-7} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $10^{-8} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $10^{-9} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $10^{-10} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、1

$10^{-11}$ M、 $5 \times 10^{-12}$ M、 $10^{-12}$ M、 $5 \times 10^{-13}$ M、 $10^{-13}$ M、 $5 \times 10^{-14}$ M、 $10^{-14}$ M、 $5 \times 10^{-15}$ M、および $10^{-15}$ Mより小さい解離定数すなわちKdを有する結合親和性が挙げられる。

【0286】

(ポリペプチドアッセイ)

本発明はまた、細胞および組織におけるDR5タンパク質またはその可溶性形態のレベルを検出する(正常および異常なレベルの判定を含む)ための定量的アッセイおよび診断アッセイのような診断アッセイに関する。従って、例えば、正常コントロール組織サンプルと比較して、DR5またはその可溶性形態の過剰発現を検出するための、本発明に従う診断アッセイは、例えば腫瘍の存在を検出するために使用され得る。宿主由来のサンプルにおいて、タンパク質(例えば、本発明のDR5タンパク質またはその可溶性形態)のレベルを決定するために使用され得るアッセイ技術は、当業者に周知である。このようなアッセイ方法としては、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびELISAアッセイが挙げられる。

【0287】

生物学的サンプル中のDR5タンパク質レベルのアッセイは、任意の当該分野で公知の方法を使用して行われ得る。「生物学的サンプル」により、DR5レセプタータンパク質またはmRNAを含む、個体、細胞株、組織培養物、または他の供給源から得られた任意の生物学的サンプルが意図される。抗体に基づく技術が、生物学的サンプル中のDR5タンパク質レベルをアッセイするために好ましい。例えば、組織におけるDR5タンパク質発現は、古典的な免疫組織学的方法で研究され得る。(Jalkanen, M.ら、J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M.ら、J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987))。DR5タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセイ(例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ検定法(ELISA)およびラジオイムノアッセイ(RIA))が挙げられる。

【0288】

適切な標識は、当該分野で公知であり、これらとしては、酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）および放射性同位体（例えば、ヨウ素（ $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ ）、炭素（ $^{14}\text{C}$ ）、硫黄（ $^{35}\text{S}$ ）、トリチウム（ $^3\text{H}$ ）、インジウム（ $^{112}\text{In}$ ）およびテクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ））；ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、ならびにビオチンが挙げられる。

#### 【0289】

（試料薬剤）

腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーリガンドが、細胞傷害性、抗ウイルス活性、免疫調節活性、および数種の遺伝子の転写制御を含む、多数の細胞応答を誘導する、最も多面的なサイトカインに属することは、公知である（Goeddel, D.V.ら、「Tumor Necrosis Factors: Gene Structure and Biological Activities」、Symp. Quant. Biol. 51:597-609 (1986)、Cold Spring Harbor; Beutler, B.およびCerami, A., Annu. Rev. Biochem. 57:505-518 (1988)；Old, L.J., Sci. Am. 258:59-75 (1988)；Fiers, W., FEBS Lett. 285:199-224 (1991)）。TNF - ファミリーリガンドは、TNF - ファミリーレセプター（本発明のDR5を含む）と結合することによって、このような種々の細胞応答を誘導する。

#### 【0290】

本発明のDR5ポリヌクレオチド、およびポリペプチド、アゴニスト、および/またはアンタゴニストは、欠損しているかまたは不十分な量のDR5によって（直接的または間接的に）媒介される任意の疾患または障害に罹患した患者（例えば、哺乳動物、好ましくは、ヒト）に投与され得る。あるいは、遺伝子治療アプローチが、このような疾患または障害を処置および/または予防するために適用され得る。本発明の1つの実施形態において、DR5ポリヌクレオチド配列は、欠損遺伝子を含むムテインDR5遺伝子を検出するために使用される。ムテイン遺伝子は、インビトロ診断アッセイにおいて、および本明細書中に開示されたDR5ヌクレオチド配列の、この遺伝子の欠損を有すると疑われている患者から

得られたDR5遺伝子のヌクレオチド配列との比較によって同定され得る。欠損遺伝子は、当業者に公知の技術を使用する通常のDR5コード遺伝子で置換され得る。

#### 【0291】

別の実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニスト、および/またはアンタゴニストは、種々の細胞型でのTRAIL/DR5相互作用を阻害することから生じる表現型的効果を研究するための研究用ツールとして使用され得る。DR5ポリペプチドおよびアンタゴニストはまた、TRAILまたはDR5またはそれらの相互作用を検出するためのインビトロアッセイにおいて使用され得る。

#### 【0292】

(TRAILがそのメンバーである)TNFファミリーの特定のリガンドは、1より多い別個の細胞表面レセプタータンパク質に結合することが報告されている。例えば、DR4と名付けられたレセプタータンパク質は、TRAILを結合することが報告されているが、本発明のDR5とは別のものである(Panら、*Science* 276:111-113(1997);本発明中に参考として援用される)。別の実施形態において、精製したDR5ポリペプチド、アゴニスト、および/またはアンタゴニストが、TRAILの内因性細胞表面TRAILへの結合を阻害するために使用される。TRAIL結合について競合することによって、本発明の可溶性DR5ポリペプチドは、TRAILの、細胞表面DR5への相互作用を阻害するためのみならず、DR5とは別個のTRAILレセプタータンパク質への結合を阻害するためにもまた、利用され得る。従って、さらなる実施形態において、本発明のDR5ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニスト、および/またはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボ手順において、TRAILの機能的活性を阻害するために使用される。TRAILの細胞表面レセプターへの結合を阻害することによって、DR5はまた、内因性レセプターへのTRAILの結合から生じる生物学的効果を阻害する。DR5ポリペプチドの種々の形態が利用され得、これらには、例えば、上記のDR5フラグメント、誘導体、およびTRAILを結合可能である改変体が含まれる。好ましい実施

形態において、可溶性DR5は、TRAILの機能的活性を阻害するために（例えば、このようなアポトーシスに感受性である細胞のTRAIL媒介アポトーシスを阻害するために）使用される。従って、さらなる実施形態において、DR5は、TRAIL媒介障害を処置および/または予防するために哺乳動物（例えば、ヒト）に投与される。このようなTRAIL媒介障害には、TRAILによって（直接的または間接的に）引き起こされるか、または悪化する状態が含まれる。

#### 【0293】

DR5ポリペプチドを発現し、かつDR5リガンドに対する有効な細胞応答を有すると考えられる細胞としては、初代樹状細胞、内皮組織、脾臓、慢性リンパ性白血病、およびヒト胸腺間質細胞が挙げられる。「TNFファミリーリガンドに対する細胞応答」により、TNFファミリーリガンドにより誘導される、細胞、細胞株、組織、組織培養物または患者に対する、遺伝子型、表現型、および/または形態型のいかなる変化もが意図される。示されるように、このような細胞応答は、TNFファミリーのリガンドに対する正常な生理学的応答だけでなく、増加したアポトーシスまたはアポトーシスの阻害に関連する疾患をも含む。アポトーシス（プログラムされた細胞死）は、免疫系の末梢Tリンパ球の欠失に関連する生理学的メカニズムであり、その調節不全は、多くの異なる病原性のプロセスを導き得る（Ameisen, J. C., AIDS 8:1197-1213 (1994); Kramer, P. H. Jr., Curr. Opin. Immunol. 6:279-289 (1994)）。

#### 【0294】

本発明のDR5ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、処置、予防、診断、および/または予後判定され得る、増加した細胞生存またはアポトーシスの阻害に関連する疾患としては、以下が挙げられる：癌（例えば、濾胞性リンパ腫、p53変異を伴う癌、およびホルモン依存性腫瘍（大腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、肺癌、腸癌、精巣癌、胃癌、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳癌、前立

腺癌、カポジ肉腫および卵巣癌が挙げられるが、これらに限定されない) ; 自己免疫障害 (例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット (Behcet) 病、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎および慢性関節リウマチ) ; およびウイルス感染 (例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス) ; 炎症 ; 対宿主性移植片病 ; 急性移植片拒絶および慢性移植片拒絶。好ましい実施形態において、本発明のDR5ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および/またはアンタゴニストは、特に上記に列挙される癌の、増殖、進行および/または転移を阻害するために使用される。

#### 【0295】

本発明のDR5ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および/あるいはアンタゴニストまたはアゴニストによって処置、予防、診断および/またはまたは予後判定され得る、細胞生存の増大に関連するさらなる疾患または状態には、悪性疾患ならびに以下のような関連する障害の進行および/または転移が挙げられるが、これらに限定されない : 白血病 (急性白血病 (例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病 (骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む) を含む) ならびに慢性白血病 (例えば、慢性骨髄性 (顆粒球性) 白血病および慢性リンパ球性白血病) )、真性赤血球増加症、リンパ腫 (例えば、ホジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、H鎖病、ならびに固形腫瘍 (肉腫および癌腫 (例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫 (endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝細胞癌腫、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫 (menangioma)、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜

芽細胞腫)を含むが、これらに限定されない)。

【0296】

本発明のDR5ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および/あるいはアンタゴニストまたはアゴニストによって処置、予防、診断および/またはまたは予後判定され得る、アポトーシスの増大に関連する疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない: AIDS; 神経変性障害(例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または以前に関連した疾患); 自己免疫障害(例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病(Behcet's disease)、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連系球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ)、脊髄形成異常症候群(例えば、再生不良性貧血)、対宿主性移植片病、虚血性傷害(心筋梗塞、発作および再灌流傷害によって生じるようなもの)、肝臓傷害または疾患(例えば、肝炎関連肝臓傷害、虚血/再灌流傷害、胆汁うっ滞(cholestosis)(胆管傷害)および肝臓癌); 毒物誘導性肝臓疾患(アルコール引き起こされるようなもの)、敗血症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。好ましい実施形態において、DR5ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび/またはアゴニストは、上記の疾患および障害を処置および/またはするために使用される。

【0297】

AIDSを規定する免疫不全の状態は、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球の数および機能の減少に対して二次的である。最近の報告は、毎日のCD4<sup>+</sup>T細胞の損失が、 $3.5 \times 10^7$ と $2 \times 10^9$ 個の細胞の間であると推定する(Wei Xら、Nature 373:117-122(1995))。HIV感染のセッティングにおけるCD4<sup>+</sup>T細胞の枯渇の一つの原因は、HIV誘導性アポトーシスと考えられている(例えば、Meynardら、Science 257:217-219、(1992); Grouxら、J Exp. Med. 175:331、(1992); およびOyaizuら、Cell Activation and Apoptosis in HIV Infection, Andrieu およびLu、編、Plenum Press、New York、1995、1

01-114頁を参照のこと)。実際に、HIV誘導性アポトーシス細胞死は、インビトロで実証されただけではなく、より重要なことに、感染した個体において実証された(Ameisen, J. C., AIDS 8:1197-1213 (1994); Finkel, T. H. および Banda, N. K., Curr. Opin. Immunol. 6:605-615 (1995); Muro-Cacho, C. A. ら, J. Immunol. 154:5555-5566 (1995))。さらに、アポトーシスおよびCD4<sup>+</sup>Tリンパ球の枯渇は、AIDSの異なる動物モデルに密接に相関し(Brunner, T. ら, Nature 373:441-444 (1995); Gougeon, M. L. ら, AIDS Res. Hum. Retroviruses 9:553-563 (1993))、そしてアポトーシスは、ウイルス複製がAIDSを生じないこれらの動物モデルにおいては観察されない(Gougeon, M. L. ら, AIDS Res. Hum. Retroviruses 9:553-563 (1993))。さらなるデータは、HIVに感染した個体由来の感染していないTリンパ球であるが、プライムされるか活性化されたTリンパ球が、TNF-ファミリーリガンドFasLと遭遇した後にアポトーシスを受けることを示す。HIV感染後に死を生じる単球細胞株を使用して、U937細胞のHIVでの感染が、FasLの新規の発現を生じ、そしてFasLが、HIV誘導性アポトーシスを媒介することが実証された(Badley, A. D. ら, J. Virol. 70:199-206 (1996))。さらに、TNFファミリーのリガンドは、感染されていないマクロファージにおいて検出可能であり、そしてその発現は、上方制御され、その後HIV感染が、感染されていないCD4<sup>+</sup>Tリンパ球の選択的殺傷を生じる(Badley, A. D. ら, J. Virol. 70:199-206 (1996))。さらに、さらなる研究は、Fas媒介性アポトーシスが、HIV個体におけるT細胞の損失を含意する(Katsikis ら, J. Exp. Med. 181:2029-2036, 1995)。

#### 【0298】

従って、本発明によって、HIV<sup>+</sup>個体を処置および/または予防するための方法が提供され、この方法は、本発明のDR5、DR5アゴニストおよび/また

はDR5アゴニストを投与する工程を包含し、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球の選択的殺傷を減少させる。投与および用量の様式を、以下に詳細に議論する。

#### 【0299】

同種移植片拒絶では、レシピエント動物の免疫系は、ほとんどの場合免疫系は周囲抗原によってのみ感作されるので、応答するように前もって感作されていない。同種のその他のメンバーからの組織は、例えば、ウイルスおよび細菌が提示されるのと同じようには、提示されていない。同種移植片拒絶の場合、免疫抑制養生法は、免疫系がエフェクター期に到達することを阻むように設計される。しかし、異種移植片拒絶の免疫プロフィールは、同種移植片拒絶よりも疾患再発により類似し得る。疾患再発の場合、免疫系は、天然の島細胞の破壊によって示されるように、すでに活性化されている。従って、疾患再発では、免疫系はすでにエフェクター期にある。活性化され、エフェクター細胞へ分化されたリンパ球は、DR5ポリペプチドを発現するので、本発明のアゴニストは、同種移植片および異種移植片の両方に対する免疫応答を抑制し得、そのことによって、アポトーシスを増強する化合物に感受性である。従って、本発明はさらに、免疫学的寛容組織を作製するための方法を提供する。

#### 【0300】

本発明のDR5アンタゴニストまたはアゴニストは、炎症疾患（例えば炎症腸疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、および敗血症）の処置および/または予防に有用であり得る。

#### 【0301】

さらに、リンパ芽球のDR5の発現に起因して、可溶性DR5アゴニスト、またはアンタゴニスト(mAb)この形態の癌の処置および/または予防に使用され得る。さらに、可溶性DR5または中和mAbは、種々の慢性および急性な形態の炎症（例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、敗血症および炎症性腸疾患）の処置および/または予防に使用され得る。

#### 【0302】

本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドならびに/あるいはそのアゴニストおよび/またはアンタゴニストは、広範な疾患および/または状態

の診断および処置、予防、診断および/または検出において有用である。このような疾患および状態には、癌（例えば、免疫細胞関連癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、濾胞性リンパ腫、膠芽腫、p53の変異または変化と関連した癌、脳腫瘍、膀胱癌、子宮頸部癌、大腸癌、結腸直腸癌、肺の非小細胞癌、肺の小細胞癌、胃癌など）、リンパ増殖性障害（例えば、リンパ節造形およびリンパ節腫瘍（例えば、ホジキン病））、微生物（例えば、ウイルス、細菌など）感染（例えば、HIV-感染、HIV-2感染、ヘルペスウイルス感染（HSV-1、HSV-2、CMV、VZV、HHV-6、HHV-7、EBVを含むがこれらに限定されない）、アデノウイルス感染、ポックスウイルス感染、ヒトパピローマウイルス感染、肝炎感染（例えば、HAV、HBV、HCVなど）、*Helicobacter pylori*感染、侵襲性*Staphylococci*など）、寄生生物感染、腎炎、骨疾患（例えば、骨粗しょう症）、アテローム性動脈硬化症、疼痛、心臓血管障害（例えば、新生血管形成、低血管形成または循環の減少（例えば、虚血性疾患（例えば、心筋梗塞、発作など））、AIDS、アレルギー、炎症、神経変性性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜症、小脳変性など）、移植拒絶（急性および慢性）、対宿主性移植片病、骨髄形成異常症に起因する疾患（例えば、再生不良性貧血など）、リウマチにおける関節組織破壊、肝臓疾患（例えば、急性および慢性肝炎、肝臓損傷、および肝硬変）、自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、免疫複合体性糸球体腎炎、自己免疫性糖尿病、自己免疫性血小板減少性紫斑病、グレーブズ病、橋本甲状腺、炎症性自己免疫疾患など）、心筋症（例えば、拡張型心筋症）、糖尿病、糖尿病性合併症（例えば、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパシー、糖尿病性網膜症）、インフルエンザ、ぜん息、乾癬、骨髄炎、糸球体腎炎、敗血症性ショック、および潰瘍性大腸炎が挙げられるがこれらに限定されない。

### 【0303】

本発明のポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチドならびに/あるいはそのアゴニストおよび/もしくはアンタゴニストは、造血の調節、新脈管形成の調節（例えば、促進）、創傷治癒（例えば、創傷、熱傷、および骨折）ならびに

骨形成の調節において有用である。

【0304】

DR5ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはDR5のアゴニストは、感染因子の処置および/または予防に用いられ得る。例えば、感染性因子に対する免疫応答を上昇させることによって、特にB細胞および/またはT細胞の増殖および分化を増加させることによって、感染性疾患が処置および/または予防され得る。免疫応答は、既存の免疫応答を上昇させるか、または新たな免疫応答を開始させるかのいずれかにより上昇され得る。あるいは、DR5ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはDR5のアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、必ずしも免疫応答を誘発することなく、感染因子を直接阻害し得る。

【0305】

ウイルスは、DR5ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはDR5アゴニストにより処置および/または予防され得る疾患または症状を引き起こし得る感染因子の一例である。ウイルスの例としては、以下のDNAおよびRNAのウイルスおよびウイルス科が挙げられるがこれらに限定されない：アルボウイルス、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アルテリウイルス、ビルナウイルス科、ブニヤウイルス科、カルシウイルス科、サルコウイルス科(Circoviridae)、コロナウイルス科、デング熱ウイルス、HIV-1、HIV-2、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科(例えば、B型肝炎)、ヘルペスウイルス科(例えば、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス1および2、ヘルペス帯状疱疹ウイルス、エプスタイン-バーウイルス(EBV)、ヘルペスB型ウイルス、ならびにヒトヘルペスウイルス6, 7および8)、モルビリウイルス科、ラブドウイルス科(例えば、狂犬病ウイルス)、オルソミクソウイルス科(例えば、インフルエンザAウイルス、およびインフルエンザB)、パラミクソウイルス科(例えば、パラインフルエンザウイルス)、パピローマウイルス、パポバウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科(例えば、EMCVおよびポリオウイルス)、ポックスウイルス科(例えば、痘瘡またはワクシニアウイルス)、レオウイルス科(例えば、ロタウイルス)、レトロウイルス科(HTLV-I、HTLV-II、レンチウイルス)、ならびにトガウイルス科(例えば、ルビ

ウイルス属)。これらのウイルスまたはウイルス科は、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：関節炎、細気管支炎 (bronchiolitis)、呼吸性疾患、脳炎、眼性感染症 (例えば、結膜炎、角膜炎)、慢性疲労症候群、肝炎 (A型、B型、C型、E型、慢性活動性、デルタ)、日本脳炎B型、アルゼンチン出血熱、チングニア、リフトバレー熱、黄熱病、髄膜炎、痘瘡、日和見感染症 (例えば、AIDS、カポジ肉腫)、肺炎、パーキットリンパ腫、水痘、出血熱、麻疹、流行性耳下腺炎、パラインフルエンザ、狂犬病、感冒、ポリオ、白血病、風疹、性感染症、皮膚病 (例えば、カポジ、いぼ)、ならびにウイルス血症。DR5ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、またはDR5のアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患を処置、予防および/または検出し得る。特定の実施形態において、DR5ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストは、以下の処置および/または予防に使用される：髄膜炎、デング熱、EBV、および/または肝炎。さらなる具体的な実施形態において、DR5ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストは、1以上の他の市販の肝炎ワクチンに非応答性の患者を処置するために使用される。さらに特定の実施形態において、DR5ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストは、AIDSを処置するために使用される。

#### 【0306】

同様に、疾患または症状を引き起こし得、かつDR5ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはDR5のアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置および/または予防され得る細菌あるいは真菌は、以下の細菌を含むがこれらに限定されない。細菌としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

#### 【0307】

#### 【化3】

*Actinomyces, Bacillus* (例は、*B. anthracis*), *Bacteroides, Bordetella, Bartonella, Borrelia* (例は、*B. burgdorferi*), *Brucella, Campylobacter, Capnocytophaga, Chlamydia, Clostridium, Corynebacterium, Coxiella, Dermatophilus, Enterococcus, Ehrlichia, Escherichia* (例は、腸毒性 *E. coli* および 腸管出血性 *E. coli*), *Francisella, Fusobacterium, Haemobartonella, Haemophilus* (例は、*H. influenzae* b 型), *Helicobacter, Klebsiella*, L 型細菌, *Legionella, Leptospira, Listeria, Mycobacteria* (例は、*M. leprae* および *M. tuberculosis*), *Mycoplasma, Neisseria* (例は、*N. gonorrhoeae* および *N. meningitidis*), *Neorickettsia, Nocardia, Pasteurella, Peptococcus, Peptostreptococcus, Pneumococcus, Proteus, Pseudomonas, Rickettsia, Rochalimaea, Salmonella* (例は、*S. typhimurium* および *S. typhi*), *Serratia, Shigella, Staphylococcus* (例は、*S. aureus*), *Streptococcus* (例は、*S. pyogenes, S. pneumoniae*, および B 群 streptococcus), *Streptomyces, Treponema, Vibrio* (例は、*Vibrio cholerae*) および *Yersinia* (例は、*Y. pestis*).

真菌としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

【0308】

【化4】

*Absidia, Acremonium, Alternaria, Aspergillus, Basidiobolus, Bipolaris, Blastomyces, Candida* (例は、*C. albicans*), *Coccidioides, Conidiobolus, Cryptococcus* (例は、*C. neoformans*), *Curvalaria, Erysipelothrix, Epidermophyton, Exophiala, Geotrichum, Histoplasma, Madurella, Malassezia, Microsporum, Moniliella, Mortierella, Mucor, Paecilomyces, Penicillium, Phialemonium, Phialophora, Prototheca, Pseudallescheria, Pseudomicrodochium, Pythium, Rhinosporidium, Rhizopus, Scolecobasidium, Sporothrix, Stemphylium, Trichophyton, Trichosporon*, および *Xylohypha*.

これらおよび他の細菌または真菌は、以下を含むがこれらに限定されない疾患または症状を引き起こし得る：菌血症、心内膜炎、眼感染症（結膜炎、ブドウ膜炎）、歯肉炎、日和見感染症（例えば、AIDSに関連した感染症）、爪周囲炎、プロテアーゼ関連感染症、ライター病、気道感染症（例えば、百日咳または蓄膿症）、敗血症、ライム病、ネコ引っ掻き病、赤痢、パラチフス熱、食中毒、腸チフス、肺炎、淋病、髄膜炎、クラミジア、梅毒、ジフテリア、ライ病、パラ結核、結核、狼瘡、ボツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿痂疹、リウマチ熱、猩紅熱、性感染症、皮膚病（例えば、蜂巣炎、皮膚真菌症（*dermatocycoses*））、毒血症、尿路感染症、および創傷感染症。DR5ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはDR5のアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状もしくは疾患を処置、予防および/または検出し得る。具体的な実施形態において、DR5ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはそれらのアゴニストは、以下を処置および/または予防するために使用される：破傷風、ジフテリア、ボツリツム、および/またはB型髄膜炎。

【0309】

さらに、DR5ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはDR5のアゴニストにより処置および/または予防され得る、寄生性疾患または症状を引き起こす寄生生物としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

【0310】

【化5】

*Babesia, Balantidium, Besnoitia, Cryptosporidium, Eimeria, Encephalitozoon, Entamoeba, Giardia, Hammondia, Hepatozoon, Isospora, Leishmania, Microsporidia, Neospora, Nosema, Pentatrichomonas, Plasmodium* (例えば、*Plasmodium virax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae* および *Plasmodium ovale*), *Pneumocystis, Sarcocystis, Schistosoma, Theileria, Toxoplasma*, ならびに *Trypanosoma*;

を含むが、これらに限定されない原生動物寄生生物；ならびに

## 【0311】

## 【化6】

*Acanthocheilonema, Aelurostrongylus, Ancylostoma, Angiostrongylus, Ascaris, Brugia, Bunostomum, Capillaria, Chabertia, Cooperia, Crenosoma, Dictyocaulus, Dioctophyme, Dipetalonema, Diphylobothrium, Diplydium, Dirofilaria, Dracunculus, Enterobius, Filaroides, Haemonchus, Lagochilascaris, Loa, Mansonella, Muellerius, Nanophyetus, Necator, Nematodirus, Oesophagostomum, Onchocerca, Opisthorchis, Ostertagia, Parafilaria, Paragonimus, Parascaris, Physaloptera, Protostrongylus, Setaria, Spirocercia, Spirometra, Stephanofilaria, Strongyloides, Strongylus, Thelazia, Toxascaris, Toxocara, Trichinella, Trichostrongylus, Trichuris, Uncinaria, ならびに Wuchereria.*

を含むが、これらに限定されない蠕虫寄生生物。これらの寄生生物は、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：疥癬、ツツガムシ病、眼性感染症（例えば、河川盲目症）、象皮病、腸疾患（例えば、赤痢、ジアルジア鞭毛虫症）、肝臓疾患、肺疾患、日和見感染症（例えば、AIDS 関連）、マラリア、妊娠合併症、およびトキソプラズマ症。DR5 ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはDR5 のアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患を処置、予防および/または検出し得る。特定の実施形態において、DR5 ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはそれらのアゴニストは、マラリアを処置および/または予防するために使用される。

## 【0312】

本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそれらのアゴニストおよび/またはアンタゴニストはまた、特定の抗原、腫瘍特異的免疫応答、および/または抗ウイルス免疫応答に対する免疫応答性を増強するために、ワクチンアジュバントとして有用である。

## 【0313】

抗ウイルス免疫応答を増強するアジュバント。アジュバントとして、本発明の組成物を使用して増強され得る抗ウイルス免疫応答は、本明細書中に記載されるか、またはそうでなければ当該分野で公知のウイルス疾患もしくは症状、またはウイルス関連性の疾患もしくは症状を含む。特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下からなる群より選択されるウイルス、疾患、または症状に対する免疫応答を増強するためにアジュバントとして使用され得る：AIDS、髄膜炎、デング熱、EBVおよび肝炎（例えば、B型肝炎）。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下からなる群より選択されるウイルス、疾患または症状に対する免疫応答を増強するためにアジュバントとして使用される：HIV/AIDS、RSウイルス、デング熱、ロタウイルス、日本脳炎B型、インフルエンザAおよびB、パラインフルエンザ、麻疹、サイトメガロウイルス、狂犬病、アルゼンチン出血熱、チクングニヤ、リフトバレー熱、単純ヘルペスウイルス、および黄熱病。

【0314】

アジュバントとして、本発明の組成物を使用して増強され得る抗細菌または抗真菌免疫応答としては、本明細書中に記載されるか、またはそうでなければ当該分野で公知である、細菌または真菌性疾患または症状、および細菌または真菌に関連する疾患または症状が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下からなる群より選択される細菌もしくは真菌、疾患または症状に対する免疫応答を増強するためにアジュバントとして使用される：破傷風、ジフテリア、ボツリヌス中毒、および髄膜炎B型。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下からなる群より選択される細菌に対する免疫応答を増強するためにアジュバントとして使用される：

【0315】

【化7】

*Vibrio cholerae*,  
*Mycobacterium leprae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, B群 streptococcus, *Shigella* spp.,  
腸毒性 *E. coli*, 腸管出血性 *E. coli* 及び *Borrelia burgdorferi*.

