

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5752587号
(P5752587)

(45) 発行日 平成27年7月22日(2015.7.22)

(24) 登録日 平成27年5月29日(2015.5.29)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
C 1 2 Q	1/25	(2006.01)	C 1 2 Q	1/25	
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	Y
C O 7 K	16/28	(2006.01)	C O 7 K	16/28	

請求項の数 7 (全 74 頁)

(21) 出願番号	特願2011-284044 (P2011-284044)
(22) 出願日	平成23年12月26日(2011.12.26)
(62) 分割の表示	特願2007-554179 (P2007-554179) の分割
原出願日	平成18年1月31日(2006.1.31)
(65) 公開番号	特開2012-90636 (P2012-90636A)
(43) 公開日	平成24年5月17日(2012.5.17)
審査請求日	平成23年12月27日(2011.12.27)
(31) 優先権主張番号	60/649, 437
(32) 優先日	平成17年2月2日(2005.2.2)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	506387487 ザ ユーエービー リサーチ ファンデー ション アメリカ合衆国 アラバマ 35294- 0107, バーミンガム, セカンド アベニュー サウス 1720, アドミ ニストレーション ビルディング 770
(74) 代理人	100113402 弁理士 前 直美
(72) 発明者	チョウ, トン アメリカ合衆国 アラバマ 35226, バーミンガム, ウェスト ストーンブ ルック プレイス 332

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシス誘導デスレセプターアゴニストに対する抵抗性を低減することに関する薬剤及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デスレセプターアゴニスト抗体に対する抵抗性のバイオマーカーについて細胞をスクリーニングするインビトロの方法であって、DR5及びDDX3の会合をモニタリングする工程を含み、前記デスレセプターはDR5であり、かつ、前記会合が前記デスレセプターアゴニスト抗体に対する抵抗性を意味することを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記細胞を前記デスレセプターアゴニスト抗体と予め接触させる工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

デスレセプターアゴニスト抗体に対する抵抗性のバイオマーカーについて細胞をスクリーニングするインビトロの方法であって、カスパーゼ調節因子(IAP)とDDX3との会合をモニタリングする工程を含み、前記IAPはcIAP1及びcIAP2から選択され、前記デスレセプターはDR5であり、かつ、前記IAPとDDX3との会合が前記デスレセプターアゴニスト抗体に対する抵抗性を示すことを特徴とする、方法。

【請求項 4】

前記細胞を前記デスレセプターアゴニスト抗体と予め接触させる工程をさらに含む、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

デスレセプターアゴニスト抗体に対する抵抗性をインビトロでモニタリングする方法で

10

20

あって、生物学的試料中の c I A P 1 及び c I A P 2 から選択されるカスパーゼ調節因子と D D X 3 との会合を検出する工程を含み、前記デスレセプターは D R 5 であり、かつ、前記会合は デスレセプター (D R 5) アゴニスト抗体に対する抵抗性を示すことを特徴とする方法。

【請求項 6】

デスレセプターアゴニスト抗体に対する抵抗性をインビトロでモニタリングする方法であって、生物学的試料中の D D X 3 と D R 5 との会合を検出する工程を含み、前記デスレセプターは D R 5 であり、かつ、デスレセプター (D R 5) アゴニスト抗体に対する抵抗性を有する細胞の会合のレベルと同様の会合のレベルはデスレセプター (D R 5) アゴニスト抗体に対する抵抗性を示すことを特徴とする方法。

10

【請求項 7】

c I A P 1 及び c I A P 2 から選択される I A P と D D X 3 との会合を検出する工程であって、デスレセプター (D R 5) アゴニスト抗体に対する抵抗性を有する細胞の会合のレベルと同様の I A P 及び D D X 3 間の会合のレベルはデスレセプター (D R 5) アゴニスト抗体に対する抵抗性を示す工程、をさらに含む、請求項 6 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の参照)

20

本願は、2005年2月2日に出願された米国仮出願第60/649437号の利益を請求するものであり、この出願は参照によりその全体がここに援用される。

【0002】

(連邦により補助された研究に関する説明)

本発明は、米国国立衛生研究所 (the National Institutes of Health) によって与えられた助成金第 P 5 0 C A 8 3 5 9 1 号、第 P 5 0 C A 8 9 0 1 9 号及び第 U 1 9 A I 0 5 6 5 4 2 号の政府の支持によりなされたものである。政府は、本発明について所定の権利を有する。

【0003】

(発明の技術分野)

30

開示される本発明は、一般に、デスレセプターのアポトーシス誘導アゴニストに対する抵抗性を阻害する薬剤、及びがん及び自己免疫性又は炎症性疾患の治療におけるこのような薬剤及びアゴニスト及びバイオマーカーの用途に関する。

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

T N F 関連アポトーシス誘導リガンド (T R A I L) は、T N F スーパーファミリーの一員であり、がん細胞に対して強力なアポトーシス誘導活性を有する (Wiley, S.R., et al., 1995., Immunity, 3:673-682)。T N F - 及び F a s リガンドのような T N F スーパーファミリーの他の死誘導リガンドとは異なり、T R A I L は、がん治療剤の開発において特に興味深いものであるが、これは、T R A I L が正常細胞にはほとんど又は全く影響を及ぼさずに腫瘍細胞のアポトーシスを優先的に誘導するためである (Walczak, H., et al. 1999. Nat Med 5:157-163)。T R A I L に関して少なくとも 5 種のレセプターが同定されており、そのうち 2 種、D R 4 (T R A I L - R 1) 及び D R 5 (T R A I L - R 2) は、アポトーシスシグナルを伝達することができるが (Walczak, H., et al. 1997. Embo J 16:5386-5397; Pan, G., et al. 1997. Science 276:111-113; Chaudhary, P.M., et al. 1997. Immunity 7:821-830)、一方、それら以外の 3 種 (T R A I L - R 3 、 - R 4 及び O P G) は、T R A I L 媒介性アポトーシスをブロックするためのデコイレセプターとして役立つ (Pan, G., et al. 1997. Science 277:815-818; Marsters, S.A., et al. 1997. Curr Biol 7:1003-1006; Emery, J.G., et al. 1998. J Biol Chem 273:1

40

50

4363-14367)。Fas及びTNFR1と同様、DR4及びDR5の細胞内セグメントは、デスドメインを含んでおり、FADD及びカスパーゼ8依存性経路を通じてアポトーシスシグナルを伝達する(Walczak, H., et al. 1997. Embo J 16:5386-5397; Chaudhary, P. M., et al. 1997. Immunity 7:821-830; Kuang, A.A., et al. 2000. J Biol Chem 275:25065-25068)。マウス及び霊長類を含む実験動物におけるTRAILの組換え可溶性形態の投与は、全身毒性なしに有意な腫瘍退行を誘導する(Walczak, H., et al. 1999. Nat Med 5:157-163)。しかし、TRAILはヒトにおいて肝臓毒性のような副作用を誘起することが示されているため、TRAILレセプターの他のアゴニストが開発されてきた。

【0005】

独特のアゴニスト性モノクローナル抗DR5抗体であるTRA-8及びそのヒト化バージョンもしくはヒトバージョンを用いたDR5の選択的ターゲティングは、腫瘍細胞の効率的かつ選択的なアポトーシスを誘導することができる。すべてのTRAIL感受性がん細胞は、TRA-8媒介性アポトーシスに対して感受性であることが見出されている。化学療法剤は、インビボ及びインビトロの両方で腫瘍細胞のTRAIL媒介性アポトーシスを相乗的に増強することができる。たとえば、TRA-8とアドリアマイシン(Adriamycin)との組合せ療法は、いずれか一方単独の場合よりも有意に高い完全腫瘍退行率をもたらした(Buchsbaum, D.J., et al. 2003. Clin Cancer Res 9:3731-3741)。これらの結果は、化学療法剤がDR5のシグナル伝達又はアポトーシスを誘導するために必要なシグナルの閾値を調節する可能性があることを示唆する。TRA-8は、その有効性及び安全性に基づいて、がん治療法としての開発の候補として選択されてきた。前臨床研究により、TRA-8が、ヒトがんの異種移植片モデルにおいて、特に化学療法との組合せで、非常に強い抗がん有効性を有していることが示されている(Buchsbaum, D.J., et al. 2003. Clin Cancer Res 9:3731-3741)。さらに、サルがTRA-8の全身投与をよく許容することも示されている。サルDR5に対するTRA-8の結合は、ヒトDR5に対する結合と同様であり、サルは、48mg/kgもの高い用量を許容した。

【0006】

しかし、標的細胞によるデスレセプターの発現は、このレセプターに関するリガンドによるアポトーシスの誘導に対して細胞を感受性にするのに必ずしも十分ではない。一例として、ほとんどのがん細胞は高レベルのDR5を発現するが、これらはTRA-8によって誘導されるアポトーシスに対して必ずしも感受性ではなく、TRA-8は、DR5に対して特異的であり、デコイレセプターとは反応しない。そのうえ、がん細胞のような標的細胞は、TRA-8又はデスレセプターを通じてアポトーシスを誘導する他の薬剤類(たとえばDR4又はDR5)に対する抵抗性を示すことができる。この技術分野において必要とされているのは、抵抗性を予測するためのバイオマーカーであり、TRA-8のようなデスレセプターのアゴニストに対する標的細胞の抵抗性を低減する手段である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(本発明の簡単な概要)

ここで具体化され、広く記載されているとおりの本発明の目的にしたがえば、本発明は、ひとつの側面において、デスレセプターアゴニストに対する標的細胞の抵抗性を逆転させる又は防止する方法であって、標的細胞を、CARD含有タンパク質の1以上の活性の調節因子(Modulator)と接触させることを含み、その調節がアゴニストに対する抵抗性を逆転させる又は防止するものである、方法に関する。

【0008】

ここで提供されるのは、デスレセプターアゴニストに対する抵抗性のバイオマーカーについて細胞をスクリーニングする方法であって、細胞を、総DDX3又はそのホモログについてアッセイすることを含み、高レベルがアゴニストに対する抵抗性を意味する、方法である。

【0009】

10

20

30

40

50

ここで提供されるのは、デスレセプターアゴニストに対する抵抗性のバイオマーカーについて細胞をスクリーニングする方法であって、デスレセプター及びCARD含有タンパク質の会合をアッセイすることを含み、会合の高レベルがアゴニストに対する抵抗性を意味する、方法である。

【0010】

ここで提供されるのは、デスレセプターアゴニストに対する抵抗性のバイオマーカーについて細胞をスクリーニングする方法であって、a)細胞をデスレセプターアゴニストと接触させる工程、b)デスレセプター及びCARD含有タンパク質のフラクションの会合をモニタリングする工程、を含み、会合がアゴニストに対する抵抗性を意味する、方法である。

10

【0011】

さらに提供されるのは、デスレセプターアゴニストに対する抵抗性のバイオマーカーについて細胞をスクリーニングする方法であって、カスパーゼ又はカスパーゼの調節因子(たとえば、cIAP1、cIAP2、XIAP、サバイピン)とCARD含有タンパク質との会合をモニタリングする工程、及び既知の抵抗性及び非抵抗性対照細胞由来の試料と会合のレベルを比較する工程を含み、抵抗性細胞の場合と同様のレベルでのIAPとCARD含有タンパク質との関連がアゴニストに対する抵抗性を意味する、方法である。場合によっては、スクリーニングされるべき細胞は、デスレセプターアゴニスト(たとえばアゴニスト性抗体)と予備的に接触させる。

【0012】

ここで提供されるのは、被検対象におけるデスレセプターアゴニストに対する抵抗性をモニタリングする方法であって、(a)被検対象から生物学的試料を得る工程、及び(b)この試料中のデスレセプターとCARD含有タンパク質との会合を検出する工程を含み、この会合が抵抗性を示す、方法である。

20

【0013】

さらに提供されるのは、被検対象におけるデスレセプターアゴニストに対する抵抗性をモニタリングする方法であって、(a)被検対象から生物学的試料を得る工程、及び(b)この試料中のCARD含有タンパク質とカスパーゼ又はカスパーゼの調節因子との会合を検出する工程を含み、この会合が抵抗性を示す、方法である。

【0014】

同様に提供されるのは、デスレセプターを発現する標的細胞において選択的にアポトーシスを誘導する方法であって、(a)デスレセプターと特異的に結合する治療量のデスレセプターアゴニストと標的細胞とを接触させる工程、及び(b)標的細胞に、治療量のCARD含有タンパク質の1以上の活性の調節因子を投与する工程を含む、方法である。

30

【0015】

提供されるのは、がんを患う被検対象を治療する方法であって、この被検対象に、治療量の(a)デスレセプターアゴニスト及び(b)CARD含有タンパク質の1以上の活性の調節因子を投与する工程を含み、調節因子がデスレセプターアゴニストに対する抵抗性を低減させる、方法である。

40

【0016】

同様に提供されるのは、炎症性疾患又は自己免疫性疾患を患う被検対象を治療する方法であって、この被検対象に、治療量の(a)デスレセプターアゴニスト及び(b)CARD含有タンパク質の1以上の活性を調節する薬剤を投与する工程を含み、調節因子がデスレセプターアゴニストに対する抵抗性を低減させる、方法である。

【0017】

ここで提供されるのは、(a)デスレセプターアゴニスト及び(b)CARD含有タンパク質の1以上の活性を調節する薬剤を含む組成物であって、調節因子がデスレセプターアゴニストに対する抵抗性を低減させる、組成物である。

【0018】

50

さらに提供されるのは、s h R N Aを含む単離された核酸であって、このs h R N AがC A R D含有タンパク質の発現を阻害する、核酸である。

【0019】

同様に提供されるのは、デスレセプターのC A R D含有タンパク質結合領域をコードする単離されたポリペプチドであって、このポリペプチドは25個未満のアミノ酸残基を含む、ポリペプチドである。

【0020】

さらに提供されるのは、C A R D含有タンパク質のデスレセプター結合ドメインを含む単離されたポリペプチドである。

【0021】

開示された方法及び組成物の付加的な利点は、一部は後述の説明において記載されており、また、一部はその説明から理解されるか、又は開示された方法及び組成物の実施によって学ぶことができる。開示された方法及び組成物の利点は、添付の特許請求の範囲において具体的に指摘された要素及び組合せによって実現され、得られることになる。前述の一般的な説明及び後述の詳細な説明の両方が、例示的及び説明的であるに留まるものであり、特許請求がされている本発明の制限的なものではないことは理解されるべきである。

【発明を実施するための形態】

【0022】

(発明の詳細な説明)

開示された方法及び組成物は、以下の具体的な態様の詳細な説明及びそこに含まれる実施例、ならびに図面及びその以前及び以下の記載を参照することにより、さらに容易に理解されるであろう。

【0023】

腫瘍細胞のデスレセプター媒介性アポトーシスの誘導は、がん療法に関して極めて有望なアプローチである。すべてでないとしてもほとんどの療法において、ある程度の標的細胞は抵抗性である。一例として、T R A - 8、これは独特のアゴニスト性モノクローナル抗D R 5抗体であるが、これは、肝細胞毒性を伴わずにヒトがん細胞のアポトーシスを誘導し(Ichikawa, K., et al. 2001 Nat Med 7:954-960)、動物モデルにおいて強い抗がん効率を示し(Buchsbaum, D.J., et al. 2003 Clin. Cancer Res 9:3731-3741)、そして、非ヒト霊長類における毒性研究において安全性が証明されている。したがって、T R A - 8は、ここにおいて例として使用されるが、デスレセプター(たとえばD R 4又はD R 5)活性化を通じてアポトーシスを誘導するその他の薬剤も、ここで教示される方法において使用することができる。T R A - 8、及びそのヒト化された及びヒトのバージョンは、抗がん療法として臨床開発中であるが、いくつかの腫瘍細胞株は、妥当なレベルのD R 5発現にもかかわらずT R A - 8媒介性アポトーシスに対して抵抗性である。これらの観察は、この抵抗性がレセプターの発現に関連するものではなく、むしろD R 5によって開始されるシグナリング機構に関するものであることを示唆する。たしかに、D R 5媒介性アポトーシスは、一般的な化学療法剤によって有意に増強することができる(Ohtsuka, T.及びT. Zhou. 2002. J Biol Chem, 277:29294-29303; Ohtsuka, T., D. et al., 2003. Oncogene, 22:2034-2044)。開示されるのは、デスレセプターと結合しカスパーゼ活性化を阻害するC A R D含有タンパク質のファミリーをターゲティングすることによりデスレセプターアゴニストに対する抵抗性を阻害するための組成物及び方法である。

【0024】

開示された方法及び組成物は、別途特定されていない限り、特異的な合成の方法、特異的な分析技術又は特定の試薬に限定されず、変わりうることは理解されるべきである。また、ここで使用される用語法は、特定の態様を説明する目的のみのためであり、限定的であることを意図しないことも理解されるべきである。

【0025】

開示されているのは、開示された方法及び組成物のために使用されることができ、それらと関連して使用されることができ、それらを調製するために使用されることができ、又

10

20

30

40

50

は開示された方法及び組成物の生成物である、材料、組成物及び成分である。これらの及び他の材料は、ここで開示されており、これらの材料の組合せ、サブセット、相互作用、グループ等が開示される場合、これらの化合物の各々の種々の個別のもの及び集合的な組合せ及び並べ替えの具体的な参照は必ずしも明示的に開示されていないが、それぞれがここで具体的に企図され説明されていることは理解されるべきである。たとえば、ひとつのベクターが開示され考察され、かつプロモーターを含む多数のベクター成分が考察されている場合、プロモーター及び他のベクター成分の各々の及びすべての組合せ及び並べ替え及び可能な改変は、そうでないことが具体的に示されていない限り、具体的に企図されている。したがって、ひとつのクラスの分子A、B及びCならびにひとつのクラスの分子D、E及びFが開示され、組合せ分子の例A-Dが開示されている場合、各々が個別に言及 10
されていなくても、各々が個別にかつ集合的に企図されている。したがって、この例においては、A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E及びC-Fの組合せの各々が、具体的に企図されており、A、B及びC；D、E及びF；及び例示の組合せA-Dの開示から開示されたものと考えられるべきである。同様に、これらの任意のサブセット又は組合せもまた、具体的に企図され、開示されている。したがって、たとえば、A-E、B-F及びC-Eのサブグループは、具体的に企図され、A、B及びC；D、E及びF；及び例示の組合せA-Dの開示から開示されたものと考えられるべきである。この考え方は、開示された組成物の製造及び使用の方法の工程を含め、しかしこれらに限らず、本出願のすべての側面に適用される。したがって、行うことができる多様な付加的な工程がある場合、これらの付加的な工程の各々は、開示された方法の任意の具体的な態様又はその組合せとともに行うことができること、また、各々のこのような組合せが具体的に 20
企図されており、開示されていると考えられるべきであることは理解されるべきである。

【0026】

種々の配列がここで提供されており、これら及びその他のものは、Genbankにおいて、「www.pubmed.gov」で見出すことができる。当業者は、配列の不一致及び相違を解析する方法、及び特定の配列に関する組成物及び方法を他の関連配列に適合させる方法を理解する。プライマー及び/又はプローブは、ここで開示された情報及び当該技術分野において公知の情報が与えられれば、任意の配列について設計することができる。

【0027】

提供されているのは、標的細胞を、CARD含有タンパク質の1以上の活性の調節因子と接触させることを含む、デスレセプターアゴニストに対する標的細胞の抵抗性を逆転させる方法又は予防する方法であって、この調節が、アゴニストに対する抵抗性を逆転させ又は予防する、方法である。この方法は、アポトーシスのシグナリングの研究、がん、及び自己免疫性及び炎症性障害のような疾患の治療に有用である。したがって、この方法の接触工程は、インピボ又はインピトロで行うことができる。

【0028】

終始用いられる「逆転」又は「逆転させる」は、反対の位置、方向又は経路に変えること、たとえばある疾患の経過を悪化することから改善することへ変えることを意味する。たとえば、デスレセプター抵抗性の場合には、デスレセプターアゴニストに対する標的細胞の抵抗性を逆転させることは、細胞を、そのアゴニストに対してより少なく抵抗性にする 40
ことである。したがって、たとえば、100%抵抗性の標的細胞の抵抗性を逆転させることは、この標的細胞を、このデスレセプターアゴニストに対して90%~0%抵抗性(90%、85%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%及び0%抵抗性を含む)にすることができる。

【0029】

終始用いられている「予防(する)」は、特に前もっての計画又は作用によって、何かが起こることを排除し、回避し、未然に防ぎ、妨害し、停止させ又は邪魔をすることを意味する。たとえば、デスレセプター抵抗性の場合には、デスレセプターアゴニストに対する標的細胞の抵抗性を予防することは、その細胞を、そのアゴニストに対して抵抗性にな 50

る能力をより少なくすることである。したがって、たとえば、標的細胞において100%抵抗性を予防することは、その標的細胞が、そのデスレセプターアゴニストに対して0%~90%のみ抵抗性(0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%及び90%抵抗性を含む)であることをもたらすことができる。

【0030】

「逆転」又は「予防」は、程度における変化又は程度における任意の変化の遅れを指す。したがって、デスレセプター抵抗性の場合には「逆転」又は「予防」は、抵抗性の増大の経過を低減させること又は抵抗性の増大を遅らせることを含む。

【0031】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形の「ひとつの」(「a」、「an」)及び「その(この)」、「the」)は、文脈が明らかにそうでないことを示す場合でない限り、複数を含む。したがって、たとえば、「ひとつのポリペプチド」は、そのようなポリペプチドの複数を含み、「そのポリペプチド」についての言及は1又はそれ以上のポリペプチド及び当業者に公知のその等価物等についての言及である。

【0032】

「付加的な」又は「場合によっては」は、その後に記載される事象、状況又は材料が、起こっても起こらなくてもよく、又は存在してもしなくてもよく、そして、その記載が、その事象、状況又は材料が、起こる又は存在する場合と、起こらない又は存在しない場合とを含むことを意味する。

【0033】

範囲は、ここで、「約」ある特定の値から、及び/又は「約」別の特定の値までとして表現され得る。このような範囲が表現されている場合、文脈が具体的にそうでないことを示さない限り、同じく具体的に企図され、開示されていると考えられるのは、そのひとつの特定の値から及び/又は別の特定の値までの範囲である。同様に、先行する「約」の語を用いることによって値が近似値で表されている場合、この特定の値が、別の、文脈が具体的にそうでないことを示さない限り具体的に企図され開示されていると考えられるべき態様を形成することは理解されるであろう。さらに、それらの範囲の各々の終点は、文脈が具体的にそうでないことを示さない限り、他方の終点との関連において及び他方の終点とは独立であることにおいての両方で有意であることも理解されるであろう。最後に、明示的に開示された範囲内に含まれるすべての個別の値及び値の下位範囲もまた、文脈が具体的にそうでないことを示さない限り、具体的に企図され、開示されていると考えられるべきであることは理解されるべきである。上記は、いくつかの特定の場においてこれらの態様のいくつか又は全てが明示的に開示されているかどうかにかかわらず、適用される。

【0034】

終始用いられている「標的細胞」は、ターゲティングされるデスレセプターを担持する細胞を意味し、たとえば、DR5又はDR4を発現する細胞を含み、例示的には、乳頭腫及びいぼ；乳がん、結腸がん、肝がん、白血病、肺がん、メラノーマ、ミエローマ、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、頭頸部がん、甲状腺がん、子宮がん、星状細胞腫のような脳腫瘍、活性化免疫細胞(たとえば、活性化されたリンパ球、リンパ様細胞及び骨髓細胞)、炎症性細胞、慢性関節リウマチ滑液細胞、及びウイルス感染細胞のような、異常に生育する細胞及び腫瘍細胞を含む。インビボにおいて、標的細胞は、病理学的状態の個体の細胞であって、がん及び慢性関節リウマチのような、細胞増殖が異常又は制御不良であるものを含む。標的細胞としては、ヒト、非ヒト霊長類、ネコ、イヌ、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ニワトリ、ブタ、マーモセット及びケナガイタチ細胞、又は種々の細胞系統の細胞(たとえばJurkat細胞)が挙げられる。

【0035】

「デスレセプター」は、いったんリガンドによって結合されたら細胞のアポトーシスを

10

20

30

40

50

誘導するレセプターを意味する。デスレセプターとしては、たとえば、デスドメインを有する腫瘍壊死因子(TNF)レセプタースーパーファミリーのメンバー(たとえばTNFR1、Fas、DR3、4、5、6)、及びデスドメインを有さないTNFレセプタースーパーファミリーのメンバー、LTbetaR、CD40、CD27、HVEMが挙げられる。

【0036】

たとえばDR5を介したシグナル伝達は、DR5媒介性アポトーシスの制御における鍵となる機構である。TNFRスーパーファミリーのデスレセプターの共通の特徴は、それらがすべてその細胞質テールに保存された「デスドメイン」を有することである(Zhou, T., et al. 2002 Immunol Res 26:323-336)。DR5媒介性アポトーシスがデスドメインで開始されることは十分に確立されている。TRAIL又はアゴニスト性抗DR5抗体による細胞表面でのDR5の架橋は、DR5のオリゴマー化をもたらし、それに直ちに引き続いてDR5のデスドメインへのFADDの動員が起こる(Bodmer, J.L., et al. 2000. Nat Cell Biol 2:241-243; Chaudhary, P.M., et al. 1997. Immunity 7:821-830; Kuan, A.A., et al. 2000. J Biol Chem 275:25065-25068; Schneider, P., et al. 1997. Immunity 7:831-836; Sprick, M.R., et al. 2000. Immunity 12:599-609)。デスドメインと結合したFADDは、さらに開始因子であるプロカスペーゼ8及び/又はプロカスペーゼ10を動員し、特異親和性(homophilic)DD相互作用を通じてDISCを形成する(Krammer, P.H. 2000. Nature 407:789-795)。活性化されたカスペーゼ8及び10は、カスペーゼ3を直接活性化することができ、あるいは、BH3含有タンパク質Bidを切断して、サイトクロームCの放出及びカスペーゼ9活性化を通じてミトコンドリア依存性アポトーシス経路を活性化する(Desagher, S.及びJ.C. Martinou. 2000. Trends Cell Biol 10:369-377; Scaffidi, C., et al. 1998. Embo J 17:1675-1687)。デスドメイン複合体の形成に続いて、カスペーゼ、NF- κ B及びJNK/p38のようないくつかのシグナル伝達経路が活性化される。これらのシグナル経路の活性化は、タンパク質のBcl-2及びIAPファミリーを通じたデスレセプター媒介性アポトーシスの調節をもたらす。

【0037】

「アゴニスト」は、細胞上のレセプター(たとえばデスレセプター)と一緒にすることができ、内在性リガンドの結合によって典型的に生成される反応又は活性(たとえばアポトーシス)と同じものを開始することができる物質(分子、薬剤、タンパク質等)を意味する。本発明の方法のアゴニストは、デスレセプターリガンドであることができる。したがって、アゴニストは、TNF、Fasリガンド又はTRAILであることができる。アゴニストは、さらに、これらのリガンドのフラグメントであることができ、そのフラグメントは、デスレセプターと結合し、活性化することができるように、デスレセプター結合ドメインを含む。アゴニストは、さらに、融合タンパク質であることができ、この融合タンパク質は、デスレセプターと結合し、活性化することができるように、デスレセプター結合ドメインを含む。アゴニストは、さらに、融合タンパク質であることができ、この融合タンパク質は、デスレセプターと結合し、活性化することができるように、デスレセプター結合ドメインを含む。アゴニストは、さらに、TNF、Fas又はTRAILと少なくとも85%相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであることができ、このホモログは、デスレセプターの結合及び活性化を行なうことができる。

【0038】

アゴニストは、さらに、デスレセプターに結合するアポトーシス誘導性抗体であることができる。「抗体」は、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、単鎖、ヒト化されたもの、完全なヒト抗体あるいはそれらの任意のFab又はF(ab')₂フラグメントであることができる。「アポトーシス誘導性抗体」は、ここで提供される方法を用いた活性化の前又は後に、プログラムされた細胞死を引き起こす抗体を意味する。したがって、本発明の方法のアゴニストは、Fas、TNFR1又はTRAILデスレセプターに対して特異的な抗体であることができ、その抗体はデスレセプターを活性化することができる。

10

20

30

40

50

アゴニストは、DR4又はDR5に対して特異的な抗体であることができる。アゴニストは、ATCC受託番号PTA-1428(たとえば、TRA-8抗体)、ATCC受託番号PTA-1741(たとえば、TRA-1抗体)、ATCC受託番号PTA-1742(たとえば、TRA-10抗体)を有するマウス-マウスハイブリドーマと同じエピトープ特異性を有する又はそれらによって分泌される、DR5抗体であることができる。アゴニストは、ATCC受託番号PTA-3798(たとえば、2E12抗体)を有するハイブリドーマと同じエピトープ特異性を有する又はそれらによって分泌される、抗体であることができる。

【0039】

本発明の方法の抗体によってターゲティングされるTRAILレセプターは、DR4又はDR5であることができる。このようなレセプターは、公開された特許出願WO99/03992、WO98/35986、WO98/41629、WO98/32856、WO00/66156、WO98/46642、WO98/5173、WO99/02653、WO99/09165、WO99/11791、WO99/12963及び公開された米国特許第6,313,269号に記載されており、これらのすべては参照によりそこに教示されたレセプターに関してその全体がここに援用される。これらのレセプターに対して特異的なモノクローナル抗体は、当業界で公知の方法を用いて生成することができる。たとえば、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495-497 (1975)及びEur. J. Immunol. 6:511-519 (1976)を参照されたい。それらの両方は、これらの方法に関してその全体がここに援用される。また、公開された特許出願WO01/83560に教示された方法も参照されたい。それは、参照によりその全体がここに援用される。

【0040】

本発明の方法の抗体は、当業界で公知の抗体であることができ、たとえば、ATCC受託番号PTA-1428(たとえば、TRA-8抗体)、ATCC受託番号PTA-1741(たとえば、TRA-1抗体)、ATCC受託番号PTA-1742(たとえば、TRA-10抗体)を有するマウス-マウスハイブリドーマと同じエピトープ特異性を有する又はそれらによって分泌される、DR5抗体が挙げられる。他の例としては、ATCC受託番号PTA-3798(たとえば、2E12抗体)を有するハイブリドーマと同じエピトープ特異性を有する又はそれらによって分泌される、抗体が挙げられる。

【0041】

「CARD含有タンパク質」は、カスパーゼ関連動員ドメイン(CARD)を含み、デスレセプターと結合する能力を特徴とし、結合が場合によってはデスドメインの外であり、前記デスレセプターのデスドメインによってアポトーシスの活性化を調節する、タンパク質のファミリーを意味する。DDX3は、このファミリーの代表的なメンバーである。CARD含有タンパク質としては、DEAD(配列番号21)ボックスタンパク質ファミリーのRNAヘリカーゼが挙げられる。開示されたCARD含有タンパク質は、たとえば、DDX3(配列番号25、受託番号gi:13514816)、mda-5(受託番号gi:11344593)又はRIG-1(受託番号gi:6048564)であることができる。CARD含有タンパク質は、さらに、DDX3、mda-5又はRIG-1に対して少なくとも85%の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであることができる。

【0042】

DEADボックスタンパク質ファミリーのRNAヘリカーゼは、細菌から哺乳類まで高度に保存されており、RNAの関与する種々の代謝経路に関与し、細胞の生存に関して重要である(Heinlein, U.A. 1998. J Pathol. 184:345-347)。タンパク質のこのファミリーのすべてのメンバーは、このファミリーの名前の由来である特徴的なアミノ酸配列D-E-A-D(Asp-Glu-Ala-Asp、配列番号21)から構成されるATPアーゼモチーフを有する。DEAD(配列番号21)ボックスタンパク質は、翻訳開始、RNAスプライシング、リボソームのアセンブリー、RNA分解、mRNA安定性、及びRNAエディティングに必要な、リボ核酸結合タンパク質のようなRNAヘリカーゼである

と一般に信じられている。これらのRNAヘリカーゼのいくつかが特別の転写因子の翻訳において重要な役割を果たす一方、いくつかのものの過剰発現は、発がんに関連している。DDX1は、神経芽腫においてN-mycと共増幅される(George, R.E., et al. 1996. *Oncogene* 12:1583-1587; Godbout, R., et al. 1998. *J Biol Chem* 273:21161-21168)。RNAヘリカーゼであるp68は、相当する正常組織と比較して腫瘍において一貫して過剰発現される。蓄積したp68は、ポリユビキチン化されているようであり、これらの腫瘍におけるプロテオソーム媒介性分解の欠陥の可能性が示唆され(Causevic, M., et al. 2001. *Oncogene* 20:7734-7743)、p68発現の制御不良が腫瘍発症の初期段階において起こることが示唆される。DEAD(配列番号21)ボックスタンパク質/RNAヘリカーゼファミリーのrck/p54は、c-mycタンパク質の合成を増大させることによって翻訳レベルでヒト結腸直腸腫瘍の発症における細胞増殖及び発がんに寄与することができる(Hashimoto, K., et al. 2001. *Carcinogenesis* 22:1965-1970)。DDX3は、このファミリーのメンバーであるが、DDX3のRNAヘリカーゼ機能は未知である(Fu, J.J., et al. 2002. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 34:655-661)。DDX3はHCVコアタンパク質と相互作用することができ、HCVウイルスタンパク質の翻訳を調節できると報告されている(Owsianka, A.M. and A.H. Patel. 1999. *Virology* 257:330-340)。

