

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-508043

(P2004-508043A)

(43) 公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 368 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-525769 (P2002-525769)	(71) 出願人	500203709
(86) (22) 出願日	平成13年9月5日 (2001.9.5)		アムジェン インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月4日 (2003.3.4)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/027631		2 O, サウザンド オークス, ワン
(87) 国際公開番号	W02002/020762		アムジェン センター ドライブ
(87) 国際公開日	平成14年3月14日 (2002.3.14)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/230, 191		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成12年9月5日 (2000.9.5)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	セイル, ラース アイド
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3
			6 O, サウザンド オークス, カレ
			ボレーゴ 1 8 7 4
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T N F レセプター様分子およびその使用

(57) 【要約】

新規の M K 6 1 ポリペプチド分子およびこれらのタンパク質をコードする核酸分子。本発明はまた、ベクター、宿主、選択的因子、および M K 6 1 ポリペプチドを産生するための方法を提供する。M K 6 1 ポリペプチドを使用して、疾患の、処置、診断、改善または予防のための方法もまた、提供される。M K 6 1 様ポリペプチドを調節する天然の分子または合成分子は、1つ以上のスクリーニングアッセイ（例えば、本明細書において記載されるアッセイ）を用いて同定され得る。このような分子は、エキソビボ様式、または注射によるインビボ様式、または経口送達、移植装置などのいずれかによって投与され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：

- (a) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13 または配列番号 15 に示されるヌクレオチド配列；
 - (b) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13 または配列番号 15 の M K 6 1 コード部分；
 - (c) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 - (d) (a) または (b) の相補体に中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および
 - (e) (a) ～ (d) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

10

【請求項 2】

単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：

- (a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドに少なくとも約 70% 同一性を示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
 - (b) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13 または配列番号 15 に示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
 - (c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13 もしくは配列番号 15、(a) または (b) のヌクレオチド配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
 - (d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13 または配列番号 15、あるいは (a) ～ (c) のヌクレオチド配列；
 - (e) (a) ～ (d) のいずれかの相補体に中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、そのポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および
 - (f) (a) ～ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

20

30

40

【請求項 3】

単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：

- (a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に

50

示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、そのポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、そのポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む (a) ～ (e) のヌクレオチド配列；

(g) (a) ～ (f) のいずれかの相補体に中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、そのポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(h) (a) ～ (e) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 4】

請求項 1、2 または 3 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 6】

真核生物細胞である、請求項 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

原核生物細胞である、請求項 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 8】

MK61 ポリペプチドを産生するプロセスであって、請求項 5 に記載の宿主細胞を、該ポリペプチドを発現するのに適切な条件下で培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のプロセスによって産生された、単離されたポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 8 に記載のプロセスであって、前記核酸分子は、該 MK61 ポリペプチドをコード

10

20

30

40

50

するヌクレオチド配列に作動可能に連結された、ネイティブなMK61ポリペプチドについてのプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、プロセス。

【請求項11】

請求項2に記載の単離された核酸分子であって、ここで、前記同一性パーセントが、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、Best FitおよびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される、核酸分子。

【請求項12】

MK61ポリペプチドの活性または産生の、候補インヒビターを同定するプロセスであって、該プロセスは、請求項5、6、または7に記載の細胞を該候補インヒビターに曝露する工程、該細胞におけるMK61ポリペプチドの活性または産生を測定する工程、および該候補インヒビターに曝露した細胞中のMK61の活性と、該候補インヒビターに曝露していない細胞中の活性とを比較する工程、を包含する、プロセス。

10

【請求項13】

MK61ポリペプチドの活性または産生の、候補刺激因子を同定するプロセスであって、該プロセスは、請求項5、6、または7に記載の細胞を候補刺激因子に曝露する工程、該細胞におけるMK61ポリペプチドの活性候補を測定する工程、および該候補刺激因子に曝露した細胞中のMK61の活性と該刺激因子に曝露していない細胞中の活性とを比較する工程を包含する、プロセス。

【請求項14】

配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

20

【請求項15】

単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるポリペプチドの成熟形態を含むアミノ酸配列であって、必要に応じてさらに、アミノ末端メチオニンを含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のオルソログのアミノ酸配列であって、ここで、このオルソログは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

30

(c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のアミノ酸配列に対して、少なくとも約70%同一性を示すアミノ酸配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるポリペプチドの活性を有する、フラグメント；ならびに

40

(e) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、もしくは配列番号16または(a)～(c)の少なくとも1つに示されるアミノ酸配列のいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、

50

ポリペプチド。

【請求項 16】

単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：

(a) 少なくとも 1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるアミノ酸配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも 1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも 1つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列であって、ここで、そのポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1つの改変を有する、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるアミノ酸配列であって、ここで、そのポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、

ポリペプチド。

【請求項 17】

請求項 15 または請求項 16 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10 または配列番号 12 の位置 38 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 18】

請求項 15 または請求項 16 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10 または配列番号 12 の位置 39 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 19】

請求項 15 または請求項 16 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10 または配列番号 12 の位置 51 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 20】

請求項 15 または請求項 16 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 2、または配列番号 6 の位置 60 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 21】

請求項 15 または請求項 16 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 2 または配列番号 6 の位置 76 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 1 4 または配列番号 1 6 の位置 4 1 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 2 3】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 1 4 または配列番号 1 6 の位置 4 2 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 2 4】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 1 4 または配列番号 1 6 の位置 5 4 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。 10

【請求項 2 5】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 1 4 または配列番号 1 6 の位置 6 3 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 2 6】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 1 4 または配列番号 1 6 の位置 7 9 にあるアミノ酸は、システイン、セリンまたはアラニンである、ポリペプチド。 20

【請求項 2 7】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 2 の位置 1 7 1 にあるアミノ酸は、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはフェニルアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 2 8】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 2 の位置 1 7 2 にあるアミノ酸は、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはフェニルアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 2 9】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 1 4 または配列番号 1 6 の位置 1 7 8 にあるアミノ酸は、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはフェニルアラニンである、ポリペプチド。 30

【請求項 3 0】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドであって、ここで、配列番号 1 4 または配列番号 1 6 の位置 1 8 0 にあるアミノ酸は、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、アラニンまたはフェニルアラニンである、ポリペプチド。

【請求項 3 1】

請求項 1、2、または 3 に記載の核酸分子によって、コードされる、単離されたポリペプチド。 40

【請求項 3 2】

請求項 1 5 に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、前記同一性パーセントが、G A P、B L A S T P、B L A S T N、F A S T A、B L A S T A、B L A S T X、B e s t F i t および S m i t h - W a t e r m a n アルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される、ポリペプチド。

【請求項 3 3】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、または配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含むペプチドで動物を免疫することによって産生された、抗体。 50

【請求項 3 4】

請求 1 4、1 5 または 1 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項 3 5】

モノクローナル抗体である、請求項 3 4 に記載の抗体。

【請求項 3 6】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、または配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含むペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項 3 7】

サンプル中の M K 6 1 ポリペプチドの検出または M K 6 1 ポリペプチドの定量を行う方法であって、該方法は、M K 6 1 を含有すると推測されるサンプルと、抗 M K 6 1 抗体または請求項 3 3、3 4 もしくは 3 5 のいずれかに記載の抗体フラグメントとを接触させる工程、および該抗体または該抗体フラグメントの結合を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 3 8】

少なくとも 1 つのポリペプチドを特異的に結合する選択的結合因子またはそのフラグメントであって、該ポリペプチドは、以下：

(a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、または配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列；および

(b) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、または配列番号 1 6 の少なくとも 1 つに示されるアミノ酸配列の、少なくとも約 2 5 アミノ酸のフラグメント；ならびに

(c) (a) または (b) の天然に存在する改変体

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、

選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 3 9】

抗体またはそのフラグメントである、請求項 3 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 4 0】

ヒト化抗体である、請求項 3 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 4 1】

ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項 3 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 4 2】

ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 3 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 4 3】

モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 3 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 4 4】

キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 3 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 4 5】

相補性決定領域 C D R 0 グラフト化抗体またはそのフラグメントである、請求項 3 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 4 6】

抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項 3 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 4 7】

抗体可変領域フラグメントである、請求項 3 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 4 8】

F a b フラグメントまたは F a b ' フラグメントである、請求項 3 8 に記載の可変領域フラグメント。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

選択的結合因子またはそのフラグメントであって、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する特異性を有する、少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 50】

検出可能な標識が結合されている、請求項 38 に記載の選択的結合因子。

【請求項 51】

MK 61 ポリペプチドの生物学的活性のアンタゴニストまたはアゴニストである、請求項 38 に記載の選択的結合因子。

10

【請求項 52】

疾患、状態または障害を、処置、予防または改善するための方法であって、請求項 38 に記載の選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 53】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 からなる群より選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって産生された、選択的結合因子。

