

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4242913号
(P4242913)

(45) 発行日 平成21年3月25日 (2009. 3. 25)

(24) 登録日 平成21年1月9日 (2009. 1. 9)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/24 (2006. 01)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)C O 7 K 16/24 Z N A
C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 4 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2008-43360 (P2008-43360)
 (22) 出願日 平成20年2月25日 (2008. 2. 25)
 (62) 分割の表示 特願平10-529045の分割
 原出願日 平成9年12月22日 (1997. 12. 22)
 (65) 公開番号 特開2008-133302 (P2008-133302A)
 (43) 公開日 平成20年6月12日 (2008. 6. 12)
 審査請求日 平成20年3月18日 (2008. 3. 18)
 (31) 優先権主張番号 60/059, 978
 (32) 優先日 平成8年12月23日 (1996. 12. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 08/813, 509
 (32) 優先日 平成9年3月7日 (1997. 3. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/064, 671
 (32) 優先日 平成9年10月14日 (1997. 10. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591123609
 イミュネックス・コーポレーション
 IMMUNEX CORPORATION
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9132
 0-1799, サウザンド・オークス, ワ
 ン・アムジェン・センター・ドライブ
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠武
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TNFスーパーファミリーのメンバーであるNF-KAPPABの受容体アクティベーターに対するリガンド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) SEQ ID NO: 13 に示されているアミノ酸配列の全部又は一部のアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ここにおいて、当該アミノ酸配列は、アミノ酸1とアミノ酸162の間のアミノ酸(アミノ酸1およびアミノ酸162を含む)からなる群から選択されるアミノ末端と、アミノ酸313とアミノ酸317の間のアミノ酸(アミノ酸313およびアミノ酸317を含む)からなる群から選択されるカルボキシ末端を有し、そして、当該ポリペプチドはSEQ ID NO: 6 からなるRANKポリペプチドに結合可能である、上記ポリペプチド; および

(b) SEQ ID NO: 13 のアミノ酸1-317、SEQ ID NO: 13 のアミノ酸162-317、SEQ ID NO: 13 のアミノ酸1-313、またはSEQ ID NO: 13 のアミノ酸162-313のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸の欠失、挿入又は置換を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、そして、当該ポリペプチドはSEQ ID NO: 6 からなるRANKポリペプチドに結合可能である、上記ポリペプチド、
 からなる群から選択される、

ここにおいて、SEQ ID NO: 11 からなるマウスポリペプチドに免疫反応性の抗体を除く、

RANKLポリペプチドに免疫反応性の抗体。

【請求項 2】

10

20

(a) SEQ ID NO: 13 に示されているアミノ酸配列の全部又は一部のアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ここにおいて、当該アミノ酸配列は、アミノ酸 69 とアミノ酸 162 の間のアミノ酸 (アミノ酸 69 およびアミノ酸 162 を含む) からなる群から選択されるアミノ末端と、アミノ酸 313 とアミノ酸 317 の間のアミノ酸 (アミノ酸 313 およびアミノ酸 317 を含む) からなる群から選択されるカルボキシ末端を有し、そして、当該ポリペプチドは SEQ ID NO: 6 からなる RANK ポリペプチドに結合可能である、上記ポリペプチド; および

(b) SEQ ID NO: 13 のアミノ酸 69 - 317、または SEQ ID NO: 13 のアミノ酸 69 - 313 のアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸の欠失、挿入又は置換を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、そして、当該ポリペプチド質は SEQ ID NO: 6 からなる RANK ポリペプチドに結合可能である、上記ポリペプチド

10

からなる群から選択される、

ここにおいて、SEQ ID NO: 11 からなるマウスポリペプチドに免疫反応性の抗体を除く、

RANKL ポリペプチドに免疫反応性の抗体。

【請求項 3】

SEQ ID NO: 13 からなる RANKL ポリペプチドに免疫反応性の抗体であって、SEQ ID NO: 11 からなるマウスポリペプチドに免疫反応性の抗体を除く、前記抗体。

20

【請求項 4】

モノクローナル抗体である、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の属する技術分野

本発明は、概してサイトカインの分野、より明確には免疫調節活性を有するサイトカイン受容体 / リガンド対に関連している。

【背景技術】

【0002】

30

発明の背景

免疫系が効率的に機能するには、免疫系が自己抗原にではなく外来抗原に対して反応できるということを確実にするために、細胞増殖および分化と細胞死の間の微妙なバランスが必要である。免疫および炎症応答を調節する過程に絶対に必要なのは、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体 / 神経増殖因子受容体スーパーファミリーの多様なメンバーである (Smith et al., Science 248:1019; 1990)。この受容体ファミリーには、2つの異なる TNF 受容体 (I 型および II 型; 上記 Smith et al.; および Schall et al., Cell 61:361, 1990)、神経増殖因子受容体 (Johnson et al., Cell 47:545, 1986)、B 細胞抗原 CD40 (Stamenkovic et al., EMBO J. 8:1403, 1989)、CD27 (Camerini et al., J. Immunol. 147:3165, 1991)、CD30 (Durkop et al., Cell 68:421, 1992)、T 細胞抗原 OX40 (Mallett et al., EMBO J. 9:1063, 1990)、ヒト Fas 抗原 (Itoh et al., Cell 66:233, 1991)、マウス 4-1 BB 受容体 (Kwon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1963, 1989) および アポトーシス誘導受容体 (AIR; USSN 08/720,864、1996 年 10 月 4 日出願) と呼ばれる受容体が含まれる。

40

【0003】

CD40 は、B リンパ球、上皮細胞およびいくつかのカルシノーマ細胞株上に存在する受容体で、活性化 T 細胞上に見いだされるリガンド、CD40L (USSN 08/249,189、1994 年 5 月 24 日出願) と相互作用する。このリガンド / 受容体対の相互作用は細胞性および液性免疫応答の両方に必須である。CD40 を介したシグナル伝達は、この分子の細胞質ドメインが TNF 受容体関連因子 (TRAFs; Baker and Reddy, Oncogene 12:1, 1996) のメンバーと結合する

50

ことにより伝達される。TRAF3をコードする遺伝子の標的破壊によりTRAF3発現を欠いたマウスが、出生時には正常であるように見えるものの、進行性低血糖症および末梢白血球減少を起こし、およそ10日齢までに死亡することが最近明らかになった (Xu et al., *Immunity* 5:407, 1996)。TRAF3^{-/-} B細胞は機能的には正常であるように見えるが、TRAF3^{-/-} 胎児肝細胞にて再構成したキメラマウスの免疫応答はCD40欠失マウスの免疫応答に似ている。

【0004】

シグナル伝達におけるTRAF3の決定的な役割は、例えばT細胞上に存在するCD30あるいはCD27などの、TNF受容体スーパーファミリーの他のメンバーのひとつと相互作用することにある可能性がある。あるいは、TRAF3と相互作用し、出生後の発育にもそして有能な免疫系の発達にも重要な役割を果たす、この受容体ファミリーのまだ同定されていないメンバーとして、別のものが存在する可能性がある。TNF受容体スーパーファミリーのさらなるメンバーを同定すると、免疫および炎症応答を調節するさらなる方法が提供されるであろうし、ほ乳類における出生後の発育になお一層の洞察が提供される可能性もある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

発明の概要

本発明は、TNFスーパーファミリーのメンバーである、RANK (NF- κ Bの受容体アクティベーターとして) と呼ばれる新規受容体に対するカウンター構造、あるいはリガンドを提供する。このリガンドは、RANKLと呼ばれるが、約50アミノ酸以下の細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび約240から250アミノ酸の細胞外ドメインを有する2型膜貫通タンパク質である。RANKLは、属するTNFファミリーの他のメンバーと同様に、膜貫通ドメインと受容体結合ドメインの間に、受容体結合には必要でない「スパーサー」領域を有する。それゆえ、RANKLの可溶型は、全細胞外ドメインあるいは、その受容体結合領域を含む断片を含み得る。

【0006】

RANKは、TNFRスーパーファミリーのメンバーである、616アミノ酸残基を有するI型膜貫通タンパク質であって、TRAF3と相互作用する。RANKおよび膜結合RANKLの過剰発現、共発現により、あるいは可溶性RANKLまたはRANKに対する拮抗抗体によりRANKを刺激すると、免疫系の細胞内で最も広範に利用されているユビキタスな転写因子である、転写因子NF- κ Bがアップレギュレーションされるという結果になる。

【0007】

本発明のこれらおよび他の観点は、以下の発明の詳細な説明を参照すれば明らかになるだろう。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の詳細な説明

CD40といくらかの類似性を有する予想オープンリーディングフレームを持つ、新規部分cDNAインサートを、ヒト骨髄由来樹状細胞 (DC) から作製されたcDNAの配列情報を含むデータベース内で同定した。このインサートを、全長cDNAを含むDC cDNAライブラリーから作製したコロニープロットにハイブリダイズさせるのに用いた。コロニーハイブリダイゼーションを数回行い、2つのクローン (SEQ ID NO:1および3) を単離した。SEQ ID NO:5は、SEQ ID NO:1および3のオーバーラップする配列の対応に基づいて予想された、全長タンパク質のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

【0009】

RANKはTNF受容体スーパーファミリーのメンバーで、CD40と細胞外領域において最も近密に似ている。CD40と同様に、RANKは (実質的にはRothe et al., *Cell* 83:1243, 1995に記載の、共免疫沈降アッセイにより求められたように) TRAF2およびTRAF3と結合する。TRAF類は免疫および炎症応答の調節において決定的に重要である。それらとTNF受容体スー

10

20

30

40

50

パーファミリーの様々なメンバーとの結合を介し、シグナルは細胞へと伝達される。そのシグナルは、どの受容体（類）が刺激されるかおよびどのTRAF（類）が受容体（類）と結合するかに応じて、細胞の増殖、分化あるいはアポトーシスという結果をもたらす；様々なシグナリングイベントの協調を介して異なるシグナルが細胞へと伝達され得る。したがって、このファミリーのひとつのメンバーを介して伝達されるシグナルは、細胞に伝達される他のシグナル、および／または細胞の分化段階に応じて、増殖の、分化のまたはアポトーシスのものであり得る。この増殖／アポトーシス経路のこのように精妙な調節は、病原体に対する防御を発達そして維持するのに必要であり；バランスが崩れると、自己免疫疾患をおこす可能性がある。

【 0 0 1 0 】

10

RANKは上皮細胞、いくつかのB細胞株上、および活性化T細胞上に発現している。しかし、活性化T細胞上での発現は遅く、活性化から約4日後である。この発現の時間推移は、既知のアポトーシス作用物質であるFasの発現と一致する。RANKは抗アポトーシスシグナルとして作用し、CD40がすると知られているように、RANKを発現している細胞をアポトーシスから救う可能性がある。あるいは、やはりCD40と同様に、RANKは適切な状況でアポトーシスシグナルを強める可能性がある。RANKおよびそのリガンドは、免疫および炎症応答の調節において絶対に必要な役割を果たしているようである。

【 0 0 1 1 】

さらに、TRAF3遺伝子を標的破壊したマウスが出生後に致死であることは、この分子が免疫応答においてのみならず発生においても重要であることを示している。TRAF3と結合するタンパク質としてRANKを、さらにそのリガンドであるRANKLを単離することにより、このシグナリング経路をさらに明確にすること、および自己免疫および／または炎症性疾患の領域に用いる診断および様式の開発ができるだろう。

20

【 0 0 1 2 】

DNA、タンパク質および類似体

本発明は、単離RANKLポリペプチドおよび、天然の分子が示す活性を有するその類似体（またはムテイン（変異タンパク質、muten））（すなわち、細胞上に発現しているかあるいは表面に固定されているRANKに、あるいはRANKL特異的な抗体に、特異的に結合するRANKLムテイン；RANKを介してRANKリガンドが誘導するシグナリングを阻害する、それらの可溶体）を提供する。そのようなタンパク質は、内在性の物質の混入が実質上なく、任意に、天然型のグリコシレーションを受けていない。本発明の範囲内にあるRANKLの誘導体には、生物活性を保持している、本来のタンパク質の様々な構造上の形も含まれる。イオン化され得るアミノ基およびカルボキシル基が存在するために、例えばRANKLタンパク質は酸性または塩基性塩の形である可能性があるか、あるいは中性の形である可能性がある。個々のアミノ酸残基は、酸化または還元によっても修飾し得る。一次アミノ酸構造は、グリコシル基、脂質、リン酸、アセチル基などの他の化学機能基と共有または集合共役体を形成することにより、あるいはアミノ酸配列の変異を作ることにより、修飾し得る。共有誘導体は、特定の官能基をアミノ酸側鎖またはN-あるいはC-末端で結合させることにより調製する。

30

【 0 0 1 3 】

40

RANKLの誘導体は、システインおよびリジン残基にM-マレイミドベンゾイルスクシンイミドエステルおよびN-ヒドロキシスクシンイミドなどの架橋剤を作用させることによって得ることができる。本発明のタンパク質は、臭化シアン活性化、ビスオキシラン活性化、カルボニルジイミダゾール活性化またはトシル活性化したアガロース構造などの様々な不溶性基質に反応性のある側基を介して、あるいはポリオレフィン表面に吸着（グルタルアルデヒド架橋あり、あるいは無しで）により、共有結合している可能性もある。いったん基質に結合したら、これらのタンパク質は、そのタンパク質に対してまたはRANKLに類似の他のタンパク質に対して作製した抗体や、RANKLまたはその相同体に結合する他のタンパク質に選択的に結合させる（アッセイまたは精製の目的で）のに用い得る。

【 0 0 1 4 】

50

RANKLの可溶体も本発明の範囲内である。RANKLのヌクレオチド配列および予想されるアミノ酸配列をSEQ ID NO:10および12(それぞれマウスおよびヒト)に示す。コンピューター解析により、RANKLは2型膜貫通タンパク質であること;マウスRANKLは予想される、48アミノ酸の細胞内ドメイン、21アミノ酸の膜貫通ドメインおよび247アミノ酸の細胞外ドメインを含み、ヒトRANKLは予想される、47アミノ酸の細胞内ドメイン、21アミノ酸の膜貫通ドメインおよび249アミノ酸の細胞外ドメインを含むことが示された。

【0015】

可溶性RANKLには、シグナルペプチドおよび細胞外ドメインあるいはその断片が含まれる。典型的なシグナルペプチドはSEQ ID NO:9に示すものであり;他のシグナル(またはリーダー)ペプチドはこの技術分野では十分に知られており、マウスインターロイキン-7またはヒト成長ホルモンのものを含む。RANKLは、膜貫通ドメインと受容体結合領域の間に、生物活性には必要ないとみられるアミノ酸の領域を有する点でTNFファミリーの他のメンバーと類似しており;これは‘スパーサー’領域と呼ばれている。アミノ酸配列の対応付けにより、受容体結合領域はヒトRANKLのおよそアミノ酸162からおよそアミノ酸317まで(SEQ ID NO:10のマウスRANKLのアミノ酸139から294に相当する)であり、このファミリーの多くのメンバーの間で保存されているAla残基で始まっている(SEQ ID NO:12のアミノ酸162)。

【0016】

さらに、細胞外ドメインの断片はRANKLの可溶体をも提供するだろう。当業者は、実際の受容体結合領域はコンピューター解析により予想されたものとは異なり得るということを理解するだろう。したがって、可溶性RANKLのN-末端アミノ酸は、保存されたAla残基の両側約5個のアミノ酸内にあると予想される。あるいは、スパーサー領域の全部または一部が可溶性RANKLのN-末端に含まれる可能性があり、もし得られる可溶性RANKLが膜結合でないとすれば、膜貫通および/または細胞内ドメインの全部または一部であり得る。したがって、可溶性RANKLは、SEQ ID NO:12のアミノ酸1から162(SEQ ID NO:10の1から139)からなる群から選択されるN-末端アミノ酸を有するだろう。好ましくは、アミノ末端のアミノ酸は、SEQ ID NO:12のアミノ酸69から162の間にある(ヒトRANKL;SEQ ID NO:10のアミノ酸48から139に相当する)。同様に、カルボキシ末端のアミノ酸は、SEQ ID NO:12のアミノ酸313から317の間にある(ヒトRANKL;SEQ ID NO:10のアミノ酸290から294に相当する)。当業者は、これらおよびさらに別の可溶体をごく普通の実験法により調製することができる。

【0017】

断片は、細胞外領域の望みの部分を単離するという既知の手法を用いて調製することができ、例えば細胞外領域をTNFファミリー(RANKLはそのメンバーである)の他のメンバーのものと比較し、他のファミリーメンバーに関して調製されたものと類似した形を選択することにより調製することができる。あるいは、発現させ、活性を解析することができる、多数の短縮形を調製するのに、この技術分野で既知の、独特の制限酵素認識部位またはPCRの手法を用いることができる。

【0018】

本発明の範囲内にあるRANKLタンパク質の他の誘導体には、例えばN-末端またはC-末端融合体として組換え体培養にて合成することによる、タンパク質またはそれらの断片と他のタンパク質またはポリペプチドの共有または集合共役体が含まれる。例えば、共役させたペプチドは、翻訳と同時にあるいは翻訳後に、そのタンパク質を合成部位から細胞膜または細胞壁の中または外の機能部位へと運ぶのを指示する、タンパク質のN末端領域のシグナル(またはリーダー)ポリペプチド配列であり得る(例えば、酵母-因子リーダー)。

【0019】

タンパク質融合体は、RANKLタンパク質および相同体の精製または同定を容易にするために加えられたペプチド(例えば、ポリ-Hisなど)を含み得る。本発明のタンパク質のアミノ酸配列は、Hoppiら(Bio/Technology 6:1204 (1988))に記載されているような同定

10

20

30

40

50

ペプチドに結合している可能性もある。このように非常に抗原性のあるペプチドは、特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現させた組換え体タンパク質の迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。Hoppらの配列は、ウシ粘膜エンテロキナーゼにより特異的に切断されもし、精製したタンパク質からペプチドを除くことが可能になる。このようなペプチドによりキャップされた融合タンパク質は、大腸菌内における細胞内分解にも耐性であり得る。

【 0 0 2 0 】

融合タンパク質には、免疫グロブリンFc領域に結合したRANKLのアミノ酸配列がさらに含まれる。典型的なFc領域は、SEQ ID NO:8に示すアミノ酸配列を有するヒトIgG₁である。Fc領域の断片も、Fcμテインも用い得る。例えば、Fc領域のヒンジ領域内の特定の残基は、Fc RIへの高親和性結合に決定的である。CanfieldおよびMorrison (J. Exp. Med. 173:1483; 1991) は、Leu₍₂₃₄₎ およびLeu₍₂₃₅₎ がU937細胞上に存在するFc RIへのIgG₃の高親和性結合に決定的であったと報告した。同様の結果がLundら (J. Immunol. 147:2657, 1991; Molecular Immunol. 29:53, 1991) により得られた。このような変異は、単独または組合わさって、IgG₁Fc領域内に作られ、FcRに対するIgG₁の親和性を減少させることができる。用いたFc領域の部分に応じて、融合タンパク質は鎖内ジスルフィド結合の形成によって二量体として発現し得る。融合タンパク質が抗体の重鎖および軽鎖の両方により作られている場合は、4つものRANKL領域にてタンパク質オリゴマーを形成することができる。

【 0 0 2 1 】

もう一つの態様において、RANKLタンパク質には、ロイシンジッパードメインのようなオリゴマー化ペプチドがさらに含まれる。ロイシンジッパーはもともと数個のDNA結合タンパク質内に同定されたものである (Landschulz et al., Science 240:1759, 1988)。ロイシンジッパードメインは、タンパク質の二量化の要因となる、これらの (および他の) タンパク質内に存在する保存されたペプチドドメインを呼ぶのに使われる用語である。ロイシンジッパードメイン (本明細書中ではオリゴマー化ドメイン、あるいはオリゴマー形成ドメインとも呼ぶ) は、他のアミノ酸の間に散在する4または5個のロイシン残基を持つ、反復される7個の繰り返しを含む。ロイシンジッパードメインの例には、酵母転写因子GCN4およびラット肝内に見いだされる熱安定DNA結合タンパク質 (C/EBP; Landschulz et al., Science 243:1681, 1989) 内に見いだされるものがある。2つの核形質転換タンパク質、fosおよびjunも、ロイシンジッパードメインを示しており、マウスプロトオンコジーンであるc-mycの遺伝子産物も同様である (Landschulz et al., Science 240:1759, 1988)。核オンコジーンfosおよびjunの産物には、選択的にヘテロ二量体を形成するロイシンジッパードメインが含まれる (O' Shea et al., Science 245:646, 1989; Turner and Tjian, Science 243:1689, 1989)。ロイシンジッパードメインは、これらのタンパク質において生物活性 (DNA結合) に必要である。

【 0 0 2 2 】

パラミクソウイルス、コロナウイルス、麻疹ウイルスおよび多くのレトロウイルスを含む数種の異なるウイルスの紡錘形成 (fusogenic) タンパク質も、ロイシンジッパードメインを有する (Buckland and Wild, Nature 338:547, 1989; Britton, Nature 353:394, 1991; Delwant and Mosialos, AIDS Research and Human Retroviruses 6:703, 1990)。これらの紡錘形成ウイルスタンパク質内のロイシンジッパードメインは、そのタンパク質の膜貫通領域の近くにあり、ロイシンジッパードメインは紡錘形成タンパク質のオリゴマー構造に寄与し得るということが示唆されてきた。紡錘形性ウイルスタンパク質のオリゴマー化は、融合孔形成に関与している (Spruce et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:3523, 1991)。ロイシンジッパードメインは熱ショック転写因子のオリゴマー化に役割を果たすと、最近報告された (Rabindran et al., Science 259:230, 1993)。

【 0 0 2 3 】

ロイシンジッパードメインは短い、平行高次コイルとして折りたたまれている (O' Shea et al., Science 254:539; 1991)。平行高次コイルの一般的な構造は、Crickにより19