【0043】

RNAヘリカーゼのいくつかは、保存されたCARD(カスパーゼ動員ドメイン; Yoneyama, M., et al. 2004. *Nat Immunol* 5:730-737; Kang, D.C., et al. 2004. *Oncogene* 23:1789-1800; Kang, D.C., et al. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:637-642)を含む。サブトラクションハイブリダイゼーションにより、メラノーマ分化関連遺伝子5(mda-5)が、分化、がんの逆転及びプログラムされた細胞死(アポトーシス)の間に誘導された遺伝子として同定された。この遺伝子は、カスパーゼ動員ドメイン及び推定DEXHグループのRNAヘリカーゼドメインの両方を含む。mda-5は、IFN誘導性成長阻害及び/又はアポトーシスの媒介因子として機能する(Kang, D. C, et al. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:637-642)。より最近の研究により、mda-5 mRNAのレベルは正常組織においては低いが、一方、発現は、IFN- γ により正常及びがん細胞のスペクトルにおいて誘導されることが示されている。複製不能のアデノウイルスであるAd.mda-5によるmda-5の発現は、形態学的、生化学的及び分子アッセイにより確認されたとおりHO-1細胞においてアポトーシスを誘導する(Kang, D.C., et al. 2004. *Oncogene* 23:1789-1800)。レチノイン酸誘導可能遺伝子I(RIG-I)は、カスパーゼ動員ドメインを含むDEXD/HボックスRNAヘリカーゼをコードしており、機能的スクリーニング及びアッセイにより評価したところdsRNA誘導性シグナリングの必須レギュレーターである。インタクトなATPアーゼ活性を有するヘリカーゼドメインは、dsRNA媒介性シグナリングに関与していた。カスパーゼ動員ドメインは、シグナルを「下流へ」伝達し、転写因子NF- κ B及びIRF-3の活性化をもたらした。これらの因子による続いての遺伝子活性化は、タイプIインターフェロン産生を含む抗ウイルス機能を誘導した(Yoneyama, M., et al. 2004. *Nat Immunol* 5:730-737)。

【0044】

カスパーゼ関連動員ドメイン(CARD)を含むタンパク質は、細胞死の鍵となるレギュレーターとして確立されている。CARDは、ある種のカスパーゼのプロドメインのN末端に見出される保存されたヘリックスバンドルから構成される。CARDはまた、種々の他のタンパク質にも見出される。デスドメインタンパク質のように、CARDは、CARD/CARD相互作用を介してタンパク質のコミュニケーションを可能にする同型タンパク質相互作用モチーフとして機能する。CARDを有するタンパク質は、プロアポトーシス性又はアンチ(抗)アポトーシス性のいずれかであり得る。プロアポトーシス性CARDタンパク質としては、カスパーゼ2、4及び9のようなある種のカスパーゼ及びApaf1が挙げられ、これらはアポトーシスの開始において重要な役割を果たす。代表的な抗アポトーシス性CARDタンパク質としては、cIAP1及びcIAP2が挙げら

10

20

30

40

50

れ、これらはカスパーゼのCARDと相互作用し、それらのBIRドメインを介してカスパーゼ活性化を阻害する。タンパク質のこのファミリーの機能の多くの側面は、がん治療における新規薬剤標的としての潜在的有用性を示す。いくつかのCARD含有タンパク質は、保存された細胞死マシナリーの重要な成分であり、これは、制御不良となった場合、発がんを促進し、化学療法に対する腫瘍抵抗性に顕著に寄与する。プロアポトーシス性タンパク質であるApaf1は、いくつかのがんにおいては不活性化されており、ミトコンドリア誘導性アポトーシスに関しては欠くことのできないCARDタンパク質である。IAPファミリーのタンパク質のような他の抗アポトーシス性CARDタンパク質は、細胞死刺激から腫瘍を保護すること、及びある種の形態のがんにおいて過剰発現されることが示されてきた。したがって、CARDタンパク質を活性化又は阻害する治療剤は、従来の化学療法とともに用いられる場合、化学感作剤又はアポトーシスの調節因子として利用することができる。

10

【0045】

デスレセプターアゴニストに対する抵抗性は、開示されたCARD含有タンパク質の活性に帰属させることができる。したがって、本発明の方法は、この抵抗性を防止するための、CARD含有タンパク質の1以上の活性を調節する組成物を提供する。「調節する(modulates)」は、形態又は機能における、上方調節(アップレギュレーション)、下方調節(ダウンレギュレーション)、活性化、アンタゴニズム又はその他の変更を意味する。タンパク質の「活性」としては、たとえば、転写、翻訳、細胞内転位、分泌、キナーゼによるリン酸化、プロテアーゼによる切断、他のタンパク質に対する特異親和性(homophilic)及び異好性(heterophilic)の結合、ユビキチン化が挙げられる。CARD含有タンパク質の活性は、部分的には、デスレセプター結合アミノ酸での又はその近傍でのリン酸化によるので、提供された調節因子は、CARD含有タンパク質リン酸化の阻害剤であることができる。したがって、調節因子はキナーゼ又はホスファターゼの阻害剤であることができる。一例として、調節因子は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3(GSK-3)活性の阻害剤であることができる。

20

【0046】

GSK-3は、哺乳類を含め、種々の生物において見出されるタンパク質キナーゼである。2種のほとんど同一の形態のGSK-3、GSK-3 α 及びGSK-3 β が存在する。阻害剤は、任意の既知又は新たに発見されたGSK-3阻害剤であることができる。最適には、提供される方法のGSK-3阻害剤は、少なくともGSK-3を阻害する。ヒトGSK-3 β についてのアミノ酸配列は、Genbank受託番号P49841で、及び対応するヌクレオチド配列は受託番号NM_002093で、入手することができる。実験及びスクリーニングの目的のためには、動物モデルを用いることが望ましい可能性がある。たとえば、ラットGSK-3 β 配列は、Genbank受託番号P18266で、及びマウスはGenbank受託番号AAD39258で、入手することができる。

30

【0047】

GSK-3阻害剤は、ここで用いる場合、競合的又は非競合的酵素阻害によって;たとえばターゲティングされた遺伝子破壊により、GSK-3遺伝子の転写を低減することにより、タンパク質不安定性を増大すること等により、タンパク質レベルを低減することによって、直接又は間接に、細胞におけるGSK-3のレベルを低減する、化合物である。阻害剤は、小さい有機又は無機分子、アンチセンス核酸、抗体又はそれらに由来するフラグメント等であることができる。GSK-3のその他の阻害剤は、コンビナトリアル又は他の化学的ライブラリーをGSK-3活性の阻害についてスクリーニングすることを通じて見出すことができる。

40

【0048】

GSK-3タンパク質の直接的な阻害剤の例としては、リチウム(Li⁺) (Klein et al. 1996)が挙げられ、これは強力にGSK-3活性を阻害するが(K_i = 2 mM)、他のタンパク質キナーゼの一般的な阻害剤ではない。ベリリウムイオン類(Be²⁺)は、GSK-3のより強力な阻害剤であって、マイクロモルの範囲で阻害する。しかし、こ

50

の阻害効果は、リチウムほど選択的ではなく、低用量でCDK1をも阻害する。

【0049】

GSK-3阻害剤は、また、アロイシン(aloisine)、アロイシンA(aloisine A)、ケンパウロン(kenpaullone)を含む。アロイシン(7-n-ブチル-6-(4-メトキシフェニル)[5H]ピロロ[2,3-b]ピラジン)は、Cdk1/B(IC50=700nM)、Cdk5/p35(IC50=1.5μM)及びGSK-3(IC50=920nM)の、強力で選択的な、細胞透過性かつATP競合性の阻害剤である(Metty Y, et al. (2003) J Med Chem 46(2):222-36; この分子に関する教示についてその全体が参照によりここに援用される)。アロイシンA(7-n-ブチル-6-(4-ヒドロキシフェニル)[5H]ピロロ[2,3-b]ピラジン)は、細胞透過性の化合物であり、サイクリン依存性キナーゼ、c-Jun N末端キナーゼ(JNK)及びグリコーゲンシターゼキナーゼ3(GSK-3)(GSK-3、IC50=500nM)(GSK-3、IC50=1.5μM)の、強力で選択的な、可逆的かつATP競合性の阻害剤として作用する(Metty Y, et al. (2003) J Med Chem 46(2):222-36); この分子に関する教示についてその全体が参照によりここに援用される)。ケンパウロン(9-プロモ-7,12-ジヒドロインドロ[3,2-d][1]ベンザゼピン-6(5H)-オン)は、グリコーゲンシターゼキナーゼ3b(GSK3b、IC50=230nM)、Lck及びサイクリン依存性キナーゼ(Cdks)の強力な細胞透過性阻害剤である(Schultz C, et al. (1999) J Med Chem 42(15):2909-19; Zaharevitz DW, et al. (1999) Cancer Res 59(11):2566-9; Kunick C, et al. (2004) J Med Chem 47(1):22-36); この分子に関する教示についてそれらすべての全体が参照によりここに援用される)。

【0050】

多数の他の化合物がGSK-3を阻害することが見出されている。その大部分は、ATP結合部位との相互作用を通じてキナーゼ活性を阻害する。それらとしては、ビスインドール-(Bisindole-)及びアニリノマレイミド類(Anilino maleimides)、アルジシン(Aldisine)アルカロイド類、パウロン類(Paullones)、インジルピン類(Indirubins)及びピラノキノザリン類(Pyraloquinoxalines)が挙げられる。たとえば、パウロン類及びGSK-3阻害におけるそれらの用途は、たとえばKunick C, et al. J Med Chem 2004 Jan 1;47(1):22-36に記載されており、これはパウロン類に関する教示についてその全体が参照によりここに援用される。このような化合物はインピトロではナノモル濃度で、インピボでは低マイクロモル濃度で、有効である。ここでもまた、多くのものが強力であることが示されている一方で、それらはGSK-3に対して非常に特異的であるのではなく、関連するCDK類をも同様のレベルで共通して阻害する。しかし、2種の構造的に異なるマレイミド類(SB216763及びSB415286)は、強力であり、かつGSK-3に対して高い特異性を有することが示されている。これらは、細胞の研究においてGSK-3阻害剤として有効にリチウムと置き換えることができる。グラヌラチミド類(granulatimides)又はジデムニミド類(didemnimides)と名づけられたクラスの化合物のメンバーもまた、GSK-3阻害剤として作用することが見出された(国際特許出願WO99/47522、これはこれらの化合物に関する教示についてその全体が参照によりここに援用される)。

【0051】

いくつかの間接的なGSK-3阻害剤としては、ワートマニン(wortmannin)が挙げられ、これは、タンパク質キナーゼBを活性化し、GSK-3のリン酸化及び阻害をもたらす。イソプロテレノール(Isoproterenol)は、β3-アドレノレセプターを通じて一次的に作用し、インシュリンと同様の程度(約50%)までGSK-3活性を低減させる(Moule et al. 1997)。p70S6キナーゼ及びp90rsk-1もまた、GSK-3をリン酸化し、その阻害をもたらす。

【0052】

GSK-3は、GSK-3特異的ペプチドを用いて選択的にターゲティングとすることもできる。たとえば、高頻度転位進行型T細胞リンパ腫1(FRAT1; Frequently Rea

10

20

30

40

50

rranged Advanced T-Cell lymphomas 1) は、G S K 3 結合タンパク質 (G B P) の哺乳類におけるホモログである。F R A T チド (F R A T 1 の残基 1 8 8 ~ 2 2 6 に相当するペプチド) は、G S K 3 に結合し、G S K 3 により触媒されるアキシン (Axin) 及び - カテニンのリン酸化をブロックする (Thomas GM, et al. FEBS Lett 1999 Sep 17;458 (2) :247-51) 。

【 0 0 5 3 】

提供される本方法の G S K - 3 阻害剤は、機能的核酸であることもできる。機能的核酸は、標的分子の結合又は特定の反応の触媒のような特異的機能を有する核酸分子である。機能的核酸分子は、制限的であることを意味しない以下のカテゴリーに分けることができる。たとえば、機能的核酸としては、アンチセンス分子、アプタマー、リボザイム、三重鎖 (triplex) 形成分子、R N A i 及び外部ガイド配列が挙げられる。機能的核酸分子は、標的分子が有する特異的活性のアフェクター、阻害剤、調節因子及び刺激剤として作用することができ、又は機能的核酸分子は、あらゆる他の分子とは独立の新規な活性を有することができる。

10

【 0 0 5 4 】

C A R D 含有タンパク質は、デスレセプター誘導性アポトーシスの間に切断され得るので、本発明の方法の調節因子は、C A R D 含有タンパク質の切断を促進することにより作用することができる。一例として、D D X 3 は、F A D D の動員と平行して (図 9 E)、D R 5 から解離して T R A - 8 誘導性アポトーシスの間に切断される (図 9 A 及び C)。D D X 3 の切断部位の一つは、アミノ酸残基 1 3 2 ~ 1 3 5 の間の比較的保存されている D E D D (配列番号 7) モチーフであり、これはカスパーゼ - 2、3、7 又は 1 0 によって切断され得る。したがって、調節因子は、カスパーゼ、又は C A R D 含有タンパク質 (たとえば D D X 3) を切断するカスパーゼの誘導体であることができる。

20

【 0 0 5 5 】

C A R D 含有タンパク質の活性はデスレセプターへの結合に依存するので、本発明の方法の調節因子は、C A R D 含有タンパク質及びデスレセプター間の相互作用の阻害剤であることができる。ある場合には、調節因子は、デスレセプター結合部位で C A R D 含有タンパク質に結合する物質 (薬剤、分子、ポリペプチド等) であることができる。したがって、調節因子は、C A R D 含有タンパク質の結合部位に相当するデスレセプターのアミノ酸を含むポリペプチドであることができる。たとえば、調節因子は、D R 5 のアミノ酸 2 5 0 ~ 3 4 0 を含むポリペプチドであることができる (配列番号 2 2、受託番号 g i : 3 7 2 1 8 7 8)。したがって、調節因子は、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含むことができる。調節因子は、さらに、そのフラグメントが D D X 3 を結合することができるように、配列番号 2 3 のアミノ酸配列のフラグメントを含むポリペプチドであることができる。一例として、調節因子は、D R 5 のアミノ酸 2 8 0 ~ 3 1 0 を含むポリペプチドであることができる (配列番号 2 2、受託番号 g i : 3 7 2 1 8 7 8)。したがって、調節因子は、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含むことができる。別の例として、調節因子は、D R 5 のアミノ酸 3 0 0 ~ 3 3 0 を含むポリペプチドであることができる (配列番号 2 2、受託番号 g i : 3 7 2 1 8 7 8)。したがって、調節因子は、配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含むことができる。

30

40

あるいは、調節因子は、アポトーシスを阻害することなしにデスレセプターの C A R D 含有タンパク質結合部位に結合する物質 (薬剤、分子、ポリペプチド等) であることができる。調節因子は、C A R D 含有タンパク質のデスレセプター結合部位に相当するアミノ酸を含むポリペプチドであることができる。

【 0 0 5 6 】

本発明の方法の調節因子は、カスパーゼ依存性アポトーシスの活性化を防止するための C A R D 含有タンパク質の能力に影響することができる。C A R D 含有タンパク質の C A R D ドメインは、アポトーシスの阻害剤の動員に関与することができ (I A P)、これはウイルス感染の間に宿主細胞におけるアポトーシスを抑制する (Crook, N.E., et al 1993 J Virol 67:2168-2174)。I A P ファミリーは、成熟カスパーゼと相互作用しその酵素

50

活性を阻害することにより、細胞死に対抗する。8種の異なる哺乳類 I A P が同定されており、これらとしては X I A P、c - I A P 1、c - I A P 2 及び M L - I A P / L i v i n が挙げられる(たとえば、Ashhab, Y., et al. 2001 FEBS Lett 495:56-60; Kasof, G.M. 及び B.C. Gomes. 2001 J Biol Chem 276:3238-3246; Vucic, D., et al. 2000. Curr Biol 10:1359-1366; これらは、これらの I A P 分子に関して、参照によりその全体がすべてここに援用される)。すべての I A P は、1 ~ 3 個のバキュロウイルス I A P 反復 (B I R) ドメインを含み、相同配列 (C X 2 C X 1 6 H X 6 C) を有する。B I R ドメインを通じて、I A P 分子はカスパーゼに結合し、これを直接阻害する (Deveraux, Q.L. 及び J.C. Reed. 1999. Genes Dev 13:239-252; Deveraux, Q.L. et al. 1997. Nature 388:300-304; Deveraux, Q.L. 及び J.C. Reed. 1999. Genes Dev 13:239-252、I A P 及びカスパーゼの相互作用に関して、これらはすべて参照によりその全体がここに援用される)。ミトコンドリアのタンパク質、S m a c / D I A B L O は、I A P に結合してこれに対抗することができ (Suzuki, Y., et al. 2001. J Biol Chem 276:27058-27063)、I A P 機能を抑制した (Wieland, I, et al. 2000. Oncol Res 12:491-500) (I A P の阻害に関して、引用した文献はすべて参照によりその全体がここに援用される)。したがって、本発明の方法の調節因子は、C A R D 依存性結合の阻害剤であることができる。調節因子は、カスパーゼ又は I A P のようなカスパーゼの調節因子を動員するための C A R D 含有タンパク質の能力に影響することができる。調節因子は、C A R D 含有タンパク質が低減された I A P の結合及び動員を有するように C A R D 含有タンパク質に結合する物質 (薬剤、分子、ポリペプチド、融合タンパク質、抗体、抗体フラグメント等) であることができる。調節因子は、たとえばカスパーゼ - 1、カスパーゼ - 2、カスパーゼ - 4 又はカスパーゼ - 5、c I A P 1、c I A P 2、X I A P 又はサバイビンの、C A R D 含有タンパク質結合フラグメントであることができる。

【0057】

調節因子は、さらに、標的細胞における I A P 又は C A R D 含有タンパク質遺伝子発現の阻害剤であることができる。細胞においてタンパク質の発現を阻害する種々の公知の方法が存在し、三重鎖形成分子、リボザイム、外部ガイド配列、アンチセンス分子及び R N A i 分子が挙げられる。

【0058】

アンチセンス分子は、カノニカル又は非カノニカル塩基対形成を通じて標的核酸分子と相互作用するように設計される。アンチセンス分子及び標的分子の相互作用は、たとえば R N A s e H 媒介性 R N A - D N A ハイブリッド分解を通じて、標的分子の破壊を促進するように設計される。あるいは、アンチセンス分子は、転写又は複製のような、標的分子上で通常起こるのであろうプロセッシング機能を妨害するように設計される。アンチセンス分子は、標的分子の配列に基づいて設計することができる。標的分子の最も接近しやすい領域を見つけることによりアンチセンス効率を最適化するための多数の方法が存在する。例示的な方法は、D M S 及び D E P C を用いた D N A 改変研究及びインビトロ選択実験であろう。アンチセンス分子は、標的分子に、10 - 6、10 - 8、10 - 10 又は 10 - 12 以下の解離定数 (K_d) で結合することが好ましい。アンチセンス分子の設計及び使用を補助する方法及び技術の代表的な見本は、米国特許第 5, 135, 917 号、第 5, 294, 533 号、第 5, 627, 158 号、第 5, 641, 754 号、第 5, 691, 317 号、第 5, 780, 607 号、第 5, 786, 138 号、第 5, 849, 903 号、第 5, 856, 103 号、第 5, 919, 772 号、第 5, 955, 590 号、第 5, 990, 088 号、第 5, 994, 320 号、第 5, 998, 602 号、第 6, 005, 095 号、第 6, 007, 995 号、第 6, 013, 522 号、第 6, 017, 898 号、第 6, 018, 042 号、第 6, 025, 198 号、第 6, 033, 910 号、第 6, 040, 296 号、第 6, 046, 004 号、第 6, 046, 319 号及び第 6, 057, 437 号に見出すことができ、これらは、アンチセンス分子に関する方法及び技術について、参照によりその全体がここに援用される。

【0059】

アプタマーは、好ましくは特異的な方法で、標的分子と相互作用する分子である。典型的には、アプタマーは、長さ15～50塩基の範囲の小さい核酸であり、ステム-ループ又はG-クアットレット(G-quartets)のような定義された二次及び三次構造に折りたたまれる。アプタマーは、ATP(米国特許第5,631,146号)及びテオフィリン(theophylline)(米国特許第5,580,737号)のような小さい分子、ならびに逆転写酵素(米国特許第5,786,462号)及びトロンピン(米国特許第5,543,293号)のような大きい分子と結合することができる。アプタマーは、 10^{-12} M未満の標的分子の K_d で非常にしっかりと結合することができる。アプタマーは、 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 又は 10^{-12} 未満の K_d で標的分子と結合することが好ましい。アプタマーは、非常に高度の特異性で標的分子と結合することができる。たとえば、標的分子及び分子上の単一の位置のみで異なる別の分子の間での結合親和性に10,000倍を超える差を有するアプタマーが単離されている(米国特許第5,543,293号)。アプタマーは、背景結合分子との K_d よりも、少なくとも10、100、1000、10,000又は100,000倍低い標的分子との K_d を有することが好ましい。たとえば、この比較をポリペプチドについて行なう場合、背景分子は異なるポリペプチドであることが好ましい。種々の異なる標的分子に結合するアプタマーの作製及び使用方法の代表的な例は、米国特許第5,476,766号、第5,503,978号、第5,631,146号、第5,731,424号、第5,780,228号、第5,792,613号、第5,795,721号、第5,846,713号、第5,858,660号、第5,861,254号、第5,864,026号、第5,869,641号、第5,958,691号、第6,001,988号、第6,011,020号、第6,013,443号、第6,020,130号、第6,028,186号、第6,030,776号及び第6,051,698号に見出すことができ、これらは、アプタマーに関する方法及び技術について、参照によりその全体がここに援用される。

【0060】

リボザイムは、分子内又は分子間で化学反応を触媒することができる核酸分子である。したがって、リボザイムは、触媒性核酸である。リボザイムは、分子間反応を触媒することが好ましい。ハンマーヘッドリボザイム(米国特許第5,334,711号、第5,436,330号、第5,616,466号、第5,633,133号、第5,646,020号、第5,652,094号、第5,712,384号、第5,770,715号、第5,856,463号、第5,861,288号、第5,891,683号、第5,891,684号、第5,985,621号、第5,989,908号、第5,998,193号、第5,998,203号; Ludwig及びSproatによる国際特許出願WO9858058、Ludwig及びSproatによるWO9858057、及びLudwig及びSproatによるWO9718312)、ヘアピンリボザイム(たとえば、米国特許第5,631,115号、第5,646,031号、第5,683,902号、第5,712,384号、第5,856,188号、第5,866,701号、第5,869,339号及び第6,022,962号)、及びテトラヒメナリボザイム(たとえば、米国特許第5,595,873号及び第5,652,107号)のような自然の系において見出されたりリボザイムに基づいた、ヌクレアーゼ又は核酸ポリメラーゼ型の反応を触媒する多数の異なるタイプのリボザイムが存在する。また、自然の系には見出されないが新規の特異的反応を触媒するように工学的処理された多数のリボザイムも存在する(たとえば、米国特許第5,580,967号、第5,688,670号、第5,807,718号及び第5,910,408号)。好ましいリボザイムは、RNA又はDNA基質を切断し、より好ましくはRNA基質を切断する。リボザイムは、典型的には、標的基質の認識及び結合、そしてその後の切断を通じて、核酸基質を切断する。この認識は、しばしばカノニカル又は非カノニカル塩基対相互作用に基づいている。この特性により、リボザイムは、核酸の標的的特異的切断のための特に良好な候補となるが、これは、標的基質の認識は標的基質配列に基づいているためである。種々の異なる反応を触媒するためのリボザイムの作製及び使用方法の代表的な例は、米国特許第5,646,042号、第5,693,535号、第5,731,295号

10

20

30

40

50

、第5, 811, 300号、第5, 837, 855号、第5, 869, 253号、第5, 877, 021号、第5, 877, 022号、第5, 972, 699号、第5, 972, 704号、第5, 989, 906号及び第6, 017, 756号に見出すことができる。

【0061】

三重鎖形成性機能的核酸分子は、二本鎖又は一本鎖核酸と相互作用することができる分子である。三重鎖分子が標的領域と相互作用した場合、三重鎖 (triplex) と呼ばれる構造が形成され、その中には、ワトソン - クリック (Watson-Crick) 及びフーグスティーン (Hoogsteen) の塩基対形成の両方に依存する複合体を形成するDNAの3本の鎖が存在する。三重鎖分子は、高い親和性及び特異性で標的領域と結合することができるため、好ましい。三重鎖形成性分子は、10 - 6、10 - 8、10 - 10又は10 - 12未満のK_dで標的分子に結合することが好ましい。種々の異なる標的分子に結合する三重鎖形成性分子の作製及び使用方法の代表的な例は、米国特許第5, 176, 996号、第5, 645, 985号、第5, 650, 316号、第5, 683, 874号、第5, 693, 773号、第5, 834, 185号、第5, 869, 246号、第5, 874, 566号及び第5, 962, 426号に見出される。

10

【0062】

外部ガイド配列 (EGSS) は、標的核酸分子と結合し、複合体を形成する分子であって、この複合体は、標的分子を切断するRNase Pによって認識される。EGSは、選択したRNA分子を特異的にターゲティングするように設計することができる。RNase Pは、細胞内での転移RNA (tRNA) のプロセッシングを補助する。細菌のRNase Pは、標的RNA: EGS複合体が天然のtRNA基質を擬似することを起こすEGSを用いることにより、本質的にあらゆるRNA配列を切断するために動員され得る (YaleによるWO 92 / 03566、及びForster及びAltman, Science 238:407-409 (1990))。

20

【0063】

同様に、真核生物のEGS / RNase Pに指示されたRNAの切断は、真核生物細胞内で所望の標的を切断するために利用され得る (Yuan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8006-8010 (1992); YaleによるWO 93 / 22434; YaleによるWO 95 / 24489; Yuan及びAltman, EMBO J 14:159-168 (1995); 及びCarrara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92:2627-2631 (1995))。種々の異なる標的分子の切断を容易にするためのEGS分子の作製及び使用の代表的な方法は、米国特許第5, 168, 053号、第5, 624, 824号、第5, 683, 873号、第5, 728, 521号、第5, 869, 248号及び第5, 877, 162号に見出すことができる。

30

【0064】

遺伝子発現もまた、RNA干渉 (RNAi) を通じて、高度に特異的な方式で効率的に、サイレントにすることができる。このサイレンシングは、もともとは二本鎖RNA (dsRNA) の添加に伴って観察された (Fire, A., et al. (1998) Nature 391:806-11; Napoli, C., et al. (1990) Plant Cell 2:279-89; Hannon, G.J. (2002) Nature, 418:244-51)。いったんdsRNAが細胞内に入ると、それは、RNAアーゼIII様酵素であるダイサー (Dicer) によって、3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングを有する長さ21~23ヌクレオチドの二本鎖の小干渉性RNA (siRNA) に切断される (Elbashir, S.M., et al. (2001) Genes Dev. 15:188-200; Bernstein, E., et al. (2001) Nature 409:363-6; Hammond, S.M., et al. (2000) Nature 404:293-6)。ATP依存性の工程において、このsiRNAは、siRNAを標的RNA配列に案内する多サブユニットタンパク質複合体であって、RNAi誘導サイレンシング複合体 (RISC) として一般に知られるものに統合される (Nykanen, A., et al. (2001) Cell, 107:309-21)。なんらかの時点で、このsiRNA二重体 (duplex) は巻き戻される。そして、アンチセンス鎖はRISCに結合したまま残り、エンド及びエキソヌクレアーゼの組合せによって相補的なmRNA配列の分解を指示するようにみえる (Martinez, J., et al. (2002) Cell, 110:563-74)。しかし、iRNA又はsiRNAの効果又はそれらの用

40

50

途は、どのタイプのメカニズムにも制限されない。

【0065】

短鎖干渉性RNA (siRNA) は、配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングを誘導することができ、それによって遺伝子発現を低減させるか、又は阻害させることができる、二本鎖RNAである。一例において、siRNAは、siRNA及び標的RNAの両方の間の配列同一性の領域内で、mRNAのような相同RNA分子の特異的分解を誘発する。たとえば、WO 02/44321は、3'オーバーハング末端と塩基対形成した場合、標的mRNAの配列特異的分解を行なうことができるsiRNAを開示しており、これは、これらのsiRNAの作製方法について、参照によりここに援用される。配列特異的遺伝子サイレンシングは、酵素ダイサーによって産生されるsiRNAを擬似する短い合成二本鎖RNAを用いて、哺乳類細胞において達成することができる (Elbashir, S.M., et al. (2001) Nature, 411 :494-498)、(Ui-Tei, K., et al. (2000) FEBS Lett 479:79-82)。siRNAは、化学的に又はインビトロで合成することができ、又は細胞内でsiRNAにプロセッシングされる短い二本鎖ヘアピン様RNA (shRNAs) の結果であることができる。合成siRNAは、一般的にアルゴリズム及び従来のDNA/RNA合成機を用いて設計される。供給業者としては、Ambion (Austin, Texas)、ChemGenes (Ashland, Massachusetts)、Dharmacon (Lafayette, Colorado)、Glen Research (Sterling, Virginia)、MWB Biotech (Esbersberg, Germany)、Proligo (Boulder, Colorado) 及びQiagen (Vento, The Netherlands) が挙げられる。siRNAは、Ambionの「SILENCER (登録商標) siRNA Construction Kit」のようなキットを用いてインビトロで合成することもできる。ここで開示されているのは、c-Kit又はSCFについての配列に基づいて上記のように設計された任意のsiRNAである。たとえば、c-Kitの遺伝子発現をサイレンシングするためのsiRNAは、商業的に入手可能である (「SUSILENCING (登録商標) Human c-Kit siRNA」; Zymed Laboratories, San Francisco, CA)。

【0066】

ベクターからのsiRNAの産生は、短鎖ヘアピンRNA (shRNAs) の転写を通じて、より一般的に行なわれる。shRNAを含むベクターの作製のためのキットは、たとえば、Imgenexの「GENESUPPRESSOR (登録商標) Construction Kits」及びInvitrogenの「BLOCK-IT (登録商標) inducible RNAi」プラスミド及びレンチウイルスベクターが入手可能である。ここで開示されているのは、ここで開示された炎症媒介因子についての配列に基づいて上記のように設計された任意のshRNAである。

【0067】

したがって、本発明の方法の調節因子は、siRNA又はshRNAを含むことができる。調節因子は、cIAP1 (受託番号 gi: 41349435)、cIAP2 (受託番号 gi: 33946283)、XIAP (受託番号 gi: 1184319)、サバイピン (受託番号 gi: 2315862)、DDX3 (配列番号 25、受託番号 gi: 13514816)、mda-5 (受託番号 gi: 11344593) 又はRIG-1 (受託番号 gi: 6048564) 遺伝子発現の阻害剤であることができる。したがって、調節因子は、DDX3の核酸配列由来のshRNA (配列番号 25、受託番号 gi: 13514816) を含むことができる。一例として、調節因子は、配列番号 10、12、14又は16の核酸配列によってコードされるshRNAを含むことができる。

【0068】

細胞へのsiRNAの送達に用いることができるいくつかのトランスフェクション試薬があり、たとえば、Invitrogenの「Lipofectamine 2000」、Mirusの「TransIT-TKO」及びNovagenの「RiboJuice siRNA Transfection Reagent」がある。しかし、トランスフェクション試薬は、一般にインビボでは作動しない。裸のsiRNAは、被検対象の脈管構造中に直接送達することができ、これは、他のタンパク質が送達又は発現されないという利点を有し、核酸は免疫原性ではないのでそのことは重要である。上皮を壊すために何らかの形態のエネルギー、たとえばソノフォレシス (sonophoresis) を用いて、皮膚のような

上皮バリアを横断して核酸を送達する方法もある（米国特許第5,421,816号、米国特許第5,618,275号、米国特許第6,712,805号及び米国特許第6,487,447号、皮膚を通した化合物の超音波媒介送達について、これらはすべて参照によりここに援用される）。

【0069】

提供されているのは、デスレセプターアゴニストに対する抵抗性のバイオマーカーについての細胞のスクリーニング方法であって、総DDX3又はそのホモログについて細胞をアッセイする工程を含む方法である。また、提供されているのは、デスレセプターアゴニストに対する抵抗性のバイオマーカーについての細胞のスクリーニング方法であって、デスレセプター及びCARD含有タンパク質の会合をアッセイする工程を含み、高レベルの会合がアゴニストに対する抵抗性を意味する、方法である。デスレセプター及びCARD含有タンパク質の会合は、アゴニストに対する抵抗性を示す。場合によっては、スクリーニングされるべき細胞は、デスレセプターアゴニスト（たとえばアゴニスト性抗体）と予め接触させておく。したがって、提供されるのは、デスレセプターアゴニストに対する抵抗性のバイオマーカーについての細胞のスクリーニング方法であって、細胞をデスレセプターアゴニストと接触させる工程、及びデスレセプター及びCARD含有タンパク質の断片的な（fractional）会合をモニタリングする工程を含み、会合がアゴニストに対する抵抗性を意味する、方法である。場合によっては、会合の検出を含む種々の方法において、解離を測定し、解離した量を総量から引き算して会合量を算出することができる。