アジュバントとして、本発明の組成物を使用して増強され得る抗寄生生物免疫応答としては、本明細書中に記載されるか、またはそうでなければ当該分野で公知である、寄生生物性疾患または症状、および寄生生物関連性疾患または症状が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、寄生生物に対する免疫応答を増強するためにアジュバントとして使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、*Plasmodium* spp. (マラリア) に対する免疫応答を増強するためにアジュバントとして使用される。

#### 【0316】

より一般的には、本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチドならびに/あるいはそのアゴニストおよび/もしくはアンタゴニストは、免疫応答を調節する(すなわち、上昇または減少させる)際に有用である。例えば、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドは、手術、外傷、放射線治療、化学療法、および移植からの準備または回復において有用であり得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドは、また、高齢の個体および免疫無防備状態の個体において免疫応答をブーストするため、ならびに/または回復を促進するために、あるいは、免疫抑制治療を受ける前に個体の免疫状態を上昇させる薬剤として、使用され得る。また、本発明のポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチドは、より高い親和性の抗体を誘導するための薬剤として、または血清免疫グロブリン濃度を増加するための薬剤として、有用であり得る。

#### 【0317】

1つの実施形態において、本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストは、骨髄移植および/または他

の移植（例えば、同種異系器官移植または外因性器官移植）の前、間またはその後、免疫系エンハンサーとして使用され得る。移植に関して、本発明の組成物は、移植の前、移植と同時、および/または移植の後に、投与され得る。特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植の後、T細胞集団の回復開始の前に、投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、まず、移植後に、T細胞集団の回復開始後だが、B細胞集団の完全な回復の前に、投与される。

#### 【0318】

別の実施形態において、本発明のDR5ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、あるいはそのアゴニストは、B細胞免疫不全の個体間の免疫応答性をブーストするための因子として使用され得る。本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストを投与することにより緩和または処置および/または予防され得るB細胞免疫不全としては、重症複合型免疫不全（SCID）、先天性無ガンマグロブリン血症、分類不能型免疫不全、ヴィスコット-オールドリッチ症候群、および過剰IgMを伴うX連鎖性免疫不全（X-linked immunodeficiency with hyper IgM）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0319】

さらに、本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストは、B細胞機能の後天的損失を有する個体間で免疫応答性をブーストするための因子として使用され得る。本発明のDR5ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、ならびに/あるいはそのアゴニストを投与することにより緩和、処置および/または予防され得る一時的免疫欠損を生じる状態としては、HIV感染、AIDS、骨髄移植、およびB細胞慢性リンパ性白血病（CLL）が、挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0320】

さらに、本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストは、一時的免疫不全を有する個体間で免疫応答性をブーストするための因子として使用され得る。本発明のDR5ポリヌクレオ

チドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストを投与することにより緩和、処置および/または予防され得る一時的免疫不全の後天性損失を生じる状態としては、ウイルス感染(例えば、インフルエンザ)からの回復、栄養失調に係る状態、感染性単核細胞症からの回復、またはストレスに係る状態、麻疹からの回復、血液輸血からの回復、手術からの回復が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0321】

本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストはまた、単球、樹状細胞および/またはB細胞による抗原提示の調節因子として使用され得る。1つの実施形態において、DR5(可溶性形態、膜結合形態または膜貫通形態)は、インビトロまたはインビボでの抗原提示を増強するかまたは抗原提示と拮抗する。

#### 【0322】

関連する実施形態において、この抗原提示の増強または拮抗作用は、抗腫瘍処置としてかまたはその免疫系を調節するために、有用であり得る。例えば、本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストは、TH1細胞性応答とは対照的に、体液性応答(すなわち、TH2)の発生へと個体の免疫系を向けるための因子として使用され得る。また、本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストは、病因(例えば、AIDS、慢性リンパ球障害および/または分類不能型免疫不全)におけるB細胞産生の刺激因子として使用され得る。

#### 【0323】

別の実施形態において、本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストは、腫瘍増殖を誘導するため、従って抗腫瘍性因子に対してその腫瘍をより感受性にするための、手段として使用され得る。例えば、多発性骨髄種は、ゆっくり分裂する疾患であり、従って事実上すべての抗腫瘍性レジメンに対して治療抵抗性である。これらの細胞が無理により迅速に増殖させられた場合、おそらくその感受性プロファイルは変化する。

#### 【0324】

本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストが使用され得る他の実施形態としては、病因（例えば、AIDS、慢性リンパ球障害および/または分類不能型免疫不全）におけるB細胞産生の刺激因子として；手術、外傷または遺伝子欠損の後のリンパ系組織の産生および/または再生のための治療として；SCID患者の間で観察されるような免疫不全を生じる、遺伝的障害についての遺伝子に基づく治療として；DR5媒介性応答を阻害または増強するための抗体の産生のための抗原として；T細胞を活性化するための手段として；移植前の骨髄サンプルの事前処理として（このような処理は、B細胞提示を増大し、それにより回復を促進させる）；DR5により惹起される分泌サイトカインを調節する手段として；インビトロまたはインビボでのIgE濃度を調節するため；ならびに喘息、鼻炎、および湿疹を含むがこれらに限定されない、IgE媒介性アレルギー反応を処置および/または予防するため、が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0325】

あるいは、本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストは、例えば、自己免疫障害の処置および/または予防する際に、免疫抑制因子として有用である。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドは、慢性の炎症状態、アレルギー状態または自己免疫状態（例えば、本明細書中に記載される状態さもなければ当該分野で公知である状態）を処置および/または予防するために使用される。

#### 【0326】

好ましくは、DR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、あるいはそのDR5のアゴニストを使用する処置は、患者に有効量のDR5ポリペプチドを投与することか、または患者から細胞を取り出し、その細胞にDR5ポリペプチドを供給し、そしてその患者に操作した細胞を戻すこと（エキソビボ治療）のいずれかによってであり得る。さらに、本明細書中にさらに考察されるように、このDR5ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、感染性疾患に対する免疫応答を惹起するためのワクチンにおけるアジュバントとして使用され得る。

## 【0327】

本発明のさらに好ましい実施形態としては、適用後におけるDR5ポリペプチドおよび機能性アゴニストの使用；免疫系をブーストするために動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、マイクロピッグ（micro-pig）、ニワトリ、ラクダ、ヤギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒト（最も好ましくは、ヒト））に投与して、1つ以上の抗体（例えば、IgG、IgA、IgM、およびIgE）の量の増大を生じるため、より高親和性の抗体産生（例えば、IgG、IgA、IgM、およびIgE）を誘導するため、そして/または免疫応答を増強するため；あるいは機能性の内因性抗体分子を産生し得ないか、さもなければ弱められた内因性免疫系を有するが、別の動物由来の再構築または部分的再構築された免疫系によりヒト免疫グロブリン分子を産生し得る動物（上記に列挙したものを含むがそれらに限定されず、そしてトランスジェニック動物も含む）への投与が、挙げられるがこれらに限定されない（例えば、公開されたPCT出願番号WO98/24893、WO96/34096、WO96/33735およびWO91/10741を参照のこと）。

## 【0328】

DR5のアンタゴニストは、DR5レセプターの結合抗体および/または阻害抗体、アンチセンス核酸、リボザイムまたは可溶性形態を含む。これらは、本明細書中の活性の多くを逆転すること、ならびに以下の適用を含むがそれらに限定されない臨床適用または実地適用を見出すことが、予期される。DR5アンタゴニストは、外来因子または自己に対する免疫応答の種々の局面（例えば、自己免疫障害（例えば、狼瘡、および関節炎、ならびに皮膚アレルギーに対する免疫応答性、炎症、腸疾患、損傷および病原体）をブロックすることにより使用され得る。本発明者らの現在のデータは、B細胞およびT細胞に関連する病因におけるDR5の潜在的役割を直接に述べるが、他の細胞型がDR5に対する発現または応答性を獲得し得ることが可能なままである。従って、DR5は、CD40およびそのリガンドと同様に、免疫系の状態および細胞が位置する微小環境によって調節され得る。DR5アンタゴニストは、自己免疫疾患（例えば、特発性血小板

減少性紫斑病、全身エリテマトーデス)と関連するB細胞増殖およびIg分泌を予防するための治療として;対宿主性移植片病または移植片拒絶のインヒビターとして;B細胞悪性疾患(例えば、ALL、ホジキン病、非ホジキンリンパ種、慢性リンパ性白血病、プラズマ細胞腫、多発性骨髄腫、バーキットリンパ腫、およびEBV形質転換疾患)の治療として;慢性高ガンマグロブリン血症事象(例えば、原因不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance)(MGUS)、ヴァルデンストレーム病、関連する特発性単クローン性高ガンマグロブリン血症、およびプラズマ細胞腫)の治療として;大B細胞リンパ腫の細胞増殖を減少するための治療として;慢性骨髄性白血病と関連するB細胞およびIgの関与を減少する手段として;あるいは免疫抑制剤として、使用され得る。

#### 【0329】

さらに、本発明のDR5ポリペプチドまたはポリヌクレオチド、あるいはそれらのアンタゴニストは、インビトロまたはインビボでIgE濃度を調節するため、あるいはIgE媒介性アレルギー反応(喘息、鼻炎および湿疹を含むが、これらに限定されない)を処置および/または予防するために、使用され得る。

#### 【0330】

本明細書中に記載の本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストおよび/またはアンタゴニストの治療適用のすべては、ヒト医療におけるそれらの使用に加えて、脊椎動物医療において使用され得る。本発明は、伴侶動物(イヌ、ネコ、フェレット、鳥類、およびウマを含むがこれらに限定されない);食用動物(ウシ、ブタ、ニワトリ、およびヒツジを含むがこれらに限定されない);ならびに風変わりな動物(例えば、動物園の動物)の処置を含む。

#### 【0331】

上記に言及される適用は、広範な種類の宿主における使用を有する。このような宿主としては、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、マイクロピッグ(micro-pig)、ニワ

トリ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、この宿主は、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ニワトリ、ラット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌ、またはネコである。好ましい実施形態において、この宿主は哺乳動物である。最も好ましい実施形態において、この宿主はヒトである。

#### 【0332】

本明細書中に記載される本発明のDR5ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストおよび/またはアンタゴニストは、例えば、本明細書中に記載されるように、薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物において、使用され得る。

#### 【0333】

1つの局面において、本発明は、本発明は、TNF-ファミリーリガンドにより誘導されるアポトーシスを増強するための方法に関し、この方法は、このDR5ポリペプチドを発現する細胞に、DR5媒介性シグナル伝達を増強し得るDR5リガンド、アナログ、またはアゴニストの有効量を投与する工程を包含する。好ましくは、DR5媒介性シグナル伝達は、アポトーシスの減少またはサイトカインおよび接着分子の発現の減少が示される疾患を、処置および/または予防するように増加される。アゴニストとしては、DR5の可溶性形態、およびDR5ポリペプチドに対するモノクローナル抗体が、挙げられ得る。

#### 【0334】

さらなる局面において、本発明は、TNF-ファミリーリガンドにより誘導されるアポトーシスを阻害するための方法に関し、この方法は、このDR5ポリペプチドを発現する細胞に、DR5媒介性シグナル伝達を減少し得るアンタゴニストの有効量を投与する工程を包含する。好ましくは、DR5媒介性シグナル伝達は、アポトーシスまたはNF- $\kappa$ B発現の増加が示される疾患を、処置および/または予防するように減少される。アンタゴニストとしては、DR5の可溶性形態（例えば、DR5の細胞外ドメインのすべてまたは一部を含む、ポリペプチド）およびDR5ポリペプチドに対するモノクローナル抗体が挙げられ得る。

#### 【0335】

「アゴニスト」によって、アポトーシスを増強または強化し得る、天然に存在する化合物および合成の化合物が意図される。「アンタゴニスト」によって、アポトーシスを阻害し得る、天然に存在する化合物および合成の化合物が意図される。本発明の任意の候補「アゴニスト」または「アンタゴニスト」がアポトーシスを増強し得るかまたは阻害し得るかは、当該分野で公知のTNF-ファミリーリガンド/レセプター細胞応答アッセイ（以下により詳細に記載されるものを含む）を用いて決定され得る。

#### 【0336】

1つのこのようなスクリーニング手順は、本発明のレセプターを発現するようにトランスフェクトされたメラニン保有細胞の使用を包含する。このようなスクリーニング技術は、1992年2月6日に公開された、PCT WO92/01810に記載される。このようなアッセイは、例えば、本発明のレセプターポリペプチドの活性化を阻害（または増強）する化合物についてスクリーニングするために使用され得、このスクリーニングは、レセプターをコードするメラニン保有細胞をTNFファミリーリガンドおよび候補アンタゴニスト（またはアゴニスト）の両方と接触させることによる。リガンドによって生成されるシグナルの阻害または増強は、その化合物が、リガンド/レセプターシグナル伝達経路のアンタゴニストまたはアゴニストであることを示す。

#### 【0337】

他のスクリーニング技術には、レセプター活性化によって引き起こされる細胞外pH変化を測定する系においてレセプターを発現する細胞（例えば、トランスフェクトしたCHO細胞）の使用が含まれる。例えば、化合物は、本発明のレセプターポリペプチドを発現する細胞と接触され得、そしてセカンドメッセンジャー応答（例えば、シグナル伝達またはpH変化）が測定され得、その潜在的な化合物がレセプターを活性化するかまたは阻害するかを決定し得る。

#### 【0338】

別のこのようなスクリーニング技術は、そのレセプターをコードするRNAをXenopus卵母細胞に導入して、そのレセプターを一過性に発現する工程を包含する。次いで、そのレセプター卵母細胞は、レセプターリガンドおよびスク

リーニングされる化合物と接触され得、続いてレセプターの活性化を阻害すると考えられている化合物についてのスクリーニングの場合、カルシウムシグナルの阻害または活性化を検出することによって行われ得る。

【0339】

別のスクリーニング技術には、構築物を細胞中で発現することが含まれ、ここでそのレセプターは、ホスホリパーゼCまたはDに連結されている。このような細胞には、内皮細胞、平滑筋細胞、胚腎臓細胞などが含まれる。このスクリーニングは、本明細書中上記のように、ホスホリパーゼシグナルから、レセプターの活性化またはレセプターの活性化の阻害の検出によって達成され得る。

【0340】

別の方法は、その表面上にレセプターを有する細胞への標識リガンドの結合の阻害を決定することによって、本発明のレセプターポリペプチドの活性化を阻害する化合物（アンタゴニスト）についてスクリーニングする工程を包含する。このような方法は、レセプターをコードするDNAで真核生物細胞をトランスフェクトして、その結果その細胞がその表面でそのレセプターを発現するようにする工程、および標識した形態の既知のリガンドの存在下でその細胞を化合物と接触させる工程を包含する。そのリガンドは、例えば、放射能によって標識され得る。レセプターに結合した標識されたりガンドの量は、例えば、レセプターの放射能を測定することによって測定される。その化合物が、レセプターに結合する標識されたりガンドの減少によって決定されるようにレセプターに結合する場合、そのレセプターに対する標識されたりガンドの結合は阻害される。

【0341】

本発明のアゴニストおよびアンタゴニストについてのさらなるスクリーニングアッセイは、Tartaglia, L. A. および Goeddel, D. V., J. Biol. Chem. 267(7): 4304-4307 (1992) に記載される。

【0342】

従って、さらなる局面において、候補アゴニストまたはアンタゴニストがTNFファミリーリガンドに対する細胞応答を増強し得るかまたは阻害し得るかを決

定するためのスクリーニング方法が提供される。この方法は、DR5ポリペプチドを発現する細胞を候補化合物およびTNFファミリーリガンドと接触させる工程、細胞応答をアッセイする工程、ならびにその細胞応答を標準的な細胞応答と比較する工程を包含し、その標準は、候補化合物の非存在下でリガンドとの接触がなされた場合にアッセイされ、それによって、標準を上回る細胞応答の増加は、その候補化合物がリガンド/レセプターシグナル伝達経路のアゴニストであることを示し、そして標準と比較して減少した細胞応答は、その候補化合物がリガンド/レセプターシグナル伝達経路のアンタゴニストであることを示す。「細胞応答をアッセイする」によって、候補化合物および/またはTNFファミリーリガンドに対する細胞応答を定性的または定量的に測定すること（例えば、T細胞増殖またはB細胞増殖あるいはトリチウム化されたチミジン標識における、増加または減少を決定または見積もること）が意図される。本発明によって、DR5ポリペプチドを発現する細胞は、内因性TNFファミリーリガンドまたは外因性投与されたTNFファミリーリガンドのいずれかと接触され得る。

#### 【0343】

本発明に従うアゴニストには、天然に存在する化合物および合成化合物（例えば、TNFファミリーリガンドペプチドフラグメント、トランスホーミング増殖因子、神経伝達物質（例えば、グルタミン酸、ドパミン、N-メチル-D-アスパラギン酸）、腫瘍サプレッサー（p53）、細胞溶解性T細胞、および代謝拮抗物質）が含まれる。好ましいアゴニストには、化学療法剤（例えば、シスプラチン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、シトシンアラビノシド、ナイトロジェンマスタード、メトトレキサート、およびビンクリスチン）が含まれる。他のアゴニストには、エタノールおよびアミロイドペプチドが含まれる（*Science* 267:1457-1458 (1995)）。さらに好ましいアゴニストには、DR5ポリペプチドまたはそのフラグメントに対して惹起されたポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。TNFファミリーレセプターに対して惹起されたこのようなアゴニスト抗体は、Tartaglia, L.A.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9292-9296 (1991)；ならびにTartaglia, L.A.およびGoeddel

, D. V., J. Biol. Chem. 267(7):4304-4307(1992)に開示される。PCT出願WO 94/09137もまた参照のこと。

#### 【0344】

本発明に従うアンタゴニストには、天然に存在する化合物および合成化合物(例えば、CD40リガンド、天然アミノ酸、亜鉛、エストロゲン、アンドロゲン、ウイルス遺伝子(例えば、アデノウイルス E1B、バキュロウイルスp35およびIAP、牛痘ウイルスcrmA、エプスタイン-バーウイルスBHRF1、LMP-1、アフリカ豚コレラウイルスLMW5-HL、およびヘルペスウイルスγ1 34.5)、カルパインインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、および腫瘍プロモーター(例えば、PMA、フェノバルビタール、および -ヘキサクロロシクロヘキサン))が含まれる。

#### 【0345】

他の可能なアンタゴニストとしては、アンチセンス核酸が挙げられる。アンチセンス技術は、アンチセンスDNAもしくはRNAを通して、または三重ヘリックス形成を通して、遺伝子発現を制御するために使用され得る。アンチセンス技術は、例えば、Okano, J. Neurochem. 56:560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL(1988)において議論される。三重ヘリックス形成は、例えば、Leeら、Nucleic Acids Research 6:3073(1979); Cooneyら、Science 241:456(1988); およびDervanら、Science 251:1360(1991)において議論される。この方法は、相補的DNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。

#### 【0346】

例えば、本発明の成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'コード部分は、約10~40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するために使用され得る。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に関与する遺伝子の領域に相補的であるように設計され、それによってレセプターの転写および

産生を妨害する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズし、そしてレセプターポリペプチドへのmRNA分子の翻訳をブロックする。上記のオリゴヌクレオチドはまた、そのアンチセンスRNAまたはDNAがDR5レセプターの産生を阻害するようにインビボで発現され得るように、細胞に送達され得る。

#### 【0347】

1つの実施形態において、本発明のDR5アンチセンス核酸は、外因性配列からの転写によって細胞内で産生される。例えば、ベクターまたはその部分は、転写されて、本発明のアンチセンス核酸(RNA)を産生する。このようなベクターは、DR5アンチセンス核酸をコードする配列を含む。このようなベクターは、所望のアンチセンスRNAを産生するために転写され得る限りにおいて、エピソームのままであっても、または染色体に組み込まれてもよい。このようなベクターは、当該分野で標準的な組換えDNA技術方法によって構築され得る。ベクターは、脊椎動物細胞中での複製および発現のために使用される、プラスミド、ウイルス、または当該分野において公知の他のものであり得る。DR5またはそのフラグメントをコードする配列の発現は、脊椎動物(好ましくは、ヒト)の細胞において作用することが当該分野において公知の任意のプロモーターによってであり得る。このようなプロモーターは、誘導性であってもまたは構成的であってもよい。このようなプロモーターには、SV40初期プロモーター領域(BernoisらおよびChambon、Nature 29:304-310(1981))、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター(Yamamotoら、Cell 22:787-797(1980))、ヘルペスチミジンプロモーター(Wagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445(1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinsterら、Nature 296:39-42(1982))などが含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0348】

本発明のアンチセンス核酸は、DR5遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に相補的な配列を含む。しかし、完全な相補性は、好ましいものの、必要なわけ

ではない。「RNAの少なくとも一部に相補的な」配列とは、本明細書中で言及される場合、RNAにハイブリダイズして、安定な二重鎖を形成し得るに十分な相補性を有する配列を意味し；二本鎖DR5アンチセンス核酸の場合、一本鎖の二重鎖DNAがそのように試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、それが二重鎖を含み得、そしてなお安定な二重鎖（または場合によっては三重鎖）を形成し得るDR5 RNAとの塩基のミスマッチがより多くなる。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を決定するための標準的な手段の使用によってミスマッチの許容できる程度を確認し得る。

【0349】

メッセージの5'末端に相補的なオリゴヌクレオチド（例えば、AUG開始コドンまでおよびAUG開始コドンを含む5'非翻訳配列）は、翻訳を阻害する際に最も効率的に働くはずである。しかし、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列は、mRNAの翻訳を阻害する際にも同様に有効であることが示されてきた。一般的には、Wagner, R., Nature 372:333-335 (1994)を参照のこと。従って、図1に示されるDR5の5'非翻訳非コード領域または3'非翻訳非コード領域のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性DR5 mRNAの翻訳を阻害するためのアンチセンスアプローチにおいて使用され得る。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補物を含むべきである。mRNAコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、翻訳のより効率的でないインヒビターであるが、本発明に従って使用され得る。DR5 mRNAの5'、3'、またはコード領域にハイブリダイズするように設計されたかどうかに関わらず、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチド長であるべきであり、そして好ましくは、6~約50ヌクレオチド長の範囲のオリゴヌクレオチドである。特定の局面において、このオリゴヌクレオチドは、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約17ヌクレオチド、少なくとも約25ヌクレオチド、または少なくとも約50ヌクレオチドである。

## 【0350】

本発明のポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のDNAもしくはRNAまたはそのキメラ混合物または誘導体または修飾バージョンであり得る。このオリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で修飾されて、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーションなどを改善し得る。このオリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加された基（例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するために）または細胞膜を横切る輸送を容易にするための薬剤（例えば、Letsingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556(1989); Lemaitreら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:648-652(1987); PCT公開番号WO88/09810(1988年12月15日公開)を参照のこと）、または血液脳関門横切る輸送を容易にするための薬剤（例えば、PCT公開番号WO89/10134(1988年4月25日公開)を参照のこと）、ハイブリダイゼーションによって誘発される切断剤（例えば、Krollら、BioTechniques 6:958-976(1988)を参照のこと）またはインターカレート(intercalating)薬剤（例えば、Zon, Pharm. Res. 5:539-549(1988)を参照のこと）を含み得る。この目的のために、このオリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションによって誘発される架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーションによって誘発される切断剤など）と結合体化され得る。

## 【0351】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの改変された塩基部分を含み得、この塩基部分は、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される：5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、

2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、- D - マンノシルキユーオシン、5 - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン (wybutoxosine)、プソイドウラシル、キユーオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル) ウラシル、(acp3)w、および2, 6 - ジアミノプリン。

【0352】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの改変された糖部分を含み得る：アラビノース、2 - フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソース。

【0353】

さらなる別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの改変されたリン酸骨格を含む：ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミデート (phosphoramidate)、ホスホロジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタール (formacetal) またはそれらのアナログ。

【0354】

さらに別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、- アノマーオリゴヌクレオチドである。- アノマーオリゴヌクレオチドは、相補的なRNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、通常の- ユニットとは反対に、その鎖は互いに平行にする (Gautierら、1987、Nucl. Acids Res.、15: 6625 - 6641)。このオリゴヌクレオチドは、2 - O - メチルリボヌクレオチドであるか (Inoueら、1987、Nucl. Acids Res.、15: 6625 - 6641)。

ds Res.、15:6131-6148)、またはキメラRNA-DNAアナログである(Inoueら、1987、FEBS Lett. 215:327-330)。

#### 【0355】

本発明による潜在的なアンタゴニストはまた、触媒RNA、すなわちリボザイムを含む(例えば、PCT国際公開WO90/11364、1990年10月4日公開; Sarverら、Science、247:1222-1225(1990)を参照のこと)。一方、部位特異的認識配列でmRNAを切断するリボザイムを使用して、DR5 mRNAを破壊し得るが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成する隣接領域により決定される位置で、mRNAを切断する。たった1つの必要条件は、標的mRNAが以下の2つの塩基配列を有することである: 5' - UG - 3'。ハンマーヘッド型リボザイムの構築および生成は当該分野で周知であり、そしてHaseloffおよびGerlach、Nature、334:585-591(1988)により十分に記載される。DR5のヌクレオチド配列(図1)内に多くの潜在的なハンマーヘッド型リボザイム切断部位が存在する。好ましくは、このリボザイムは、切断認識部位がDR5 mRNAの5'末端付近に位置するように; すなわち、効率を増大し、そして非機能的mRNA転写物の細胞内蓄積を最小化するように、操作される。リボザイムをコードするDNA構築物は、DNAをコードするアンチセンスの導入についての上記と同様の様式で細胞に導入され得る。リボザイムは、アンチセンス分子とは違って触媒性であるので、より低い細胞内濃度が効率のために必要である。

#### 【0356】

本発明によるさらなるアンタゴニストは、DR5の可溶性型(すなわち、全長レセプターの細胞外領域からリガンド結合ドメインを含むDR5フラグメント)を含む。レセプターのこのような可溶性型(天然に存在するか、または合成であり得る)は、TNF-ファミリーリガンドへの結合について細胞表面DR5と競合することにより、DR5媒介性シグナリングに拮抗する。従って、リガンド結合ドメインを含むレセプターの可溶性型は、TNF-ファミリーリガンドによっ

て誘導されるアポトーシスを阻害し得る、新規サイトカインである。これらは、モノマーとして発現され得るが、好ましくは、二量体または三量体として発現される。なぜなら、これらはアンタゴニストとしての可溶性レセプターの単量体の形態（例えば、IgG Fc - TNFレセプターファミリー融合体）より優れることが示されているからである。その他のこのようなサイトカインは当該分野で公知であり、Fasリガンドにより誘導されるアポトーシスを制限するように生理学的に作用する、Fas B（マウスFasレセプターの可溶性形態）を含む（Hughes, D. P. およびCrispe, I. N., J. Exp. Med. 182: 1395 - 1401 (1995)）。

#### 【0357】

上で議論されるように、本明細書で使用される用語「抗体」(Ab)または「モノクローナル抗体」(mAb)は、抗原に結合し得るインタクトな分子ならびにそれらのフラグメント（例えば、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメント）を含むことを意味する。Fab、Fab'、およびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントはインタクトな抗体のFcフラグメントを欠落し、循環からより迅速に除去され、そしてインタクトな抗体の非特異的な組織へのより少ない結合を有し得る（Wahlら、J. Nucl. Med. 24: 316 - 325 (1983)）。

#### 【0358】

本発明による抗体は、本発明のDR5免疫原を使用する種々の方法のいずれかにより、調製され得る。示されるように、このようなDR5免疫原は、全長DR5ポリペプチド（リーダー配列を含むか、または含まなくとも良い）およびDR5ポリペプチドフラグメント（例えば、リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインおよび死ドメイン）を含む。

#### 【0359】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド配列の位置および活性に関して、当該分野で公知の方法（例えば、これらのポリペプチドを画像化するため、適切な生理学的サンプルにおけるそのレベルを測定するためなど）において使用され得る。抗体はまた、DR5のアゴニストおよびアンタゴニストとして、イムノアッセイおよび治療法における使用もまた有する。

## 【0360】

DR5ドメインに結合するタンパク質および他の化合物はまた、本発明の候補アゴニストおよび候補アンタゴニストである。このような結合化合物は、酵母ツーハイブリッドシステムを用いて「捕捉され」得る (Fields および Song, Nature 340:245-246 (1989))。酵母ツーハイブリッドシステムの改変型は、Roger Brent および彼の共同研究者らによって記載されている (Gyuris, J.ら、Cell 75:791-803 (1993); Zervos, A.S.ら、Cell 72:223-232 (1993))。好ましくは、酵母ツーハイブリッドシステムは、DR5リガンド結合ドメインまたはDR5細胞内ドメインのいずれかに結合する化合物を捕捉するために、本発明に従って使用される。このような化合物は、本発明の良い候補アゴニストおよび良い候補アンタゴニストである。

## 【0361】

「TNF-ファミリーリガンド」によって、TNFレセプターファミリーのメンバーに結合し得る、天然に存在するリガンド、組換えリガンド、および合成リガンドが意図され、これは、リガンド/レセプターシグナリング経路を誘導し得る。TNFリガンドファミリーのメンバーには、DR5リガンド、TRAIL、TNF- $\alpha$ 、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  としても公知である)、LT- $\beta$  (複合体ヘテロトリマーLT- $\beta$ に見出される)、FasL、CD40、CD27、CD30、4-1BB、OX40、および神経成長因子 (NGF) が含まれるが、これらに限定されない。DR5およびその誘導體 (フラグメントを含む) ならびにそのアナログのTRAILに結合する能力を決定するために行われ得るアッセイの例は、以下の実施例6に記載される。

## 【0362】

(遺伝子治療)

特定の実施形態において、抗体またはその機能的誘導體をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害および/または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現したか、または発現可能な核酸の、被験体へ

の投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

#### 【0363】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法は、本発明に従って使用され得る。例示的な方法が以下に記載される。

#### 【0364】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら, *Clinical Pharmacy* 12:488-505(1993); WuおよびWu, *Biotherapy* 3:87-95(1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596(1993); Mulligan, *Science* 260:926-932(1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217(1993); May, *TIBTECH* 11(5):155-215(1993)を参照のこと。使用され得る、組換えDNA技術分野において一般的に公知である方法は、Ausubelら(編), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY(1993); およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY(1990)に記載される。

#### 【0365】

好ましい局面において、化合物は抗体をコードする核酸配列を含有し、上記核酸配列は、適切な宿主において、抗体、またはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質、あるいはその重鎖もしくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸配列は、抗体コード領域に作動可能に連結したプロモーターを有し、上記プロモーターは誘導性であるかまたは構成性であり、そして必要に応じて組織特異的である。別の特定の実施形態においては、抗体をコードする配列および任意の他の所望の配列がゲノム中の所望の部位での相同組換えを

促進する領域に隣接した核酸分子が使用され、従って抗体をコードする核酸の染色体内の発現を提供する (KollerおよびSmithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstraら, Nature 342:435-438 (1989))。特定の実施形態において、発現した抗体分子は単鎖抗体であるか;あるいはこの核酸配列は、この抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする配列またはそのフラグメントを含む。

#### 【0366】

核酸の患者への送達は、直接的 (この場合、患者は核酸または核酸保有ベクターに直接的に曝される) か、または間接的 (この場合、細胞は最初にインビトロで核酸で形質転換され、次いで患者に移植される) のいずれかであり得る。これらの2つのアプローチは、インビボ遺伝子治療として、またはエキソビボ遺伝子治療としてそれぞれ公知である。

#### 【0367】

特定の実施形態において、核酸配列はインビボで直接的に投与され、そこで核酸配列は発現されて、コードされた生成物を産生する。これは、当該分野で公知の多数の方法 (例えば、それらを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれを (例えば、欠損性または弱毒化したレトロウイルスまたは他のウイルスベクター (米国特許第4,980,286号を参照のこと) を用いる感染により) 細胞内になるように投与することにより、あるいは、裸のDNAの直接注射により、あるいは、微粒子ボンバードメント (例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont) の使用により、あるいは脂質または細胞表面のレセプターでコーティングするか、もしくは薬剤をトランスフェクトすることにより、あるいは、リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセル中へのカプセル化により、あるいは、それらを核に入ることが公知であるペプチドと結合させて投与することにより、レセプター媒介のエンドサイトーシスを受けるリガンドと結合させて投与することにより (例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987) を参照のこと) (レセプターを特異的に発現する細胞の型を標的にするために用いられ得る) などのいずれかにより

達成され得る。別の実施形態において、核酸-リガンド複合体が形成され得、ここで、このリガンドはエンドソームを破壊するフソジェニック (fusogenic) ウイルス性ペプチドを含み、この核酸がリソゾーム分解を回避することを可能にする。さらに別の実施形態において、核酸は、特定のレセプターを標的化することにより、細胞特異的な取り込みおよび発現についてインビボで標的化され得る (例えば、1992年4月16日のPCT公開第WO92/06180号 (Wuら); 1992年12月23日の同第WO92/22635号 (Wilsonら); 1992年11月26日の同第WO92/20316号 (Findenisら); 1993年7月22日の同第WO93/14188号 (Clarkeら)、1993年10月14日の同第WO93/20221号 (Young) を参照のこと)。あるいは、核酸は、細胞内部に導入され得、そして相同組換えにより、発現のために宿主細胞DNA中に組み込まれ得る (KollerおよびSmithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstraら, Nature 342:435-438 (1989))。

#### 【0368】

特定の実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが用いられ得る (Millerら, Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993) を参照のこと)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルス性ゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組込みのために必要でないレトロウイルス配列を欠失している。遺伝子治療において使用される抗体をコードする核酸配列は、一つ以上のベクター中にクローニングされ、これは、患者内への遺伝子の送達を容易にする。レトロウイルスベクターに関するさらなる詳細は、Boesenら, Biotherapy 6:291-302 (1994) (これは、幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために、mdr1遺伝子を造血性幹細胞に送達するための、レトロウイルスベクターの使用を記載する) に見出され得る。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献は、以下である: Clowesら, J. Clin. Invest. 93:644-6

51 (1994); Kiemら, Blood 83:1467-1473 (1994); SalmonsおよびGunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); ならびにGrossmanおよびWilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993)。