10

20

30

40

50

53年に提唱された (Acta Crystallogr. 6:689) “穴中ノブ (knobs-into-holes)” パッキングを含め、十分に特徴が分かっている。ロイシンジッパードメインにより形成される二量体は、McLachlanおよびStewartの意見 (J. Mol. Biol. 98:293; 1975) にしたがって (abcdefg)_nと表される7個の繰り返しによって安定化されており、その中で残基aおよびdは一般的に疎水性残基であり、dはロイシンであり、らせんの同じ面上に一直列に並んでいる。逆に荷電した残基は、一般に位置gおよびeに現れる。したがって、2つのらせん状のロイシンジッパードメイン間で形成される平行高次コイルにおいては、第1のらせんの疎水性側鎖によって形成される“ノブ (knobs)”が、第2のらせんの側鎖間に形成される“穴 (holes)”内に詰められている。

【0024】

位置dのロイシン残基は、大きな疎水性安定化エネルギーに寄与しており、二量体形成に重要である (Krystek et al., Int. J. Peptide Res. 38:229, 1991)。Lovejoyらは最近、らせんが上-上-下に走行する3本鎖 -らせん束の合成を報告した (Science 259:1288, 1993)。彼らの研究により、らせん単量体から高次コイルを形成するための主な駆動力を、疎水性安定化エネルギーが提供するということが確認された。これらの研究は、静電相互作用が高次コイルの化学量論および結合構造に寄与することも示している。

【0025】

いくつかの研究により、二量化する能力の減少は最小限にしたまま、保存されたアミノ酸で個々のロイシン残基を置換し得るが；複数の交換はたいていこの能力を失わせるということが示されている (Landshulz et al., Science 243:1681, 1989; Turner and Tjian, Science 243:1689, 1989; Hu et al., Science 250:1400, 1990)。van Heekerenらは、多数の異なるアミノ酸残基でGCN4のロイシンジッパードメイン内のロイシン残基を置換し得ることを報告し、さらに、2つのロイシン置換を含むいくつかのGCN4タンパク質は活性が弱かったことを見いだした (Nucl. Acids Res. 20:3721, 1992)。麻疹ウイルス融合タンパク質 (MVF) のロイシンジッパードメインの最初および二番目の7個のロイシンの変異はシンシチウム形成 (ウイルスにより誘導される細胞融合の尺度) に影響しなかったが；4個すべてのロイシン残基の変異は融合を完全に阻害した (Buckland et al., J. Gen. Virol. 73:1703, 1992)。どの変異も、MVFの四量体形成能には影響しなかった。

【0026】

GCN4ロイシンジッパードメインに相当する合成ペプチドのaおよびd残基におけるアミノ酸置換は、そのロイシンジッパードメインのオリゴマー化特性を変えることがわかった (Alber, Sixth Symposium of Protein Society, San Diego, CA)。位置aにあるすべての残基をイソロイシンに変えても、ロイシンジッパーは依然として平行な二量体を形成する。この変換に加えて、位置dにあるすべてのロイシン残基もイソロイシンに変えると、得られたペプチドは溶液中で自然に三量体の平行高次コイルを形成する。位置dにあるすべてのアミノ酸をイソロイシンで、位置aはロイシンで置換すると、四量化するペプチドが得られる。これらの置換を含むペプチドを、それでもロイシンジッパードメインと呼ぶ。

【0027】

本発明には、天然型のグリコシレーションを持つあるいは持たないRANKLも含まれる。酵母あるいは例えばCOS-7細胞などのほ乳類発現系に発現させたタンパク質は、その発現系に応じて、分子量およびグリコシレーションのパターンの点で、天然の分子と同様であるかあるいはわずかに異なり得る。本発明のタンパク質をコードするDNAを大腸菌などの細菌に発現させると、グリコシレーションされていない分子が提供される。不活性化されたN-グリコシレーション部位を有する、RANKLタンパク質の機能的な変異類似体を、オリゴヌクレオチド合成およびライゲーションにより、あるいは部位特異的な変異誘発手法により作製し得る。これらの類似体タンパク質を、酵母発現系を用いて収率よく、均質な還元糖の形で作出し得る。真核生物のタンパク質中のN-グリコシレーション部位は、アミノ酸三つ組みAsn-A₁-Zを特徴とし、ここでA₁はPro以外のあらゆるアミノ酸であり、ZはSerまたはThrである。この配列において、アスパラギンは糖の共有結合のための側鎖アミノ基を提供する。Asnあるいは残基Zを別のアミノ酸で置換すること、AsnまたはZを削除する

10

20

30

40

50

こと、またはA₁とZの間にZではないアミノ酸を、あるいはAsnとA₁の間にAsn以外のアミノ酸を挿入することにより、このような部位を除去することができる。

【0028】

RANKLタンパク質誘導体は、天然のRANKLまたはそのサブユニットの変異によっても得ることができる。本明細書中で呼ぶようなRANKL変異タンパク質とは、天然のRANKLタンパク質に相同なポリペプチドのことだが、ひとつまたは多数の欠失、挿入または置換のために、天然のタンパク質とは異なるアミノ酸配列を有する。変異ペプチドをコードするDNA内に作られたあらゆる変異の影響は、変異ペプチドがそのカウンター構造に特異的に結合する能力を分析することにより容易に決定し得る。さらに、RANKL類似体、ムテインまたは誘導体の活性は、本明細書中に記載のあらゆるアッセイ（例えば、NF- κ B活性化の誘導など）により求めることができる。

10

【0029】

本発明のタンパク質の類似体は、例えば、残基または配列の様々な置換を作ること、あるいは生物活性に必要ではない、末端または内部の残基または配列を欠失させることにより構築し得る。例えば、システイン残基は、復元の際の間違った分子内ジスルフィド架橋の形成を防ぐために欠失させるかあるいは他のアミノ酸と置き換えることができる。変異誘発への他のアプローチは、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母系における発現を増強するために、近接した二塩基性アミノ酸残基を修飾することを伴う。

【0030】

欠失または挿入戦略を採用する場合は、欠失または挿入が生物活性に対して与え得る影響を考慮しなければならない。本発明のタンパク質のサブユニットは、末端または内部の残基あるいは配列を欠失させることにより構築し得る。RANKLの可溶体は迅速に調製でき、NF- κ B活性化を誘導する能力について試験することができる。細胞質領域に相当するポリペプチドおよびその断片（例えば、デスドメインなど）は、同様の手法により調製し得る。作り得る変異の型に関するさらなる手引きは、RANKLの配列と、同様の構造を有するタンパク質との比較によっても、本発明のRANKLタンパク質の構造解析を行うことによっても提供される。

20

【0031】

一般的に、置換は保存的に行わなければならない；すなわち、アミノ酸の最も好ましい置換とは、RANKLの生物活性（すなわち、本発明のタンパク質の対応する天然のタンパク質に対する抗体に実質上同等に結合する能力、天然のタンパク質と実質上同様にカウンター構造に結合する能力、RANKLシグナルを誘導する能力、あるいはNF- κ B活性化を誘導する能力）に影響しないような置換である。保存的な置換の例には、結合ドメイン外のアミノ酸置換（細胞外ドメインについてはリガンド/受容体または抗体の結合領域、あるいは細胞質ドメインについては他の細胞内タンパク質と相互作用する領域のいずれか）、および天然のタンパク質の二次および/または三次構造を変えないようなアミノ酸置換が含まれる。別の例には、ある脂肪族残基を別のものと、例えばIle、Val、Leu、またはAlaなどを互いに置換すること、あるいはある極性残基を別のものと、例えばLysとArg、GluとAsp、またはGlnとAsnの間で置換することが含まれる。例えば同様の疎水性特性を有する領域全体の置換などの、他のこのような保存的な置換が十分に知られている。

30

40

【0032】

類似体タンパク質またはその断片を発現するために構築されたヌクレオチド配列内の変異は、コーディング配列の読み枠相を当然保存していなければならない、好ましくは、ハイブリダイズして、mRNAの翻訳に不都合に影響するであろうループまたはヘアピンなどのmRNA二次構造を作り得るような相補的な領域を作り出さないだろう。

【0033】

RANKLタンパク質またはその断片をコードするヌクレオチド配列内のすべての変異が最終産物に発現されるわけではなく、例えば、ヌクレオチド置換は、発現を増強するために、主として転写されたmRNA内の二次構造ループを避けるために（本明細書中で参考文献として援用しているEPA 75,444A参照）、あるいは、例えば有名な大腸菌は大腸菌発現用の

50

コドンを含む大腸菌など、選択した宿主によってより迅速に翻訳されるコドンを提供するために作られ得る。

【0034】

変異部位はあらかじめ決めることができるが、変異の性質それ自体があらかじめ決められている必要はない。例えば、変異の最適な性質について選択するために、無作為な変異誘発を行うことができ、望ましい活性を求めて、発現された変異タンパク質をスクリーニングする。変異配列を含み、天然配列の断片とのライゲーションを可能にする制限酵素認識部位に隣接するようなオリゴヌクレオチドを合成することにより、変異を特定の位置に導入し得る。ライゲーションの後、得られた再構築された配列は、望みのアミノ酸挿入、置換、あるいは欠失を有する類似体をコードしている。

10

【0035】

あるいは、必要な置換、欠失、または挿入にしたがって改変された特定のコドンを含む改変遺伝子を提供するために、オリゴヌクレオチド特異的部位特異的変異誘発の手順を用いることができる。上に示す改変を行う典型的な方法はWalderら (Gene 42:133, 1986) ; Bauerら (Gene 37:73, 1985) ; Craikら (BioTechniques, January 1985, 12-19) ; Smithら (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981) ; によって開示されており、アメリカ合衆国特許番号4,518,584および4,737,462は適切な手法を開示し、本明細書中で参考文献として援用されている。

【0036】

本発明のタンパク質のさらなる態様には、RANKLをコードするDNA配列に、適度に厳しい条件下 (5 X SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0) というプレ洗浄溶液および50 、5 X SSC、一晩というハイブリダイゼーション条件) で、あるいは、より好ましくは厳しい条件下 (例えば、6 X SSC中、63 で一晩ハイブリダイゼーション ; 3 X SSC中、55 で洗浄) で、SEQ ID NO:10または12のDNAにハイブリダイズすることができるDNAによりコードされるRANKLポリペプチド、およびRANKLをコードする配列と縮重した他の配列が含まれる。一態様においては、RANKLポリペプチドは、SEQ ID NO:10および12に示す天然のRANKLタンパク質のアミノ酸配列と、アミノ酸配列の点で少なくとももおよそ70%同一である。好ましい態様においては、RANKLポリペプチドは、RANKLの天然型とアミノ酸配列の点で少なくとももおよそ80%同一であり、最も好ましいポリペプチドは天然のRANKLと少なくとももおよそ90%同一なものである。

20

30

【0037】

パーセント同一性は、例えばDevereuxら (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) によって記載され、ウイスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ (UWCGC) から入手可能なGAPコンピュータープログラムなどのコンピュータープログラムを用いて求め得る。RANKLタンパク質由来の断片に関しては、同一性は断片内に存在するRANKLタンパク質の部分に基づいて算出する。

【0038】

RANKL類似体またはムテインの生物活性は、類似体またはムテインの、例えば本明細書中の実施例に記載の転写活性化などの、RANKを介するシグナルを誘導する能力を調べることにより求め得る。あるいは、例えば、天然のRANKLに結合する抗体またはRANKLの可溶体を用いた酵素免疫アッセイまたはドットプロットなどの適切なアッセイを、RANKL類似体またはムテインの活性を評価するのに用い得る。適切なアッセイには、例えば、RANKLペプチドまたはムテインの、RANKを発現している細胞に結合する能力、および/またはその結果の生物効果を測るアッセイも含まれる。そのような方法はこの技術分野では十分に知られている。

40

【0039】

RANKLヌクレオチド配列の断片も有用である。一態様において、そのような断片は、本明細書中に開示するRANKL DNAの少なくとも約17個の連続したヌクレオチドを、好ましくは少なくとも約25個のヌクレオチドを、より好ましくは少なくとも30個の連続したヌクレオチドを含む。そのような断片のDNAおよびRNA相補体は、SEQ ID NO:10および12のRANKL

50

DNAの一本鎖および二本鎖型の両方、および前記ポリペプチドをコードするものとあわせて、本明細書中に提供されている。RANKL DNAの断片は、一般的に少なくとも約17個のヌクレオチドを、好ましくは約17から約30個のヌクレオチドを含む。そのような核酸断片（例えば、RANKLの細胞外ドメインに対応するプローブなど）は、プローブとしてあるいはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）におけるプライマーとして用いる。

【0040】

プローブは、*in vitro*アッセイにおいて、そしてノーザンおよびサザンブロットのような手順において、RANKL核酸の存在を検出するのにも利用できる。RANKLを発現している細胞の種類も同様に同定し得る。そのような手順は十分に知られており、当業者は目的とする特定の適用に応じて適切な長さのプローブを選択し得る。PCRに関しては、常法を用い

10

、目的のRANKL DNA配列の末端に対応する5'および3'プライマーを使用してその配列を増幅する。

【0041】

RANKL核酸の他の有用な断片は、目的とするRANKL mRNA（センス）またはRANKL DNA（アンチセンス）配列に結合できる一本鎖核酸配列（RNAまたはDNAのいずれか）を含む、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドである。あるタンパク質についてcDNA配列に基づいてアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを作り出せるということは、例えばSteinとCohen（Cancer Res. 48:2659, 1988）およびvan der Krolら（BioTechniques 6:958, 1988）に記載されている。

【0042】

20

DNA、タンパク質および類似体の使用

本明細書中に記載のRANKL DNA、タンパク質および類似体には、薬剤組成物の調製を含め、非常に多くの利用法があるだろう。例えば、RANKLの可溶体はRANKを介したシグナルを伝達するのに有用であろう。RANKL組成物（タンパク質とDNAの両方）は、RANKLに対する、RANKへの結合を阻害するものと阻害しないものとの両方の抗体の開発にも有用であろう。本発明のDNAは、組換え体タンパク質の発現に、そしてRANKL転写物の存在または分布の解析（定量的または定性的のいずれか）のためのプローブとして有用である。

【0043】

本発明のタンパク質は、例えば患者標本において、可溶性RANKまたはRANKLを検出する、あるいはRANKに関連した活性を測定するのに用いるキットを調製するのに有用であろう。RANKLタンパク質は、他の試料または組成物におけるRANKに関連した活性を測定するのにも利用されるだろうし、この活性のアンタゴニストまたは模倣体（例えば、相互作用をそれぞれ阻害または模倣するペプチドまたは小分子）のスクリーニングの際にも必要である。様々なアッセイ形式が、ELISA、ドットブロット、固相結合アッセイ（バイオセンサーを用いるものなど）、迅速な形式のアッセイおよびパイオアッセイを含む（しかしそれらに限定はされない）、そのようなキットに有用である。

30

【0044】

本発明にしたがって精製されたRANKLは、RANKの阻害物質、そしてそれゆえ炎症応答の阻害物質（NF- κ B活性化の阻害を介する）の発見を容易にするだろう。可能性のある阻害物質のスクリーニングにおいて精製RANKLポリペプチドを利用することは重要であり、混入物との妨害反応の可能性を事実上消し得る。そのようなスクリーニングアッセイには、RANKLの細胞外ドメインかその断片のいずれかを利用し得る。ある分子の阻害活性の検出は典型的には、RANKに結合しRANKLの結合を阻害できる分子を検出するためのスクリーニングアッセイにおいて細胞外ドメイン由来のRANKLの可溶体を使用することを伴う。

40

【0045】

加えて、RANKLポリペプチドは、構造に基づいたRANKL阻害物質の設計にも使用できる。そのような構造に基づいた設計は、“合理的な薬剤設計”としても知られている。RANKLポリペプチドは、例えばX線結晶学、核磁気共鳴あるいは相溶性モデリングなどによって三次元的に解析することができ、それらすべてが有名な方法である。阻害物質の設計を助けるために分子モデリングソフトウェアシステムにRANKL構造情報を利用することも、本

50

発明に包含される。そのようなコンピューターに助けられたモデリングおよび薬剤設計は、化学配座解析、分子の静電ポテンシャル、タンパク質折りたたみなどといった情報を利用し得る。本発明の特定の方法には、基質の結合しそうな部位に関してRANKLの三次元構造を解析すること、予想反応部位を結合している新規の分子を合成すること、およびその新規分子を上記のようにアッセイすることが含まれる。

【0046】

さらに、本明細書中の実施例に示すように、RANKLの可溶体は樹状細胞（DC）の成熟を誘導するのに、そしてそれらの同種異系刺激能を増強するのに有用であろう。したがって、RANKLタンパク質は免疫応答を増大させるのに有用であろうし、ex vivo（すなわち、個体からDCなどの細胞を得て、それらをex vivoで抗原およびサイトカインにさらし、それらを個体に再び投与すること）、あるいはin vivo（すなわち、液性および/または細胞性免疫を増大させるであろうワクチンアジュバントとして）のいずれかにおいて、それらの目的のために用い得る。RANKLはTGF β の存在下でT細胞の生存率を促進するのににも有用であろうし、それは免疫応答を調節するのににも役立つだろう。

【0047】

組換え体RANKLの発現

本発明のタンパク質は好ましくは、RANKLタンパク質またはその類似体をコードするDNA配列を組換え体発現ベクターに挿入し、そのDNA配列を発現を促進する条件下、組換え体発現系で発現させることによる、組換え体DNAの手法によって作出する。本発明により提供されるタンパク質をコードするDNA配列は、cDNA断片および短いオリゴヌクレオチドリンカーから、あるいは一連のオリゴヌクレオチドから、組換え体発現ベクターに挿入し組換え体転写単位内で発現できるような合成遺伝子を提供するように組み立てることができる。

【0048】

組換え体発現ベクターには、ほ乳類、微生物、ウイルスあるいは昆虫遺伝子に由来する適切な転写または翻訳調節要素に制御可能なように結合した、RANKLあるいはその相同体、ムテインまたは生物学的に同等な類似体をコードする合成またはcDNA由来のDNA断片が含まれる。そのような調節要素には、以下に詳細に記載する、転写プロモーター、転写を制御するためのオプシオンのオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、および転写および翻訳の終結を制御する配列が含まれる。通常は複製の開始点によって与えられる、宿主内で複製する能力および、形質転換体の識別を容易にするための選択遺伝子を、さらに取り入れ得る。

【0049】

DNA領域は、それらが互いに機能的に関連している場合には、制御可能なように結合される。例えば、ポリペプチドの分泌に係する前駆体として発現する場合には、シグナルペプチド（分泌リーダー）に対するDNAをポリペプチドに対するDNAに制御可能なように結合させ；その配列の転写を制御する場合は、プロモーターをコーディング配列に、制御可能なように結合させ；あるいは翻訳できるように配置されている場合には、リボソーム結合部位をコーディング配列に、制御可能なように結合させる。一般的に、制御可能なように結合させるとは隣接しているということを、そして分泌リーダーの場合は、隣接しており読み枠にあっていうことを意味する。微生物に発現させる、RANKL、あるいはその相同体または類似体をコードするDNA配列は好ましくは、DNAのmRNAへの転写を成熟前に終結させ得るイントロンを含まないだろう。

【0050】

細菌利用に有用な発現ベクターは、選択マーカーおよび、有名なクローニングベクターpBR322（ATCC 37017）の遺伝要素を含む商業的に入手可能なプラスミドに由来する、細菌の複製開始点を含み得る。そのような商業用ベクターには、例えばpKK223-3（Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden）およびpGEM1（Promega Biotec, Madison, WI, USA）が含まれる。これらのpBR322“骨格”部分が、適切なプロモーターおよび発現させるべき構造配列と連結されている。大腸菌は、一般的には大腸菌種由来のプラスミドである（Bo

livar et al., Gene 2:95, 1977) pBR322の誘導体を用いて形質転換される。pBR322には、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性のための遺伝子が含まれ、それゆえ形質転換された細胞を同定する簡単な手段を提供する。

【0051】

組換え体微生物発現ベクターに一般的に用いられるプロモータには、 β -ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）およびラクトースプロモーター系（Chang et al., Nature 275:615, 1978; およびGoeddel et al., Nature 281:544, 1979）、トリプトファン（trp）プロモーター系（Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980; およびEPA 36,776）およびtacプロモーター（Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p.412, 1982）が含まれる。特に有用な細菌発現系は、ファージ P_L プロモーターおよびcl857ts熱不安定性リプレッサーを用いている。 P_L プロモーターの誘導体を取り入れている、American Type Culture Collectionから入手可能なプラスミドベクターには、大腸菌株JMB9中に含まれるプラスミドpHUB2（ATCC 37092）および大腸菌RR1中に含まれるpPLc28（ATCC 53082）が含まれる。

【0052】

酵母ベクターにおいて適切なプロモーター配列は、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, 1980）あるいは、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼなどの他の解糖酵素（Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; およびHolland et al., Biochem. 17:4900, 1978）に対するプロモーターを含む。酵母発現に用いる適切なベクターおよびプロモーターは、R. HitzemanらのEPA 73,657にさらに記載されている。

【0053】

好ましい酵母ベクターは、大腸菌における選択および複製用のpBR322由来のDNA配列（Amp^r遺伝子および複製開始点）と、グルコース抑制性ADH2プロモーターおよび β -因子分泌リーダーを含む酵母DNA配列を用いて組み立て得る。ADH2プロモーターはRussellら（J. Biol. Chem. 258:2674, 1982）およびBeierら（Nature 300:724, 1982）によって記載されている。異種のタンパク質の分泌を導く酵母 β -因子リーダーは、プロモーターと発現させるべき構造遺伝子の間に挿入され得る（例えばKurjan et al., Cell 30:933, 1982; およびBitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330, 1984などを参照のこと）。リーダー配列は、その3'末端の近くで、リーダー配列の外来遺伝子との融合を容易にするためにひとつまたはそれ以上の有用な制限酵素認識部位を含むように修飾し得る。

【0054】

脊椎動物細胞の形質転換に用いられる発現ベクター内の転写および翻訳調節配列は、ウイルス起源から提供され得る。例えば、一般的に用いられるプロモーターおよびエンハンサーは、ポリオーマ、アデノウイルス2、シミアンウイルス40（SV40）、およびヒトサイトメガロウイルスに由来する。例えば、SV40開始点、早期および後期プロモーター、エンハンサー、スプライス、およびポリアデニル化部位などの、SV40ウイルスゲノム由来のDNA配列は、異種のDNA配列の発現に必要な他の遺伝的要素を提供するために用いられ得る。早期および後期プロモーターは、両者ともSV40ウイルス複製起点をも含む断片としてウイルスから容易に得られるため（Fiers et al., Nature 273:113, 1978）特に有用である。ウイルス複製起点に位置する、Hind III部位からBgl I部位まで広がるおよそ250 bpの配列が含まれるならば、より小さなあるいは大きなSV40断片をも用い得る。さらに、ウイルスゲノムプロモーター、調節および/またはシグナル配列を、そのような調節配列が選んだ宿主細胞と適応するならば、用い得る。典型的なベクターは、OkayamaおよびBerg（Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983）によって開示されているように構築し得る。