【0070】

本発明の方法の接触工程は、インビボ又はインビトロのいずれでも行うことができる。デスレセプター及びCARD含有タンパク質の間の会合のモニタリングは、特異的抗体を用いての細胞からのタンパク質フラグメント（たとえば、デスレセプター）の単離（たとえば免疫沈降による）を含むことができる。この方法は、さらに、会合タンパク質（たとえばDDX3）についてのタンパク質フラグメントの、ウェスタン・プロット、放射性免疫アッセイ（RIA）又はELISAのような標準的免疫検出法による解析を含むことができる。これらの抗体ベースの方法は、当該技術分野で周知であり、目的のデスレセプター、CARD含有タンパク質、カスパーゼ及びカスパーゼの調節因子の各々について容易に適合させることができる。説明例として、本発明の方法は、被検対象からの細胞をTRA-8抗体で処理する工程、細胞ライセートからタンパク質を単離する工程、DR5タンパク質を免疫沈降させる工程、（還元又は非還元条件での）SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）によりDR5を分離する工程、分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写する工程、及び標準的なウェスタン・プロット技術を用いてDR5と会合したDDX3を検出する工程を含むことができ、会合はその細胞におけるTRA-8抵抗性の証拠である。

【0071】

また、提供されているのは、デスレセプターアゴニストに対する抵抗性のバイオマーカーについての細胞のスクリーニング方法であり、カスパーゼ又はカスパーゼの調節因子（たとえば、cIAP1、cIAP2、XIAP、サバイビン）とCARD含有タンパク質との会合をモニタリングする工程及び既知の抵抗性及び非抵抗性対照細胞由来の試料との会合のレベルを比較する工程を含む。抵抗性細胞のレベルと同様のレベルでのCARD含有タンパク質とのIAPの会合は、そのアゴニストに対する抵抗性を意味する。場合によっては、スクリーニングされるべき細胞は、デスレセプターアゴニスト（たとえば、アゴニスト性抗体）と予め接触させておく。

【0072】

説明例として、本発明の方法は、被検対象からの細胞をTRA-8抗体で処理する工程、細胞ライセートからタンパク質を単離する工程、DDX3タンパク質を免疫沈降させる工程、（還元又は非還元条件での）SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）によりDDX3を分離する工程、分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写する工程、及び標準的なウェスタン・プロット技術を用いてDDX3と会合したカス

パーゼ（たとえばカスパーゼ-1、カスパーゼ-2、カスパーゼ-4、カスパーゼ-5）及び I A P（たとえば c I A P 1、c I A P 2、X I A P、サバイビン）を検出する工程を含むことができ、D D X 3 と I A P との検出はその細胞における T R A - 8 抵抗性の証拠である。会合のレベルは、対照のレベルと比較することができる。対照レベルは、非抵抗性細胞に基づくことができる。試験レベルが非抵抗性対照細胞レベルより高い場合、抵抗性が示されている。対照レベルは、抵抗性細胞に基づくことができ、試験レベルと対照レベルとの類似性は抵抗性を示している。

また、提供されているのは、C A R D 含有タンパク質の調節因子についてのスクリーニング方法である。特に、ここで提供されているのは、調節因子がデスレセプターアゴニストに対する標的細胞の抵抗性を逆転又は防止するようなスクリーニング方法である。スクリーニング方法の工程は、候補薬剤と C A R D 含有タンパク質とを接触させる工程、及び候補薬剤の不存在下と比較して候補薬剤の存在下での A R D 含有タンパク質の 1 以上の活性の変化（たとえば低減）を検出する工程を含み、この 1 又は複数の活性はデスレセプターアゴニストに対する標的細胞の抵抗性と相関する。C A R D 含有タンパク質の 1 又は複数の活性の低減は、その候補薬剤が C A R D 含有タンパク質を調節することを示す。この方法は、改変された C A R D 含有タンパク質を利用するように改変することができ、たとえば、天然の改変又は非天然の改変が含まれる。このような改変としては、短縮化（truncations）、突然変異、キメラタンパク質等が挙げられる。たとえば、D D X 3 の核酸配列は、配列番号 2 5 に定義されている。D D X 3 の突然変異の例としては、配列番号 2 5 の位置 1 8 4 2 及び 2 4 9 3 での、アデノシンからグアノシンへの置換が挙げられる。

【 0 0 7 3 】

C A R D 含有タンパク質の任意の数の活性を、ここで記載するスクリーニング方法において評価することができる。たとえば、C A R D 含有タンパク質の活性は、リン酸化（たとえば、デスレセプター結合アミノ酸での又はその近傍でのリン酸化）であることができる。したがって、本発明の方法は、C A R D 含有タンパク質のリン酸化の検出を含むことができる。タンパク質のリン酸化を検出するための細胞ベース及び無細胞のアッセイは、当該技術分野において周知であり、抗体、たとえば抗ホスホセリン（Phosphoserine）（Chemicon（登録商標） A B 1 6 0 3 ）（Chemicon, Temecula, CA）、抗ホスホトレオニン（Phosphothreonine）（Chemicon（登録商標） A B 1 6 0 7 ）及び抗ホスホチロシン（Phosphotyrosine）（Chemicon（登録商標） A B 1 5 9 9 ）を含む抗体の利用が挙げられる。部位特異的抗体もまた、D D X 3 のリン酸化形態に対して特異的に生成させることができる。これらの抗体の生成及び使用の方法は、当該技術分野において周知である。

【 0 0 7 4 】

ここで記載されるスクリーニング方法において評価することができる別の C A R D 含有タンパク質の活性は、結合活性である。たとえば、C A R D 含有タンパク質の活性は、デスレセプターに対する結合であることができる。したがって、本発明の方法は、C A R D 含有タンパク質及びデスレセプターとの間の相互作用を検出する工程を含むことができる。C A R D 含有タンパク質の活性は、C A R D 依存性結合であることができる。したがって、本発明の方法は、たとえば c I A P 1、c I A P 2、X I A P 又はサバイビンに対する、C A R D 依存性結合を検出する工程を含むことができる。タンパク質結合の検出の方法は、当該技術分野で周知であり、たとえば、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A s）又はウェスタン・ブロットと組合せた共免疫沈降が挙げられる。別の例においては、サンドイッチアッセイを用いることができ、ここで、第一の抗体はデスレセプターを捕獲し、第二の抗体は C A R D 含有タンパク質を検出する。別の例においては、サンドイッチアッセイを用いることができ、ここで、第一の抗体は C A R D 含有タンパク質を捕獲し、第二の抗体はデスレセプターを検出する。

【 0 0 7 5 】

さらに、ここで提供されているのは、C A R D 含有タンパク質の評価される活性が、切断、たとえばデスレセプター誘導アポトーシスの間に起こる切断を含む、スクリーニングアッセイである。したがって、このスクリーニング方法は、C A R D 含有タンパク質の切

10

20

30

40

50

断を検出する工程を含むことができる。タンパク質切断を検出するための方法は当該技術分野において周知であり、たとえば、ウェスタン・ブロット法が挙げられる。

【0076】

スクリーニング方法の接触工程は、インピボ又はインピトロで行なうことができる。スクリーニング方法は、細胞ベース又は無細胞のいずれであることもできる。したがって、一つの側面においては、CARD含有タンパク質は、標的細胞内にある。CARD含有タンパク質は細胞内に天然に存在することができ、又は細胞は、CARD含有タンパク質を産生するように遺伝子工学的処理されていることができる。無細胞の方法においては、CARD含有タンパク質は、基質（基材）に付着するように又はキメラタンパク質を形成するように、改変されていることができる。

10

【0077】

場合によっては、スクリーニング方法は、さらに、標的細胞又はデスレセプターを含む非細胞系を、デスレセプターアゴニストと1回以上接触させる工程、及びデスレセプターアゴニストに対する抵抗性のレベルを検出する工程を含むことができる。デスレセプターアゴニストに対する抵抗性のレベルは、たとえば、アポトーシスを測定することによって検出することができ、デスレセプターアゴニストに反復的に暴露した際のアポトーシスの低下は、抵抗性の増大を示す。アポトーシスの検出方法は、当該技術分野において周知であり、たとえば、末端dUTPニック・エンドラベリング（TUNEL）、活性カスペーゼ3、アネキシンV（Annexin V）による細胞表面リン脂質ホスファチジルセリン（PS）を検出するための試薬が挙げられる。アポトーシスを検出するためのこれらの及び他の方法のための試薬は、商業的に入手可能である。

20

【0078】

一般に、候補薬剤は、天然生成物又は合成（もしくは半合成）抽出物の大規模なライブラリー又は化学ライブラリーから、当該技術分野で公知の方法にしたがって、同定することができる。薬剤の発見及び開発の分野の当業者は、試験抽出物又は化合物の正確な起源は本発明のスクリーニング手順については重要ではないことを理解するであろう。したがって、事実上、任意の数のペプチド、化学抽出物又は化合物を、ここで記載された例示的な方法を用いてスクリーニングすることができる。このようなペプチド、抽出物又は化合物の例としては、植物、菌類、原核生物又は動物ベースの抽出物、発酵物ブロス、及び合成化合物、ならびに存在する化合物の改変物が挙げられるが、これらに限らない。多数の方法が、任意の数の化学化合物（たとえばサッカリド、脂質、ペプチド、ポリペプチド及び核酸ベースの化合物を含むが、それらに限らない）のランダム又は指向性合成（たとえば、半合成又は全合成）を生成するために利用可能である。合成化合物ライブラリーは、たとえばBrandon Associates（Merrimack, NH）及びAldrich Chemical（Milwaukee, WI）から、商業的に入手可能である。あるいは、細菌、菌類、植物及び動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーは、多数の供給源から商業的に入手可能であり、Biotics（Sussex, UK）、Xenova（Slough, UK）、Harbor Branch Oceanographic Institute（Ft. Pierce, Fla.）及びPharmaMar, U.S.A.（Cambridge, Mass.）が挙げられる。それに加えて、天然及び合成により作製されたライブラリーは、所望の場合、当該技術分野において公知の方法、たとえば標準的な抽出及び分画方法にしたがって作製することができる。さらに、所望の場合、任意のライブラリー又は化合物は、標準的な化学、物理又は生化学の方法を用いて、容易に改変することができる。それに加えて、薬剤の発見及び開発の分野の当業者は、CARD含有タンパク質の活性に対するそれらの影響について既に知られている材料の複製物もしくは反復物の排除又は脱複製（dereplication）（たとえば、分類学上の脱複製、生物学的脱複製及び化学的脱複製、又はそれらの任意の組合せ）のための方法が、可能な限りいつでも用いられるべきであることを容易に理解する。

30

40

【0079】

未精製（粗）抽出物が、所望の活性を有することが見出された場合、観察された効果の原因である化学的構成成分を単離するために陽性リード抽出物のさらなる分画が必要である。したがって、抽出、分画及び精製プロセスのゴールは、CARD含有タンパク質の活

50

性を刺激又は阻害する活性を有する未精製抽出物中の化学的実体を注意深く特徴づけし、同定することである。化合物の混合物中の活性の検出についてここで記載されている同じアッセイは、活性成分を精製し、それらの誘導体を試験するために用いることができる。このような異成分からなる抽出物の分画及び精製の方法は、当該技術分野において公知である。所望の場合、治療のための有用な薬剤であることが示された化合物は、当該技術分野において公知の方法にしたがって化学的に改変することができる。治療的価値を有するとして同定された化合物は、続いて、CARD含有タンパク質の活性を調節又は擬似することが望ましい疾患又は状態の動物モデルを用いて解析されることができるとすることができる。

【0080】

提供されているのは、被検対象におけるデスレセプターアゴニストに対する抵抗性をモニタリングする方法であって、被検対象から生物学的試料を得る工程、及び試料中のデスレセプターとCARD含有タンパク質との会合を検出する工程を含む方法であり、会合は抵抗性を表す。上記のとおり、会合のレベルは、対照のレベルと比較することができる。

10

【0081】

説明例として、本発明の方法は、被検対象から生物学的試料を単離する工程（被検対象は、治療的抗DR5抗体（たとえばTRA-8）で処理されている）、生物学的試料からタンパク質を単離する工程、DR5タンパク質を免疫沈降させる工程、DR5を（還元又は非還元条件下の）SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により分離する工程、分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写する工程、及びDDX3に対する抗体と標準的なウェスタン・ブロット技術とを用いてDR5と会合したDDX3を検出する工程を含むことができ、ここで、会合はその細胞におけるTRA-8抵抗性の証拠である、方法である。

20

【0082】

提供されているのは、被検対象におけるデスレセプターアゴニストに対する抵抗性をモニタリングする方法であって、被検対象から生物学的試料を得る工程、及び試料中のカスパーゼ又はカスパーゼの調節因子のCARD含有タンパク質との会合を検出する工程を含み、会合が抵抗性を表す、方法である。

【0083】

説明例として、本発明の方法は、治療的抗DR5抗体（たとえばTRA-8）で処理された生物学的試料を被検対象から単離する工程、この生物学的試料からタンパク質を単離する工程、DDX3タンパク質を免疫沈降させる工程、DDX3を（還元又は非還元条件下の）SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により分離する工程、分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写する工程、及び標準的なウェスタン・ブロット技術を用いてDDX3と会合したカスパーゼ（たとえばカスパーゼ-1、カスパーゼ-2、カスパーゼ-4、カスパーゼ-5）及びIAP（たとえば、cIAP1、cIAP2、XIAP、サバイピン）を検出する工程を含むことができ、ここで、たとえばcIAP1及びDDX3の検出はその細胞におけるTRA-8抵抗性の証拠である、方法である。

30

【0084】

提供されているのは、被検対象におけるデスレセプターアゴニストに対する抵抗性をモニタリングする方法であって、被検対象から生物学的試料を得る工程、及びDDX3のリン酸化を検出する工程を含む方法である。タンパク質のリン酸化を検出するための方法は、当該技術分野において周知であり、たとえば抗ホスホセリン（Chemicon（登録商標）、AB1603）、抗ホスホトレオニン（Chemicon（登録商標）、AB1607）及び抗ホスホチロシン（Chemicon（登録商標）、AB1599）を含む抗体の使用が挙げられる。部位特異的抗体もまた、DDX3のリン酸化形態に対して生成することができる。このような抗体の作製及び使用の方法は、当該技術分野において周知である。

40

【0085】

提供されているのは、デスレセプターを発現する標的細胞においてアポトーシスを選択的に誘導する方法であって、標的細胞をデスレセプターに特異的に結合するデスレセプタ

50

ーアゴニストの治療的量と接触させる工程、及び標的細胞にCARD含有タンパク質の1以上の活性の調節因子の治療的量を投与する工程を含む方法である。

アゴニスト及びCARD含有タンパク質調節因子がアポトーシスを誘導する能力は、ヒト白血病細胞株であるJurkat (American Type Culture No. TIB-152) 及び星状細胞腫細胞株である1321N1のような細胞を、試験試料を添加した培地中で培養することにより、確認することができる。生存率は、たとえばATPLITEアッセイを用いて、測定することができる。

【0086】

ここで提供されている方法及び組成物は、細胞の不適切な生存又は増殖に関連する疾患の治療において用いることができ、がん、炎症性及び自己免疫性疾患におけるアポトーシスシステムの調節不全に起因する疾患が挙げられる。炎症性及び自己免疫性疾患としては、代表的には、全身性エリテマトーデス、橋本病、慢性関節リウマチ、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、悪性貧血、アジソン病、強皮症、グッドパスチャー症候群、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、不妊症、重症筋無力症、多発性硬化症、パセドウ病、血小板減少性紫斑病、インシュリン依存性糖尿病、アレルギー、喘息、アトピー性疾患、動脈硬化症、心筋炎、心筋症、糸球体腎炎、低形成性貧血、臓器移植後の拒絶が挙げられる。がんとしては、肺、前立腺、肝臓、卵巣、直腸、子宮頸部、リンパ及び胸部組織の多数の悪性腫瘍が挙げられる。したがって、提供されている組成物及び方法は、さらに、これらの標的とされた細胞が特異的デスレセプター（すなわちDR4又はDR5）を発現する又は発現するように作られている限りにおいて、活性化されたリンパ球、リンパ性細胞、骨髄細胞及びリウマチ性滑膜細胞（炎症性滑膜細胞（synoviocytes）、マクロファージ様滑膜細胞、線維芽細胞様滑膜細胞を含む）及びウイルス感染細胞（たとえばHIV感染細胞を含む）を含む活性化された免疫細胞を標的とし、それらに選択的にアポトーシスを誘導するために用いることができる。

【0087】

提供されているのは、がん、自己免疫性疾患又は炎症性疾患を有する被検対象を治療する方法であって、その被検対象に、治療的量のデスレセプターアゴニスト及びCARD含有タンパク質の1以上の活性の調節因子を投与する工程を含み、この調節因子がデスレセプターアゴニストに対する抵抗性を低減する方法である。

終始用いられている、デスレセプターアゴニスト及び/又はCARD含有タンパク質調節因子の「治療的量」は、標的細胞においてアポトーシスを引き起こすのに十分な量である。ここで用いられる場合、「治療的量」及び「薬学的有効量」という用語は、同義である。当業者は、容易に適正な治療的量を決定することができる。

【0088】

疾患、たとえばがん、自己免疫性疾患及び炎症性疾患の治療においては、処理の組合せを用いることもできる。たとえば、提供されている方法及び組成物のCARD含有タンパク質の調節因子及びアゴニストは、他の治療的薬剤とともに投与することができる。ここで用いられる場合、「治療的薬剤」は、病理学的状態を改善するのに有効な化合物又は組成物である。放射線療法もまた、他の薬剤とともに、又は他の薬剤なしで、組合せることができる。当業者は、放射線療法の形態を疾患に適合させるであろう。

【0089】

治療的薬剤の例としては、化学療法剤、抗炎症剤、疾患改変抗リウマチ薬（Disease Modifying Anti Rheumatic Drug; DMARD）、抗体、TNFファミリーのメンバー、抗ウイルス剤、抗日和見感染剤、抗生物質、免疫抑制剤、免疫グロブリン、抗マラリア剤、抗慢性関節リウマチ剤、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、及び抗がん化合物が挙げられる。抗がん化合物は、異常に生育する細胞の成長を阻害又は停止することにおいて有効な化合物又は組成物である。抗がん化合物の説明例としては、以下のものが挙げられる：ブレオマイシン（bleomycin）、カルボプラチン（carboplatin）、クロラムブシル（chlorambucil）シスプラチン（cisplatin）、コルヒチン、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ドーノルビシン（daunorubicin）、ダクチノマイシン（dactinomycin）、ジ

10

20

30

40

50

エチルスチルベストロール (diethylstilbestrol) ドキソルビシン (doxorubicin)、エトポシド (etoposide)、5 - フルオロウラシル (5-fluorouracil)、フロクスリジン (flouxuridine)、メルファラン (melphalan)、メトトレキセート (methotrexate)、マイトマイシン (mitomycin)、6 - メルカプトプリン (6-mercaptapurine)、テニポシド (teniposide)、6 - チオグアニン (6-thioguanine)、ビンクリスチン (vincristine) 及びビンブラスチン (vinblastine)。抗がん化合物及び治療的薬剤のさらなる例は、「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy 15th Ed.」、Berkow et al. eds. 1987 Rahway N.J.及びSladek et al. 「Metabolism and Action of Anti-Cancer Drugs」、1987 Powis et al. eds. Taylor and Francis, New York, N.Y.に見出される。

【0090】

PKC阻害剤、ビスインドリーマレイミドVIII (bisindolymaleimide VIII; (BisVIII)) は、Fas媒介性アポトーシスを大きく促進する (Zhou T. et al. 1999. Nat Med 5:42-48)。JNK / p38経路の相乗的活性化は、重要な役割を果たすこと (Ohtsuka T. 及びT. Zhou. 2002. J Biol Chem 277:29294-29303)、及び3種の一般的な化学療法剤によるDR5媒介性アポトーシスの増強は、同様の機構を通じて起こるらしいこと (Ohtsuka T. D. et al. 2003. Oncogene 22:2034-2044) が示されている。したがって、提供された方法は、さらに、ビスインドリーマレイミドVIII (BisVIII) 又はSN-50もしくはLY294002のような他の感作剤のような、アポトーシス誘導性化合物の使用を含むことができる。したがって、提供された方法及び組成物のCARD含有タンパク質の調節因子及びアゴニストは、BisVIIIと組合せることができる。提供された方法及び組成物のCARD含有タンパク質の調節因子及びアゴニストは、さらに、非ステロイド系抗炎症剤 (NSAID) (たとえば、スリンダックスルフィド (sulindac sulfide) 又は他のCOX-1又はCOX-2阻害剤) と組合せることができる。

【0091】

提供された方法及び組成物のアゴニストを用いる療法は、他のアゴニストを用いる療法とも組合せることができる。たとえば、DR5に対する抗体は、それを必要とする個体に、DR4に対する抗体の投与とともに又はその前もしくは後に、投与することができる。このような組合せ抗体療法は、さらに、ここで提供されたCARD含有タンパク質の1以上の調節因子の投与と組合せることができ、さらに他の治療的薬剤と組合せることができる。

【0092】

提供されているのは、デスレセプターアゴニスト及びCARD含有タンパク質の1以上の活性を調節する薬剤を含む組成物であって、ここで、この調節因子はデスレセプターアゴニストに対する抵抗性を低減する組成物である。提供されている組成物は、化学療法剤、TNFファミリーのメンバー、抗ウイルス剤、抗炎症剤、抗日和見感染剤、抗生物質、免疫抑制剤、免疫グロブリン、抗マラリア剤、抗慢性関節リウマチ剤、サイトカイン、ケモカイン及び成長因子からなる群から選択される治療的薬剤をさらに含むことができる。

【0093】

「タンパク質」、「ペプチド」、「ポリペプチド」又は「ペプチド部分」という用語は、ここでは互換可能に用いられており、ペプチド結合によって連結された2以上のアミノ酸を広く意味するように用いられる。「フラグメント」という用語は、ここでは、全長ポリペプチド又はタンパク質の部分であって、ポリペプチド上でのタンパク分解反応によって生成されることができる部分、すなわちポリペプチド中のペプチド結合の切断の際に生成されるペプチドを意味するように用いられる。フラグメントは、必ずしもタンパク分解反応によって生成される必要はなく、合成ポリペプチドを製造するための化学合成又は組換えDNA技術の方法を用いて生成されることができることは認識されるべきである。「タンパク質」及び「ポリペプチド」という用語は、ここでは、その分子を含む特定のサイズ又はアミノ酸数を示唆するために用いられてはいないこと、及び本発明のペプチドは数個のアミノ酸残基又はそれ以上を含むことができることは認識されるべきである。

【0094】

10

20

30

40

50

「単離された」又は「精製された」という語は、天然においてその組成物が通常関連している材料を含め、他の物質を実質的に含まない組成物（たとえばポリペプチド又は核酸）を意味する。本発明のポリペプチド又はそのフラグメントは、たとえば天然供給源（たとえばファージ）からの抽出、そのポリペプチドをコードする組換え核酸の発現（たとえば細胞内又は無細胞翻訳系における）、又はポリペプチドの化学合成によって、得ることができる。それに加えて、ポリペプチドフラグメントは、これらの任意の方法によって、又は全長ポリペプチドの切断によっても得ることができる。参照タンパク質又はポリペプチドのフラグメントは、その参照タンパク質/ポリペプチドの連続するアミノ酸のみを含み、その参照配列よりも少なくとも1アミノ酸短い。

【0095】

特異的タンパク質が言及される場合、ここでは変異体、誘導体及びフラグメントが企図される。タンパク質変異体及び誘導体は、当業者には十分に理解されており、アミノ酸配列の改変を含むことができる。たとえば、アミノ酸配列の改変は、典型的には3つのクラスの1つ以上に該当する：置換、挿入又は欠失変異体。挿入としては、1又は複数のアミノ酸残基のアミノ末端及び/又はカルボキシル末端への融合ならびに配列内への挿入が挙げられる。挿入は、通常はアミノ末端及び/又はカルボキシル末端への融合よりも小さい挿入であり、たとえば1～4個の残基のオーダーである。欠失は、タンパク質配列からの1以上のアミノ酸残基の除去を特徴とする。典型的には、タンパク質分子内の任意の部位で約2～6残基を超えない残基が除去されるが、欠失は、1～30残基の範囲であることができる。これらの変異体は、通常は、そのタンパク質をコードするDNA中のヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発によってその変異体をコードするDNAを生成し、その後、このDNAを組換え細胞培養において発現させることにより調製することができる。既知の配列を有するDNAにおける予め決められた部位での置換突然変異を作製する技術は周知であり、たとえば、M13プライマー突然変異誘発及びPCR突然変異誘発が挙げられる。アミノ酸置換は、典型的には単一残基であるが、一度に多数の異なる位置で起こることができる。挿入は、通常は約1～10アミノ酸残基のオーダーである。欠失又は挿入は、好ましくは隣接する2個の対、すなわち2残基の欠失又は2残基の挿入として作製される。置換、欠失、挿入又はそれらの任意の組合せを、最終構築物に到達するために組合せることができる。突然変異は、配列をリーディングフレーム外に置くものであってはならず、かつ、好ましくは、mRNAの二次構造のこのような変化が望ましい場合でない限り、二次mRNA構造を生成し得る相補的領域を生み出さないものである。置換変異体は、少なくとも1残基が除去され、その場所に異なる残基が挿入されているものである。このような置換は、一般的に、以下の表1にしたがって作製され、これらは保存的置換と呼ばれる。

【0096】

10

20

30

【表 1】

表 1: アミノ酸置換

もとの残基	例示的な置換	
Ala	Ser	
Arg	Lys	
Asn	Gln	
Asp	Glu	10
Cys	Ser	
Gln	Asn	
Glu	Asp	
Gly	Pro	
His	Gln	
Ile	Leu; Val	
Leu	Ile; Val	
Lys	Arg; Gln	20
Met	Leu; Ile	
Phe	Met; Leu; Tyr	
Pro	Gly	
Ser	Thr	
Thr	Ser	
Trp	Tyr	
Tyr	Trp; Phe	
Val	Ile; Leu	30

【 0 0 9 7 】

機能又は免疫学的同一性の実質的な変化は、表1におけるものよりも保存的ではない置換を選択することにより、すなわち (a) 置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造、たとえばシート又はらせんのコンフォメーション、(b) 標的部位での分子の電荷又は疎水性、又は (c) 側鎖の大きさ、に対するそれらの効果がより有意に異なる残基を選択することにより、作ることができる。タンパク質の特性に最大の変化を生じると一般に期待される置換は、(a) 親水性残基、たとえばセリル又はトレオニルが、疎水性残基、たとえばロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリル又はアラニルと (又はそれによって) 置換されること ; (b) シス테인又はプロリンが、別の任意の残基と (又はそれによって) 置換されること ; (c) 電氣的に陽性の側鎖を有する残基、たとえば、リシル、アルギニル又はヒスチジルが電氣的に陰性の残基、たとえば、グルタミル又はアスパルチルと (又はそれによって) 置換されること ; 又は (d) 嵩高い側鎖を有する残基、たとえばフェニルアラニンが側鎖を有さないもの、たとえばグリシンと (又はそれによって) 置換されること、及び (e) 硫酸化及び / 又はグリコシル化のための部位の数を増加させること、であろう。

【 0 0 9 8 】

たとえば、1つのアミノ酸を生物学的及び / 又は化学的に同様の別のもの で置換するこ

40

50

とは、当業者に保存的置換として知られている。たとえば、保存的置換は、ある疎水性残基を別のもので、又はある極性残基を別のもので、置換することであろう。置換としては、表1に示されている組合せが挙げられる。明示的に開示された配列の各々の保存的置換された変異体は、ここで提供されるポリペプチドの範囲内に含まれる。

【0099】

典型的には、保存的置換は、結果として得られるポリペプチドの生物学的活性に対し、ほとんど又はまったく影響を与えない。特定の例において、保存的置換は、ペプチドの生物学的機能に実質的に影響を与えないペプチド内のアミノ酸置換である。ペプチドは、1以上のアミノ酸置換、たとえば2~10個の保存的置換、2~5個の保存的置換、4~9個の保存的置換、たとえば2、5又は10個の保存的置換を含むことができる。

10

【0100】

ポリペプチドは、たとえば部位特異的突然変異誘発又はPCRのような標準的手順を用いて、そのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を操作することにより、1以上の保存的置換を含むように製造することができる。あるいは、ポリペプチドは、標準的ペプチド合成法を用いて1以上の保存的置換を含むように製造することができる。アラニン・スキャンは、タンパク質中のどのアミノ酸残基が、アミノ酸置換を許容することができるかを同定するために用いることができる。一例において、アラニン又は他の保存的アミノ酸(以下に列挙されているもののような)が1以上のネイティブなアミノ酸で置換されている場合、そのタンパク質の生物学的活性は、25%を超えて、たとえば20%を超えて、たとえば10%を超えて低減することはない。

20

【0101】

保存的置換についてのさらなる情報は、Ben-Bassat et al. (J. Bacteriol. 169:751-7, 1987)、O'Regan et al. Gene 77:237-51, 1989)、Sahin-Toth et al. (Protein Sci. 3:240-7, 1994)、Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-5, 1988)、ならびに遺伝学及び分子生物学の標準的テキストブックのような他の場所に見出すことができる。

【0102】

置換又は欠失突然変異誘発は、N-グリコシル化のための部位(Asn-X-Thr/Ser)又はO-グリコシル化のための部位(Ser又はThr)を挿入するために用いることができる。システイン又は他の不安定な残基の欠失もまた望ましい。潜在的なタンパク分解部位、たとえばArgの欠失又は置換は、たとえば、塩基性残基のひとつを欠失させること又はグルタミル又はヒスチジル残基で置換することによって、達成される。

30

【0103】

ある種の翻訳後誘導体化は、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミル及びアスパラギン残基は、頻繁に翻訳後脱アミド化され、相当するグルタミル及びアスパリル残基になる。あるいは、これらの残基は、穏和な酸性の条件下で脱アミド化される。他の翻訳後改変としては、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリル及びトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のO-アミノ基のメチル化(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983])、N末端アミンのアセチル化、及びいくつかの場合には、C末端カルボキシルのアミド化が挙げられる。

40

【0104】

開示された組成物に取り込まれることができる多数のアミノ酸及びペプチドアナログがあることは理解される。たとえば、多数のD-アミノ酸又は表1に示されるアミノ酸とは異なる機能的置換基を有するアミノ酸がある。天然のペプチドとは反対の立体異性体もまた、ペプチドアナログの立体異性体と同様に開示されている。これらのアミノ酸は、選択したアミノ酸をtRNA分子に担持させること及びアナログアミノ酸をペプチド鎖に部位特異的な方法で挿入するために、たとえばアンバーコドンを用いる遺伝的構築物を工学的に製造することにより、ポリペプチド鎖に容易に取り込ませることができる(Thorson et al. Methods in Molec. Biol. 77:43-73 (1991), Zoller, Current Opinion in Biote

50

chnology, 3:348-354 (1992); Ibba, Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 13:197-216 (1995), Cahill et al. TIBS, 14(10):400-403 (1989); Benner, TIB Tech, 12:158-163 (1994); Ibba及びHennecke, Bio/technology, 12:678-682 (1994)、これらのすべては、少なくともアミノ酸アナログに関する材料について、参照によりここに援用される)。

【0105】

ポリペプチドと似せた分子であるが、天然のペプチド結合を介して連結されていないものを、作製することができる。たとえばアミノ酸又はアミノ酸アナログのための結合としては、 $\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $- \text{CH}_2\text{S}-$ 、 $- \text{CH}_2- \text{CH}_2-$ 、 $- \text{CH}=\text{CH}-$ 、(シス及びトランス)、 $- \text{COCH}_2-$ 、 $- \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、及び $- \text{CHH}_2\text{SO}-$ が挙げられる(これら及びその他のものは、Spatola, A. F. in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein eds., Marcel Dekker, New York, p.267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (March 1983), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications (一般的な総説); Morley, Trends Pharm Sci (1980) pp. 463-468; Hudson, D. et al., Int J Pept Prot Res 14:177-185 (1979) ($- \text{CH}_2\text{NH}-$ 、 CH_2CH_2-); Spatola et al. Life Sci 38:1243-1249 (1986) ($- \text{CHH}_2-$ S); Hann J. Chem. Soc Perkin Trans. 1307-314 (1982) ($- \text{CH}- \text{CH}-$ 、シス及びトランス); Almquist et al. J. Med. Chem. 23:1392-1398 (1980) ($- \text{COCH}_2-$); Jennings-White et al. Tetrahedron Lett 23:2533 (1982) ($- \text{COCH}_2-$); Szelke et al.の欧州特許出願 E P 4 5 6 6 5 C A (1982): 97:39405 (1982) ($- \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$); Holladay et al. Tetrahedron. Lett 24:4401-4404 (1983) ($- \text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$);及びHruby Life Sci 31:189-199 (1982) ($- \text{CH}_2-$ S)に見出すことができ、それらの各々が、参照によりここに援用される。特に好ましい非ペプチド結合は、 $- \text{CH}_2\text{NH}-$ である。ペプチドアナログは、結合原子間に、b-アラニン、g-アミノブチル酸などのように2以上の原子を有することができることは理解される。

【0106】

アミノ酸アナログ及びアナログ及びペプチドアナログは、しばしば、たとえばより経済的な生産、より大きい化学的安定性、強化された薬学的特性(半減期、吸収、強度、効率等)、変化した特異性(たとえば、生物学的活性の広いスペクトル)、低減された抗原性その他のような、増強された又は望ましい特性を有することができる。

【0107】

D-アミノ酸は、より安定なペプチドを生成するために用いることができるが、これは、D-アミノ酸はペプチダーゼ等によって認識されないためである。同じタイプのD-アミノ酸でのコンセンサス配列の1以上のアミノ酸の系統的な置換(たとえば、L-リジンの代わりにD-リジン)は、より安定なペプチドを生成するために用いることができる。システイン残基は、2以上のペプチドを環状化又は付着させるために用いることができる。これは、ペプチドを特定のコンフォメーションに束縛するために有益である(Rizo及びGierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)、参照によりここに援用される)。