【請求項 54】

請求項 1、2 または 3 に記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。

20

【請求項 55】

請求項 14、15、または 16 に記載のポリペプチド、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 56】

前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、可溶化剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項 55 に記載の組成物。

【請求項 57】

前記ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチドの成熟形態を含む、請求項 55 に記載の組成物。

30

【請求項 58】

請求項 14、15、または 16 に記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項 59】

水溶性ポリマーで共有結合的に改変されている、請求項 58 に記載のポリペプチド。

【請求項 60】

請求項 51 に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

40

【請求項 61】

請求項 1、2 または 3 に記載の核酸分子、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 62】

前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項 61 に記載の組成物。

【請求項 63】

請求項 1、2 または 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項 64】

異種アミノ酸配列に融合された、請求項 14、15、または 16 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む、ポリペプチド。

50

【請求項 65】

前記異種アミノ酸配列が、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項 64 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 66】

配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含む、融合ポリペプチド。

【請求項 67】

配列番号 39 に記載のアミノ酸配列を含む、融合ポリペプチド。

【請求項 68】

MK61 ポリペプチドのレベルの増加により生じる哺乳動物の医学的状態を、処置、予防または改善するための方法であって、該方法は、該哺乳動物に治療有効量のアンタゴニストを投与する工程であって、該アンタゴニストが、選択的結合因子、低分子、ペプチド、ペプチド誘導体およびアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる群より選択される、工程を包含する、方法。 10

【請求項 69】

MK61 ポリペプチドのレベルの減少により生じる哺乳動物の医学的状態を、処置、予防または改善するための方法であって、該方法は、該哺乳動物に治療有効量のポリペプチドを投与する工程であって、該ポリペプチドは、請求項 14、15、もしくは 16 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求項 1、2、または 3 のいずれに記載される核酸によってコードされるポリペプチドである、工程を包含する、方法。

【請求項 70】

MK61 ポリペプチドの異常なレベルによって引き起こされるか、または MK61 ポリペプチドの異常なレベルから生じる、被験体における病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下： 20

(a) サンプル中の請求項 14、15 もしくは 16 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または請求項 1、2 もしくは 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現の存在または量を決定する工程；および

(b) 正常被験体または異なる時刻における該被験体由来の、生物学的サンプル、組織サンプルまたは細胞サンプル中の MK61 ポリペプチドのレベルを比較する工程であって、ここで、病理学的状態に対する感受性が該ポリペプチドの発現の存在または量に基く、工程 30

を包含する、方法。

【請求項 71】

デバイスであって、以下：

(a) 移植に適合性の膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞、
を備え、ここで、該細胞は、請求項 14、15 または 16 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを分泌し、そして、ここで、該膜は、該ポリペプチドに対して透過性である、デバイス。

【請求項 72】

デバイスであって、以下： 40

(a) 移植に適合性の膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された MK61 ポリペプチド、
を備え、ここで、該膜は、該ポリペプチドに対して透過性である、デバイス。

【請求項 73】

ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、
該方法は、以下：

(a) 請求項 14、15、または 16 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと化合物とを接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該ポリペプチドの結合の程度を決定する工程
を包含する、方法。 50

【請求項 7 4】

動物におけるポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項 1、2 または 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 7 5】

哺乳動物における M K 6 1 レセプター活性を阻害する方法であって、該方法は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 36 および配列番号 39 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドを投与する工程を包含する、方法。

【請求項 7 6】

哺乳動物における M K 6 1 リガンド活性を阻害する方法であって、該方法は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 36 および配列番号 39 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチドを投与する工程を包含する、方法。 10

【請求項 7 7】

M K 6 1 レセプターシグナル伝達のネガティブ調節因子を投与する工程を包含する、哺乳動物における免疫応答を刺激する方法。

【請求項 7 8】

請求項 7 7 に記載の方法であって、ここで、前記ネガティブ調節因子が、融合タンパク質、抗体、低分子、ペプチドおよびペプチド誘導体からなる群より選択される、方法。

【請求項 7 9】

請求項 7 8 に記載の方法であって、ここで、前記融合タンパク質が配列番号 16、36、または 39 に記載のアミノ酸配列を含む、方法。 20

【請求項 8 0】

M K 6 1 レセプターのシグナル伝達のポジティブ調節因子を投与する工程を包含する、免疫応答を阻害する方法。

【請求項 8 1】

請求項 8 0 に記載の方法であって、ここで、前記ポジティブ調節因子が、融合タンパク質、抗体、低分子、ペプチドおよびペプチド誘導体からなる群より選択される、方法。

【請求項 8 2】

細胞表面結合 M K 6 1 リガンドを介する逆シグナル伝達を刺激する方法であって、該方法が、M K 6 1 リガンド逆シグナル伝達のポジティブ調節因子を投与する工程、包含する、方法。 30

【請求項 8 3】

請求項 8 4 に記載の方法であって、ここで、前記ポジティブ調節因子が、融合タンパク質、抗体、低分子、ペプチドおよびペプチド誘導体からなる群より選択される、方法。

【請求項 8 4】

請求項 8 3 に記載の方法であって、ここで、前記融合タンパク質が、配列番号 16、配列番号 36、または配列番号 39 のアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 8 5】

細胞表面結合 M K 6 1 リガンドを介する逆シグナル伝達を阻害する方法であって、該方法が、M K 6 1 リガンド逆シグナル伝達のネガティブ調節因子を投与する工程、を包含する、方法。 40

【請求項 8 6】

請求項 8 7 に記載の方法であって、ここで、前記ネガティブ調節因子が、融合タンパク質、抗体、低分子、ペプチドおよびペプチド誘導体からなる群より選択される、方法。

【請求項 8 7】

哺乳動物における、B 細胞および T 細胞のリンパ増殖性障害を処置する方法であって、該方法は、治療有効量の、M K 6 1 - F c 融合タンパク質、抗 M K - 6 1 抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、M K 6 1 リガンド、または抗 M K 6 1 リガンド抗体を、該哺乳動物に投与する工程、を包含する、方法。 50

【請求項 88】

請求項 87 に記載の方法であって、ここで、前記リンパ増殖性障害が、白血病、骨髄腫、Bリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫である、方法。

【請求項 89】

自己免疫疾患を処置する方法であって、該方法は、治療有効量の、MK61-Fc 融合タンパク質、抗MK-61 抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、MK61 リガンド、または抗MK61 リガンド抗体を、該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 90】

請求項 89 に記載の方法であって、ここで前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (SLE)、腸管性腸疾患、またはクローン病である、方法。

10

【請求項 91】

炎症性疾患を処置する方法であって、該方法は、治療有効量の、MK61-Fc 融合タンパク質、抗MK-61 抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、MK61 リガンド、または抗MK61 リガンド抗体を、哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 92】

請求項 91 に記載の方法であって、ここで、前記炎症性疾患が、慢性関節リウマチ、敗血症、腸管性腸疾患、またはクローン病である、方法。

【請求項 93】

配列番号 36 のシステインリッチドメインである残基 26 ~ 60 を含むアミノ酸配列を有する、ポリペプチドフラグメント。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、2000 年 9 月 5 日付けで出願された米国仮特許出願番号第 60 / 230, 191 号（これは、本明細書中において、全体が参考として援用される）の利益を主張する。

【0002】

（発明の分野）

本発明は、新規な TNF レセプター (TNF r) 様ポリペプチド（本明細書中において、「MK61」と呼称する）およびこれをコードする核酸分子に関する。

【0003】

本発明はまた、MK61 ポリペプチドを産生するための、ベクター、宿主細胞、薬学的組成物、選択的結合因子、および方法に関する。MK61 ポリペプチドと関連する疾患の診断、処置、改善、および／または予防のための方法もまた提供される。

30

【0004】

（発明の背景）

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノム解読は、ヒトゲノム解読に基く新規治療剤の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ解析と合わされて、ゲノムの一部および全体へと重複配列を構築（アセンブリ）すること、ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知のアミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較によって、以前に同定された配列および／または構造的な目印に対して相同性の程度を決定することが可能である。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現によって、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物が提供される。核酸分子およびコードされるポリペプチドを操作して、その改変体および誘導体を作製することによって、治療剤としての用途のための生成物に有利な特性を与え得る。

40

【0005】

過去 10 年間にわたるゲノム研究における顕著な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に関する可能性は、未だほとんど実現されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子または（治療分子に対して「標的」としてはたらき得る）ポリペプチドをコードする遺伝子は、未だ同定されていない。