【0369】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用され得る他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、特に、気道上皮へ遺伝子を送達するための魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、自然に気道上皮に感染し、そこで軽い疾患を起こす。アデノウイルスベースの送達システムの他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞を感染することができるという利点を有する。KozarskyおよびWilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993)は、アデノウイルスベースの遺伝子治療の概説を示す。Boutら, Human Gene Therapy 5:3-10 (1994)は、アカゲザルの気道上皮に遺伝子を移すためのアデノウイルスベクターの使用を示した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenfeldら, Science 252:431-434 (1991); Rosenfeldら, Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeliら, J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); PCT公開第WO94/12649号; およびWangら, Gene Therapy 2:775-783 (1995)に見出され得る。好ましい実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。

【0370】

アデノ随伴ウイルス(AAV)はまた、遺伝子治療における使用が提案されてきた(Walshら, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); 米国特許第5,436,146号)。

【0371】

遺伝子治療への別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクシヨ

ン、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、またはウイルス感染のような方法により、組織培養中の細胞へ遺伝子を移入する工程を包含する。通常、移入の方法は、選択マーカーの細胞への移入を含む。次いで、細胞は、移入された遺伝子を取り込みそして発現する細胞を単離するために選択下に置かれる。次いで、それらの細胞は患者に送達される。

#### 【0372】

この実施形態においては、得られた組換え細胞のインビボ投与の前に、核酸が細胞に導入される。このような導入は、当該分野において公知の任意の方法により実施され得、それらの方法としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介の遺伝子移入、マイクロセル媒介の遺伝子移入、スフェロプラスト融合など。外来遺伝子の細胞への導入については、当該分野において多数の技術が公知であり（例えば、LoefflerおよびBehr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohenら, Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92 (1985)を参照のこと）、そしてレシピエント細胞の必要な発生的および生理学的機能が破壊されないならば、本発明に従って使用され得る。この技術は、細胞への核酸の安定した移入を提供すべきであり、その結果、この核酸は、細胞により発現可能であり、好ましくは、その細胞の子孫により遺伝性でかつ発現可能である。

#### 【0373】

得られた組換え細胞は、当該分野において公知の様々な方法により、患者へ送達され得る。組換え血球（例えば、造血幹細胞または造血前駆細胞）は、好ましくは、静脈内に投与される。使用が考えられる細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者により決定され得る。

#### 【0374】

遺伝子治療の目的のために核酸が導入され得る細胞は、任意の所望の入手可能な細胞型を包含し、以下を含むがこれらに限定されない：上皮細胞、内皮細胞、

ケラチノサイト、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球のような血球；様々な幹細胞または前駆細胞、特に、造血幹細胞または造血前駆細胞（例えば、骨髓、臍帯血、末梢血、胎児の肝臓などから得られるような細胞）。

【0375】

好ましい実施形態において、遺伝子治療に使用される細胞は、患者に対して自己である。

【0376】

遺伝子治療において組換え細胞が使用される実施形態において、抗体をコードする核酸配列は、細胞またはそれらの子孫により核酸配列が発現可能であるように細胞に導入され、そして次いで組み換え細胞は、治療的効果のためにインビボで投与される。具体的な実施形態において、幹細胞または前駆細胞が用いられる。インビトロで単離され得、そしてインビトロで維持され得る任意の幹細胞および/または前駆細胞は、本発明のこの実施形態に従って潜在的に使用され得る（例えば、1994年4月28日のPCT公開第WO94/08598号：StempleおよびAnderson, Cell 71:973-985(1992)；Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229(1980)；ならびにPittelkowおよびScott, Mayo Clinic Proc. 61:771(1986)を参照のこと）。

【0377】

特定の実施形態において、遺伝子治療の目的で導入されるべき核酸は、コード領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含有し、その結果、核酸の発現は、適切な転写誘導因子の存在または不在を制御することにより制御可能である。

【0378】

(投与の形態)

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物、好ましくは本発明のポリペプチドまたは抗体の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製される（例えば、その

効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質は実質的にない)。被験体は好ましくは、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない動物であり、そして好ましくは哺乳動物であり、そして最も好ましくはヒトである。

【0379】

化合物が核酸または免疫グロブリンを含む場合に使用され得る処方および投与方法は、上記に記載され；さらなる適切な処方および投与経路は、本明細書中で以下に記載されたものの中から選択され得る。

【0380】

本明細書中に記載されるアゴニストまたはアンタゴニストは、インビトロ、エキソピボ、またはインピボで、細胞に投与され得る。それらは、本発明のレセプターを発現する。アゴニストまたはアンタゴニストの「有効量」の投与とは、化合物の量を意図する。これは、TNFファミリーリガンドの細胞応答を、十分に増強または阻害し、そしてポリペプチドを含む。特に、アゴニストまたはアンタゴニストの「有効量」の投与とは、DR5媒介性アポトーシスを増強または阻害する有効量を意図する。もちろん、アポトーシスが増強されることが望まれる場合、本発明に従うアゴニストは、TNFファミリーリガンドと共に投与され得る。当業者は以下のことを理解する。アゴニストまたはアンタゴニストの有効量が、経験的に決定され得、そして純粋な形態または薬学的に受容可能な塩の形態、エステル形態、あるいはプロドラッグの形態で使用され得ることを理解する。アゴニストまたはアンタゴニストは、1以上の薬学的に受容可能な賦形剤と組み合わせられた組成物において投与され得る（すなわち、キャリア）。

【0381】

以下のことが理解される。ヒト患者に投与される場合、本発明の化合物および組成物の全体の日々の使用は、主治医である医師によって信頼できる医療の判断の範囲内で決定される。任意の特別な患者に対する特定の治療有効量の用量レベルは、医療分野で周知の因子に依存する。

【0382】

一般的提案として、1用量あたりで非経口投与されるDR5ポリペプチドの総

薬学的有効量は、患者の体重の約 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ ~ $10\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ の範囲であるが、上記のように、これは治療的自由裁量に供される。より好ましくは、この用量は、少なくとも $0.01\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、そして最も好ましくはヒトについて、ホルモンに関して約 $0.01\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ と $1\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ との間である。連続的に与えられる場合、DR5アゴニストまたはアンタゴニストは、代表的には、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ ~約 $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ の用量速度で、1日あたり1~4回の注射、または例えば、ミニポンプを用いる連続的皮下注入のいずれかにより投与される。静脈内バック溶液もまた用いられ得る。

### 【0383】

投与はまた、患者に特異的な様式でアレンジされ、決定された濃度のアゴニストまたはアンタゴニストを血液に提供する(RIA技術によって決定されたように)。従って、患者に投与することは、調節され得、RIAによって測定される血液レベルによってレギュラーな継続を達成する。そのオーダーは、 $50\sim 1000\text{ng}/\text{ml}$ 、好ましくは $150\sim 500\text{ng}/\text{ml}$ である。

### 【0384】

アゴニストまたはアンタゴニスト(本発明のDR5ポリヌクレオチドおよびオリゴペプチドを含む)、および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む薬学的組成物が提供され、これは、経口投与、直腸投与、非経口投与、槽内(intracisternally)投与、鞘膜内投与、腹腔内投与、局所投与(散剤、軟膏、ドロップまたは経皮パッチによって)、頬投与され得るか、あるいは経口スプレーまたは経鼻スプレーとして投与され得る。重要なことに、アゴニストおよびTNF-ファミリーリガンドを同時投与することによって、臨床的な副作用は、リガンドおよびアゴニストの両方のより低い用量によって軽減され得る。特定の治療適用の緊急性に依存して、アゴニストがTNF-ファミリーリガンドの前に、後に、またはTNF-ファミリーリガンドと同時に「同時投与」され得ることが理解される。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の製剤補助剤をいう。具体的な実施形態において、用語「薬学的に受容可能な」とは、動物における、そしてさらに特にヒトにおける使用のために、連邦規制当局もしくは米国政府に

より認められたか、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に列挙されたことを意味する。用語「キャリア」とは、試料薬剤とともに投与される、希釈剤、アジュバンド、賦形剤、またはビヒクルをいう。このような薬学的なキャリアは、水および油（石油起源、動物起源、植物起源、または合成起源の油（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油など）を含む）のような滅菌した液体であり得る。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合に、好ましいキャリアである。生理食塩水溶液、ならびにデキストロースおよびグリセロールの水溶液はまた、特に注射可能な溶液のために、液体キャリアとして使用され得る。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、イネ、フラワー、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、滑石、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物はまた、所望されるならば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含み得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出処方物などの形態を取り得る。この組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリドのようなキャリアとともに、坐剤として処方され得る。経口処方物は、薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準キャリアを含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。このような組成物は、治療有効量の化合物を、好ましくは精製された形態で、適切な量のキャリアとともに含んで、患者への適切な投与のための形態を提供する。処方物は、投与形態に適すべきである。

#### 【0385】

好ましい実施形態において、組成物は、慣用手順に従って、ヒトへの静脈内投与のために採用された薬学的組成物として、処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤および注射の部位での痛みを緩和するリグノカインのような局部麻酔を含み得る。一般的には、成分は、別々にかまたは単一投薬形態と一緒に混

合してのどちらかで、例えば、一定量の活性薬剤を示すアンプルまたは小袋 ( s a c h e t t e ) のような密封された容器中の凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。組成物が注入により投与されるべき場合には、組成物は、滅菌した薬学的等級の水または生理食塩水を含む注入ボトルに分配され得る。組成物が注射により投与される場合、成分が投与の前に混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

#### 【0386】

本発明の化合物は、中性のまたは塩の形態として処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもののようなアニオンとともに形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するもののようなカチオンとともに形成される塩が挙げられる。

#### 【0387】

用語「非経口的」とは本明細書中において使用される場合、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

#### 【0388】

様々な送達系が公知であり、そして本発明の化合物を投与するために用いられ得る(例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、この化合物の発現が可能な組換え細胞中でのカプセル化、レセプター媒介エンドサイトーシス(例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)を参照のこと)、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築など)。導入方法としては、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられるがそれらに限定されない。化合物または組成物は、任意の好都合な経路により(例えば、注入またはボラス注射により、上皮または粘膜内層(例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など)を通しての吸収により)投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さらに、本発明の薬学的化合物または組成物を、任意の適切な経路(脳室内注射および髄腔内注射を包含し

；脳室内注射は、例えば、Ommayaリザーバのようなりザーバに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易にされ得る)により中枢神経系に導入することが望まれ得る。例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアゾール化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

#### 【0389】

具体的な実施形態において、本発明の薬学的化合物または組成物を、処置の必要な領域に局所的に投与することが望まれ得る；これは、制限する目的ではないが、例えば、手術中の局部注入、局所適用（例えば、手術後の創傷包帯との組み合わせ）により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラント（このインプラントは、シアラスティック(sialastic)膜のような膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、または膠様材料である）により達成され得る。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する際、タンパク質が吸収されない材料を使用するために注意が払われなければならない。

#### 【0390】

別の実施形態において、化合物または組成物は、小胞、特に、リポソーム中へ送達され得る(Langer, Science 249:1527-1533(1990); Treatise, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler(編), Liss, New York, 353~365頁(1989); Lopez-Berestein, 同書317~327頁を参照のこと；広く同書を参照のこと)。

#### 【0391】

さらに別の実施形態において、化合物または組成物は、徐放系中で送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る(Langer, (前出); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987); Buchwald, Surgery 88:507(1980); Saudek, N. Engl. J. Med. 321:574(1989)を参照のこと)。別の実施形態において、高分子材料が用いられ得る(Medical Applications of Controlled Rel

ease, LangerおよびWise (編), CRC Press, Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall (編), Wiley, New York (1984); RangerおよびPeppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)を参照のこと; Levyら, Science 228:190 (1985); Duringら, Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howardら, J. Neurosurg. 71:105 (1989)もまた参照のこと)。さらに別の実施形態において、徐放系は、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、全身用量の一部のみを必要とする(例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, (前出), 第2巻, 115~138頁(1984)を参照のこと)。

#### 【0392】

他の徐放系は、Langerにより総説において議論される(Science 249:1527-1533(1990))。

#### 【0393】

本発明のDR5組成物はまた、徐放性の系により、適切に投与される。徐放性組成物の適切な例としては、適切なポリマー材料(例えば、成形品の形態の半透過性ポリマーマトリックス(例えば、フィルムまたはマイクロカプセル)のような)、適切な疎水性材料(例えば、受容可能な油における乳剤として)またはイオン交換樹脂、および控えめに(sparingly)可溶性の誘導体(例えば、控えめに可溶性な塩のような)が挙げられる。

#### 【0394】

徐放性マトリックスとしては、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号、EP58,481)、L-グルタミン酸および-エチル-L-グルタメートのコポリマー(Sidman, Uら, Biopolymers 22:547-556(1983))、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(R.

Langerら、J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981) および R. Langer、Chem. Tech. 12:98-105 (1982)、エチレンビニルアセテート (R. Langerら、同書) またはポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸 (EP133, 988) が挙げられる。

#### 【0395】

徐放性組成物はまた、リポソームに封入された本発明の組成物 (一般に、Langer、Science 249:1527-1533 (1990); Treatら、Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer、Lopez Berestein および Fidler (編)、Liss、New York、317-327頁 および 353-365頁 (1989) を参照のこと) を包含する。DR5 を含有するリポソームは、それ自体が公知である方法により調製される (DE 3, 218, 121; Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4030-4034 (1980); EP52, 322; EP36, 676; EP88, 046; EP143, 949; EP142, 641; 日本国特許出願第83-118008号; 米国特許第4, 485, 045号 および 同第4, 544, 545号; ならびに EP102, 324)。通常、リポソームは、小さな (約200~800) ユニラメラ型であり、そこでは、脂質含有量は、約30モル% コレステロールよりも多く、選択された比率が、最適なDR5ポリペプチド治療のために調整される。

#### 【0396】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である、具体的な実施形態において、その核酸は、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構成し、そしてそれが細胞内になるように投与することにより (例えば、レトロウイルスベクターの使用により (米国特許第4, 980, 286号を参照のこと)、または直接注射により、または微粒子ボンバードメント (例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont) の使用により、または脂質もしくは細胞表面レセプター

もしくはトランスフェクト剤でコーティングすることにより、または核に入ることが公知であるホメオボックス様ペプチドと結合させて投与すること（例えば、Joliotら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868(1991)を参照のこと）などにより、そのコードされたタンパク質の発現を促進するようにインビボで投与され得る。あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして、発現のために相同組換えにより宿主細胞DNA内に組み込まれ得る。

#### 【0397】

さらに別の実施形態において、本発明の組成物は、ポンプの方法によって送達される。（Langer, (前出); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987); Buchwaldら, Surgery 88:507(1980); Saudekら, N. Engl. J. Med. 321:574(1989)を参照のこと）。

#### 【0398】

他の制御された放出システムは、Langerにより総説において議論される（Science 249:1527-1533(1990)）。

#### 【0399】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である、具体的な実施形態において、その核酸は、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれが細胞内になるように投与することにより（例えば、レトロウイルスベクターの使用により（米国特許第4,980,286号を参照のこと）、または直接注射により、または微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont）の使用により、または脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト剤でコーティングすることにより、または核に入ることが公知であるホメオボックス様ペプチドと結合させて投与すること（例えば、Joliotら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868(1991)を参照のこと）などにより、そのコードされたタンパク質の発現を促進するようにインビボで投与され得る。あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして、発現のために相同組換えにより宿主細胞DNA内に

組み込まれ得る。

【0400】

非経口注射のための本発明の薬学的組成物は、使用の直前に滅菌注射溶液または分散剤 (dispersion) への再形成のために以下を含み得る。薬学的に受容可能な滅菌された水性または非水性溶液、分散剤、懸濁液またはエマルジョン、ならびにの滅菌粉末。

【0401】

可溶性DR5ポリペプチドに加えて、膜貫通領域を含むDR5ポリペプチドはまた、以下の場合に使用され得る。界面活性剤 (例えば、CHAPSまたはNP-40) を含むことによって緩衝液に適切に可溶化される場合。

【0402】

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の治療有用性または予防有用性を実証するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および/または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術 (ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない) を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるかどうかを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養において増殖され、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

【0403】

本発明の組成物を単独でまたは他の補助剤と組み合わせて投与し得る。本発明の組成物と共に投与され得る補助剤は、ミョウバン、ミョウバンおよびデオキシコール酸 (ImmunoAg)、MTP-PE (Biocine Corp.)、QS21 (Genentech, Inc.)、BCG、およびMPLを含み得るが、これに限定されない。特定の実施形態において、本発明の組成物をミョウ

バンと組み合わせて投与する。別の特定の実施形態において、本発明の組成物を QS - 21 と組み合わせて投与する。本発明の組成物と共に投与され得るさらなる補助剤は、モノホスホリル液体免疫調節物質、Adjuvax 100a、QS - 21、QS - 18、CRL1005、アルミニウム塩、MF - 59、および Virosomal アジュバント技術を含むが、これらに限定されない。本発明の組成物と共に投与され得るワクチンは、MMR（はしか、おたふくかぜ、風疹）、ポリオ、水痘、破傷風/ジフテリア、A型肝炎、B型肝炎、B型インフルエンザ菌、百日咳、肺炎、インフルエンザ、ライム病、ロタウイルス、コレラ、黄熱病、日本脳炎、ポリオ、狂犬病、腸チフス、および百日咳に対する防御へ指向されるワクチンを含むがこれらに限定されない。同時に（例えば、混合剤として）、別々であるが同時もしくは並行して；または経時的にのいずれかの配合物を投与し得る。これは、組み合わせた薬剤を治療混合剤として共に投与する提示、また組み合わせ剤を別々であるが、同時に（例えば、別々の静脈内ラインを個々の同じ静脈ラインへ通すように）投与する手順を含む。さらに、「組み合わせての」投与は、化合物の1つの別々の投与または、所与の第1の、続いて第2の薬剤の投与を含む。

#### 【0404】

上で示されるように、本発明の組成物は、単独で、または他の治療的薬剤と組み合わせて投与され得る。本発明の組成物とともに投与され得る治療的薬剤としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：TNFファミリーの他のメンバー、化学療法剤、抗生物質、抗ウイルス剤、ステロイド性および非ステロイド性の抗炎症剤、従来の免疫療法剤、サイトカイン、ケモカインならびに/または増殖因子。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時もしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせられた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じての場合）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

## 【0405】

1つの実施形態において、本発明の組成物は、TNFファミリーの他のメンバーと組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得るTNF分子、TNF関連分子、またはTNF様分子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：可溶性形態のTNF- $\alpha$ 、リンホトキシン- $\alpha$ 、(LT- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ としても公知)、LT- $\alpha$  (複合ヘテロトリマーLT- $\alpha$  2- $\beta$ の状態で見出された)、OPGL、FasL、CD27L、CD30L、CD40L、4-1BBL、DcR3、OX40L、TNF- $\beta$  (国際公開番号WO96/14328)、TRAIL、AIM-II、(国際公開番号WO97/34911)、APRIL (J. Exp. Med. 188(6):1185-1190)、エンドカイン(endokine)- $\beta$  (国際公開番号WO98/07880)、TR6 (国際公開番号WO98/30694)、OPG、および神経成長因子(NGF)、ならびに可溶性形態のFas、可溶性形態のCD30、可溶性形態のCD27、可溶性形態のCD40および可溶性形態の4-1BB、TR2 (国際公開番号WO96/34095)、DR3 (国際公開番号WO97/33904)、DR4 (国際公開番号WO98/32856)、TR5 (国際公開番号WO98/30693)、TRANK、TR9 (国際公開番号WO98/56892)、TR10 (国際公開番号WO98/54202)、312C2 (国際公開番号WO98/06842)、およびTR12、ならびに可溶性形態のCD154、可溶性形態のCD70、および可溶性形態のCD153。

## 【0406】

別の実施形態において、本発明の組成物は、CD40リガンド(CD40L)、可溶性形態のCD40L (例えば、AVREND™)、生物学的に活性なフラグメント、変異体、またはCD40Lの誘導體、抗CD40L抗体 (例えば、アゴニストまたはアンタゴニストの抗体)、および/または抗CD40抗体 (例えば、アゴニストまたはアンタゴニストの抗体) と組み合わせて、投与される。

## 【0407】

なお別の実施形態において、本発明の組成物は、1個、2個、3個、4個、5個、またはそれ以上の以下の組成物と組み合わせて投与される：タクロリムス(

Fujisawa)、サリドミド(例えば、Celgene)、抗Tac(Fv)-PE40(例えば、Protein Design Labs)、イノリモマブ(inolimomab)(Biotest)、MAK-195F(Knoll)、ASM-981(Novartis)、インターロイキン-1レセプター(例えば、Immunex)、インターロイキン-4レセプター(例えば、Immunex)、ICM3(ICOS)、BMS-188667(Bristol-Myers Squibb)、抗TNF Ab(例えば、Therapeutic抗体)、CG-1088(Celgene)、抗-B7モノクローナル抗体(例えば、Innogenetics)、MEDI-507(Bio Transplant)、ABX-CBL(Abgenix)。

#### 【0408】

本発明によれば、Fasリガンド(Fas-L)媒介細胞死およびTRAIL媒介細胞死の両方に敏感な患者は、TRAIL/TRAIL-R相互作用を阻害する薬剤およびFas-L/Fas相互作用を阻害する薬剤の両方を用いて処置され得る。Fas-LのFasへの結合を遮断するための適切な薬剤として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：可溶性Fasポリペプチド；可溶性Fasポリペプチド(例えば、sFas/Fcのダイマー)のオリゴマー形態；アポトーシスを生じる生物学的シグナルを変換することなくFasと結合する抗Fas抗体；Fas-LのFasへの結合を遮断する抗Fas-L抗体；およびFasと結合するが、アポトーシスを生じる生物学的シグナルを変換しないFas-Lのムテイン。好ましくは、この方法に従って使用された抗体は、モノクローナル抗体である。Fas-L/Fas相互作用を遮断するための適切な薬剤(抗Fasモノクローナル抗体を含む)の例は、本明細書中において参考として援用されるWO95/10540に記載される。

#### 【0409】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、抗レトロウイルス薬剤、ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、および/またはプロテアーゼインヒビターとの組み合わせで投与される。本発明の組成物との組み合わせで投与され得るヌクレオシド逆転写酵素インヒビターは、R

ETROVIR™ (ジドブジン/AZT)、VIDEX™ (ジダノシン/ddl)、HIVID™ (ザルシタビン/ddC)、ZERIT™ (スタブジン(stavudine)/d4T)、EPIVIR™ (ラミブジン(lamivudine)/3TC)、およびCOMBIVIR™ (ジドブジン/ラミブジン)が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の組成物との組み合わせで投与され得る非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビターは、VIRAMUNE™ (ネビラピン(nevirapine))、RESCRIPTOR™ (デラビジン(delavirdine))、およびSUSTIVA™ (エファビレン(efavirenz))が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の組成物との組み合わせで投与され得るプロテアーゼインヒビターは、CRIXIVAN™ (インディナビル(indinavir))、NORVIR™ (リトナビル(ritonavir))、INVIRASE™ (サキナビル(saquinavir))、およびVIRACEPT™ (ネルフィナビル(nelfinavir))が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、抗レトロウイルス薬剤、ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、および/またはプロテアーゼインヒビターは、AIDSの処置、および/またはHIV感染を予防または処置するために、本発明の組成物との任意の組み合わせにおいて使用され得る。

#### 【0410】

他の実施形態において、本発明の組成物は、抗日和見感染薬剤と組み合わせて投与され得る。本発明の組成物と組み合わせて投与され得る抗日和見感染薬剤は、TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™、DAPSONE™、PENTAMIDINE™、ATOVAQUONE™、ISONIAZID™、RIFAMPIN™、PYRAZINAMIDE™、ETHAMBUTOL™、RIFABUTIN™、CLARITHROMYCIN™、AZITHROMYCIN™、GANCICLOVIR™、FOSCARNET™、CIDOFOVIR™、FLUCONAZOLE™、ITRACONAZOLE™、KETOCONAZOLE™、ACYCLOVIR™、FAMCICOLVIR™、PYRIMETHAMINE™、LEUCOVORIN™、NEUPOGE

N<sup>TM</sup> (フィルグラスチン (filgrastim) / G-CSF)、および LEUKINE<sup>TM</sup> (サルグラモスチン (sargramostim) / GM-CSF) が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の組成物は、日和見性のニューモシスティス肺炎感染を予防的に処置または予防するために、TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE<sup>TM</sup>、DAPSONE<sup>TM</sup>、PENTAMIDINE<sup>TM</sup>、および/またはATOVAQUONE<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態では、本発明の組成物は、日和見性のトリ菌感染を予防的に処置または予防するために、ISONIAZID<sup>TM</sup>、RIFAMPIN<sup>TM</sup>、PYRAZINAMIDE<sup>TM</sup>、および/またはETHAMBUTOL<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態では、日和見性の結核菌感染を予防的に処置または予防するために、本発明の組成物は、RIFABTIN<sup>TM</sup>、CLARITHROMYCIN<sup>TM</sup>、および/またはAZITHROMYCIN<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、日和見性のサイトメガロウイルス感染を予防的に処置または予防するために、GANCICLOVIR<sup>TM</sup>、FOSCARNET<sup>TM</sup>、および/またはCIDOFOVIR<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、日和見性の真菌症感染を予防的に処置または予防するために、FLUCONAZOLE<sup>TM</sup>、ITRACONAZOLE<sup>TM</sup>、および/またはKETOCOCONAZOLE<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、日和見性の単純性疱疹ウイルスI型および/またはII型感染を予防的に処置または予防するために、ACYCLOVIR<sup>TM</sup>および/またはFAMCICLOVIR<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、日和見性のToxoplasma gondii感染を予防的に処置または予防するために、PYRIMETHAMINE<sup>TM</sup>および/またはLEUCOVORIN<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、日和見性の細菌感染を予防的に処置または予防するために、LEUCOVORIN<sup>TM</sup>および/またはNEUPOGEN<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。

## 【0411】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、抗ウイルス薬剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物と共に投与され得る抗ウイルス薬剤は、アシクロビル、リバビリン、アマンタジン、およびリマンタジンが挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0412】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、抗生物質薬剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物と共に投与され得る抗生物質薬剤は、アモキシリン、アミノグリコシド、 $\beta$ -ラクタム(グリコペプチド)、 $\beta$ -ラクタマーゼ、クリンダマイシン、クロラムフェニコール、セファロスポリン、シプロフロキサシン、シプロフロキサシン、エリスロマイシン、フルオロキノロン、マクロライド、メトロニダゾル、ペニシリン、キノロン、リファンピン、ストレプトマイシン、スルホンアミド、テトラサイクリン、トリムトプリム、トリムトプリム-スルファメトキサゾールおよびバンコマイシンが挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0413】

本発明の組成物と組み合わせて投与され得る従来の非特異的免疫抑制剤としては、ステロイド、シクロスポリン、シクロスポリン類似体、シクロホスファミド、メチルプレドニゾン、プレドニゾン、アザチオプリン、FK-506、15-デオキシスパガリン、およびT細胞に応答する機能を抑制することによって作用する他の免疫抑制剤が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0414】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、免疫抑制剤調製物と組み合わせて投与される。さらに、本発明の組成物と組み合わせて投与され得る免疫抑制剤調製物は、ORTHOCLONE™(OKT3)、SANDIMMUNE™/NEORAL™/SANGDYA™(シクロスポリン)、PROGRAF™(タクロリムス)、CELLCEPT™(マイコフェノラート)、アザチオプリン、グルコミコステロイド(glucomicosteroid)、およびRAPAMUNE™(シロリムス(sirrolimus))が挙げられるがこれらに限定さ

れない。特定の実施形態において、免疫抑制薬が、器官の拒絶または骨髄移植の拒絶を予防するために使用され得る。

【0415】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、単独でかまたは1以上の静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る静脈内免疫グロブリン調製物としては、GAMMAR™、IVEEGAM™、SANDOGLOBULIN™、GAMMAGARD S/D™およびGAMIMUNE™が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植治療（例えば、骨髄移植）において静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。

【0416】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、単独でかまたは抗炎症剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る抗炎症剤としては、グルココルチコイドおよび非ステロイド抗炎症剤、アミノアリアルカルボン酸誘導体、アリアル酢酸誘導体、アリアル酪酸誘導体、アリアルカルボン酸、アリアルプロピオン酸誘導体、ピラゾール類、ピラゾロン類、サリチル酸誘導体、チアジンカルボキサミド類、e-アセトアミドカプロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン（amixetrine）、ベンダザック、ベンジダミン、ブコローム、ジフェンピラミド、ジタゾール、エモルファゾン、グアイアズレン、ナブメトン、ニメスリド、オルゴテイン、オキサセプロール、パラニリン（paranyline）、ペリソキサール、ピフオキシム、プロカゾン、プロキサゾール、およびテニダブが挙げられるが、これらに限定されない。

【0417】

1つの実施形態において、本発明の組成物は、ステロイド療法と組み合わせて投与される。本発明の組成物と組み合わせて投与され得るステロイドとしては、オーラル（経口）コルチコステロイド、プレドニゾン、およびメチルプレドニゾン（例えば、IVメチルプレドニゾン）が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の組成物は、プレドニゾンと組み合わせて

投与される。さらに特定の実施形態において、本発明の組成物は、プレドニゾンおよび免疫抑制剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物およびプレドニゾンと投与され得る免疫抑制剤は、本明細書中に記載される免疫抑制剤であり、アザチオプリン、シクロホスファミド、およびシクロホスファミドIVが挙げられるがこれらに限定されない。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、メチルプレドニゾンと組み合わせて投与される。さらに特定の実施形態において、本発明の組成物は、メチルプレドニゾンおよび免疫抑制剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物およびメチルプレドニゾンと共に投与され得る免疫抑制剤は、本明細書中に記載される免疫抑制剤であり、そしてアザチオプリン、シクロホスファミド、およびシクロホスファミドIVが挙げられるがこれらに限定されない。

【0418】

別の実施形態において、本発明の組成物は、抗マラリア薬と組み合わせて投与される。本発明の組成物と共に投与され得る抗マラリア薬としては、ヒドロキシクロロキン、および/またはキナクリンが挙げられるがこれらに限定されない。