【0108】

ここで開示された遺伝子及びタンパク質の任意の変異体、改変又は誘導体を定義するためのひとつの方法は、既知の特異的な配列に対する相同性によって変異体、改変又は誘導体を定義することであることは理解される。具体的に開示されたのは、ここで開示された核酸及びポリペプチドの変異体であって、記載された又は既知の配列に対して、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%相同性を有するものである。当業者は、2つのタンパク質又は核酸の相同性をいかにして決定するかを容易に理解する。たとえば、相同性は、相同性が最も高いレベルになるように2つの配列を整列させた後に、算出することができる。

【0109】

相同性を算出するための別の方法は、公開されたアルゴリズムによって行うことができる。比較のための配列の最適な整列（アラインメント）は、Smith及びWaterman, Adv. Appl. Math. 2: 482（1981）の局所的相同性アルゴリズム、Needleman及びWunsch, J. Mol. Biol. 48:443（1970）の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson及びLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444（1988）の類似性探索（search for similarity）法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行（GAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA、the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI）又は検査（inspection）によって、実行することができる。これらの参考文献は、相同性の算出方法について、参照によりその全体がここに援用される。

10

【0110】

同じタイプの相同性は、核酸について、たとえば、Zuker, M. Science 244:48-52, 1989, Jaeger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706-7710 1989, Jaeger et al. Methods Enzymol. 183:281-306 1989に開示されたアルゴリズムによって得ることができ、それらは、少なくとも核酸の整列に関する材料について、参照によりここに援用される。

【0111】

提供されている組成物は、経口、経直腸、嚢内、心室（脳室）内、頭蓋内、鞘内、関節内、腔内、非経口（静脈内、筋内、又は皮下）、局所的（粉末剤、軟膏又は点滴剤）、腹腔内注射によって、経皮的に、吸入によって又は口腔もしくは鼻腔用スプレーによって、投与することができる。必要な抗体又は治療剤の正確な量は、年齢、体重及び対象の一般的な状態、治療すべき疾患の重症度、腫瘍の位置及び大きさ、用いられる特定の化合物、投与のモード等に応じて、対象ごとに変化する。適切な量は、ここでの教示を与えられれば当業者によってルーチンの実験のみによって決定されることができる。典型的な抗体の単一用量は、0.1～10,000マイクログラムの範囲であり、好ましくは1及び100マイクログラムの間である。キャリア中の典型的な抗体濃度は、送達される1ミリリットル当たり0.2～2000ナノグラムの範囲である。関節内への注射のためには、抗体及びキャリアの容量は、その関節に応じて変化するが、約0.5～10ml、及び好ましくは1～5mlがヒトの膝に注入され、そして、約0.1～5ml、好ましくは1～2mlがヒトの足首に注入される。

20

30

【0112】

組成物は、さらに、製剤学的に許容されうるキャリアを含むことができる。「製剤学（薬学）的に許容されうる」は、生物学的に又はそれ以外で望ましくないものではない材料であって、有意な望ましくない生物学的影響を引き起こすことなしに又はそれが含まれる製剤組成物の他の成分と悪い方式で相互作用することなしに、選択された基質とともに個体に投与され得るもの、を意味する。

【0113】

意図された投与モードに応じて、抗体又は治療剤は、たとえば、錠剤、座剤、ピル（丸薬）、カプセル、粉末剤、液体又は懸濁液のような固体、半固体又は液体の用量形態の製剤組成物であることができ、好ましくは正確な用量の単一投与に好適な単位用量形態であることができる。組成物は、有効量の選択された基質を、製剤学的に許容されうるキャリアとの組合せで含み、それに加えて他の医薬、製剤、キャリア又は希釈剤を含むことができる。非経口注入に好適な組成物は、生理学的に許容されうる滅菌された水性又は非水性溶液、分散液、懸濁液又は乳液、及び滅菌された注射可能な溶液又は分散液に再構成される滅菌粉末剤を含むことができる。好適な水性及び非水性キャリア、希釈剤、溶剤又はベヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール類（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロール等）、それらの好適な混合物、植物油（たとえばオリーブ油）及びエチルオレートのような注入可能な有機エステルが挙げられる。適正な流動性は、たとえば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。

40

50

【 0 1 1 4 】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤及び調剤 (dispensing agent) のような補助薬をも含んでいてもよい。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌剤及び抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等によって確保することができる。等張剤、たとえば、糖類、塩化ナトリウム等を含有させることも望ましい場合がある。注入可能な製剤形態の延長された吸収は、吸収を遅延される薬剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの使用によってもたらされることができる。

【 0 1 1 5 】

経口投与のための固体用量形態としては、カプセル、錠剤、ピル(丸薬)、粉末剤及び顆粒が挙げられる。このような固体用量形態においては、活性化合物は、少なくとも1種の不活性な慣用的賦形剤 (又はキャリア)、たとえばクエン酸ナトリウム又はリン酸2カルシウム、又は (a) 充填剤又は増量剤、たとえば、スターチ、乳糖、ショ糖、グルコース、マンニトール及び珪酸、(b) 結合剤、たとえば、カルボキシメチルセルロース、アリグネート (alignates)、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ショ糖及びアラビアゴム、(c) 希釈剤、たとえば、グリセロール、(d) 崩壊剤、たとえば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ又はタピオカデンプン、アルギン酸、ある種の複合体珪酸塩 (エステル) 及び炭酸ナトリウム、(e) 溶解遅延剤 (solution retarders)、たとえば、パラフィン、(f) 吸収促進剤、たとえば、第4級アンモニウム化合物、(g) 湿潤剤、たとえば、セチルアルコール及びモノステアリン酸グリセロール、(h) 吸着剤、たとえば、カオリン及びベントナイト、(i) 潤滑剤、たとえば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、又はそれらの混合物、と混合される。カプセル、錠剤及びピル (丸薬) の場合、用量形態は、緩衝剤をも含むことができる。

【 0 1 1 6 】

同様のタイプの固体組成物は、ラクトース又は乳糖ならびに高分子ポリエチレングリコール等のような賦形剤を用いて、軟及び硬充填ゼラチンカプセルの充填剤としてもまた使用することができる。

【 0 1 1 7 】

錠剤、糖衣錠、カプセル、ピル (丸薬) 及び顆粒のような固体用量形態は、腸溶性コーティング及び当該技術分野において周知のその他のコーティングのようなコーティング及びシェルを伴って調製することができる。これらは、乳白剤を含んでいてもよく、遅延された方式で腸管内の一定の部分で1種又は複数の活性化合物を放出するような組成物であることができる。用いることができる包埋組成物の例としては、ポリマー物質及びワックスがある。活性化合物は、適切な場合には、1以上の上記の賦形剤を含むマイクロカプセル化された形態であることができる。

【 0 1 1 8 】

経口投与のための液体用量形態としては、製剤学的に許容され得る乳剤、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルが挙げられる。活性化合物に加えて、液体用量形態は、当該分野において一般に用いられる、水又は他の溶剤のような不活性希釈剤、可溶化剤及び乳化剤を含むことができ、たとえば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、カルボン酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油類、特に、綿実油、塊茎植物油 (groundnut oil)、トウモロコシ胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油及びゴマ油、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル類、又はこれらの物質の混合物等である。

【 0 1 1 9 】

このような不活性希釈剤に加えて、組成物は、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味料、調味料及び香料のような補助薬をも含むことができる。

【 0 1 2 0 】

活性化合物に加えて、懸濁液は、懸濁剤、たとえば、エトキシ化イソステアリルアルコ

10

20

30

40

50

ール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天及びトラガカント、又はこれらの物質の混合物等を含んでいてもよい。

【0121】

直腸投与のための組成物は、好ましくは、本発明の化合物を、ココアバター、ポリエチレングリコール又は坐剤ワックスのような、通常温度では固体であるが体温では液体であって、したがって、直腸又は腔で融解し活性成分を放出する、好適な非刺激性賦形剤又はキャリアと混合することによって調製することができる、坐剤である。

【0122】

本発明の化合物の局所投与のための用量形態としては、軟膏、粉末剤、噴霧薬及び吸入剤が挙げられる。活性成分は、滅菌条件下で、生理学的に許容されうるキャリア及び必要な可能性のある任意の保存料、緩衝剤、又は推進剤と混合される。眼の製剤、軟膏、粉末剤及び溶液もまた、本発明の範囲内であるものとして企図される。

【0123】

「製剤学（薬学）的に許容されうる塩類、エステル類、アミド類及びプロドラッグ」という用語は、ここで用いられる場合、健全な医学的判断の範囲内で、患者の組織と接触させての使用に好適であり、過度の毒性、刺激、アレルギー反応等を伴わず、妥当な利益／リスク比と釣り合っており、その意図された用途について効果的である、本発明の化合物のカルボキシレート塩類、アミノ酸付加塩類、エステル類、アミド類及びプロドラッグ、ならびに可能な場合には本発明の化合物の両性イオン形態を指す。「塩類」という用語は、本発明の化合物の、比較的非毒性の無機及び有機酸付加塩類を指す。これらの塩類は、化合物の最終的な単離及び精製の間インシチュで調製することができ、又は精製された化合物をその遊離塩基形態で好適な有機又は無機酸と別個に反応させ、形成された塩類を単離することによって調製することができる。代表的な塩類としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、蔞酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリル酸塩（laurate）、ホウ酸塩、ベンゾエート（安息香酸塩）、乳酸塩、リン酸塩、トシラート、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチレート（naphthylate）、メシレート（mesylate）、グルコヘプトネート（glucoheptonate）、ラクトビオネート（lactobionate）、メタンスルホン酸塩及びラウリル硫酸塩類等が挙げられる。これらは、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等のようなアルカリ及びアルカリ土類金属ベースのカチオン類、ならびに、非毒性のアンモニウム、第4級アンモニウム及びアミンカチオン類（アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン等を含むがそれらに限らない）を含んでいてもよい。（たとえば、S. M. Barge et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci. 1977 66:1-19を参照されたい、これは参照によりここに援用される。）

【0124】

提供されているのは、RNA干渉（RNAi）における使用のための二本鎖RNA（dsRNA）を含む単離された核酸である。dsRNAは、短鎖干渉性RNA（siRNA）又は短鎖ヘアピンRNA（shRNA）であることができる。したがって、提供されているのは、shRNAを含む単離された核酸であって、そのshRNAはCARD含有タンパク質の発現を阻害する。shRNAは、配列番号10、12、14又は16の核酸配列によってコードされていることができる。

【0125】

開示された核酸は、たとえば、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ又はヌクレオチド代用品から構成されている。これら及び他の分子の非制限的な例がここで検討される。たとえば、ベクターが細胞において発現される場合、発現されたmRNAは、典型的にはA、C、G及びUから構成されていることが理解される。同様に、もし、たとえばアンチセンス分子が細胞又は細胞環境に、たとえば外来性の送達によって、導入される場合、その

10

20

30

40

50

アンチセンス分子は、細胞の環境においてアンチセンス分子の分解を低減するヌクレオチドアナログから構成されていることが有利であることが理解される。

【0126】

「単離(された)核酸」又は「精製(された)核酸」は、本発明のDNAが由来した生物の天然のゲノムにおいてその遺伝子に隣接する遺伝子を含まないDNAを意味する。したがって、この用語は、たとえば組換えDNA、自律複製プラスミド又はウイルスのようなベクター中に取り込まれている;又は原核生物又は真核生物のゲノムDNAに取り込まれている(たとえば、トランスジーン);又は分離した分子(たとえば、PCR、制限エンドヌクレアーゼ消化又は化学もしくはインビトロ合成によって産生された、cDNA、又はゲノムもしくはcDNAフラグメント)として存在する、組換えDNAを含む。また、それは、付加的なポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAをも含む。「単離(された)核酸」という用語は、RNA、たとえば、単離されたDNA分子によってコードされる又は化学合成された、又は少なくともいくらかの細胞成分、たとえば他のタイプのRNA分子又はポリペプチド分子から分離された又はそれらを実質的に含まない、mRNA分子をも指す。

10

【0127】

ここで提供されているのは、発現制御配列に作動可能に連結された、ここで提供された任意の核酸を含むベクターである。哺乳類宿主細胞でのベクターからの転写を制御する好ましいプロモーターは、種々の供給源から入手することができ、たとえば、以下のようなウイルスのゲノム:ポリオーマ、シミアンウイルス40(SV40)、アデノウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及び最も好ましくはサイトメガロウイルス、又は非相同哺乳類プロモーター、たとえば - アクチンプロモーター又はEF1プロモーターから、又はハイブリッドもしくはキメラプロモーター(たとえば、 - アクチンプロモーターに融合されたサイトメガロウイルスプロモーター)から入手することができる。SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点をも含むSV40制限フラグメントとして好都合に得ることができる(Fiers et al., Nature 273:113 (1978))。ヒトサイトメガロウイルスの極初期(immediate early)プロモーターは、HindIII E制限フラグメントとして好都合に得ることができる(Greenway, P.J. et al., Gene 18:355-360 (1982))。もちろん、宿主細胞又は関連種由来のプロモーターもまた、ここでは有用である。

20

30

【0128】

「エンハンサー」は、一般に、転写開始部位からの固定的な距離を有さずに機能するDNAの配列を指し、転写単位に対して、5'側(Laimins, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78:993 (1981))又は3'側(Lusky, M.L. et al., Mol. Cell Bio. 3:1108 (1983))のいずれであることもできる。さらに、エンハンサーは、イントロンの中(Banerji, J.L. et al., Cell 33:729 (1983))ならびにコード配列それ自体の中(Osborne, T.F. et al., Mol. Cell Bio. 4:1293 (1984))にあることができる。それらは、通常、長さ10及び300bpの間であり、シスで機能する。エンハンサーは、近傍のプロモーターからの転写を増大するように機能する。エンハンサーは、しばしば、転写の調節を媒介する応答要素をも含む。プロモーターもまた、転写の調節を媒介する応答要素を含むことができる。エンハンサーは、しばしば、遺伝子の発現の調節を決定する。多くのエンハンサー配列が今では哺乳類遺伝子(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、フェトタンパク質及びインシュリン)から公知である一方で、典型的には、一般的な発現については真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。好ましい例は、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(bp 100270)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーである。

40

【0129】

プロモーター及び/又はエンハンサーは、光又はその機能の引き金をひく特異的化学的事象によって、特異的に活性化されてもよい。システムは、テトラサイクリン及びデキサ

50

メタゾンのような試薬、合成転写因子、方向付けされたRNA自己切断 (Yen L. et al. 2004. Nature 431:471-476) 及び他のアプローチによって制御されることができる。また、線のような放射線照射又はアルキル化化学療法剤に暴露することによって、ウイルスベクター遺伝子発現を増強する方法もある。

【0130】

プロモーター及び/又はエンハンサー領域は、転写されるべき転写単位の領域の発現を最大化するための構成的プロモーター及び/又はエンハンサーとして作用することができる。ある種の構築物において、プロモーター及び/又はエンハンサー領域は、特定のタイプの細胞において特定の時のみに発現されるとしても、すべての真核生物細胞タイプにおいて活性である。このタイプの好ましいプロモーターは、CMVプロモーター (650 bases) である。他の好ましいプロモーターは、SV40プロモーター、サイトメガロウイルス (及び連結するイントロン配列)、 γ -アクチン、伸長因子1 (EF-1) 及びレトロウイルスベクターLTRである。

10

【0131】

すべての特異的調節要素は、クローニングすることができ、メラノーマ細胞のような特異的な細胞タイプにおいて選択的に発現される発現ベクターを構築するために用いることができることが示されている。神経膠線維性酢酸タンパク質 (GFAP) プロモーターは、神経膠 (星状細胞) 起源の細胞において選択的に遺伝子発現するために用いられた。HLA-DR、CD11c、ファスシン (Fascin) 及びCD68プロモーターは、すべて、マクロファージ及び樹状細胞を含む抗原提示細胞において選択的に遺伝子を発現するために用いられており (Brocker, T., et al. 1997. J Exp Med 185:541-550; Gough, P.J. 及びRaines, E.W. 2003. Blood 101:485-491; Cui, Y. et al. 2002. Blood 99:399-408; Sudowe, S. et al. 2003. Mol Ther 8:567-575)、樹状細胞特異的遺伝子 (CD83等) 由来のプロモーター要素もまた、これに関して有用であることが明らかにされている (Berchtold S. et al. 2002. Immunobiology 205:231-246)。

20

【0132】

真核生物宿主細胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト又は有核細胞) において用いられる発現ベクターもまた、mRNA発現に影響し得る転写終結に必要な配列を含んでいることができる。これらの領域は、組織因子タンパク質をコードするmRNAの非翻訳部分のポリアデニル化セグメントとして転写される。3'非翻訳領域もまた、転写終結部位を含む。転写単位は、ポリアデニル化領域をも含むことが好ましい。この領域のひとつの利点は、転写される単位がmRNAのようにプロセッシングされ、輸送される確率を増大させることである。発現構築物におけるポリアデニル化シグナルの同定及び使用は、十分に確立されている。相同なポリアデニル化シグナルは、トランスジーン構築物において用いられることが好ましい。ある種の転写単位において、ポリアデニル化領域は、SV40初期ポリアデニル化シグナルから由来し、約400塩基からなる。転写される単位は、他の標準的な配列を、単独で又は上記の配列と組合せて含み、構築物からの発現又は構築物の安定性を改善することが好ましい。

30

【0133】

ウイルスベクターは、マーカー生成物をコードする核酸配列を含むことができる。このマーカー生成物は、遺伝子が細胞に送達されたか否か、及びいったん送達されたら、発現されているか否か、を決定するために用いることができる。好ましいマーカー遺伝子としては、 β -ガラクトシダーゼをコードする大腸菌 (*E. coli*) のlacZ遺伝子、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 及びルシフェラーゼが挙げられる。

40

【0134】

いくつかの態様においては、マーカーは、選択可能なマーカーであることができる。哺乳類細胞についての好適な選択可能マーカーの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)、チミジンキナーゼ、ネオマイシン、ネオマイシンアナログG418、ハイグロマイシン及びピューロマイシンである。このような選択可能マーカーが哺乳類宿主細胞内に成功裡に移入されると、形質転換された哺乳類宿主細胞は、選択的圧力下に置かれた場合に

50

生存することができる。2つの広く用いられている異なるカテゴリーの選択的な管理法がある。第一のカテゴリーは、細胞の代謝及び添加物入り培地に依存せずに生育する能力を欠いた突然変異細胞株の使用に基づいている。2つの例は、CHO DHFR細胞及びマウスLTK細胞である。これらの細胞は、チミジン又はヒポキサンチンのような栄養の添加なしに生育する能力を欠いている。これらの細胞は、完全なヌクレオチド合成経路に必要なある種の遺伝子を欠いているため、添加物入り培地において失われたヌクレオチドが提供されるのでなければ生存できない。培地への添加の代替法は、インタクトなDHFR又はTK遺伝子を、それぞれの遺伝子を欠いている細胞に導入し、したがって、その生育要件を変更することである。DHFR又はTK遺伝子で形質転換されていない個別の細胞は、添加物なしの培地中で生存することができない。

10

【0135】

第二のカテゴリーは、優勢選択であり、これは突然変異細胞株の使用を必要とせずに任意の細胞タイプにおいて用いられる選択スキームを指す。これらのスキームは、典型的には、宿主細胞の生育を停止させる薬剤を用いる。新規な遺伝子を有する細胞は、薬剤抵抗性を運ぶタンパク質を発現し、選択を生き抜くであろう。このような優勢選択の例は、薬剤の、ネオマイシン (Southern P. 及び Berg P. J. Molec. Appl. Genet. 1 :327 (1982))、ミコフェノール酸 (mycophenolic acid) (Mulligan, R.C. 及び Berg, P. Science 209:1422 (1980)) 又はハイグロマイシン (Sugden, B. et al. Mol. Cell. Biol. 5:410-413 (1985)) を用いる。この3つの例は、適切な薬剤、それぞれ、薬剤の、G418 又はネオマイシン (ゲンチシン)、xgpt (ミコフェノール酸) 又はハイグロマイシン 20 に対する抵抗性を運ぶための真核生物制御下の細菌遺伝子を用いる。他のものは、ネオマイシンアナログ、G418 及びピューロマイシンを含む。

20

【0136】

提供されているのは、ここで提供された任意のベクターを含む細胞である。開示された細胞は、ここで提供されたベクターをクローニング又は増殖させるために用いられる任意の細胞であることができる。したがって、細胞は、任意の一次細胞培養又は確立された細胞株由来であることができる。細胞タイプは、ベクター及び所望の用途の選択に基づいて、当業者が選択することができる。

【0137】

提供されているのは、デスレセプターのCARD含有タンパク質結合領域を含む単離されたポリペプチドであって、25アミノ酸残基未満を含むポリペプチドである。

30

【0138】

したがって、提供されているポリペプチドは、TFNR1のCARD含有タンパク質結合領域であることができる (受託番号 gi:23312372)。提供されているポリペプチドは、FasレセプターのCARD含有タンパク質結合領域であることができる (受託番号 gi:119833)。提供されているポリペプチドは、TRAILレセプターのCARD含有タンパク質結合領域であることができる。したがって、提供されているポリペプチドは、DR4のCARD含有タンパク質結合領域であることができる (受託番号 gi:21264525)。提供されているポリペプチドは、DR5のCARD含有タンパク質結合領域であることができる (受託番号 gi:3721878)。提供されているポリペプチドは、配列番号22のアミノ酸配列のフラグメントであることができ、このフラグメントはここで開示されたCARD含有タンパク質に結合するものであることができる。説明例として、提供されているポリペプチドは、DR5のアミノ酸250~340を含むことができる。したがって、ポリペプチドは、配列番号23のアミノ酸配列を含むことができる。ポリペプチドは、さらに、配列番号23のアミノ酸配列のフラグメントを含むことができ、このフラグメントはDDX3に結合することができるものであることができる。一例として、調節因子は、DR5のアミノ酸280~310を含むポリペプチドであることができる。したがって、調節因子は、配列番号24のアミノ酸配列を含むことができる。別の例として、調節因子は、DR5のアミノ酸300~330を含むポリペプチドであることができる。したがって、調節因子は、配列番号36のアミノ酸配列を含むこと

40

50

ができる。

【0139】

「結合(する)」は、ポリペプチドが、標準的な生化学的方法で検出することができる十分な親和性で、CARD含有タンパク質タンパク質と非共有結合(たとえば水素結合)を形成することを意味する。ひとつの側面において、提供されているポリペプチドは、それが由来するデスレセプターと等しい又はそれより大きい親和性で、CARD含有タンパク質と結合する。

【0140】

デスレセプターのCARD含有タンパク質結合領域は、CARD含有タンパク質結合の競合的阻害のための可溶性レセプターとしても利用性を有する。したがって、提供されているのは、細胞においてデスレセプターへのCARD含有タンパク質結合をブロックする方法であって、細胞を、ここで開示されたデスレセプターの生存領域をコードするポリペプチド又は結合をブロックするそのフラグメントと接触させる工程を含む、方法である。同じく提供されているのは、細胞においてデスレセプターアゴニストに対する細胞の抵抗性を逆転させる方法であって、細胞をポリペプチドと接触させることを含む方法である。

10

【0141】

提供されているのは、CARD含有タンパク質のデスレセプター結合ドメインを含む単離されたポリペプチドである。提供されているポリペプチドは、DDX3のデスレセプター結合ドメインであることができる(配列番号25、受託番号gi:13514816)。提供されているポリペプチドは、配列番号25のアミノ酸配列のフラグメントであって、このフラグメントはここで開示されたデスレセプターと結合するものであることができる。DDX3は、約アミノ酸200~250及び350~400でDR5と結合する。したがって、調節因子は、DDX3のアミノ酸200~250を含むポリペプチド、又はそのフラグメントであることができる。したがって、調節因子は、配列番号37のアミノ酸配列を含むことができる。したがって、調節因子は、DDX3のアミノ酸350~400を含むポリペプチド、又はそのフラグメントであることができる。したがって、調節因子は、配列番号38のアミノ酸配列を含むことができる。提供されているポリペプチドは、mda-5のデスレセプター結合ドメインであることができる(受託番号gi:11344593)。提供されているポリペプチドは、RIG-1のデスレセプター結合ドメインであることができる(受託番号gi:6048564)。

20

30

【0142】

CARD含有タンパク質のデスレセプター結合ドメインを含む単離されたポリペプチドは、デスレセプター誘導性アポトーシスを阻害することができない場合、CARD含有タンパク質によるデスレセプター結合の優勢陰性阻害剤としての利用性を有する。したがって、ひとつの側面において、単離されたポリペプチドは、カスパーゼ又はIAPと結合することができない。DDX3のIAP結合に関与するCARDモチーフは、アミノ酸約50~100である。したがって、提供されているポリペプチドは、DDX3のデスレセプター結合ドメインを含むが、DDX3のアミノ酸50~100を含まないことができる。したがって、調節因子は、DDX3のアミノ酸200~250及び/又はアミノ酸350~400を含むが、DDX3のアミノ酸50~100を含まないポリペプチドであることができる。たとえば、提供されているのは、DDX3のアミノ酸151~662からなるポリペプチドである。したがって、調節因子は、配列番号39のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことができる。

40

【0143】

さらに別の側面において、ポリペプチドは、内在性CARD含有タンパク質とデスレセプターとの会合をブロックすることができる。さらに別の側面において、ポリペプチドは、デスレセプターに対するIAPの動員を防止することができる。別の側面においては、ポリペプチドは、デスレセプターに対するFADDの動員を阻害することができない。これらの側面の任意の組合せが企図される。

デスレセプター誘導アポトーシスを阻害する、DDX3のようなCARD含有タンパク

50

質の能力は、少なくとも一部はCARD含有タンパク質のCARDドメインによるデスレセプターに対するIAPの動員によるものである。したがって、提供されているのは、IAPとデスレセプターとの会合をブロックする方法であって、細胞を、開示されたポリペプチドと接触させる工程を含む方法である。また、提供されているのは、デスレセプターアゴニストに対する細胞の抵抗性を逆転させる方法であって、細胞を、開示されたポリペプチドと接触させることを含む方法である。

【0144】

ここで開示された組成物及び開示された方法を実施するために必要な組成物は、別途具体的に記載しない限り、その特定の試薬又は化合物について当業者に公知の任意の方法を用いて作製することができる。

10

【0145】

たとえば、核酸は、標準的な化学合成法を用いて作製することができ、又は酵素的な方法もしくは任意の他の公知の方法を用いて作製することができる。このような方法は、標準的な酵素的消化及びその後のヌクレオチドフラグメントの単離（たとえば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition (Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989) 第5、6章を参照されたい) から、純粋に合成による方法、たとえばMilligen又はBeckman System 1Plus DNA合成機（たとえばモデル8700自動合成機、Milligen-Bioscience, Burlington, MA又はABIモデル380B）を用いるシアノエチルホスホルアミダイト法までにわたる。オリゴヌクレオチドの作製に有用な合成的方法は、Ikuta et al., *Ann. Rev. Biochem.* 53:323-356 (1984) (ホスホトリエステル法及びホスファイト-トリエステル法)、及びNarang et al., *Methods Enzymol.*, 65:610-620 (1980) (ホスホトリエステル法) にも記載されている。タンパク質核酸分子は、Nielsen et al., *Bioconjug. Chem.* 5:3-7 (1994) に記載された方法のような公知の方法を用いて作製することができる。

20

【0146】

開示されたポリペプチドを作製するひとつの方法は、タンパク質化学技術によって2又はそれ以上のペプチド又はポリペプチドを連結することである。たとえば、ペプチド又はポリペプチドは、現在利用可能な実験室装置を用いてFmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)又はBoc(tert-ブチルオキシカルボニル)化学を用いて化学的に合成することができる。(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)。当業者は、開示されたタンパク質に相当するペプチド又はポリペプチドが、たとえば標準的な化学反応によって合成できることを、容易に認めることができる。たとえば、あるペプチド又はポリペプチドは、合成され、その合成樹脂から切断させないでいることができる一方、他のペプチド又はタンパク質のフラグメントは、合成され、続いてその樹脂から切断されて、それによって他方のフラグメントにおいては官能的に保護されている末端基を暴露することができる。ペプチド縮合反応によって、これらの2つのフラグメントを、それぞれカルボキシル末端及びアミノ末端でペプチド結合を介して共有結合させ、抗体又はそのフラグメントを形成させることができる(Grant GA (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman and Co., N. Y. (1992); Bodansky M及びTrost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY、これらは、少なくともペプチド合成に関連する材料に関して、参照によりここに援用される)。あるいは、ペプチド又はポリペプチドは、ここで記載されているように、インピボで独立して合成される。いったん単離されると、これらの独立したペプチド又はポリペプチドは、同様のペプチド縮合反応を介して連結され、ペプチド又はそのフラグメントを形成することができる。

30

40

【0147】

たとえば、クローニングされた又は合成されたペプチドセグメントの酵素的連結により、比較的短いペプチドフラグメントを、より大きいペプチドフラグメント、ポリペプチド又はタンパク質ドメイン全体を生成するように結合させることが可能になる(Abrahmsen L et al., *Biochemistry*, 30:4151 (1991))。あるいは、合成ペプチドのネイティブの

50

化学的連結を、より短いフラグメントから合成により大きいペプチド又はポリペプチドを構築するために利用することができる。この方法は、2工程の化学反応からなっている (Dawson et al. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science* 266:776-779 (1994))。最初の工程は、保護されていない合成ペプチドの化学選択的反応であり、チオエステルと、アミノ末端 Cys 残基を含む別の保護されていないペプチドセグメントとにより、チオエステル結合中間体を、最初の共有結合生成物として与える。反応条件の変化なしに、この中間体は、偶発的で迅速な分子内反応を起こし、連結部位でネイティブなペプチド結合を形成する (Baggiolini M et al. (1992) *FEBS Lett.* 307:97-101; Clark-Lewis I et al., *J.Biol.Chem.*, 269:16075 (1994); Clark-Lewis I et al., *Biochemistry* 30:3128 (1991); Rajarathnam K et al., *Biochemistry* 33:6623-30 (1994))。

10

【0148】

あるいは、保護されていないペプチドセグメントは、化学的に連結され、そこで化学的連結の結果として形成されたペプチドセグメント間の結合は非天然 (非ペプチド) 結合である (Schnolzer, M et al. *Science* 256:221 (1992))。この技術は、タンパク質ドメインのアナログ、ならびに十分な生物学的活性を有する大量の比較的純粋なタンパク質を合成するために用いられてきたものである (deLisle Milton RC et al., *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, New York, pp. 257-267 (1992))。

【0149】

以下の実施例は、本発明にしたがった方法及び結果を説明するためのものである。これらの実施例は、本発明の全ての側面を包含するには意図されておらず、むしろ代表的な方法及び結果を説明することを意図されている。これらの実施例は、当業者には明白な本発明の等価物及び変形を除外することを意図するものではない。

20

【0150】

(実施例)

例1: デスドメイン機能での封鎖の生成による T R A I L - R 2 媒介性アポトーシスに対する腫瘍細胞の誘導可能な抵抗性

材料及び方法細胞株、抗体、及び試薬:

ヒト乳がん細胞株、M D A - M B - 2 3 1 は、the American Tissue Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) から購入した。ヒト卵巣がん細胞株、U L - 3 C を入手した。細胞は、10% 熱非働化 F C S、50 µg/ml ストレプトマイシン、及び 50 U/mL ペニシリン (Cellgro, Mediatec, Inc., Herndon, VA) を添加した D M E M 又は R P M I 1 6 4 0 中で維持した。抗ヒト T R A I L - R 1 (クローン: 2 E 1 2) 及び抗ヒト T R A I L - R 2 (クローン: T R A - 8) モノクローナル抗体は、以前に記載された (Ichikawa, et al. 2003; Ichikawa, et al. 2001)。フローサイトメトリー及び免疫沈降アッセイのための抗ヒト T R A I L - R 2 (クローン: 2 B 4) は、開発した。組換え可溶性 T R A I L は、Alexis Biochemicals (San Diego, CA) から購入した。ポリクローナル抗カスパーゼ 3 及び抗カスパーゼ 8 抗体は、BD PharMingen (San Diego, CA) から購入した。モノクローナル抗ヒトカスパーゼ 2、3、8、9 及び 10 抗体、及びモノクローナル抗ヒト B c l - 2、B c l - x L、B a x、c I A P - 1、c I A P - 2、X I A P 及びサバイピン抗体は、調製した。ポリクローナル抗ホスホ - S A P K / J N K (T h r ^{1 8 3} / T y r ^{1 8 5})、抗ホスホ - p 3 8 M A P K (T h r ^{1 8 0} / T y r ^{1 8 2})、抗 P A R P 抗体は、Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA) から購入した。抗 - アクチン抗体は、Sigma (St. Louis, MO) から購入した。抗 F A D D は、Transduction Laboratories (Lexington, KY) から購入した。抗 F L I P は、ProSci Inc. (Poway, CA) から購入した。すべての西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) - コンジュゲート化二次試薬は、Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL) から購入した。

30

40

【0151】

50

TRAIL-R1及びR2の細胞表面発現のフローサイトメトリー解析:

10⁶個の細胞を、1 µg/mlのビオチン化2E12及び1 µg/mlのPE-コンジュゲート化2B4とともに、氷上で30分間、インキュベートした。FACS緩衝液(5% FBS及び0.01% NaN₃を含むPBS)で2回洗浄した後、細胞を、ストレプトアビジン-サイクローム(Cychrome)とともにインキュベートした。10,000個の生存細胞を、FACSscanフローサイトメーター(BD, CA)で解析した。