50

【0006】

従って、診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【0007】

腫瘍の壊死に関する数年の研究の後、腫瘍壊死因子 (TNF) α および腫瘍壊死因子 β が、1984年に、ついにクローニングされた。これに続く数年間は、以下を含むTNFサイトカインのスーパーファミリーの出現の場となった：fasリガンド (FasL)、CD27リガンド (CD27L)、CD30リガンド (CD30L)、CD40リガンド (CD40L)、TNF関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL, これはまた、AGP-1として示される)、オステオプロテゲリン結合タンパク質 (OPG-BPまたはOPGリガンド)、4-1BBリガンド、LIGHT、APRIL、およびTALL-1 (Smithら (1994), Cell, 76: 959-962; Laceyら (1998), Cell, 93: 165-176; Chichepoticheら (1997), J. Biol. Chem., 272: 32401-32410; Mauriら (1998), Immunity, 8: 21-30; Hahneら (1998), J. Exp. Med., 188: 1185-90; Shuら (1999), J. Leukocyte Biology, 65: 680-3)。このファミリーは、その構造、特にC末端における構造によって、1つにまとめられる。さらに、これまでに知られているほとんどのメンバーは、免疫画分において発現されるが、いくつかのメンバーはまた、他の組織または器官でも同様に発現される (Smithら (1994), Cell 76: 959-62)。全てのリガンドメンバー (LT- α は除外する) は、II型膜貫通タンパク質であって、これらは、C末端細胞外ドメイン内の保存された150アミノ酸の領域によって特徴付けられる。わずか20~25%の同一性に限定されていることが、この保存された150アミノ酸のドメインは、特徴的な β プリーツシートサンドイッチ (β -pleated sheet sandwich) に折り畳まれ、そして3量体化する。この保存された領域は、タンパク質分解によって放出され、これにより、可溶性の機能的形態を生じ得る (Bannerら (1993), Cell, 73: 431-445)。

【0008】

このリガンドファミリーの中の多くのメンバーは、リンパの多い組織において発現され、そして免疫系の発達および調節において重要な役割を果たす (Smithら (1994))。例えば、TNF α は、マクロファージによって主に合成され、そして、このTNF α は、炎症性応答および免疫防御のための重要な伝達物質である (TraceyおよびCerami (1994), Annu. Rev. Med., 45: 491-503)。FasL (これは、活性化T細胞において優勢に発現している) は、胸腺細胞のTCR媒介性アポトーシスを調節する (Nagataら (1995) Immunology Today, 16: 39-43; Castrimら (1996), Immunity, 5: 617-27)。CD40Lは、B細胞の生存、増殖、および免疫グロブリンアイソタイプスイッチに必須のシグナルを提供する (Noelle (1996), Immunity, 4: 415-9)。

【0009】

TNFリガンドファミリーのメンバーの大部分についての同族 (cognate) レセプターが同定された。これらのレセプターは、それらの細胞外ドメインにおいて特徴的な複数のシステインリッチ反復を共有し、そして細胞質領域内の触媒モチーフを有さない (Smithら (1994))。TNFRのホモログ (すなわち、Fas、TNFR1、DR3、DR4、DR5、およびDR6) のうちの2つのサブグループは、細胞内デスドメイン (death domain) を含み、このドメインはTRADまたはFADDに結合する。この結合によって、カスパーゼ8の活性化およびアポトーシスを生じる (Locksleyら (2001) Cell 104: 487-501)。しかし、デスレセプター (death-receptor) を介するシグナル伝達はまた、肝細胞およびT細胞の増殖のために必要とされ得る (Strasserら (1999) Intl. J. Bioc

hem. Cell Biol. 31: 533-537, Yamadaら(1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 94: 1441-6)。TNFR2、CD40、またはCD30を含む他のグループは、これらの表面レセプターを下流のシグナル伝達カスケードにつなぐ分子アダプターであるTNFレセプター結合因子(TRAFF)(TNF-Receptor Associated Factor)に結合する。この結合によって、細胞増殖および細胞生存を促進し得る、JNKおよびNFkBに活性化を生じる。従って、これらのタンパク質は、形態形成、アポトーシスの制御、分化または、増殖において重大な役割を果たす。TNF/TNFRスーパーファミリーのタンパク質は、アテローム性動脈硬化症、同種移植拒絶、関節炎、および癌のような多くのヒト疾患に対する治療のための標的として、現在、広範に研究がなされている。Locksleyら(2001), Williamsら(2000), Ann. Rheum. Dis. 59: i75-80。 10

【0010】

上記の膜結合レセプター分子に加えて、TNFレセプタースーパー遺伝子ファミリーに属する多くのレセプターは、可溶性リガンド結合タンパク質として存在する。その後、膜貫通レセプターの可溶性形態の多くのものは、このレセプターの細胞外リガンド結合ドメインのみを含むとして同定された。例えば、可溶性形態のTNFレセプターは、尿および血清において見出され(米国特許第5,843,789号およびNopharら, EMBO J., 9(10): 3269-3278, 1990を参照のこと)、そして、この可溶性形態のTNFレセプターは、細胞表面のTNFレセプターのタンパク質分解性切断によって生じることが示された(Wallachら, Agents Actions Suppl., 35: 51-57, 1991)。これらの可溶性形態のレセプター分子は、レセプターへのTNF結合を阻害のみならず、このTNF構造を安定化し、そしてその活性を保持し、従ってその効果を延長することによって、TNF活性の調節に関与する(Aderkara, Cytokine & Growth Factor Reviews, 7(3): 231-240, 1996)。 20

【0011】

この腫瘍壊死因子スーパーファミリーのリガンドおよび細胞表面レセプターのメンバーは、免疫機能を調節し、そしてほとんどのTNF/TNFRスーパーファミリータンパク質(例えば、2~3例挙げると、FASL/FAS、CD40L/CD40、TNF/TNFR、またはLTβ/LTβR)は、この免疫系協調的(coordinate)な免疫細胞のホメオスタシス、活性誘導性細胞死、T細胞初回免疫、樹状細胞の機能および生存、または胚中心およびリンパ器官(例えば、パイアー斑およびリンパ節)の形成の場合)において発現される(Fuら(1999), Ann. Rev. Immunol. 17: 399-433, Grewalら(1998), Ann. Rev. Immunol. 166: 111-135)。最近、この大きなファミリーの新規のメンバーが、免疫における重要な機能を有し、そしてリンパ系細胞と他の器官系(例えば、妊娠時の骨形態形成および乳腺形成)とをつなぐことが同定された。 30

【0012】

免疫系および種々の疾患プロセスにおける、このTNFファミリーのリガンドおよびそれらのレセプター(膜結合型および可溶型)のメンバーが担う重要な役割に起因して、診断および治療を改善する用途のために、これらのファミリーの新規のメンバーを同定し、そして特徴付けるという必要性が存在する。 40

【0013】

(発明の要旨)

本発明は、新規のMK61核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0014】

本発明に従って、以下の多くのヒトMK61アイソフォームが本明細書中に記載される: 「hMK61T1」、「hMK61T2」、「hMK61T3」、「hMK61T4」、「hMK61T5」、および「hMK61T6」。さらに、マウスのアイソフォーム(「 50

mMK61」) およびそのFc融合ポリペプチド(「mMK61-Fc」および「hMK61-Fc」)が、本明細書中に記載される。

【0015】

本発明は、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：

- (a) 配列番号(SEQ ID NO：)1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13または配列番号15に記載のヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- (c) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)または(b)の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここでこのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに
- (d) (a)～(c)のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。

10

【0016】

本発明はまた、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：

- (a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドに対して、少なくとも約70、75、80、85、90、95、96、97、98または99%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでこのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13または配列番号15に記載のヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、ここでこのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1、(a)または(b)のヌクレオチド配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (d) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のいずれかに記載されるアミノ酸配列の中で、少なくとも1つのアミノ酸置換および／またはアミノ酸欠失を有する、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (e) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1または(a)～(d)のヌクレオチド配列；
- (f) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(e)のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここでこのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに
- (g) (a)～(e)のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。

20

30

40

【0017】

50

本発明はさらに、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでこのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでこのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでこのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端および／またはN末端の短縮を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでこのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮およびN末端短縮からなる群から選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでそのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a)～(e)のヌクレオチド配列；

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここでそのコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)～(e)のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。

【0018】

本発明はまた、本明細書中に記載の単離された核酸分子を含む発現ベクター；このベクターを含む（真核生物および／または原核生物の）組換え宿主細胞；h2520ポリペプチドを産生するプロセスであって、この宿主細胞を適切な条件下で培養して、このポリペプチドを発現させる工程および必要に応じてこの培養物からこのポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス；ならびにこのプロセスによって産生された単離されたポリペプチド、を提供する。このプロセスにおいて使用される核酸分子はまた、MK61ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された、ネイティブMK61ポリペプチドのプロモーターDNA以外のプロモーターを含み得る。

【0019】

本発明はまた、同一性パーセントが、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFitおよびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータプログラムを使用して決定される、上の段落に記載の核酸分子を提供する。