【0419】

別の実施形態において、本発明の組成物は、NSAIDと組み合わせて投与される。

【0420】

非独占的な実施形態において、本発明の組成物は、1、2、3、4、5、10、またはそれ以上の、以下の薬物と組み合わせて投与される：NRD-101 (Hoechst Marion Roussel)、ジクロフェナク (Dimethaid)、オキサプロジンカリウム (Monsanto)、メカセルミン (mecasermin) (Chiron)、T-614 (Toyama)、ペメトレストニナトリウム (pemetrexed disodium) (Eli Lilly)、オトレルートン (atreleuton) (Abbott) ヴァルデコキシブ (valdecoxib) (Monsanto)、エルテナク (Byk Gulden)、カンパッチ (campath)、AGM-1470 (Takeda)、CDP-571 (Celltech Chiroscienc

e)、CM-101 (CarboMed)、ML-3000 (Merckle)、CB-2431 (KS Biomedix)、CBF-BS2 (KS Biomedix)、IL-1Ra 遺伝子治療 (gene therapy) (Valentis)、JTE-522 (Japan Tobacco)、パクリタキセル (Angiotech)、DW-166HC (Dong Wha)、ダルブフェロンメシレート (darbufelone mesylate) (Warner-Lambert)、可溶性TNFレセプター-1 (synergen; Amgen)、IPR-6001 (Institute for Pharmaceutical Research)、トロケード (trocade) (Hoffman-La Roche)、EF-5 (Scotia Pharmaceuticals)、BIIL-284 (Boehringer Ingelheim)、BIIF-1149 (Boehringer Ingelheim)、LeukoVax (Inflammatics)、MK-663 (Merck)、ST-1482 (Sigma-Tau) およびブチソコートプロピオネート (butixocort propionate) (Warner Lambert)。

#### 【0421】

なお別の実施形態において、本発明の組成物は、1、2、3、4、5、10、またはそれ以上の、以下の薬物と組み合わせて投与される：メトトレキセート、スルファサラジン、金チオリンゴ酸ナトリウム、オーラノフィン、シクロスポリン、ペニシラミン、アザチオプリン、抗マラリア薬（例えば、本明細書において記載されるものなど）、シクロホスファミド、クロラムブシル、金、EMBREL™ (Etanercept)、抗TNF抗体、およびプレドニゾロン。より好ましい実施形態において、本発明の組成物は、抗マラリア薬、メトトレキセート、抗TNF抗体、EMBREL™ および/またはスルファサラジンと組み合わせて投与される。1つの実施形態において、本発明の組成物は、メトトレキセートと組み合わせて投与される。別の実施形態において、本発明の組成物は、抗TNF抗体と組み合わせて投与される。別の実施形態において、本発明の組成物は、メトトレキセートおよび抗TNF抗体と組み合わせて投与される。別の実施形態において、本発明の組成物は、スルファサラジンと組み合わせて投与される。別

の特定の実施形態において、本発明の組成物は、メトトレキサート、抗TNF抗体、およびスルファサラジンと組み合わせて投与される。別の実施形態において、本発明の組成物は、EMBREL™と組み合わせて投与される。別の実施形態において、本発明の組成物は、EMBREL™およびメトトレキサートと組み合わせて投与される。別の実施形態において、本発明の組成物は、EMBREL™、メトトレキサートおよびスルファサラジンと組み合わせて投与される。他の実施形態において、1つ以上の抗マラリア薬は、上記に列挙された組み合わせ剤の1つと組み合わせられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、抗マラリア薬（例えば、ヒドロキシクロロキン）、EMBREL™、メトトレキサートおよびスルファサラジンと組み合わせて投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、抗マラリア薬（例えば、ヒドロキシクロロキン）、スルファサラジン、抗TNF抗体、およびメトトレキサートと組み合わせて投与される。

#### 【0422】

別の実施形態において、本発明の組成物は、化学療法剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る化学療法剤としては、抗生物質誘導体（例えば、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、およびダクチノマイシン）；抗エストロゲン（例えば、タモキシフェン）；抗代謝物（例えば、フルオロウラシル、5-FU、メトトレキサート、フロクスウリジン、インターフェロン - 2b、グルタミン酸、プリカマイシン（plicamycin））、メルカプトプリン、および6-チオグアニン）；細胞傷害剤（例えば、カルムスチン、BCNU、ロムスチン、CCNU、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、エストラムスチン、ヒドロキシウレア、プロカルバジン、マイトマイシン、ブスルファン、シス-プラチン、および硫酸ビンクリスチン）；ホルモン（例えば、メドロキシプロゲステロン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エチニルエストラジオール、エストラジオール、酢酸メゲストロール、メチルテストステロン、ジエチルスチルベストロールジホスフェート、クロロトリアニセン、およびテストラクトン）；ナイトロジェンマスタード誘導体（例えば、メファ

レン (mephalen)、クロランブシル (chlorambucil)、メクロレタミン (ナイトロジェンマスタード) およびチオテパ) ; ステロイド類および組み合わせ (例えば、ベタメタゾンリン酸ナトリウム) ; ならびにその他 (例えば、ジカルバジン (dicarbazine)、アスパラギナーゼ、ミトーテン、硫酸ピンクリスチン、硫酸ピンブラスチン、およびエトポシド) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0423】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、CHOP (シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、およびプレドニゾン) と組み合わせるまたはCHOPの成分の任意の組み合わせにおいて投与される。別の実施形態において、本発明の組成物は、Rituximabと組み合わせる投与される。さらなる実施形態において、本発明の組成物は、RituximabおよびCHOPとともに、またはRituximabおよびCHOPの成分の任意の組み合わせとともに投与される。

#### 【0424】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、サイトカインと組み合わせる投与され得る。本発明の組成物とともに投与され得るサイトカインとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: GM-CSF、G-CSF、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、抗CD40、CD40L、IFN-、IFN-、IFN-、TNF-、およびTNF-。

#### 【0425】

別の実施形態において、本発明の組成物は、造血性増殖因子と組合せて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る造血性増殖因子としては、LEUKINE (登録商標) (SARGRAMOSTIM (登録商標)) およびNEUPOGEN (登録商標) (FILGRASTIM (登録商標)) が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0426】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、抗原性タンパク質と組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る抗原性タンパク質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：神経膠腫由来増殖因子（GDGF）（欧州特許番号EP-399816に開示される）；血小板由来増殖因子A（PDGF-A）（欧州特許番号EP-682110に開示される）；血小板由来増殖因子B（PDGF-B）（欧州特許番号EP-282317に開示される）；胎盤増殖因子（PlGF）（国際出願公開番号WO92/06194に開示される）；胎盤増殖因子-2（PlGF-2）（Hauserら, Gorwth Factors, 4:259-268(1993)に開示される）；血管内皮増殖因子（VEGF）（国際出願公開番号WO90/13649に開示される）；血管内皮増殖因子-A（VEGF-A）（欧州特許番号EP-506477に開示される）；血管内皮増殖因子-2（VEGF-2）（国際出願公開番号WO96/39515に開示される）；血管内皮増殖因子-B186（VEGF-B186）（国際出願公開番号WO96/26736に開示される）；血管内皮増殖因子-D（VEGF-D）（国際出願公開番号WO98/02543に開示される）；血管内皮増殖因子-D（VEGF-D）（国際出願公開番号WO98/07832に開示される）；および血管内皮増殖因子-E（VEGF-E）（ドイツ国特許番号DE19639601に開示される）。上記の参考文献は、本明細書中に参考として援用される。

#### 【0427】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、線維芽細胞増殖因子と組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る線維芽細胞増殖因子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、およびFGF-15。

#### 【0428】

1つの実施形態において、本発明の組成物を、1つ以上のケモカインと組合せて投与する。特定の実施形態において、本発明の組成物を、インターフェロン

誘導性タンパク質 - 10 ( I P - 10 )、インターロイキン8 ( I L - 8 )、血小板因子 - 4 ( P F 4 )、好中球活性化タンパク質 ( N A P - 2 )、G R O - 、 G R O - 、 G R O - 、好中球活性化化合物ペプチド ( E N A - 7 8 )、顆粒球化学誘引タンパク質 - 2 ( G C P - 2 )、および間質性細胞由来因子 - 1 ( S D F - 1、またはプレB細胞刺激因子 ( P B S F ) ) ; かなる群より選択される ( C x C ) ケモカインと ; および / または、R A N T E S ( 活性化において調節された、発現および分泌された正常 T )、マクロファージ炎症性タンパク質 - 1 ( M I P - 1 )、マクロファージ炎症性タンパク質 - 1 ( M I P - 1 )、単球走化性タンパク質 - 1 ( M C P - 1 )、単球走化性タンパク質 - 2 ( M C P - 2 )、単球走化性タンパク質 - 3 ( M C P - 3 )、単球走化性タンパク質 - 4 ( M C P - 4 )、マクロファージ炎症性タンパク質 - 1 ( M I P - 1 )、マクロファージ炎症性タンパク質 - 3 ( M I P - 3 )、マクロファージ炎症性タンパク質 - 3 ( M I P - 3 )、マクロファージ炎症性タンパク質 - 4 ( M I P - 4 / D C - C K - 1 / P A R C )、エオタキシン ( e o t a x i n )、エクソダス ( E x o d u s )、および I - 3 0 9、かなる群より選択される ( C C ) ; および / または ( C ) ケモカイン、リンホタクチン ( l y m p h o t a c t i n ) と組合せて投与する。

【0429】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、例えば、放射線療法のような他の治療レジメンまたは予防レジメンと組み合わせて投与される。

【0430】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の化合物、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。特定の実施形態において、用語「薬学的に受容可能な」とは、動物における、そしてさらに特にヒトにおける使用について、連邦規制当局もしくは州政府により許可されたか、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に収載されたことを意味する。

【0431】

本発明のポリペプチドの異常な発現および / または活性と関連する疾患または障害の処置、阻害および予防において効果的である本発明の化合物の量は、標準

的な臨床技術により決定され得る。さらに、インビトロアッセイは、必要に応じて、最適な投薬量の範囲の同定を補助するために使用され得る。処方において使用されるべき正確な用量はまた、投与の経路、および疾患または障害の重篤さに依存し、そして開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量応答曲線から外挿され得る。

#### 【0432】

抗体に関して、患者に投与される投薬量は、代表的に、患者の体重1kgあたり0.1mg~100mgである。好ましくは、患者に投与される投薬量は、患者の体重1kgあたり0.1mgと20mgとの間であり、より好ましくは、患者の体重1kgあたり1mg~10mgである。一般に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドへの免疫応答に起因して、他種由来の抗体よりもヒト体内で長い半減期を有する。従って、ヒト抗体をより低い投薬量および頻度のより少ない投与で投与することが、しばしば可能である。さらに、本発明の抗体の投与の投薬量および投与の頻度は、改変（例えば、脂溶化（lipidation）など）による（例えば、脳への）抗体の取り込みおよび組織浸透を増強することにより減少され得る。

#### 【0433】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の一つ以上の成分で満たされている一つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。薬学的製品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関により規定される形式における通告は、このような容器に、必要に応じて付随し得る。この通告は、ヒトの投与のための製造、使用または販売のこの機関による認可を反映する。

#### 【0434】

（診断および画像化）

目的のポリペプチドに特異的に結合する標識化抗体、ならびにその誘導体およびそのアナログは、診断目的のために使用されて、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連する疾患、障害および/または状態を検出、診断またはモニターし得る。本発明は、目的のポリペプチドの異常な発現の検出に

ついて提供し、これは、(a) 目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および(b) この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、異常な発現を示す。

#### 【0435】

本発明は、障害を診断するための診断アッセイを提供し、このアッセイは、(a) 目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および(b) この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、特定の障害を示す。癌に関して、個体由来の生検組織における比較的高い量の転写物の存在は、疾患の発生のための素因を示し得るか、または実際の臨床症状の出現前に疾患を検出するための手段を提供し得る。この型のより決定的な診断は、保健専門家に予防手段を使用させること、または早期の積極的な処置を可能にし得、これにより、癌の発生またはさらなる進行を予防する。

#### 【0436】

本発明の抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を使用して生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイし得る(例えば、Jalkanenら、J. Cell. Biol. 101:976-985(1985); Jalkanenら、J. Cell. Biol. 105:3087-3096(1987)を参照のこと)。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセイ(例えば、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)および放射免疫測定法(RIA))が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野において公知であり、そして酵素標識(例えば、グルコースオキシダーゼ);放射性同位体(例えば、ヨウ素(125I、121I)、炭素(14C)、硫黄(35S)、トリチウム(3H)、インジウム

( $^{112}\text{In}$ )、およびテクネチウム( $^{99}\text{Tc}$ )；発光標識(例えば、ルミノール)；ならびに蛍光標識(例えば、フルオレセインおよびローダミン)、ならびにビオチンが挙げられる。

#### 【0437】

本発明の1つの局面は、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおける、目的のポリペプチドの異常な発現と関連する疾患または障害の検出および診断である。1つの実施形態において、診断は、a)目的のポリペプチドに特異的に結合する有効量の標識化分子を被験体に(例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に)投与する工程；b)このポリペプチドが発現する被験体内の部位でこの標識化分子が優先的に濃縮することを可能にするために(および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるために)投与後、時間間隔を待つ工程；c)バックグラウンドレベルを決定する工程；およびd)この被験体中の標識化分子を検出する工程、を包含し、その結果、このバックグラウンドレベルを越える標識化分子の検出は、この被験体が目的のポリペプチドの異常な発現と関連する特定の疾患または障害を有することを示す。バックグラウンドレベルは、特定の系について以前に決定された標準的な値と、検出された標識化分子の量を比較する工程を包含する種々の方法により決定され得る。

#### 【0438】

被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、約5～20ミリキュリーの $^{99}\text{mTc}$ の範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、S.W.Burchielら、「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments」(Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer)の第13章、S.W.BurchielおよびB.A.Rhodes編、Masson Publishing Inc.(1982)に記載される。

## 【0439】

用いられる標識の型および投与の様式を含む、いくつかの可変要素に依存して、標識された分子が被験体の部位に優先的に濃縮し、そして結合されていない標識された分子がバックグラウンドレベルまで一掃されることを可能にする、投与後の時間間隔は、6～48時間または6～24時間または6～12時間である。別の実施形態においては、投与後の時間間隔は、5～20日間または5～10日間である。

## 【0440】

1つの実施形態においては、疾患または障害のモニタリングは、その疾患または障害を診断するための方法を繰り返すこと（例えば、最初の診断後1ヶ月、最初の診断後6ヶ月、最初の診断後1年など）により行われる。

## 【0441】

標識された分子の存在は、インビボ走査について当該分野において公知の方法を用いて、患者から検出され得る。これらの方法は、用いられる標識の型に依存する。当業者は、特定の標識を検出するための適切な方法を決定し得る。本発明の診断方法において用いられ得る方法およびデバイスとしては、限定はされないが、コンピューター断層撮影（CT）、陽子（p o s i t i o n）射出断層撮影法（PET）のような全身走査、磁気共鳴像（MRI）、および超音波診断法が挙げられる。

## 【0442】

特定の実施形態においては、この分子は放射性同位体で標識され、そして放射線応答性の外科用機器を用いて患者から検出される（Thurstonら、米国特許第5,441,050号）。別の実施形態においては、この分子は蛍光化合物で標識され、そして蛍光応答性の走査機器を用いて患者から検出される。別の実施形態においては、この分子は陽電子放出金属で標識され、そして陽子射出断層撮影法を用いて患者（p a t e n t）から検出される。さらに別の実施形態においては、この分子は常磁性標識で標識され、そして磁気共鳴映像（MRI）を用いて患者から検出される。

## 【0443】

(キット)

本発明は、上記の方法において用いられ得るキットを提供する。1つの実施形態においては、キットは、1以上の容器中に、本発明の抗体（好ましくは精製された抗体）を備える。特定の実施形態においては、本発明のキットは、このキットに含まれる抗体と特異的に免疫反応性であるエピトープを含む、実質的に分離されたポリペプチドを備える。好ましくは、本発明のキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体を、さらに備える。別の特定の実施形態においては、本発明のキットは、目的のポリペプチドとの抗体の結合（例えば、この抗体は、検出可能な基質（例えば、抗体は、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物または発光化合物）と結合体化され得るか、あるいは第一の抗体を認識する第二の抗体は、検出可能な基質と結合体化され得る）を検出するための手段を備える。

【0444】

本発明の別の特定の実施形態においては、このキットは、増殖性および/または癌性のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対して特異的な抗体を含む血清をスクリーニングする際に用いる診断用キットである。このようなキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体を備え得る。このようなキットは、少なくとも1つの抗ポリペプチド抗原抗体と特異的に免疫反応性であるエピトープを含む、実質的に単離されたポリペプチド抗原を備え得る。さらに、このようなキットは、この抗体の抗原への結合（例えば、この抗体は、フローサイトメトリーにより検出され得る、フルオレセインまたはローダミンのような蛍光化合物と結合体化され得る）を検出するための手段を備える。特定の実施形態においては、このキットは、組換え的に産生されたポリペプチド抗原または化学的に合成されたポリペプチド抗原を備え得る。このキットのポリペプチド抗原はまた、固体支持体に付着され得る。

【0445】

より特定の実施形態においては、上記のキットの検出手段は、このポリペプチド抗原が付着される固体支持体を含む。このようなキットはまた、非付着レポーター標識抗ヒト抗体を備える。この実施形態においては、抗体のポリペプチド抗

原との結合はこのレポーター標識抗体の結合により検出され得る。

【0446】

さらなる実施形態においては、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清をスクリーニングする際に用いる診断用キットを含む。この診断用キットは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド抗原と特異的に免疫反応性である、実質的に単離された抗体、およびこのポリヌクレオチドまたはポリペプチド抗原の抗体との結合を検出する手段を備える。1つの実施形態においては、この抗体は、固体支持体に付着される。特定の実施形態においては、この抗体は、モノクロナール抗体であり得る。このキットの検出手段は、第二の標識されたモノクロナール抗体を含み得る。あるいは、またはさらに、この検出手段は、標識された、競合抗原を含み得る。

【0447】

1つの診断の構成においては、試験血清は、本発明の方法により得られる表面結合抗原を有する固相試薬と反応する。特異的な抗原抗体をこの試薬と結合させ、そして結合されない血清成分を洗浄により除去した後、固体支持体上に結合する抗原抗体の量に応じて、レポーターをこの試薬と結合させるために、この試薬をレポーター標識抗体と反応させる。この試薬は、結合されない標識抗体を除去するため、再び洗浄され、そしてこの試薬と会合したレポーターの量が決定される。代表的には、レポーターは、適切な蛍光測定基質、発光基質または比色基質 (Sigma, St. Louis, MO) の存在下で、この固相をインキュベートすることにより検出される酵素である。

【0448】

上記のアッセイにおける固体表面試薬は、タンパク質材料を固体支持体材料 (例えば、高分子ビーズ、計深棒、96ウェルプレートまたは濾過材料) に付着させるための公知の技術により調製される。これらの付着方法としては、一般的に、支持体へのタンパク質の非特異的な吸着または固体支持体上の化学的に活性な基 (例えば、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基、またはアルデヒド基) とのタンパク質の共有結合 (covalent attachment) (代表的には、遊離アミン基を介する) が挙げられる。あるいは、ストレプトアビジンで

コートされたプレートが、ビオチン化された抗原と共に使用され得る。

【0449】

従って、本発明は、この診断方法を行うためのアッセイ系またはキットを提供する。このキットは、一般的に、表面結合された組換え抗原を有する支持体、および表面結合された抗原抗体を検出するための、レポーター標識された抗ヒト抗体を備える。

【0450】

(染色体アッセイ)

本発明の核酸配列はまた、染色体同定に有用である。この配列は、個々のヒト染色体における特定の位置に特異的に標的化され、そしてハイブリダイズし得る。本発明による染色体へのDNAのマッピングは、それらの配列を、疾患に関連した遺伝子と関連づけることにおいて重要な第一歩である。

【0451】

この点における特定の好ましい実施形態において、本明細書中で開示されるcDNAおよび/またはポリヌクレオチドは、DR5遺伝子のゲノムDNAをクローニングするために用いられる。これは、一般的に入手可能である、種々の周知の技術およびライブラリーを用いて達成され得る。次いで、この目的のために周知の技術を用いて、インサイチュ染色体マッピングのためにゲノムDNAが用いられる。

【0452】

さらに、配列は、cDNAからPCRプライマー(好ましくは、15~25bp)を調製することにより、染色体にマッピングされ得る。遺伝子の3'非翻訳領域のコンピューター分析を用いて、ゲノムDNAにおいて1つを超えるエキソンにまたがらないプライマーを迅速に選択し、従って、増幅プロセスを複雑化する。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含有する体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために用いられる。

【0453】

中期染色体スプレッド(spread)へのcDNAの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(「FISH」)は、一工程で、正確な染色体位置を提供す

るために用いられ得る。この技術は、50または60bp程度の長さのcDNA由来のプローブと共に用いられ得る。この技術の概説については、Vermaら、Human Chromosomes: A Manual Of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)を参照のこと。

【0454】

一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上の配列の物理学的な位置は、遺伝子マップデータと関連づけられ得る。このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance In Man (Johns Hopkins University, Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能である)に見出される。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関連が、連鎖分析(物理学的に隣接した遺伝子の共同遺伝)によって同定される。

【0455】

次に、罹患個体と非罹患個体との間でのcDNAまたはゲノム配列における差異を決定することが必要である。罹患個体のいくらかまたは全てにおいて変異が認められるが、いずれの正常個体でも認められない場合、変異は、疾患の原因因子のようである。

【0456】

本発明に一般的に記載されるように、以下の実施例を参照することにより、本発明は、より容易に理解されるが、以下の実施例は、例示の目的で提供され、限定として意図されない。

【0457】

(実施例1)

(E. coliにおける発現と精製)

寄託したcDNA(ATCC番号97920)の成熟DR5タンパク質をコードするDNA配列を、DR5タンパク質のアミノ末端配列、および遺伝子の3'側のベクター配列に特異的なPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅する。クローニングを容易にするための制限酵素部位を含むさらなるヌクレオチ

ドを、5'および3'配列にそれぞれ加える。

【0458】

以下のプライマーを、E. coliのDR5細胞外ドメインの発現に用いる：  
5'プライマーは、以下の配列：

【0459】

【化8】

5'-CGCCCATGGAGTCTGCTCTGATCAC-3'(SEQ ID NO:8)

を有し、そして下線を付したNcoI部位を含み：ならびに3'プライマーは、  
以下の配列：

【0460】

【化9】

5'-CGCAAGCTTTTAGCCTGATTCTTTGTGGAC-3'(SEQ ID NO:9)

を有し、そして下線を付したHindIII部位を含む。

【0461】

制限部位は、細菌発現ベクターpQE60中の制限酵素部位に好都合であり、  
これらは、本実施例における細菌発現に用いられる。(Qiagen, Inc.  
9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)。  
pQE60は、アンピシリン抗生物質耐性(「Amp<sup>r</sup>」)をコードし、そ  
して細菌複製起点(「ori」)、IPTG誘導性プロモーター、およびリボゾ  
ーム結合部位(「RBS」)を含む。

【0462】

増幅したDR5 DNAおよびベクターpQE60の両方を、NcoIおよび  
HindIIIで消化し、次いで、消化したDNAをお互いに連結した。DR5

タンパク質DNAの制限化pQE60ベクターへの挿入は、ベクターのIPTG-誘導性プロモーターの下流にかつ作動可能に連結させて、そしてDR5タンパク質の翻訳のために適切に配置した開始AUGにインフレームで、DR5タンパク質コード領域を配置する。

#### 【0463】

連結混合物を、標準的な手順を使用して、コンピテントなE. Coli細胞に形質転換する。このような手順は、Sambrookら、Molecular Cloning: a Laboratory Manual、第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載されている。E. coli M15/rep4株(複数のコピーのプラスミドpREP4を含有し、lacリプレッサーを発現し、そしてカナマイシン耐性(「Kan<sup>r</sup>」)を与える)が、本明細書中に記載の例示的な実施例を実施することにおいて使用される。この株は、DR5タンパク質の発現に適した多くのうちの唯一の1つであり、Qiagen(前出)から市販されている。

#### 【0464】

形質転換体は、アンピシリンおよびカナマイシンの存在下におけるLBプレート上で増殖するそれらの能力によって同定される。プラスミドDNAは耐性コロニーから単離され、そしてクローン化DNAの正体は制限分析、PCR、およびDNA配列決定によって確認される。

#### 【0465】

所望の構築物を含有するクローンを、アンピシリン(100 µg/ml)およびカナマイシン(25 µg/ml)の両方を補充したLB培地中での液体培養において、一晚(「O/N」)増殖させる。このO/N培養物を、約1:100~1:250の希釈で多くの培養物を接種するために使用する。細胞を、600 nmでの光学密度(「OD600」)が0.4と0.6との間になるまで増殖させる。次いで、イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(「IPTG」)を最終濃度1 mMまで添加し、lacIリプレッサーを不活性化することにより、lacリプレッサー感受性プロモーターからの転写を誘導する。細胞を、続け

てさらに3～4時間インキュベートする。

【0466】

次いで、細胞を、標準的な方法を使用して、遠心分離により採取し、そして破壊する。封入体を破壊細胞から慣用的な採集技術を使用して精製し、そしてタンパク質を封入体から8M尿素に可溶化する。可溶化タンパク質を含有する8M尿素溶液を、2×リン酸緩衝化生理食塩水(「PBS」)中でPD-10カラムに通し、それにより尿素を除去し、緩衝液を交換し、そしてタンパク質を再折畳みさせる。このタンパク質をクロマトグラフィーのさらなる段階によって精製し、エンドトキシンを除去する。次いで、これを滅菌濾過する。滅菌濾過されたタンパク質調製物を、95 µg/mlの濃度で2×PBS中に保存する。

【0467】

(実施例2)

(哺乳動物細胞における発現)

代表的な哺乳動物発現ベクターは、プロモーターエレメント(mRNAの転写の開始を媒介する)、タンパク質コード配列、ならびに転写の終結および転写物のポリアデニル化に必要なシグナルを含む。さらなるエレメントとしては、エンハンサー、Kozak配列、ならびにRNAスプライシングのためのドナー部位およびアクセプター部位に隣接する介在配列が挙げられる。非常に効率的な転写を、SV40由来の初期および後期プロモーター、レトロウイルス由来の長末端反復(LTR)(例えば、RSV、HTLVI、HIVI)ならびにサイトメガロウイルス(CMV)の初期プロモーターを用いて達成し得る。しかし、細胞性エレメントもまた使用され得る(例えば、ヒトアクチンプロモーター)。本発明の実施における使用に適切な発現ベクターとしては、例えば、pSVLおよびpMSG(Pharmacia, Uppsala, Sweden)、pRSVcat(ATCC 37152)、pSV2dhfr(ATCC 37146)、ならびにpBC12MI(ATCC 67109)のようなベクターが挙げられる。使用され得る哺乳動物宿主細胞としては、ヒトHeLa細胞、293細胞、H9細胞およびJurkat細胞、マウスNIH3T3細胞およびC127細胞、Cos1細胞、Cos7細胞およびCV1細胞、ウズラQC1-3細胞、マ

ウスL細胞、ならびにチャイニーズハムスター卵巣（CHO）-細胞が挙げられる。

【0468】

あるいは、目的の遺伝子は、染色体に組み込まれるその遺伝子を含む安定な細胞株において発現され得る。選択マーカー（例えば、dhfr、gpt、ネオマイシン、ハイグロマイシン）との同時トランスフェクションは、トランスフェクトされた細胞の同定および単離を可能にする。

【0469】

トランスフェクトされた遺伝子はまた、増幅されて大量のコードされたタンパク質を発現し得る。DHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）マーカーは、目的の遺伝子の数百または数千ものコピーを有する細胞株を開発するのに有用である。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ（GS）である（Murphyら、Biochem J. 227:277-279（1991）；Bebbingtonら、Bio/Technology 10:169-175（1992））。これらのマーカーを使用して、哺乳動物細胞を選択培地において増殖させ、そして最も高い耐性を有する細胞を選択する。これらの細胞株は染色体に組み込まれた増幅された遺伝子を含む。チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は、タンパク質の産生にしばしば使用される。

【0470】

発現ベクターpC1およびpC4は、ラウス肉腫ウイルスの強力なプロモーター（LTR）（Cullenら、Molecular and Cellular Biology, 438-447（1985年3月））およびCMV-エンハンサーのフラグメント（Boshartら、Cell 41:521-530（1985））を含む。複数のクローニング部位（例えば、制限酵素切断部位BamHI、XbaI、およびAsp718を有する）は、目的の遺伝子のクローニングを容易にする。ベクターはさらに、ラットプレプロインシュリン遺伝子の3'イントロン、ポリアデニル化、および終結シグナルを含む。

【0471】

（クローニングおよびCHO細胞における発現）

ベクター pC4 を、DR5 ポリペプチドの発現のために使用する。プラスミド pC4 は、プラスミド pSV2-dhfr (ATCC 受託番号 37146) の誘導体である。このプラスミドは、SV40 初期プロモーターの制御下で、マウス DHFR 遺伝子を含む。これらのプラスミドでトランスフェクトされるジヒドロ葉酸活性を欠如するチャイニーズハムスター卵巣細胞または他の細胞は、化学療法剤メトトレキサート (MTX) を補充した選択培地 ( マイナス MEM、Life Technologies ) 中で細胞を増殖させることによって選択され得る。メトトレキサート (MTX) に耐性である細胞における DHFR 遺伝子の増幅は、よく考証されている (例えば、Alt, F.W., Kellems, R.M., Bertino, J.R. および Schimke, R.T., J. Biol. Chem. 253: 1357 - 1370 (1978); Hamlin, J.L. および Ma, C., Biochem. et Biophys. Acta, 1097: 107 - 143 (1990); Page, M.J. および Sydenham, M.A. 1991, Biotechnology 9: 64 - 68 (1991) を参照のこと)。漸増濃度の MTX における細胞増殖は、DHFR 遺伝子の増幅の結果として、標的酵素 DHFR を過剰産生することによって薬物への耐性を生じる。第2の遺伝子が DHFR 遺伝子に連結される場合、通常、同時増幅され、そして過剰発現される。増幅した遺伝子の 1,000 を超えるコピーを有する細胞株を開発するためにこのアプローチを使用し得ることは、当該分野において公知である。続いて、メトトレキサートが取り除かれる場合、宿主細胞の 1 つ以上の染色体に組み込まれた増幅遺伝子を含む細胞株が得られる。

#### 【0472】

プラスミド pC4 は、目的の遺伝子の発現のために、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復 (LTR) の強力なプロモーター (Cullen ら、Molecular and Cellular Biology 5: 438 - 447 (1985年3月))、およびヒトサイトメガロウイルス (CMV) の前初期遺伝子のエンハンサーから単離されたフラグメント (Boshart ら、Cell 41: 521 - 530 (1985)) を含む。プロモーターの下流には、遺伝子の組み込みを可能にする以下の単一の制限酵素切断部位、BamHI、XbaI およ

びAsp718が存在する。これらのクローニング部位の後ろに、プラスミドは、ラットプレプロインスリン遺伝子の3'イントロンおよびポリアデニル化部位を含む。他の高効率プロモーターもまた、発現のために使用され得る(例えば、ヒトアクチンプロモーター、SV40初期もしくは後期プロモーター、または他のレトロウイルス(例えば、HIVおよびHTLVI)由来の長末端反復)。ClontechのTet-OffおよびTet-On遺伝子発現系ならびに同様の系は、哺乳動物細胞において調節された方法でDR5ポリペプチドを発現するために使用され得る(Gossen, M., およびBujard, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551(1992))。mRNAのポリアデニル化のために、他のシグナル(例えば、ヒト成長ホルモン由来またはグロビン遺伝子由来)も同様に使用され得る。