【0152】

TRA-8、2E12及びTRAIL媒介性アポトーシスに対する腫瘍細胞感受性の細胞毒性解析:

細胞(1,000細胞/ウェル)を、96ウェルプレートに三連で、8種の濃度のTRA-8、2E12又はTRAIL(1,000ng/mlからの二重連続希釈)とともに播いた。細胞生存率は、製造業者の指示書にしたがってATPLITEアッセイ(Packard Instruments, Meriden, CT)を用いて、一晚培養後に決定した。結果は、培地対照ウェルに対して比較した処理ウェルの生存細胞のパーセンテージとして表す。

【0153】

TRAIL-R2に対する腫瘍細胞抵抗性の誘導:

細胞(5 × 10⁵/ml)を、1ng/mlの開始用量のTRA-8とともに2日間インキュベートした。細胞を、2日ごとに新鮮な培地で分割し、TRA-8用量が2,000ng/mlに達するまで、2倍用量のTRA-8を含む培地でインキュベートした。各処理サイクルで、非誘導(親)細胞及び誘導用量のTRA-8で処理された誘導細胞の細胞生存率を、ATPLITEアッセイによって決定した。

【0154】

TRAIL-R2のクローニング及び配列決定:

TRAIL-R2の全長cDNAは、プラチナDNAブルーフリーディングポリメラーゼ(Invitrogen)を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって得た。cDNAは、pCR2.1-TOPOベクター(Invitrogen)にクローニングした。少なくとも5個の独立したクローンを配列決定のために選択した。

【0155】

アポトーシス関連タンパク質のウェスタン・ブロット解析:

腫瘍細胞(3 × 10⁶)を、冷PBSで2回洗浄し、10mM トリス塩酸(pH 7.6)、150mM NaCl、0.5mM EDTA、1mM EGTA、0.1% SDS、1mM オルソバナジウム酸ナトリウム、及びプロテアーゼ阻害剤の混合物(1mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド、1 µg/ml ペプスタチンA、2 µg/ml アプロチニン)を含む300 µlの溶解緩衝液で溶解した。ライセートを、10秒間超音波処理し、20分間、12,000gで遠心分離した。細胞ライセート及び等量の総タンパク質をSDS-PAGEサンプル緩衝液を用いて5分間ボイルした。総(全体)細胞ライセートを、8%、10%又は12%のSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。これらのブロットを、5%ノンファットドライミルクを含むTBST緩衝液(20mM トリス塩酸(pH 7.4)、500mM NaCl及び0.1% Tween 20)でブロッキングし、ブロッキング緩衝液中の一次抗体とともに4で一晚インキュベートした。ブロットを、TBSTで3回洗浄し、HRP-コンジュゲート化二次抗体を用いて室温で1時間探索した。TBSTで4回洗浄後、探索されたタンパク質を、ECLウェスタン・ブロッティング検出システム(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)を製造業者の指示書にしたがって用いて可視化した。

【0156】

アポトーシス及び細胞シグナリング関連遺伝子の転写調節のcDNAアレイ解析:

ヒトアポトーシス遺伝子アレイ(Human Apoptosis Gene Array; HS-002)及びヒトシグナル伝達パスウェイファインダー遺伝子アレイ(Human Signal Transduction PathwayFinder Gene Array; HS-008)は、SuperArray, Inc.(Frederick, MD)から購入した。総RNAは、TRIZOL(登録商標)プロトコール(Invitrogen, Carlsbad,

10

20

30

40

50

CA) を用いて細胞から抽出した。cDNAプローブは、 ^{32}P -dCTPを用いて合成した。膜プロット上のcDNAを、 ^{32}P -dCTP標識したプローブと、60 で一晚、ハイブリダイズさせた。遺伝子発現プロファイルは、CYCLONE PHOSPHORIMAGER (登録商標) (Packard Instruments, Meridien, CT) を用いて解析した。

【0157】

TRAIL-R1及びTRAIL-R2の共免疫沈降:

10⁷個の細胞を氷冷したPBSで洗浄し、氷上で15分間、溶解緩衝液で溶解した(1% Triton X-100、150mM NaCl、10%グリセロール、20mM トリス塩酸[pH7.5]、2mM EDTA、0.57mM PMSF、及びプロテアーゼ阻害剤カクテル)。ライセートを、次に4 で10分間、16,000gで遠心分離することにより、2回清澄化した。可溶性画分を、30 μ lのTRA-8又は2B4コンジュゲート化セファロース4Bとともに4 で一晚インキュベートした。溶解緩衝液で7回及び10mMトリスで3回の洗浄の後、結合したタンパク質を、SDS-PAGEローディング緩衝液中で3分間ボイルすることにより溶出させ、SDS-PAGEで分離した。カスパーゼ8及びFADDの存在は、ウェスタン・プロット解析により決定した。

【0158】

二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動:

2B4-セファロース4Bを用いた共免疫沈降の後、タンパク質を溶出させ、アセトンで脱塩して、IEFサンプル緩衝液(Bio-Rad Hercules, CA)中で再構成した。160 μ gの総タンパク質を、IPGストリップ(Bio-Rad)に載せ、室温で一晩置き、その後、PROTEAN IEF(登録商標)Cell(BioRad)中で分離した。タンパク質ストリップを、ReadyPrep平衡化緩衝液(Bio-Rad)で平衡化し、10%SDS-PAGEゲルでさらに分離した。完了後、ゲルを、10%メタノール及び7%酢酸を含む緩衝液で固定し、SYPRO(登録商標)Ruby染色緩衝液(Bio-Rad)で染色した。ゲルを、VERSADOC(登録商標)デジタル・イメージング・システム(Bio-Rad)を用いて画像化し、PDQUEST(登録商標)ソフトウェア(Bio-Rad)で解析した。

【0159】

結果

TRAIL-R2媒介性アポトーシスに対する選択的抵抗性の誘導。

ヒト乳がん細胞株、MDA-231及びヒト卵巣がん細胞株、UL-3Cを、TRAIL-R2抵抗性の誘導のために選択したが、これは、それらが、抗TRAIL-R1(2E12)及び抗TRAIL-R2(2B4)抗体を用いて二色フローサイトメトリーによって測定したところ、高レベルの細胞表面TRAIL-R1及びR2を共発現したためである(図1A)。2つの腫瘍細胞株は、インビトロ細胞毒性アッセイによって測定したところ、アゴニスト性抗TRAILレセプター抗体、2E12及びTRA-8、ならびにTRAILによって誘導されるアポトーシスに対して感受性であり(図1B)、TRAILについての両レセプターが2つの腫瘍細胞株において機能的であることが示された。これらの腫瘍細胞が処理後にTRA-8に対するアポトーシス抵抗性を生じるかどうかを決定するために、細胞を、非アポトーシス用量(1ng/ml)から始まるTRA-8で2日間処理し、次いでこの用量を、2,000ng/mlになるまで2日ごとに2倍にし、TRA-8を除去した。細胞生存率は、各用量で処理及び非処理細胞の両方について測定した。10ng/ml未満のTRA-8用量では、処理及び非処理細胞の両方において有意な細胞死は見られなかった。TRA-8用量が50ng/ml以上に増大された場合、非処理細胞において、細胞生存率のTRA-8用量依存性低減が観察された。これに対して、処理細胞においては、2000ng/mlまで、有意な細胞死は見られなかった(図1C)。これらの結果は、低い、非アポトーシス誘導性用量のTRA-8での反復的な腫瘍細胞の処理が、アポトーシス抵抗性を誘導すること、及び誘導された抵抗性はアポトーシス感受性細胞を除去することによる選択過程のせいではないこと、を示す。

【0160】

TRA-8の除去後4週間で、親細胞(MDA-231P、UL-3CP)及び処理細胞

胞 (MDA - 231R、UL - 3CR) の両方を、TRA - 8、2E12 又は TRAIL によって誘導されるアポトーシスに対する感受性について試験した。1,000 ng/ml の TRA - 8 での処理後の親細胞の 100% 近い細胞死と比較して、MDA - 231R 及び UL - 3CR 細胞の両方において、ある濃度範囲の TRA - 8 で有意な細胞死は誘導されず (図 2A)、これらの細胞は TRA - 8 誘導性アポトーシスに対して高度に抵抗性となっていたことが示された。これに対し、2E12 誘導性アポトーシスに対する TRA - 8 抵抗性腫瘍細胞の感受性は不変であった (図 2B)。感受性は低減したが、誘導された TRA - 8 抵抗性細胞は、いまだに TRAIL 媒介性アポトーシスに対して感受性であった (図 2C)。これらの結果は、TRA - 8 誘導性アポトーシス抵抗性が、TRAIL - R2 について選択的であることを示す。TRA - 8 除去の後、細胞は、少なくとも 3 ヶ月間、TRA - 8 抵抗性の状態を維持し、その後、感受性は 4 ヶ月までに親細胞の約 30% のレベルまでゆっくり回復し (図 2D)、TRA - 8 に対する誘導された抵抗性は長く留まるが、部分的に可逆的であることが示された。

【0161】

誘導された TRAIL - R2 抵抗性は、TRAIL - R2 の変更された細胞表面発現もしくは突然変異、又は内在的なアポトーシス欠陥のためではない。

TRA - 8 誘導性アポトーシス抵抗性が TRAIL - R2 について選択的であることは、TRA - 8 抵抗性の誘導後、TRAIL - R2 の発現が選択的に低減され得ること又は TRAIL - R2 の突然変異が起こり得ることを示す。これらの可能性を除外するために、TRAIL - R2 の細胞表面発現を調べ、両 TRA - 8 抵抗性細胞において、それらの親細胞と比較して TRAIL - R2 の発現レベルの変更がなかったことが決定された (図 3A)。この結果は、ウェスタン・ブロット解析によってさらに確認され、TRAIL - R2 タンパク質の 2 つのアイソフォームが親及び抵抗性細胞において同等に発現されたことが示された (図 3A)。両 TRA - 8 抵抗性細胞株から単離された TRAIL - R2 の全長 cDNA クローンを配列決定し、突然変異は同定されなかった。これらの結果は、TRAIL - R2 に対する誘導された選択的な抵抗性が、TRAIL - R2 自体の変更によるものではないことを示した。

【0162】

TRAIL - R2 媒介性アポトーシスは、多数のアポトーシス調節タンパク質、たとえばアポトーシス阻害剤 (IAP) ファミリー (Park, et al. 2002; Ng, et al. 2002; Roa, et al. 2003; Cummins, et al. 2004; Li, et al. 2004; Bockbrader, et al. 2005) 及び Bcl - 2 ファミリー (Hinz, et al. 2000; Rokhlin, et al. 2001; Fulda, et al. 2002; Carthy, et al. 2003; Chawla-Sarkar, et al. 2004; Sinicrope, et al. 2004) によって、調節されることができる。新規に開発されたモノクローナル抗体のパネルを用いて、cIAP1、cIAP2、XIAP、サバイピン、Bcl - 2、Bcl - xL 及び Bax の発現のタンパク質レベルを、ウェスタン・ブロット解析によって試験した。MDA - 231 及び UL - 3C は、それらのタンパク質を変化するレベルで発現したが、親細胞及び抵抗性細胞の間で有意な差はなく (図 3A)、これらのタンパク質の発現レベルが TRA - 8 の誘導に関与している可能性は低いことが示された。アポトーシス及び細胞シグナリング関連遺伝子のパネルにおける潜在的な転写の変更についてのより広範囲のスクリーニングを、200 を超える周知のアポトーシス関連遺伝子 (図 3B、上のパネル) 及び細胞シグナリング遺伝子 (図 3B、下のパネル) を含む膜 cDNA アレイ (Superarray, Frederick, MD) を用いて実施した。MDA - 231 親細胞及び抵抗性細胞間での平行比較により、TRA - 8 抵抗性の誘導後のこれらの遺伝子の発現プロフィールには有意な差がなかったことが示される。

【0163】

TRA - 8 抵抗性腫瘍細胞における TRAIL - R2 アポトーシスシグナル伝達の選択的封鎖。

上流カスパーゼ 8 及び下流カスパーゼ 3 の連続的な活性化は、TRAIL - R2 アポトーシスシグナル伝達の鍵となる事象である。したがって、これら 2 つのカスパーゼの時間

10

20

30

40

50

依存性活性化を調べた。以前に示されたように、T R A - 8 感受性親 M D A - 2 3 1 細胞の T R A - 8 での処理は、T R A - 8 処理後の切断されたカスパーゼフラグメントの生成によって示されるように、カスパーゼ 8 (図 4 A、上のパネル) 及びカスパーゼ 3 (図 4 A、中央のパネル) の活性化を誘導した。カスパーゼ活性化の非常に高感度のマーカーとして、P A R P は、急速に切断された (図 4 A、下のパネル)。しかし、カスパーゼ 8、カスパーゼ 3 の活性化及びその後の P A R P 切断は、T R A - 8 処理後に抵抗性細胞においては起こらなかった。カスパーゼカスケードの活性化の失敗は、T R A - 8 抵抗性細胞において 2 E 1 2 に誘発された T R A I L - R 1 カスパーゼ活性化が損なわれていないので、カスパーゼ経路の内在的な欠陥によるものではない (図 4 A、左パネル)。これらの結果は、T R A I L - R 2 関連カスパーゼカスケードが、T R A - 8 抵抗性誘導後に、上流カスパーゼ 8 のレベルで選択的に封鎖されていることを示す。

10

【 0 1 6 4 】

J N K / p 3 8 キナーゼ経路のカスパーゼ 8 依存性活性化は、T R A I L - R 2 媒介性アポトーシスにおいて重要な相乗的役割を果たす (Ohtsuka, et al. 2003; Ohtsuka, et al. 2002)。J N K / p 3 8 キナーゼの活性化は、T R A - 8 処理中の J N K / p 3 8 キナーゼのリン酸化のウェスタン・プロット解析によって測定した。カスパーゼ 8 活性化に対応して、J N K (図 4 B、上のパネル) 及び p 3 8 (図 4 B、下のパネル) は時間依存性の方式で急速にリン酸化された。しかし、T R A - 8 抵抗性細胞においては、2 E 1 2 のみが J N K / p 3 8 のリン酸化を誘導できたが T R A - 8 はできなかったのであり、J N K / p 3 8 キナーゼ経路も T R A - 8 抵抗性細胞において選択的に阻害されていることが示された。

20

【 0 1 6 5 】

T R A - 8 抵抗性腫瘍細胞における T R A I L - R 2 デスドメイン機能の選択的封鎖。

F A D D 及びカスパーゼ 8 は T R A I L - R 2 のデスドメインに動員され、D I S C の主要な成分であるので、親細胞及び抵抗性細胞の両方において、共免疫沈降アッセイによって T R A I L - R 1 及び T R A I L - R 2 での D I S C 形成能を調べた。M D A - 2 3 1 親細胞においては、T R A - 8 又は 2 E 1 2 での処理後、F A D D (図 5 A、上のパネル) 及びカスパーゼ 8 (図 5 A、中央のパネル) の時間依存性の増大があり、これらはそれぞれ T R A I L - R 2 (図 5 A、左パネル) 又は T R A I L - R 1 (図 5 A、右パネル) で共免疫沈降された。T R A - 8 抵抗性細胞においては、T R A - 8 媒介性アポトーシスの間に T R A I L - R 2 で共免疫沈降された F A D D 及びカスパーゼ 8 はなかったが、2 E 1 2 処理後の T R A I L - R 1 との F A D D 及びカスパーゼ 8 の共免疫沈降は影響されなかった。さらに、デスドメインへのカスパーゼ 8 についての阻害的競合剤である c F L I P が D I S C 形成の封鎖において役割を果たすかどうかを決定するために、T R A I L - R 1 及び T R A I L - R 2 との c F L I P の共免疫沈降も調べた。同様の時間依存性パターンで、c F L I P は、親細胞においては、T R A - 8 媒介性アポトーシスの間に T R A I L - R 2 と共免疫沈降したが、抵抗性細胞においては沈降しなかった (図 5 A、下のパネル)。2 E 1 2 媒介性アポトーシスの間における T R A I L - R 1 との c F L I P の共免疫沈降は、親細胞及び T R A - 8 抵抗性細胞の間で異ならなかった。F A D D、カスパーゼ 8 及び c F L I P の同様のレベルの総タンパク質発現があったので、これらのデスドメイン会合タンパク質の動員の失敗は、これらのタンパク質の発現の欠陥のせいではない。これらの結果は、誘導された T R A - 8 抵抗性が、T R A - 8 処理後の D I S C 形成における F A D D 及びカスパーゼ 8 の動員のための T R A I L - R 2 についての選択的欠陥である可能性が高い。

30

40

【 0 1 6 6 】

T R A - 8 抵抗性細胞における T R A I L - R 2 のデスドメインでの D I S C アセンブリの失敗は、T R A I L - R 2 タンパク質複合体の機能及び組成が変更されており、ここでは、新規に生成された又は機能的に変更されたタンパク質が、T R A I L - R 2 と会合することができ、T R A I L - R 2 のデスドメインに対する F A D D 及びカスパーゼ 8 の動員を防止することを示す。したがって、T R A I L - R 2 会合タンパク質のプロテオ

50

ームプロフィールを、T R A - 8 感受性親細胞及びT R A - 8 抵抗性M D A - 2 3 1 細胞において、T R A - 8 処理の前後で、二次元プロテオーム及びマススペクトロメトリー解析によって比較した。T R A I L - R 2 と共免疫沈降した差時的に発現されたタンパク質を、P D Q u e s t ソフトウェアによって解析した結果、親細胞及び抵抗性細胞の間でT R A - 8 媒介性アポトーシスの間に变化した3つのタンパク質スポットに注目した(図5 B)。スポット1及び2は、それぞれ分子量50kDa又は20kDaのタンパク質マスであり、T R A - 8 処理後のM A D - 2 3 1 親細胞のみ出現したが、未処理の細胞及びT R A - 8 処理した抵抗性細胞には出現せず、これらのタンパク質は、T R A - 8 媒介性アポトーシスの間にT R A I L - R 2 に動員されることが示された。それらの分子量及び等電点に基づいて、スポット1のタンパク質は、カスパーゼ8であることが確認され(図5 C)、スポット2はF A D Dであることが(図5 D)ウェスタン・プロット解析によって確認された。スポット3のタンパク質は、T R A I L - R 2 と定常的に会合しており、T R A - 8 媒介性アポトーシスの間に、より高分子量のタンパク質からより低分子量のタンパク質へのシフトが起こったので、興味深いものであった(図5 E)。この変換は、T R A - 8 処理されたM D A - 2 3 1 親細胞のみにおいて観察されたが、抵抗性細胞では観察されなかったので、誘導されたT R A - 8 抵抗性に関連するよう見えた。さらに、マススペクトロメトリー分析によって、両スポットがD E A D - ボックスR N A ヘリカーゼファミリーのメンバーであるD D X 3 に由来することが同定された。D D X 3 の高分子形態は、T R A - 8 抵抗性細胞において定常的にT R A I L - R 2 と会合しているので、T R A I L - R 2 のデスドメインへのF A D D 及びカスパーゼ8の動員を防止する因子であることができる。

【0167】

化学療法剤によるT R A - 8 抵抗性の逆転。

化学療法剤は、特にT R A - 8 抵抗性細胞において、インビトロ及びインビボの両方でT R A - 8 媒介性アポトーシス相乗的に増強する(Ohtsuka, et al. 2003; Ohtsuka, et al. 2002; Buchsbaum et al. 2003)。化学療法剤が誘導されたT R A - 8 抵抗性を逆転させることができるかどうかを決定するために、一群の化学療法剤、アドリアマイシン、テキソール(Texol)、シスプラチン及びビスインドリーマレイミドVIII(Bisindolymla leimide VIII)(BisVIII)の効果を、誘導された抵抗性細胞のT R A - 8 媒介性アポトーシスで調べた。示した濃度の化学療法剤の存在下で、T R A - 8 用量依存性応答は、T R A - 8 抵抗性M D A - 2 3 1 及びU L - 3 C 細胞の両方で回復され(図6 A)、すべての化学療法剤がT R A - 8 誘導性抵抗性を逆転させることができることが示された。アドリアマイシン及びT R A - 8 の組合せ療法後のM A D - 2 3 1 抵抗性細胞におけるカスパーゼカスケードの活性化を、モノクローナル抗カスパーゼ抗体のパネルを用いて調べた。抗カスパーゼ8(クローン: 2 F 4)及び抗カスパーゼ2(クローン: 2 A 3)は、それぞれカスパーゼ8及び2のプロ形態のみを認識するので、カスパーゼ8及び2の活性化は、切断によるプロ形態の低減された量によって明らかにされた。抗カスパーゼ9(クローン: 4 B 4)及び抗カスパーゼ3(クローン: 1 H 6)は、それぞれプロ及び切断形態のカスパーゼ9及び3を認識し、それらの活性化は、カスパーゼ9及び3の切断されたフラグメントの存在によって示された。T R A - 8 (図6 B、レーン5)又はアドリアマイシン(図6 B、レーン4)での単一薬剤処理単独は、4時間で、非処理対照と比較して、すべての試験したカスパーゼの有意な活性化は誘導されなかった(図6 B、レーン1)。これに対し、カスパーゼ2、9及び3の活性化は、アドリアマイシン及びT R A - 8 の組合せ療法後1時間もの速さで誘導され(図6 B、レーン2)、これは、4時間の時点でさらに増強された(図6 B、レーン3)。カスパーゼ8の活性化は、組合せ療法後4時間の時点で顕著であった。これらの結果は、アドリアマイシンでの処理がT R A - 8 抵抗性細胞においてT R A I L - R 2 関連カスパーゼカスケードを回復させたことを示す。アドリアマイシンの存在下で、T R A - 8 は、T R A I L - R 2 に対するF A D D の動員を誘発することができ(図6 C、レーン2及び3)、T R A I L - R 2 の動員機能は、アドリアマイシン処理によって回復された。

10

20

30

40

50

【0168】

例2：TRAIL-R2 媒介性アポトーシスにおけるDDXの役割

材料及び方法細胞株、抗体及び試薬。

ヒト乳がん細胞株、MDA-MB-231はthe American Tissue Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) から購入した。ヒト卵巣がん細胞株、UL-3Cは入手した。細胞は、10%熱非働化FCS、50 µg/ml ストレプトマイシン、及び50 U/mL ペニシリン (Cellgro Medi-atec, Inc., Herndon, VA) を添加したDMEM又はRPMI 1640中で維持した。抗ヒトTRAIL-R1 (クローン：2E12) 及び抗ヒトTRAIL-R2 (クローン：TRA-8) モノクローナル抗体は、以前記載された (Ichikawa et al., 2003; Ichikawa et al., 2001)。抗ヒトTRAIL-R2 (クローン：2B4) は、フローサイトメトリー及び免疫沈降アッセイのために開発された。組換え可溶性TRAILは、Alexis Biochemicals (San Diego, CA) から購入した。ポリクローナル抗カスパーゼ3及び抗カスパーゼ8抗体は、BD Pharmingen (San Diego, CA) から購入した。モノクローナル抗ヒトカスパーゼ2、3、8、9及び10抗体及びモノクローナル抗ヒトBcl-2、Bcl-xL、Bax、cIAP-1、cIAP-2、XIAP及びサバイピン抗体は、調製した。抗PARP抗体は、Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA) から購入した。抗-アクチン抗体はSigmaから購入した。抗FADDは、Transduction Laboratories (Lexington, KY) から購入した。すべての西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート化二次試薬は、Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL) から購入した。活性カスパーゼ-1、カスパーゼ-2、カスパーゼ-3、カスパーゼ-6、カスパーゼ-7、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9及びカスパーゼ-10は、EMD Biosciences, Inc. (San Diego, CA) から購入した。蛍光原性ペプチド誘導体、Ac-Val-Asp-Val-Asp-AMC (Ac-VDVAD-AMC、260060M001、配列番号40)、Ac-Asp-Glu-Val-Asp-アミノ-4-メチルクマリン (Ac-DEVD-AMC、260031M001、配列番号41) 及びAc-カルボニル-Ile-Glu-Thr-Asp-7-アミド-4-メチルクマリン (Z-IETD-AMC、260042M001、配列番号42) は、Alexis Biochemicals, San Diego, CAから購入した。カスパーゼ-2、-3、-8、-10阻害剤 (FMKSP01) は、R&D Systems, Inc.から購入した。

【0169】

TRA-8、2E12及びTRAIL 媒介性アポトーシスに対する腫瘍細胞感受性の細胞毒性解析。

細胞 (1,000細胞/ウェル) を、96ウェルプレートに三連で、8種の濃度 (1000 ng/mlから始まる二重連続希釈) のTRA-8、2E12又はTRAILとともに播いた。細胞生存率は、製造業者の指示書にしたがってATPLITE (登録商標) アッセイ (Packard Instruments, Meriden, CT) を用いて一晩培養後に決定した。結果は、培地対照ウェルと比較した処理ウェル中の生存細胞パーセンテージとして表す。

【0170】

フローサイトメトリー。

細胞 (10⁶個) を、PBSで1回洗浄して、一次抗体 (1 µg/mlのTRA-8) を含む1mlの冷FACS緩衝液 (5% FBS及び0.01% NaN₃を含むPBS) 中に再懸濁した。細胞を、氷上で60分間染色し、その後3mlの冷FACS緩衝液で洗浄し、二次抗体 (PEコンジュゲート化ヤギ抗マウスIgGの1:100希釈) とともに、暗所で4で60分間、インキュベートした。さらに3mlのFACS緩衝液で洗浄後、10,000細胞/試料をFACSCANフローサイトメーター (BD Biosciences, San Jose, CA) で解析した。

【0171】

アポトーシス関連タンパク質のウェスタン・プロット解析。

腫瘍細胞 (3 × 10⁶個) を、冷PBSで2回洗浄し、10mMトリス塩酸 (pH 7.6

10

20

30

40

50

)、150mM NaCl、0.5mM EDTA、1mM EGTA、0.1% SDS、1mMオルトバナジウム酸ナトリウム、及びプロテアーゼ阻害剤の混合物(1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、1µg/ml ペプスタチンA、2µg/ml アプロチニン)を含む300µlの溶解緩衝液で溶解した。細胞ライセートを、10秒間超音波処理し、20分間、12,000gで遠心分離した。細胞ライセートを等量の総タンパク質とともに、SDS-PAGE試料緩衝液を用いて5分間ボイルした。総細胞ライセートを、8%、10%又は12% SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。プロットを、5%ノンファットドライミルクを含むTBST緩衝液(20mM トリス塩酸(pH7.4)、500mM NaCl及び0.1% Tween 20)でブロッキングし、ブロッキング緩衝液中の一次抗体とともに4で一晩インキュベートした。プロットを、TBSTで3回洗浄し、HRPコンジュゲート二次抗体で室温で1時間、探索した。TBSTで4回洗浄した後、探索されたタンパク質を、ECLウェスタン・プロットティング検出システム(Amersham Biosciences)を製造業者の指示書にしたがって用いて可視化した。

10

【0172】

DDX3の寡少発現。

RNAi設計:

オンライン設計ツール、BLOCK-iT RNAiデザイナー(Invitrogen)を用いて、DDX3のためのRNAi標的を同定した。5つのターゲティングされたshRNA配列を、上位10種の最高スコアのRNAi標的から選択した(表2を参照されたい)。

20

【0173】

【表2】

表 2. shRNA 方向性:センスループ-アンチセンス

構築物	鎖	配列	
1	108-128	上 CACCAAGCTGCGCTATATTCCTCCTCATTcgaaAAAT GAGGAGGAATATAGCGCCTCGAG	SEQ ID NO:8
	下	AAAACTCGAGGCGCTATATTCCTCCTCATTtctgAAAT GAGGAGGAATATAGCGCAAGCTT	SEQ ID NO:9
2	562-582	上 CACCGGAGAAATTATCATGGGAAACcgaaGTTTCCCAT GATAATTTCTCC	SEQ ID NO:10
	下	AAAAGGAGAAATTATCATGGGAAACctcgGTTTCCCAT GATAATTTCTCC	SEQ ID NO:11
3	1554-1574	上 CACCGCCAAGTGATATTGAAGAATAaacgTATTCTTCA ATATCACTTGGC	SEQ ID NO:12
	下	AAAAGCCAAGTGATATTGAAGAATAcgttTATTCTTCAA TATCACTTGGC	SEQ ID NO:13
4	5'UTR	上 CACCGCTTCCAGCGGGTATATTAGcgaaCTAATATAACC CGCTGGAAAGC	SEQ ID NO:14
		下 AAAAGCTTCCAGCGGGTATATTAGttcgCTAATATAACC CGCTGGAAAGC	SEQ ID NO:15
5	1045-1065	上 CACCGCTGATCGGATGTTGGATATGcgaaCATATCCAA CATCCGATCAGC	SEQ ID NO:16
	下	AAAAGCTGATCGGATGTTGGATATGttcgCATATCCAAC ATCCGATCAGC	SEQ ID NO:17

30

40

【0174】

これらを、次に、BLOCK-iT U6エンターベクターにクローニングした。shRNAは、U6プロモーターによって制御されており、ほとんどの分裂中又は非分裂中の哺乳類細胞タイプにおいて一過性発現することができる。抵抗性細胞を、RNAi応答のために、RNAiを用いるLEPOFECTAMINE 2000(Invitrogen)でトランスフェクションした。低減したDDX3発現を、抗DDX3抗体を用いてトランスフェクションの36時間後にウェスタン・プロット解析によって決定した。いったん低減したDDX3発現が達成されると、そのsiRNAオリゴを合成した(標的配列:GGAG

50

AAATTATCATGGGAAC (配列番号27) : センスRNA 5' - FL - GGAGAAATTATCATGGGAAC (FL - 配列番号27) (FL = フルオレックスイン); アンチセンスRNA 5' - GUUUCCCAUGAUAAUUUCUCC - 3' (配列番号28)、及びRNAi対照オリゴ(RI - 010 - DP)は、Molecular (Columbia, MD) から購入した。

【0175】

発現ベクターの生成。

全長DDX3を、HisタグをDDX3のN末端につけてpcDNA3.1プラスミド (Invitrogen) にクローニングした。DDX3及びTRAIL - R2 cDNAを、MDA - 231細胞から抽出された総RNAを用いて実施した逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT - PCR)によって、以下のプライマー対を用いて生成した: DDX31 フォワードプライマー、BamHIあり: 5' - acggatccaaatgagtcattgtggcagtgga - 3' (配列番号29); DDX3662 リバースプライマー、XhoIあり: 5' - ctctcgcagcaagcaggctcagttacc - 3' (配列番号30)。TRAIL - R21 フォワードプライマー、KpnIあり: 5' - aaaggtaaccagccatggaaacaacggggacag - 3' (配列番号31); TRAIL - R2441 リバースプライマー、EcoVあり: 5' - aaagatatcttaggacatggcagagtcctgcatt - 3' (配列番号32); DDX3の単離されたポリメラーゼ連鎖反応フラグメントは、pcDNA3.1 - Hisベクター (Invitrogen) 内でインフレームであった。TRAIL - R2 cDNAは、pshutter - CMVベクター中にクローニングした。正しい配列は、DNA配列決定によって確認した。

【0176】

DDX3 / pcDNA3.1 - His発現プラスミドは、BamHI及びXhoI部位の間でDDX3配列を欠失させることによって生成した。DDX3151 フォワードプライマー、BamHIあり: 5' - acggatccaaatgttttctggaggcaacactggg - 3' (配列番号33); TRAIL - R2 / pshutter - CMV発現プラスミドは、以下のプライマーを用いてTRAIL - R2配列を欠失させることにより、生成した: TRAIL - R2340 リバースプライマー、EcoRVあり: 5' - aaagatatcttactgtctcagagtcctcagtgggatc - 3' (配列番号34); TRAIL - R2330 リバースプライマー、EcoRV及びxhoIあり: 5' - aaagatatcctcagagatttgctggaaaccagcagcct - 3' (配列番号35)。

【0177】

細菌におけるDDX3のための発現プラスミドの構築。

DDX3又はcIAP1フラグメントを、TOPO100ベクター (Invitrogen) に挿入した。結果として得られたプラスミドで大腸菌株BL21 (DE3) を形質転換し、これを指数増殖期までLB培地中で生育させ、0.4mMイソプロピル - 1 - チオ - D - ガラクトピラノシドで3時間誘導した。細胞をペレット化し、溶解緩衝液 (30mM トリス塩酸、pH7.5、0.1mM NaCl、1mM DTT、0.1mM EDTA、1% Nonidet P - 40及び20µg/ml PMSF) 中に再懸濁させ、超音波処理した。14,000xgで15分間遠心分離した後の上清を、Niカラムで精製した。タンパク質濃度は、BCAアッセイ (Pierce, Rockford, IL) で決定し、アリコートをして - 80 で保存した。

【0178】

293又は3T3細胞の一過性トランスフェクション。

293又は3T3細胞を、LIPOFECTAMINE (登録商標) 2000 (Invitrogen, Inc.) を用いて発現ベクターで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、タンパク質発現を、それぞれのモノクローナル抗体を用いてウェスタン・ブロット解析によって決定した。共免疫沈降解析のためには、細胞を、プロテアーゼ阻害剤カ