【0020】

本発明は、MK61ポリペプチドの活性または産生の候補インヒビターおよび／または候補刺激因子を同定するためのプロセスを提供し、このプロセスは、宿主細胞を候補インヒビターおよび／または候補刺激因子に曝露する工程、この宿主細胞中におけるMK61ポリペプチドの活性または産生を測定する工程、およびこの活性とコントロール細胞（すなわち、この候補インヒビターおよび／または候補刺激因子に曝露されていない細胞）とを比較する工程を包含する。関連する局面において、本発明は、前述の方法のいずれかによって同定される、インヒビターおよび／または刺激因子を提供する。

10

【0021】

本発明はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0022】

本発明はまた、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する：

20

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載の成熟アミノ酸配列であって、必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のオルソログのアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータプログラムを使用して決定される場合の、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のアミノ酸配列に対して、少なくとも約70、75、80、85、90、95、96、97、98または99%同一性を示すアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

30

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列のフラグメント；ならびに

40

(e) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、もしくは配列番号16に記載のアミノ酸配列、または(a)～(c)のうちの少なくとも1つのいずれかの、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体についてのアミノ酸配列であって、ここでそのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0023】

本発明はさらに、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペ

50

チドを提供する：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のアミノ酸配列であって、ここでそのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のアミノ酸配列であって、ここでそのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列； 10

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端および／またはN末端の短縮を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のアミノ酸配列であって、ここでそのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16 20
に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮およびN末端短縮からなる群から選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のアミノ酸配列であって、ここでそのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0024】

MK61のアナログを、本発明で提供する。これは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のM 30
K61ポリペプチドの保存的および非保存的な置換によって生じる。このようなアナログには、以下が含まれる：配列番号2、4、6、8、10、または12の38位、39位、または51位に対応しているアミノ酸がシステイン、セリン、またはアラニンである、MK61ポリペプチド；配列番号2または6の60位または76位に対応しているアミノ酸が、システイン、セリン、またはアラニンである、MK61ポリペプチド；配列番号14または16の41位、42位、54位、63位、または79位に対応しているアミノ酸がシステイン、セリン、またはアラニンである、MK61ポリペプチド；配列番号2の17 40
1位または172位に対応しているアミノ酸が、ロイシン、ノルロイシン、バリン、メチオニン、アラニン、またはフェニルアラニンである、MK61ポリペプチド；配列番号14または16の178位または180位に対応しているアミノ酸が、ロイシン、ノルロイシン、バリン、メチオニン、アラニン、またはフェニルアラニンである、MK61ポリペプチド；配列番号14または16の141位に対応しているアミノ酸が、グリシン、プロリン、またはアラニンである、MK61ポリペプチド。

【0025】

本発明はまた、哺乳動物中のMK61レセプターおよび／またはリガンド活性を阻害する方法を提供する。この方法は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されている少なくとも1つのポリペプチドを投与する工程を包含する。

【0026】

上記の(a)～(e)のアミノ酸配列を含有している融合ポリペプチドもまた、提供され 50

る。さらに、本発明は、配列番号 16、配列番号 36、および配列番号 39 のアミノ酸配列を含有している融合ポリペプチドを含む。

【0027】

本発明はまた、本明細書中に示されている単離された核酸分子を含有している発現ベクター、本明細書中に示されている組換え核酸分子を含有している組換え宿主細胞、ならびに、宿主細胞を培養する工程、および必要に応じてそのように產生されたポリペプチドを単離する工程を包含する、MK61 ポリペプチドを產生する方法を提供する。

【0028】

MK61 ポリペプチドをコードする核酸分子を含有している非ヒトトランスジェニック動物はまた、本発明に包含される。MK61 核酸分子は、MK61 ポリペプチドの発現およびそのレベルの増大（これは、循環レベルの増大を含み得る）を可能にする様式で動物中に導入される。非ヒトトランスジェニック動物は、好ましくは哺乳動物である。

10

【0029】

本発明の MK61 ポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

【0030】

本発明はさらに、本明細書中に示されている MK61 ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを提供する。この抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得、そして、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 のアミノ酸配列を含有しているペプチドでの免疫によって產生され得る。

20

【0031】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含有しているペプチドに結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマもまた、提供される。

【0032】

本発明はまた、サンプル中の MK61 ポリペプチドを検出するかまたはその量を定量する方法を提供する。この方法は、MK61 ポリペプチドを含有しているとの疑いのあるサンプルを、本明細書中に示されている抗 MK61 抗体または抗体フラグメントと接触させる工程、および上記の抗体または抗体フラグメントの結合を検出する工程を包含する。

【0033】

さらに、MK61 ポリペプチド、その誘導体、変異体、およびフラグメント（好ましくは、少なくとも約 25 個のアミノ酸の配列を有している）に特異的に結合することができる、選択的結合試薬またはそのフラグメントが、本発明によって提供される。これらの選択的結合試薬は、ヒト化抗体、ヒト抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、相補性決定領域（CDR）を繋がれた抗体、抗イディオタイプ抗体のような抗体、およびそれらのフラグメントのであり得る。さらに、選択的結合試薬は、Fab フラグメントまたは Fab' フラグメントのような抗体の可変領域のフラグメント、あるいはそれらのフラグメントであり得、そして本明細書中に示されている MK61 ポリペプチドに対して特異性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む場合がある。選択的結合試薬はまた、検出可能な標識（例えば、放射性標識、蛍光標識、酵素標識、または当該分野で公知の任意の他の標識）に結合する場合がある。さらに、選択的結合試薬は、MK61 ポリペプチドの生物学的活性をアンタゴナイズし得、そして／または本明細書中に示されているような MK61 ポリペプチドでの動物の免疫化によって產生され得る。

30

40

【0034】

本発明はまた、本明細書中に示されている MK61 ポリペプチドに結合することができる選択的結合試薬を產生するハイブリドーマを提供する。

【0035】

本明細書中に示されている選択的結合試薬の有効量を患者に投与する工程を包含する、疾患、症状、または障害を処置、予防、または緩和するための方法もまた、提供される。有効量または治療有効量は、疾患、症状、または障害の経過または大きさ（例えば、これらに関係している任意の徴候の存在の強さまたは期間）において検出可能な変化を生じるた

50

めに十分な量である。

【0036】

上記の核酸分子、ポリペプチド、または選択的結合試薬、および1つ以上の薬学的に受容可能な処方剤を含有している薬学的組成物もまた、本発明に含まれる。薬学的に受容可能な処方剤は、キャリア、アジュバント、可溶化剤、安定剤、または抗酸化剤であり得る。本発明の核酸分子は、ウイルスベクター中に含まれ得る。組成物は、本発明の核酸分子またはポリペプチドの治療有効量を提供するために、使用される。本発明はまた、ポリペプチド、核酸分子、および選択的結合試薬を使用する方法にも関する。

【0037】

本発明のMK61ポリペプチドの誘導体もまた、提供される。これらのポリペプチドは、水溶性ポリマーを用いて共有的に改変され得る。ここでは、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキサイド／エチレンオキサイドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される。

10

【0038】

本発明はまた、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントであり得る異種アミノ酸配列に融合された、本明細書中で示されているポリペプチド配列を含有している融合ポリペプチドを提供する。

【0039】

MK61ポリペプチドのレベルの低下によって生じる哺乳動物中の医学的状態（例えば、癌）を処置、予防、または緩和するための方法もまた、本発明に含まれる。これらの方法は、選択的結合試薬、低分子、ペプチド、ペプチド誘導体、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる群より選択されるアンタゴニストの治療有効量を患者に投与する工程を包含する。これらの医学的状態には、免疫システムの刺激によって特徴付けられる症状（例えば、自己免疫疾患および白血病およびリンパ腫）が含まれ得る。

20

【0040】

MK61ポリペプチドのレベルの増加によって生じる哺乳動物中の医学的状態を処置、予防、または緩和するための方法もまた、本発明に含まれる。これらの方法は、MK61ポリペプチド；MK61ポリペプチドをコードする核酸分子；またはMK61ポリペプチドの発現を調節するもしくは調整するエレメントを含有している核酸分子の治療有効量を患者に投与する工程を包含する。これらの方法の例には、遺伝子治療および細胞療法が含まれ、そしてさらに、本明細書中に記載される。これらの医学的状態には、免疫システムの抑制によって特徴付けられる症状（例えば、AIDSおよび癌）が含まれ得る。

30

【0041】

本発明は、MK61ポリペプチドの異常なレベルによって引き起こされるかまたはそれによって生じる被験体の病理学的症状を診断または病理学的症状に対するかかりやすさを診断する方法を含む。この方法は、生物学的組織または細胞サンプル中のMK61ポリペプチドの存在またはその発現量を決定する工程；および正常な被験体または異なる時間の被験体のいずれかに由来する生物学的組織または細胞サンプル中の上記のポリペプチドのレベルを比較する工程を包含する。ここでは、病理学的症状に対するかかりやすさは、ポリペプチドの存在またはその発現量に基づく。