【0055】

C127マウス乳上皮細胞におけるほ乳類受容体cDNAの安定な高レベルの発現に有用な系は

10

20

30

40

50

、Cosmanら (Mol. Immunol. 23:935, 1986) によって記載されているようにして実質的に構築することができる。RANKL DNAの発現に関して好ましい真核細胞ベクターは、pDC406 (McMahan et al., EMBO J. 10:2821, 1991) と呼ばれ、SV40、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、およびエプスタイン-バーウイルス (EBV) 由来の調節配列を含む。他の好ましいベクターには、pDC409およびpDC410が含まれるが、それらはpDC406に由来する。pDC410は、EBV複製開始点をSV40ラージT抗原をコードする配列で置換することによりpDC406から得た。pDC409は、マルチクローニング部位の外のBgl II制限酵素認識部位が欠失されて、マルチクローニング部位内のBgl II部位が唯一のものになっているという点でpDC406とは異なる。

【 0 0 5 6 】

EBV複製開始点を含むpDC406およびpDC409などの発現ベクターを染色体外複製させる有用な細胞株は、CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478) である。CV-1/EBNA細胞株は、CV-1細胞株にエプスタイン-バーウイルス核抗原-1 (EBNA-1) をトランスフェクトすることにより得られたもので、ヒト CMV即時早期エンハンサー/プロモーターから駆動されるEBNA-1を構成的に発現している。

【 0 0 5 7 】

宿主細胞

形質転換された宿主細胞は、組換え体DNAの手法を用いて構築された発現ベクターで形質転換または形質導入された細胞であり、それは本発明のタンパク質をコードする配列を含む。形質転換された宿主細胞は、目的のタンパク質 (RANKL、あるいはその相同体または類似体) を発現し得るが、本発明のDNAをクローニングまたは増幅する目的で形質転換された宿主細胞は、そのタンパク質を発現する必要はない。発現されたタンパク質は好ましくは、選択したDNAに応じて培養上清中に分泌されるであろうが、細胞膜内に置かれる可能性がある。

【 0 0 5 8 】

タンパク質の発現に適した宿主細胞には、適切なプロモーターの制御下にある原核細胞、酵母あるいは高等な真核細胞が含まれる。原核細胞には、例えば大腸菌またはバチルス種などのグラム陰性またはグラム陽性生物が含まれる。高等な真核細胞には、樹立されている、以下に記載のほ乳類起源の細胞株が含まれる。無細胞翻訳系を用い、本明細書中に開示するDNA構築物に由来するRNAを使用してタンパク質を生成することもできる。細菌の、菌類の、酵母のおよびほ乳類の細胞宿主とともに用いるための適切なクローニングおよび発現ベクターは、Pouwelsら (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985) に記載されており、それに関連した開示は本明細書中で参考文献として援用している。

【 0 0 5 9 】

原核細胞発現宿主を、RANKL、あるいは、大規模なタンパク質分解およびジスルフィドプロセッシングを必要としないその相同体または類似体の発現のために用い得る。原核細胞発現ベクターには一般的に、例えば、抗生物質耐性を与えるあるいは独立栄養体の要求性を補足するタンパク質をコードする遺伝子などの、表現型選択可能なマーカーをひとつまたはそれ以上と、さらに宿主によって認識されて宿主内での増幅を確実にする複製起点が含まれる。選択の問題として他のものも用い得るが、形質転換に適した原核細胞宿主には、大腸菌、Bacillus subtilis、Salmonella typhimurium、およびPseudomonas、Streptomyces、およびStaphylococcus属の中の様々な種が含まれる。

【 0 0 6 0 】

組換え体RANKLは、好ましくはS. cerevisiaeのようなSaccharomyces種由来の酵母宿主に発現させることもできる。PichiaまたはKluyveromycesのような他の属の酵母も用い得る。酵母ベクターは一般的には、2 μ 酵母プラスミド由来の複製起点または自律的に複製する配列 (ARS)、プロモーター、そのタンパク質をコードするDNA、ポリアデニル化および転写終結のための配列および選択遺伝子を含むだろう。好ましくは、酵母ベクターには複製開始点および、例えば大腸菌のアンプシリン耐性遺伝子およびトリプトファン中で増

10

20

30

40

50

殖する能力を欠いた酵母の変異系統を選択するマーカーを提供する*S. cerevisiae* trp1遺伝子などの、酵母と大腸菌の両方の形質転換ができる選択可能なマーカー、そして下流の構造配列の転写を誘導する非常に発現する酵母遺伝子由来のプロモーターが含まれるだろう。酵母宿主細胞ゲノム内のtrp1損傷の存在は、トリプトファン非存在下での増殖により形質転換を検出するための効果的な環境を提供する。

【0061】

適切な酵母形質転換のプロトコールは当業者には知られており、典型的な手法は、0.67%酵母窒素塩基、0.5%カザミノ酸、2%グルコース、10 µg/mlアデニンおよび20 µg/mlウラシルを含む選択培地中でTrp⁺形質転換体を選択するというもので、Hinnenら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978) に記載されている。ADH2プロモーターを含むベクターで形質転換した宿主系統は、発現のために80 µg/mlアデニンおよび80 µg/mlウラシルを補充した1%酵母抽出物、2%ペプトン、および1%グルコースを含む、栄養に富んだ培地中で培養し得る。ADH2プロモーターの抑制解除は培地グルコースが枯渇した時に起こる。粗酵母上清を濾過によって回収し、さらなる精製の前に4 に置いた。

【0062】

様々なほ乳類または昆虫細胞培養系を用いて組換え体タンパク質を発現させ得る。昆虫細胞内で異種のタンパク質を産生するためのバキュロウイルス系は、LuckowとSummers (Bio/Technology 6:47 (1988)) によって総説されている。適したほ乳類宿主細胞株の例には、Gluzman (Cell 23:175, 1981) により記載されているサル腎細胞のCOS-7株、および例えばCV-1/EBNA (ATCC CRL 10478)、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)、HeLaおよびBHK細胞株などを含む、適切なベクターを発現し得る他の細胞株が含まれる。ほ乳類発現ベクターは、複製開始点、発現させるべき遺伝子に連結した適切なプロモーターおよびエンハンサーなどの非転写要素、および他の5'または3' 隣接非転写配列、そして、必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与および受容部位、および転写終結配列などの5'または3' 非翻訳配列を含み得る。

【0063】

組換え体RANKLの精製

適した宿主/ベクター系を培養して本発明のDNAの組換え体翻訳産物を発現させ、それから培養培地または細胞抽出物から精製することにより、精製されたRANKL、およびその相同体または類似体を調製する。例えば、組換え体タンパク質を培養培地中に分泌するような系の上清を最初に、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon 限外濾過ユニットなどの商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルターを用いて濃縮し得る。

【0064】

濃縮段階の後、濃縮物を適切な精製基質に適用し得る。例えば、適したアフィニティーマトリックスは、適切な担体に結合したカウンター構造タンパク質またはレクチンまたは抗体分子を含み得る。あるいは、例えば張り出したジエチルアミノエチル (DEAE) 基を有するマトリックスまたは基質など、陰イオン交換樹脂を用い得る。マトリックスはアクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースあるいはタンパク質精製に一般的に用いられる他の種類のものであり得る。あるいは、陽イオン交換の段階を用い得る。適切な陽イオン交換体には、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含む様々な不溶性マトリックスが含まれる。スルホプロピル基が好ましい。ゲル濾過クロマトグラフィーも、本発明のタンパク質を精製する手段を提供する。

【0065】

アフィニティークロマトグラフィーは、RANKLおよびその相同体を精製する、特に好ましい方法である。例えば、免疫グロブリンFc領域を含む融合タンパク質として発現させたRANKLは、プロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製し得る。さらに、オリゴマー化ジッパードメインを含むRANKLタンパク質は、オリゴマー化ジッパードメインに特異的な抗体を含む樹脂にて精製し得る。RANKLタンパク質に対するモノクローナル抗体も、この技術分野で十分知られている方法を用いることにより、アフィニティークロマトグラフィー精製に有用であり得る。リガンドも、RANKLのアフィ

ニティー精製用のアフィニティマトリックスを調製するのに用い得る。

【0066】

最終的に、例えば張り出したメチルあるいは他の脂肪族基を有するシリカゲルなどの疎水性RP-HPLC媒体を用いた、1回あるいはそれ以上の逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）段階を、RANKL組成物をさらに精製するのに用い得る。上述の精製段階のいくつかまたはすべては、様々な組み合わせで、同種の組換え体タンパク質を提供するのに用い得る。

【0067】

細菌培養中に産生された組換え体タンパク質は、通常は細胞沈渣の最初の抽出物により単離され、続いて1回またはそれ以上の濃縮、塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィーの段階を行う。最後に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を最終精製段階に用い得る。組換え体タンパク質の発現に用いた細菌細胞は、凍結-融解の繰り返し、音波処理、機械による破壊、あるいは細胞可溶化剤の使用を含む、都合のよいあらゆる方法により破壊し得る。

【0068】

本発明のタンパク質を分泌タンパク質として発現する酵母の発酵は、精製を非常に簡単にする。大規模な発酵から得られる分泌組換え体タンパク質は、Urdal ら（J. Chromatog. 296:171, 1984）により開示されているものと類似の方法によって精製し得る。この参考文献では、分離用HPLCカラム上で組換え体ヒト GM-CSFを精製するための2つの連続した逆相HPLC段階を記載している。

【0069】

組換え体培養中で合成されるタンパク質は、培養物から本発明のタンパク質を回収するのにとる精製段階に応じた量および性質の、タンパク質を含む細胞構成成分の存在を特徴とする。これらの構成成分は、通常は酵母、原核細胞またはヒト以外の高等な真核細胞起源のものであるが、好ましくは、重量で約1パーセント以下のオーダーの、特に害のない混入量で存在する。さらに、組換え体細胞培養により本発明のタンパク質を、起源となる種において天然に見いだされるのと同様に正常ではこのタンパク質と結合し得るような他のタンパク質を含まずに産生することができる。

【0070】

RANKL組成物の使用および投与

本発明は、効果的な量のタンパク質および適切な希釈剤およびキャリアーを含む治療組成物の使用方法、そして免疫または炎症応答を調節する方法を提供する。RANKLを可溶性サイトカイン受容体またはサイトカイン、あるいは他の免疫調節分子と組み合わせることも企図している。

【0071】

治療利用については、適応症に適した方法で治療するために精製タンパク質を患者、好ましくはヒトに投与する。例えば、免疫機能を調節するために投与されるRANKLタンパク質組成物を、ボラス注射、連続注入、インプラントからの持続放出、または他の適切な手法により与え得る。典型的には、治療剤は、精製RANKLを生理的に許容可能なキャリアー、賦形剤または希釈剤と組み合わせる形で投与されるだろう。そのようなキャリアーは、用いる用量および濃度ではレシピエントに対して無毒だろう。

【0072】

一般的には、そのようなタンパク質組成物の調製は、本発明のタンパク質を緩衝剤、アスコルビン酸などの抗酸化剤、低分子量（約10残基以下）ポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、グルコース、スクロースまたはデキストリンを含む糖、EDTAなどのキレート剤、グルタチオンおよび他の安定化剤および賦形剤と混ぜることを必要とする。中性緩衝生理食塩水または同種の血清アルブミンと混ぜた生理食塩水は、典型的な適切な希釈剤である。好ましくは、適切な賦形剤溶液（例えばスクロース）を希釈剤として用いた凍結乾燥品として産物を製剤化する。適切な投与量は試行により決定しうる。投与の量および頻度は、当然ながら、治療される適応症の性質および厳しさ、目的とする応答、患者の状態など

の要因に依存するだろう。

【 0 0 7 3 】

本明細書中で示すように、RANKLは免疫系において重要である様々な細胞に対して有益な効果を有する。したがって、RANKLをワクチンアジュバントとして、あるいは例えば流行感染症などにおける免疫応答をアップレギュレートするための治療剤として個体に投与し得る。さらに、NF- κ Bは、TNF- α または化学療法によって誘導される細胞のアポトーシス死を防ぐ防御機能を果たすことが見いだされた。したがって、RANKのアゴニスト（すなわち、RANKLおよび拮抗抗体）はRANK発現細胞を、化学療法の負の効果または敗血症などで起こる高レベルのTNF- α の存在（すなわち、Barinaga, Science 274 " 724, 1996、および同じ号のScienceの782および784ページのBegとBaltimoreおよびWangらによる論文を参照のこと）から守るのに有用であるだろう。

10

【 0 0 7 4 】

本発明の態様

本発明は以下の態様を含む。

1 . (a) SEQ ID NO:10に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であって、0アミノ酸1とアミノ酸139の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるアミノ末端と、アミノ酸290とアミノ酸294の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるカルボキシ末端を有するものをコードするDNA ;

(b) SEQ ID NO:12に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であって、アミノ酸1とアミノ酸162の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるアミノ末端と、アミノ酸313とアミノ酸317の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるカルボキシ末端を有するものをコードするDNA ;

20

(c) 厳しい条件下で(a)または(b)のDNAとのハイブリダイゼーションが可能で、かつ生物学的に活性なRANKLをコードするDNA分子 ; および

(d) (a)、(b)または(c)のDNAによってコードされるタンパク質の断片をコードするDNA分子 ;

からなる群から選択される、単離されたDNA。

【 0 0 7 5 】

2 . SEQ ID NO:10および12に示す天然型のRANKLとアミノ酸配列が少なくとも約70%同一であるRANKLポリペプチドをコードする、態様 1 の単離されたDNA。

30

3 . 可溶性RANKLポリペプチドをコードする、態様 1 の単離されたDNA。

【 0 0 7 6 】

4 . 可溶性RANKLポリペプチドをコードする、態様 2 の単離されたDNA。

5 . (a) SEQ ID NO:10に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であって、アミノ酸48とアミノ酸139の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるアミノ末端と、アミノ酸290とアミノ酸294の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるカルボキシ末端を有するものをコードするDNA ;

(b) SEQ ID NO:12に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であって、アミノ酸69とアミノ酸162の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるアミノ末端と、アミノ酸313とアミノ酸317の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるカルボキシ末端を有するものをコードするDNA ;

40

(c) 厳しい条件下で(a)または(b)のDNAとのハイブリダイゼーションが可能で、かつ生物学的に活性なRANKLをコードするDNA分子 ; および

(d) (a)、(b)または(c)のDNAによってコードされるタンパク質の断片をコードするDNA分子 ;

からなる群から選択される、可溶性RANKLをコードする単離されたDNA。

【 0 0 7 7 】

6 . 免疫グロブリンFcドメイン、免疫グロブリンFcドメインムテイン、FLAGTMタグ、少なくとも約6個のHis残基を含むペプチド、ロイシンジッパー、およびそれらの組み合わせ、からなる群から選択されるポリペプチドをコードするDNAをさらに含む、態様 5 の単

50

離されたDNA。

【 0 0 7 8 】

- 7 . 態様 1 に記載のDNA配列を含む組み換え体発現ベクター。
- 8 . 態様 2 に記載のDNA配列を含む組み換え体発現ベクター。
- 9 . 態様 3 に記載のDNA配列を含む組み換え体発現ベクター。

【 0 0 7 9 】

- 1 0 . 態様 4 に記載のDNA配列を含む組み換え体発現ベクター。
- 1 1 . 態様 5 に記載のDNA配列を含む組み換え体発現ベクター。
- 1 2 . 態様 6 に記載のDNA配列を含む組み換え体発現ベクター。

【 0 0 8 0 】

- 1 3 . 態様 7 に記載の発現ベクターで形質転換または形質導入した宿主細胞。
- 1 4 . 態様 8 に記載の発現ベクターで形質転換または形質導入した宿主細胞。
- 1 5 . 態様 9 に記載の発現ベクターで形質転換または形質導入した宿主細胞。

【 0 0 8 1 】

- 1 6 . 態様 1 0 に記載の発現ベクターで形質転換または形質導入した宿主細胞。
- 1 7 . 態様 1 1 に記載の発現ベクターで形質転換または形質導入した宿主細胞。
- 1 8 . 態様 1 2 に記載の発現ベクターで形質転換または形質導入した宿主細胞。

【 0 0 8 2 】

1 9 . RANKLの発現および回収を促進する条件下で態様 1 3 に記載の宿主細胞を培養することを含む、RANKLタンパク質の製造方法。

2 0 . RANKLの発現および回収を促進する条件下で態様 1 4 に記載の宿主細胞を培養することを含む、RANKLタンパク質の製造方法。

【 0 0 8 3 】

2 1 . RANKLの発現および回収を促進する条件下で態様 1 5 に記載の宿主細胞を培養することを含む、RANKLタンパク質の製造方法。

2 2 . RANKLの発現および回収を促進する条件下で態様 1 6 に記載の宿主細胞を培養することを含む、RANKLタンパク質の製造方法。

【 0 0 8 4 】

2 3 . RANKLの発現および回収を促進する条件下で態様 1 7 に記載の宿主細胞を培養することを含む、RANKLタンパク質の製造方法。

2 4 . RANKLの発現および回収を促進する条件下で態様 1 8 に記載の宿主細胞を培養することを含む、RANKLタンパク質の製造方法。

【 0 0 8 5 】

2 5 . SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:12のDNAの断片である、少なくとも約17ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチド、少なくとも約25ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチド、および少なくとも約30ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドからなる群から選択される、単離されたDNA。

【 0 0 8 6 】

2 6 . (a) SEQ ID NO:11に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、アミノ酸1とアミノ酸139の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるアミノ末端と、アミノ酸290とアミノ酸294の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるカルボキシ末端を有するもの；

(b) SEQ ID NO:13に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、アミノ酸1とアミノ酸162の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるアミノ末端と、アミノ酸313とアミノ酸317の間のアミノ酸すべてからなる群から選択されるカルボキシ末端を有するもの；

(c) 厳しい条件下で(a)または(b)のタンパク質をコードするDNAとのハイブリダイゼーションが可能であるDNAによりコードされ、かつ生物学的に活性なRANKLポリペプチド；および

(d) 生物学的に活性な、(a)、(b)または(c)のポリペプチドの断片；

10

20

30

40

50

からなる群から選択される、単離されたRANKLポリペプチド。

【0087】

27. SEQ ID NO:11または13と少なくとも約80%同一であるアミノ酸配列を有する、態様26のタンパク質。

28. 可溶性RANKLである、態様27に記載のタンパク質。

【0088】

29. 可溶性RANKLである、態様26に記載のタンパク質。

30. 免疫グロブリンFcドメイン、免疫グロブリンFcドメインムテイン、FLAGTMタグ、少なくとも約6個のHis残基を含むペプチド、ロイシンジッパー、およびそれらの組み合わせ、からなる群から選択されるペプチドをさらに含む、可溶性RANKLタンパク質。

10

【0089】

31. 態様26のRANKLポリペプチドと免疫反応性のある抗体。

32. モノクローナル抗体である、態様31の抗体。

33. 樹状細胞(DC)の生存を促進し、DCを成熟させる条件下で、DC上のCD1b/c発現量を減少させるのに十分な量のRANKLポリペプチドとCD1a⁺DCを接触させることを含む、DCの成熟を誘導する方法。

【0090】

34. 樹状細胞(DC)の生存を促進し、DCをT細胞に対して抗原を提示するようにさせる条件下で、混合リンパ球反応(MLR)におけるDCの同種異系刺激能を上昇させるのに十分な量のRANKLポリペプチドとCD1a⁺DCを接触させることを含む、DCの同種異系刺激能を増強する方法。

20

【0091】

35. TGF 非存在下でT細胞の生存を促進し、T細胞をT細胞寛容に感化させる条件下で、TGF の存在下で生存能を維持しているT細胞の数を増加させるのに十分な量のRANKLポリペプチドと、TGF にさらされたT細胞を接触させることを含む、TGF 存在下でT細胞の生存を促進する方法。

【実施例】

【0092】

以下の実施例は説明として提供されているのであって、限定のために提供されたものではない。当業者は、実施例に包含される本発明の変形物を、とりわけ本明細書中に引用している様々な参考文献の手法に照らして作ることができるということを理解するだろうし、それらの開示は参考文献として援用している。

30

【0093】

実施例1

本実施例では、TNF受容体スーパーファミリーの新規メンバーをコードするDNAの同定および単離を説明する。CD40(B細胞の増殖および分化に重要な役割を果たすことが示された、正常のおよび腫瘍性の両方のヒトB細胞の表面上に存在する細胞表面抗原; Stamenkovic et al., EMBO J. 8:1403, 1989)といくらかの類似性を有する予想オープンリーディングフレームを持った部分cDNAインサートを、ヒト骨髓由来の樹状細胞(DC)から作製されたcDNAの配列情報を含むデータベース内で同定した。このインサートを制限エンドヌクレアーゼ切断によってベクターから切り出し、ゲル精製し、³²Pにて標識して、これを用いて、より大きなcDNAインサートを含むDC cDNAライブラリーから作製したコロニープロットと、非常に厳しいハイブリダイゼーションおよび洗浄の手法(5 x SSC、50%ホルムアミド中、42 °で一晩ハイブリダイゼーション、0.5 x SSC中、63 °で洗浄)を用いてハイブリダイズさせ; 他の適切な非常に厳しい条件は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 1989), 9.52-9.55のSambrookらの中に開示されている。最初の実験では、9D-8A(SEQ ID NO:1)と名付けたクローンが得られ、続く解析により、このクローンが新規cDNAの5'最末端を除くすべてを含み、5'最末端に予想イントロン配列を有することが示された(SEQ ID NO:1のヌクレオチド1-92)。さらなるコロニーハイブリダイゼーションを行い、2つめのクロ

40

50

ーンを単離した。9D-15C (SEQ ID NO:3) と名付けた2つめのクローンは、イントロンの介在のない5'末端を含んでいたが、完全な3'末端を含んでいなかった。SEQ ID NO:5は、SEQ ID NO:1および3のオーバーラップする配列の対応付けに基づいて予想された全長タンパク質のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