10

20

30

40

50

クテルを含む免疫沈降溶解緩衝液で溶解した。

【0179】

共免疫沈降アッセイ。

抗DDX3又は抗TRAIL-R2抗体を、セファロースビーズ(Sigma)にコンジュゲート化した。TRAIL-R2 DISCの組成を、以下のようにして決定した。5 × 10⁶個の細胞(別途示さない限り同じ)を、500 ng/mlのTRA-8で、示した時間、37 °Cで処理し、次に、免疫沈降溶解緩衝液(20 mM トリス塩酸、pH 7.4、150 mM NaCl、0.2% NONIDET P40及び10%グリセロール及び完全ブロテアーゼ阻害剤カクテル)中で溶解し、あるいは、処理せずに溶解した(無刺激条件)。TRAIL-R2 DISCを、次に30 µlのビーズとともに4 °Cで一晩沈降させた。免疫沈降後、ビーズを溶解緩衝液で4回洗浄した。このビーズを、次に、10 mM トリス緩衝液で5回洗浄し、SDS-PAGE及び免疫ブロッティング解析のためにローディング緩衝液中に再懸濁した。

10

【0180】

インビトロでのカスパーゼ活性のアッセイ。

蛍光測定アッセイを、96ウェル透明底プレートで行い、すべての測定を三連のウェルで行った。100 µlのアッセイ緩衝液(10 mM HEPES、pH 7.0、50 mM NaCl、2 mM MgCl₂、5 mM EDTA及び1 mM DTT)を添加した。活性カスパーゼ8及びペプチド基質(Ac-IETD-AMC)を、各ウェルに添加し、最終濃度100 ng/µlとした。共免疫沈降溶出画分を添加して、反応を開始した。背景蛍光を、アッセイ緩衝液、基質及び溶解緩衝液を含み、細胞ライセートを含まないウェルで測定した。アッセイプレートを37 °Cで1時間、インキュベートした。蛍光は、355 nmでの励起及び440 nmでの発光にセットした蛍光プレートリーダーで測定した(Bio-Tek, Winooski, VT)。

20

【0181】

インビトロのカスパーゼ切断アッセイ。

DDX3を切断するカスパーゼの能力を、インビトロアッセイにおいて調べた。切断反応は、TRAIL-R co-IPからの10 µlの溶出画分、10 µlの反応緩衝液(10 mM HEPES [pH 7.0]、50 mM NaCl、2 mM MgCl₂、5 mM EGTA、1 mM DTT、2 mM ATP)及び5 µl(0.1 U/µl)の組換え活性形態のカスパーゼを含有させて、37 °Cで30分間、行った。切断は、抗DDX3抗体を用いてウェスタン・プロットによって決定した。

30

【0182】

結果

抵抗性細胞においてTRAIL-R2のデスドメインの封鎖を起こす候補タンパク質であるDDX3のプロテオーム解析。

デスレセプターを標的とする、治療剤、TRAIL及びアゴニスト性抗体に対する、偶発的に発生した又は誘導されたアポトーシス抵抗性は、これらの薬剤での有効ながん治療における主要な障害を表す。抵抗性細胞におけるTRAIL-R2デスドメイン複合体の代替的な組成物かどうかを決定するために、存在するTRAIL-R2関連タンパク質のプロテオームプロファイルを、TRA-8感受性親細胞及びTRA-8抵抗性MDA-231細胞において、TRA-8処理の前後に、二次元プロテオーム及びマススペクトロメトリー解析によって比較した。SYPRO(登録商標)ルビー(Molecular Probes, Eugene, OR)で染色した二次元ゲルの検査において、約~80 kDaのタンパク質スポットが見出された。このタンパク質とTRAIL-R2との会合は、TRAIL-R2 DISCの形成をブロックし、それによってTRA-8抵抗性が引き起こされる。この~80 kDaタンパク質をSDS-PAGEから切り出し、トリプシンで消化して、ペプチド配列をマススペクトロメトリーで解析した。6個の消化フラグメントからのタンパク質アミノ酸配列は、ヒトDDX3のGenbank配列と100%同一であり(表3)、DISC形成と相関してTRA-8誘導性アポトーシスの間にDDX3がTRAIL-R2から解離する

40

50

ことが示された。このタンパク質が、TRAIL-R2関連タンパク質複合体と会合したままであれば、それは、FADD動員を防止し、DISC形成の失敗を起こすことができる。

【0183】

【表3】

表3. DDX3フラグメント

ペプチド	配列	DDX3	SEQ ID
1	HVINFDLPSDIEEYVHR	aa512-528	SEQ ID NO:1
2	DFLDEYIFLAVGR	aa395-407	SEQ ID NO:2
3	DLLDLLVEAK	aa555-564	SEQ ID NO:3
4	SFLDLLNATGK	aa429-440	SEQ ID NO:4
5	TAAFLLPILSQIYSDGPGEALR	aa231-252	SEQ ID NO:5
6	QYPISLVLAPT	aa265-275	SEQ ID NO:6

10

【0184】

DDX3は、TRAIL-R2媒介性アポトーシスにおける新規のTRAIL-R2会合タンパク質である。DDX3が本当にTRAIL-R2と会合しているかどうかを決定するために、DDX3の全長(アミノ酸1~662)、N末端フラグメント(アミノ酸1~316)及びC末端フラグメント(アミノ酸310~662)を、N末端に6-Hisタグを有するPCDNAIII3.1にクローニングした。これらの発現ベクターでMDA-231親細胞をトランスフェクトし、DDX3の組換え全長及び欠失突然変異体の過剰発現を達成した。しかし共免疫沈降及びその後の抗6-His抗体を用いたウェスタン・ブロット解析により検出したところ、全長DDX3のみが、TRAIL-R2と会合していたが、N末端及びC末端欠失突然変異体は会合していなかった(図8A)。これらの結果により、DDX3がTRAIL-R2と会合すること及びTRAIL-R2に対するその結合は全長依存性であることが確認された。DDX3は、MDA-231細胞において抗TRAIL-R2で免疫沈降された。

20

30

【0185】

TRAIL-R2とのDDX3の会合をさらに確認するために、DDX3のN末端、C末端フラグメント及び全長バージョンを、大腸菌において発現させた。タンパク質を精製し、DDX3に対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体パネルを作製するための抗原として用いた。TRAIL-R2会合DDX3は、マウス抗DDX3モノクローナル抗体を用いて共免疫沈降及びウェスタン・ブロット解析によって検出した。これらの結果により、DDX3は非アポトーシス性親細胞及び抵抗性細胞の両方においてTRAIL-R2と共免疫沈降することが明らかになった(図7)。TRA-8感受性細胞においては、DDX3の時間依存性の低減があったが、アポトーシス中のTRA-8抵抗性細胞では見られなかった。それに加えて、ウェスタン・ブロット解析によって、TRA-8誘導性アポトーシスの間におけるTRAIL-R2会合DDX3の急速な低減及び切断が観察された。これは、DDX3の切断がカスパーゼ依存性であることを示す。これらの結果に基づいて、DDX3配列を、N末端の潜在的切断部位について精査し、比較的保存されたカスパーゼ切断モチーフ、DKSDEDD(配列番号46)がアミノ酸129~135に発見された。切断がDISC上で起こり、TRAIL-R2からのDDX3の重要な機能的要素の放出をもたらすことは明らかである。これらのデータは、後者のモデルと矛盾がなく、そのことは、開始されたカスパーゼはTRAIL-R2に急速に動員され、容易にDDX3を切断することを示唆する。それに加えて、FADD及びカスパーゼ-8はTR

40

50

A I L - R 2 と会合及び動員され、D I S C を形成し、それが今度は、T R A I L - R 2 会合 D D X 3 切断と相関するカスパーゼカスケード活性化をもたらし、これは、ある種の状況下において、D D X 3 はアポトーシスプログラムに必須であることを示し、D D X 3 は T R A I L - R 2 媒介性アポトーシス抵抗性に関与する T R A I L - R 2 と会合することを説明する。

【 0 1 8 6 】

T R A I L - R 2 との D D X 3 の相互作用領域のマッピング。 T R A I L - R 2 媒介性シグナル伝達における D D X 3 の調節をよりよく理解するために、T R A I L - R 2 との結合に必要なおよその D D X 3 領域を、D D X 3 の欠失突然変異体をコードするプラスミドで一過性トランスフェクションされている H E K 2 9 3 A 細胞を用いて決定した (図 8 A) 。 組換え D D X 3 及び T R A I L - R 2 の相互作用は、T R A - 8 を用いて共免疫沈降によって決定した。全長 D D X 3、D D X 3 2 0 1 - 6 6 2 又は D D X 3 1 - 4 0 0 は、T R A I L - R 2 と結合した。しかし、D D X 3 2 5 1 - 6 6 2 及び D D X 3 1 - 3 5 0 のどちらも、T R A I L - R 2 と結合できなかった (図 8 A) 。これは、D D X 3 が T R A I L - R 2 に 2 個の結合モチーフを有することを示す。一方は、N 末端に位置し (アミノ酸 2 0 0 ~ 2 5 0) ; 他方は、アミノ酸 3 5 0 ~ 4 0 0 に隣接する。同じ細胞由来のライセートのウェスタン・プロット解析により、匹敵する量の野生型 D D X 3 及び D D X 3 の欠失フラグメントの産生が確認され、このことは、これらの結果の説明としてのタンパク質発現の差を除外した。

【 0 1 8 7 】

D D X 3 は、恒常的に T R A I L - R 2 と会合し、T R A - 8 抵抗性細胞における及び F A D D 動員の封鎖と相関するが、このことは、T R A I L - R 2 会合 D D X 3 が F A D D の動員を防止することを示す。T R A I L - R 2 を通じて D D X 3 及び F A D D の間に連絡があり得る。D D X 3 及び F A D D が、T R A I L - R 2 のデスドメインで共通の結合モチーフを共有しているのか、又はこれらの 2 つの結合モチーフが互いに近接しており、先に結合した D D X 3 が F A D D の動員と干渉するのかを試験するために、T R A I L - R 2 における D D X 3 結合ドメインの位置を決定した。全長 T R A I L - R 2 及び一連の T R A I L - R 2 アミノ末端ドメイン欠失体 (デスドメインの完全な欠失体を含む) をコードするベクターを構築した (図 8 B) 。 D D X 3 の機能を評価し、内在性ヒト T R A I L - R 2 を排除するために、類似したアプローチにおいて、マウス線維芽細胞株、N I H 3 T 3 を、ヒト T R A I L - R 2 及び D D X 3 の共発現のための宿主細胞として選択した。3 T 3 細胞を、H i s タグを有する D D X 3 及び全長 T R A I L - R 2、D D X 3 及び T R A I L - R 2 の一連の欠失突然変異体、及び D D X 3 単独をコードするプラスミドで共トランスフェクションした。細胞表面 T R A I L - R 2 発現は、T R A - 8 染色を用いてフローサイトメトリーによって試験した。すべてのトランスフェクションされた細胞は、同様のレベルの細胞表面 T R A I L - R 2 を呈し (図 8 B)、細胞内ドメインの欠失は、細胞表面 T R A I L - R 2 を変更させないことが示された。それに加えて、すべてのトランスフェクションされた細胞は、抗 6 - H i s 抗体を用いて総細胞ライセートのウェスタン・プロット解析によって検出したところ、同様のレベルの組換え D D X 3 を発現した。T R A I L - R 2 欠失突然変異体との組換え D D X 3 の会合は、T R A - 8 との共免疫沈降及び抗 6 - H i s 抗体を用いたウェスタン・プロット解析によって試験した (図 8 B) 。 D D X 3 との T R A I L - R 2 の相互作用は、T R A I L - R 2 のデスドメインとは独立である。T R A I L - R 2 結合モチーフをさらにより正確に定義するために、T R A I L - R 2 のさらなる欠失突然変異体である D 3 3 0 及び T R A I L - R 2 の短縮型 (T 3 0 0 - 3 3 0) を構築し (図 8 C)、D D X 3 とともに 3 T 3 細胞を共トランスフェクションして、それらの相互作用について解析した。それらの結果により、D D X 3 は T R A I L - R 2 デスドメインと結合せず、むしろ、デスドメイン (アミノ酸 3 4 0 ~ アミノ酸 4 2 0) の近傍の膜近接領域 (アミノ酸 3 0 0 ~ 3 3 0) と結合することが明らかになった (図 8 C) 。これは、D D X 3 が、以前に同定された T R A I L - R 2 シグナリングにおけるデスドメイン関連タンパク質とは異なる役割を果たす可能性があることを示す

。それに加えて、この領域は、TRAIL-R1及びDcR2と非常に相同性が高い(図8D)。これらのデータは、DDX3が、デスレセプターファミリーのメンバーと会合する共通のアダプタータンパク質であることを示す。

【0188】

DDX3はCARDを含有する。

TRAIL-R2媒介性アポトーシスにおけるDDX3の機能的な重要性を、次に、この分子の特異的特性を解析することにより調査した。カスパーゼ動員ドメイン(CARD)を含む、DEADボックスタンパク質ファミリーの少なくとも2つのRNAヘリカーゼが最近同定されており、これらのRNAヘリカーゼのCARDは、アポトーシスの調節因子として機能する。DDX3はTRAIL-R2媒介性アポトーシスの調節において重要な役割を果たすので、DEADボックスタンパク質ファミリーメンバーであるDDX3は、同様にCARDを有することができ、DDX3のアポトーシス阻害機能はCARDに直接依存することができる。したがって、DDX3がCARDタンパク質である可能性を試験した。アミノ酸整列(アラインメント)解析は、DDX3が、MDA5及びRIGIのように、アミノ酸50~アミノ酸150の間に保存された作用モチーフを有することを示す。CARDは、ホモタイプの(homotypic)相互作用モチーフである。CARDを含有するタンパク質は、このドメインを介して互いに相互作用することができる。DDX3は、新規な高度に保存されたCARD含有ヘリカーゼであるため、他のCARDタンパク質と相互作用することができる。cIAP1は、同様にCARD含有タンパク質であり、カスパーゼの阻害剤として広く認識されており、TNFRI及びTNFRIIに動員されてTNTRIM3媒介性アポトーシスを調節する。DDX3がcIAP1と相互作用することができるかどうかを、抗DDX3又は抗TRAIL-R2抗体を用いて、共免疫沈降実験において試験した。TRA-8未処理の親細胞及び抵抗性細胞の両方においてTRAIL-R2共免疫沈降及びDDX3共免疫沈降によって解析したところ、cIAP1は、容易にDDX3と及びTRAIL-R2複合体と、共免疫沈降することができると決定された(図8E)。しかし、cIAP1は、TRAIL-R2-DDX3複合体から迅速に放出され、これは親細胞におけるDDX3切断と関連した。これに対し、cIAP1レベルはTRA-8処理後に抵抗性細胞においてTRAIL-R2-DDX3複合体で増大した(図8E)。これらの結果は、DDX3がTRAIL-R2及びcIAP1の間の連結として役立つことを示す。

【0189】

ノックダウンDDX3による逆抵抗性。

TRAIL-R2シグナリングにおけるDDX3の役割を研究するために、TRA-8誘導性アポトーシスにおける内在性DDX3の重要性を試験した。DDX3はTRA-8誘導性アポトーシスの間に抵抗性細胞において低減しなかったため、DDX3の低減したレベルの発現が、がん細胞がアポトーシス感受性であるために必要であることができる。RNAi戦略を用いて、TRAIL-R2媒介性アポトーシスに対する抵抗性におけるDDX3の役割を決定した。オンライン設計ツールである、BLOCK-IT(登録商標)RNAiデザイナー(Invitrogen)を用いて、DDX3のためのRNAi標的を同定した。5つのターゲティングされたshRNA配列を、上位10個の最高スコアのRNAi標的から選択し、BLOCK-IT(登録商標)U6エンターベクター中にクローニングした。TRA-8抵抗性MDA-231細胞を、5つのRNAi構築物でトランスフェクトして、DDX3のタンパク質発現レベルを、トランスフェクションの48時間後にモノクローナル抗DDX3抗体を用いてウェスタン・ブロット解析により決定した。試験した5つのRNAi構築物のうち、4つが、非トランスフェクション又はGFPでトランスフェクションした対照と比較して、DDX3発現の非常に効果的な阻害剤(50%超の低減)であった(図9A)。これらの構築物の最も効果的なものである#2を、TRA-8媒介性アポトーシスにおけるDDX3ノックダウンの効果の解析のために選択した。ノックダウンDDX3発現が、TRA-8抵抗性細胞におけるTRA-8感受性を逆転させるかどうかを決定するために、TRA-8抵抗性MDA-231細胞を、RNAiベクター(

構築物#2)及びトランスフェクトされた細胞のインジケータとしてGFP発現ベクターで共トランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後、DDX3をTRAIL-R2と共免疫沈降させ、抗DDX3抗体で探索した。期待したとおり、DDX3の発現は、対照細胞と比較して有意に低減した(図9B)。GFP陽性細胞を選別し、種々の濃度のTRA-8とともに一晚培養した。ATPLITEアッセイを用いて、GFP及び対照ベクターでトランスフェクションされたMDA-231細胞は、TRA-8処理後にアポトーシスを行なわなかったため、これらの細胞がTRA-8に対する抵抗性を保持していたことが示された。しかし、DDX3 RNAi及びGFPで共トランスフェクションされた細胞は、TRA-8用量依存性細胞死を呈した(図9C)。TUNEL染色を用いて、有意数のDDX3ノックダウン細胞がアポトーシスを行なったことが見出された(図9D)。これらの結果は、DDX3発現のダウンレギュレーションがTRA-8抵抗性を逆転させることを示す。TRAIL-R2媒介性アポトーシスにおけるDDX3の因果的な役割をさらに決定するために、腫瘍細胞のパネルにおいてDDX3発現を低減させ、それらのTRA-8誘導性アポトーシス感受性を解析した。DDX3 RNAiは、内在性DDX3の量を低減させ、いくつかの偶発的抵抗性細胞を含む腫瘍細胞のパネルにおいてTRA-8誘導性アポトーシスを増強した(図9E~F)。これに対し、対照オリゴヌクレオチドでトランスフェクトされた細胞は、正常なDDX3発現を示し、TRA-8誘導性アポトーシスに対して抵抗性のままであった(図9E~F)。したがって、DDX3は、TRAIL-R2シグナル伝達装置の重要成分であり、TRAIL-R2媒介性アポトーシスに対する抵抗性のために必須である。

【0190】

DDX3結合領域を持たないTRAIL-R2は、プロアポトーシス性である。

DDX3結合モチーフがTRAIL-R2のデスドメイン機能を調節する新規な負の調節ドメインを表すかどうかを決定するために、突然変異型TRAIL-R2のアポトーシス誘導機能を、野生型TRAIL-R2と比較した。デスドメインを持たないTRAIL-R2でトランスフェクトされた細胞は、TRA-8処理に応答しないように見えたが、短縮型DDX3結合ドメインを有するTRAIL-R2でトランスフェクトされた細胞は、プロアポトーシス性であり、野生型TRAIL-R2でトランスフェクトされた細胞と比較して、TRA-8誘導性アポトーシスに対してより感受性を呈したように見えた(図10)。TRAIL-R2媒介性アポトーシスを抑制し得るDDX3の顕著な阻害効果があった。これらの知見は、DDX3が、TRAIL-R2誘導性アポトーシスの阻害性媒介因子であることを示す。

【0191】

DDX3はTRAIL-R2媒介性アポトーシスを調節するCARDタンパク質である。

TRAIL-R2-DDX3-cIAP1シグナリングを吟味するために、cIAP1に対する結合に必要な領域を評価した。CARDは、DDX3のN末端にあり、cIAP1と相互作用すると考えられているため、この領域は、cIAP1を結合するのに関与することができる。HEK293A細胞を、Hisタグを有する全長DDX3、DDX3 51-662、DDX3 101-662、DDX3 151-662、又はDDX3 1-350をコードするプラスミドでトランスフェクトした。全長及びC末端欠失したDDX3の両方が、cIAP1を共免疫沈降させることができたが、最初の100アミノ酸が欠失したDDX3は、cIAP1を共免疫沈降させることができなかった(図11A)。これらの結果は、DDX3のN末端CARDが、cIAP1をTRAIL-R2複合体に動員することに関与することを確認した。また、cIAP1結合モチーフが切断部位であるアミノ酸129~135(DKSEDD;配列番号46)の前のDDX3のアミノ酸50~100に位置することも示された。DDX3がTRAIL-R2媒介性アポトーシス中に切断される場合、DDX3のN末端フラグメントとcIAP1の組合せがTRAIL-R2複合体から解離し、それによって死シグナリングに対するcIAP1の阻害を救済する。したがって、DDX3は、アポトーシス抵抗性のためにcIAP1及びデスレ

セプターをカップリングさせる候補である。

【0192】

このコンセプトをさらに強固にするために、アミノ酸1~150を欠いた優勢陰性突然変異型DDX3を用いた。この突然変異体、DDX3 CARD (DDX3 151-662)は、cIAP1との相互作用に失敗しするが、なおTRAIL-R2に結合することができる(図11B)。したがって、DDX3 151-662はTRAIL-R2を結合する野生型DDX3と競合して内在性DDX3の優勢陰性阻害剤となり得るかどうかを評価した。4つのタイプの細胞を、DDX3 CARDでトランスフェクトした。図5Bに示すように、DDX3 CARDでトランスフェクトされた細胞は、内在性全長DDX3と比較して、より高いレベルのDDX3 CARDの発現を呈しており、短縮型DDX3はTRAIL-R2結合に関して内在性DDX3と競合することができることが示唆された。図11Bに示すように、抗DDX3及び抗cIAP1抗体を用いて探索してTRAIL-R2-co-IP及びウェスタン・ブロッティングにより解析したところ、cIAP1は全長DDX3と共免疫沈降されたが、DDX3 CARDとは共免疫沈降されなかった。さらに、TRA-8媒介性アポトーシスに対するトランスフェクトされた細胞の感受性を、ATPLITEアッセイを用いて試験した。すべての試験した細胞はTRA-8処理後に抵抗性のままであったので、全長組換えDDX3の発現は、TRA-8媒介性アポトーシスに対する感受性を変更しなかった。しかし、高レベルのDDX3 CARDを発現したTRA-8抵抗性腫瘍細胞は、ダウンレギュレーションされたTRAIL-R2がcIAP1と会合した後にTRA-8誘導性アポトーシスに対する感受性を再獲得した。これらのデータは、TRA-8誘導性アポトーシスに対するcIAP1の阻害が、DDX3のインタクトなCARDによって媒介されることを示す。N末端CARDを欠いたDDX3は、TRA-8抵抗性を部分的に逆転する優勢陰性剤として役立つことができる。TRA-8誘導性アポトーシスに対するがん細胞の潜在的感受性は、TRAIL-R2会合複合体上のDDX3及びcIAP1のレベルによって調節されることができる。

【0193】

TRAIL-R2-DDX3-cIAP1複合体は、カスパーゼ-8の活性化を阻害する。

細胞内に存在するDDX3のレベルがいかにしてカスパーゼ-8動員及びTRAIL-R2 DISCでのプロセッシングに相関しているかを調べるために、DDX3を定量した。MDA-231及びUL-3C親細胞及び抵抗性細胞を、TRA-8で4時間処理し、TRAIL-R2を、TRA-8とは異なるTRAIL-R2エピトープを認識する新規な抗TRAIL-R2モノクローナル抗体(クローン:2B4)を用いて免疫沈降させた。TRAIL-R2/DDX3/cIAP1複合体を、ビーズから放出させ、TRAIL-R2会合DDX3及びcIAP1を、抗DDX3及び抗cIAP1抗体を用いたイムノブロッティング及びサンドイッチELISA解析に供した。ELISAプレートは、2B4抗TRAIL-R2抗体でコーティングして、免疫沈降されたTRAIL-R2を捕獲し、DDX3及びcIAP1を、DDX3(3E2)及びcIAP1に対する特異的モノクローナル抗体によって測定した。親-感受性又は誘導-抵抗性腫瘍細胞のいずれかのTRA-8での処理は、TRAIL-R2タンパク質レベルを変更しなかった(図12A)。しかし、TRAIL-R2会合DDX3のレベルは、TRA-8処理によって、感受性及び抵抗性細胞の両方で有意に変更された。第一に、非処理抵抗性細胞は、3E2抗DDX3抗体で検出したところ、非処理感受性細胞と比較して、より高いレベルのTRAIL-R2会合DDX3を発現した(図12B)。重要なことに、TRA-8処理後、TRAIL-R2会合DDX3は、TRA-8抵抗性細胞において有意に増大したが、感受性細胞においては顕著な低減が明らかにされた。TRAIL-R2複合体におけるcIAP1のレベルもまた、DDX3と同じパターンで変更された(図12C)。これらの結果は、DDX3のCARDドメインは、切断によってアポトーシス中にTRA-8感受性細胞においてTRAIL-R2複合体から切断されて放出された一方、DDX3及びcIAP1は、感受性細胞よりも抵抗性細胞においてより効率的に、TRA-8刺激に際してTR

10

20

30

40

50

A I L - R 2 に動員されたことを示す。

【 0 1 9 4 】

機能的 D I S C を形成するために、がん細胞が、T R A I L - R 2 複合体から c I A P 1 を放出し、T R A - 8 誘導性アポトーシス中にカスパーゼに対する抑制を低減することが必須である。この過程は、D D X 3 の切断を必要とし、この工程がフィードフォワードアポトーシス増幅ループを開始するために重要であることが示される。T R A I L - R 2 会合 D D X 3 の切断抵抗性は、抵抗性細胞における D I S C 形成の失敗と相関するので、T R A I L - R 2 - D D X 3 - c I A P 1 複合体での D D X 3 切断感受性は、親及び抵抗性細胞の間で異なる。異なるカスパーゼによる T R A I L - R 2 会合 D D X 3 切断ポテンシャルを、両細胞で解析した。T R A I L - R 2 - D D X 3 - c I A P 1 複合体を、抗 T R A I L - R 2 抗体で共免疫沈降させた。ビーズから溶出させた画分を、活性カスパーゼ - 2 及び - 8 とともにインキュベートした。D D X 3 の切断を、抗 D D X 3 抗体を用いてウェスタン解析によって検出した。これらの結果は、E L I S A 解析と合わせて (図 1 2 E)、カスパーゼ - 2 は両細胞において同様のプロテアーゼポテンシャルを呈するが (図 1 2 E)、抵抗性細胞におけるカスパーゼ - 8 による D D X 3 切断が、感受性細胞と比較して高度に減衰されたことを明らかにした。これらの結果は、T R A - 8 感受性及び抵抗性細胞間で D D X 3 複合体の機能的な差異があることを示す。また、デスレセプター会合開始カスパーゼによる D D X 3 の切断の失敗が、T R A - 8 抵抗性の発生における鍵となる工程であることを示す。

10

【 0 1 9 5 】

D D X 3 の切断は、誘導された抵抗性細胞においては阻害されたので、D D X 3 が T R A I L - R 2 媒介性アポトーシスを阻害するアポトーシスシグナリングにおける工程を決定するための研究を進めた。D D X 3 / c I A P 1 複合体は、カスパーゼ - 8 活性化を阻害すると予測された。したがって、レセプターによる誘発後の最初に検出可能な事象のひとつとして、T R A I L - R 2 - D D X 3 - c I A P 1 複合体でのカスパーゼ - 8 の活性化を試験した。カスパーゼ - 8 活性化に対する T R A I L - R 2 - D D X 3 - c I A P 1 複合体の効果を評価するために、親 - 感受性又は誘導 - 抵抗性細胞由来の活性カスパーゼ - 8 及び D D X 3 c o - I P 溶出画分とともにインキュベートされた蛍光原性基質である A c - I E T D - A M C を用いて、カスパーゼ活性を測定した。感受性細胞と比較して抵抗性細胞由来の T R A I L - R 2 c o - I P 溶出画分の広範囲の希釈物にわたって、カスパーゼ - 8 活性の用量依存性の阻害が観察された。それに加えて、精製 c I A P 1 もまた、カスパーゼ - 8 プロテアーゼ活性を完全に抑制した (図 1 2 F)。D D X 3 会合 c I A P 1 が、カスパーゼ - 8 の当初の活性化の阻害剤であって、それによって D D X 3 の切断を防止することは妥当である。したがって、これらのデータは、D D X 3 - c I A P 1 がカスパーゼ - 8 活性を調節できることの直接証拠を提供し、D D X 3 - c I A P 1 は T R A I L - R 2 と結合したカスパーゼ - 8 の特異的調節因子であることを示す。

20

30

【 0 1 9 6 】

カスパーゼ - 8 活性化に対する T R A I L - R 2 - D D X 3 - c I A P 1 の効果を、カスパーゼアッセイによる D D X 3 切断と組合わされた c I A P 1 で阻害されたカスパーゼ - 8 の直接解析によって試験し、D D X 3 - c I A P 1 もまた、新規なタイプのカスパーゼ阻害剤として機能することが示された。D D X 3 - c I A P 1 複合体は、カスパーゼ - 8 の活性化を抑制し、それによって開始カスパーゼによる T R A I L - R 2 会合 D D X 3 の切断を阻害することにより、デスレセプタープロアポトーシスのシグナルを停止させることができる。このモデルは、D D X 3 が c I A P 1 の動員を介して T R A - 8 誘導性アポトーシスに対して細胞を保護し、がん細胞における死シグナリング経路の封鎖に寄与することを示す。

40

【 0 1 9 7 】

例 3 : N 末端領域のセリンリン酸化による D R 5 への D D X 3 結合の調節

バイオインフォマティクス検索により、D D X 3 中に、G S K 3 の潜在的基質について保存されているセリン豊富なドメイン (配列番号 2 0 ; 配列番号 2 6 のアミノ酸 7 0 ~ 9

50

0に相当)が同定された(図13A)。GSK3の2つの最良の基質である -カテニン及びグリコゲンシンセターゼと比較して、DDX3は、活性化された部位(the primed site)に対してN末端側に5個の連続するセリンを有する。DDX3がGSK3の基質であることを支持するいくつかの証拠がある:(1)DDX3とGSK3との共免疫沈降により明らかにされたところ、DDX3は、GSK3と直接会合し、GSK3はDDX3をリン酸化することができる(図13B);(2)GSK3はSer90に点突然変異を有するDDX3をリン酸化できない(図13C);(3)Ser90突然変異DDX3は、TRA-8媒介性アポトーシス間に、増大したDR5からの解離及び切断を呈する(図13D)。これらの結果は、DDX3のN末端のセリン豊富ドメインは、DR5とのDDX3の会合において調節の役割を果たすことを示す。

10

【0198】

別途定義されていない限り、ここで用いられるすべての技術的及び科学的用語は、開示された方法及び組成物が属する当該技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。ここで記載されたものと同様又は等価の任意の方法及び材料は、本発明の方法及び組成物の実施又は試行において用いることができるが、特に有用な方法、機器及び材料は記載されているとおりである。ここで引用された刊行物及びそれらが引用されている所以の材料は、参照により具体的にここに援用される。ここにおける何物も、本発明の発明が従来発明のおかげでこのような開示に先んじていることを許可されていないことの容認として解釈されるべきではない。いかなる参考文献も先行技術を構成することを容認されていない。参考文献の論述は、それらの著者が主張するものを記載しており、出願人は、引用された書類の正確性及び適切性を攻撃する権利を保持する。多数の刊行物がここで言及されているが、このような参考文献は、これらの書類のいずれかが当該技術分野における普通一般的な知識の一部を形成することの容認を構成しないことは明白に理解されるであろう。

20

【0199】

本明細書の説明及び特許請求の範囲を通じて、「含む(comprise)」という語、及び「comprising」及び「comprises」のようなこの語の変化形は、「包含するが制限されないこと」を意味し、たとえば他の付加物成分、整数又は工程を除外することを意図しない。

当業者は、ここで記載された方法及び組成物の具体的な態様の多数の等価なものを、ルーチンの実験以外のものを用いずに、認識し、又は把握することができるであろう。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0200】

(参考文献)

【0201】

【表4】

Akao, Y., Yoshida, H., Matsumoto, K., Matsui, T., Hogetu, K., Tanaka, N., and Usukura, J. (2003). A tumour-associated DEAD-box protein, rck/p54 exhibits RNA unwinding activity toward c-myc RNAs *in vitro*. *Genes Cells* 8, 671-676.

40

Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong, and J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.

Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R. E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17264-17269.

Ashhab, Y., A. Alian, A. Polliack, A. Panet, and D. Ben Yehuda. 2001. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett* 495:56-60.

50

【 0 2 0 2 】

【表 5】

- Ashkenazi, A, Pai, RC, Fong, S, Leung, S, Lawrence, DA, Marsters, SA, Blackie, C, Chang, L, McMurtrey, AE, Hebert, A, DeForge, L, Koumenis, IL, Lewis, D, Harris, L, Bussiere, J, Koeppen, H, Shahrokhi, Z, and Schwall, RH Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; 104: 155-162.
- Baldwin, A.S. 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 107:241-246. 10
- Baldwin, A.S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683.
- Belka, C., B. Schmid, P. Marini, E. Durand, J. Rudner, H. Faltin, M. Bamberg, K. Schulze-Osthoff, and W. Budach. 2001. Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* 20:2190-2196.
- Bockbrader, K. M., Tan, M., and Sun, Y. (2005). A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*.
- Bodmer, J.L., N. Holler, S. Reynard, P. Vinciguerra, P. Schneider, P. Juo, J. Blenis, and J. Tschopp. 2000. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2:241-243. 20
- Boldin, M.P., E.E. Varfolomeev, Z. Pancer, I.L. Mett, J.H. Camonis, and D. Wallach. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270:7795-7798.
- Boldin, M.P., T.M. Goncharov, Y.V. Goltsev, and D. Wallach. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815.
- Bonavida, B, Ng, CP, Jazirehi, A, Schiller, G, and Mizutani, Y Selectivity of TRAIL-mediated apoptosis of cancer cells and synergy with drugs: the trail to non-toxic cancer therapeutics (review). *Int J Oncol* 1999; 15: 793-802. 30
- Buchsbaum, D. J., Zhou, T., Grizzle, W. E., Oliver, P. G., Hammond, C. J., Zhang, S., Carpenter, M., and LoBuglio, A. F. (2003). Antitumor efficacy of TRA-8 anti-DR5 monoclonal antibody alone or in combination with chemotherapy and/or radiation therapy in a human breast cancer model. *Clin Cancer Res* 9, 3731-3741.
- Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, and X. Wang. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:269-290.
- Carthy, CM, Yanagawa, B, Luo, H, Granville, DJ, Yang, D, Cheung, P, Cheung, C, Esfandiarei, M, Rudin, CM, Thompson, CB, Hunt, DW, and McManus, BM Bcl-2 and Bcl-xL overexpression inhibits cytochrome c release, activation of multiple caspases, and virus release following coxsackievirus B3 infection. *Virology* 2003; 313: 147-157 40
- Causevic, M., R.G. Hislop, N.M. Kernohan, F.A. Carey, R.A. Kay, R.J. Steele, and F.V. Fuller-Pace. 2001. Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours. *Oncogene* 20:7734-7743.
- Chang, H.Y., H. Nishitoh, X. Yang, H. Ichijo, and D. Baltimore. 1998. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281:1860-1863.