40

【0042】

本発明のMK61ポリペプチドおよび核酸分子は、本明細書中に記載されているものを含む、疾患および障害を処置、予防、緩和、および／または検出するために使用される場合がある。

【0043】

本発明はまた、MK61ポリペプチドに結合する化合物の同定方法を提供する。この方法は、MK61ポリペプチドを試験分子と接触させる工程、そしてポリペプチドに対する試験分子の結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子

50

がMK61ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する工程を包含する場合がある。本発明はさらに、MK61ポリペプチドの発現、またはMK61ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【0044】

MK61ポリペプチドの発現を調節しそしてそのレベルを調節する（すなわち、増進させるかまたは低下させる）方法もまた、本発明に含まれる。1つの方法は、MK61ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法においては、MK61ポリペプチドの発現を調節するかまたは調整するエレメントを含有している核酸分子が投与される場合がある。これらの方法の例には、本明細書中にさらに記載されているような、遺伝子治療、細胞療法、およびアンチセンス治療が含まれる。

10

【0045】

本発明は、さらに、本明細書中に示されている核酸分子を動物に投与する工程を包含する、動物のMK61ポリペプチドのレベルを調節する方法を提供する。

【0046】

MK61ポリペプチドをコードする核酸分子を含有している非ヒトトランスジェニック動物もまた、本発明に含まれる。MK61核酸分子は、MK61ポリペプチドの発現およびそのレベルの増大（これは、循環レベルの増大を含み得る）を可能にする様式で動物中に導入される。非ヒトトランスジェニック動物は、好ましくは哺乳動物である。

【0047】

本発明は、配列番号2に示されているアミノ酸配列、またはそのフラグメント、変異体、もしくはホモログ（その対立遺伝子変異体およびスプライシングされた変異体を含む）をコードする、検出可能に標識されたポリヌクレオチドを含有している診断試薬を提供する。検出可能に標識されたポリヌクレオチドは、第1鎖のcDNA、DNA、またはRNAであり得る。

20

【0048】

本発明はまた、以下の工程を包含する、生物学的サンプル中のMK61核酸分子の存在を検出するための方法を提供する：

（a）MK61核酸分子を含有しているとの疑いのある生物学的サンプルを提供する工程；

（b）診断薬が上記の生物学的サンプル中に含まれるMK61核酸分子とハイブリダイズする条件下で、生物学的サンプルを診断薬と接触させる工程；

30

（c）生物学的サンプル中のMK61核酸分子と診断薬との間でのハイブリダイゼーションを検出する工程；および

（d）生物学的サンプルと診断薬との間でのハイブリダイゼーションのレベルを、既知の濃度のMK61核酸分子と診断薬との間でのハイブリダイゼーションのレベルと比較する工程。

【0049】

本発明はまた、以下の工程を包含する、組織または細胞サンプル中のMK61核酸分子の存在を検出するための方法を提供する：

（a）MK61核酸分子を含有しているとの疑いのある組織または細胞サンプルを提供する工程；

40

（b）診断薬がMK61核酸分子とハイブリダイズする条件下で、組織または細胞サンプルを診断薬と接触させる工程；

（c）組織または細胞サンプル中のMK61核酸分子と診断薬との間でのハイブリダイゼーションを検出する工程；および

（d）組織または細胞サンプルと診断薬との間でのハイブリダイゼーションのレベルを、既知の濃度のMK61核酸分子と診断薬との間でのハイブリダイゼーションのレベルと比較する工程。

【0050】

本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、36、および38から構

50

成なる群より選択されるアミノ酸配列の少なくとも1つを投与する工程を包含する、哺乳動物のMK61レセプター活性を阻害する方法を提供する。

【0051】

本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、36、および38から構成なる群より選択されるアミノ酸配列の少なくとも1つを投与する工程を包含する、哺乳動物のMK61リガンド活性を阻害する方法を提供する。

【0052】

本発明は、MK61レセプターのシグナル伝達のネガティブな調節因子を投与することによる、哺乳動物の免疫応答を刺激する方法を提供する。ネガティブな調節因子は、MK61レセプターのシグナル伝達を阻害する分子である。ネガティブな調節因子には、配列番号16、36、および39に示されているような融合タンパク質、抗体、低分子、ペプチド、およびペプチド誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0053】

本発明はまた、MK61レセプターのシグナル伝達のポジティブな調節因子を投与する工程を包含する、免疫応答を阻害する方法を提供する。ポジティブな調節因子は、MK61レセプターのシグナル伝達を活性化する分子である。ポジティブな調節因子には、MK61リガンドおよびアゴニスト抗体が含まれる。

【0054】

本発明は、MK61リガンドの逆シグナル伝達のポジティブな調節因子を含む、細胞表面に結合したMK61リガンドを通じる逆シグナル伝達を刺激する方法を提供する。ポジティブな調節因子には、MK61融合タンパク質、抗体、低分子、およびペプチド誘導体が含まれるがこれらに限定されない。用語「逆シグナル伝達」は、リガンドのレセプターまたは抗リガンド抗体による結合のような細胞表面に結合したリガンドへの分子の結合によって誘導される、細胞性のシグナル伝達の活性化因子をいう。

20

【0055】

本発明はまた、MK61リガンドの逆シグナル伝達のネガティブな調節因子を含む、細胞表面に結合したMK61リガンドを通じる逆シグナル伝達を阻害する方法を提供する。ネガティブな調節因子には、MK61融合タンパク質、抗体、低分子、およびペプチド誘導体が含まれるがこれらに限定されない。

【0056】

本発明は、哺乳動物のB細胞性またはT細胞性リンパ増殖障害、自己免疫疾患、または炎症性疾患を処置する方法を提供する。これらの方法は、治療有効量のMK61-Fc融合タンパク質、抗MK61抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、MK61リガンド、または抗MK61リガンド抗体を、上記の哺乳動物に投与する工程を包含する。処置され得るリンパ増殖性疾患には、骨髄腫、Bリンパ腫、白血病、および非ホジキンリンパ腫以外のリンパ腫が含まれるが、これらに限定されない。自己免疫疾患には、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、腸管疾患、およびクローン病が含まれるが、これらに限定されない。炎症性疾患には、慢性関節リウマチ、敗血症、腸管性腸疾患、およびクローン病が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0057】

本発明はまた、配列番号36のシステインリッチドメインの残基26～60を含有しているアミノ酸配列を有するポリペプチドフラグメントを含む。システインリッチドメインは、Madryら(Intl. Immunol. 10:1693-1702、1998)および本明細書中の参考文献に定義されているような、TNFRスーパーファミリーのシステインリッチ領域の記号と適合し、そしてMK61リガンド結合ドメインを含むと予想される。

40

【0058】

MK61ポリペプチドは、そのリガンド同定するために使用され得る。「発現クローニング」の種々の形態が、レセプターのリガンドをクローニングするために使用されている。例えば、Davisら、Cell, 87:1161-1169(1996)を参照のこと

50

。これらおよび他のMK61リガンドクローニング実験は、本明細書中でさらに詳細に記載される。MK61リガンドの単離は、MK61シグナル伝達経路の新規のアゴニストおよび／またはアンタゴニストの同定および開発を可能にする。このようなアゴニストおよびアンタゴニストには、MK61リガンド、抗MK61リガンド抗体、およびそれらの誘導体、低分子、炭水化物、脂質、ポリヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む）が含まれる。これらのいずれかが、本明細書中に記載されているものを含む、1つ以上の疾患または障害を処置する可能性を秘めて使用され得る。

【0059】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される見出しの節は、構成の目的だけのためであり、そして記載される発明事項を限定するようには解釈されない。本明細書中で引用されている全ての参考文献は、本明細書中で明白に参考として援用される。

【0060】

hMK61T1アイソフォームは、シグナルペプチド、TNFレセプター（TNFR）、システインリッチドメイン（CRD）、膜貫通ドメイン（TM）、および長くかつ高度に保存されている細胞内ドメインを有している細胞表面レセプターである。

【0061】

残りの5個のヒトのアイソフォーム（hMK61T2、hMK61T3、hMK61T4、hMK61T5、およびhMK61T6）は、MK61の可溶性のレセプター形態であると考えられる。hMK61T3およびhMK61T5はそれぞれ、完全なTNFR CRDを含み、そしておそらく、hMK61T1によって媒介されるシグナル伝達の天然に存在しているインヒビターである。hMK61T2アイソフォーム、hMK61T4アイソフォーム、およびhMK61T6アイソフォームの各々は、部分的なCRDを含む。

【0062】

mMK61はマウスMK61のアイソフォームであり、そしてmMK61-Fcは、そのFc融合ポリペプチドである。

【0063】

（定義）

用語「MK61遺伝子」または「MK61核酸分子」または「ポリヌクレオチド」は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、または配列番号15に示されているヌクレオチド配列、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されているポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および本明細書中で定義されている核酸分子を含むかまたはそれらから構成される核酸分子をいう。