【0094】

コードされるタンパク質は、NF- κ B受容体アクティベーターとしてRANKと名付けた。このcDNAは、616アミノ酸残基を有し、24アミノ酸予想シグナル配列(コンピューターで予想した切断部位はLeu24の後である)、188アミノ酸細胞外ドメイン、21アミノ酸膜貫通ドメイン、および383アミノ酸細胞質尾部を持った、予想1型膜貫通タンパク質をコードしている。RANKの細胞外領域はCD40と有意なアミノ酸相同性(38.5%同一性、52.3%類似性)を示した。pBluescript:huRANK(大腸菌DH10B内)と名付けた、ヒトRANK配列を含むクローニングベクター(pBluescriptSK⁺)を、ブダベスト条約の条件で1996年12月20日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MD(ATCC)に寄託し、受託番号98285を得た。

【0095】

実施例2

本実施例では、RANK/Fc融合タンパク質を発現するためのRANK DNA構築物の構築を説明する。ヒトIgG₁のFc領域と融合したRANK可溶体を、ほ乳類発現ベクターpDC409(USSN 08/571,579)にて構築した。この発現ベクターは、サイトメガロウイルス(CMV)のオープンリーディングフレームR27080(SEQ ID NO:9)のリーダー配列、それに続くRANKのアミノ酸33-213、それに続くFc受容体に対する親和性が減少している、ヒトIgG₁の定常ドメインの変異体(SEQ ID NO:8;融合タンパク質については、構築物のうちのFc部分はArg3からLys232までを含んでいた)をコードしている。RANKのアミノ酸1-213(天然のリーダー配列を用いる)、それに続くIgG₁ムテインを包含する別のベクターも調製した。両発現ベクターは、トランスフェクトした細胞内で高レベルにRANK/Fc融合タンパク質の発現を誘導することがわかった。

【0096】

RANK/Fcタンパク質を得るために、RANK/Fc発現プラスミドをCV-1/EBNA細胞にトランスフェクトし、上清を約1週間集める。RANK/Fc融合タンパク質を、例えば、製造者の推奨に従ってプロテインAセファロースカラムクロマトグラフィー(すなわち、Pharmacia, Uppsala, Sweden)によってなど、Fc融合タンパク質の精製についてこの技術分野では十分に知られている手段によって精製する。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析により、精製RANK/Fcタンパク質は還元剤の存在下では分子量約50kDaで、そして還元剤の非存在下では分子量約110kDaの位置に移動したことが示された。

【0097】

CMV R27080リーダーを用いて作られた精製タンパク質のN-末端アミノ酸配列を決定すると、Ala20の後で60%切断され、Pro22の後で20%切断され、そしてArg28の後で20%切断されることが示され(これはFurin切断部位であり、アミノ酸残基はSEQ ID NO:9と関連する);天然のリーダーにより発現させた融合タンパク質のN-末端アミノ酸を解析すると、Gln25の後で主に切断されることが示された(Gln25の後で80%、Arg23の後で20%であり、アミノ酸残基は全長RANKであるSEQ ID NO:6と関連する)。両融合タンパク質は、RANKに対するリガンドと特異的に結合することができ(すなわち、マウス胸腺腫細胞株EL4などの様々な細胞株の表面に結合した)、これはRANKのN-末端にさらにアミノ酸が存在してもRANKに結合する能力を妨害しないということを示している。さらに、アミノ酸33から始まるRANKをコードする、CMVリーダーを含む構築物、したがってArg23とPro33両方の間のアミノ酸にN-末端を有するRANKペプチドを、RANKに対するリガンドに特異的に結合できると予想される。

【0098】

TNF受容体スーパーファミリーの他のメンバーは、膜貫通ドメインとリガンド結合ドメインの間に「スパーサー」領域とよばれる、リガンド結合には必要ではないアミノ酸の領域を有する。RANKにおいては、196と213との間のアミノ酸は、このようなスパーサー領域

を形成すると予想される。したがって、この領域の中のアミノ酸で終わるRANK可溶体は、RANKのリガンドに対して特異的に結合する能力を保持していると予想される。可溶性RANKペプチドの好ましいC-末端アミノ酸は、スパーサー領域内の他のアミノ酸もC-末端として用いられ得るが、SEQ ID NO:6のアミノ酸213および196からなる群から選択される。

【0099】

実施例3

本実施例ではRANKに対するモノクローナル抗体の調製を説明する。例えば、精製組み換え体RANKの調製物、あるいはRANKを高レベルに発現するトランスフェクトされた細胞などが、アメリカ合衆国特許4,411,993に開示されているような常法を用いてRANKに対するモノクローナル抗体を作製するのに使用される。RANKをコードするDNAも、例えばImmunity 3:165, 1995でPardollおよびBeckerlegによって総説されているように、免疫原として用い得る。そのような抗体は、RANKが誘導するシグナリングを妨げるのに（アンタゴニストまたはブロック抗体）、あるいはRANKまたはRANK活性に関する診断上のあるいは研究上のアッセイの構成要素として、RANKを架橋することによってシグナルを誘導するのに（アゴニスト抗体）、あるいはRANKのアフィニティー精製に有用であるとみられる。

【0100】

齧歯類を免疫するために、RANK免疫原をアジュバント（完全または不完全フロイントアジュバント、ミョウバン、またはRibiアジュバントR700（Ribi, Hamilton, MT）といった他のアジュバントなど）にエマルジョン化し、例えばBALB/cマウスまたはLewisラットなど選択した齧歯類個体に10-100 µgの範囲の量を皮下投与する。DNAを皮内に（Raz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9519, 1994）あるいは筋肉内に（Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4156, 1993）投与することができ、生理食塩水がDNAをもとにした抗原に適した希釈剤であることが分かっている。10日から3週間後に、免疫した動物個体に免疫原を追加してブーストし、その後1週間ごと、2週間ごと、または3週間ごとの免疫日程で定期的にブーストする。

【0101】

ドットプロットアッセイ（抗体サンドイッチ）、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、免疫沈降、またはFACS解析を含めた他の適切なアッセイによる分析のために、眼窩後方放血または尾先端切断により血清試料を定期的に採取する。適切な抗体価の検出後、陽性の動物個体に生理食塩水に溶かした抗体を静脈内投与する。3から4日後、その動物個体を犠牲死させ、脾細胞を回収し、マウスミエローマ細胞株（例えばNS1、あるいは好ましくはAg 8.653 [ATCC CRL 1580]）と融合させる。この手順によって作製したハイブリドーマ細胞株を、複マイクロタイタープレートに、融合していない細胞、ミエローマ-ミエローマハイブリッド、および脾細胞-脾細胞ハイブリッドの増殖を阻害するための選択培地（例えば、ハイポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含むもの、すなわちHAT）中でまく。

【0102】

このように作製されたハイブリドーマクローンを、例えばEngvallら（Immunochem. 8:871 (1971)）およびアメリカ合衆国特許4,703,004によって開示されている手法を適用することにより、RANKとの反応性に関するELISAにてスクリーニングし得る。好ましいスクリーニング法は、Beckmanら（J. Immunol. 144:4212 (1990)）によって記載されている抗体捕捉法である。それから、陽性クローンを同系の齧歯類の腹腔内に投与して、高濃度（>1 mg/ml）の抗RANKモノクローナル抗体を含む腹水を作り出す。得られたモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿、続いてゲル排除クロマトグラフィーにより精製し得る。あるいは、プロテインAまたはプロテインGへの抗体の結合に基づいたアフィニティークロマトグラフィーも、RANKタンパク質への結合に基づいたアフィニティークロマトグラフィーも用い得る。

【0103】

RANK/Fc融合タンパク質を免疫原として用い、モノクローナル抗体を作製した。これらの試薬をスクリーニングして、RANKタンパク質に対する反応性を確認した。本明細書中に

記載の方法を、mAbの活性を測定するために用い、ブロッキング（すなわち、RANKに結合し、リガンドがRANKに結合するのを阻害する抗体）および非ブロッキング（すなわち、RANKに結合し、リガンド結合を阻害しない抗体）の両方を単離した。

【0104】

実施例4

本実施例では、293/EBNA細胞（ヒト CMV即時-早期エンハンサー/プロモーターに駆動されて構成的にエプスタイン-バーウイルス核抗原-1（ENBA-1）を発現する細胞株を、293細胞にENBA-1をコードする遺伝子をトランスフェクトすることによって得た）における、RANKによるNF- κ B活性の誘導を説明する。もともとYaoら（Immunity 3:811, 1995）によって記載されているように、NF- κ B活性の活性化を293/EBNA細胞内で測定した。核抽出物を調製し、NF- κ B結合部位にまたがる25塩基対オリゴヌクレオチドを用いたゲル遅延アッセイによりNF- κ B活性について解析した。DNAトランスフェクションの2日前に、200万個の細胞を10 cmディッシュにまき、2.5% FBS（ウシ胎児血清）を含むDMEM-F12培地中で培養した。DNAトランスフェクションを、IL-8プロモーター/レポーターアッセイに関して本明細書中で記載しているように行った。

【0105】

単離した核を400 mM NaClにて可溶化することにより、核抽出物を調製した（上記Yaoら）。NF- κ B結合部位を含むオリゴヌクレオチドを、アニールさせT4 DNAポリヌクレオチドキナーゼを用いて 32 Pにて末端標識した。移動度シフト反応物は、10 μ gの核抽出物、4 μ gのポリ(dI-dC)および15,000 cpm標識二本鎖オリゴヌクレオチドを含み、室温で20分間インキュベートした。得られたタンパク質-DNA複合体を、0.25 X Tris-ホウ酸-EDTAバッファー中、6%非変性ポリアクリルアミドゲル上で分離した。

【0106】

RANKの過剰発現の結果、放射活性のあるプローブの、ゲル上での移動度の適切なシフトが示すように、NF- κ B活性が誘導された。同様の結果は、RANKに結合して受容体を発現している細胞にシグナルを伝達するリガンドによってRANKを刺激した時に（すなわち、細胞にヒトRANKとマウスRANKL DNAを共トランスフェクトすることによる；以下の実施例7を参照）観察され、アゴニスト抗体によって刺激が行われた時に起こると予想された。

【0107】

実施例5

本実施例では、in vivoで遺伝子転写の活性化を解析するために用いる、ヒトインターロイキン-8（IL-8）プロモーターをもとにした遺伝子プロモーター/レポーターシステムを説明する。サイトカインインターロイキン-1（IL-1）または腫瘍壊死因子-アルファ（TNF- α ）によるヒトIL-8遺伝子転写の誘導は、無傷のNF- κ BとNF-IL-6転写因子結合部位に依存していることが知られている。サイトカイン応答性IL-8プロモーターを、マウスIL-4受容体（mIL-4R）をコードするcDNAと融合させると、トランスフェクトした細胞の細胞表面の異種受容体タンパク質（mIL-4R）を検出することにより、プロモーター活性化の測定が可能になる。

【0108】

ヒト腎上皮細胞（293/EBNA）に、1). レポーター/プロモーター構築物（pIL-8repと名付けた）および2). 目的のcDNA(s)、をコードするプラスミドをトランスフェクトした（DEAE/DEXTRAN法による）。空のベクターDNAを添加することによりDNA濃度を一定に保つ。293/EBNA細胞を、 2.5×10^4 細胞/ml（3 ml/穴）の密度で6穴プレートにまき、トランスフェクションの前に2日間インキュベートする。トランスフェクションの2日後、mIL-4受容体を、以下に説明する放射免疫アッセイ（RIA）により検出する。

【0109】

そのような一実験においては、293/EBNA細胞にRANKをコードするDNAとRANKLをコードするDNAを共トランスフェクトした（以下の実施例7を参照）。細胞によってこの受容体とそのカウンター構造が共発現される結果、RANKのシグナリング過程が活性化される。このような共トランスフェクション研究に関しては、DEAEトランスフェクション用のDNA濃度/穴

は以下の通りであった。すなわち、40 ngのpIL-8rep [pBluescriptSK⁺ベクター (Stratagene)] ; 0.4 ng CD40 (対照受容体であるCD40をコードするDNA ; pCDM8ベクター) ; 0.4 ng RANK (RANKをコードするDNA ; pDC409ベクター) および、1-50 ng CD40L (CD40のリガンドをコードするDNAで、CD40と共トランスフェクトされた場合には陽性の対照として、RANKと共トランスフェクトされた場合には陰性の対照として働く ; pDC304内) またはRANKL (RANKのリガンドをコードするDNA ; pDC406内) のいずれかであった。RANKをトランスフェクトした細胞を刺激することにより、可溶性RANKLあるいはRANKに対するアゴニスト抗体を用いて同様の実験を行い得る。

【0110】

mIL-4R特異的なRIAについては、mIL-4Rと反応性のあるモノクローナル抗体をChloramine T結合法により¹²⁵Iにて標識する。得られる比活性は典型的には 1.5×10^6 cpm/nmolである。48時間後、トランスフェクトされた細胞を培地 (DMEM/F12 5% FBS) で1回洗う。5% 脱脂乾燥乳を含む、あらかじめ暖めた結合培地を加え、37 °C /5% CO₂で組織培養インキュベーター内にて1時間インキュベートすることにより、非特異的な結合部位をブロックする。ブロッキング培地をデカントし、¹²⁵I抗mIL-4R (クローンM1 ; ラットIgG1) を含む結合バッファを細胞に加えて、室温で1時間、揺すりながらインキュベートする。細胞を放射標識した抗体とインキュベートした後、細胞を結合バッファ (2 X) にて大規模に、そしてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて2回洗う。細胞を1 mlの0.5M NaOHにて可溶化し、総放射活性をガンマカウンターで測定する。

【0111】

このアッセイを用い、RANKをコードするDNAを共トランスフェクトした293/EBNAは、細胞表面のmIL-4Rの検出によって示されるように、転写活性化を示した。RANKの過剰発現の結果、RANKLによるRANK刺激と同様に、mIL-4Rが転写された。RANKをアゴニスト抗体で刺激した場合に、同様の結果が観察される。

【0112】

実施例6

本実施例では、RANKとTRAFタンパク質の結合を説明する。RANKと細胞質TRAFタンパク質の相互作用を、もともとHsuら (Cell 84:299; 1996) によって説明されている共免疫沈降アッセイにより行った。簡潔に述べると、RANKおよびエピトープでタグ付けした (FLAG(R) ; SEQ ID NO:7) TRAF2またはTRAF3の合成を指示するプラスミドを、293/EBNA細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後に、表面タンパク質をビオチン-エステルにて標識し、細胞を0.5% NP40を含むバッファにて可溶化した。RANKおよびこの受容体に結合しているタンパク質を、抗RANKにて免疫沈降し、大規模に洗い、6-10% SDSポリアクリルアミドゲル上の電気泳動分離により分離し、ウエスタンブロット用のニトロセルロース膜に電気泳動で移した。TRAF2およびTRAF3タンパク質のRANKとの結合を、FLAG(R) エピトープを特異的に認識する抗体で膜をプローブすることにより可視化した。RANK発現がない場合には、TRAF2および3は抗RANKで免疫沈降されなかった。

【0113】

実施例7

本実施例では、直接的な発現クローニングによる、RANKLと名付けたRANKのリガンドの同定を説明する。このリガンドはもともと、1994年5月24日出願のUSSN 08/249,189 (その関連する開示は、参照により本明細書中で援用されている) に記載のようにCD40Lに対してクローニングされたものである。簡潔に述べると、ビオチン化したCD40/Fc融合タンパク質でFACS (蛍光活性化細胞分析分離装置) により5回ソーティングして得た、EL-40.5と名付けたマウス胸腺腫細胞株EL-4 (ATCC TIB 39) のクローンから、ライブラリーを調製した。標準的な方法論を用いてcDNAライブラリーを作製し、プラスミドDNAを単離して、DEAE-デキストラン法を用いてサブコンフルエントなCV-1EBNA細胞にトランスフェクトした。実施例2で調製したRANK/Fc融合タンパク質、続いて放射性ヨウ素と結合したヤギ抗ヒトIgG抗体を用いた2段階の結合方法を用い、RANKLの発現に関してスライドオートラジオグラフィにより形質転換体をスクリーニングした。

【 0 1 1 4 】

RANKに特異的に結合するタンパク質をコードするクローンを単離し、配列を決定した。そのクローンを11Hと名付けた。pDC406:muRANK-L (大腸菌DH10B中) という、マウスRANKL配列を含む発現ベクターを、ブダペスト条約の条件で1996年12月20日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MD (ATCC) に寄託し、受託番号98284を得た。このクローンのヌクレオチド配列および予想アミノ酸配列は、SEQ ID NO:10に示す。このクローンは開始メチオニンを含んで織らず; 追加の全長クローンを7B9ライブラリー (実質的には、1997年2月4日に刊行されたアメリカ合衆国特許5,599,905に記載のように調製した) から得た。5' 領域は、残基9のThrがGlyに置換されていること以外はSEQ ID NO:12アミノ酸1から22までに示すようなヒトRANKLのものと同一であることが分かった。

10

【 0 1 1 5 】

このリガンドは、多くの異なるアッセイによりRANKの、RANKLに結合する能力を評価するのに有用である。例えば、RANKLを発現する、形質転換細胞は、可溶性RANKのRANKLに結合する能力を評価するためにFACSアッセイ (あるいは同様のアッセイ) に用いられ得る。さらに、RANKLの可溶体は調製でき、この技術分野で知られているアッセイ (すなわち、ELISAまたはもともと1994年5月24日出願のUSSN 08/249,189に記載のBIAcoreアッセイ) に用い得る。RANKLはRANKのアフィニティー精製にも、試料中のRANKの量を測定する方法における試薬としても有用である。可溶性RANKLはNF- κ B活性化を誘導するのに有用であり、それゆえRANKを発現している細胞をアポトーシスから守るのに有用である。

20

【 0 1 1 6 】

実施例8

本実施例では、PCRをもとにした手法を用いたヒトRANKリガンド (RANKL) の単離を説明する。マウスRANKリガンド特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを、ヒト細胞株由来のファーストストランドcDNAを鋳型として使ったPCR反応に用いた。プライマーは、マウスRANKリガンド (SEQ ID NO:10) のヌクレオチド478-497に、そしてヌクレオチド858-878に相補的なものに対応した。ヒト類表皮細胞株KB (ATCC CCL-17) を用いた一反応由来の、長さ約400 bpの増幅されたバンドを、ゲル精製し、そのヌクレオチド配列を決定したところ、その配列はマウスRANKリガンドの対応する領域と85%同一であり、この断片がヒトRANKL由来であることが確認された。

30

【 0 1 1 7 】

全長ヒトRANKL cDNAを得るために、KB PCR産物ヌクレオチド配列に由来する2つのヒトRANKL特異的オリゴヌクレオチドを放射標識し、ハイブリダイゼーションプローブとして用いて、1997年2月4日刊行のアメリカ合衆国特許5,599,905に実質的に記載のようにしてラムダgt10 (Stratagene, La Jolla, CA) に調製した、ヒトPBL cDNAライブラリーをスクリーニングした。陽性にハイブリダイズしたいいくつかのプラークを同定し精製して、それらのインサートをpBluescript SK⁻ (Stratagene, La Jolla, CA) にサブクローニングし、そのヌクレオチド配列を決定した。単離されたもののひとつPBL3は、予想されるヒトRANKLの大部分をコードしていることが分かったが、5' コーディング領域のおよそ200 bpが欠けているとみられた。第二の単離されたものPBL5は、完全な5' 末端とさらに200bpの5' 非翻訳配列を含む、予想されるヒトRANKLのほとんどをコードしていることが分かった。

40

【 0 1 1 8 】

PBL5の5' 末端とPBL3の3' 末端を互いに連結し、ヒトRANKLをコードする全長cDNAを作った。全長ヒトRANKリガンドのヌクレオチドおよび予想アミノ酸配列を、SEQ ID NO:12に示す。ヒトRANKリガンドは、マウスRANKリガンドと83%のヌクレオチド同一性および84%のアミノ酸同一性を有する。pBluescript:huRANK-L (大腸菌DH10B中) と名付けた、ヒトRANKL配列を含むプラスミドを、ブダペスト条約の条件で1997年3月11日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MD (ATCC) に寄託し、受託番号98354を得た。

【 0 1 1 9 】

マウスおよびヒトRANKLは2型膜貫通タンパク質である。マウスRANKLは、予想される48アミノ酸の細胞内ドメイン、21アミノ酸の膜貫通ドメインおよび247アミノ酸の細胞外ド

50

メインを含む。ヒトRANKLは、予想される47アミノ酸の細胞内ドメイン、21アミノ酸の膜貫通ドメインおよび249アミノ酸の細胞外ドメインを含む。

【 0 1 2 0 】

実施例9

本実施例では、PCRをもとにしたマッピング戦略を用いた、ヒトRANKの染色体マッピングを説明する。最初のヒト染色体対応付けを、RANKおよびRANKL特異的なPCRプライマーと、BIOS Laboratories (New Haven, CT) のBIOS Somatic Cell Hybrid PCRable DNA kitを用い、製造者の使用説明書にしたがって行った。RANKはヒト第18番染色体にマップされ、RANKリガンドはヒト第13番染色体にマップされた。放射線照射したハイブリッドマッピングパネルGenebridge 4 Radiation Hybrid Panel (Research Genetics, Huntsville, AL; Walter, MA et al., Nature Genetics 7:22-28, 1994に記載されている)を用いて、さらに詳細なマッピングを行った。それから、この解析のデータをMIT Radiation Hybrid Mapper (URL: <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) に、そこに含まれていた説明にしたがって電子的に提出した。この解析により、NCBI Entrezブラウザ (URL: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Entrez/query?db=c&form=0>) に電子的に提出すると特異的なマップ位置が得られる、特異的な遺伝子マーカー名がわかった。RANKは染色体18q22.1に、RANKLは染色体13q14にマップされた。

【 0 1 2 1 】

実施例10

本実施例では、RANKLに対するモノクローナル抗体の調製を説明する。アメリカ合衆国特許4,411,993に開示されているもののような常法を用い、例えば、精製組み換え体RANKLの調製物、あるいは穿孔した (transfixed)、高レベルにRANKLを発現する細胞を用いて、RANKLに対するモノクローナル抗体を作製した。RANKLをコードするDNAも、例えばImmunity 3:165, 1995中でPardollおよびBeckerlegにより総説されているように、免疫原として用いることができる。このような抗体は、RANKLまたはRANKL活性に関する診断上のまたは研究上のアッセイの構成要素としてRANKLシグナリングを妨げる (アンタゴニストまたはブロック抗体) のに、あるいはRANKLのアフィニティー精製に有用であるとみられる。