【 0 2 0 3 】

50

【表 6】

- Chaudhary, P.M., M. Eby, A. Jasmin, A. Bookwalter, J. Murray, and L. Hood. 1997. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7:821-830.
- Chawla-Sarkar, M, Bae, SI, Reu, FJ, Jacobs, BS, Lindner, DJ, and Borden, EC
Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; 11: 915-923
- Chen, C., L.C. Edelman, and C. Gelinas. 2000. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 20:2687-2695. 10
- Chinnaiyan, A.M., K. O'Rourke, M. Tewari, and V.M. Dixit. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81:505-512.
- Chinnaiyan, AM, Prasad, U, Shankar, S, Hamstra, DA, Shanaiah, M, Chenevert, TL, Ross, BD, and Rehemtulla, A Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1754-1759.
- Crook, N.E., R.J. Clem, and L.K. Miller. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67:2168-2174. 20
- Cuello, M, Ettenberg, SA, Nau, MM, and Lipkowitz, S Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2001; 81: 380-390.
- Cummins, JM, Kohli, M, Rago, C, Kinzler, KW, Vogelstein, B, and Bunz, F X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3006-3008
- Damiano, J.S., and J.C. Reed. 2004. CARD proteins as therapeutic targets in cancer. *Curr Drug Targets* 5:367-374.
- Degli-Esposti, M.A., W.C. Dougall, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, C.A. Smith, and R.G. Goodwin. 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7:813-820. 30
- Desagher, S., and J.C. Martinou. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10:369-377.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17, 2215-2223.
- Deveraux, Q.L., and J.C. Reed. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252. 40
- Deveraux, Q.L., R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-304.

【表7】

- Dubey, P., Hendrickson, R. C., Meredith, S. C., Siegel, C. T., Shabanowitz, J., Skipper, J. C., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., and Schreiber, H. (1997). The immunodominant anti-gen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68. *J Exp Med* 185, 695-705.
- Emery, JG, McDonnell, P, Burke, MB, Deen, KC, Lyn, S, Silverman, C, Dul, E, Appelbaum, ER, Eichman, C, DiPrinzio, R, Dodds, RA, James, IE, Rosenberg, M, Lee, JC, and Young, PR Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998; 273: 14363-14367. 10
- Fesik, S.W. 2000. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103:273-282.
- Fu, J.J., L.Y. Li, and G.X. Lu. 2002. Molecular cloning and characterization of human DDX36 and mouse Ddx36 genes, new members of the DEAD/H box superfamily. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 34:655-661.
- Fulda, S, Meyer, E, and Debatin, KM Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 2002; 21: 2283-2294
- Fulda, S., E. Meyer, C. Friesen, S.A. Susin, G. Kroemer, and K.M. Debatin. 2001. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene* 20:1063-1075. 20
- George, R.E., R.M. Kenyon, A.G. McGuckin, A.J. Malcolm, A.D. Pearson, and J. Lunec. 1996. Investigation of co-amplification of the candidate genes ornithine decarboxylase, ribonucleotide reductase, syndecan-1 and a DEAD box gene, DDX1, with N-myc in neuroblastoma. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Oncogene* 12:1583-1587.
- Gliniak, B and Le, T Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity *in vivo* is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res* 1999; 59: 6153-6158.
- Godbout, R., M. Packer, and W. Bie. 1998. Overexpression of a DEAD box protein (DDX1) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines. *J Biol Chem* 273:21161-21168. 30
- Green, A.M., and N.D. Steinmetz. 2002. Monitoring apoptosis in real time. *Cancer J* 8:82-92.
- Green, D.R. 1998. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94:695-698.
- Green, D.R. 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102:1-4.
- Griffith, TS, Rauch, CT, Smolak, PJ, Waugh, JY, Boiani, N, Lynch, DH, Smith, CA, Goodwin, RG, and Kubin, MZ Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1999; 162: 2597-2605.
- Grimm, S., B.Z. Stanger, and P. Leder. 1996. RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10923-10927. 40
- Hashimoto, K., Y. Nakagawa, H. Morikawa, M. Niki, Y. Egashira, I. Hirata, K. Katsu, and Y. Akao. 2001. Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc

【表 8】

- protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines. *Carcinogenesis* 22:1965-1970.
- Heim, M. H. (2005). RIG-I: an essential regulator of virus-induced interferon production. *J Hepatol* 42, 431-433.
- Heinlein, U.A. 1998. Dead box for the living. *J Pathol* 184:345-347.
- Hernandez, A., Q.D. Wang, S.A. Schwartz, and B.M. Evers. 2001. Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *J Gastrointest Surg* 5:56-65. 10
- Hinz, S, Trauzold, A, Boenicke, L, Sandberg, C, Beckmann, S, Bayer, E, Walczak, H, Kalthoff, H, and Ungefroren, H Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 5477-5486
- Ichijo, H. 1998. [Molecular mechanisms for cell life and cell death]. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 65:155-163.
- Ichijo, H., E. Nishida, K. Irie, P. ten Dijke, M. Saitoh, T. Moriguchi, M. Takagi, K. Matsumoto, K. Miyazono, and Y. Gotoh. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275:90-94. 20
- Ichikawa, K., W. Liu, L. Zhao, Z. Wang, D. Liu, T. Ohtsuka, H. Zhang, J.D. Mountz, W.J. Koopman, R.P. Kimberly, and T. Zhou. 2001. Tumorcidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 7:954-960.
- Ichikawa, K., W. Liu, M. Fleck, H. Zhang, L. Zhao, T. Ohtsuka, Z. Wang, D. Liu, J.D. Mountz, M. Ohtsuki, W.J. Koopman, R. Kimberly, and T. Zhou. 2003. TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 171:1061-1069.
- Ip, Y.T., and R.J. Davis. 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205-219. 30
- Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.
- Jo, M., T.H. Kim, D.W. Seol, J.E. Esplen, K. Dorko, T.R. Billiar, and S.C. Strom. 2000. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor- related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 6:564-567.
- Kang, D.C., R.V. Gopalkrishnan, L. Lin, A. Randolph, K. Valerie, S. Pestka, and P.B. Fisher. 2004. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 23:1789-1800. 40
- Kang, D.C., R.V. Gopalkrishnan, Q. Wu, E. Jankowsky, A.M. Pyle, and P.B. Fisher. 2002. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:637-642.

【表 9】

- Kasof, G.M., and B.C. Gomes. 2001. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 276:3238-3246.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6, 981-988.
- Keane, MM, Ettenberg, SA, Nau, MM, Russell, EK, and Lipkowitz, S Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 1999; 59: 734-741. 10
- Kischkel, F.C., D.A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K.J. Kim, and A. Ashkenazi. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12:611-620.
- Kischkel, F.C., D.A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott, and A. Ashkenazi. 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276:46639-46646.
- Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-795.
- Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276:20633-20640. 20
- Krueger, A., S. Baumann, P.H. Krammer, and S. Kirchhoff. 2001. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21:8247-8254.
- Kuang, A.A., G.E. Diehl, J. Zhang, and A. Winoto. 2000. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 275:25065-25068.
- Lassus, P., X. Opitz-Araya, and Y. Lazebnik. 2002. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297:1352-1354. 30
- Lawrence, D., Z. Shahrokh, S. Marsters, K. Achilles, D. Shih, B. Mounho, K. Hillan, K. Totpal, L. DeForge, P. Schow, J. Hooley, S. Sherwood, R. Pai, S. Leung, L. Khan, B. Gliniak, J. Bussiere, C.A. Smith, S.S. Strom, S. Kelley, J.A. Fox, D. Thomas, and A. Ashkenazi. 2001. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7:383-385.
- LeBlanc, H, Lawrence, D, Varfolomeev, E, Totpal, K, Morlan, J, Schow, P, Fong, S, Schwall, R, Sinicropi, D, and Ashkenazi, A Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* 2002; 8: 274-281. 40
- Li, L., Thomas, R. M., Suzuki, H., De Brabander, J. K., Wang, X., and Harran, P. G. (2004). A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death. *Science* 305, 1471-1474.

【表 1 0】

- Lin, Y., A. Devin, A. Cook, M.M. Keane, M. Kelliher, S. Lipkowitz, and Z.G. Liu. 2000. The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of I κ B kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol* 20:6638-6645.
- MacFarlane, M., M. Ahmad, S.M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G.M. Cohen, and E.S. Alnemri. 1997. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272:25417-25420.
- Marsters, S.A., J.P. Sheridan, R.M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi. 1997. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7:1003-1006. 10
- Matsuzaki, H, Schmied, BM, Ulrich, A, Standop, J, Schneider, MB, Batra, SK, Picha, KS, and Pour, PM Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and actinomycin D induces apoptosis even in TRAIL-resistant human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 407-414.
- McCarthy, J.V., J. Ni, and V.M. Dixit. 1998. RIP2 is a novel NF- κ B-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 273:16968-16975.
- Mitsiades, C.S., S.P. Treon, N. Mitsiades, Y. Shima, P. Richardson, R. Schlossman, T. Hideshima, and K.C. Anderson. 2001. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 98:795-804. 20
- Mitsiades, N., C.S. Mitsiades, V. Poulaki, K.C. Anderson, and S.P. Treon. 2002. Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood* 99:2162-2171.
- Muzio, M., A.M. Chinnaiyan, F.C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J.D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P.H. Krammer, M.E. Peter, and V.M. Dixit. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365. 30
- Ng, CP and Bonavida, B X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation: sensitization by overexpression of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI (Smac/DIABLO). *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 1051-1058
- Nicholson, D. W. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407, 810-816.
- Nishitoh, H., M. Saitoh, Y. Mochida, K. Takeda, H. Nakano, M. Rothe, K. Miyazono, and H. Ichijo. 1998. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* 2:389-395. 40
- Ohtsuka, T., and T. Zhou. 2002. Bisindolylmaleimide VIII enhances DR5-mediated apoptosis through the MKK4/JNK/p38 kinase and the mitochondrial pathways. *J Biol Chem* 277:29294-29303.
- Ohtsuka, T., D. Buchsbaum, P. Oliver, S. Makhija, R. Kimberly, and T. Zhou. 2003. Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and

【表 1 1】

- chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway. *Oncogene* 22:2034-2044.
- Owsianka, A.M., and A.H. Patel. 1999. Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. *Virology* 257:330-340.
- Pan, G., J. Ni, Y.F. Wei, G. Yu, R. Gentz, and V.M. Dixit. 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815-818.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113. 10
- Park, SY, Billiar, TR, and Seol, DW IFN-gamma inhibition of TRAIL-induced IAP-2 upregulation, a possible mechanism of IFN-gamma-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 233-236
- Payan, and Y. Luo. 1999. Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB. *Curr Biol* 9:539-542.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271, 12687-12690.
- Roa, WH, Chen, H, Fulton, D, Gulavita, S, Shaw, A, Th'ng, J, Farr-Jones, M, Moore, R, and Petruk, K X-linked inhibitor regulating TRAIL-induced apoptosis in chemoresistant human primary glioblastoma cells. *Clin Invest Med* 2003; 26: 231-242 20
- Rokhlin, OW, Guseva, N, Tagiyev, A, Knudson, CM, and Cohen, MB Bcl-2 oncoprotein protects the human prostatic carcinoma cell line PC3 from TRAIL-mediated apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 2836-2843
- Saleh, A., S.M. Srinivasula, S. Acharya, R. Fishel, and E.S. Alnemri. 1999. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 274:17941-17945.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17:1675-1687. 30
- Schneider, P., J.L. Bodmer, M. Thome, K. Hofmann, N. Holler, and J. Tschopp. 1997. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 416:329-334.
- Schneider, P., M. Thome, K. Burns, J.L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, and J. Tschopp. 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7:831-836.
- Sheridan, J.P., S.A. Marsters, R.M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C.L. Gray, K. Baker, W.I. Wood, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277:818-821. 40
- Sinicrope, FA, Penington, RC, and Tang, XM Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8284-8292

【表 1 2】

- Sprick, M.R., M.A. Weigand, E. Rieser, C.T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P.H. Krammer, and H. Walczak. 2000. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12:599-609.
- Stanger, B.Z., P. Leder, T.H. Lee, E. Kim, and B. Seed. 1995. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81:513-523.
- Sun, SY, Yue, P, Hong, WK, and Lotan, R Augmentation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamantyl)- 4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437) through up- regulation of TRAIL receptors in human lung cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 7149-7155. 10
- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, K. Nakata, J.C. Reed, and R. Takahashi. 2001. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* 276:27058-27063.
- Ting, A.T., F.X. Pimentel-Muinos, and B. Seed. 1996. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *Embo J* 15:6189-6196. 20
- Toshiaki Ohtsuka, Buchsbaum D, Patsy Oliver, Sharmila Makhija, Robert Kimberly, and Tong Zhou Synergistic Induction of Tumor Cell Apoptosis by Death Receptor Antibody and Chemotherapy Agent Through JNK/p38 and Mitochondrial Death Pathway. *Onogene* 2003; in press:
- Tournier, C., P. Hess, D.D. Yang, J. Xu, T.K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S.N. Jones, R.A. Flavell, and R.J. Davis. 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288:870-874.
- Vucic, D., H.R. Stennicke, M.T. Pisabarro, G.S. Salvesen, and V.M. Dixit. 2000. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 10:1359-1366. 30
- Wagner, KW, Engels, IH, and Deveraux, QL Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 35047-35052
- Walczak, H, Miller, RE, Ariail, K, Gliniak, B, Griffith, TS, Kubin, M, Chin, W, Jones, J, Woodward, A, Le, T, Smith, C, Smolak, P, Goodwin, RG, Rauch, CT, Schuh, JC, and Lynch, DH Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med* 1999; 5: 157-163.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., et al. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* 16, 5386-5397. 40
- Walczak, H., M.A. Degli-Esposti, R.S. Johnson, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, N. Boiani, M.S. Timour, M.J. Gerhart, K.A. Schooley, C.A. Smith, R.G. Goodwin, and C.T. Rauch. 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* 16:5386-5397.

【表 1 3】

- Wang, C.Y., D.C. Guttridge, M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr. 1999. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19:5923-5929.
- Wieland, I., Ropke, A., Stumm, M., Sell, C., Weidle, U. H., and Wieacker, P. F. (2000). Molecular characterization of the DICE1 (DDX26) tumor suppressor gene in lung carci-noma cells. *Oncol Res* 12, 491-500.
- Wiley, S.R., K. Schooley, P.J. Smolak, W.S. Din, C.P. Huang, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, T.D. Smith, C. Rauch, C.A. Smith, and et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-682. 10
- Yamanaka, T., K. Shiraki, K. Sugimoto, T. Ito, K. Fujikawa, M. Ito, K. Takase, M. Moriyama, T. Nakano, and A. Suzuki. 2000. Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatology* 32:482-490.
- Yang, X., R. Khosravi-Far, H.Y. Chang, and D. Baltimore. 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89:1067-1076.
- Yang, Y. L., and Li, X. M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 10, 169-177. 20
- Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L., and Jeang, K. T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* 119, 381-392.
- Yoneyama, M., and Fujita, T. (2004). [RIG-I: critical regulator for virus-induced innate immunity]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 49, 2571-2578.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., et al. (2005). Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J Immunol* 175, 2851-2858. 30
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5:730-737.
- Zhou, T., J.D. Mountz, and R.P. Kimberly. 2002. Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol Res* 26:323-336.
- Zhou, T., L. Song, P. Yang, Z. Wang, D. Lui, and R.S. Jope. 1999. Bisindolylmaleimide VIII facilitates Fas-mediated apoptosis and inhibits T cell-mediated autoimmune diseases. *Nat Med* 5:42-48.
- Zhu, N., Ware, C. F., and Lai, M. M. (2001). Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology* 283, 178-187. 40
- Zong, W.X., L.C. Edelstein, C. Chen, J. Bash, and C. Gelinas. 1999. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 13:382-387.

【表 1 4】

Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang. 1999. An APAF-1, cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274:11549-11556.

【図面の簡単な説明】

【 0 2 1 2 】

付随する図面は、本明細書に取り込まれ、本明細書の一部を構成するものであり、開示された方法及び組成物のいくつかの態様を説明するものであって、説明文とともに、開示された方法及び組成物の原理を説明するために役立つものである。 10

【図 1】図 1 は、T R A - 8 媒介性アポトーシスに対する腫瘍細胞の抵抗性の誘導を示す。パネル (A) は、T R A I L - R 1 及び T R A I L - R 2 の細胞表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。ヒト乳がん細胞株 M D A - 2 3 1 及びヒト卵巣がん細胞株 U L - 3 C を、サイクロームコンジュゲート化 (CyChrome-conjugated) 抗 T R A I L - R 1 (2 E 1 2) 及び P E コンジュゲート化抗 T R A I L - R 2 (2 B 4) を用いて染色し、F A C S c a n フローサイトメーターで分析した。パネル (B) は、T R A - 8、2 E 1 2 又は T R A I L 媒介性アポトーシスに対する M D A - 2 3 1 及び U L - 3 C 細胞の感受性を示す。細胞を、9 6 ウェルプレート中で 1 ウェル当たり 1 , 0 0 0 細胞で 3 ウェルずつ (三連) で培養し、示した濃度の各アポトーシス誘導剤とともにインキュベートした。架橋剤として、2 E 1 2 誘導アポトーシスについては、2 µg/ml のヤギ抗マウス I g G 1 を添加し、T R A I L 誘導アポトーシスについては、抗 F l a g 抗体を添加した。細胞生存率は、一晚培養後に A T P L I T E アッセイによって決定した。細胞生存率は、処理したウェルのカウントを培地対照のカウントで割ったパーセンテージによって決定した。各点は、3 ウェルずつのセットの平均を表し、少なくとも 3 回の独立した実験の代表値である。 20

パネル (C) は、T R A - 8 抵抗性の誘導中の T R A - 8 媒介性アポトーシスに対する腫瘍細胞の感受性を示す。T R A - 8 抵抗性の誘導は、細胞を 1 ng/ml の T R A - 8 で 2 日間処理することによって開始した。T R A - 8 の用量は、2 , 0 0 0 ng/ml になるまで 2 日毎に 2 倍にした。これらの用量の各サイクルで、非誘導細胞及び対応する各用量で処理中の誘導細胞の細胞生存率を、A T P L I T E アッセイによって決定した。データを、3 ウェルずつの培養の平均として表す。 30

【図 2】図 2 は、M D A - 2 3 1 及び U L - 3 C 細胞における誘導された T R A - 8 抵抗性の選択性を示す。パネル (A) は、M D A - 2 3 1 及び U L - 3 C 細胞における T R A I L - R 2 誘導性アポトーシスを示す。親及び抵抗性の M D A - 2 3 1 及び U L - 3 C 細胞の両方を、示した濃度の T R A - 8 で処理した。パネル (B) は、M D A - 2 3 1 及び U L - 3 C 細胞における T R A I L - R 1 誘導性アポトーシスを示す。親及び抵抗性の M D A - 2 3 1 及び U L - 3 C 細胞の両方を、示した濃度の 2 E 1 2 で処理した。パネル (C) は、M D A - 2 3 1 及び U L - 3 C 細胞における T R A I L 誘導性アポトーシスを示す。親及び抵抗性の M D A - 2 3 1 及び U L - 3 C 細胞の両方を、示した濃度の組換え可溶性 T R A I L で処理した。細胞生存率は、上述のとおり A T P L I T E アッセイによって一晚培養後に決定した。パネル (D) は、T R A - 8 抵抗性の維持を示す。T R A - 8 抵抗性の誘導後、T R A - 8 を撤去した。T R A - 8 抵抗性の維持は、T R A - 8 の撤去後毎週決定した。細胞を、1 , 0 0 0 ng/ml の T R A - 8 で一晚処理し、A T P L I T E アッセイによって細胞生存率を決定した。 40

【図 3】図 3 は、T R A - 8 抵抗性細胞における T R A I L - R 2 及び関連するアポトーシス調節の発現を示す。パネル (A) は、タンパク質発現のウェスタン・プロット解析を示す。総細胞ライセートを S D S - P A G E で分離し、ウェスタン・プロットを行なった。これらのプロットを、1 µg/ml の一次抗体と一晚反応させ、続いて、H R P コンジュゲート化二次抗体と反応させた。タンパク質は、E C L 化学発光によって明らかにした。パ 50

ネル (B) は、 M D A - 2 3 1、親及び抵抗性細胞の c D N A アレイ解析を示す。ヒトアポトーシス (上のパネル) 及び細胞シグナリング関連遺伝子 (下のパネル) のパネルについての膜 c D N A アレイは、 SuperArray, Inc. から購入した。 ^{32}P 標識 c D N A プローブを、 M D A - 2 3 1 親及び抵抗性細胞の総 R N A から調製し、プロット上の c D N A アレイとハイブリダイズさせた。遺伝子発現プロファイルは、 Cyclone Phosphor-Imager を用いて解析した。

【図 4】図 4 は、 T R A - 8 抵抗性細胞における J N K / p 3 8 キナーゼ経路及びカスパーゼ経路の活性化を示す。パネル (A) は、 T R A I L - R 1 及び R 2 を引き金としたカスパーゼ活性化を示す。 M D A - 2 3 1 親及び抵抗性細胞を、 1, 0 0 0 ng/ml の T R A - 8 (左のパネル) 又は 2 E 1 2 (右のパネル) で示した時間処理した。総細胞ライセートのウェスタン・プロットを、ポリクローナル抗カスパーゼ 8 (上のパネル)、抗カスパーゼ 3 (中央のパネル) 又は抗 P A R P (下のパネル) で探索した。矢印は、全長及び切断されたタンパク質を示す。パネル (B) は、 J U K / p 3 8 キナーゼ経路の活性化を示す。細胞を、上記と同様にして処理した。総細胞ライセートのウェスタン・プロットを、ポリクローナル抗リン酸化 J N K (上のパネル) 又は抗リン酸化 p 3 8 (下のパネル) で探索した。矢印は、リン酸化されたタンパク質を示す。

【図 5 A】図 5 は、 T R A - 8 抵抗性細胞における変更された D I S C 形成を示す。パネル (A) は、 D I S C 形成の共免疫沈降アッセイを示す。 M D A - 2 3 1 親及び抵抗性細胞を、 1, 0 0 0 ng/ml の T R A - 8 (左のパネル) 又は 2 E 1 2 (右のパネル) で示した時間処理した。 T R A I L - R 1 及び T R A I L - R 2 は、 2 E 1 2 又は 2 B 4 コンジュゲート化セファロース 4 B (Sepharose 4B) とともに免疫沈降した。この共免疫沈降されたタンパク質及び総細胞タンパク質のウェスタン・プロットを、ポリクローナル抗 F A D D (上のパネル) 又は抗カスパーゼ 8 抗体 (中央のパネル) 又は抗 c F L I P 抗体 (下のパネル) で探索した。

【図 5 B】図 5、パネル (B ~ E) は、 T R A - 8 抵抗性細胞の T R A I L - R 2 関連タンパク質の二次元プロテオームプロファイルを示す。 M D A 2 3 1 親及び抵抗性細胞を、 1, 0 0 0 ng/ml の T R A - 8 で 4 時間処理するか、又は対照として未処理のままとした。 2 B 4 コンジュゲート化セファロース 4 B との T R A I L - R 2 の免疫沈降の後、溶出したタンパク質を二次元電気泳動によって分離し、 S Y P R O L B E E (Ruby) 染色緩衝液で染色した。円で囲まれた差時的に発現されたタンパク質のスポットを、 P D Q u e s t ソフトウェアによって同定した。実験は、再現性のある結果を得るために少なくとも 3 回繰り返した。

【図 6】図 6 は、化学療法剤による T R A - 8 抵抗性の逆転を示す。パネル (A) は、化学療法剤の存在下での T R A - 8 誘導アポトーシスに対する T R A - 8 抵抗性細胞の感受性を示す。 M D A - 2 3 1 及び U L - 3 C 抵抗性細胞を、 0 . 1 C M のタキソール、 1 V M のアドリアマイシン、 1 0 0 V M のシスプラチン (cisplatin) 又は 5 V M の BisVIII の存在下又は不存在下で種々の用量の T R A - 8 で処理した。細胞生存率は、 A T P L I T E アッセイによって一晩培養後に決定した。パネル (B) は、アドリアマイシンによる T R A - 8 抵抗性細胞におけるカスパーゼカスケードの活性化を示す。 M D A - 2 3 1 抵抗性細胞を、培地対照 (レーン) で培養するか、あるいは 1, 0 0 0 ng/ml の T R A - 8 及び 1 M のアドリアマイシンで 1 時間 (レーン 2) 又は 4 時間 (レーン 3)、又は 1 V M のアドリアマイシン単独又は 1, 0 0 0 ng/ml の T R A - 8 単独 (レーン 5) で処理した。総細胞ライセートのウェスタン・プロットを、モノクローナル抗ヒトカスパーゼ抗体で探索した。パネル (C) は、 T R A - 8 抵抗性細胞における F A D D の T R A I L - R 2 動員を示す。上述したように異なる処理をした M D A - 2 3 1 抵抗性細胞由来の T R A I L - R 2 を、 2 B 4 セファロース 4 B で免疫沈降させた。 T R A I L - R 2 との F A D D の共免疫沈降は、抗 F A D D 抗体と反応させたウェスタン・プロットによって決定した。

【図 7】図 7 は、 T R A I L - R 2 との D D X 3 の会合を示す。 M D A 2 3 1 親細胞及び抵抗性細胞を、組換え全長 D D X 3 でトランスフェクトした。トランスフェクションの 4 8 時間後、細胞を、 5 0 0 ng/ml の T R A - 8 で示した時間処理した。総細胞タンパク質

10

20

30

40

50

を、モノクローナル抗His抗体で探索した(上のパネル)。-アクチンを、添加対照として用いた。TRAIL-R2会合組換えDDX3の共免疫沈降アッセイは、抗His抗体を用いて決定した(下のパネル)。TRAILと会合する内在性DDX3を解析するために、MDA231親細胞及び抵抗性細胞を、500ng/mlのTRA-8で示した時間処理した。TRAIL-R2は、2B4コンジュゲート化セファロース4Bで免疫沈降された。総細胞タンパク質を、モノクローナル抗DDX3抗体、3E2及び5A6で探索した(上のパネル)。共免疫沈降された内在性DDX3を、モノクローナル抗DDX3抗体、3E2及び5A6で探索した(下のパネル)。親細胞及び抵抗性細胞内のTRAIL-R2を、抗TRAIL-R2ポリクローナル抗体を用いてウェスタン・プロットによって決定した。

10

【図8A】図8は、DDX3及びTRAIL-R2の相互作用領域のマッピングを示す。図8Aは、欠失したDDX3の構築物を示す。示したとおりの全長及び欠失DDX3をコードするcDNAは、pcDNA3.1-HisA発現ベクターにクローニングした。293細胞を、N末端、C末端欠失DDX3及び野生型DDX3でトランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後、組換えDDX3の発現をウェスタン・プロットによって抗His抗体を用いて検出した(上のパネル)。TRAIL-R2で共免疫沈降した組換えDDX3は、ウェスタン・プロット解析によって抗Hisモノクローナル抗体を用いて決定した(中央のパネル)。TRAIL-R2は、ウェスタン・プロットによって、抗TRAIL-R2ポリクローナル抗体を用いて決定した(下のパネル)。レーン1:トランスフェクションなし、レーン2~5:N末端DDX3の2-5、レーン6~9:

20

C末端DDX3の3-6、レーン10:全長DDX3。
【図8B】図8Bは、TRAIL-R2とのDDX3の相互作用はデスドメインと独立であることを示す。示したとおりの全長及び欠失したTRAIL-R2をコードするcDNAは、シャトルCMVベクターにクローニングした。マウス3T3細胞を、野生型又は突然変異型のTRAIL-R2及びDDX3で共トランスフェクションした。24時間後、細胞表面発現を、フローサイトメトリー解析によって、TRA-8及びPEコンジュゲート化抗mIgG1を用いて試験した。共トランスフェクションの48時間後、細胞ライセートをTRA-8と共免疫沈降させた。総DDX3(上のパネル)及びTRAIL-R2会合DDX3(中央のパネル)を、ウェスタン・プロットによって抗His抗体を用いて試験した。レーン1:トランスフェクションなし; レーン2: DDX3単独; レーン3:

30

野生型TRAIL-R2及びDDX3; レーン4~9: TRAIL-R2及びDDX3の1-6。TRAIL-R2は、ウェスタン・プロットによって抗TRAIL-R2ポリクローナル抗体を用いて決定した(下のパネル)。
【図8C】図8Cは、示したとおりの全長及び短縮型(truncated)TRAIL-R2をコードするcDNAを、レポータータンパク質としてGFPを有する二重発現ベクターにクローニングしたことを示す。マウス3T3細胞を、野生型又は突然変異型TRAIL-R2及びDDX3で共トランスフェクションした。24時間後、細胞表面発現を、フローサイトメトリー解析によってTRA-8及びPEコンジュゲート化抗mIgG1を用いて試験した。共トランスフェクションの48時間後、細胞ライセートを、TRA-8と免疫沈降させた。TRAIL-R2は、ウェスタン・プロットによって抗TRAIL-R2ポリクローナル抗体を用いて決定した(上のパネル)。総DDX3(下のパネル)及びTRAIL-R2会合DDX3(中央のパネル)は、ウェスタン・プロットによって抗His抗体を用いて試験した。レーン1: DDX3単独; レーン2: TRAIL-R2-300-330及びDDX3; レーン3: D330及びDDX3; レーン4:

40

D340及びDDX3; レーン5: 野生型TRAIL-R2及びDDX3。
【図8D】図8Dは、TRAIL-R2のDDX3結合領域の、DcR2及びDR4とのアミノ酸整列図を示す。

【図8E】図8Eは、DDX3がTRAIL-R2及びcIAP1の間の連結物として役立つことを示す。MDA231親細胞及びMDA231抵抗性細胞を、示した時間、500ng/mlのTRA-8で処理した。TRAIL-R2は、2B4コンジュゲート化セファ

50

コース4Bで免疫沈降させた。DDX3は、3E4コンジュゲート化セファロース4Bで免疫沈降させた。総DDX3、cIAP1(上のパネル)、TRAIL-R2と共免疫沈降させたDDX3、cIAP1(中央のパネル)、DDX3と共免疫沈降させたDDX3、cIAP1(下のパネル)のウェスタン・プロットを、3E4モノクローナル抗DDX3抗体及び1C12モノクローナル抗cIAP1抗体で探索した。TRAIL-R2は、ウェスタン・プロットによって抗TRAIL-R2ポリクローナル抗体を用いて決定した(中央のパネル)。

【図9A】図9は、DDX3のダウンレギュレーションがTRA-8誘導性アポトーシスに対する抵抗性を逆転させることを示す。図9Aは、選択された有効なsRNAi-DDX3を示す。MDA231親細胞を、標的sRNAi-DDX3をコードするU6エンターベクターでトランスフェクトしたことを示す。トランスフェクションの48時間後、DDX3発現を、ウェスタン・プロット解析によって抗DDX3抗体を用いて測定した。アクチンを添加対照として用いた。

【図9B】図9Bは、MDA231抵抗性細胞を、GFP発現ベクター及びsRNAi-DDX3と共トランスフェクションしたことを示す。トランスフェクションの24時間後、GFP陽性細胞をサイトメトリーによってソーティングし、種々の濃度のTRA-8とともに一晩培養した。DDX3発現は、ウェスタン・プロットによって抗DDX3抗体を用いて検出した(上のパネル)。TRAIL-R2は、2B4コンジュゲート化セファロース4Bで免疫沈降させた。TRAIL-R2会合DDX3は、3E4モノクローナル抗DDX3抗体で探索した(中央のパネル)。トランスフェクションの24時間後、細胞を、種々の濃度のTRA-8で一晩処理した。TRA-8誘導性アポトーシスに対するトランスフェクションされた細胞の感受性は、ATPLiteアッセイによって決定した。

【図9C】図9Cは、DDX3 RNAi及びGFPで共トランスフェクションされた細胞は、TRA-8用量依存性細胞死を呈したことを示す。

【図9D】図9Dは、アポトーシスを行っているトランスフェクションされた細胞がTUNEL染色によって決定されることを示す。

【図9E】図9Eは、がん細胞のパネルが、対照又はDDX3 sRNAi oligoでトランスフェクションされたことを示す。トランスフェクションの48時間後、DDX3の低減された発現をウェスタン・プロットによって抗DDX3抗体を用いて検出した。アクチンを添加対照として用いた。