【0064】

用語「MK61ポリペプチド」は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のアミノ酸配列、および関連するポリペプチドを含むポリペプチドをいう。関連するポリペプチドには、MK61ポリペプチドの対立遺伝子変異体、MK61ポリペプチドのオルトログ、MK61ポリペプチドのスプライシング変異体、MK61ポリペプチドの変異体、およびMK61ポリペプチドの誘導体が含まれる。MK61ポリペプチドは、本明細書中で定義されているような成熟ポリペプチドである場合があり、そしてそれらが調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有するかまたはそれを有さない場合もある。

【0065】

用語「MK61ポリペプチドの対立遺伝子変異体」は、生物体または生物体の集団の染色体上の所定の遺伝子座を占有している遺伝子の、天然において生じる可能性のある別の形態のいくつかのうちの1つによってコードされるポリペプチドをいう。

【0066】

用語「MK61ポリペプチドの誘導体」は、化学的に改変されている、本明細書中で定義されているような、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、

配列番号 1 2、配列番号 1 4、または配列番号 1 6 に示されているアミノ酸配列を有しているポリペプチド、MK 6 1 ポリペプチドの対立遺伝子変異体、MK 6 1 ポリペプチドのオルトログ、MK 6 1 ポリペプチドのスプライシング変異体、または MK 6 1 ポリペプチドの変異体をいう。

【0067】

用語「MK 6 1 ポリペプチドフラグメント」は、ポリペプチドのアミノ末端での短縮（リーダー配列を含むかまたは含まない）、および／またはカルボキシ末端での短縮を含むポリペプチド（それらの配列は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されている）、MK 6 1 ポリペプチドの対立遺伝子改変体、MK 6 1 ポリペプチドのオルトログ、MK 6 1 ポリペプチドのスプライス変異体、および／または MK 6 1 ポリペプチドの変異体（配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されている MK 6 1 ポリペプチドのアミノ酸配列と比較した場合に 1 つ以上のアミノ酸の付加、または置換、または内部欠失を有している（ここでは、得られるポリペプチドは、少なくとも 6 アミノ酸またはそれ以上の長さである））をいう。MK 6 1 ポリペプチドフラグメントは、選択的 RNA スプライシングまたはインビボでのプロテアーゼ活性によって生じ得る。MK 6 1 ポリペプチドの膜貫通形態または膜に結合した形態については、好ましいフラグメントは、膜貫通ドメインまたは膜結合ドメインを欠失しているフラグメントのような、可溶性の形態を含む。

10

【0068】

好ましい実施態様においては、短縮は、約 10 個のアミノ酸、または約 20 個のアミノ酸、または約 50 個のアミノ酸、または約 75 個のアミノ酸、または約 100 個のアミノ酸、または 100 個以上のアミノ酸を含む。このように産生されたポリペプチドフラグメントは、約 25 個の連続するアミノ酸、または約 50 個のアミノ酸、または約 75 個のアミノ酸、または約 100 個のアミノ酸、または約 150 個のアミノ酸、または約 200 個のアミノ酸を含む。このような MK 6 1 ポリペプチドフラグメントは、アミノ酸末端のメチオニン残基を必要に応じて含み得る。このようなフラグメントが、例えば、MK 6 1 ポリペプチドに対する抗体を作成するために使用され得ることが理解される。

20

【0069】

用語「MK 6 1 融合ポリペプチド」とは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示されるポリペプチド、MK 6 1 ポリペプチドの対立遺伝子改変体、MK 6 1 ポリペプチドのオルソログ、MK 6 1 ポリペプチドのスプライス改変体、または配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示される MK 6 1 ポリペプチドのアミノ酸配列と比べて、1 つ以上のアミノ酸の欠失、置換、または内部付加を有する、MK 6 1 ポリペプチド改変体の、アミノ末端またはカルボキシ末端での 1 つ以上のアミノ酸（例えば、異種ペプチドまたは異種ポリペプチド）の融合体をいう。

30

【0070】

用語「MK 6 1 ポリペプチドのオルソログ」とは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示される MK 6 1 ポリペプチドのアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトの MK 6 1 ポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

40

【0071】

用語「MK 6 1 ポリペプチドのスプライス改変体」とは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 に示される MK 6 1 ポリペプチドのアミノ酸配列の非連続的コード領域を含む RNA 一次転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常は RNA）をいう。

50

【0072】

用語「MK61ポリペプチドの改変体」とは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるMK61ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および／またはMK61ポリペプチドフラグメント）、および／または付加（例えば、内部付加および／またはMK61融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列（リーダー配列を有するかまたは有さない）を含むMK61ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する（例えば、MK61ポリペプチドの対立遺伝子改変体、MK61ポリペプチドのオルソログ、およびMK61ポリペプチドスプライス改変体）か、または、人工的に構築され得る。このようなMK61ポリペプチドの改変体は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13または配列番号15に示されるDNA配列から適切に変化させたDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、1～3、または1～5、または1～10、または1～15、または1～20、または1～25、または1～50、または1～75、または1～100、または100より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および／または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

10

【0073】

用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得、そしてさらに動物において使用されて、各抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し得る分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

20

【0074】

用語「生物学的に活性なMK61ポリペプチド」とは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を有するMK61ポリペプチドをいう。

【0075】

用語「有効量」および「治療有効量」とは、各々、本明細書中に示されるMK61ポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるMK61ポリペプチドまたはMK61核酸分子の量をいう。

30

【0076】

用語「発現ベクター」とは、宿主細胞における使用に適切であり、かつ異種核酸配列の発現を、指示および／または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0077】

用語「宿主細胞」を用いて、核酸配列で形質転換されたか、または形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞をいう。この用語は、選択された遺伝子が存在する限り、その子孫が形態学または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、その親細胞の子孫を含む。

40

【0078】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定されるような、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、2つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上のアミノ酸配列のストリングの間の一致によって決定されるような、核酸分子間またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、2つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータープログラム（すなわち、「アルゴリズム」）により取り扱われたギャップアラインメント（存在する場合）との間の同一的一致のパーセントを測定する。

【0079】

50

用語「類似性」は、関連した概念であるが、「同一性」とは対照的に、同一的一致および保存的置換の一致の両方を含む類似性の尺度をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば10/20個同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、パーセント同一性および類似性は、どちらも50%である。同じ例において、保存的置換であるさらに5つの位置が存在する場合、パーセント同一性は50%のままであるが、パーセント類似性は75% (15/20) である。従って、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド間のパーセント類似性の程度は、これらの2つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

【0080】

用語「単離された核酸分子」とは、(1) 総DNAが供給源細胞から単離される場合に、これが天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50パーセントから分離された本発明の核酸分子、(2) 「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、(3) 天然では連結していないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、あるいは(4) より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在しない本発明の核酸分子、をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、任意の他の混入核酸分子、または天然の環境において見出される他の混入物（これらは、ポリペプチド産生におけるその使用、またはその治療的用途、診断的用途、予防的用途、または研究的用途を妨害する）を実質的に含まない。

10

【0081】

用語「単離されたポリペプチド」とは、(1) 供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50%から分離された本発明のポリペプチド、(2) 「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に連結していない（共有結合的相互作用によってもまたは非共有結合的相互作用によっても）、本発明のポリペプチド、(3) 天然には連結しないポリペプチドに作動可能に連結（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）する、本発明のポリペプチド、あるいは(4) 天然では存在していない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、その治療的用途、診断用途、予防用途または研究用途を妨害する、その天然の環境において見出される任意の他の混入ポリペプチドまたは他の混入物を、実質的に含まない。

20

30

【0082】

用語「成熟MK61ポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したMK61ポリペプチドをいう。成熟MK61ポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および／またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N結合型および／またはO結合型グリコシル化など）を含み得る。

【0083】

例示的な成熟MK61ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸残基24～アミノ酸残基355；配列番号4のアミノ酸残基24～アミノ酸残基85；配列番号6のアミノ酸残基24～アミノ酸残基136；配列番号8のアミノ酸残基24～アミノ酸残基187；配列番号10のアミノ酸残基24～アミノ酸残基71；配列番号12のアミノ酸残基24～アミノ酸残基167；配列番号14のアミノ酸残基22～アミノ酸残基345；および配列番号16のアミノ酸残基22～アミノ酸残基404によって示される。

40

【0084】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNAまたはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を包含し、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシー-N6-メチルアデニン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン (pseudoisocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシルメチル) ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル

50

、5-カルボキシ-メチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキユエオシン (β -D-mannosyl queosine)、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン (oxybutoxosine)、プソイドウラシル、キユエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キユエオシン、2-チオシトシン、および2, 6-ジアミノプリン。