【 0 1 2 2 】

齧歯類を免疫するために、RANKL免疫原をアジュバント (完全または不完全フロイントアジュバント、ミョウバン、またはRibiアジュバントR700 (Ribi, Hamilton, MT) といった他のアジュバントなど) にエマルジョン化し、例えばBALB/cマウスまたはLewisラットなど選択した齧歯類個体に10-100 μ gの範囲の量を皮下投与する。DNAを皮内に (Raz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9519, 1994) あるいは筋肉内に (Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4156, 1993) 投与することができ、生理食塩水がDNAをもとにした抗原に適した希釈剤であることが分かっている。10日から3週間後に、免疫した動物個体に免疫原を追加してブーストし、その後1週間ごと、2週間ごと、または3週間ごとの免疫日程で定期的にブーストする。

【 0 1 2 3 】

ドットプロットアッセイ (抗体サンドイッチ)、ELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ)、免疫沈降、またはFACS解析を含めた他の適切なアッセイによる分析のために、眼窩後方放血または尾先端切断により血清試料を定期的に採取する。適切な抗体価の検出後、陽性の動物個体に生理食塩水に溶かした抗原を静脈内投与する。3から4日後、その動物個体を犠牲死させ、脾細胞を回収し、マウスミエローマ細胞株 (例えばNS1、あるいは好ましくはAg 8.653 [ATCC CRL 1580]) と融合させる。この手順によって作製したハイブリドーマ細胞株を、複マイクロタイタープレートに、融合していない細胞、ミエローマ-ミエローマハイブリッド、および脾細胞-脾細胞ハイブリッドの増殖を阻害するための選択培地 (例えば、ハイポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含むもの、すなわちHAT) 中でまく。

【 0 1 2 4 】

このように作製されたハイブリドーマクローンを、例えばEngvall et al., Immunochem. 8:871 (1971)およびアメリカ合衆国特許4,703,004によって開示されている手法を適用することにより、RANKLとの反応性に関するELISAにてスクリーニングし得る。好ましいスクリーニング法は、Beckmanら (J. Immunol. 144:4212 (1990)) によって記載されている抗体捕捉法である。それから、陽性クローンを同系の齧歯類の腹腔内に投与して、高濃度 (>1 mg/ml) の抗RANKモノクローナル抗体を含む腹水を作り出す。得られたモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿、続いてゲル排除クロマトグラフィーにより精製し得る。あるいは、プロテインAまたはプロテインGへの抗体の結合に基づいたアフィニティークロマトグラフィーも、RANKLタンパク質への結合に基づいたアフィニティークロマトグラフィーも用い得る。本明細書中に記載の方法を、mAbの活性を測定するために用い、プロ

10

【0125】

実施例11

本実施例では、RANK発現をアップレギュレーションし得るということを明らかにする。ヒト末梢血T細胞を、フローサイトメーターソーティングにより、あるいは抗体をコートしたビーズを用いた負の選択により精製し、インターロイキン-4 (IL-4)、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) および商業的に入手可能な他のサイトカイン (IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IFN- γ 、TNF- α) を含む様々なサ

20

【0126】

【表1】

表1: サイトカインによる RANK のアップレギュレーション

30

サイトカイン (濃度)	結果
IL-4 (50 ng/ml)	+
TGF- β (5 ng/ml)	+から++
IL-4 (50 ng/ml) +TGF- β (5 ng/ml)	+++
IL-1 α (10 ng/ml)	-
IL-2 (20 ng/ml)	-
IL-3 (25 ng/ml)	-
IL-7 (20 ng/ml)	-
IL-8 (10 ng/ml)	-
IL-10 (50 ng/ml)	-
IL-12 (10 ng/ml)	-
IL-15 (10 ng/ml)	-
IFN- γ (100 U/ml)	-
TNF- α (10 ng/ml)	-

40

【0127】

調べたサイトカインのうち、IL-4とTGF- β はCD8+細胞傷害性およびCD4+ヘルパーT細胞上のRANK発現量を4日目から8日目まで上昇させた。IL-4とTGF- β の組み合わせは、活性化

50

T細胞上におけるこの受容体の発現を共同的にアップレギュレートするように作用した。サイトカインのこの特別な組み合わせは、サプレッサーT細胞によって分泌され、寛容の成立に重要であると考えられており (Mitchison and Sieper, Z. Rheumatol. 54:141, 1995にて総説されている)、これは、RANKの相互作用を、寛容あるいは活性な免疫応答の誘導のいずれか向かわせる免疫応答の調節に関係づけている。

【0128】

実施例12

本実施例では、活性化T細胞増殖に対するRANK.FcおよびhRANKLの影響を記述する。抗CD3で活性化したヒト末梢血Tリンパ球にTGF β を加えると、増殖阻止と、ついには培養の最初の数日の間にほとんどのリンパ球の死が誘導される。我々は、RANK:RANKL相互作用がTGF β -処理T細胞に与える影響を、RANK.Fcまたは可溶性ヒトRANKLをT細胞培養に添加することにより試験した。

【0129】

ヒト末梢血T細胞 (7×10^5 PBT) を、抗CD3 (OKT3、5 μ g/ml) および抗Flag (M1、5 μ g/ml) をコートした24穴プレート上で、TGF β (1ng/ml) およびIL-4 (10ng/ml) 存在下、組み換え体FLAG-タグ付加可溶性hRANKL (1 μ g/ml) あるいはRANK.Fc (10 μ g/ml) ありまたはなしで、6日間培養した。生存T細胞の回収率を3重のトリパンブルー計数によって求めた。

【0130】

RANK.Fcを添加すると、6日後の回収される生存T細胞の数が有意に減少したが、可溶性RANKLは生存T細胞の回収率を大きく増加させた (図1)。このように、内在性または外来性のRANKLは、TGF β 存在下で生じた生存T細胞の数を増加させる。TGF β はIL-4と共に、T_H3/調節性T細胞亜集団によって分泌された場合に免疫応答の調節と関係づけられている。これらのT細胞は、エフェクターT細胞の傍観的 (bystander) 抑制を媒介すると考えられている。したがって、RANKとそのリガンドは自己/傍分泌的に作用してT細胞寛容に影響し得る。さらに、TGF β は、特定の病原体または日和見性生物によってもたらされる免疫系の回避に役割を果たしていると考えられている。寛容の成立に機能することに加え、RANKは病原体による免疫系の回避にも機能し得る。

【0131】

実施例13

本実施例では、CD1a⁺樹状細胞 (DC) に対する、RANK相互作用の影響を記述する。機能的に成熟した樹状細胞 (DC) をin vitroでCD34⁺骨髄 (BM) 始原細胞から生じさせた。手短に述べると、健康なボランティア由来のヒトBM細胞を、Ficoll培地を用いて密度分画し、抗CD34マトリックスカラム (Ceptra, CellPro) を用いてCD34⁺細胞を免疫アフィニティー単離した。それから、CD34⁺ BM細胞を、10%ウシ胎児血清を添加したSuper McCoy培地にてヒトGM-CSF (20 ng/ml)、ヒトIL-4 (20 ng/ml)、ヒトTNF α (20 ng/ml)、ヒトCHO-由来Flt3L (FL; 100 ng/ml) 中、十分に加湿した37 $^{\circ}$ Cインキュベーター (5% CO₂) 内で14日間培養した。それから、FACStar PlusTMを用いてCD1a⁺、HLA-DR⁺DCをソートし、RANKを生物学的に評価するのに用いた。

【0132】

CD34⁺骨髄細胞由来のヒトCD1a⁺DCに関しては、フローサイトメーター解析によって評価すると、CD1a⁺DC亜集団 (20-30%) のみがRANKを細胞表面に発現していただけであった。しかし、DC培養にCD40Lを加えた結果、大多数のCD1a⁺DC表面にRANKが発現するようになった。CD40Lは、in vitroのクラスター形成を増強し、DCの形態的な変化を誘導し、HLA-DR、CD54、CD58、CD80およびCD86発現をアップレギュレーションすることによってDCを活性化することが示されている。

【0133】

DC培養にRANKLを加えると、対照の培養よりも、DC凝集およびクラスター形成の程度が有意に上昇し、CD40Lで見られた効果と同様であった (図2)。ソートしたヒトCD1a⁺DCを、サイトカインカクテル (GM-CSF、IL-4、TNF α およびFL) (左上のパネル) 中、カクテ

ルプラスCD40L (1 µg/ml) (右上) 中、カクテルプラスRANKL (1 µg/ml) (左下) 中、あるいはカクテルプラス熱で不活性化した (H) RANKL (1 µg/ml) (右下) 中、24穴平底培養プレート内で1 ml培地中、48-72時間培養し、それから倒立顕微鏡を用いて撮影した。対照培養以上の、DC凝集およびクラスター形成の増加は、熱で不活性化したRANKLを用いた場合には明らかではなく、この効果が生物学的に活性なタンパク質に依存していたことを示している。しかし、接着分子の発現の初期形質解析では、RANKLが誘導するクラスター形成はCD2、CD11a、CD54またはCD58の量の増加のためではないことが示された。

【0134】

CD1a⁺DCにRANKLを加えると、混合リンパ球反応 (MLR) における同種異系刺激能が、CD40L培養DCと比較して少なくとも3から10倍に上昇した (図3)。同種異系T細胞 (1 × 10⁵) を、図2について上に示したように培養した様々な数の放射線照射した (2000 rad) DCと、96穴丸底培養プレート内で0.2 ml培地中、4日間インキュベートした。培養物に0.5 mCi [³H]チミジンを8時間パルスし、気相 カウンターで計数するためのガラス繊維板上に細胞を回収した。単独で培養したT細胞またはDCのいずれかに対応するバックグラウンドのカウントは、<100 cpmであった。数値は三重の培養の平均 ± SDを表す。熱で不活性化したRANKLは全く効果がなかった。RANKLおよびCD40Lを組み合わせると、DC同種異系刺激活性はそれ以上は増強されなかったが、おそらくDCの機能的な能力はそれぞれのサイトカイン単独で最大限にまで達してしまっただけであろう。RANKLおよびCD40Lのいずれも、3日間の培養期間を越えてDCの *in vitro* 増殖を増強することはなかった。CD40Lと異なり、RANKLはHLA-DR発現量も、CD80またはCD86発現量も有意に上昇させはしなかった。

【0135】

RANKLは、すべてCD40/CD40Lシグナリングによって制御されている、細胞接着 (CD18、CD54)、抗原提示 (HLA-DR) または共刺激 (CD86) に関わる既知の分子を調節することなくDCのクラスター形成および機能的な能力を増強し得る。これらの分子の発現に対する影響がないことは、RANKLがCD40/CD40Lとは異なる、代替経路を介してDC機能を制御し得るということを示唆している。CD40LがRANKの、*in vitro* で生じさせたDCの表面発現を調節し、CD40LがDC-T細胞相互作用の間に活性化T細胞上でアップレギュレーションされるとすれば、RANKとそのリガンドは、DCが介するT細胞拡張の間に誘導される、活性化カスケードの重要な部分を形成し得る。さらに、RANKL中でDCを培養した結果、CD1b/c発現量が増加し、さらにCD83の量が増加した。これら両方の分子はCD40LによるDC成熟の間に同様に調節されており (Caux et al., J. Exp. Med. 180:1263; 1994)、RANKLがDC成熟を誘導するということを示している。

【0136】

樹状細胞は、“専門的な” 抗原提示細胞と呼ばれており、MHC拘束性のT細胞を感作する高い能力を有する。樹状細胞を *ex vivo* で腫瘍または感染性疾患のワクチンアジュバントとして用いることに、ますます興味を持たれている (例えばRomani, et al., J. Exp. Med., 180:83, 1994参照)。それゆえ、DC成熟を誘導し、樹状細胞の免疫応答を刺激する能力を増強するRANKLのような薬剤は、様々な疾患の免疫療法に有用であると見られる。

【0137】

実施例14

本実施例では、muRANKと名付けたRANKのマウス相同体の単離を説明する。種交差PCRとコロニーハイブリダイゼーションの組み合わせにより、muRANKを単離した。TNFRスーパーファミリーメンバータンパク質の細胞外ドメインのCysに富んだ疑似繰り返し内にあるCys残基が保存されていることを、様々な起源由来のマウスファーストストランドcDNAに対して用いる、ヒトRANKに基づいたPCRプライマーを設計するのに利用した。センス上流プライマーとアンチセンス下流プライマーの両方を、Cys残基内に3' 末端終止があるように設計した。

【0138】

上流センスプライマーは、SEQ ID NO:5 (アミノ酸79-86をコードする領域) のヌクレオチド272-295をコードしており、下流アンチセンスプライマーはヌクレオチド409-427 (ア

10

20

30

40

50

ミノ酸124-130をコードする領域)に相補的なものをコードしていた。これらのプライマーと、様々なマウス細胞株または組織起源由来のファーストストランドcDNAを用い、標準的なPCR反応を組み立てて行った。94℃を30秒間、50℃を30秒間、72℃を20秒間という反応サイクル30回を行った。PCR産物を電気泳動にて解析し、特異的なバンドをいくつかのサンプル中に認めた。あるサンプル由来のバンドをゲル精製し、DNA配列を決定したところ、プライマー間の配列が、対応するヒトRANKヌクレオチド配列とおよそ85%一致していることが判明した。

【0139】

マウス肝上皮細胞株FLE18 (PCRスクリーニングで陽性と同定された細胞株の一つ)から調製した、プラスミドに基づいたcDNAライブラリーを、PCR産物の配列決定により決まったマウスRANK配列に由来する、マウスRANK特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用い、全長RANK cDNAに関してスクリーニングした。1つは全長マウスRANKの5'末端をコードし、もう1つが3'末端をコードする (全長ヒトRANKとの配列比較に基づく) という、2つのcDNAを再結合させ、全長マウスRANK cDNAを作った。muRANKのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、SEQ ID NO:14および15に示す。

【0140】

このcDNAは、625アミノ酸残基を有する、予想30アミノ酸のシグナル配列、184アミノ酸の細胞外ドメイン、21アミノ酸の膜貫通ドメイン、および390アミノ酸の細胞質尾部を持った予想1型膜タンパク質をコードしている。muRANKの細胞外領域は、huRANKと有意なアミノ酸相同性 (69.7%同一性、80.8%類似性) を示した。当業者は、実際の切断部位はコンピュータによって予想されたものとは異なる可能性があるということを理解するだろう。従って、RANKのN-末端はアミノ酸25からアミノ酸35の間にあり得る。

【0141】

TNF受容体スーパーファミリーの他のメンバーは、膜貫通ドメインとリガンド結合ドメインの間に、リガンド結合には必要ではない 'スパーサー' 領域と呼ばれるアミノ酸の領域を有する。muRANKでは、アミノ酸197と214の間がそのようなスパーサー領域を形成すると予想される。したがって、この領域内のアミノ酸で終結するRANKの可溶体は、RANKのリガンドに特異的に結合する能力を維持していると予想される。可溶性RANKペプチドの好ましいC末端アミノ酸は、このスパーサー領域内の他のアミノ酸がC末端として使われる可能性があるものの、SEQ ID NO:14のアミノ酸214および197からなる群から選択される。

【0142】

実施例15

本実施例では、RANKおよびRANKLの様々な可溶体のいくつかの調製を記述する。都合のよい制限酵素認識部位が存在しない断片をPCRに基づいて単離することと組み合わせて、切断し連結する制限酵素の標準的な手法を用いた。PCRを用いる場合は、PCR産物を配列決定し、変異が導入されていないかどうかを確認したが、そのような変異は見つからなかった。

【0143】

実施例2に記載のhuRANK/Fcに加え、SEQ ID NO: 6のアミノ酸1-213をコードするDNAを、以前に記載したFcムテイン (SEQ ID NO:8) のアミノ酸3-232をコードするDNAと連結することにより、別のRANK/Fc融合タンパク質を調製した。全長マウスRANK (SEQ ID NO:5) のアミノ酸1-213をコードするDNAを、Fcムテイン (SEQ ID NO:8) のアミノ酸3-232をコードするDNAと連結することにより、同様の構築物をマウスRANKについて調製した。

【0144】

免疫グロブリンカップパ鎖 (SEQ ID NO:16) 由来のリーダーペプチドをコードするDNAに、短いタイプのFLAG(R) タグ (SEQ ID NO:17) をコードするDNA、その後にGly Serをコードするコドン、それからポリ-Hisタグ (SEQ ID NO:18) 、その後にGly Thr Serをコードするコドン、さらにSEQ ID NO:13のアミノ酸138-317をコードするDNAを連結することにより、可溶性の、タグ付加された、poly-HisタイプのhuRANKLを調製した。CMVリーダー配列 (SEQ ID NO:9) をコードするDNAに、Arg Thr Serをコードするコドン、それからポリ-Hi

sタグ (SEQ ID NO:18)、その後SEQ ID NO:11のアミノ酸119-294をコードするDNAを連結することにより、可溶性の、ポリ-Hisタグ付加されたタイプのマウスRANKLを調製した。

【0145】

CMVリーダー配列 (SEQ ID NO:9) をコードするDNAに、Aspをコードするコドン、その後三量体形成 “ロイシン” ジッパー (SEQ ID NO:19) をコードするDNA、それからThr Arg Ser、その後SEQ ID NO:13のアミノ酸138-317をコードするコドンを連結することにより、可溶性の、オリゴマータイプのhuRANKLを調製した。

【0146】

これらおよび他の構築物は、日常の実験によって調製される。それから、様々なDNAを適切な発現ベクターに挿入し、発現させる。特に好ましい発現ベクターは、ほ乳類細胞内で使用できるものである。例えば、本明細書中に記載のpDC409およびpDC304は、一過性の発現に有用である。安定トランスフェクションのためには、CHO細胞を用いるのが好ましく、いくつかの有用なベクターは現在特許されているUSSN 08/785,150に記載されており、例えば、2A5-3 I由来発現ベクターのひとつがその中で議論されている。

【0147】

実施例16

本実施例では、RANKL発現がマウスT細胞上でアップレギュレートされ得るということを明らかにする。細胞をC57BL/6マウスの腸間膜リンパ節から得て、抗CD3をコートしたプレート、コンカナバリンA (ConA) またはホルボールミリステートアセテートを、イオノマイシン (抗CD3: 500A2; Immunex Corporation, Seattle WA; ConA, PMA、イオノマイシン、Sigma, St. Louis, MO) と組み合わせて用いることにより、実質的に本明細書中で記載のようにして活性化し、約2から5日間培養した。RANKL発現を、T細胞マーカーCD4、CD8およびCD45RB、そして本明細書中で記載したようにして調製したRANK/Fcを用い、FACSによる三色解析にて評価した。

【0148】

RANKLは無刺激のマウスT細胞上には発現していなかった。抗CD3、ConAまたはPMA/イオノマイシンのいずれで刺激したT細胞も、特異なRANKL発現を示し、CD4⁺/CD45RB^{Lo}およびCD4⁺/CD45RB^{Hi}細胞はRANKLに関して陽性であったが、CD8⁺細胞はそうではなかった。RANKLはB細胞上には観察されず、ヒトの細胞でも同様の結果が観察された。

【0149】

実施例17

本実施例では、細胞増殖および活性化に対するマウスRANKLの効果を記述する。免疫応答に役割を果たす細胞の典型である様々な細胞および細胞株 (マウス脾臓、胸腺およびリンパ節) を、RANKLの存在または非存在下、それらの生存を促進する条件下で培養することにより評価した。RANKLは調べたいずれの細胞の増殖も促進しなかった。一つの細胞株、RAW 264.7 (ATCC受託番号TIB 71) と呼ばれるマクロファージ細胞株が、活性化のしるしをいくらか示していた。

【0150】

RAW細胞は、少量のTNF- α を構成的に産生している。ヒトまたはマウスRANKLのいずれかとインキュベートすると、これらの細胞からのTNF- α 産生が用量依存的に増強された。RANKLを10分間煮沸するとTNF- α 産生が無くなったのに対し、精製エンドトキシン (LPS) を同様に処理してもLPSのTNF- α 産生刺激能には影響しなかったことから、この結果はRANKL調製物にエンドトキシンが混入したためではなかった。RANKLはマクロファージ細胞株RAW 264.7をTNF- α 産生に関して活性化したという事実にも関わらず、ヒトRANKLとマウスRANKLのいずれも、これらの細胞からの一酸化窒素産生を促進しなかった。

【0151】

実施例18

本実施例では、胎児マウスにおける胸腺の増殖および発生に対するマウスRANKLの影響を記述する。妊娠マウスに、1 mgのRANK/Fcまたは媒体の対照タンパク質 (マウス血清ア

10

20

30

40

50

ルブミン；MSA）を、妊娠13、16および19日目に注入した。誕生後、新生児にRANK/Fcを、腹腔内に（IP）毎日注入し続け、1 mgの投与量から開始し、最終用量4 mgまで4日ごとに用量を倍にした。新生児を生後1、8および15日目に取り、胸腺と脾臓を回収し、大きさ、細胞性および表現型の組成を調べた。

【0152】

1日目に胸腺の大きさのわずかな減少が、RANK/Fcを注入したメスから産まれた新生児において観察され、大きさの同様の減少は対照の新生児では観察されなかった。8日目には、MSA処理マウスと比較してRANK/Fc処理マウスにおいて胸腺の大きさと細胞性が約50%減少した。表現型解析により、胸腺内の異なるT細胞集団の相対的な特性は、RANK/Fcマウスと対照マウスで同じであったことが明らかになり、細胞性の減少は特定の集団の減少とは全く異なり、胸腺T細胞数の全体的な減退のためであることが示された。RANK/Fc処理新生児は、胸腺細胞の大きさ、細胞性または表現型のいずれの点においても15日目には対象の新生児と有意に異なるということではなかった。評価したどの時点においても、脾臓の大きさ、細胞性または組成におけるいかなる有意な違いも観察されなかった。細胞性が8日目には異なり、15日目には変わらなかったことは、RANK/Fcが胸腺発生の初期に明らかに影響を及ぼす可能性があるということを示唆し得る。