#### 【0473】

染色体に組み込まれた目的の遺伝子を保有する安定な細胞株もまた、選択マーカー(例えば、gpt、G418、またはヒグロマイシン)と同時トランスフェクションする際に選択し得る。開始時に1つより多い選択マーカー(例えば、G418およびメトトレキサート)を使用することは有利である。

#### 【0474】

プラスミドpC4を制限酵素BamHIで消化し、次いでウシ腸ホスフェートを使用して、当該分野で公知の手順により脱リン酸化する。次いで、ベクターを1%アガロースゲルから単離する。

#### 【0475】

完全なポリペプチドをコードするDNA配列を、遺伝子の所望の部分の5'および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅する。下線を付したBamHI部位、Kozak配列、およびAUG開始コドンを含む5'プライマーは、以下の配列を有する：

5' - CGC GGATCC GCC ATCATGGAACAACGGGGACAGAAC - 3' (配列番号10)。

下線を付したAsp718部位を含む3'プライマーは、以下の配列を有する：

5' - CGC GGTACC TTAGGACATGGCAGAGTC - 3' (配列

番号11)。

【0476】

増幅されたフラグメントを、エンドヌクレアーゼBamHIおよびAsp718で消化し、次いで、1%アガロースゲル上で再び精製する。次いで、単離したフラグメントおよび脱リン酸化したベクターを、T4 DNAリガーゼで連結する。次いで、E. coli HB101またはXL-1 Blue細胞を形質転換し、そしてプラスミドpC4に挿入したフラグメントを含有する細菌を、例えば、制限酵素分析を使用して同定する。

【0477】

活性DHFR遺伝子を欠損するチャイニーズハムスター卵巣細胞をトランスフェクションのために使用する。5 µgの発現プラスミドpC4を、リポフェクション法(Felgnerら、前出)を使用して、0.5 µgのプラスミドpSVneoと同時トランスフェクトする。プラスミドpSV2-neoは、優性選択マーカー(G418を含む一群の抗生物質に対する耐性を付与する酵素をコードするTn5由来のneo遺伝子)を含む。細胞を、1 mg/mlのG418を補充したマイナスMEMに播種する。2日後、細胞をトリプシン処理し、そして10、25、または50 ng/mlのメトトレキサートおよび1 mg/ml G418を補充したマイナスMEM中のハイブリドーマクローニングプレート(Greiner, Germany)に播種する。約10~14日後、単一のクローンをトリプシン処理し、次いで異なる濃度のメトトレキサート(50 nM、100 nM、200 nM、400 nM、800 nM)を用いて、6ウェルペトリ皿または10 mlフラスコに播種する。次いで、最高濃度のメトトレキサートで増殖するクローンを、さらに高濃度のメトトレキサート(1 µM、2 µM、5 µM、10 mM、20 mM)を含む新たな6ウェルプレートに移す。同じ手順を、100~200 µMの濃度で増殖するクローンが得られるまで繰り返す。所望の遺伝子産物の発現を、例えば、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットによって、または逆相HPLC分析によって分析する。

【0478】

(COS細胞でのクローニングおよび発現)

発現プラスミド pDR5-HA を、DR5 タンパク質の可溶性細胞外ドメインをコードする cDNA を、発現ベクター p cDNA I / Amp または p cDNA III (Invitrogen, Inc. から入手可能) 中にクローニングすることにより作製する。発現ベクター p cDNA I / amp は以下を含む：(1) E. coli および他の原核生物細胞での増殖に有効な E. coli 複製起点；(2) プラスミド含有原核生物細胞の選択のためのアンピシリン耐性遺伝子；(3) 真核生物細胞での増殖のための SV40 複製起点；(4) cDNA が都合良く CMV プロモーターの発現制御下に置かれ、そしてポリリンカー中の制限部位により SV40 イントロンおよびポリアデニル化シグナルに作動可能に連結し得るように配置された、CMV プロモーター、ポリリンカー、SV40、およびポリアデニル化シグナル。その 3' 末端にインフレームで融合した DR5 ポリペプチドの細胞外ドメインおよび HA タグをコードする DNA フラグメントを、組換えタンパク質発現が CMV プロモーターによって指向されるように、ベクターのポリリンカー領域にクローニングする。HA タグは、Wilson ら、Cell 37: 767 (1984) により記載されるインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する。標的タンパク質への HA タグの融合により、HA エピトープを認識する抗体を用いて組換えタンパク質の検出と回収が容易になる。

#### 【0479】

プラスミド構築ストラテジーは、以下の通りである。寄託プラスミドの DR5 cDNA を、E. coli での DR5 の発現のためのベクター構築について上で詳しく記載した都合の良い制限部位を含むプライマーを用いて増幅する。

#### 【0480】

発現された DR5 の検出、精製、および特徴付けを容易にするために、プライマーの 1 つは、上記のように赤血球凝集素タグ(「HA タグ」)を含む。

#### 【0481】

好適なプライマーとしては、この実施例で使用される以下のものがあげられる。下線の BamHI 部位を含む 5' プライマーは、以下の配列を有する：5' - CGC GGATCC GCC ATCATGGAACAACGGGGACAGAAC

- 3' (配列番号10)。下線を付したAsp718制限配列を含む3' プライマーは、以下の配列を有する：5' - CGCGGTACCTTAGCCTGAT TCTTTTGGAC - 3' (配列番号12)。

#### 【0482】

PCR増幅DNAフラグメント、およびベクター、pcDNA1/Ampを、BamHIおよびAsp718で消化し、次いで連結する。連結混合物を、E. coli株SURE (Stratagene Cloning Systems、11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037から入手可能) に形質転換し、形質転換した培養物をアンピシリン培地プレートにプレートし、次いでこれをインキュベートしてアンピシリン耐性コロニーを増殖させる。プラスミドDNAを耐性コロニーから単離し、そして制限分析またはその他の手段により、DR5ポリペプチドの細胞外ドメインをコードするフラグメントの存在について試験する。

#### 【0483】

組換えDR5の発現のために、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: a Laboratory Manual、Cold Spring Laboratory Press、Cold Spring Harbor, New York (1989) に記載されるように、DEAE-DEXTRANを用いて、上述のように、COS細胞を発現ベクターでトランスフェクトする。細胞を、このベクターによるDR5の発現の条件下でインキュベートする。

#### 【0484】

DR5-HA融合タンパク質の発現を、例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual、第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, New York (1988) に記載の方法を用いて、放射標識および免疫沈降法により検出する。この目的のため、トランスフェクションの2日後、細胞を<sup>35</sup>S-システイン含有培地で8時間インキュベートすることにより標識する。上述のWilsonらにより記載されるように、細胞お

よび培地を回収し、そして細胞を洗浄し、そして界面活性剤含有RIP A緩衝液：150mM NaCl、1%NP-40、0.1%SDS、1% NP-40、0.5%DOC、50mM TRIS、pH7.5で溶解する。タンパク質を、HA特異的モノクローナル抗体を用い、細胞溶解物および培養培地から沈殿させる。次いで、沈殿させたタンパク質を、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーにより分析する。期待されるサイズの発現産物は細胞溶解物中に見いだされ、ネガティブコントロールには見いだされない。

#### 【0485】

この実施例での発現に使用するプライマーセットは、この実施例でCHO発現について使用するpC4、この実施例でのCOS発現についてのpcDNA1/Amp、および以下の実施例でのバキュロウイルス発現について使用するpA2と適合性である。従って、例えば、CHO発現について増幅された完全なDR5コードフラグメントはまた、COS発現についてのpcDNA1/Ampまたはバキュロウイルス発現についてのpA2に連結され得る。

#### 【0486】

(実施例3)

(DR5のタンパク質融合物)

本発明のDR5融合タンパク質は、必要に応じて、他のタンパク質に融合され得る。これらの融合タンパク質は、種々の適用に対して有用であり得る。例えば、DR5ポリペプチドのHisタグ、HAタグ、プロテインA、IgGドメイン、およびマルトース結合タンパク質への融合は、精製を容易にする。(EPA 394, 827; Trauneckerら、Nature 331:84-86(1988)を参照のこと)。同様に、IgG-1、IgG-3、およびアルブミンへの融合は、インビボでの半減期を増加させる。DR5ポリペプチドに融合された核局限化シグナルは、タンパク質を特定の細胞内位置に標的化し得、一方で、共有結合ヘテロダイマーまたはホモダイマーは、融合タンパク質の活性を増加し得るか、または減少し得る。融合タンパク質はまた、1より多い機能を有するキメラ分子を生成し得る。最後に、融合タンパク質は、非融合のタンパク質と比較して融合タンパク質の溶解性および/または安定性を増加し得る。上記の

融合タンパク質の型の全ては、当該分野で公知の技術を使用して、あるいは以下のプロトコル（これは、ポリペプチドのI g G分子への融合を概説する）を使用するか、または慣用的に改変することによって、作製され得る。

【0487】

簡潔に、I g G分子のヒトF c部分は、配列番号13に記載される配列の5'末端および3'末端にわたるプライマーを使用して、PCR増幅され得る。これらのプライマーはまた、好ましくは、発現ベクター（好ましくは、哺乳動物発現ベクター）へのクローニングを容易にする好都合な制限酵素部位を含む。

【0488】

例えば、pC4（寄託番号209646）発現ベクターが使用される場合、ヒトF c部分は、BamHIクローニング部位に連結され得る。3' BamHI部位は破壊されるべきであることに注意すべきである。次に、ヒトF c部分を含むベクターは、BamHIで再制限酵素切断され、ベクターを線状化し、そして、実施例1に記載のPCRプロトコルにより単離されたDR5ポリヌクレオチドを、このBamHI部位に連結する。このポリヌクレオチドは、終止コドンなしでクローニングされ、さもなければ、融合タンパク質は、産生されないことに注意すべきである。

【0489】

天然のシグナル配列を使用して、分泌タンパク質を産生する場合、pC4は、第二のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、天然のシグナル配列が使用されない場合、ベクターは、異種シグナル配列を含むために改変され得る。（例えば、WO 96/34891を参照のこと）。

【0490】

（実施例4）

（バキュロウイルス発現系におけるDR5の可溶性細胞外ドメインのクローニングおよび発現）

この例示的な実施例において、プラスミドシャトルベクターpA2を使用して、完全なDR5タンパク質をコードするcDNA（その天然に付随するシグナル配列を含む）を、バキュロウイルスへ挿入し、標準的な方法（例えば、Summ

ersら、A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987) に記載される方法) を使用して、DR5タンパク質を発現させる。この発現ベクターは、Autographa californica核多角体病ウイルス(ACMNPV)の強力なポリヘドロンプロモーター、続いて都合の良い制限部位を含む。組換えウイルスの平易な選択のために、プラスミドは、同じ方向で、弱いDrosophilaプロモーターの制御下で、E. coli由来のガラクトシダーゼ遺伝子、続いて、ポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む。挿入遺伝子は、クローニングされたポリヌクレオチドを発現する生存ウイルスを生成するために、野生型ウイルスのDNAとの細胞媒介性相同組換えのためのウイルス配列を両側に隣接させている。

#### 【0491】

当業者に容易に理解されるように、構築物が転写、翻訳、分泌などのための適切に配置されたシグナル(例えば、インフレームのAUGおよび必要ならばシグナルペプチド)を提供する限り、多くの他のバキュロウイルスベクター(例えば、pAc373、pVL941、およびpAcIMI)が、pA2の代わりに使用され得る。このようなベクターは、例えば、Luckowら、Virology 170:31-39(1989)に記載される。

#### 【0492】

寄託されたプラスミド(ATCC番号97920)のDR5タンパク質の可溶性細胞外ドメインをコードするcDNA配列を、この遺伝子の5'配列および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅する。

#### 【0493】

DR5に対する5'プライマーは、下線を付したBamHI制限酵素部位を含む、配列5'CGCGGATCCGCCATCATGGAACAACGGGGA CAGAAC-3'(配列番号10)を有する。発現ベクター中に挿入されて、以下に記載のように、DR5をコードする増幅されたフラグメントの5'末端は

、効率的な切断シグナルペプチドを提供する。真核生物細胞における翻訳の開始のための効率的なシグナルは、Kozak, M., J. Mol. Biol. 196: 947-950 (1987)に記載されるように、構築物のベクター部分に適切に配置される。

【0494】

DR5についての3'プライマーは、下線を付したAsp718制限、続いて図1中のDR5ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド、続いて終止コドンを含む配列5' - CGCGGTACCTTAGCCTGATTCTTTGTGGAC - 3' (配列番号12)を有する。

【0495】

増幅されたフラグメントを、市販のキット(「Geneclean」BIO 101 Inc., La Jolla, Ca)を用いて1%アガロースゲルから単離する。次いで、このフラグメントを、BamHIおよびAsp718で消化し、そして再度1%アガロースゲル上で精製する。このフラグメントを「F1」と命名する。

【0496】

プラスミドを、制限酵素BamHIおよびAsp718で消化し、そして必要に応じて、当該分野で公知の日常的な手順を用いて、仔ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸化し得る。次いで、このDNAを市販のキット(「Geneclean」BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.)を用いて1%アガロースゲルから単離する。このベクターDNAを本明細書中で「V1」と命名する。

【0497】

フラグメントF1と脱リン酸化プラスミドV1とを、T4 DNAリガーゼで連結する。E. coli HB101細胞またはXL-1 Blue細胞(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)のような他の適切なE. coli宿主を、連結混合物で形質転換し、そして培養プレートに塗布する。ヒトDR5を有するプラスミドを含む細菌を、PCR法を用いて同定する。このPCR法では、この遺伝子を増幅するために使用される

プライマーの一つはDR5配列に指向され、そして第2のプライマーは、十分にベクター内に由来し、その結果、DR5遺伝子フラグメントを含むそれらの細菌コロニーのみがDNAの増幅を示す。クローニングされたフラグメントの配列を、DNA配列決定によって確認する。このプラスミドを、本明細書中で、pBac DR5と命名する。

#### 【0498】

5 µgのプラスミドpBac DR5を、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417(1987)によって記載されるリポフェクチン法を用いて、1.0 µgの市販の線状化バキュロウイルスDNA(「BaculoGold™ baculovirus DNA」, Pharmingen, San Diego, CA.)とともに同時トランスフェクトする。1 µgのBaculoGold™ウイルスDNAおよび5 µgのプラスミドpBac DR5を、50 µlの無血清グレース培地(Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD)を含むマイクロタイタープレートの無菌ウェル中で混合する。その後、10 µlのリポフェクチンおよび90 µlのグレース培地を添加し、混合し、そして室温にて15分間インキュベートする。次いで、このトランスフェクション混合物を、1 mlの無血清グレース培地を有する35 mm組織培養プレート内に播種されたSf9昆虫細胞(ATCC CRL 1711)に滴下する。プレートを、前後に揺らして新たに添加された溶液を混合する。次いで、プレートを27 °Cで5時間インキュベートする。5時間後、トランスフェクション溶液をプレートから除去し、そして10%ウシ胎仔血清を補充した1 mlのグレース昆虫培地を添加する。プレートをインキュベーターに戻し、そして培養を27 °Cで4日間続ける。

#### 【0499】

4日後、上清を回収し、そしてSummersおよびSmith(前出)に記載されるようにプラークアッセイを行う。「Blue Gal」(Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD)を有するアガロースゲルを、青く染色されたプラークを産生するgal発現クローンの

容易な同定および単離を可能にするために用いる。(このタイプの「ブランクアッセイ」の詳細な説明はまた、Life Technologies Inc.、Gaithersburg, MDによって配布される昆虫細胞培養およびバキュロウイルス学のための使用者ガイド(第9~10頁)においても見い出され得る)。適切なインキュベーションの後、青く染色されたブランクを、マイクロピペッター(例えば、エッペンドルフ)のチップで拾う。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、200  $\mu$ lのグレース培地を含む微小遠心管中に再懸濁する。そして、組換えバキュロウイルスを含む懸濁液を用いて、35mmディッシュに播種された昆虫 Sf 9細胞に感染させる。4日後、これらの培養ディッシュの上清を回収し、次いでそれらを4℃で保存する。この組換えウイルスをV-DR5と称する。

#### 【0500】

DR5遺伝子の発現を確認するために、Sf9細胞を、10%熱不活化FBSを補充したグレース培地中で増殖させる。細胞を、約2(約1~約3)の感染多重度(「MOI」)にて組換えバキュロウイルスV-DR5で感染させる。6時間後、その培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを除いたSF900 II培地(Life Technologies Inc., Gaithersburg, MDから入手可能)に置き換える。放射性標識されたタンパク質が所望される場合、42時間後、5  $\mu$ Ciの<sup>35</sup>S-メチオニンおよび5  $\mu$ Ciの<sup>35</sup>S-システイン(Amershamから入手可能)を添加する。細胞をさらに16時間インキュベートし、次いで細胞を遠心分離により収集する。上清中のタンパク質ならびに細胞内タンパク質をSDS-PAGE、続いて(放射性標識されていれば)オートラジオグラフィーにより分析する。精製タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列の微小配列決定を用いて、成熟タンパク質のアミノ末端配列を決定し得、従って分泌シグナルペプチドの切断点および長さを決定し得る。

#### 【0501】

(実施例5)

(哺乳動物細胞におけるDR5誘導アポトーシス)

Fas/APO-1およびTNFR-1の哺乳動物細胞における過剰発現は、

レセプター活性化を模倣する (M. Muzioら、Cell 85:817-827 (1996); M. P. Boldinら、Cell 85:803-815 (1996))。従って、この系を、アポトーシスの誘導におけるDR5の機能的役割を研究するために利用する。この実施例は、MCF7ヒト乳ガン細胞およびヒト類上皮ガン (HeLa) 細胞の両方において、DR5の過剰発現がアポトーシスを誘導したことを実証する。

### 【0502】

#### (実験の設計)

細胞死アッセイを、本質的に以前に記載されるように行った (A. M. Chinnaiyanら、Cell 81:505-12 (1995); M. P. Boldinら、J. Biol Chem 270:7795-8 (1995); F. C. Kischkelら、EMBO 14:5579-5588 (1995); A. M. Chinnaiyanら、J Biol Chem 271:4961-4965 (1996))。簡単には、MCF-7ヒト乳ガンクローン細胞株およびHeLa細胞を、ベクター、DR5、DR5((52-411)、またはTNFR-1と、ガラクトシダーゼレポーター構築物と一緒に同時トランスフェクトした。

### 【0503】

MCF7およびHeLa細胞を、リポフェクタミン手順 (GIBCO-BRL) を使用して、製造業者の指示に従ってトランスフェクトした。293細胞を、CaPO<sub>4</sub>沈澱を使用してトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、以前に記載のように (A. M. Chinnaiyanら、Cell 81:505-12 (1995); M. P. Boldinら、J Biol Chem 270:7795-8 (1995); F. C. Kischkelら、EMBO 14:5579-5588 (1995))、細胞を固定してX-Galで染色し、そして顕微鏡で観察した。図5に示すデータ (平均±SD) は、円形のアポトーシス細胞のパーセントを総ガラクトシダーゼポジティブ細胞の関数として表す (n=3)。DR5の過剰発現は、MCF7 (図5A) およびHeLa細胞 (図5B) の両方においてアポトーシスを誘導した。

## 【0504】

MCF7細胞をまた、z-VAD-fmk (20  $\mu$ l) (Enzyme Systems Products, Dublin, CA)の存在下で、DR5発現構築物でトランスフェクトするか、または3倍過剰のCrmA (M. Tewariら、J Biol Chem 270:3255-60 (1995))、もしくはFADD-DN発現構築物、もしくはベクター単独で同時トランスフェクトした。図5Cに示すデータは、DR5によって誘導されたアポトーシスが、カスパーゼインヒビターによって弱められるが、優性ネガティブFADDによっては弱められないことを示す。

## 【0505】

図5Dに示されるように、DR5は、FADDまたはTRADDとはインピボで会合しなかった。293細胞を、リン酸カルシウム沈澱を使用して、示された発現構築物とともに同時トランスフェクトした。トランスフェクションの後(40時間で)、細胞溶解物を調製し、そしてFlag M2抗体アフィニティゲル(ABI, Kodak)で免疫沈降させ、そしてFADDまたはmyc-タグ化TRADD(myc-TRADD)の存在を、FADDに対するポリクローナル抗体またはmycに対する西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)結合体化抗体(BMB)を用いる免疫ブロッティングによって検出した(Baker, S. J.ら、Oncogene 12:1 (1996); Chinnaiyan, A. M.ら、Science 274:990 (1996))。

## 【0506】

図5Eに示すように、FLICE2-DNは、DR5誘導アポトーシスをブロックする。293細胞を、DR5またはTNFR-1発現構築物と同時トランスフェクトし、そして示されたように4倍過剰のCrmA、FLICE-DN、FLICE2-DN、またはベクター単独とともに、ガラクトシダーゼの報告された構築物の存在下で同時トランスフェクトした。細胞を染色し、そして25~30時間後に試験した。

## 【0507】

(結果)

DR5の過剰発現は、MCF7ヒト乳ガン細胞(図5A)およびヒト類上皮ガン(HeLa)細胞(図5B)の両方において、アポトーシスを誘導した。トランスフェクトした細胞のほとんどは、アポトーシスを経験している細胞に特徴的な形態学的な変化(Earnshaw, W. C., Curr. Biol. 7: 337 (1995))を示し、円形になり濃縮されて、そしてディッシュから脱離した。死ドメインの欠失は、殺傷能力を消失させた。DR4と同様に、DR5誘導アポトーシスは、カスパーゼインヒビター、CrmAおよびz-VAD-fmkによってブロックされたが、優性ネガティブFADDは効果がなかった(図5C)。これと一致して、DR5はFADDおよびTRADDとインビボで相互作用しなかった(図5D)。新たに同定したFLICE様分子の優性ネガティブバージョン、FLICE2(Vincenz, Cら、J. Biol. Chem. 272: 6578 (1997))は、効率的にDR5誘導アポトーシスをブロックしたのに対し、優性ネガティブFLICEは、ブロックした条件下で部分的な効果を有するのみであった。TNFR-1は、アポトーシスを効率的に誘導した(図5E)。まとめると、証拠は、DR5が、FLICE2および下流のカプラーゼの活性化を包含するアポトーシスプログラムに参与しているが、FADDとは独立であることを示唆する。

#### 【0508】

(実施例6: DR5の細胞外ドメインは、細胞傷害性リガンドTRAILに結合し、そしてTRAIL誘導性アポトーシスをブロックする)

上記で議論されるように、TRAIL/Apo2Lは、腫瘍壊死因子(TNF)リガンドファミリーに属し、そしてその死ドメイン含有レセプターDR4が両方の細胞型において発現されるにもかかわらず、多くの形質転換細胞株の迅速な細胞死を誘導するが、正常組織の細胞死は誘導しない細胞傷害性リガンドである。この実施例は、本発明のレセプターDR5もまたTRAILに結合することを示す。

#### 【0509】

DR5およびDR4の細胞外リガンド結合システインリッチドメインの類似性を考慮して、本発明者らは、DR5もまたTRAILに結合すると理論を立てた

。このことを確認するために、DR5の可溶性細胞外リガンド結合ドメインを、ヒト免疫グロブリン(IgG)のFc部分に対する融合物として発現した。配列番号2におけるアミノ酸1~129をコードするcDNAをポリメラーゼ連鎖反応によって入手し、そしてヒトIgGのFc部分とのインフレームの融合を可能にする、改変されたpCMV1FLAGベクター中にクローン化した。

#### 【0510】

図6Aに示すように、DR5-Fcは、TRAILに特異的に結合するが、関連する細胞傷害性リガンドTNFには結合しなかった。この実験において、DR5、DR4、TRID、またはTNFR-1の細胞外ドメイン-Fcおよび対応するリガンドを調製し、そして結合アッセイをPanら、Science 276:111(1997)に記載されるように行った。それぞれのFc融合物を、プロテインGセファロースで沈澱させ、そして共沈した可溶性リガンドを、抗Flag(Babco)または抗myc-HRP(BMB)を用いたイムノブロットングによって検出した。図6Aの下のパネルは、結合アッセイにおいて存在するインプットFc融合物を示す。

#### 【0511】

さらに、DR5-Fcは、TRAILのアポトーシス誘導能をブロックした(図6B)。MCF7細胞を、等量のFc融合物またはFc単独の存在下で、可溶性TRAIL(200ng/ml)で処理した。6時間後、細胞を固定し、そしてPanら(同書)に記載されるように試験した。図6Bに示すデータ(平均±SD)は、計数される総核のうちのアポトーシス核の百分率である(n=4)。

#### 【0512】

最後に、DR5-Fcは、TNFR1-Fcが完全にTNF殺傷を消失させる条件下で、アポトーシスTNF誘導細胞死に対する効果を有さなかった(図6C)。MCF7細胞を、等量のFc融合物またはFc単独の存在下で、TNF(40ng/ml; Genentech, Inc.)で処理した。核を染色し、そして11~15時間後に試験した。

#### 【0513】

TRAILについてのレセプターとしてDR5を新たに同定したことは、TR

A I L 開始シグナル伝達の生物学にさらなる複雑性を加える。

【0514】

(実施例7：B細胞増殖および分化の刺激または阻害を検出するアッセイ)

機能的体液性免疫応答の生成は、B系列の細胞とそれらの微小環境との間に、可溶性のシグナル伝達および同族のシグナル伝達の両方を必要とする。シグナルは、正の刺激（B系列の細胞がプログラムされた発生を持続するようにさせる）、または負の刺激（細胞が現在の発生経路を停止させるように指示する）を伝え得る。現在までに、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-13、IL-14およびIL-15を含む、多数の刺激シグナルおよび阻害シグナルがB細胞応答性に影響を与えることが見出されている。興味深いことに、これらのシグナルはそれ自体は弱いエフェクターであるが、種々の補助刺激タンパク質と組み合わせさせて、B細胞集団中の活性化、増殖、分化、ホーミング、耐性、および死を誘導し得る。B細胞補助刺激タンパク質の最も研究されたクラスの1つがTNFスーパーファミリーである。このファミリー内で、CD40、CD27およびCD30は、そのそれぞれのリガンドである、CD154、CD70およびCD153と共に種々の免疫応答を調節することが見出されている。これらのB細胞集団およびそれらの前駆細胞の増殖および分化の検出および/または観察を可能にするアッセイは、種々のタンパク質がこれらのB細胞集団に対して増殖および分化に関して有し得る効果を決定する際に価値のあるツールである。以下に列挙するのは、B細胞集団およびそれらの前駆体の分化、増殖、または阻害の検出を可能にするように設計された2つのアッセイである。

【0515】

(実験手順)

(インビトロアッセイ) - 精製したDR5タンパク質またはその短縮型を、B細胞集団およびそれらの前駆体において活性化、増殖、分化もしくは阻害および/または死を誘導する能力について評価する。精製したヒト扁桃B細胞へのDR5タンパク質の活性(0.1~10,000 ng/mLの用量範囲にわたって定性的に測定した)を、標準的なBリンパ球副刺激アッセイにおいて評価する。このアッセイでは、精製した扁桃B細胞を、プライミング因子として、ホルマリン

固定 *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC)、または固定化した抗ヒト IgM 抗体のいずれかの存在下で培養する。IL-2 および IL-15 のような第 2 のシグナルは、トリチウム化チミジン取り込みにより測定した場合、SAC および IgM 架橋と相乗作用して B 細胞増殖を誘発する。新規な相乗作用因子を、このアッセイを用いて容易に同定し得る。このアッセイは、CD3 陽性細胞の磁気ビーズ (MACS) 枯濁によりヒト扁桃 B 細胞を単離する工程を包含する。得られる細胞集団は、CD45R (B220) の発現により評価した場合、95% より大きい B 細胞である。種々の希釈のそれぞれのサンプルを 96 ウェルプレートの個々のウェルに配置し、ここへ、培養培地 (10% FBS、 $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -ME、100 U/ml ペニシリン、10  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、および  $10^{-5}$  希釈の SAC を含有する RPMI 1640) 中で懸濁した、総量 150  $\mu$ l 中の、 $10^5$  個の B 細胞を添加する。増殖または阻害を、因子の添加後 72 時間から開始して、 $^3$ H-チミジン (6.7 Ci/mM) で 20 h パルス (1  $\mu$  Ci / ウェル) により定量する。陽性コントロールおよび陰性コントロールは、それぞれ IL2 および培地である。

#### 【0516】

(インビボアッセイ) - BALB/c マウスに、緩衝液のみ、または本発明の 2 mg / Kg の DR5 タンパク質もしくはその短縮形態を、1 日 2 回注射 (腹腔内) する。マウスにこの処置を 4 日間連続して与え、この時点でそれらを屠殺し、そして分析のために種々の組織および血清を収集した。正常な脾臓および DR5 タンパク質で処理した脾臓由来の H & E 切片の比較により、脾臓細胞に対する DR5 タンパク質の活性の結果、例えば、動脈周囲リンパ性鞘の拡散および / または赤色脾髄領域の有核の細胞充実性の顕著な増加 (これは、B 細胞集団の分化および増殖の活性化を示し得る) が確認される。B 細胞マーカーである、抗 CD45R (B220) を用いる免疫組織化学的研究を用いて、脾臓細胞に対する任意の生理的な変化 (例えば、脾臓組織崩壊) が、樹立された T 細胞領域に浸潤する漠然と規定された B 細胞帯内の B 細胞提示の増加に起因するか否かを決定する。

#### 【0517】

DR5タンパク質で処置したマウス由来の脾臓のフローサイトメトリー分析を用いて、このDR5タンパク質が、ThB+であるCD45R(B220)du11 B細胞の比を、コントロールマウスで観察される比よりも特異的に増加させるか否かを示す。

【0518】

同様に、増加した成熟B細胞のインビボでの提示の推定される結果は、血清Ig力価の相対的な増加である。従って、血清でのIgMおよびIgAのレベルを緩衝液処置マウスとDR5タンパク質処置マウスとの間で比較する。

【0519】

本実施例において記載する試験は、DR5タンパク質における活性を試験する。しかし、当業者は、DR5ポリヌクレオチド(例えば、遺伝子治療)、DR5のアゴニストおよび/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【0520】

(実施例8：T細胞増殖アッセイ)

CD3誘導性の増殖アッセイをPBMCで実行し、そして<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みにより測定する。このアッセイを以下のように実行する。96ウェルプレートを、CD3に対するmAb(HIT3a, Pharmingen)の100 μl/ウェル、またはアイソタイプが一致したコントロールmAb(B33.1)(0.05M 炭酸水素塩緩衝液、pH9.5中、1 μg/ml)で4で1晩、コートし、次いでPBSで3回洗浄する。PBMCをヒト末梢血から、F/H勾配遠心分離により単離し、そして種々の濃度のDR5タンパク質の存在下で、10%FCSおよびP/Sを含有するRPMI中、mAbでコートしたプレートの4連のウェル(5 × 10<sup>4</sup>/ウェル)に添加する(総量200 μl)。関連するタンパク質緩衝液および培地単独がコントロールである。37で48時間後、プレートを1000 rpmで2分間回転させ、そして100 μlの上清を取り出し、そして、増殖への効果が観察される場合、IL-2(または他のサイトカイン)の測定のために-20で貯蔵した。ウェルに0.5 μCiの<sup>3</sup>H-チミジンを含有する100 μlの培地を補充し、そして37で18~24時間培