10

【0085】

用語「天然に存在する」または「ネイティブの」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的物質と関連して使用される場合、天然において見出され、かつヒトによって操作されていない物質をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」は、本明細書中で使用される場合、天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成された物質をいう。

【0086】

20

用語「作動可能に連結された」を用いて、本明細書中では、隣接配列の様式をいい、ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように構成またはアセンブルされる。従って、コード配列に作動可能に連結した隣接配列は、このコード配列の複製、転写および／または翻訳を行うことが可能であり得る。例えば、コード配列は、プロモーターがコード配列の転写を指示し得る場合に、このプロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、これが正確に機能する限り、コード配列と連続する必要はない。従って、例えば、非翻訳性であるが転写される介在配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、なおこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。

【0087】

30

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのMK61ポリペプチド、MK61核酸分子、またはMK61選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な1つ以上の処方物質をいう。

【0088】

用語「選択的結合因子」とは、MK61ポリペプチドに特異性を有する分子（単数または複数）をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子の、ヒトMK61ポリペプチドに結合し、かつヒトの非MK61ポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間バージョン（例えば、マウスポリペプチドおよびラットポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。

40

【0089】

用語「形質導入」を用いて、1つの細菌から別のものへの核酸の移入（通常、ファージによる）をいう。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞の配列の獲得および移入をいう。

【0090】

用語「トランスフェクション」を用いて、細胞による外来DNAまたは外因性DNAの取り込みをいう。そして、細胞は、その外因性DNAが細胞膜の内側に導入されている場合

50

、「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術が、当該分野で周知であり、そして、本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、Virology 52:456 (1973); Sambrookら、Molecular Cloning, a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, New York, (1989); Davisら、Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, (1986); および Chuら、Gene 13:197 (1981) を参照のこと。このような技術は、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入するために使用され得る。

【0091】

用語「形質転換」は、本明細書中で使用される場合、細胞の遺伝特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含むように改変されている場合、形質転換されている。例えば、細胞は、そのネイティブな状態から遺伝的に改変された場合、形質転換されている。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、その形質転換するDNAは、細胞の染色体へ物理的に組み込むことによってその細胞のDNAと組み換わり得るか、複製されないエピソードエレメントとして一過性に維持され得るか、またはプラスミドとして独立して複製し得る。細胞は、そのDNAが細胞の分裂と共に複製される場合、安定に形質転換されているとみなされる。

【0092】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。

【0093】

（核酸分子および／またはポリペプチドの関連性）

関連した核酸分子が、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13または配列番号15の核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を包含すること、そしてこの関連した核酸分子が上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を包含することが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16におけるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および／もしくは欠失を含むかまたは本質的にこれからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。

【0094】

フラグメントは、配列番号2のポリペプチドの少なくとも約25個のアミノ酸残基、または約50個、または約75個、または約100個、または約100個より多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする分子を包含する。

【0095】

さらに、関連したMK61核酸分子は、本明細書中で定義したとおりの中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13もしくは配列番号15の核酸分子、または配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、もしくは配列番号16に示されるようなアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子、または本明細書中に定義されるような核酸フラグメント、または本明細書に定義されるようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの完全に相補的な配列と、ハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子を包含する。cDNAライブラリー、ゲノムDNAライブラリーまたは合成DNAライブラリーを、関連した配列についてスクリーニングするために、本明細書中に提供されるMK61配列を用いてハイブリダイゼーションプローブが調製され得る。MK61ポリペプチドのDNA配列および／またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して顕著な同一性を示す領域は、本明細書中に記載される配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

10

20

30

40

50

【0096】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ顕著に不一致のDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは42℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである。Sambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))；ならびにAndersonら, Nucleic Acid Hybridization: a practical approach 第4章、IRL Press Limited Oxford, England (1985))を参照のこと。

10

【0097】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの程度が影響される。他の薬剤は、非特異的および／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (NaDodSO_4 またはSDS)、ficoll、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH 6.8～7.4で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHからほとんど独立する。Andersonら, Nucleic Acid Hybridization: a practical approach 第4章 (IRL Press Limited, Oxford, England (1985))

20

30

を参照のこと。

【0098】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、長さおよび塩基対の不一致程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって評価され得る：

$$T_m (\text{℃}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、ヌクレオチド中に形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中でのナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中での（グアニン+シトシン）塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度は、1%の不一致毎に約1℃低下する。

40

【0099】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50～65℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、または37～50℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例示として、0.015Mナトリウムイオン中で50℃の「中程度にストリンジェン

50

トな条件」は、約 21 % の不一致を可能にする。

【0100】

「高度に」ストリンジェントな条件と「中程度に」ストリンジェントな条件との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって認識される。例えば、0.015 M ナトリウムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長さの DNA の融解温度は、約 71 °C である。65 °C で（同じイオン強度で）の洗浄を用いると、このことは、約 6 % の不一致を可能にする。より遠い関連配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。

【0101】

約 20 ヌクレオチド (nt) までのオリゴヌクレオチドプローブについての 1 M NaCl 1 * 中での融解温度の良好な推定は、以下によって与えられる：

$$T_m = A - T \text{塩基対あたり } 2^\circ\text{C} + G - C \text{塩基対あたり } 4^\circ\text{C}$$

* 6 × クエン酸ナトリウム塩 (SSC) 中でのナトリウムイオン濃度は、1 M である。Suggs ら, Developmental Biology Using Purified Genes 683 頁、Brown および Fox 編、(1981) を参照のこと。

【0102】

オリゴヌクレオチドについての高度なストリンジェンシー洗浄条件は、通常、より長いオリゴヌクレオチドについて、そのオリゴヌクレオチドの T_m よりも 0 °C ~ 5 °C 低い温度にて、6 × SSC、0.1 % SDS 中である。

【0103】

別の実施形態では、関連した核酸分子は、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13 もしくは配列番号 15 に示されるとおりのヌクレオチド配列に対して約 70 パーセント (70 %) 同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14 もしくは配列番号 16 に示されポリペプチドに対して約 70 パーセント (70 %) 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態では、このヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示されるとおりのヌクレオチド配列に対して約 75 パーセント、または約 80 パーセント、または約 85 パーセント、または約 90 パーセント、または約 95 パーセント、96 パーセント、97 パーセント、98 パーセント、もしくは 99 パーセント同一であるか、またはヌクレオチド配列は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14 もしくは配列番号 16 に示されるとおりのポリペプチド配列に対して約 75 パーセント、または約 80 パーセント、または約 85 パーセント、または約 90 パーセント、または約 95 パーセント、96 パーセント、97 パーセント、98 パーセント、もしくは 99 パーセント同一であるポリペプチドをコードする。

【0104】

核酸配列における相違は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的改変および／または非保存的改変をもたらし得る。

【0105】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14 または配列番号 16 のアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対応する改変）は、天然に存在する MK61 ポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有する MK61 ポリペプチドを生成する。対照的に、MK61 ポリペプチドの機能的特徴および／または化学的特徴における実質的な改変は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 のアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得、以下を維持することに対するその効果が顕著に異なる：(a) 例えば、シートコンホメーションもしくはヘリックスコンホメーションのような、置換領域

における分子骨格の構造、(b) 標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または(c) 側鎖のバルク。

【0106】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんど影響がないかまたは全く影響がないように、ネイティブではない残基でのネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンで置換され得る。

【0107】

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるよりむしろ、化学的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転(reversed)形態または反転(inverted)形態が挙げられる。

【0108】

天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいてクラスに分けられ得る：

1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

2) 中性で親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

3) 酸性：Asp、Glu；

4) 塩基性：His、Lys、Arg；

5) 鎖の方向に影響を与える残基：Gly、Pro；および

6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0109】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーへの交換を含み得る。このように置換された残基は、非ヒトMK61ポリペプチドオルソログと相同または類似するヒトMK61ポリペプチドの領域、あるいはこの分子の非相同性領域に導入され得る。

【0110】

このような変更を作製する際、アミノ酸の疎水性親水性指標(hydrophatic index)が、考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性特徴および荷電特徴に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられている。これらは、イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン／シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)である。

【0111】

タンパク質に対して相互作用的な生物学的機能を与える疎水性アミノ酸指標の重要性が、当該分野で理解される。Kyteら、J. Mol. Biol., 157:105-132 (1982)。特定のアミノ酸が、類似した疎水性親水性の指標またはスコアを有する他のアミノ酸に置換され得、そしてなお、類似した生物学的活性を保持するということは公知である。疎水性親水性指標に基づいて変更を作製する際、疎水性親水性指標が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、疎水性親水性指標が±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして疎水性親水性指標が±0.5以内であるアミノ酸置換がなおより特に好ましい。

【0112】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得ることもまた当該分野で理解され、特に、それによって作製される生物学的に機能的で等価なタンパク質またはペプチドが一部本発明における場合と同様に、免疫学的な実施形態において使用されることが意図される。タンパク質の最大局所的平均親水性は、その隣接するアミノ酸の親水性によ