【0153】

実施例19

本実施例では、RANKの細胞質ドメインのC末端領域がいくつかの異なるTRAFタンパク質の結合に重要であることを明らかにする。RANKには、TRAF連結部位であろう認識可能なPXQX(X)Tモチーフが少なくとも2つ含まれている。それゆえ、RANKの細胞質ドメインの様々な領域の、TRAF結合に対する重要性を評価した。RANK/GST融合タンパク質を、実質的にSmithとJohnson（Gene 67:31（1988））に記載のようにして調製し、以下に説明する様々な切断体の調製に用いた。

【0154】

マウスおよびヒトRANKのヌクレオチド配列の比較により、TRAF結合に重要であり得るいくつかの保存された領域があることが示された。それゆえ、PCRに基づいた手法を開発して、保存された領域を保持しているであろう様々なC末端切断体の調製を容易にした。選択した場所に終止コドンおよび制限酵素認識部位を導入するようにPCRプライマーを設計し、以下の表1に記載する切断体を得た。配列決定により、目的としない変異は構築物に一つも導入されなかったことが確認された。

【0155】

放射標識した（³⁵S-Met、Cys）TRAFタンパク質を、商業的に入手可能な網状赤血球可溶化物キットを製造者（Promega）の指示に従って用いたin vitro翻訳により調製した。切断されたGST融合タンパク質を、実質的にSmithおよびJohnson（上記）に記載のようにして精製した。手短に述べると、融合タンパク質をコードする発現ベクターを大腸菌にトランスフェクトし、このタンパク質を発現するように誘導した。その細菌を可溶化し、不溶性の物質を除き、グルタチオンをコートしたビーズ（Sepharose 4B, Pharmacia, Uppsala Sweden）で沈降させることにより、融合タンパク質を単離した。

【0156】

ビーズを洗い、様々な放射標識TRAFタンパク質とインキュベートした。インキュベーションと洗いの段階の後、0.1% SDS + β-メルカプトエタノール中で煮沸することにより融合タンパク質/TRAF複合体をビーズから除き、12% SDSゲル（Novex）にロードした。ゲルをオートラジオグラフィーにかけ、放射標識された物質が存在するかあるいは存在しないかを記録した。結果を以下の表2に示す。

【0157】

【表 2】

表 2：種々の TRAF タンパク質の RANK 細胞質ドメインへの結合

C 末端切断	E206-S339	E206-Y421	E206-M476	E206-G544	全長
TRAF1	-	-	-	-	++
TRAF2	-	-	-	-	++
TRAF3	-	-	-	-	++
TRAF4	-	-	-	-	-
TRAF5	-	-	-	-	+
TRAF6	-	+	+	+	++

10

【 0 1 5 8 】

これらの結果は、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF5およびTRAF6がRANK細胞質ドメインの最も遠い部分（アミノ酸G544とA616の間）に結合することを示している。TRAF6はS339とY412の間にも結合部位を有する。この実験においては、TRAF5もRANKの細胞質ドメイン結合した。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 9 】

【図 1】図1は、活性化T細胞の増殖に対するRANK.FcおよびhRANKLの影響を示す。ヒト末梢血T細胞を実施例12に記載のように培養し、生存T細胞回収率を3重のトリパンプルー計

20

数により求めた。
【図 2】図2は、RANKLが、ヒトDCクラスター形成を誘導する能力を説明する。機能的に成熟した樹状細胞（DC）をCD34⁺骨髄（BM）始原細胞からin vitroで発生させ、実施例13に記載のように培養した。CD1a⁺ DCをサイトカインカクテルのみ（図2A）、カクテルにCD40L（図2B）、RANKL（図2C）、あるいは熱で不活性化した（H）RANKL（図2D）を加えて培養し、それから倒立顕微鏡を用いて撮影した。

【図 3】図3は、RANKLがDCの同種異系刺激能を増強することを示す。同種異系のT細胞を、実施例13に記載のように培養した、様々な数の放射線照射DCとインキュベートした。培養したものに[³H]-チミジンをパルスし、細胞を計数用のガラス繊維板上に回収した。数値は3重の培養の平均±標準偏差（SD）を表す。

30

【図 4】図4は、構造上保存されている、細胞外のシステインに富んだ疑似繰り返し領域内で、ヒトRANKと他のTNFRファミリーのメンバーとを対応させたものを示す。予想されるジスルフィド結合（DS1-DS3）を示してある。RANKおよびCD40は、2番目の疑似繰り返し内のDS2を消去する、同じアミノ酸置換（C H、C G）を含む。

【図 5 - 1】図5は、ヒトRANKLと他のTNFファミリーのメンバーとの対応を示す。

【図 5 - 2】図5は、ヒトRANKLと他のTNFファミリーのメンバーとの対応を示す。

【 0 1 6 0 】

配列表

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 3115 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: HOMO SAPIENS

50

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: BONE-MARROW DERIVED DENDRITIC CELLS

(B) CLONE: 9D-8A

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 93..1868

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

GCTGCTGCTG CTCTGCGCGC TGCTCGCCCG GCTGCAGTTT TATCCAGAAA GAGCTGTGTG	60	
GACTCTCTGC CTGACCTCAG TGTTCCTTTTC AG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT	113	
Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro		10
1 5		
CCA TGT ACC AGT GAG AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC	161	
Pro Cys Thr Ser Glu Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn		
10 15 20		
AAA TGT GAA CCA GGA AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT	209	
Lys Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser		
25 30 35		
GAC AGT GTA TGT CTG CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG	257	
Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp		
40 45 50 55		20
AAT GAA GAA GAT AAA TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG	305	
Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys		
60 65 70		
GCC CTG GTG GCC GTG GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC	353	
Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys		
75 80 85		
GCG TGC ACG GCT GGG TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC	401	
Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg		
90 95 100		
CGC AAC ACC GAG TGC GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG	449	
Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln		30
105 110 115		
CTC AAC AAG GAC ACA GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT	497	
Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser		
120 125 130 135		
GAT GCC TTT TCC TCC ACG GAC AAA TGC AGA CCC TGG ACC AAC TGT ACC	545	
Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr		
140 145 150		
TTC CTT GGA AAG AGA GTA GAA CAT CAT GGG ACA GAG AAA TCC GAT GCG	593	
Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala		40
155 160 165		
GTT TGC AGT TCT TCT CTG CCA GCT AGA AAA CCA CCA AAT GAA CCC CAT	641	
Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His		
170 175 180		
GTT TAC TTG CCC GGT TTA ATA ATT CTG CTT CTC TTC GCG TCT GTG GCC	689	
Val Tyr Leu Pro Gly Leu Ile Ile Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala		
185 190 195		
CTG GTG GCT GCC ATC ATC TTT GGC GTT TGC TAT AGG AAA AAA GGG AAA	737	
Leu Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys		
200 205 210 215		50

GCA CTC ACA GCT AAT TTG TGG CAC TGG ATC AAT GAG GCT TGT GGC CGC	785	
Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp His Trp Ile Asn Glu Ala Cys Gly Arg		
220 225 230		
CTA AGT GGA GAT AAG GAG TCC TCA GGT GAC AGT TGT GTC AGT ACA CAC	833	
Leu Ser Gly Asp Lys Glu Ser Ser Gly Asp Ser Cys Val Ser Thr His		
235 240 245		
ACG GCA AAC TTT GGT CAG CAG GGA GCA TGT GAA GGT GTC TTA CTG CTG	881	
Thr Ala Asn Phe Gly Gln Gln Gly Ala Cys Glu Gly Val Leu Leu Leu		
250 255 260		
ACT CTG GAG GAG AAG ACA TTT CCA GAA GAT ATG TGC TAC CCA GAT CAA	929	10
Thr Leu Glu Glu Lys Thr Phe Pro Glu Asp Met Cys Tyr Pro Asp Gln		
265 270 275		
GGT GGT GTC TGT CAG GGC ACG TGT GTA GGA GGT GGT CCC TAC GCA CAA	977	
Gly Gly Val Cys Gln Gly Thr Cys Val Gly Gly Gly Pro Tyr Ala Gln		
280 285 290 295		
GGC GAA GAT GCC AGG ATG CTC TCA TTG GTC AGC AAG ACC GAG ATA GAG	1025	
Gly Glu Asp Ala Arg Met Leu Ser Leu Val Ser Lys Thr Glu Ile Glu		
300 305 310		
GAA GAC AGC TTC AGA CAG ATG CCC ACA GAA GAT GAA TAC ATG GAC AGG	1073	20
Glu Asp Ser Phe Arg Gln Met Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Met Asp Arg		
315 320 325		
CCC TCC CAG CCC ACA GAC CAG TTA CTG TTC CTC ACT GAG CCT GGA AGC	1121	
Pro Ser Gln Pro Thr Asp Gln Leu Leu Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ser		
330 335 340		
AAA TCC ACA CCT CCT TTC TCT GAA CCC CTG GAG GTG GGG GAG AAT GAC	1169	
Lys Ser Thr Pro Pro Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp		
345 350 355		
AGT TTA AGC CAG TGC TTC ACG GGG ACA CAG AGC ACA GTG GGT TCA GAA	1217	
Ser Leu Ser Gln Cys Phe Thr Gly Thr Gln Ser Thr Val Gly Ser Glu		
360 365 370 375		30
AGC TGC AAC TGC ACT GAG CCC CTG TGC AGG ACT GAT TGG ACT CCC ATG	1265	
Ser Cys Asn Cys Thr Glu Pro Leu Cys Arg Thr Asp Trp Thr Pro Met		
380 385 390		
TCC TCT GAA AAC TAC TTG CAA AAA GAG GTG GAC AGT GGC CAT TGC CCG	1313	
Ser Ser Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Glu Val Asp Ser Gly His Cys Pro		
395 400 405		
CAC TGG GCA GCC AGC CCC AGC CCC AAC TGG GCA GAT GTC TGC ACA GGC	1361	
His Trp Ala Ala Ser Pro Ser Pro Asn Trp Ala Asp Val Cys Thr Gly		
410 415 420		
TGC CGG AAC CCT CCT GGG GAG GAC TGT GAA CCC CTC GTG GGT TCC CCA	1409	40
Cys Arg Asn Pro Pro Gly Glu Asp Cys Glu Pro Leu Val Gly Ser Pro		
425 430 435		
AAA CGT GGA CCC TTG CCC CAG TGC GCC TAT GGC ATG GGC CTT CCC CCT	1457	
Lys Arg Gly Pro Leu Pro Gln Cys Ala Tyr Gly Met Gly Leu Pro Pro		
440 445 450 455		
GAA GAA GAA GCC AGC AGG ACG GAG GCC AGA GAC CAG CCC GAG GAT GGG	1505	
Glu Glu Glu Ala Ser Arg Thr Glu Ala Arg Asp Gln Pro Glu Asp Gly		
460 465 470		
GCT GAT GGG AGG CTC CCA AGC TCA GCG AGG GCA GGT GCC GGG TCT GGA	1553	
Ala Asp Gly Arg Leu Pro Ser Ser Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly		50

475	480	485	
AGC TCC CCT GGT GGC CAG TCC CCT GCA TCT GGA AAT GTG ACT GGA AAC	1601		
Ser Ser Pro Gly Gly Gln Ser Pro Ala Ser Gly Asn Val Thr Gly Asn			
490	495	500	
AGT AAC TCC ACG TTC ATC TCC AGC GGG CAG GTG ATG AAC TTC AAG GGC	1649		
Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met Asn Phe Lys Gly			
505	510	515	
GAC ATC ATC GTG GTC TAC GTC AGC CAG ACC TCG CAG GAG GGC GCG GCG	1697		
Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln Glu Gly Ala Ala			
520	525	530	535
GCG GCT GCG GAG CCC ATG GGC CGC CCG GTG CAG GAG GAG ACC CTG GCG	1745		
Ala Ala Ala Glu Pro Met Gly Arg Pro Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala			
540	545	550	
CGC CGA GAC TCC TTC GCG GGG AAC GGC CCG CGC TTC CCG GAC CCG TGC	1793		
Arg Arg Asp Ser Phe Ala Gly Asn Gly Pro Arg Phe Pro Asp Pro Cys			
555	560	565	
GGC GGC CCC GAG GGG CTG CGG GAG CCG GAG AAG GCC TCG AGG CCG GTG	1841		
Gly Gly Pro Glu Gly Leu Arg Glu Pro Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val			
570	575	580	
CAG GAG CAA GGC GGG GCC AAG GCT TGA GCGCCCCCA TGGCTGGGAG	1888		
Gln Glu Gln Gly Gly Ala Lys Ala			
585	590		
CCCGAAGCTC GGAGCCAGGG CTCGCGAGGG CAGCACCGCA GCCTCTGCCC CAGCCCCGGC	1948		
CACCCAGGGA TCGATCGGTA CAGTCGAGGA AGACCACCGC GCATTCTCTG CCCACTTTGC	2008		
CTTCCAGGAA ATGGGCTTTT CAGGAAGTGA ATTGATGAGG ACTGTCCCCA TGCCACGGA	2068		
TGCTCAGCAG CCCGCCGCAC TGGGGCAGAT GTCTCCCCTG CCACTCCTCA AACTCGCAGC	2128		
AGTAATTTGT GGCATATGA CAGCTATTTT TATGACTATC CTGTTCTGTG GGGGGGGGT	2188		
CTATGTTTTT CCCCCATATT TGTATTCCTT TTCATAACTT TTCTTGATAT CTTTCCTCCC	2248		
TCTTTTTTAA TGTAAGGTT TTCTCAAAAA TTCTCCTAAA GGTGAGGGTC TCTTTCTTTT	2308		
CTCTTTTCCT TTTTTTTTTC TTTTTTTGGC AACCTGGCTC TGGCCAGGC TAGAGTGCAG	2368		
TGGTGCGATT ATAGCCCGGT GCAGCCTCTA ACTCCTGGGC TCAAGCAATC CAAGTGATCC	2428		
TCCCACCTCA ACCTTCGGAG TAGCTGGGAT CACAGCTGCA GGCCACGCC AGCTTCCTCC	2488		
CCCCGACTCC CCCCCCCCAG AGACACGGTC CCACCATGTT ACCCAGCCTG GTCTCAAAC	2548		
CCCCAGCTAA AGCAGTCCTC CAGCCTCGGC CTCCCAAAGT ACTGGGATTA CAGGCGTGAG	2608		
CCCCACGCT GGCCTGCTTT ACGTATTTTC TTTTGTGCC CTGCTCACAG TGTTTTAGAG	2668		
ATGGCTTTCC CAGTGTGTGT TCATTGTAAA CACTTTTGGG AAAGGGCTAA ACATGTGAGG	2728		
CCTGGAGATA GTTGCTAAGT TGCTAGGAAC ATGTGGTGGG ACTTTCATAT TCTGAAAAAT	2788		
GTTCTATATT CTCATTTTTT TAAAAGAAAG AAAAAAGGAA ACCCGATTTA TTTCTCCTGA	2848		
ATCTTTTTTAA GTTTGTGTCG TTCCTTAAGC AGAACTAAGC TCAGTATGTG ACCTTACCCG	2908		
CTAGGTGGTT AATTTATCCA TGCTGGCAGA GGCACCTCAG TACTTGGTAA GCAAATTTCT	2968		
AAACTCCAA GTTGCTGCAG CTTGGCATTCT TTCTTATTCT AGAGGTCTCT CTGGAAAAGA	3028		
TGGAGAAAAT GAACAGGACA TGGGGCTCCT GGAAAGAAAG GGCCCGGGA GTTCAAGGAA	3088		
GAATAAAGTT GAAATTTTAA AAAAAA	3115		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 591 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

10

20

30

40

50

Val	Ala	Leu	Gln	Ile	Ala	Pro	Pro	Cys	Thr	Ser	Glu	Lys	His	Tyr	Glu
1	5				10				15						
His	Leu	Gly	Arg	Cys	Cys	Asn	Lys	Cys	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Met	Ser
20				25				30							
Ser	Lys	Cys	Thr	Thr	Thr	Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Pro
35				40				45							
Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Ser	Trp	Asn	Glu	Glu	Asp	Lys	Cys	Leu	Leu	His
50				55				60							
Lys	Val	Cys	Asp	Thr	Gly	Lys	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Val	Ala	Gly	Asn
65				70				75				80			
Ser	Thr	Thr	Pro	Arg	Arg	Cys	Ala	Cys	Thr	Ala	Gly	Tyr	His	Trp	Ser
85				90				95							
Gln	Asp	Cys	Glu	Cys	Cys	Arg	Arg	Asn	Thr	Glu	Cys	Ala	Pro	Gly	Leu
100				105				110							
Gly	Ala	Gln	His	Pro	Leu	Gln	Leu	Asn	Lys	Asp	Thr	Val	Cys	Lys	Pro
115				120				125							
Cys	Leu	Ala	Gly	Tyr	Phe	Ser	Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp	Lys	Cys
130				135				140							
Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Thr	Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Val	Glu	His	His
145				150				155				160			
Gly	Thr	Glu	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Arg
165				170				175							
Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Ile	Leu
180				185				190							
Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Gly	Val
195				200				205							
Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	His	Trp
210				215				220							
Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly
225				230				235				240			
Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala
245				250				255							
Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe	Pro	Glu
260				265				270							
Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Cys	Val
275				280				285							
Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Met	Leu	Ser	Leu
290				295				300							
Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	Gln	Met	Pro	Thr
305				310				315				320			
Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Asp	Gln	Leu	Leu
325				330				335							
Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Glu	Pro
340				345				350							
Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr
355				360				365							
Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys
370				375				380							
Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Glu

50

20

50

GCC CGG CTG CAG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT ACC AGT GAG	149	
Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro Pro Cys Thr Ser Glu		
25 30 35		
AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC AAA TGT GAA CCA GGA	197	
Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn Lys Cys Glu Pro Gly		
40 45 50		
AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT GAC AGT GTA TGT CTG	245	
Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser Asp Ser Val Cys Leu		
55 60 65		
CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG AAT GAA GAA GAT AAA	293	10
Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys		
70 75 80 85		
TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG GCC CTG GTG GCC GTG	341	
Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val		
90 95 100		
GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC GCG TGC ACG GCT GGG	389	
Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly		
105 110 115		
TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC CGC AAC ACC GAG TGC	437	20
Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys		
120 125 130		
GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG CTC AAC AAG GAC ACA	485	
Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr		
135 140 145		
GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT GAT GCC TTT TCC TCC	533	
Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser		
150 155 160 165		
ACG GAC AAA TGC AGA CCC TGG ACC AAC TGT ACC TTC CTT GGA AAG AGA	581	
Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr Phe Leu Gly Lys Arg		
170 175 180		30
GTA GAA CAT CAT GGG ACA GAG AAA TCC GAT GCG GTT TGC AGT TCT TCT	629	
Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser		
185 190 195		
CTG CCA GCT AGA AAA CCA CCA AAT GAA CCC CAT GTT TAC TTG CCC GGT	677	
Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His Val Tyr Leu Pro Gly		
200 205 210		
TTA ATA ATT CTG CTT CTC TTC GCG TCT GTG GCC CTG GTG GCT GCC ATC	725	
Leu Ile Ile Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala Leu Val Ala Ala Ile		
215 220 225		
ATC TTT GGC GTT TGC TAT AGG AAA AAA GGG AAA GCA CTC ACA GCT AAT	773	40
Ile Phe Gly Val Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys Ala Leu Thr Ala Asn		
230 235 240 245		
TTG TGG CAC TGG ATC AAT GAG GCT TGT GGC CGC CTA AGT GGA GAT AAG	821	
Leu Trp His Trp Ile Asn Glu Ala Cys Gly Arg Leu Ser Gly Asp Lys		
250 255 260		
GAG TCC TCA GGT GAC AGT TGT GTC AGT ACA CAC ACG GCA AAC TTT GGT	869	
Glu Ser Ser Gly Asp Ser Cys Val Ser Thr His Thr Ala Asn Phe Gly		
265 270 275		
CAG CAG GGA GCA TGT GAA GGT GTC TTA CTG CTG ACT CTG GAG GAG AAG	917	
Gln Gln Gly Ala Cys Glu Gly Val Leu Leu Leu Thr Leu Glu Glu Lys		50

280	285	290	
ACA TTT CCA GAA GAT ATG TGC TAC CCA GAT CAA GGT GGT GTC TGT CAG	965		
Thr Phe Pro Glu Asp Met Cys Tyr Pro Asp Gln Gly Gly Val Cys Gln			
295	300	305	
GGC ACG TGT GTA GGA GGT GGT CCC TAC GCA CAA GGC GAA GAT GCC AGG	013		
Gly Thr Cys Val Gly Gly Gly Pro Tyr Ala Gln Gly Glu Asp Ala Arg			
310	315	320	325
ATG CTC TCA TTG GTC AGC AAG ACC GAG ATA GAG GAA GAC AGC TTC AGA	061		
Met Leu Ser Leu Val Ser Lys Thr Glu Ile Glu Glu Asp Ser Phe Arg			
330	335	340	
CAG ATG CCC ACA GAA GAT GAA TAC ATG GAC AGG CCC TCC CAG CCC ACA	109		
Gln Met Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Met Asp Arg Pro Ser Gln Pro Thr			
345	350	355	
GAC CAG TTA CTG TTC CTC ACT GAG CCT GGA AGC AAA TCC ACA CCT CCT	157		
Asp Gln Leu Leu Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ser Lys Ser Thr Pro Pro			
360	365	370	
TTC TCT GAA CCC CTG GAG GTG GGG GAG AAT GAC AGT TTA AGC CAG TGC	205		
Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln Cys			
375	380	385	
TTC ACG GGG ACA CAG AGC ACA GTG GGT TCA GAA AGC TGC AAC TGC ACT	253		
Phe Thr Gly Thr Gln Ser Thr Val Gly Ser Glu Ser Cys Asn Cys Thr			
390	395	400	405
GAG CCC CTG TGC AGG ACT GAT TGG ACT CCC ATG TCC TCT GAA AAC TAC	301		
Glu Pro Leu Cys Arg Thr Asp Trp Thr Pro Met Ser Ser Glu Asn Tyr			
410	415	420	
TTG CAA AAA GAG GTG GAC AGT GGC CAT TGC CCG CAC TGG GCA GCC AGC	349		
Leu Gln Lys Glu Val Asp Ser Gly His Cys Pro His Trp Ala Ala Ser			
425	430	435	
CCC AGC CCC AAC TGG GCA GAT GTC TGC ACA GGC TGC CGG AAC	391		
Pro Ser Pro Asn Trp Ala Asp Val Cys Thr Gly Cys Arg Asn			
440	445	450	