養する。ウェルを収集し、そして<sup>3</sup>H - チミジンの取り込みを増殖の指標として用いた。抗CD3単独が増殖の陽性コントロールである。IL - 2 ( 100 U / ml ) をまた、増殖を増強するコントロールとして用いる。T細胞の増殖を誘導しないコントロール抗体をDR5タンパク質の効果についての陰性コントロールとして用いる。

#### 【0521】

本実施例において記載される研究は、DR5タンパク質の活性を試験する。しかし、当業者は、DR5ポリヌクレオチド(例えば、遺伝子治療)、DR5のアゴニストおよび/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

#### 【0522】

(実施例9：MHCクラスII、補助刺激分子および接着分子の発現、ならびに単球および単球由来ヒト樹状細胞の細胞分化へのDR5の効果)

樹状細胞を末梢血において見出される増殖前駆体の増殖により生成する：接着性PBMCまたは単離した単球画分を、GM - CSF ( 50 ng / ml ) およびIL - 4 ( 20 ng / ml ) とともに7 ~ 10日間培養する。これらの樹状細胞は、未成熟細胞の特徴的表現型( CD 1、CD 80、CD 86、CD 40およびMHCクラスII抗原の発現)を有する。TNF - のような活性化因子での処理は、表面の表現型に迅速な変化( MHCクラスIおよびII、補助刺激分子および接着分子の発現の増加、FCRIIの下方制御、CD83の上方制御)を生じる。これらの変化は抗原提示能力の増加、および樹状細胞の機能的成熟と相関する。

#### 【0523】

表面抗原のFACS分析を以下の様に実施する。細胞を、漸増濃度のDR5またはLPS(陽性コントロール)で1 ~ 3日処理し、1%BSAおよび0.02mMアジ化ナトリウムを含有するPBSで洗浄し、次いで1:20希釈の適切なFITC標識モノクローナル抗体またはPE標識モノクローナル抗体とともに、4で30分間インキュベートする。さらなる洗浄後、標識した細胞をFACSscan(Becton Dickinson)でのフローサイトメトリーにより

分析する。

【0524】

(サイトカインの産生への効果)

樹状細胞により生成されるサイトカイン、特にIL-12は、T細胞依存性免疫応答の開始において重要である。IL-12は、Th1ヘルパーT細胞免疫応答の発達に強力に影響を与え、そして細胞傷害性T細胞機能およびNK細胞機能を誘導する。ELISAを用いて以下のようにIL-12放出を測定する。樹状細胞( $10^6/ml$ )を、漸増濃度のDR5で24時間処理する。LPS( $100ng/ml$ )を、陽性コントロールとして細胞培養物に添加する。次いで、細胞培養物からの上清を収集し、そして市販のELISAキット(例えば、R&D Systems(Minneapolis, MN))を用いてIL-12含量について分析する。キットに提供される標準的プロトコールを用いる。

【0525】

(MHCクラスII、補助刺激分子および接着分子の発現への効果)

細胞表面抗原の3つの主要ファミリー(接着分子、抗原提示に関与する分子、およびFcレセプター)が、単球上で同定され得る。MHCクラスII抗原および他の補助刺激分子(例えば、B7およびICAM-1)の発現の調節は、単球の抗原提示能力、およびT細胞活性化を誘導する能力に変化を生じ得る。Fcレセプターの発現増加は、単球細胞傷害性活性、サイトカイン放出および食菌作用の改善と相関し得る。

【0526】

FACS分析は、以下のように表面抗原を試験するために用いられる。単球を、漸増濃度のDR5またはLPS(陽性コントロール)で1~5日処理し、1%BSAおよび0.02mMアジ化ナトリウムを含有するPBSで洗浄し、次いで1:20希釈の適切なFITC標識モノクローナル抗体またはPE標識モノクローナル抗体とともに、4で30分間インキュベートする。さらなる洗浄後、標識した細胞をFACSscan(Becton Dickinson)でのフローサイトメトリーにより分析する。

【0527】

(単球活性化および/または生存の増加)

単球を活性化する(あるいは、不活化する)および/または単球の生存を増加させる(あるいは、単球の生存を低下させる)分子についてのアッセイは、当該分野で公知であり、そして本発明の分子が単球のインヒビターまたはアクチベーターとして機能するか否かを決定するために慣用的に適用され得る。DR5、DR5のアゴニストまたはアンタゴニストは、以下に記載の3つのアッセイを用いてスクリーニングされ得る。これらのアッセイのそれぞれについて、末梢血単核細胞(PBMC)を、Histopaque勾配(Sigma)を通じた遠心分離により、単一のドナー白血球パック(leukopack)(American Red Cross, Baltimore, MD)から精製する。単球を向流遠心性エルトリエーション(counterflow centrifugal elutriation)によりPBMCから単離する。

【0528】

(1. 単球生存アッセイ) ヒト末梢血単球は、血清または他の刺激の非存在下で培養した場合、次第に生存率が低下する。それらの死は、内部調節されたプロセス(アポトーシス)から生じる。活性化因子、例えばTNF- $\alpha$ の培養物への添加は、細胞の生存を劇的に改善し、そしてDNAの断片化を妨げる。ヨウ化プロピジウム(PI)染色を用いて、以下のようにアポトーシスを測定する。単球を、100 ng/mlのTNF- $\alpha$ の存在下(陰性コントロール)、および試験される種々の濃度の化合物の存在下で、ポリプロピレンチューブ中の無血清培地(陽性コントロール)中で、48時間培養する。細胞を、最終濃度5  $\mu$ g/mlでPIを含有するPBS中で $2 \times 10^6$ /mlの濃度に懸濁し、次いでFACSscan分析の前に5分間室温でインキュベートする。PI取り込みは、この実験パラダイムにおけるDNAの断片化と相関することを示している。

【0529】

(2. サイトカイン放出への影響) 単球/マクロファージの重要な機能は、刺激後のサイトカインの放出を通じた免疫系の他の細胞集団へのそれらの調節活性である。サイトカイン放出を測定するためのELISAは、以下のように実施する。ヒト単球を、 $5 \times 10^5$ 細胞/mlの密度で、漸増濃度のDR5とともに

、およびDR5が存在しない以外は同じ条件下で、インキュベートする。IL-12の産生については、この細胞を、DR5の存在下でIFN- $\gamma$  (100 U/ml)とともに1晩プライムする。次いで、LPS (10 ng/ml)を添加する。馴化培地を24時間後に収集し、そして使用するまで凍結保存する。次いで、TNF- $\alpha$ 、IL-10、MCP-1およびIL-8の測定を市販のELISAキット(例えば、R&D Systems Minneapolis, MN)を用い、そしてキットに提供される標準的プロトコールを適用して実施する。

#### 【0530】

(3. 酸化バースト(Oxidative burst)) 精製した単球を96ウェルプレートに $2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞/ウェルでプレートする。漸増濃度のDR5をこのウェルに、総量0.2 mlの培養培地(RPMI 1640 + 10% FCS、グルタミンおよび抗生物質)中で添加する。3日間のインキュベーション後、このプレートを遠心分離し、そして培地をウェルから除く。マクロファージの単層に、1ウェルあたり0.2 mlのフェノールレッド溶液(140 mM NaCl、10 mM リン酸カリウム緩衝液pH 7.0、5.5 mM デキストロース、0.56 mM フェノールレッドおよび19 U/mlのHRPO)を、刺激物質(200 nM PMA)とともに添加する。このプレートを37℃で2時間インキュベートし、そして1ウェルあたり20  $\mu$ lの1N NaOHを添加して反応を停止する。吸光度を610 nmで読み取る。マクロファージにより産生されるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の量を算出するため、既知のモル濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液の標準曲線をそれぞれの実験について実施する。

#### 【0531】

本実施例において記載される研究は、DR5タンパク質における活性を試験する。しかし、当業者は、DR5ポリヌクレオチド(例えば、遺伝子治療)、DR5のアゴニストおよび/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

#### 【0532】

(実施例10: 血管内皮細胞の増殖へのDR5の効果)

1日目に、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)を、4%ウシ胎仔血清(FBS

)、16ユニット/mlヘパリン、および50ユニット/ml内皮細胞増殖補充物(EGGS、Biotechnique, Inc.)を含有するM199培地中で、35mmシャーレあたり $2 \sim 5 \times 10^4$ 細胞の密度で播種する。2日目に、この培地を、10%FBS、8ユニット/mlヘパリンを含有するM199で置換する。配列番号2のDR5タンパク質および陽性コントロール(例えば、VEGFおよび塩基性FGF(bFGF))を種々の濃度で添加する。4日目および6日目に、培地を交換する。8日目に、Coulter Counterを用いて細胞数を決定する。

#### 【0533】

HUVEC細胞数の増加は、DR5が血管内皮細胞を増殖させ得ることを示す。

#### 【0534】

本実施例において記載される研究は、DR5タンパク質における活性を試験する。しかし、当業者は、DR5ポリヌクレオチドの活性(例えば、遺伝子治療)、DR5のアゴニストおよび/またはアンタゴニストを試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

#### 【0535】

(実施例11:抗体の産生)

(A.ハイブリドーマ技術)

本発明の抗体は、種々の方法によって調製され得る(Current Protocols, 第2章を参照のこと)。このような方法の1つの例として、DR5を発現する細胞は、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために動物に投与される。好ましい方法において、DR5タンパク質の調製物が調製され、そして精製されて、ネイティブの夾雑物を実質的に含まないようにする。次いで、このような調製物は、より大きな比活性のポリクローナル抗血清を生成するために動物に導入される。

#### 【0536】

タンパク質DR5に特異的なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を使用して調製され得る(Koehlerら、Nature 256:495(19

75) ; Koehlerら、Eur. J. Immunol. 6 : 511 (1976) ; Koehlerら、Eur. J. Immunol. 6 : 292 (1976) ; Hammerlingら : Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 563 - 681頁 (1981) )。一般に、動物 (好ましくは、マウス) を、DR5ポリペプチドで免疫するか、またはより好ましくは、分泌DR5ポリペプチド発現細胞で免疫する。このようなポリペプチド発現細胞は、任意の適切な組織培養培地 (好ましくは、10%ウシ胎仔血清 (約56 で非働化した) を補充し、そして約10g/lの非必須アミノ酸、約1,000U/mlのペニシリン、および約100μg/mlのストレプトマイシンを補充したアール改変イーグル培地) において培養され得る。

#### 【0537】

このようなマウスの脾細胞を抽出し、そして適切な骨髓腫細胞株と融合させる。任意の適切な骨髓腫細胞株は、本発明に従って用いられ得る ; しかし、ATCCから入手可能な親骨髓腫細胞株 (SP20) を用いることが好ましい。融合後、得られるハイブリドーマ細胞を、HAT培地において選択的に維持し、次いでWandsら (Gastroenterology 80 : 225 - 232 (1981) ) に記載されるように限界希釈によってクローニングする。次いで、このような選択によって得られるハイブリドーマ細胞を、DR5ポリペプチドに結合し得る抗体を分泌するクローンを同定するためにアッセイする。

#### 【0538】

あるいは、DR5ポリペプチドに結合し得るさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を使用して2段階の手順において生成し得る。このような方法は、抗体自体が抗原であり、それゆえ第2の抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用する。この方法に従って、タンパク質特異的抗体を使用して、動物 (好ましくは、マウス) を免疫する。次いで、このような動物の脾細胞を使用して、ハイブリドーマ細胞を産生する。そして、このハイブリドーマ細胞をスクリーニングして、DR5タンパク質特異的抗体に結合する能力が、DR5によってブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定する。このような抗体は、D

R5タンパク質特異的抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、そして動物を免疫してさらなるDR5タンパク質特異的抗体の形成を誘導するために使用され得る。

【0539】

ヒトにおける抗体のインビボ使用のために、抗体は、「ヒト化」される。このような抗体は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝子構築物を使用することによって産生され得る。キメラ抗体およびヒト化抗体を産生するための方法は当該分野で公知である（総説については、Morrisson, Science 229:1202(1985); Oiら、Bio Techniques 4:214(1986); Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Taniguchiら、EP 171496; Morrisonら、EP 173494; Neubergerら、WO 8601533; Robinsonら、WO 8702671; Boulianneら、Nature 312:643(1984); Neubergerら、Nature 314:268(1985)を参照のこと）。

【0540】

(B.scFvsのライブラリー由来のDR5に対する抗体フラグメントの単離)

ヒトPBLから単離された天然に存在するV遺伝子を、ドナーが曝露されても、されていなくてもよい本発明のポリペプチドに対する反応性を有する抗体フラグメントの大きいライブラリーに構築する（例えば、米国特許第5,885,793号（参考としてその全体が本明細書中に援用される））。

【0541】

(ライブラリーのレスキュー)

WO 92/01047に記載のように、ヒトPBLのRNAからscFvsのライブラリーを構築する。抗体フラグメントを提示するファージをレスキューするため、ファージミドを保有する約 $10^9$ 個のE.coliを用いて、50mlの2xTY(1%グルコースおよび100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する)(2xTY-AMP-GLU)を接種し、そして振盪しながら0.8のO.

D.まで増殖させる。この培養物の5 mlを用いて50 mlの2×TY-AMP-GLUに接種し、 $2 \times 10^8$  TUの 遺伝子3ヘルパー (M13 遺伝子III、WO92/01047を参照のこと) を添加し、そして培養物を振盪なしで37 で45分間インキュベートし、次いで振盪しながら37 で45分間インキュベートする。この培養物を10分間4000 r.p.m.で遠心分離し、そしてペレットを2リットルの2×TY (100 µg/mlアンピシリンおよび50 µg/mlカナマイシンを含有する) 中に再懸濁し、そして一晩増殖させる。ファージをWO92/01047に記載のように調製する。

#### 【0542】

M13 遺伝子IIIを以下のように調製する：M13 遺伝子IIIヘルパーファージは、遺伝子IIIタンパク質をコードしない。それゆえ、抗体フラグメントを提示するファージ (ファージミド) は、抗原に対するより大きい結合アビディティを有する。ファージ形態形成の間、野生型遺伝子IIIタンパク質を供給するpUC19誘導体を保有する細胞においてヘルパーファージを増殖させることにより、感染性M13 遺伝子III粒子を作製する。培養物を振盪なしで37 で1時間インキュベートし、次いで振盪しながら37 でさらに1時間インキュベートする。細胞をペレット化し (IEC-Centra 8, 400 r.p.m./分で10分間)、100 µg/mlのアンピシリンおよび25 µg/mlのカナマイシンを含有する2×TYブロス (2×TY-AMP-KAN) 300 ml中で再懸濁し、そして37 で振盪しながら一晩増殖させた。ファージ粒子を、2回のPEG沈殿 (Sambrookら、1990) により培養培地から精製および濃縮し、2 ml PBSに再懸濁し、そして0.45 µmのフィルター (Minisart NML; Sartorius) を通過させ、約 $10^{13}$  形質導入単位/ml (アンピシリン耐性クローン) の最終濃度を得る。

#### 【0543】

(ライブラリーのパニング)

Immunotubes (Nunc) を、本発明のポリペプチドの100 mg/mlまたは10 mg/mlのいずれかの4 mlを用いてPBS中で一晩コーティングする。チューブを2% Marvel-PBSを用いて37 で2時間プロ

ックし、次いでPBS中で3回洗浄する。約 $10^{13}$  TUのファージをそのチューブに適用し、そして、回転盤で上下に傾けながら室温で30分間インキュベートし、次いでさらに1.5時間静置しておく。チューブをPBS 0.1% Tween-20で10回、そしてPBSで10回洗浄する。1mlの100mMトリエチルアミンを添加し、そして回転盤上で15分間上下に回転させることによりファージを溶出し、その後この溶液を0.5mlの1.0M Tris-HCl, pH 7.4で直ちに中和する。次いで、溶出したファージを細菌とともに37℃で30分間インキュベートすることにより、ファージを用いて、10mlの対数増殖中期のE. coli TG1に感染させる。次いで、そのE. coliを1%グルコースおよび100 µg/mlアンピシリンを含有するTYEプレート上にプレーティングする。次いで、得られる細菌ライブラリーを、上記のようにM13遺伝子IIIヘルパーファージでレスキューし、引き続き回の選択のためのファージを調製する。次いで、このプロセスを、アフィニティー精製の全4回について反復し、3回目および4回目にはチューブ洗浄をPBS、0.1% Tween-20で20回、そしてPBSで20回に増加する。

#### 【0544】

(結合剤の特徴付け)

第3回目および4回目の選択から溶出したファージを用いて、E. coli HB 2151を感染させ、そして可溶性scFvをアッセイのために単一コロニーから生成する(Marksら、1991)。50mM炭酸水素塩、pH 9.6中の本発明のポリペプチドの10 µg/mlのいずれかでコーティングしたマイクロタイタープレートを用いてELISAを行う。ELISA中の陽性クローンをPCRフィンガープリンティング(例えば、WO92/01047を参照のこと)、次いで配列決定することによりさらに特徴付ける。

#### 【0545】

(実施例12: DR5遺伝子発現の組織分布)

ノーザンブロット分析を行って、とりわけSambrookら(前出)によって記載される方法を用いて、ヒト組織におけるDR5遺伝子発現を調べた。DR5タンパク質の全ヌクレオチド配列(配列番号1)を含むcDNAプローブを、

rediprime™ DNA標識システム (Amersham Life Science) を製造者の説明書に従って用いて<sup>32</sup>Pで標識した。標識後、プローブを、CHROMA SPIN-100™カラム (Clontech Laboratories, Inc.) を製造者のプロトコル番号PT1200-1に従って用いて精製した。次いで、精製した標識プローブを用いて、種々のヒト組織をDR5 mRNAについて調べた。

#### 【0546】

種々のヒト組織 (H) またはヒト免疫系組織 (IM) を含む複数組織のノーザン (MTN) プロットを、Clontech (Palo Alto, CA) から入手し、そしてExpressHyb™ハイブリダイゼーション溶液 (Clontech) を製造者のプロトコル番号PT1190-1に従って用いて標識プローブを用いて調べた。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、プロットをマウントし、そして-70℃にて一晩フィルムに曝した。このフィルムを標準的な手順に従って現像した。DR5の発現は、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、子宮、小腸、結腸、末梢白血球 (PBL)、リンパ節、骨髄および胎児肝臓で検出された。

#### 【0547】

DR5の発現もまた、以下の癌細胞株：HL-60 (前骨髄球性白血病、HeLa S3、K562 (慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia))、MOLT4 (リンパ芽球性白血病)、Raji (バーキットリンパ腫)、SW480 (結腸直腸腺癌)、A549 (肺癌腫)、およびG361 (黒色腫)) においてノーザンプロットにより評価し、そして試験した細胞株の全てにおいて検出した。

#### 【0548】

(実施例13：DR5遺伝子における変化を決定する方法)

目的の表現型 (例えば、疾患) を提示する家族全員または個々の患者からRNAを単離する。次いで、cDNAをこれらのRNAサンプルから当該分野で公知のプロトコルを使用して生成する (Sambrookを参照のこと)。次いで、このcDNAを、配列番号1における目的の領域を取り囲むプライマーを用いる

PCRのための鋳型として使用する。示唆されるPCR条件は、Sidransky, D.ら、Science 252:706(1991)に記載の緩衝溶液を使用する、95 で30秒間; 52~58 で60~120秒間; および70 で60~120秒間の35サイクルから構成される。

#### 【0549】

次いで、PCR産物を、SequiTherm Polymeraseを用い、それらの5'末端にT4ポリヌクレオチドキナーゼで標識したプライマーを使用して配列決定する。(Epicentre Technologies)。DR5の選択したエキソンのイントロン-エキソン境界もまた決定し、そしてゲノムPCR産物を分析してその結果を確認する。次いで、DR5において疑わしい変異を有するPCR産物をクローン化し、そして配列決定し、直接配列決定の結果を確認する。

#### 【0550】

DR5のPCR産物を、Holton, T. AおよびGraham, M. W.、Nucleic Acids Research, 19:1156(1991)に記載のようにTテールベクターにクローン化し、T7ポリメラーゼ(United States Biochemical)で配列決定する。罹患した個体を、罹患していない個体には存在しないDR5における変異により同定する。

#### 【0551】

ゲノム再配置もまた、DR5遺伝子における変化を決定する方法として観察される。当該分野で公知の技術を使用して単離したゲノムクローンを、ジゴキシゲニンデオキシ-ウリジン5'-三リン酸(Boehringer Mannheim)を用いてニックトランスレーションし、そしてJohnson, Cg.ら、Methods Cell Biol. 35:73-99(1991)に記載のようにFISHを行う。DR5ゲノムの遺伝子座への特異的ハイブリダイゼーションのために、大過剰のヒトcot-1 DNAを用いて標識プローブとのハイブリダイゼーションを行う。

#### 【0552】

染色体を、4, 6-ジアミノ-2-フェニリドールおよびヨウ化プロピジウム

で対比染色し、CバンドおよびRバンドの組み合わせを生成する。正確なマッピングのための整列イメージを、三重バンドフィルターセット (Chroma Technology, Brattleboro, VT) と冷却電荷結合素子カメラ (Photometrics, Tucson, AZ) および可変励起波長フィルターとを組み合わせ用いて得る。(Johnson, Cg.ら、Genet. Anal. Tech. Appl., 8:75 (1991))。I See Graphical Program Systemを使用して、イメージ収集、分析および染色体部分長測定を行う。(Inovision Corporation, Durham, NC)。DR5のゲノム領域の染色体変化(プローブによりハイブリダイズされる)を、挿入、欠失および転座として同定する。これらのDR5変化を関連疾患の診断マーカーとして使用する。

#### 【0553】

(実施例14: 生物学的サンプル中のDR5の異常レベルを検出する方法)

DR5ポリペプチドは生物学的サンプル中で検出され得、そしてDR5の上昇または低下が検出される場合、このポリペプチドは、特定の表現型についてのマーカーである。検出方法は数多くあり、そしてそれ故、当業者は以下のアッセイをそれらの特定の必要性に適合するように改変し得ることが理解される。

#### 【0554】

例えば、抗体サンドイッチELISAを使用して、サンプル中、好ましくは、生物学的サンプル中のDR5を検出する。マイクロタイタープレートのウェルを、最終濃度0.2~10 µg/mlでDR5に対して特異的な抗体でコーティングする。この抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであって、そして当該分野で公知の技術を使用して産生される。ウェルに対するDR5の非特異的結合が減少するように、このウェルをブロックする。

#### 【0555】

次に、コーティングしたウェルを、DR5含有サンプルを用いて室温で2時間を超えてインキュベートする。好ましくは、サンプルの段階希釈を使用して結果を確認すべきである。次に、プレートを脱イオン水または蒸留水で3回洗浄し、非結合DR5を除去する。

## 【0556】

次に、特異的抗体 - アルカリホスファターゼ結合体  $50 \mu\text{l}$  を  $25 \sim 400 \text{ ng}$  の濃度で加え、そして室温で2時間インキュベートする。プレートを再び脱イオン水または蒸留水で3回洗浄し、非結合の結合体を除去する。

## 【0557】

4 - メチルウンベリフェリルリン酸 (MUP) または p - ニトロフェニルリン酸 (NPP) 基質溶液  $75 \mu\text{l}$  を各ウェルに添加し、そして室温で1時間インキュベートして基質と蛍光とを切断する。蛍光をマイクロタイタープレートリーダーにより測定する。コントロールサンプルの段階希釈からの実験結果を使用して標準曲線を作成し、そしてX軸 (対数スケール) にサンプル濃度を、そしてY軸 (直線スケール) に蛍光または吸光度をプロットする。次いで、このサンプルの測定された蛍光に基づいた標準曲線を用いてサンプル中のDR5ポリペプチド濃度を補間する。

## 【0558】

(実施例15: DR5のレベル低下を処置する方法)

本発明は、体内におけるDR5の生物学的活性のレベルを増大させる必要のある個体を処置するための方法に関し、その方法は、治療有効量のDR5アゴニストを含む組成物をそのような個体に投与する工程を包含する。本発明における使用のために好ましいアンタゴニストは、DR5特異的抗体である。

## 【0559】

さらに、個体におけるDR5の標準または正常発現レベルの低下により引き起こされる状態は、DR5を、好ましくは可溶および/または分泌形態で投与することにより処置され得ることが理解される。従って、本発明はまた、DR5ポリペプチドのレベルの増加が必要な個体の処置方法を提供する。この方法は、このような個体に、このような個体でDR5の生物学的活性レベルを増加させる量のDR5を含む薬学的組成物を投与する工程を包含する。

## 【0560】

例えば、DR5ポリペプチドのレベルが低下した患者は、ポリペプチドを、1日用量  $0.1 \sim 100 \text{ g/kg}$  で6日続けて服用する。好ましくは、ポリペプチ

ドは可溶および/または分泌形態である。

【0561】

(実施例16: DR5のレベル上昇を処置する方法)

本発明はまた、体内におけるDR5の生物学的活性のレベルを減少させる必要のある個体を処置するための方法に関し、その方法は、治療有効量のDR5またはそのアンタゴニストを含む組成物をそのような個体に投与する工程を包含する。

【0562】

アンチセンス技術を使用してDR5の産生を阻害する。この技術は、癌のような様々な病因に起因するDR5ポリペプチド、好ましくは可溶および/または分泌形態のポリペプチドのレベルを低下させる方法の1つの例である。

【0563】

例えば、DR5のレベルが異常に上昇したと診断された患者に、アンチセンスポリヌクレオチドを、0.5、1.0、1.5、2.0および3.0mg/kg/日で静脈内に21日間投与する。この処置に対して十分な耐性があれば、7日間の休薬期間後に、この処置を繰り返す。

【0564】

(実施例17: 遺伝子治療を使用する処置方法 - エキソビポ)

遺伝子治療の1つの方法は、可溶性および/または成熟DR5ポリペプチドを発現し得る線維芽細胞を患者に移植する方法である。一般に、線維芽細胞は、皮膚生検により被験者から得られる。得られた組織を組織培養培地中に配置し、小片に分割する。組織の小塊を組織培養フラスコの湿潤表面に置き、約10片を各フラスコに置く。このフラスコを倒置し、しっかりと閉め、そして室温で一晩放置する。室温で24時間後、フラスコを反転させ、組織塊をフラスコの底に固定させたままにし、そして新鮮培地(例えば、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するHamのF12培地)を添加する。次に、フラスコを37°Cで約1週間インキュベートする。

【0565】

この時点で、新鮮培地を添加し、次いで数日ごとに取り換える。さらに二週間

培養した後、単層の線維芽細胞が出現する。単層をトリプシン処理し、そしてさらに大きなフラスコにスケールアップする。

#### 【0566】

Moloney マウス肉腫ウイルスの長末端反復が隣接する pMV-7 (Kirschmeier, P. T. ら、DNA, 7:219-25 (1988)) を EcoRI および HindIII で消化した後、仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。線状ベクターをアガロースゲルで分画し、そしてガラスビーズを使用して精製する。

#### 【0567】

DR5 をコードする cDNA を、それぞれ 5' および 3' コード末端配列に対応する PCR プライマーを使用して増幅し得る。好ましくは、5' プライマーは EcoRI 部位を含み、そして 3' プライマーは HindIII 部位を含む。等量の、Moloney マウス肉腫ウイルス線状骨格ならびに増幅した EcoRI および HindIII フラグメントを、T4 DNA リガーゼの存在下で一緒に加える。得られた混合物を二つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。次に、連結混合物を使用し、E. coli HB101 を形質転換する。次に、それを、カナマイシン含有寒天上にプレーティングし、ベクターが適切に挿入された DR5 を有することを確認する。

#### 【0568】

アンフォトロピック pA317 または GP+am12 パッケージング細胞を、10% 仔ウシ血清 (CS)、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中、組織培養でコンフルエントな密度まで増殖させる。次に、DR5 遺伝子を含む MSV ベクターを培地に加え、そしてパッケージング細胞にベクターを形質導入する。このとき、パッケージング細胞は DR5 遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する (ここで、パッケージング細胞をプロデューサー細胞という)。

#### 【0569】

形質導入されたプロデューサー細胞に新鮮培地を添加し、次いで培地を 10 cm プレートのコンフルエントなプロデューサー細胞から採取する。感染性ウイル

ス粒子を含む使用済み培地を、ミリポアーフィルターを通して濾過して、はがれたプロデューサー細胞を除去し、次いでこの培地を使用して、線維芽細胞を感染させる。線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから培地を除去し、そしてプロデューサー細胞からの培地で速やかに置き換える。この培地を除去し、そして新鮮培地と置き換える。ウイルスの力価が高ければ、実質的にすべての線維芽細胞が感染され、選択は必要ではない。力価が非常に低ければ、neoまたはhisのような選択マーカーを有するレトロウイルスベクターを使用することが必要である。一旦、線維芽細胞が効率的に感染すると、線維芽細胞を分析し、DR5タンパク質が産生されているか否かを決定する。

#### 【0570】

次に、操作された線維芽細胞を、単独で、またはサイトデックス3マイクロキャリアビーズ上でコンフルエントに増殖させた後のいずれかで、宿主に移植する。

#### 【0571】

(実施例18：遺伝子治療を使用する処置方法 - インビボ)

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置するためにインビボ遺伝子治療方法を使用することである。この遺伝子治療法は、DR5ポリペプチドの発現を増大または減少させるための、動物への裸の核酸(DNA、RNA、およびアンチセンスDNAまたはRNA) DR5配列の導入に関する。DR5ポリヌクレオチドは、プロモーター、または標的組織によるDR5ポリペプチドの発現に必要な任意の他の遺伝子エレメントに、作動可能に連結され得る。このような遺伝子治療および送達の技術および方法は、当該分野で公知であり、例えば、WO90/11092、WO98/11779；米国特許第5693622号、同第5705151号、同第5580859号；Tabata H.ら、Cardiovasc. Res. 35:470-479(1997)；Chao J.ら、Pharmacol. Res. 35:517-522(1997)；Wolff J.A., Neuromuscul. Disord. 7:314-318(1997)、Schwartz B.ら、Gene Ther. 3:405-411(1996)；Tsurumi Y.ら、Circulation 94:

3281-3290(1996)(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

【0572】

DR5ポリヌクレオチド構築物は、注入可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法(例えば、組織(心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸など)の間隙空間への注入)によって送達され得る。DR5ポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリア中で送達され得る。

【0573】

用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAは、細胞への侵入を補助、促進、または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル(ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、または沈澱剤などを含む)も含まない配列をいう。しかし、DR5ポリヌクレオチドはまた、当業者に周知の方法によって調製され得るリポソーム処方物(例えば、Felgner P. L.ら(1995)Ann. NY Acad. Sci. 772:126-139およびAbdallah B.ら(1995)Biol. Cell 85(1):1-7で教示されたもの)中で送達され得る。