【図9F】図9Fは、トランスフェクションの24時間後、細胞を種々の濃度のTRA-8で一晩処理したことを示す。TRA-8誘導性アポトーシスに対するトランスフェクトされた細胞の感受性は、ATPLiteアッセイによって決定した。

【図10】図10は、DDX3結合モチーフを欠いたTRAIL-R2がプロアポトーシス性であることを示す。マウス3T3細胞を、D340-TRAIL-R2及びDDX3野生型、TRAIL-R2及びDDX3、T300-330-TRAIL-R2及びDDX3で共トランスフェクションした。トランスフェクションの24時間後、細胞を、500ng/mlのTRA-8で一晩処理した。アポトーシス性細胞を、GFP陽性細胞においてPEコンジュゲート化抗TRAIL-R2抗体、ビオチンコンジュゲート化アネキシンV(annexin V)によってフローサイトメトリー解析を用いて決定した。アポトーシス性細胞は、棒グラフで示した。

【図11A】図11は、DDX3がTRAIL-R2にcIAP1を連結するアダプタータンパク質として役立つことを示す。図11Aは、DDX3のcCARD結合IAP1のマッピングを示す。293細胞を、示したとおりの一連の欠失型DDX3(上のパネル)、N末端アミノ酸1~アミノ酸50欠失(レーン1)、N末端アミノ酸1~アミノ酸100欠失(レーン2)、N末端アミノ酸1~アミノ酸150欠失(レーン3)及びC末端アミノ酸350~アミノ酸662欠失DDX3(レーン4)及び全長(レーン5)でトランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後、ニッケルビーズを用いて組換えDDX3を免疫沈降させた。総cIAP1(中央のパネル)及び共免疫沈降したcIAP1を、ウェスタン・プロット解析によって抗cIAP1モノクローナル抗体を用いて

10

20

30

40

50

決定した(下のパネル)。

【図11B】図11Bは、CARDを欠いたDDX3はTRA-8抵抗性を逆転させることを示す。4系統のTRA-8抵抗性腫瘍細胞を、全長DDX3(DDX3-FL)又はCARD短縮型DDX3(CARD-DDX3)をコードするアデノウイルスベクターでトランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後、細胞ライセートを、TRA-8で免疫沈降させ、続いて、共免疫沈降したDDX3(上のパネル)及びcIAP1(中央のパネル)のウェスタン・ブロット解析を行なった。TRAIL-R2を、ウェスタン・ブロット解析によって抗TRAIL-R2ポリクローナル抗体を用いて決定した(下のパネル)。

【図11C】図11Cは、ATPLiteアッセイによって決定した細胞生存率を示す。トランスフェクションした細胞を、500ng/mlのTRA-8と一晩インキュベートした。

【図12A-C】図12は、TRAIL-R2/DDX3/cIAP1タンパク質複合体がTRA-8抵抗性細胞においてカスパーゼ-8活性化及びDDX3切断をブロックすることを示す。図12Aは、TRA-8感受性及び抵抗性細胞におけるTRAIL-R2/DDX3/cIAP1タンパク質複合体を示す。MDA231親(MDA231p)及び誘導された抵抗性(MDA231r)細胞、UL-3C親(UL-3Cp)及び誘導された抵抗性(UL-3Cr)細胞を、500ng/mlのTRA-8で8時間処理した。総細胞ライセートを、2B4抗TRAIL-R2抗体コンジュゲート化セファロース4Bで免疫沈降させ、グリシン-塩酸、pH2.0で溶出させて、直ちに1Mトリス緩衝液で中和した。ELISAプレートを、2B4抗TRAIL-R2抗体でコーティングし、3%BSA-PBSでブロッキングした。TRAIL-R2 co-IP由来タンパク質複合体とのインキュベーション後、TRAIL-R2を、ビオチンコンジュゲート化ポリクローナル抗TRAIL-R2抗体と、続いてHRPコンジュゲート化ストレプトアビジンとを用いて検出した。図12Bは、DDX3が、ビオチンコンジュゲート化3E2抗DDX3抗体、続いてHRPコンジュゲート化ストレプトアビジンによって検出されたことを示す。図12Cは、cIAP1が、ビオチンコンジュゲート化1C12抗cIAP1抗体、続いてHRPコンジュゲート化ストレプトアビジンによって検出されたことを示す。

【図12D】図12Dは、カスパーゼ媒介性切断に対するDDX3の差時的感受性を示す。DDX3を、示したとおりの細胞から、2B4抗TRAIL-R2抗体コンジュゲート化セファロース4Bとの免疫沈降によって単離し、示したとおりのカスパーゼ-2又はカスパーゼ-8と、37℃で4時間インキュベートした。

【図12E】図12Eは、5A6を捕獲抗体、3E2を検出抗体として、サンドイッチELISAによってDDX3の量を測定したことを示す。結果は、切断後のDDX3を切断しない対照で割ったパーセンテージとして表される。

【図12F】図12Fは、カスパーゼ8活性に対するDDX3/cIAP1複合体の効果を示す。DDX3は、示したとおりの細胞から2B4抗TRAIL-R2抗体コンジュゲート化セファロース4Bとの免疫沈降によって単離し、カスパーゼ8の蛍光基質であるAc-IEDD-AMCの存在下で2時間、組換え活性ヒトカスパーゼ8とインキュベートした。カスパーゼ8の阻害は、低減した蛍光強度によって測定した。結果は、対照ウェル中における最大活性のパーセンテージとして表される。

【図13A】図13は、会合及び切断の調節におけるDDX3のセリン豊富なドメインの役割を示す。パネル(A)は、GSK3基質の保存されたドメインを示す。

【図13B】図13、パネル(B)は、GSK3によって共免疫沈降されたDDX3を示す(上段)。TRA-8感受性MDA231細胞を、リチウムとともに又はなしで、TRA-8で2時間処理した。総細胞ライセートを、抗GSK3抗体で免疫沈降させた。GSK3とタンパク質を、ウェスタン・ブロットによって、抗DDX3抗体を用いて解析した。GSK3はDDX3をリン酸化する(B、下段)。組換えDDX3及びタウ(tau)を基質として用い、PKAとともに又はなしで、GSKと1時間インキュベートした。取り込まれた³²Pをカウントし、cpmとして表した。

10

20

30

40

50

【図13C】図13、(C) GSK3は、Ser90変異体DDX3をリン酸化できない。

【図13D】図13、(D) MDA231細胞を野生型DDX3及びSer90変異体DDX3でトランスフェクトした。TRA-8処理後、DR5からのDDX3の解離及びDDX3の切断を決定した。

【図1】

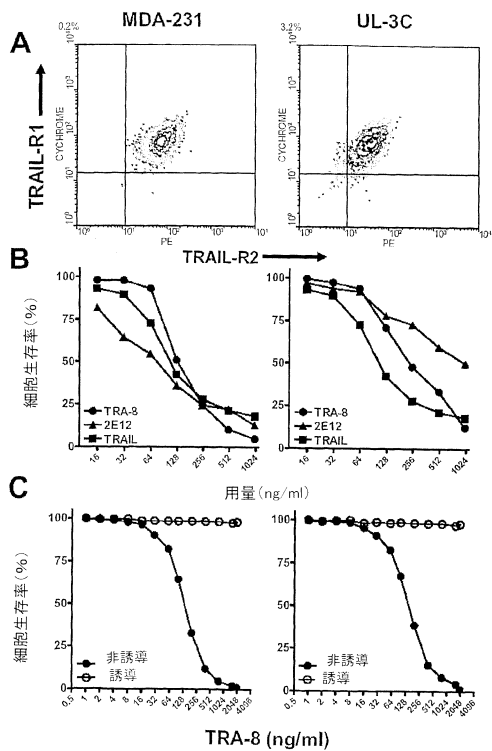


図1

【図2】

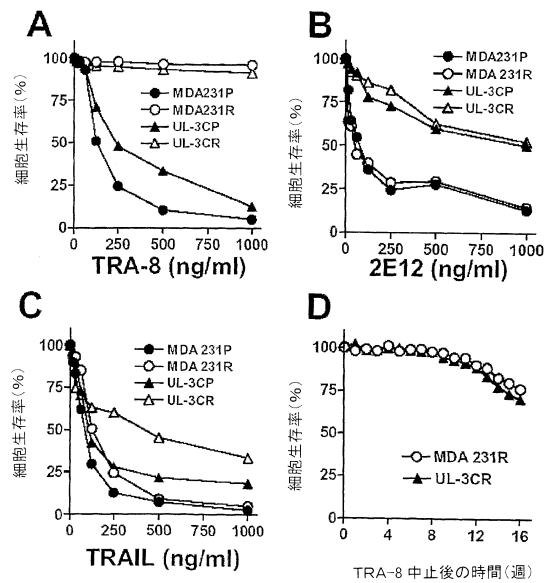


図2

【 図 3 】

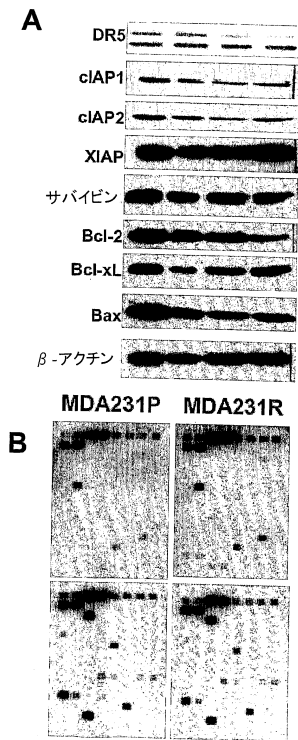


図3

【 図 4 】

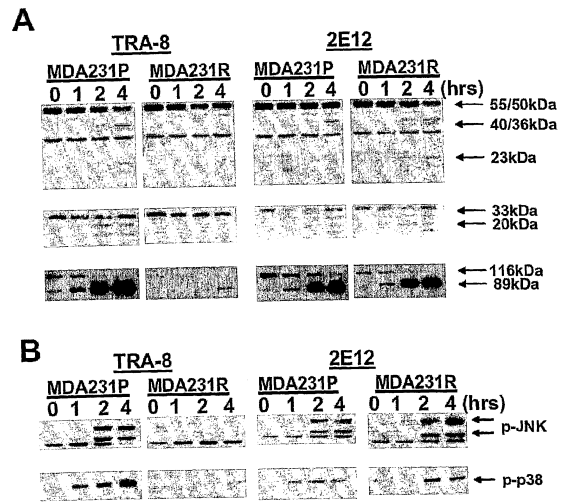


図4

【 図 5 A 】

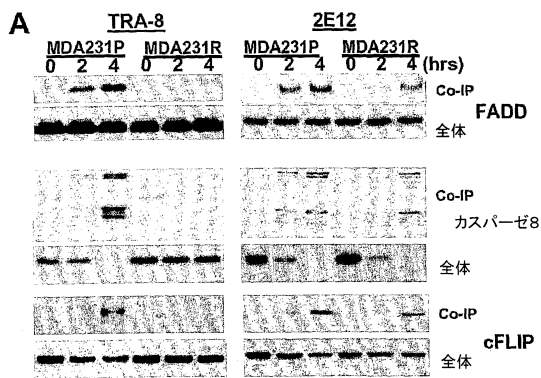


図5A

【 図 5 B 】

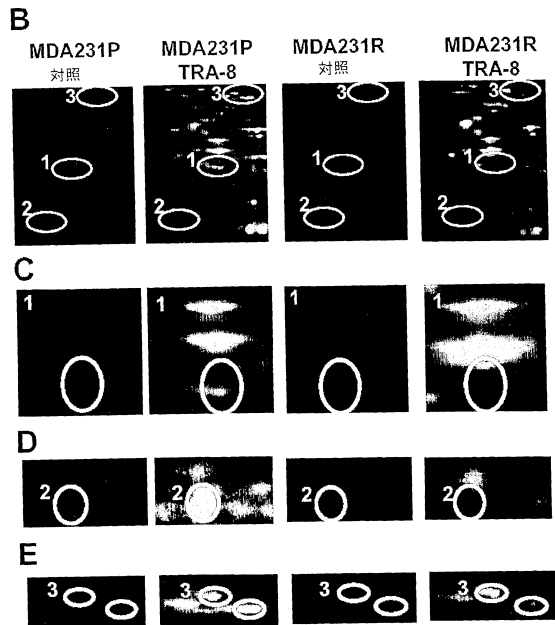


図5B

【 図 6 】

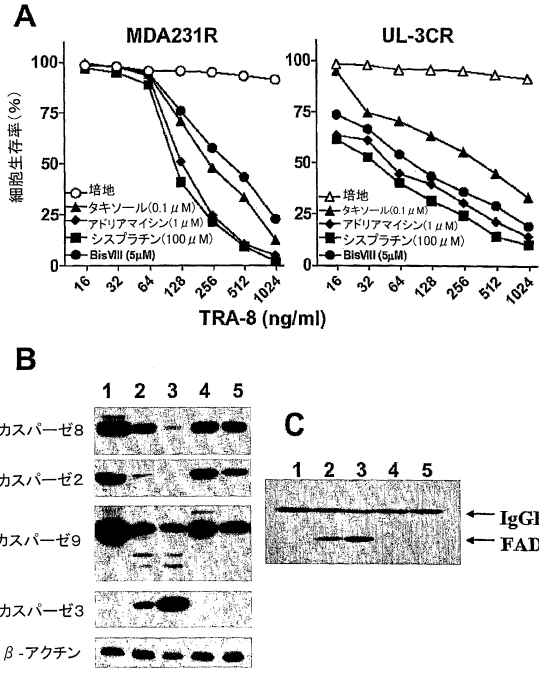


図6

【 図 7 】

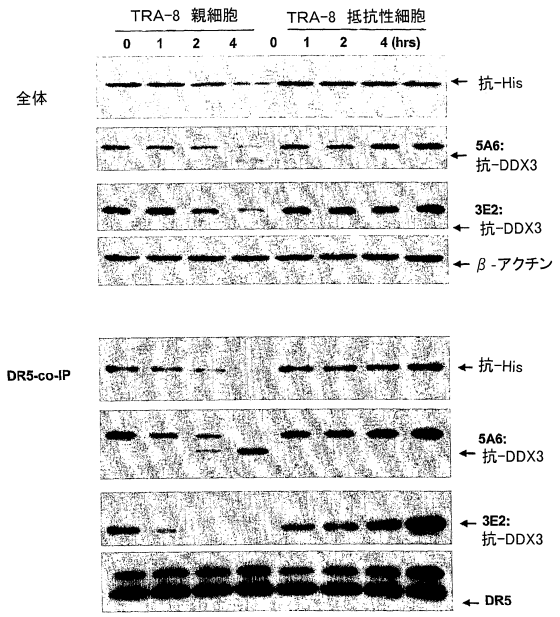


図7

【 図 8 A 】

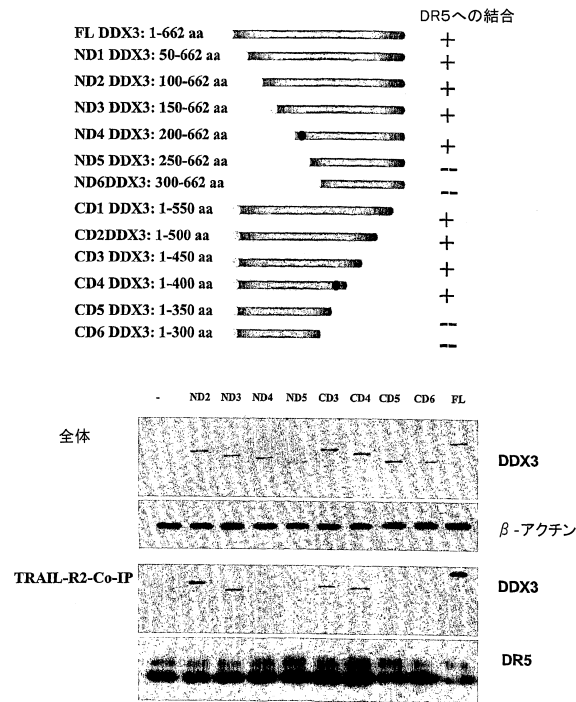


図8A

【 図 8 B 】

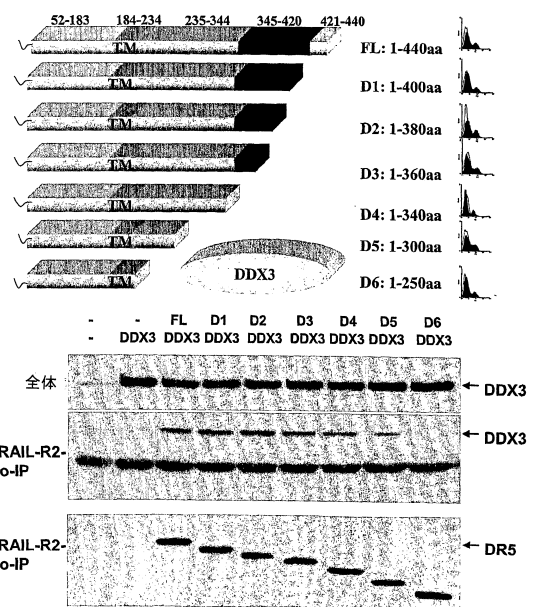


図8B

【 図 8 C 】

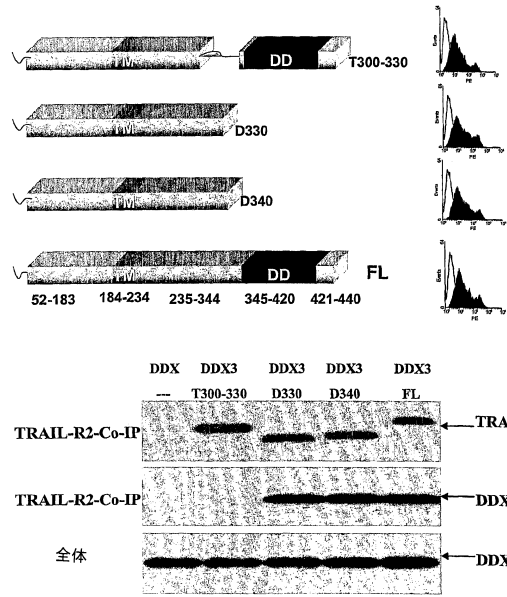


図8C

【 図 8 D 】

DR5: 4 SPGESEHLLSPAEAEERSQRRRLVLPAN 30 (SEQ ID NO:43)
 SP E + ILLH ABAE QRRRLVLP N
 Dcr2: 709 SPEEPQRLLEQAABGCQRRRLVLPVN 735 20/27 (74%) (SEQ ID NO:44)
 SPGE++ LL PAEAE SQRRRLVLPAN
 DR4: 330 SPGEAQCLLGPAAEAGSQRRRLVLPAN 356 24/27 (88%) (SEQ ID NO:45)

図8D

【 図 8 E 】

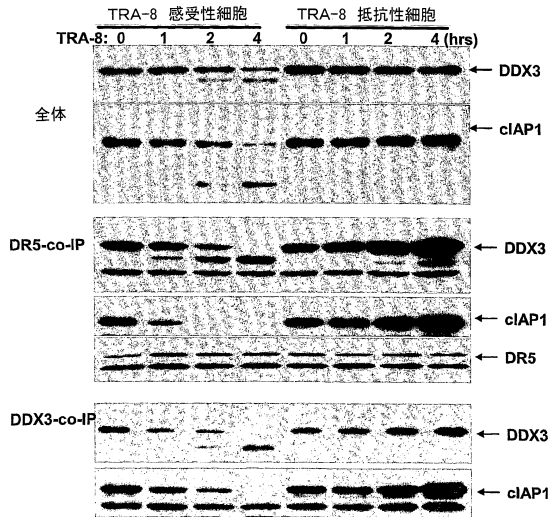


図8E

【 図 9 A 】

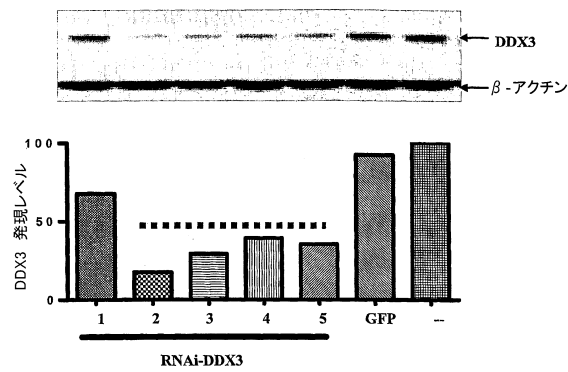


図9A

【 図 9 C 】

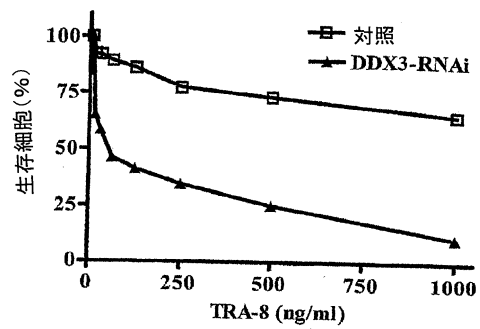


図9C

【 図 9 B 】

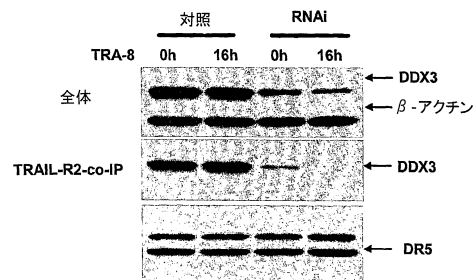


図9B

【 図 9 D 】

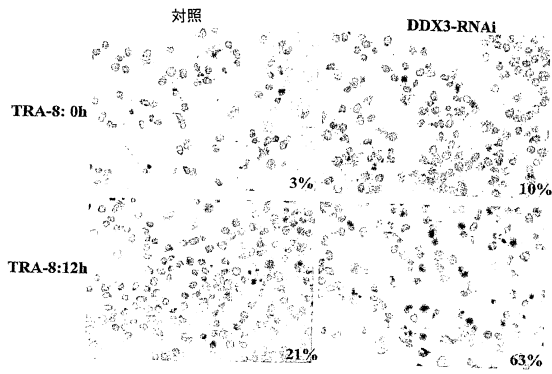


図9D

【 図 9 E 】

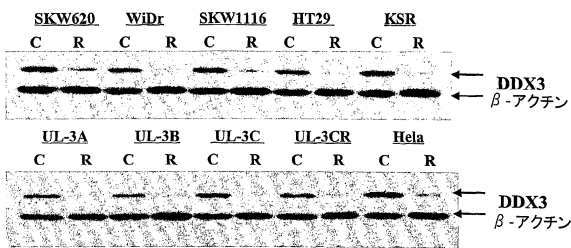


図9E

【 図 9 F 】

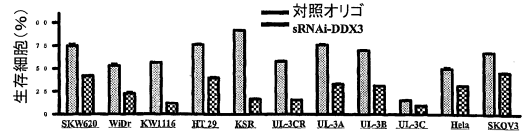


図9F

【 図 1 0 】

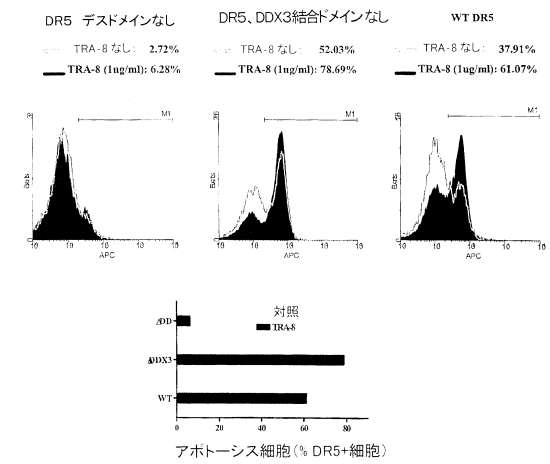


図10

【 図 1 1 A 】

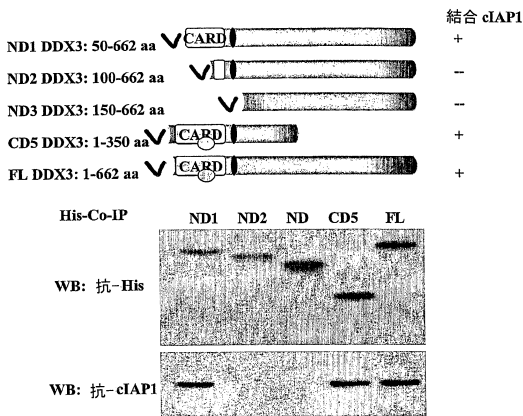


図11A

【 図 1 1 B 】

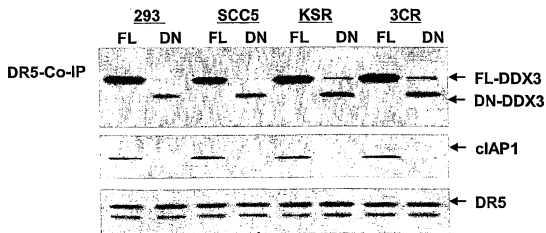


図11B

【 図 1 1 C 】

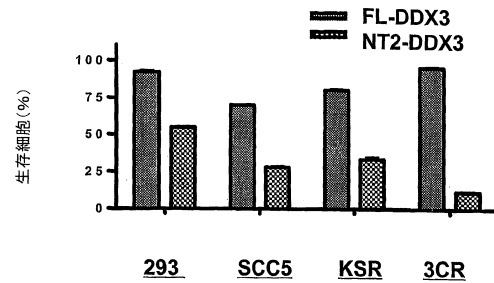


図11C

【 図 1 2 A - C 】

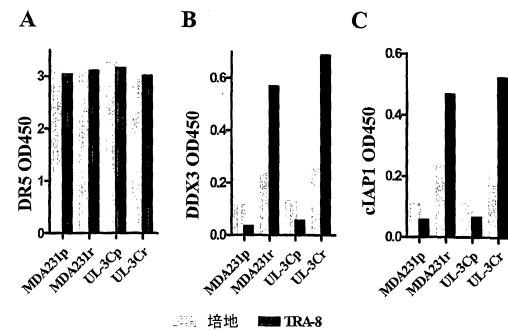


図12A-C

【 図 1 2 D 】

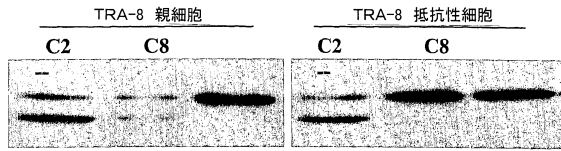


図12D

【 図 1 2 E 】

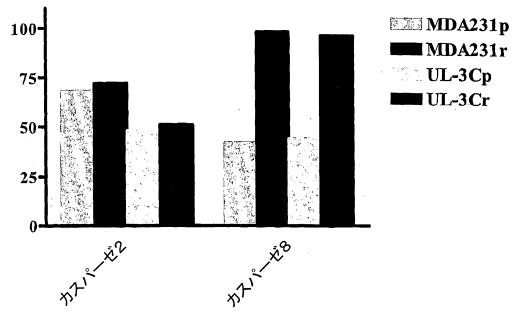


図12E

【 図 1 2 F 】

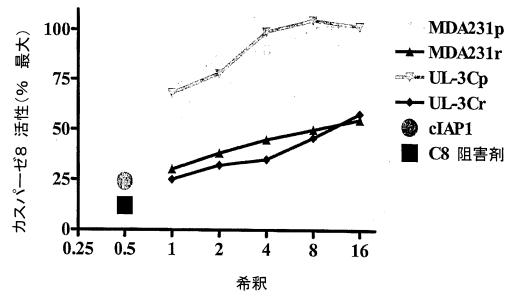


図12F

【 図 1 3 A 】

SGIHSGATTTAPS (SEQ ID NO:18) B-カドヘリン
 SVPPSPSGSQASSPQSS (SEQ ID NO:19) グリコーゲンシンターゼ
 SSFGSRSDSRGKSSFFSDRGS (SEQ ID NO:20) pDx3

図13A

【 図 1 3 B 】

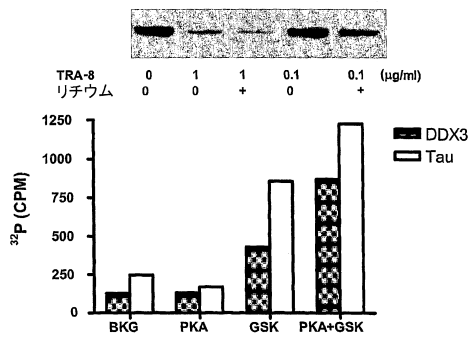


図13B

【 図 1 3 D 】

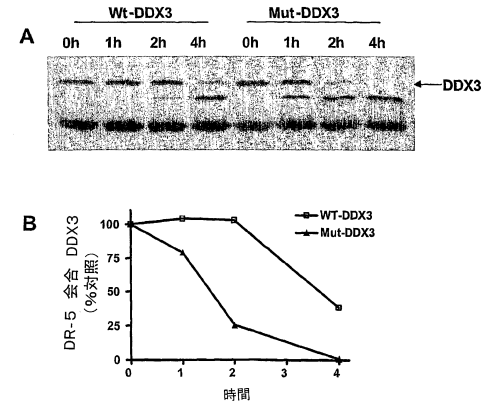


図13D

【 図 1 3 C 】

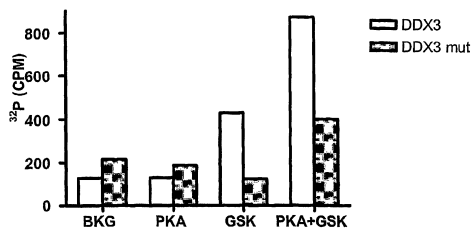


図13C

【配列表】

0005752587000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 キンバリー, ロバート ピー.
アメリカ合衆国 アラバマ 35243, バーミンガム, マグノリア リッジ 2045

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 特表2002-502590(JP,A)
Molecular Medicine, 2002, Vol.8, No.11, p.725-732
J. Immunol., 1998, Vol.161, p.2195-2200
Trends Mol. Med., 2001, Vol.7, No.5, p.191-194
Blood, 2000, Vol.96, No.12, p.3900-3906
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, Vol.99, No.2, p.637-642
J. Biol. Chem., 1998, Vol.273, No.10, p.5841-5845

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/00-1/70
G01N 33/53
MEDLINE/BIOSIS(STN)
PubMed
Thomson Innovation

专利名称(译)	涉及降低对凋亡诱导的死亡受体激动剂的抗性的试剂和方法		
公开(公告)号	JP5752587B2	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	JP2011284044	申请日	2011-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	UAB研究基金会		
申请(专利权)人(译)	该Yuebi研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	该Yuebi研究基金会		
[标]发明人	チヨウトン キンバリー口バートピー		
发明人	チヨウ, トン キンバリー, 口バート ピー.		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/04 C12Q1/25 G01N33/53 C07K16/28		
CPC分类号	A61K39/39558 A61K2039/505 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/2878 C07K16/40 C07K2317/34 G01N33/574 G01N33/6863 G01N2333/70578 G01N2333/7151 G01N2333/914 G01N2500/02 G01N2800/44 Y02A50/412 A61K2300/00 C12Q1/6886 G01N33/57492		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/04 C12Q1/25 G01N33/53.Y C07K16/28 A61K37/02 A61K38/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.105 A61P43/00.111 A61P43/00.121 C07K14/525 C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.P C12N15/09.Z C12N5/00.101 C12N5/00.202.A C12N5/071 C12N5/10 C12Q1/02 C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA11 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QX01 4B065/AA93X 4B065/AC12 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA20 4C084/AA24 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C084/ZC202 4C084/ZC422 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/CC22 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA14 4H045/DA51 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
审查员(译)	铃木隆行		
优先权	60/649437 2005-02-02 US		
其他公开文献	JP2012090636A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供逆转或预防靶细胞对死亡受体激动剂的抗性的方法，筛选对死亡受体激动剂具有抗性的生物标志物并监测对死亡受体激动剂的抗性的方法，选择性诱导靶细胞凋亡的方法治疗患有癌症，自身免疫疾病或炎症疾病的受试者，包括施用本文提供的组合物，和包含调节含CARD蛋白质的药剂的组合物。解决方案：公开了一种用于将抗性生物标志物上的细胞筛选至死亡受体激动剂的方法，包括监测死亡受体和包括CARD的蛋白质的关联的过程，其中所述结合意指对激动剂的抗性。

(21) 出願番号	特願2011-284044 (P2011-284044)	(73) 特許権者	506387487
(22) 出願日	平成23年12月26日 (2011.12.26)		ザ ユーエービー リサーチ ファンデーション
(62) 分割の表示	特願2007-554179 (P2007-554179)		の分割
原出願日	平成18年1月31日 (2006.1.31)		アメリカ合衆国 アラバマ 35294-0107, バーミンガム, セカンド
(65) 公開番号	特開2012-90636 (P2012-90636A)		アベニュー サウス 1720, アドミニストレーション ビルディング 770
(43) 公開日	平成24年5月17日 (2012.5.17)	(74) 代理人	100113402
審査請求日	平成23年12月27日 (2011.12.27)		弁理士 前 直美
(31) 優先権主張番号	60/649,437	(72) 発明者	チョウ, トン
(32) 優先日	平成17年2月2日 (2005.2.2)		アメリカ合衆国 アラバマ 35226, バーミンガム, ウェスト ストーンブルック プレイス 332
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く