10

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 451 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Met	Ala	Pro	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu	Phe	Ala	Leu	Leu	Leu	40
1				5					10				15			
Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Gln	Val	Ala	Leu	Gln	Ile	Ala	Pro	
			20				25					30				
Pro	Cys	Thr	Ser	Glu	Lys	His	Tyr	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Cys	Cys	Asn	
		35				40					45					
Lys	Cys	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Met	Ser	Ser	Lys	Cys	Thr	Thr	Thr	Ser	
	50				55					60						
Asp	Ser	Val	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Pro	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Ser	Trp	
	65				70				75					80		
Asn	Glu	Glu	Asp	Lys	Cys	Leu	Leu	His	Lys	Val	Cys	Asp	Thr	Gly	Lys	50

	85		90		95	
Ala	Leu	Val	Ala	Val	Val	Ala
			Gly	Asn	Ser	Thr
					Thr	Pro
					Arg	Arg
					Cys	
	100		105		110	
Ala	Cys	Thr	Ala	Gly	Tyr	His
			Trp	Ser	Gln	Asp
				Cys	Glu	Cys
					Cys	Arg
	115		120		125	
Arg	Asn	Thr	Glu	Cys	Ala	Pro
			Gly	Leu	Gly	Ala
					Gln	His
					Pro	Leu
					Gln	
	130		135		140	
Leu	Asn	Lys	Asp	Thr	Val	Cys
					Lys	Pro
					Cys	Leu
					Ala	Gly
					Tyr	Phe
						Ser
	145		150		155	
Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp
					Lys	Cys
					Arg	Pro
					Trp	Thr
					Asn	Cys
					Thr	
	165		170		175	
Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Val	Glu
					His	His
					Gly	Thr
					Glu	Lys
					Ser	Asp
					Ala	
	180		185		190	
Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro
					Ala	Arg
					Lys	Pro
					Pro	Asn
					Glu	Pro
					His	
	195		200		205	
Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile
					Ile	Leu
					Leu	Leu
					Phe	Ala
					Ser	Val
					Ala	
	210		215		220	
Leu	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe
					Gly	Val
					Cys	Tyr
					Arg	Lys
					Lys	Gly
					Lys	
	225		230		235	
Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp
					His	Trp
					Ile	Asn
					Glu	Ala
					Cys	Gly
					Arg	
	245		250		255	
Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser
					Ser	Ser
					Gly	Asp
					Ser	Cys
					Val	Ser
					Thr	His
	260		265		270	
Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	Gln	Gln
					Gly	Ala
					Cys	Glu
					Gly	Val
					Leu	Leu
					Leu	
	275		280		285	
Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe
					Pro	Glu
					Asp	Met
					Cys	Tyr
					Pro	Asp
					Gln	
	290		295		300	
Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Thr
					Cys	Val
					Gly	Gly
					Gly	Pro
					Tyr	Ala
					Gln	
	305		310		315	
Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Met	Leu
					Ser	Leu
					Val	Ser
					Lys	Thr
					Glu	Ile
					Glu	
	325		330		335	
Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	Gln	Met
					Pro	Thr
					Glu	Asp
					Glu	Tyr
					Met	Asp
					Arg	
	340		345		350	
Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Asp	Gln
					Leu	Leu
					Phe	Leu
					Thr	Glu
					Pro	Gly
					Ser	
	355		360		365	
Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser
					Glu	Pro
					Leu	Glu
					Val	Gly
					Glu	Asn
					Asp	
	370		375		380	
Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Phe	Thr
					Gly	Thr
					Gln	Ser
					Thr	Val
					Gly	Ser
					Glu	
	385		390		395	
Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	Glu	Pro
					Leu	Cys
					Arg	Thr
					Asp	Trp
					Thr	Pro
					Met	
	405		410		415	
Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln
					Lys	Glu
					Val	Asp
					Ser	Gly
					His	Cys
					Pro	
	420		425		430	
His	Trp	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser
					Pro	Asn
					Trp	Ala
					Asp	Val
					Cys	Thr
					Gly	
	435		440		445	
Cys	Arg	Asn				
	450					

10

20

30

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

50

(A) LENGTH: 3136 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: HOMO SAPIENS
 (vii) IMMEDIATE SOURCE: 10
 (A) LIBRARY: BONE-MARROW DERIVED DENDRITIC CELLS
 (B) CLONE: FULL LENGTH RANK
 (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 39..1886
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

CCGCTGAGGC CGCGGCGCCC GCCAGCCTGT CCCGCGCC ATG GCC CCG CGC GCC	53	
Met Ala Pro Arg Ala		
1 5		
CGG CGG CGC CGC CCG CTG TTC GCG CTG CTG CTG CTC TGC GCG CTG CTC	101	20
Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu		
10 15 20		
GCC CGG CTG CAG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT ACC AGT GAG	149	
Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro Pro Cys Thr Ser Glu		
25 30 35		
AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC AAA TGT GAA CCA GGA	197	
Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn Lys Cys Glu Pro Gly		
40 45 50		
AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT GAC AGT GTA TGT CTG	245	
Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser Asp Ser Val Cys Leu		30
55 60 65		
CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG AAT GAA GAA GAT AAA	293	
Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys		
70 75 80 85		
TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG GCC CTG GTG GCC GTG	341	
Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val		
90 95 100		
GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC GCG TGC ACG GCT GGG	389	
Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly		
105 110 115		40
TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC CGC AAC ACC GAG TGC	437	
Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys		
120 125 130		
GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG CTC AAC AAG GAC ACA	485	
Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr		
135 140 145		
GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT GAT GCC TTT TCC TCC	533	
Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser		
150 155 160 165		
ACG GAC AAA TGC AGA CCC TGG ACC AAC TGT ACC TTC CTT GGA AAG AGA	581	50

Thr	Asp	Lys	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Thr	Phe	Leu	Gly	Lys	Arg		
				170					175					180			
GTA	GAA	CAT	CAT	GGG	ACA	GAG	AAA	TCC	GAT	GCG	GTT	TGC	AGT	TCT	TCT	629	
Val	Glu	His	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Cys	Ser	Ser	Ser		
				185				190					195				
CTG	CCA	GCT	AGA	AAA	CCA	CCA	AAT	GAA	CCC	CAT	GTT	TAC	TTG	CCC	GGT	677	
Leu	Pro	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly		
		200					205				210						
TTA	ATA	ATT	CTG	CTT	CTC	TTC	GCG	TCT	GTG	GCC	CTG	GTG	GCT	GCC	ATC	725	
Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	10	
		215				220				225							
ATC	TTT	GGC	GTT	TGC	TAT	AGG	AAA	AAA	GGG	AAA	GCA	CTC	ACA	GCT	AAT	773	
Ile	Phe	Gly	Val	Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn		
230					235				240					245			
TTG	TGG	CAC	TGG	ATC	AAT	GAG	GCT	TGT	GGC	CGC	CTA	AGT	GGA	GAT	AAG	821	
Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys		
				250					255					260			
GAG	TCC	TCA	GGT	GAC	AGT	TGT	GTC	AGT	ACA	CAC	ACG	GCA	AAC	TTT	GGT	869	
Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly		
				265					270					275		20	
CAG	CAG	GGA	GCA	TGT	GAA	GGT	GTC	TTA	CTG	CTG	ACT	CTG	GAG	GAG	AAG	917	
Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys		
		280						285						290			
ACA	TTT	CCA	GAA	GAT	ATG	TGC	TAC	CCA	GAT	CAA	GGT	GGT	GTC	TGT	CAG	965	
Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	Gly	Gly	Val	Cys	Gln		
		295				300					305						
GGC	ACG	TGT	GTA	GGA	GGT	GGT	CCC	TAC	GCA	CAA	GGC	GAA	GAT	GCC	AGG	1013	
Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg		
310					315				320					325			
ATG	CTC	TCA	TTG	GTC	AGC	AAG	ACC	GAG	ATA	GAG	GAA	GAC	AGC	TTC	AGA	1061	30
Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg		
				330					335					340			
CAG	ATG	CCC	ACA	GAA	GAT	GAA	TAC	ATG	GAC	AGG	CCC	TCC	CAG	CCC	ACA	1109	
Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr		
				345					350					355			
GAC	CAG	TTA	CTG	TTC	CTC	ACT	GAG	CCT	GGA	AGC	AAA	TCC	ACA	CCT	CCT	1157	
Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro		
		360							365					370			
TTC	TCT	GAA	CCC	CTG	GAG	GTG	GGG	GAG	AAT	GAC	AGT	TTA	AGC	CAG	TGC	1205	
Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys		40
		375				380								385			
TTC	ACG	GGG	ACA	CAG	AGC	ACA	GTG	GGT	TCA	GAA	AGC	TGC	AAC	TGC	ACT	1253	
Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr		
390					395				400					405			
GAG	CCC	CTG	TGC	AGG	ACT	GAT	TGG	ACT	CCC	ATG	TCC	TCT	GAA	AAC	TAC	1301	
Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr		
				410					415					420			
TTG	CAA	AAA	GAG	GTG	GAC	AGT	GGC	CAT	TGC	CCG	CAC	TGG	GCA	GCC	AGC	1349	
Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	His	Trp	Ala	Ala	Ser		
				425					430					435		50	

CCC AGC CCC AAC TGG GCA GAT GTC TGC ACA GGC TGC CGG AAC CCT CCT	1397	
Pro Ser Pro Asn Trp Ala Asp Val Cys Thr Gly Cys Arg Asn Pro Pro		
440 445 450		
GGG GAG GAC TGT GAA CCC CTC GTG GGT TCC CCA AAA CGT GGA CCC TTG	1445	
Gly Glu Asp Cys Glu Pro Leu Val Gly Ser Pro Lys Arg Gly Pro Leu		
455 460 465		
CCC CAG TGC GCC TAT GGC ATG GGC CTT CCC CCT GAA GAA GAA GCC AGC	1493	
Pro Gln Cys Ala Tyr Gly Met Gly Leu Pro Pro Glu Glu Glu Ala Ser		
470 475 480 485		
AGG ACG GAG GCC AGA GAC CAG CCC GAG GAT GGG GCT GAT GGG AGG CTC	1541	10
Arg Thr Glu Ala Arg Asp Gln Pro Glu Asp Gly Ala Asp Gly Arg Leu		
490 495 500		
CCA AGC TCA GCG AGG GCA GGT GCC GGG TCT GGA AGC TCC CCT GGT GGC	1589	
Pro Ser Ser Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ser Ser Pro Gly Gly		
505 510 515		
CAG TCC CCT GCA TCT GGA AAT GTG ACT GGA AAC AGT AAC TCC ACG TTC	1637	
Gln Ser Pro Ala Ser Gly Asn Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe		
520 525 530		
ATC TCC AGC GGG CAG GTG ATG AAC TTC AAG GGC GAC ATC ATC GTG GTC	1685	20
Ile Ser Ser Gly Gln Val Met Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val		
535 540 545		
TAC GTC AGC CAG ACC TCG CAG GAG GGC GCG GCG GCG GCT GCG GAG CCC	1733	
Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln Glu Gly Ala Ala Ala Ala Ala Glu Pro		
550 555 560 565		
ATG GGC CGC CCG GTG CAG GAG GAG ACC CTG GCG CGC CGA GAC TCC TTC	1781	
Met Gly Arg Pro Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala Arg Arg Asp Ser Phe		
570 575 580		
GCG GGC AAC GGC CCG CGC TTC CCG GAC CCG TGC GGC GGC CCC GAG GGC	1829	
Ala Gly Asn Gly Pro Arg Phe Pro Asp Pro Cys Gly Gly Pro Glu Gly		
585 590 595		30
CTG CGG GAG CCG GAG AAG GCC TCG AGG CCG GTG CAG GAG CAA GGC GGC	1877	
Leu Arg Glu Pro Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln Gly Gly		
600 605 610		
GCC AAG GCT TGAGCGCCCC CCATGGCTGG GAGCCCGAAG CTCGGAGCCA	1926	
Ala Lys Ala		
615		
GGGCTCGCGA GGGCAGCACC GCAGCCTCTG CCCCAGCCCC GGCCACCCAG GGATCGATCG	1986	
GTACAGTCGA GGAAGACCAC CCGGCATTCT CTGCCCATT TGCCTTCCAG GAAATGGGCT	2046	
TTTCAGGAAG TGAATTGATG AGGACTGTCC CCATGCCAC GGATGCTCAG CAGCCCGCCG	2106	
CACTGGGGCA GATGTCTCCC CTGCCACTCC TCAAACCTCGC AGCAGTAATT TGTGGCACTA	2166	40
TGACAGCTAT TTTTATGACT ATCCTGTTCT GTGGGGGGGG GGTCTATGTT TTCCCCCAT	2226	
ATTTGTATTC CTTTTCATAA CTTTTCTTGA TATCTTTCCT CCCTCTTTTT TAATGTAAAG	2286	
GTTTTCTCAA AAATTCTCCT AAAGGTGAGG GTCTCTTTCT TTTCTCTTTT CCTTTTTTTT	2346	
TTCTTTTTTT GGCAACCTGG CTCTGGCCCA GGCTAGAGTG CAGTGGTGCG ATTATAGCCC	2406	
GGTGCAGCCT CTAACCTCTG GGCTCAAGCA ATCCAAGTGA TCCTCCCACC TCAACCTTCG	2466	
GAGTAGCTGG GATCACAGCT GCAGGCCACG CCCAGCTTCC TCCCCCGAC TCCCCCCCCC	2526	
CAGAGACACG GTCCACCAT GTTACCCAGC CTGGTCTCAA ACTCCCCAGC TAAAGCAGTC	2586	
CTCCAGCCTC GGCCTCCCAA AGTACTGGGA TTACAGGCGT GAGCCCCAC GCTGGCCTGC	2646	
TTTACGTATT TTCTTTTGTG CCCCTGCTCA CAGTGTTTTA GAGATGGCTT TCCAGTGTG	2706	
TGTTCAATTGT AAACACTTTT GGGAAAGGGC TAAACATGTG AGGCCTGGAG ATAGTTGCTA	2766	50

AGTTGCTAGG AACATGTGGT GGGACTTTCA TATTCTGAAA AATGTTCTAT ATTCTCATTT 2826
 TTCTAAAAGA AAGAAAAAAG GAAACCCGAT TTATTTCTCC TGAATCTTTT TAAGTTTGTG 2886
 TCGTTCCTTA AGCAGAACTA AGCTCAGTAT GTGACCTTAC CCGCTAGGTG GTTAATTTAT 2946
 CCATGCTGGC AGAGGCACTC AGGTACTTGG TAAGCAAATT TCTAAACTC CAAGTTGCTG 3006
 CAGCTTGGCA TTCTTCTTAT TCTAGAGGTC TCTCTGAAAA AGATGGAGAA AATGAACAGG 3066
 ACATGGGGCT CCTGGAAAGA AAGGGCCCGG GAAGTTCAAG GAAGAATAAA GTTGAAATTT 3126
 TAAAAAATAA 3136

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

(A) LENGTH: 616 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

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

20

30

40

50

275	280	285
Thr Leu Glu Glu Lys Thr	Phe Pro Glu Asp Met Cys Tyr Pro Asp Gln	
290	295	300
Gly Gly Val Cys Gln Gly Thr Cys Val Gly Gly Gly Pro Tyr Ala Gln		
305	310	315
Gly Glu Asp Ala Arg Met Leu Ser Leu Val Ser Lys Thr Glu Ile Glu		
325	330	335
Glu Asp Ser Phe Arg Gln Met Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Met Asp Arg		
340	345	350
Pro Ser Gln Pro Thr Asp Gln Leu Leu Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ser		
355	360	365
Lys Ser Thr Pro Pro Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp		
370	375	380
Ser Leu Ser Gln Cys Phe Thr Gly Thr Gln Ser Thr Val Gly Ser Glu		
385	390	395
Ser Cys Asn Cys Thr Glu Pro Leu Cys Arg Thr Asp Trp Thr Pro Met		
405	410	415
Ser Ser Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Glu Val Asp Ser Gly His Cys Pro		
420	425	430
His Trp Ala Ala Ser Pro Ser Pro Asn Trp Ala Asp Val Cys Thr Gly		
435	440	445
Cys Arg Asn Pro Pro Gly Glu Asp Cys Glu Pro Leu Val Gly Ser Pro		
450	455	460
Lys Arg Gly Pro Leu Pro Gln Cys Ala Tyr Gly Met Gly Leu Pro Pro		
465	470	475
Glu Glu Glu Ala Ser Arg Thr Glu Ala Arg Asp Gln Pro Glu Asp Gly		
485	490	495
Ala Asp Gly Arg Leu Pro Ser Ser Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly		
500	505	510
Ser Ser Pro Gly Gly Gln Ser Pro Ala Ser Gly Asn Val Thr Gly Asn		
515	520	525
Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met Asn Phe Lys Gly		
530	535	540
Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln Glu Gly Ala Ala		
545	550	555
Ala Ala Ala Glu Pro Met Gly Arg Pro Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala		
565	570	575
Arg Arg Asp Ser Phe Ala Gly Asn Gly Pro Arg Phe Pro Asp Pro Cys		
580	585	590
Gly Gly Pro Glu Gly Leu Arg Glu Pro Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val		
595	600	605
Gln Glu Gln Gly Gly Ala Lys Ala		
610	615	

10

20

30

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 8 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: not relevant

(D) TOPOLOGY: linear

50

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: FLAG(R)peptide
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 232 amino acids

10

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: not relevant

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(B) CLONE: IgG1 Fc mutein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

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

20

30

40

50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 31 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: not relevant
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: CMV (R2780 Leader)

(ix) FEATURE:

- (D) OTHER INFORMATION: Met1-Arg28 is the actual leader peptide; Arg29 strengthens the furin cleavage site; nucleotides encoding Thr30 and Ser31 add a Spe1 site.

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

Met Ala Arg Arg Leu Trp Ile Leu Ser Leu Leu Ala Val Thr Leu Thr
 1 5 10 15
 Val Ala Leu Ala Ala Pro Ser Gln Lys Ser Lys Arg Arg Thr Ser
 20 25 30

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1630 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Mus musculus

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (A) LIBRARY:
- (B) CLONE: RANKL

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 3..884

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

CC GGC GTC CCA CAC GAG GGT CCG CTG CAC CCC GCG CCT TCT GCA CCG 47
 Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro Ala Pro Ser Ala Pro
 1 5 10 15
 GCT CCG GCG CCG CCA CCC GCC GCC TCC CGC TCC ATG TTC CTG GCC CTC 95
 Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu
 20 25 30
 CTG GGG CTG GGA CTG GGC CAG GTG GTC TGC AGC ATC GCT CTG TTC CTG 143
 Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu
 35 40 45
 TAC TTT CGA GCG CAG ATG GAT CCT AAC AGA ATA TCA GAA GAC AGC ACT 191
 Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr

30

40

50

50	55	60	
CAC TGC TTT TAT AGA ATC CTG AGA CTC CAT GAA AAC GCA GAT TTG CAG	239		
His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Asp Leu Gln			
65	70	75	
GAC TCG ACT CTG GAG AGT GAA GAC ACA CTA CCT GAC TCC TGC AGG AGG	287		
Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg			
80	85	90	95
ATG AAA CAA GCC TTT CAG GGG GCC GTG CAG AAG GAA CTG CAA CAC ATT	335		
Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile			
100	105	110	10
GTG GGG CCA CAG CGC TTC TCA GGA GCT CCA GCT ATG ATG GAA GGC TCA	383		
Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser			
115	120	125	
TGG TTG GAT GTG GCC CAG CGA GGC AAG CCT GAG GCC CAG CCA TTT GCA	431		
Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala			
130	135	140	
CAC CTC ACC ATC AAT GCT GCC AGC ATC CCA TCG GGT TCC CAT AAA GTC	479		
His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val			
145	150	155	20
ACT CTG TCC TCT TGG TAC CAC GAT CGA GGC TGG GCC AAG ATC TCT AAC	527		
Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn			
160	165	170	175
ATG ACG TTA AGC AAC GGA AAA CTA AGG GTT AAC CAA GAT GGC TTC TAT	575		
Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr			
180	185	190	
TAC CTG TAC GCC AAC ATT TGC TTT CGG CAT CAT GAA ACA TCG GGA AGC	623		
Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser			
195	200	205	
GTA CCT ACA GAC TAT CTT CAG CTG ATG GTG TAT GTC GTT AAA ACC AGC	671		
Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser			30
210	215	220	
ATC AAA ATC CCA AGT TCT CAT AAC CTG ATG AAA GGA GGG AGC ACG AAA	719		
Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys			
225	230	235	
AAC TGG TCG GGC AAT TCT GAA TTC CAC TTT TAT TCC ATA AAT GTT GGG	767		
Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly			
240	245	250	255
GGA TTT TTC AAG CTC CGA GCT GGT GAA GAA ATT AGC ATT CAG GTG TCC	815		
Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser			
260	265	270	40
AAC CCT TCC CTG CTG GAT CCG GAT CAA GAT GCG ACG TAC TTT GGG GCT	863		
Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala			
275	280	285	
TTC AAA GTT CAG GAC ATA GAC TGAGACTCAT TTCGTGGAAC ATTAGCATGG	914		
Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp			
290			
ATGTCCTAGA TGTTTGAAAA CTTCTTAAAA AATGGATGAT GTCTATACAT GTGTAAGACT	974		
ACTAAGAGAC ATGGCCACG GTGTATGAAA CTCACAGCCC TCTCTCTTGA GCCTGTACAG	1034		
GTTGTGTATA TGTAAGTCC ATAGGTGATG TTAGATTCAT GGTGATTACA CAACGGTTTT	1094		
ACAATTTTGT AATGATTTCC TAGAATTGAA CCAGATTGGG AGAGGTATTC CGATGCTTAT	1154		50