【0574】

この遺伝子治療方法において使用されるDR5ポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列も含まない構築物である。当業者に公知の任意の強力なプロモーターが、DNAの発現を駆動するために用いられ得る。他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する1つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製DNA配列が細胞に導入されて、6ヶ月までの期間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【0575】

DR5ポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織(筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する)の間隙空間に送達され得る。組織の間隙空間は、細胞間液、器官組織の細網線維間

のムコ多糖マトリクス、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは筋肉細胞の鞘で囲まれた結合組織内の同じマトリクス (that same matrix) または骨の裂孔中の結合組織内の同じマトリクス (that same matrix) を含む。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下に考察する理由のために好ましい。それらは、これらの細胞を含む組織への注入によって、好都合に送達され得る。それらは、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞 (例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞) において達成され得る。インビボで、筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現するそれらの能力において、特に適格である。

#### 【0576】

裸のDR5ポリヌクレオチド注入のために、DNAまたはRNAの有効投薬量は、約0.05g/kg体重から約50mg/kg体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約0.005mg/kgから約20mg/kgであり、そしてより好ましくは、約0.05mg/kgから約5mg/kgである。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注入の組織部位に従って変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注入経路によってである。しかし、他の非経口経路 (例えば、特に肺もしくは気管支組織、咽喉、または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入) もまた用いられ得る。さらに、裸のDR5ポリヌクレオチド構築物が、血管形成術の間に、この手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達され得る。

#### 【0577】

インビボで筋肉に注入されたDR5ポリヌクレオチドの用量応答効果を、以下のようにして決定する。DR5ポリペプチドをコードするmRNAの生成のための適切なDR5鋳型DNAを、標準的な組換えDNA方法論に従って調製する。

鋳型DNA（これは環状または線状のいずれかであり得る）を裸のDNAとして使用するか、またはリポソームと複合体化するかのいずれかである。次いで、マウスの四頭筋に、種々の量の鋳型DNAを注入する。

#### 【0578】

5～6週齢の雌性および雄性のBalb/Cマウスに、0.3mlの2.5% Avertinを腹腔内注射することにより麻酔する。1.5cmの切開を大腿前部で行い、そして四頭筋を直接可視化する。DR5鋳型DNAを、0.1mlのキャリアに入れて、1cc注射器で27ゲージ針を通して1分間にわたって、筋肉の遠位挿入部位から約0.5cmのところまで膝に、約0.2cmの深さで注入する。縫合を、将来の位置決定のために注入部位の上で行い、そしてその皮膚をステンレス鋼クリップで閉じる。

#### 【0579】

適切なインキュベーション時間（例えば、7日）後、筋肉抽出物を、四頭全体を切り出すことによって調製する。個々の四頭筋の5枚毎の15μm切片を、DR5タンパク質発現について組織化学的に染色する。DR5タンパク質発現についてのタイムコースを、異なるマウスからの四頭を異なる時間で採取すること以外は、同様な様式で行い得る。注入後の筋肉中のDR5 DNAの持続性を、注入したマウスおよびコントロールマウスからの全細胞性DNAおよびHIRT上清を調製した後、サザンブロット分析によって決定し得る。マウスにおける上記実験の結果を、裸のDR5 DNAを用いて、ヒトおよび他の動物において適切な投薬量および他の処置パラメーターを外挿するために使用し得る。

#### 【0580】

（実施例19：DR5-Fc融合タンパク質は、同時刺激アッセイにおいてインビトロでB細胞増殖を阻害する）

ヒトIgG1免疫グロブリン分子のFc部分に連結したDR5の可溶性形態（配列番号2のアミノ酸-51～133に対応する）からなるDR5-Fcポリペプチドを、調製した。このタンパク質が、ヒトB細胞の増殖応答を変化させる能力を、標準的な同時刺激アッセイにおいて評価する。簡潔には、ヒト扁桃腺B細胞を、CD3陽性細胞の磁性ビーズ（MACS）により精製した。得られた細胞

集団を、慣用的には、CD19およびCD20染色の発現により評価されるように、95% B細胞を超えていた。種々の希釈のrHuニュートロカイン-（国際出願公開WO98/18921）またはコントロールタンパク質rHuIL2を、96ウェルプレートの個々のウェルに配置し、ここへ、培養培地（10% FBS、 $5 \times 10^{-5}$ M 2ME、100U/mlペニシリン、10 $\mu$ g/mlストレプトマイシン、および $10^{-5}$ 希釈のホルマリン固定Staphylococcus aureus Cowan I (SAC) (Pansorbina (Pan)としても公知)を含有するRPMI 1640)中で懸濁した、総量150 $\mu$ l中の、 $10^5$ B細胞を添加した。DR5-Fcを種々の濃度で添加した。次いで、プレートを3日間インキュベーター中に置いた（37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、95%湿潤）。因子を添加して72時間後に開始した<sup>3</sup>H-チミジン（6.7Ci/mM）の20時間のパルス（1 $\mu$ Ci/ウェル）により増殖を定量した。陽性コントロールおよび陰性コントロールは、それぞれ、IL-2および培地である。

#### 【0581】

この実験の結果を、DR5-Fcが、プライミング因子としてStaphylococcus aureus Cowan I (SAC)、および台2のシグナルとしてニュートロカイン-を用いた同時刺激アッセイにおいてB細胞増殖を阻害したことを確認した（データは示さず）。他の腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）融合タンパク質（例えば、DR4-Fc（国際出願公開番号WO98/32856）、TR6-Fc（国際出願公開番号WO98/31799）およびTR9-Fc（国際出願公開番号WO98/56892））は増殖を阻害しなかったことに注目することは重要である。

#### 【0582】

本発明を、前述の説明および実施例に詳細に記載された以外の方法で実施し得ることは、明らかである。本発明の多数の改変およびバリエーションが、上記の教示を考慮して可能であり、従って、それは、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

#### 【0583】

発明の背景、詳細な説明および実施例において引用された各文書の全開示（特許、特許出願、学術文献、要約、実験マニュアル、書籍または他の開示を含む）は、本明細書中に参考として援用される。

【0584】

さらに、本明細書とともに紙形態で提出された配列表は、本明細書中にその全体が参考として援用される。

【0585】

【表3】

出願人または代理人ファイル参照番号  
1488.131PC07

国際出願番号 T

寄託された微生物に関する表示  
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

5 頁、 6 行

B. 寄託物の表示

その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ プールバード 10801

寄託日

1997年3月7日

受託番号

97920

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)

この情報は追付の用紙に続く

DNAプラスミド 1989360

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する (表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

この用紙は国際出願とともに受理された

この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官 ポール F. ウルッチア

認定官

国際部門

703-305-3681

PCT/RO/134様式 (1992年7月)

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

```

<110> Human Genome Sciences, Inc.
      Ni, Jian
      Gentz, Reiner L.
      Yu, Guo-liang
      Su, Jeffrey
      Rosen, Craig A.

<120> Death Domain Containing Receptor 5

<130> 1488.131PC07

<140> To Be Assigned
<141> To Be Assigned

<150> 60/148,939
<151> 1999-08-13

<150> 60/133,238
<151> 1999-05-07

<150> 60/132,498
<151> 1999-05-04

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1600
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (130)..(1362)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (283)..(1362)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (130)..(282)

<400> 1
cacgcgccg cgggcgcggc cggagaacc cgcgaatctt gcgcccacaa aatacaccga 60
cgatgccga tctactttaa gggctgaaac ccacgggcct gagagactat aagagcggtc 120
cctaccgcc atg gaa caa cgg gga cag aac gcc ccg gcc gct tcg ggg gcc 171
      Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala
      -50 -45 -40

cgg aaa agg cac ggc cca gga ccc agg gag gcg cgg gga gcc agg cct 219
Arg Lys Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro
      -35 -30 -25

ggg ccc cgg gtc ccc aag acc ctt gtg ctc gtt gtc gcc gcg gtc ctg 267
Gly Pro Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu

```



gaa gct gaa agg tct cag agg agg agg ctg ctg gtt cca gca aat gaa 1035  
 Glu Ala Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu  
 240 245 250

ggt gat ccc act gag act ctg aga cag tgc ttc gat gac ttt gca gac 1083  
 Gly Asp Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp  
 255 260 265

ttg gtg ccc ttt gac tcc tgg gag ccg ctc atg agg aag ttg ggc ctc 1131  
 Leu Val Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu  
 270 275 280

atg gac aat gag ata aag gtg gct aaa gct gag gca gcg ggc cac agg 1179  
 Met Asp Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg  
 285 290 295

gac acc ttg tac acg atg ctg ata aag tgg gtc aac aaa acc ggg cga 1227  
 Asp Thr Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg  
 300 305 310 315

gat gcc tct gtc cac acc ctg ctg gat gcc ttg gag acg ctg gga gag 1275  
 Asp Ala Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu  
 320 325 330

aga ctt gcc aag cag aag att gag gac cac ttg ttg agc tct gga aag 1323  
 Arg Leu Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys  
 335 340 345

ttc atg tat cta gaa ggt aat gca gac tct gcc atg tcc taagtgtgat 1372  
 Phe Met Tyr Leu Glu Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser  
 350 355 360

tetottcagg aagtgagacc ttccttggtt tacotTTTTT ctggaaaaag cccaactgga 1432

ctccagtcag taggaaagtg ccacaattgt cacatgaccg gtactggaag aaactctccc 1492

atccaacatc acccagtgga tggaacatcc tgtaactttt cactgcactt ggcattattt 1552

ttataagctg aatgtgataa taaggacact atggaaaaaa aaaaaaaaa 1600

<210> 2  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys  
 -50 -45 -40

Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro  
 -35 -30 -25 -20

Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu  
 -15 -10 -5

Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln  
 -1 1 5 10

Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu  
 15 20 25

Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser  
 30 35 40 45  
 Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe  
 50 55 60  
 Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro  
 65 70 75  
 Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe  
 80 85 90  
 Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys  
 95 100 105  
 Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile  
 110 115 120 125  
 Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala  
 130 135 140  
 Ala Val Val Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp  
 145 150 155  
 Lys Lys Val Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly  
 160 165 170  
 Asp Pro Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp  
 175 180 185  
 Asn Val Leu Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro  
 190 195 200 205  
 Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn  
 210 215 220  
 Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala  
 225 230 235  
 Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp  
 240 245 250  
 Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val  
 255 260 265  
 Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp  
 270 275 280 285  
 Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr  
 290 295 300  
 Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala  
 305 310 315  
 Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu  
 320 325 330  
 Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met  
 335 340 345  
 Tyr Leu Glu Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser  
 350 355 360

<210> 3  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro  
 20 25 30  
 His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys  
 35 40 45  
 Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys  
 50 55 60  
 Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp  
 65 70 75 80  
 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu  
 85 90 95  
 Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val  
 100 105 110  
 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg  
 115 120 125  
 Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe  
 130 135 140  
 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu  
 165 170 175  
 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr  
 180 185 190  
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser  
 195 200 205  
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu  
 210 215 220  
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu  
 245 250 255  
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser  
 260 265 270  
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val  
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys  
 290 295 300  
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly  
 305 310 315  
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn  
 325 330 335  
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp  
 340 345 350  
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro  
 355 360 365  
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu  
 370 375 380  
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln  
 385 390 395 400  
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala  
 405 410 415  
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly  
 420 425 430  
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro  
 435 440 445  
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg  
 450 455

<210> 4  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Met Leu Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser  
 20 25 30  
 Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn  
 35 40 45  
 Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro  
 50 55 60  
 Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His  
 85 90 95  
 Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly  
 100 105 110  
 Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg

115					120					125					
Cys	Lys	Pro	Asn	Phe	Phe	Cys	Asn	Ser	Thr	Val	Cys	Glu	His	Cys	Asp
	130					135					140				
Pro	Cys	Thr	Lys	Cys	Glu	His	Gly	Ile	Ile	Lys	Glu	Cys	Thr	Leu	Thr
	145				150					155					160
Ser	Asn	Thr	Lys	Cys	Lys	Glu	Glu	Gly	Ser	Arg	Ser	Asn	Leu	Gly	Trp
				165					170					175	
Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ile	Pro	Leu	Ile	Val	Trp	Val	Lys	Arg
			180					185					190		
Lys	Glu	Val	Gln	Lys	Thr	Cys	Arg	Lys	His	Arg	Lys	Glu	Asn	Gln	Gly
		195					200					205			
Ser	His	Glu	Ser	Pro	Thr	Leu	Asn	Pro	Glu	Thr	Val	Ala	Ile	Asn	Leu
	210					215					220				
Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Tyr	Ile	Thr	Thr	Ile	Ala	Gly	Val	Met
	225				230					235					240
Thr	Leu	Ser	Gln	Val	Lys	Gly	Phe	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Val	Asn	Glu
				245					250					255	
Ala	Lys	Ile	Asp	Glu	Ile	Lys	Asn	Asp	Asn	Val	Gln	Asp	Thr	Ala	Glu
			260					265					270		
Gln	Lys	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Asn	Trp	His	Gln	Leu	His	Gly	Lys	Lys
		275					280					285			
Glu	Ala	Tyr	Asp	Thr	Leu	Ile	Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Ala	Asn	Leu	Cys
	290					295					300				
Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Gln	Thr	Ile	Ile	Leu	Lys	Asp	Ile	Thr	Ser
	305				310					315					320
Asp	Ser	Glu	Asn	Ser	Asn	Phe	Arg	Asn	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Val	
				325					330					335	
<210> 5															
<211> 417															
<212> PRT															
<213> Homo sapiens															
<400> 5															
Met	Glu	Gln	Arg	Pro	Arg	Gly	Cys	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu
	1			5						10				15	
Leu	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Arg	Ala	Gln	Gly	Gly	Thr	Arg	Ser	Pro	Arg
			20					25					30		
Cys	Asp	Cys	Ala	Gly	Asp	Phe	His	Lys	Lys	Ile	Gly	Leu	Phe	Cys	Cys
		35					40					45			
Arg	Gly	Cys	Pro	Ala	Gly	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Pro	Cys	Thr	Glu	Pro
	50					55					60				
Cys	Gly	Asn	Ser	Thr	Cys	Leu	Val	Cys	Pro	Gln	Asp	Thr	Phe	Leu	Ala
	65				70					75					80

Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp  
 85 90 95  
 Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp  
 100 105 110  
 Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser  
 115 120 125  
 Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys  
 130 135 140  
 Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys  
 165 170 175  
 Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala  
 180 185 190  
 Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala  
 195 200 205  
 Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr  
 210 215 220  
 Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly  
 225 230 235 240  
 Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp  
 245 250 255  
 Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys  
 260 265 270  
 Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr  
 275 280 285  
 Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro  
 290 295 300  
 Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr  
 325 330 335  
 Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg  
 340 345 350  
 Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile  
 355 360 365  
 Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln  
 370 375 380  
 Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met  
 385 390 395 400  
 Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly  
 405 410 415

Pro

<210> 6  
 <211> 507  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 aattcggcac agctcttcag gaagtcagac cttccctggt ttacctttt tctggaaaaa 60  
 gcccaactgg gactccagtc agtaggaaag tgccacaatt gtcacatgac cggactgga 120  
 agaaactctc ccatccaaca tcaccagtg gnatgggaac actgatgaac ttttctactgc 180  
 acttggcatt atttttgna agctgaatgt gataataagg gcactgatgg aaatgtctgg 240  
 atcattccgg ttgtgcttac tttgagattt gngtttgggg atgtncattg tgtttgacag 300  
 cacttttttn atccctaag tnaaatgcnt natittgattg tganttgggg gtnaacattg 360  
 gtnaaggntn ccctntgac acagtagntg gtncccgact tanaatngnn gaanangatg 420  
 natnangaac ctttttttgg gtgggggggt nncggggcag ttnnaangnng nctccccagg 480  
 tttgngtng caatngngga annntgg 507

<210> 7  
 <211> 226  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 ttttttttgt agatggatct tacaatgtag cccaaataaa taaataaagc atttacatta 60  
 ggataaaaaa gtgctgtgaa aacaatgaca tcccaaacca aatctcaaag tacgcacaaa 120  
 cggaatgatc cagacatttc cataggtcct tattatcaca ttcagcttat aaaataatgc 180  
 caagtgcagt gaaaagttac aggatgttcc atccactggg tggatt 226

<210> 8  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 8  
 cgcccatgga gtctgctctg atcac 25

<210> 9  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 9  
 cgcaagcttt tagcctgatt ctttgtggac 30

<210> 10  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 10  
 cgcggtaccg ccatcatgga acaacgggga cagaac 36

<210> 11  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11  
 cgcggtacct taggacatgg cagagtc 27

<210> 12  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 12  
 cgcggtacct tagcctgatt ctttgggac 30

<210> 13  
 <211> 733  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 gggatccgga gcccaaatct tctgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg 60  
 aattcgaggg tgcaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga 120  
 tctccgggac tcttgaggtc acatgcctgg tggtagcgt aagccacgaa gaccctgagg 180  
 tcaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 240  
 aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 300  
 ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctocca acccccatcg 360  
 agaaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc 420  
 catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 480  
 atccaagcga catcgcctg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga 540  
 ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccctggg 600  
 acaagagcag gtggcagcag ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc 660  
 acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc 720  
 gactctagag gat 733

<210> 14  
 <211> 257  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 14  
 agggctgaaa cccacgggccc tgagagacta taagagngtt ccctacogcc atggaacaac 60  
 ggggacagaa cgccccggnc ncttcggggg cccggaaaag gcacggccca ggaccaggg 120  
 aggnccgggg agccaggcct gggccccggg tccccaaagac ccttgtgctc gttgtcgcg 180  
 cgttctgctc gttggtgagt ccccgccgcg gtcctggctc ggggaagagc gtnccctggg 240

cctggagagg gcaqgga 257

## 【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、DR5のヌクレオチド配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。アミノ酸約1~約51(下線を付した)は、シグナル伝達ペプチドを構成し(配列番号2のアミノ酸残基約-51~約-1);アミノ酸約52~約184は、細胞外ドメインを構成し(配列番号2のアミノ酸残基約1~約133);アミノ酸約84~約179は、システインリッチドメインを構成し(配列番号2のアミノ酸残基約33~約128);アミノ酸約185~約208(下線を付した)は、膜貫通ドメインを構成し(配列番号2のアミノ酸残基約134~約157);そしてアミノ酸約209~約411は、細胞内ドメインを構成し(配列番号2のアミノ酸残基約158~約360)、そのアミノ酸約324~約391(斜字体)は死ドメインを構成する(配列番号2のアミノ酸残基約273~約340)と予測される。

#### 【図2】

図2は、DR5(HLYBX88)、ヒト腫瘍壊死因子レセプター1(hTNFR-1)(配列番号3)、ヒトFasタンパク質(配列番号4)、および死ドメインを含むレセプター3(配列番号5)のアミノ酸配列間の類似性領域を示す。比較は、DNA Star suite プログラムに含まれる、Megaalignプログラムで、Clustal法を使用して行われた。コンセンサスと一致する残基は、影をつける。

#### 【図3】

図3は、DR5アミノ酸配列の分析を示す。 、 、 ターン、およびコイル領域;親水性および疎水性;両親媒性領域;可撓性領域;抗原性指数、および表面確率を、図1に示されるアミノ酸配列について、説明されるコンピュータープログラムのデフォルトパラメーターを用いて予想したように示す。「抗原性指数-Jameson-Wolf」のグラフでは、図1に示されるアミノ酸残基約62~約110、約119~約164、約224~約271、および約275~約370が、示されるDR5タンパク質の高度な抗原性領域に一致する。図1におけるこれらの高度に抗原性のフラグメントは、配列番号2の以下のフラグメントにそれぞれ一致する:アミノ酸残基約11~約59、約68~約113、約173~約220、および約224~約319。

## 【図4】

図4は、図1（配列番号1）に示されるヌクレオチド配列に関連する2つのcDNA分子のヌクレオチド配列（HAPBU13RおよびHSBBU76R）を示す。

## 【図5A】

図5Aは、DR5過剰発現がMCF7ヒト乳癌細胞においてアポトーシスを誘導したことを示す棒グラフである。

## 【図5B】

図5Bは、DR5過剰発現がヒト類表皮癌（HeLa）細胞においてアポトーシスを誘導したことを示す棒グラフである。

## 【図5C】

図5Cは、DR5に誘導されるアポトーシスが、カスパーゼ（caspase）インヒビターであるCrmAおよびz-VAD-fmkによってブロックされたが、優性ネガティブなFADDは効果がなかったことを示す棒グラフである。

## 【図5D】

図5Dは、DR4と同様に、DR5は、インビボではFADDおよびTRADDと相互作用しなかったことを示すイムノプロットである。

## 【図5E】

図5Eは、新しく同定した、FLICE様分子の優性ネガティブバージョン（version）である、FLICE2（Vincenz, C.ら、J. Biol. Chem. 272:6578（1997））が効率的にDR5誘導性のアポトーシスをブロックしたが、一方優性ネガティブFLICEは、それがブロックした条件下で部分的な効果のみ有したことを示す棒グラフである。TNFR-1がアポトーシスを効果的にブロックしたことも示す。

## 【図6A】

図6Aは、DR5-Fc（ならびにDR4およびTRID）が、特異的にTRAILを結合するが、関連する細胞毒性リガンドTNFを結合しないことを示すイムノプロットである。図6Aの下部のパネルは、結合アッセイ中に存在するFc融合物の入力を示す。

**【図6B】**

図6Bは、DR5-FcがTRAILのアポトーシスを誘導する能力をブロックしたことを示す棒グラフである。図6Bに示されるデータ(平均±SD)は、計数された全核(n=4)中のアポトーシス性の核のパーセントである。

**【図6C】**

図6Cは、TNFR-1-Fcが完全にTNF 殺傷を無効にした条件下で、DR5-Fcはアポトーシス性TNF 誘導細胞死に効果を有さなかったことを示す棒グラフである。

## 【図1A】

10 30 50  
 CACGCGTCCGCGGGCGCGGCCGGAGAACCCCGCAATCTTTGCGCCACAAAATACACCGA  
 70 90 110  
 CGATGCCCGATCTACTTTAAGGGCTGAAACCCACGGGCTGAGAGACTATAAGAGCGTTC  
 130 150 170  
 CCTACCGCCATGGAACAACGGGGACAGAACGCCCGCGCTTCGGGGGCGGAAAAGG  
M E Q R G Q N A P A A S G A R K R  
 190 210 230  
 CACGGCCCAGGACCCAGGGAGGCGCGGGGAGCCAGGCCTGGGCCCCGGGTCCCCAAGACC  
H G P G P R E A R G A R P G P R V P K T  
 250 270 290  
 CTTGTGCTCGTTGTGCGCCGCGTCTGCTGTTGGTCTCAGCTGAGTCTGCTCTGATCACC  
L V L V V A A V L L L V S A E S A L I T  
 310 330 350  
 CAACAAGACCTAGCTCCCCAGCAGAGCGGCCCCACAACAAAAGAGGTCCAGCCCCCTCA  
 Q Q D L A P Q Q R A A P Q Q K R S S P S  
 370 390 410  
 GAGGGATTGTGTCCACCTGGACACCATATCTCAGAAGACGGTAGAGATTGCATCTCCTGC  
 E G L C P P G H H I S E D G R D C I S C  
 430 450 470  
 AAATATGGACAGGACTATAGCACTCACTGGAATGACCTCCTTTTCTGCTTGCCTGCACC  
 K Y G Q D Y S T H W N D L L F C L R C T  
 490 510 530  
 AGGTGTGATTGAGGTGAAGTGGAGCTAAGTCCCTGCACCACGACCAGAAAACACAGTGTGT  
 R C D S G E V E L S P C T T T R N T V C  
 550 570 590  
 CAGTGCGAAGAAGGCACCTTCCGGGAAGAAGATTCTCCTGAGATGTGCCGGAAGTGCCGC  
 Q C E E G T F R E E D S P E M C R K C R  
 610 630 650  
 ACAGGGTGTCCCAGAGGGATGGTCAAGGTGGTATTGTACACCCTGGAGTGACATCGAA  
 T G C P R G M V K V G D C T P W S D I E  
 670 690 710  
 TGTGTCCACAAAGAATCAGGCATCATATAGGAGTCACAGTTGCAGCCGTAGTCTTGATT  
C V H K E S G I I I G V T V A A V V L I  
 730 750 770  
 GTGGCTGTGTTTGTGCAAGTCTTTACTGTGGAAGAAAGTCCTTACCTGAAAGGC  
V A V F V C K S L L W K K V L P Y L K G  
 790 810 830  
 ATCTGCTCAGGTGGTGGTGGGGACCCTGAGCGTGTGGACAGAAGCTCACAAACGACCTGGG  
 I C S G G G G D P E R V D R S S Q R P G

FIG.1A

## 【図1B】

```

      850              870              890
GCTGAGGACAATGTCCTCAATGAGATCGTGAGTATCTTGCAGCCCACCCAGGTCCCTGAG
A E D N V L N E I V S I L Q P T Q V P E
      910              930              950
CAGGAAATGGAAGTCCAGGAGCCAGCAGAGCCAACAGGTGTCAACATGTTGTCCCCGGG
Q E M E V Q E P A E P T G V N M L S P G
      970              990              1010
GAGTCAGAGCATCTGCTGGAACCGGCAGAAGCTGAAAGGTCTCAGAGGAGGAGGCTGCTG
E S E H L L E P A E A E R S Q R R R L L
      1030             1050             1070
GTTCCAGCAAATGAAGGTGATCCCCTGAGACTCTGAGACAGTGCTTCGATGACTTTGCA
V P A N E G D P T E T L R Q C F D D F A
      1090             1110             1130
GACTTGGTGCCCTTTGACTCCTGGGAGCCGCTCATGAGGAAGTTGGGCCTCATGGACAAT
D L V P F D S W E P L M R K L G L M D N
      1150             1170             1190
GAGATAAAGGTGGCTAAAGCTGAGGCAGCGGGCCACAGGGACACCTTGACACGATGCTG
E I K V A K A E A A G H R D T L Y T M L
      1210             1230             1250
ATAAAGTGGGTCAACAAAACCGGGCGAGATGCCTCTGTCCACACCCTGCTGGATGCCTTG
I K W V N K T G R D A S V H T L L D A L
      1270             1290             1310
GAGACGCTGGGAGAGAGACTTGCCAAGCAGAAGATTGAGGACCACTTGTTGAGCTCTGGA
E T L G E R L A K Q K I E D H L L S S G
      1330             1350             1370
AAGTTCATGTATCTAGAAGGTAATGCAGACTCTGCCATGTCCTAAGTGTGATTCTCTTCA
K F M Y L E G N A D S A M S *
      1390             1410             1430
GGAAGTGAGACCTTCCCTGGTTTACCTTTTTTCTGGAAAAGCCCAACTGGACTCCAGTC
      1450             1470             1490
AGTAGGAAAGTGCCACAATTGTCACATGACCGGTACTGGAAGAACTCTCCCATCCAACA
      1510             1530             1550
TCACCCAGTGGATGGAACATCCTGTAACCTTTTCACTGCACTTGGCATTATTTTTATAAGC
      1570             1590
TGAATGTGATAATAAGGACACTATGGAAAAAAAAAAAAA

```

FIG.1B



【図2B】

(図2の続き)

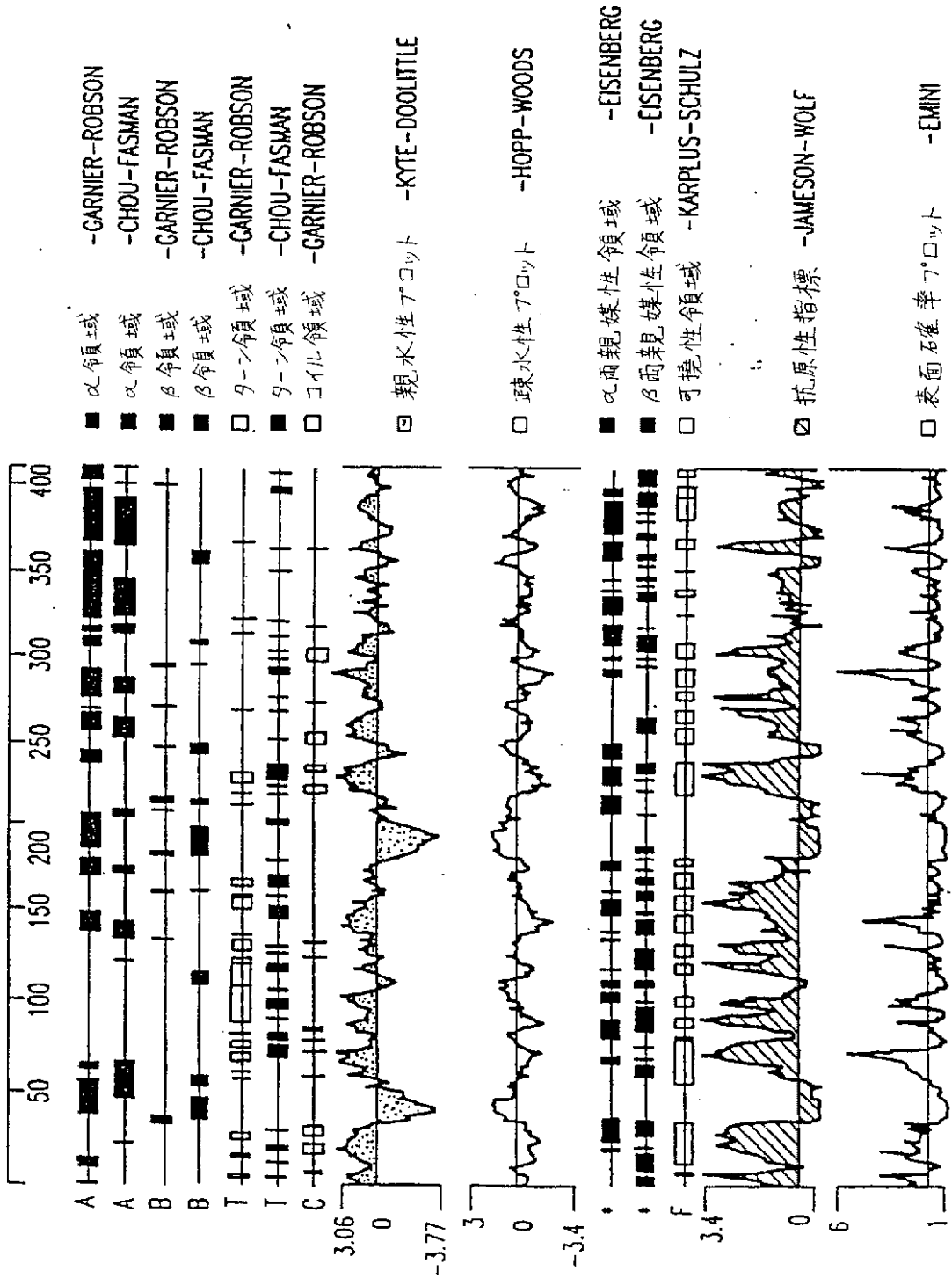
149 - - - - - **C E H G I I** - - - **K E C** - - - **L T S N T K C K E** - - - **h Fas タンパク質**  
 161 **K Q N T V C T C H A G F F L R E N E C V S C S N C K S L E C T K L C L P Q I E** **h TNFR I タンパク質**  
 158 **R D T D C G T C L P G F Y E H G D G C V S C P T S T L G - S C P E R C A A V C G** **DR3 タンパク質**  
 163 **G M V K V G D C T P** - - - **W S D I E C V** - - - **H K E S G I I G** **HLYBX88XX タンパク質**  
 168 - - - **E G S R S N L G W** - - - **L C L L - L L P I P L I V - - - W** **h Fas タンパク質**  
 201 **N V K G T E D S G T V L P L V I F F G L C L L S L L F I G L M Y R Y Q R - W** **h TNFR I タンパク質**  
 197 **W R Q** - - - **M F W V Q V L L A G L V V P L L L G A T L T Y T Y R H C W** **DR3 タンパク質**  
 189 - - - **V T V A A V V L I V A V F** - - - **V C K S L L W K K V L P Y L K G I C S** **HLYBX88XX タンパク質**  
 190 **V K R K E V Q K T C R K H R K E N Q G S H E S** - - - **I P L I P L A P N P S F S P T P G** **h Fas タンパク質**  
 240 - **K S K L Y S I V C G K S T P E K E G E L L E G T T T K P L A P N P S F S P T P G** **h TNFR I タンパク質**  
 229 - **P H K P L - V T A D E A G M E A L T P P P A T H L S P L D S A H T L L A P P P D** **DR3 タンパク質**  
 221 - - - **G G G G D P E R V D R S S Q R P G A E D N V L L N E I V S I L Q P T Q** **HLYBX88XX タンパク質**  
 213 - - - **T L G F S P V P S S T F T S S S T Y T P G D - C P N F A A P R R E V A P P** **h Fas タンパク質**  
 279 **F T P T L G F S P V P S S T F T S S S T Y T P G D - C P N F A A P R R E V A P P** **h TNFR I タンパク質**  
 267 **S S E K I C T V Q L V G N S W T P G Y P E T Q E A L C P Q V T W S W D Q L - - -** **DR3 タンパク質**  
 255 **V P E Q E M E V Q E R A E** - - - **P T C V N M L S P G - - - E S E H L - - -** **HLYBX88XX タンパク質**  
 213 - - - **P T L N P E T V A I N L** - - - **S D V D L S K Y I T T I A G V M** **h Fas タンパク質**  
 318 **Y Q G A D P I L A T A L A S D P I P N P L Q K W E D S A H K P Q S L D T D D P P A** **h TNFR I タンパク質**  
 305 **S R A L G P A A P T L S P** - - - **E S P A G S P A M M L Q P G P Q** **DR3 タンパク質**  
 283 - - - **L E P A E A E R S Q R R R L L V P A N E G D P T E T L R Q** **HLYBX88XX タンパク質**