GAAAACTTA CACGTGAGCT ATGGAAGGGG GTCACAGTCT CTGGGTCTAA CCCCTGGACA 1214
 TGTGCCACTG AGAACCTTGA AATTAAGAGG ATGCCATGTC ATTGCAAAGA AATGATAGTG 1274
 TGAAGGGTTA AGTTCTTTTG AATTGTTACA TTGCGCTGGG ACCTGCAAAT AAGTTCTTTT 1334
 TTTCTAATGA GGAGAGAAAA ATATATGTAT TTTTATATAA TGTCTAAAGT TATATTTTCAG 1394
 GTGTAATGTT TTCTGTGCAA AGTTTTGTAA ATTATATTTG TGCTATAGTA TTTGATTCAA 1454
 AATATTTAAA AATGTCTCAC TGTTGACATA TTTAATGTTT TAAATGTACA GATGTATTTA 1514
 ACTGGTGCAC TTTGTAATTC CCCTGAAGGT ACTCGTAGCT AAGGGGGCAG AATACTGTTT 1574
 CTGGTGACCA CATGTAGTTT ATTTCTTTAT TCTTTTAAAC TTAATAGAGT CTTTCAG 1630

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 294 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

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

20

30

40

50

Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe
 275 280 285
 Lys Val Gln Asp Ile Asp
 290

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 954 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Homo sapiens

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY:

(B) CLONE: huRANKL (full length)

(ix) FEATURE:

20

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..951

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

ATG CGC CGC GCC AGC AGA GAC TAC ACC AAG TAC CTG CGT GGC TCG GAG	48
Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu	
1 5 10 15	
GAG ATG GGC GGC GGC CCC GGA GCC CCG CAC GAG GGC CCC CTG CAC GCC	96
Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala	
20 25 30	
CCG CCG CCG CCT GCG CCG CAC CAG CCC CCC GCC GCC TCC CGC TCC ATG	144
Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met	
35 40 45	
TTC GTG GCC CTC CTG GGG CTG GGG CTG GGC CAG GTT GTC TGC AGC GTC	192
Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val	
50 55 60	
GCC CTG TTC TTC TAT TTC AGA GCG CAG ATG GAT CCT AAT AGA ATA TCA	240
Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser	
65 70 75 80	
GAA GAT GGC ACT CAC TGC ATT TAT AGA ATT TTG AGA CTC CAT GAA AAT	288
Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn	
85 90 95	
GCA GAT TTT CAA GAC ACA ACT CTG GAG AGT CAA GAT ACA AAA TTA ATA	336
Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile	
100 105 110	
CCT GAT TCA TGT AGG AGA ATT AAA CAG GCC TTT CAA GGA GCT GTG CAA	384
Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln	
115 120 125	
AAG GAA TTA CAA CAT ATC GTT GGA TCA CAG CAC ATC AGA GCA GAG AAA	432
Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys	
130 135 140	

30

40

50

50

65	70	75	80	
Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn				
	85	90	95	
Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile				
	100	105	110	
Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln				
	115	120	125	
Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys				
	130	135	140	
Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu				10
	145	150	155	160
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro				
	165	170	175	
Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly				
	180	185	190	
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val				
	195	200	205	
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His				
	210	215	220	
His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val				20
	225	230	235	240
Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met				
	245	250	255	
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe				
	260	265	270	
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu				
	275	280	285	
Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp				
	290	295	300	
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp				30
	305	310	315	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1878 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Murine

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (A) LIBRARY: Murine Fetal Liver Epithelium
- (B) CLONE: muRANK

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..1875

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

10

20

30

40

50

ATG GCC CCG CGC GCC CGG CGG CGC CGC CAG CTG CCC GCG CCG CTG CTG	48	
Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu		
1 5 10 15		
GCG CTC TGC GTG CTG CTC GTT CCA CTG CAG GTG ACT CTC CAG GTC ACT	96	
Ala Leu Cys Val Leu Leu Val Pro Leu Gln Val Thr Leu Gln Val Thr		
20 25 30		
CCT CCA TGC ACC CAG GAG AGG CAT TAT GAG CAT CTC GGA CGG TGT TGC	144	
Pro Pro Cys Thr Gln Glu Arg His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys		
35 40 45		
AGC AGA TGC GAA CCA GGA AAG TAC CTG TCC TCT AAG TGC ACT CCT ACC	192	10
Ser Arg Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Leu Ser Ser Lys Cys Thr Pro Thr		
50 55 60		
TCC GAC AGT GTG TGT CTG CCC TGT GGC CCC GAT GAG TAC TTG GAC ACC	240	
Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Thr		
65 70 75 80		
TGG AAT GAA GAA GAT AAA TGC TTG CTG CAT AAA GTC TGT GAT GCA GGC	288	
Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Ala Gly		
85 90 95		
AAG GCC CTG GTG GCG GTG GAT CCT GGC AAC CAC ACG GCC CCG CGT CGC	336	20
Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro Arg Arg		
100 105 110		
TGT GCT TGC ACG GCT GGC TAC CAC TGG AAC TCA GAC TGC GAG TGC TGC	384	
Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys		
115 120 125		
CGC AGG AAC ACG GAG TGT GCA CCT GGC TTC GGA GCT CAG CAT CCC TTG	432	
Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Phe Gly Ala Gln His Pro Leu		
130 135 140		
CAG CTC AAC AAG GAT ACG GTG TGC ACA CCC TGC CTC CTG GGC TTC TTC	480	
Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Thr Pro Cys Leu Leu Gly Phe Phe		
145 150 155 160		30
TCA GAT GTC TTT TCG TCC ACA GAC AAA TGC AAA CCT TGG ACC AAC TGC	528	
Ser Asp Val Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys		
165 170 175		
ACC CTC CTT GGA AAG CTA GAA GCA CAC CAG GGG ACA ACG GAA TCA GAT	576	
Thr Leu Leu Gly Lys Leu Glu Ala His Gln Gly Thr Thr Glu Ser Asp		
180 185 190		
GTG GTC TGC AGC TCT TCC ATG ACA CTG AGG AGA CCA CCC AAG GAG GCC	624	
Val Val Cys Ser Ser Ser Met Thr Leu Arg Arg Pro Pro Lys Glu Ala		
195 200 205		
CAG GCT TAC CTG CCC AGT CTC ATC GTT CTG CTC CTC TTC ATC TCT GTG	672	40
Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Val Leu Leu Leu Phe Ile Ser Val		
210 215 220		
GTA GTA GTG GCT GCC ATC ATC TTC GGC GTT TAC TAC AGG AAG GGA GGG	720	
Val Val Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly		
225 230 235 240		
AAA GCG CTG ACA GCT AAT TTG TGG AAT TGG GTC AAT GAT GCT TGC AGT	768	
Lys Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp Asn Trp Val Asn Asp Ala Cys Ser		
245 250 255		
AGT CTA AGT GGA AAT AAG GAG TCC TCA GGG GAC CGT TGT GCT GGT TCC	816	50
Ser Leu Ser Gly Asn Lys Glu Ser Ser Gly Asp Arg Cys Ala Gly Ser		

			260			265			270									
CAC	TCG	GCA	ACC	TCC	AGT	CAG	CAA	GAA	GTG	TGT	GAA	GGT	ATC	TTA	CTA	864		
His	Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Gln	Gln	Glu	Val	Cys	Glu	Gly	Ile	Leu	Leu			
			275			280			285									
ATG	ACT	CGG	GAG	GAG	AAG	ATG	GTT	CCA	GAA	GAC	GGT	GCT	GGA	GTC	TGT	912		
Met	Thr	Arg	Glu	Glu	Lys	Met	Val	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Gly	Val	Cys			
			290			295			300									
GGG	CCT	GTG	TGT	GCG	GCA	GGT	GGG	CCC	TGG	GCA	GAA	GTC	AGA	GAT	TCT	960		
Gly	Pro	Val	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Trp	Ala	Glu	Val	Arg	Asp	Ser			
			305			310			315						320			10
AGG	ACG	TTC	ACA	CTG	GTC	AGC	GAG	GTT	GAG	ACG	CAA	GGA	GAC	CTC	TCG	1008		
Arg	Thr	Phe	Thr	Leu	Val	Ser	Glu	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Asp	Leu	Ser			
			325			330			335									
AGG	AAG	ATT	CCC	ACA	GAG	GAT	GAG	TAC	ACG	GAC	CGG	CCC	TCG	CAG	CCT	1056		
Arg	Lys	Ile	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Thr	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro			
			340			345			350									
TCG	ACT	GGT	TCA	CTG	CTC	CTA	ATC	CAG	CAG	GGA	AGC	AAA	TCT	ATA	CCC	1104		
Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Gln	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Pro			
			355			360			365									
CCA	TTC	CAG	GAG	CCC	CTG	GAA	GTG	GGG	GAG	AAC	GAC	AGT	TTA	AGC	CAG	1152	20	
Pro	Phe	Gln	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln			
			370			375			380									
TGT	TTC	ACC	GGG	ACT	GAA	AGC	ACG	GTG	GAT	TCT	GAG	GGC	TGT	GAC	TTC	1200		
Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Glu	Ser	Thr	Val	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Asp	Phe			
			385			390			395						400			
ACT	GAG	CCT	CCG	AGC	AGA	ACT	GAC	TCT	ATG	CCC	GTG	TCC	CCT	GAA	AAG	1248		
Thr	Glu	Pro	Pro	Ser	Arg	Thr	Asp	Ser	Met	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Lys			
			405			410			415									
CAC	CTG	ACA	AAA	GAA	ATA	GAA	GGT	GAC	AGT	TGC	CTC	CCC	TGG	GTG	GTC	1296		
His	Leu	Thr	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Asp	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Val	Val		30	
			420			425			430									
AGC	TCC	AAC	TCA	ACA	GAT	GGC	TAC	ACA	GGC	AGT	GGG	AAC	ACT	CCT	GGG	1344		
Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Asp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Pro	Gly			
			435			440			445									
GAG	GAC	CAT	GAA	CCC	TTT	CCA	GGG	TCC	CTG	AAA	TGT	GGA	CCA	TTG	CCC	1392		
Glu	Asp	His	Glu	Pro	Phe	Pro	Gly	Ser	Leu	Lys	Cys	Gly	Pro	Leu	Pro			
			450			455			460									
CAG	TGT	GCC	TAC	AGC	ATG	GGC	TTT	CCC	AGT	GAA	GCA	GCA	GCC	AGC	ATG	1440		
Gln	Cys	Ala	Tyr	Ser	Met	Gly	Phe	Pro	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Met			
			465			470			475						480			40
GCA	GAG	GCG	GGA	GTA	CGG	CCC	CAG	GAC	AGG	GCT	GAT	GAG	AGG	GGA	GCC	1488		
Ala	Glu	Ala	Gly	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Arg	Ala	Asp	Glu	Arg	Gly	Ala			
			485			490			495									
TCA	GGG	TCC	GGG	AGC	TCC	CCC	AGT	GAC	CAG	CCA	CCT	GCC	TCT	GGG	AAC	1536		
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Asp	Gln	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Asn			
			500			505			510									
GTG	ACT	GGA	AAC	AGT	AAC	TCC	ACG	TTC	ATC	TCT	AGC	GGG	CAG	GTG	ATG	1584		
Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Met			
			515			520			525									
AAC	TTC	AAG	GGT	GAC	ATC	ATC	GTG	GTG	TAT	GTC	AGC	CAG	ACC	TCG	CAG	1632	50	

Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln
 530 535 540
 GAG GGC CCG GGT TCC GCA GAG CCC GAG TCG GAG CCC GTG GGC CGC CCT 1680
 Glu Gly Pro Gly Ser Ala Glu Pro Glu Ser Glu Pro Val Gly Arg Pro
 545 550 555 560
 GTG CAG GAG GAG ACG CTG GCA CAC AGA GAC TCC TTT GCG GGC ACC GCG 1728
 Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala His Arg Asp Ser Phe Ala Gly Thr Ala
 565 570 575
 CCG CGC TTC CCC GAC GTC TGT GCC ACC GGG GCT GGG CTG CAG GAG CAG 1776
 Pro Arg Phe Pro Asp Val Cys Ala Thr Gly Ala Gly Leu Gln Glu Gln 10
 580 585 590
 GGG GCA CCC CGG CAG AAG GAC GGG ACA TCG CGG CCG GTG CAG GAG CAG 1824
 Gly Ala Pro Arg Gln Lys Asp Gly Thr Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln
 595 600 605
 GGT GGG GCG CAG ACT TCA CTC CAT ACC CAG GGG TCC GGA CAA TGT GCA 1872
 Gly Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Thr Gln Gly Ser Gly Gln Cys Ala
 610 615 620
 GAA TGA 1878
 Glu
 625 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 625 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu
 1 5 10 15 30
 Ala Leu Cys Val Leu Leu Val Pro Leu Gln Val Thr Leu Gln Val Thr
 20 25 30
 Pro Pro Cys Thr Gln Glu Arg His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys
 35 40 45
 Ser Arg Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Leu Ser Ser Lys Cys Thr Pro Thr
 50 55 60
 Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Thr
 65 70 75 80
 Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Ala Gly
 85 90 95 40
 Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro Arg Arg
 100 105 110
 Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys
 115 120 125
 Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Phe Gly Ala Gln His Pro Leu
 130 135 140
 Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Thr Pro Cys Leu Leu Gly Phe Phe
 145 150 155 160
 Ser Asp Val Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys
 165 170 175 50

Thr Leu Leu Gly Lys Leu Glu Ala His Gln Gly Thr Thr Glu Ser Asp
 180 185 190
 Val Val Cys Ser Ser Ser Met Thr Leu Arg Arg Pro Pro Lys Glu Ala
 195 200 205
 Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Val Leu Leu Leu Phe Ile Ser Val
 210 215 220
 Val Val Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly
 225 230 235 240
 Lys Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp Asn Trp Val Asn Asp Ala Cys Ser
 245 250 255
 Ser Leu Ser Gly Asn Lys Glu Ser Ser Gly Asp Arg Cys Ala Gly Ser
 260 265 270
 His Ser Ala Thr Ser Ser Gln Gln Glu Val Cys Glu Gly Ile Leu Leu
 275 280 285
 Met Thr Arg Glu Glu Lys Met Val Pro Glu Asp Gly Ala Gly Val Cys
 290 295 300
 Gly Pro Val Cys Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Glu Val Arg Asp Ser
 305 310 315 320
 Arg Thr Phe Thr Leu Val Ser Glu Val Glu Thr Gln Gly Asp Leu Ser
 325 330 335
 Arg Lys Ile Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Thr Asp Arg Pro Ser Gln Pro
 340 345 350
 Ser Thr Gly Ser Leu Leu Leu Ile Gln Gln Gly Ser Lys Ser Ile Pro
 355 360 365
 Pro Phe Gln Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln
 370 375 380
 Cys Phe Thr Gly Thr Glu Ser Thr Val Asp Ser Glu Gly Cys Asp Phe
 385 390 395 400
 Thr Glu Pro Pro Ser Arg Thr Asp Ser Met Pro Val Ser Pro Glu Lys
 405 410 415
 His Leu Thr Lys Glu Ile Glu Gly Asp Ser Cys Leu Pro Trp Val Val
 420 425 430
 Ser Ser Asn Ser Thr Asp Gly Tyr Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Gly
 435 440 445
 Glu Asp His Glu Pro Phe Pro Gly Ser Leu Lys Cys Gly Pro Leu Pro
 450 455 460
 Gln Cys Ala Tyr Ser Met Gly Phe Pro Ser Glu Ala Ala Ala Ser Met
 465 470 475 480
 Ala Glu Ala Gly Val Arg Pro Gln Asp Arg Ala Asp Glu Arg Gly Ala
 485 490 495
 Ser Gly Ser Gly Ser Ser Pro Ser Asp Gln Pro Pro Ala Ser Gly Asn
 500 505 510
 Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met
 515 520 525
 Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln
 530 535 540
 Glu Gly Pro Gly Ser Ala Glu Pro Glu Ser Glu Pro Val Gly Arg Pro
 545 550 555 560
 Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala His Arg Asp Ser Phe Ala Gly Thr Ala
 565 570 575

10

20

30

40

50

Pro Arg Phe Pro Asp Val Cys Ala Thr Gly Ala Gly Leu Gln Glu Gln
 580 585 590
 Gly Ala Pro Arg Gln Lys Asp Gly Thr Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln
 595 600 605
 Gly Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Thr Gln Gly Ser Gly Gln Cys Ala
 610 615 620
 Glu
 625

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16: 10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly
 20

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 5 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

Asp Tyr Lys Asp Glu
 5

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 6 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

His His His His His His
 5

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 33 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

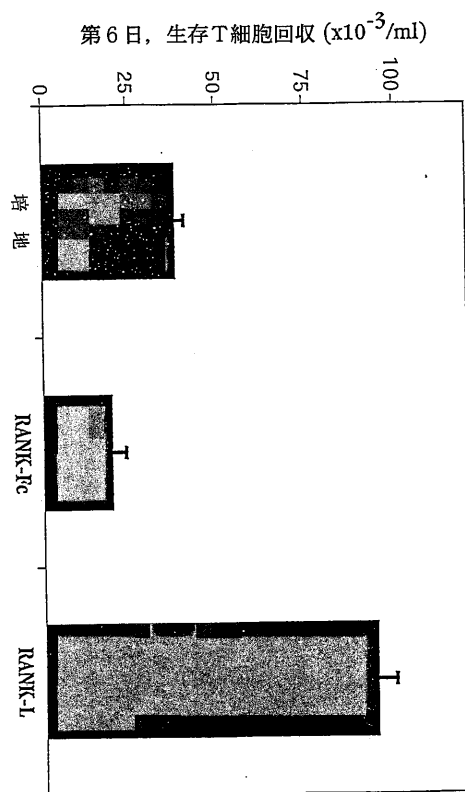
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile
 1 5 10 15

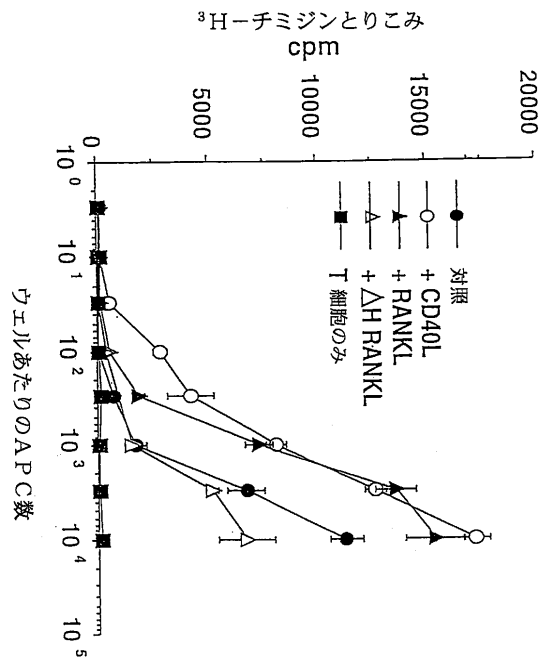
50

Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu
 20 25 30
 Arg

【図 1】



【図 3】



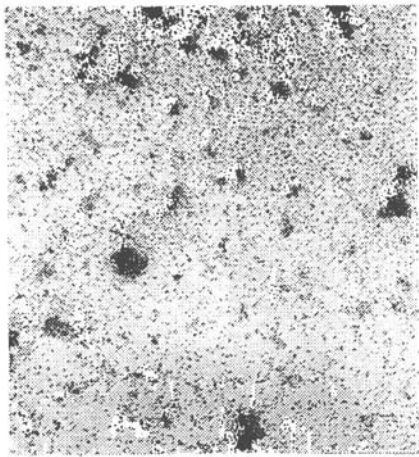
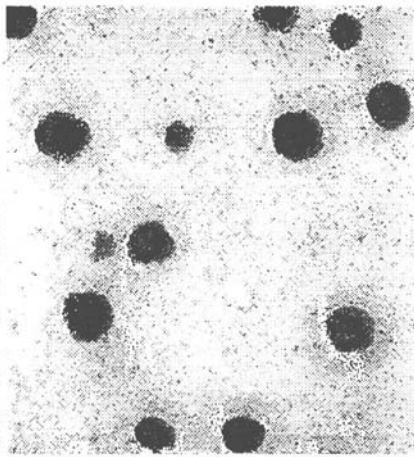
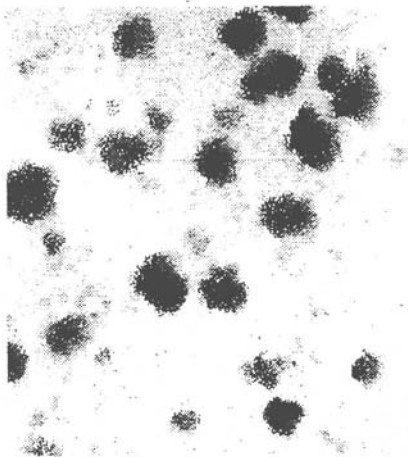
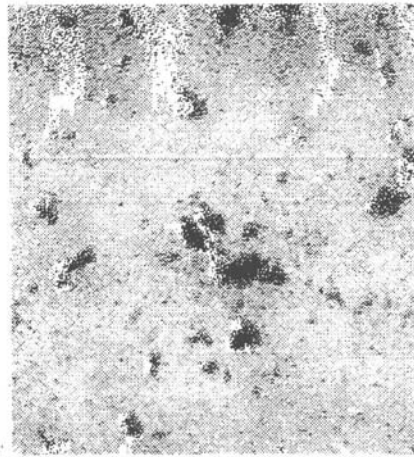
【 図 5 - 1 】

[illegible][illegible]

【 図 5 - 2 】

[illegible]

【図 2】

*Fig. 2A**Fig. 2B**Fig. 2C**Fig. 2D*

フロントページの続き

- (74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
- (74)代理人 100107386
弁理士 泉谷 玲子
- (72)発明者 アンダーソン, ダーク・エム
アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 0 7, シアトル, ノースウエスト・シックスティフォース・ストリート 3 6 1 6
- (72)発明者 ガリバート, ローレント・ジェイ
アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 1 9, シアトル, フィフス・アベニュー・ウエスト 6 1 7
- (72)発明者 マラスコフスキー, ユージーン
オーストラリア連邦ヴィクトリア 3 1 6 1, コールフィールド・ノース, ノーウッド・ロード 4 0

審査官 左海 匡子

- (56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 9 2 1 0 6 (WO, A 1)
特表 2 0 0 2 - 5 0 9 4 3 0 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 - C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0
 - BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN)
 - GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
 - UniProt / GeneSeq
 - Science Direct
 - JSTPlus (JDreamII)
 - JMEDPlus (JDreamII)
 - JST7580 (JDreamII)
 - 医学・薬学予稿集全文データベース