2B

(図 2 の続き)

241 T L S Q V - - - - K G F V R K N G V N E A K I D D E I K N D N V Q D T A h Fas タンパク質  
 358 T L Y A V V E N V P A R R W K E F V R R L G L S D H E I D R L E L Q N G R C L R h TNFR I タンパク質  
 335 - L Y D V M D A V P A R R W K E F V R R L G L R E A E I E A V E V E I G R - F R D R 3 タンパク質  
 312 C F D D F A D L V P F D S W E P L M R K L G L M D N E I - K V A K A E A A G H R H L Y B X 8 8 X X タンパク質  
  
 272 E Q K V Q L L R N W H Q L H G K K E A - Y D T L I K D L K K A N L C T L A E K I h Fas タンパク質  
 398 E A Q Y S M L A T W R R Q P P - - A G L G R V L R D M D L L G C L E D I h TNFR I タンパク質  
 373 D Q Q Y E M L K R W R Q Q P - - A G L G A V Y A A L E R R M G L D G C V E D L D R 3 タンパク質  
 351 D T L Y T M L I K K W V N K T G R - D A S V H T L L D A L E T L G E R L A K Q K I H L Y B X 8 8 X X タンパク質  
  
 311 Q T I I L K D I T S D S E N S N F R N E I Q S L V h Fas タンパク質  
 438 E E A L - - - - C G P A A L P P A P S L L R h TNFR I タンパク質  
 410 - - - - - R S R L Q R G P - - - - -  
 390 E D H L L S S G K F M Y L E G N - - A D S A M S H L Y B X 8 8 X X タンパク質

【図3】



【図4】

HAPBU13R

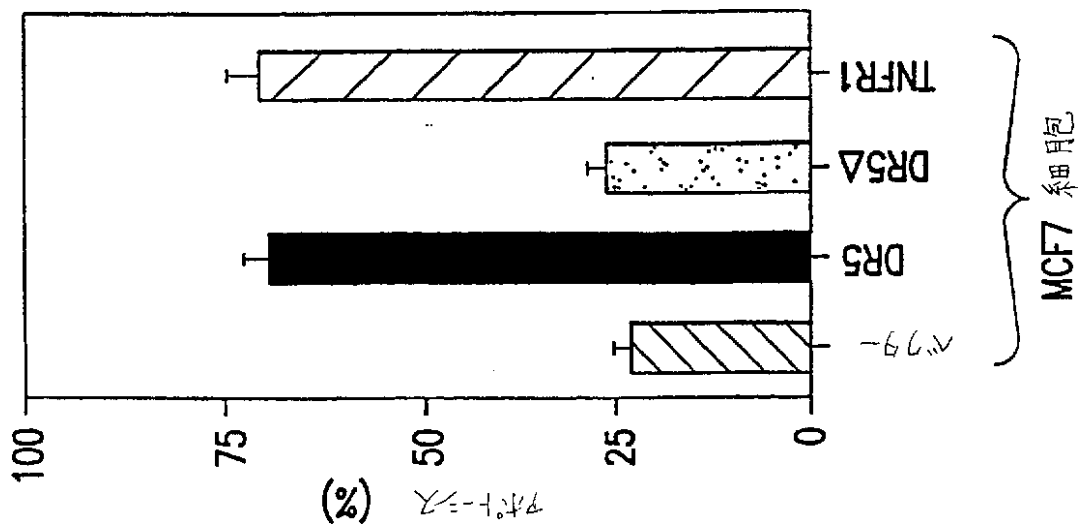
1 AATTCGGCAC AGCTCTTCAG GAAGTCAGAC CTTCCCTGGT TTACCTTTTT  
 51 TCTGGAAAAA GCCCAACTGG GACTCCAGTC AGTAGGAAAG TGCCACAATT  
 101 GTCACATGAC CGGTACTGGA AGAAACTCTC CCATCCAACA TCACCCAGTG  
 151 GNATGGGAAC ACTGATGAAC TTTTCACTGC ACTTGGCATT ATTTTTGTNA  
 201 AGCTGAATGT GATAATAAGG GCACTGATGG AAATGTCTGG ATCATTCCGG  
 251 TTGTGCGTAC TTTGAGATTT GNGTTTGGGG ATGTNCATTG TGTTTGACAG  
 301 CACTTTTTTN ATCCCTAATG TNAATGCNT NATTTGATTG TGANTTGGGG  
 351 GTNAACATTG GTNAAGGNTN CCCNTNTGAC ACAGTAGNTG GTNCCCGACT  
 401 TANAATNGNN GAANANGATG NATNANGAAC CTTTTTTTGG GTGGGGGGGT  
 451 NNCGGGGCAG TNNAANGMNG NCTCCCCAGG TTTGGNGTNG CAATNGNGGA  
 501 ANNNTGG

HSBBU76R

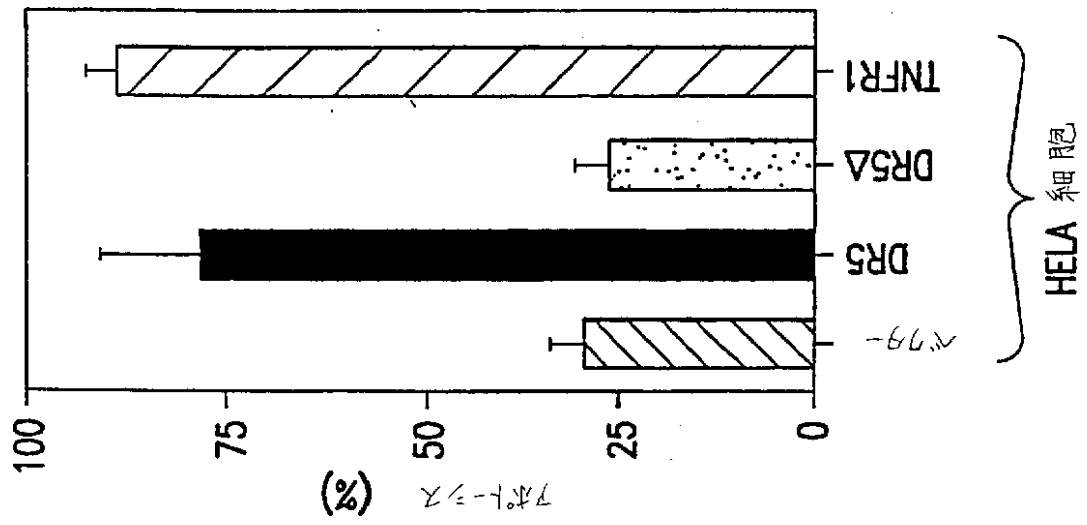
1 TTTTTTTTGT AGATGGATCT TACAATGTAG CCCAAATAAA TAAATAAAGC  
 51 ATTTACATTA GGATAAAAAA GTGCTGTGAA AACAAATGACA TCCCAAACCA  
 101 AATCTCAAAG TACGCACAAA CGGAATGATC CAGACATTTT CATAGNGTCC  
 151 TTATTATCAC ATTCAGCTTA TAAAANTAAT GCCAAGTGCA GTGAAAAGTT  
 201 ACAGGATGTT CCATCCACTG GGTGGATT

FIG.4

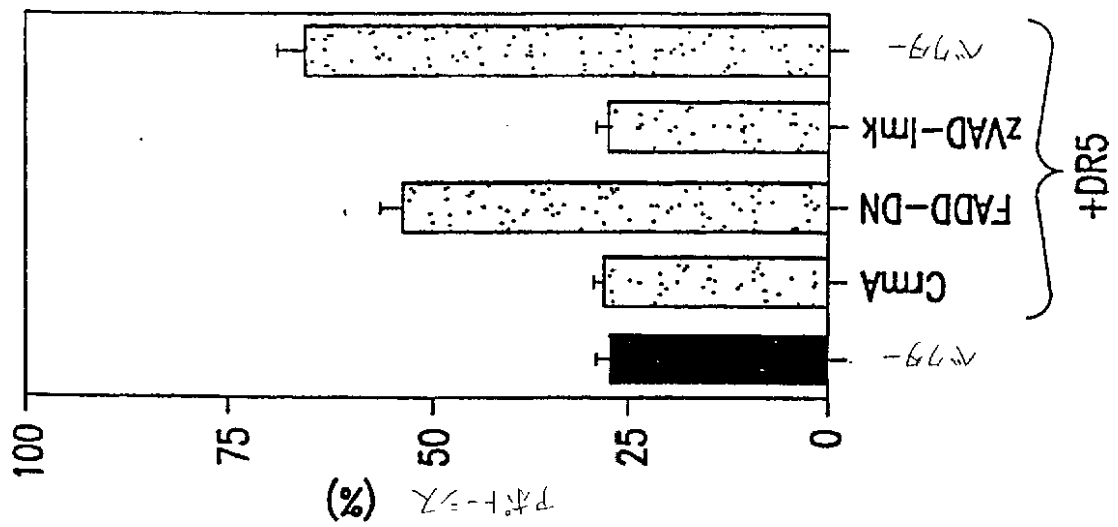
【図5A】




【図5B】



【図5C】



【 5 D】

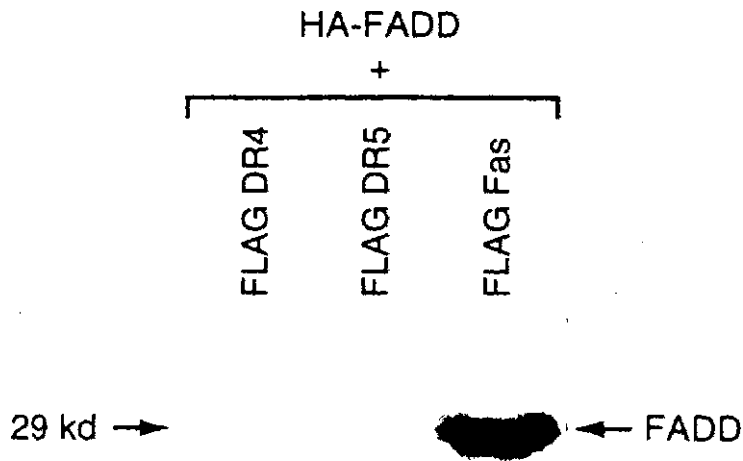
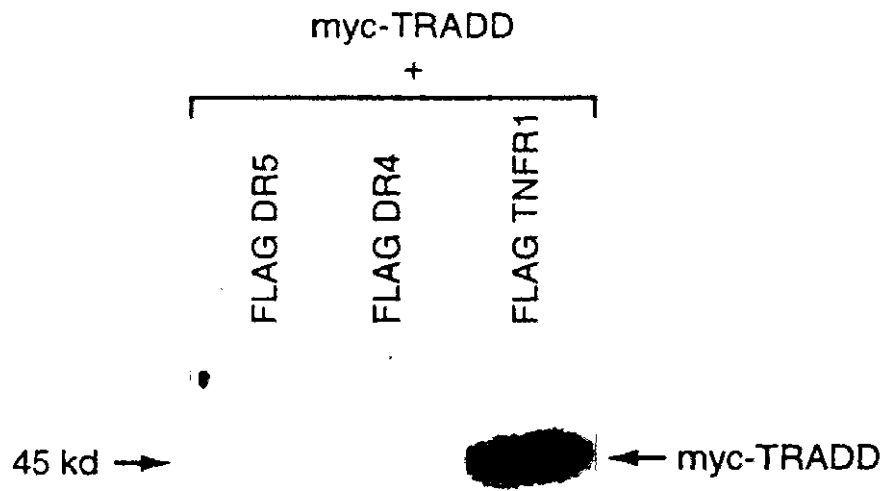
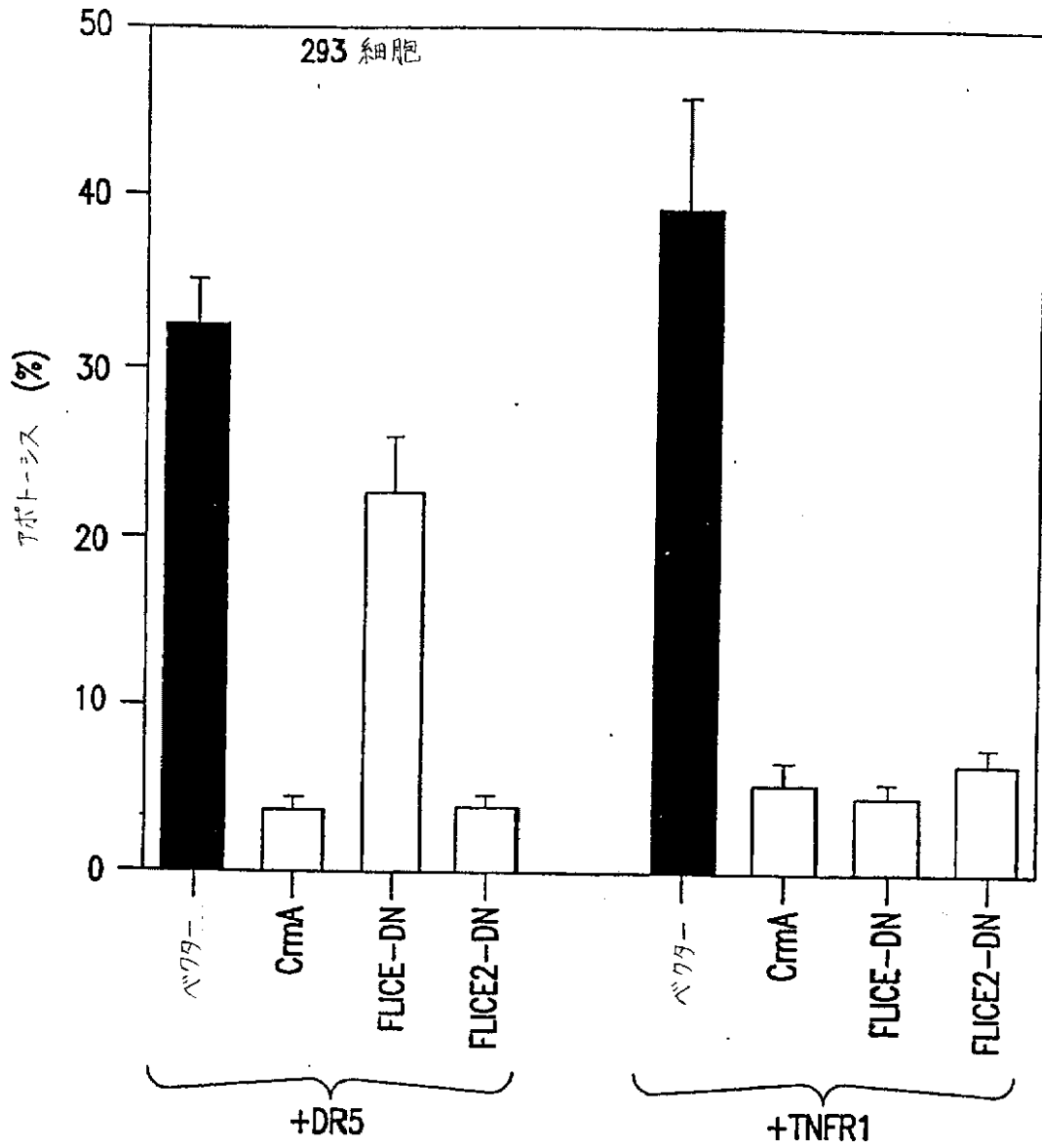


FIG.5D



【図5E】



【図6A】

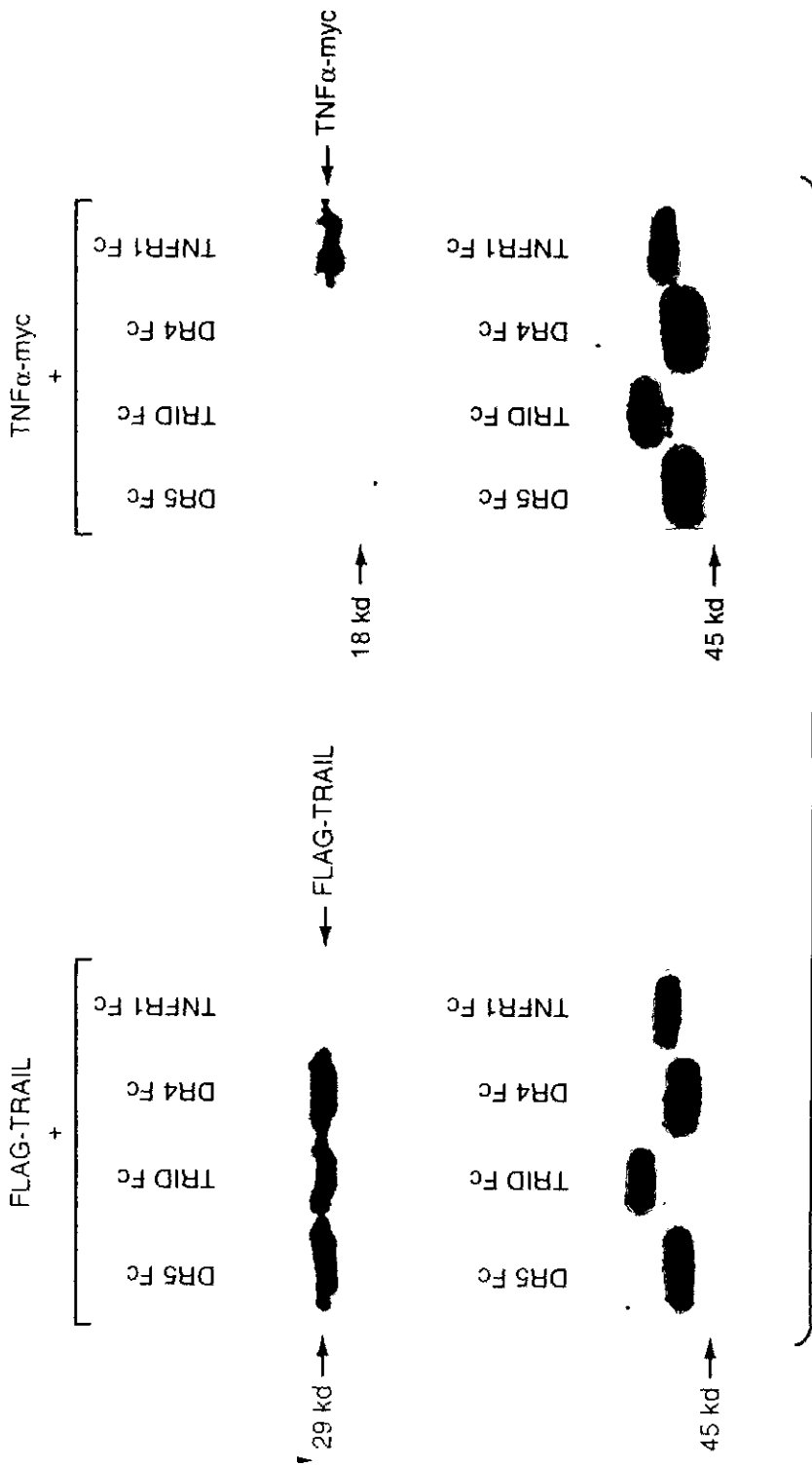
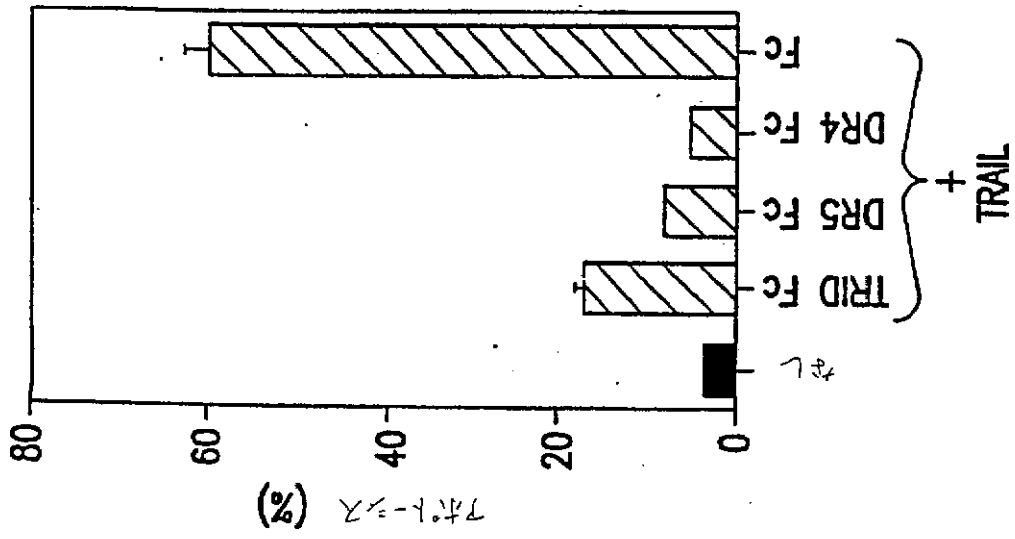
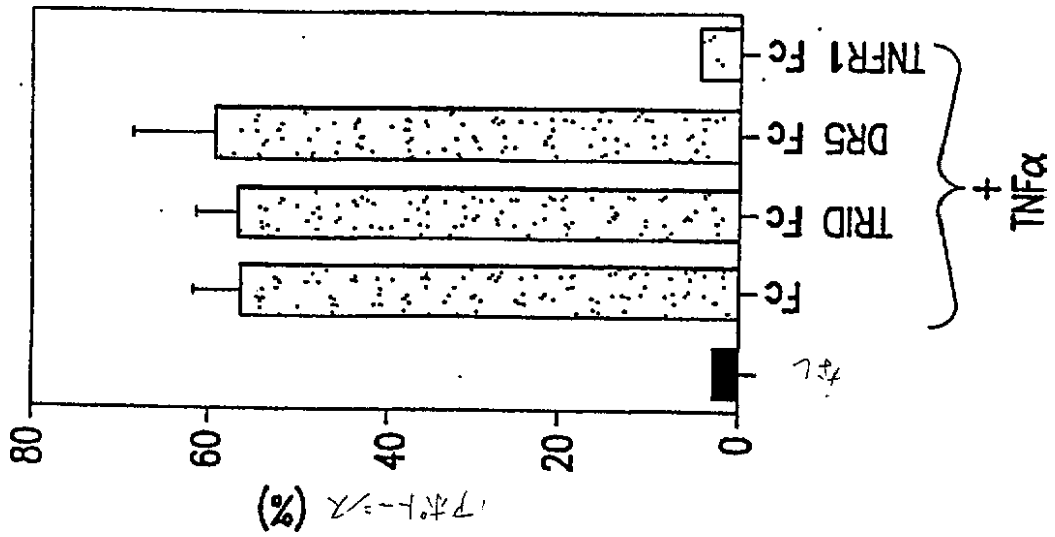


FIG.6A

【図6B】



【図6C】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/12041
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : 424/144.1, 184.1, 278.1, 809, 514/2, 885, 530/350, 351, 388.22 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) U.S. : 424/144.1, 184.1, 278.1, 809, 514/2, 885, 530/350, 351, 388.22 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, DIALOG medicine index; apoptosis, TRAIL, death domain, DR4, DR5, TNF		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHAUDHARY et al. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappa B pathway. Immunity. December 1997, Vol. 7, No. 6, pages 821-830, abstract in particular.	1-25
A	SCHNEIDER et al. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappa B. Immunity. December 1997, Vol. 7, No. 6, pages 831-836, abstract in particular.	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "B" earlier document 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 claim 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 *g* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 27 JULY 2000		Date of mailing of the international search report 30 AUG 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer F. PIERRE WANDERVEG <i>F. Pierre Wanderveg</i> Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US00/12041

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZAMAI et al. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. <i>J. Exp. Med.</i> 21 December 1998, Vol. 188, No. 12, pages 2375-2380, see entire document.	1-25
A	RIEGER et al. APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma? <i>FEBS Letters.</i> 01 May 1998, Vol. 427, No. 1, pages 124-128, see entire document.	1-25
A	MARSTERS et al. A novel receptor for APO2L/TRAIL contains a truncated death domain. <i>Current Biology.</i> 01 December 1997, Vol. 7, No. 12, pages 1003-1006, see entire document.	1-25
A	SAEED SHEIKH et al. p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. <i>Cancer Research.</i> 15 April 1998, Vol. 58, No. 8, pages 1593-1598, see entire document.	1-25

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US00/12041

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:**

IPC (7):

A61K 39/00, 39/395, 45/00; A01N 37/18; C07K 14/52, 14/525, 16/28

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 31/12		A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
		37/04	
		43/00	1 1 1
	1 1 1	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/705		17/08	
		19/00	
		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 15/09	Z N A	33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
		33/50	
		33/53	B
		33/566	
		33/577	C
// C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	
		A 6 1 K 37/02	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(31)優先権主張番号 60 / 148 , 939

(32)優先日 平成11年8月13日(1999.8.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 ニ, ジアン

アメリカ合衆国 メリーランド 20853,  
ロックビル, マナーフィールド ロード  
5502

(72)発明者 ジェンツ, レイナー エル.

アメリカ合衆国 メリーランド 20850,  
ロックビル マウント プロスペクト  
ドライブ 13608

(72)発明者 ユ, グオ-リャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94705,  
パークレイ, グラバット ドライブ

(72)発明者 ローゼン, クレイグ エイ.  
アメリカ合衆国 メリーランド 20882,  
レイトンズビル, ローリング ヒル  
ロード 22400

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA12 DA13 DA14  
DA36 DA77 DA78 FB02 FB03  
4B024 AA01 BA63 CA04 DA02 DA06  
EA04 FA02 GA11 HA01 HA12  
HA15  
4B064 AG27 AG31 CA02 CA10 CA19  
CC24 DA01  
4C084 AA01 AA02 AA07 AA16 BA01  
BA08 BA21 BA41 BA42 DA01  
DA25 DA50 MA02 ZB072  
ZB112 ZB262 ZB332 ZC422  
ZC542  
4C085 AA13 AA14 AA16 CC22 CC23  
EE03  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 BA57  
CA40 DA50 DA76 DA86 EA22  
FA74 FA81

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002543151A5</a>	公开(公告)日	2007-05-31
申请号	JP2000615040	申请日	2000-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	人类基因科学公司		
申请(专利权)人(译)	人类Jinomu科学公司		
当前申请(专利权)人(译)	人类Jinomu科学公司		
[标]发明人	ニジアン ジェンツレイナーエル ユグオリャン ローゼンクレイグエイ		
发明人	ニ, ジアン ジェンツ, レイナー エル. ユ, グオ-リャン ローゼン, クレイグ エイ.		
IPC分类号	A61K39/395 A61K45/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K14/705 C07K17/08 C07K19/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577 A61K38/00 C12N15/09 C12P21/02		
CPC分类号	C07K2319/00 A61K38/00 C07K2319/30 A61K39/395 C07K14/70578 A61P29/00 A61P31/12 A61P35 /00 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 A61K38/191 A61K38/19 A61K38/177 A61K31/00 A61K2300/00		
FI分类号	A61K39/395.U A61K39/395.G A61K45/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00. 111 C07K14/705 C07K17/08 C07K19/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/577.B A61K37/02 C12N15/00.ZNA.A C12P21/02.C		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045 /DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064 /AG31 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA16 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA41 4C084/BA42 4C084 /DA01 4C084/DA25 4C084/DA50 4C084/MA02 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4C084 /ZB332 4C084/ZC422 4C084/ZC542 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/CC22 4C085 /CC23 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/BA57 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/FA74 4H045/FA81		
优先权	60/132498 1999-05-04 US 60/133238 1999-05-07 US 60/148939 1999-08-13 US		
其他公开文献	JP2002543151A		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种新颖的含有受体5 ( DR5 ) 蛋白的死亡域, 该蛋白是肿瘤坏死因子 ( TNF ) 受体家族的成员, 目前被证明与TRAIL结合。特别地, 提供了编码人DR5蛋白的分离的核酸分子。还提供了DR5多肽, 以及提供了用于制备DR5多肽的载体, 宿主细胞和重组方法。本发明进一步涉及用于鉴定DR5活性的激动剂或拮抗剂的筛选方法。