て支配される場合、その免疫原性および抗原性（すなわち、そのタンパク質の生物学的特性）と相関する。

【0113】

以下の親水性値が、これらのアミノ酸残基に対して割りあてられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）およびトリプトファン（-3.4）。類似した親水性値に基づいて変更を作製する際、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、親水性値が±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして親水性値が±0.5以内であるアミノ酸置換がなおより特に好ましい。当業者はまた、親水性に基づいて、アミノ酸の一次配列からエピトープを同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」ともいわれる。

10

【0114】

所望のアミノ酸置換（保存的または非保存的にかかわらず）は、そのような置換が所望されるときに当業者によって決定され得る。例えば、アミノ酸置換は、MK61ポリペプチドの重要な残基を決定するために使用され得るか、または本明細書中に記載されるMK61ポリペプチドのそれらの基質に対する親和性を増加もしくは減少させるために使用され得る。

20

【0115】

例示的なアミノ酸置換を、表Iに示す。

【0116】

【表1】

表1
アミノ酸置換

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn

30

Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ 酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

当業者は、周知技術を用いて、配列番号2に示されるポリペプチドの適切な改変体を決定し得る。活性を崩壊させることなく変化され得る分子の適切な領域を同定するため、当業者は、活性に重要であると考えられない領域を標的し得る。例えば、同じ種由来または他の種由来の、類似した活性を有する類似のポリペプチドが既知の場合、当業者は、MK61ポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似したポリペプチドと比較し得る。そのような比較を用いて、当業者は、類似したポリペプチドの間で保存されているその分子の残基および部分を同定し得る。そのような類似したポリペプチドに対して保存されていないMK61ポリペプチドの領域における変化は、MK61ポリペプチドの生物学的活性および／または構造に逆の影響をおそらくほとんど与えないことが理解される。当業者はまた、たとえ比較的保存された領域においても、活性を維持したままで、天然に存在する残基を化学的に類似したアミノ酸で置換し得る（保存的アミノ酸残基置換）ことを理解する。従って、生物学的活性または構造に対して重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を崩壊させることなく、またはポリペプチド構造に有害な影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

30

40

【0117】

さらに、類似したポリペプチドにおいて活性または構造に重要である残基を同定する構造機能研究を、当業者は再検討し得る。そのような比較を考慮して、当業者は、類似したポリペプチドにおいて活性もしくは構造に重要であるアミノ酸残基に対応する、MK61ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、MK61ポリペプチドのそのような予測された重要なアミノ酸残基の代わりに、化学的に類似したアミノ酸置換を選択し得る。

【0118】

当業者はまた、類似したポリペプチドにおける三次元構造に関連して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。そのような情報を考慮して、当業者は、その三次元構造につ

50

いてMK61ポリペプチドのアミノ酸残基のアラインメントを推測し得る。当業者は、タンパク質の表面上であると推測されるアミノ酸残基に対して極端な変更を作製しないように選択し得る。なぜなら、そのような残基は、他の分子との重要な相互作用に参与し得るからである。さらに、当業者は、所望の各アミノ酸残基において単一アミノ酸置換を含む試験改変体を作製し得る。次いで、この改変体は、当業者に公知の活性アッセイを用いてスクリーニングされ得る。そのような改変体を使用して、適切な改変体に関する情報を集め得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変更が、崩壊された活性、好ましくなく減少された活性、または不適切な活性を生じることが発見された場合、そのような変更を有する改変体は、回避される。言い換えると、そのような慣用的な実験から集められた情報に基づいて、当業者は、単独でかまたは他の変異と組み合わせてのいずれかで、さらなる置換が回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。 10

【0119】

本発明のMK61ポリペプチドアナログは、MK1ポリペプチドのアミノ酸配列を、関連するファミリーメンバーとを比較することによって、決定され得る。例示的なMK61ポリペプチド関連ファミリーメンバーとしては、TNFレセプターファミリーメンバー（例えば、Mrank（配列番号17））、Fasリガンドレセプターファミリーメンバー（例えば、Mfasr（配列番号18））、およびリンフォトキシンβレセプターファミリーメンバー（例えば、TNFrc（配列番号19））が挙げられる、これらに限定されない。この比較は、Pileup alignment（図10、図11および図12に示されるような、Wisconsin GCG Program Package, ver. 8.1）または保存領域および非保存領域内で複数のファミリーメンバーを用いる等価（オーバーラップ（重複））比較を用いることによって、達成され得る。図10～図12に示されるように、mMK61ポリペプチド（配列番号14）の予測されたアミノ酸配列は、それぞれ、Mrank（配列番号17）、Mfasr（配列番号18）およびTnfrc（配列番号19）の公知のアミノ酸と共にアラインメントされる。 20

【0120】

他のMK61ポリペプチドアナログは、当業者に公知の、これらまたは他の方法を使用して同定され得る。これらのオーバーラップ（重なり合わせた）配列は、保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換についての指針を与え、これによって、さらなるMK61アナログを生じる。これらのアミノ酸置換が天然に存在するアミノ酸または非天然のアミノ酸からなり得ることが理解される。例えば、図10～12に示されるアラインメントによって、潜在的なMK61アナログが、配列番号2、4、6、8、10、および12の38位、39位、または51位においてCys残基を有し、これらがSer残基またはAla残基によって置換されること；このMK61アナログが、配列番号2および6の位置60または76においてCys残基し、これらがSer残基およびAla残基で置換されること；このMK61アナログが、配列番号14または16の41位、42位、54位、63位、または79位においてCys残基を有して、これらがSer残基またはAla残基で置換されること；このMK61アナログが、配列番号2の171位および172位においてLeu残基を有して、これらがノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、またはPheで置換されること；このMK61アナログが、配列番号14または配列番号16の位置178位および180位においてLeu残基を有して、これらがノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、またはPheで置換されること；このMK61アナログが、配列番号14または16の141位においてGly残基を有して、これらがPro残基またはAla残基によって置換されることを示される。 30 40

【0121】

多数の科学刊行物が、二次構造の推測に向けられている。Moult J.、Curr. Op. in Biotech. 7（4）：422-427（1996）、Chouら、Biochemistry 13（2）：222-245（1974）；Chouら、Biochemistry 113（2）：211-222（1974）；Chouら、Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47：45-148 50

(1978) ; Chouら、Ann. Rev. Biochem. 47 : 251 - 276 および Chouら、Biophys. J. 26 : 367 - 384、(1979) を参照のこと。さらに、二次構造の予測を補助するコンピュータプログラムが、現在利用可能である。二次構造を予測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%よりも高い配列同一性、または40%よりも高い配列類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース (PDB) の近年の成長により、二次構造の推測可能性 (ポリペプチド構造またはタンパク質構造内の潜在的な折り畳みの数を含む) の増大がもたらされた。Holmら、Nucleic Acids Res. 27 (1) : 244 - 247 (1999) を参照のこと。所定のポリペプチドもしくはタンパク質において限定された数の折り畳みが存在すること、および一旦構造の臨界数が決定されると、構造予測が劇的により正確になること、が示唆されている (Brennerら、Curr. Opin. Struct. Biol. 7 (3) 369 - 376 (1997))。

10

【0122】

二次構造を予測するさらなる方法としては、「スレッディング (threading)」 (Jones, D.、Curr. Opin. Struct. Biol. 7 (3) : 377 - 87 (1997) ; Sipplら、Structure, 4 (1) : 15 - 19 (1996))、「プロファイル分析」 (Bowieら、Science, 253 : 164 - 170 (1991) ; Gribskovら、Meth. Enzym. 183 : 146 - 159 (1990) ; Gribskovら、Proc. Nat. Acad. Sci. 84 (13) 4355 - 4358 (1987))、および「進化的連鎖 (evolutionary linkage)」 (Holm (前出) および Brenner (前出) を参照のこと) が、挙げられる。

20

【0123】

好ましいMK61ポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および／または型が配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、MK61ポリペプチド改変体は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のアミノ酸配列より多いかまたは少ない数のN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、配列：Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型炭水化物鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN結合型炭水化物鎖を除去する。1つ以上のN結合型グリコシル化部位 (代表的に、天然に存在するグリコシル化部位) が排除され、そして1つ以上の新たなN結合型部位が作製される、N結合型炭水化物鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいMK61改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸 (例えば、セリン) で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、MK61ポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性なコンフォメーションにリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には偶数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

30

40

【0124】

本発明は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されたタンパク質のエピトープ結合部分を含むポリペプチドさらに提供する。用語「エピトープ」とは、抗体が結合し得るタンパク

50

質の領域をいう。例えば、Geysenら、PNAS, USA 81:3998~4002 (1984)を参照のこと。エピトープは、直鎖状またはコンフォメーション型であり得、この後者は、このタンパク質のフォールディング（折り畳み）の際にエピトープを形成するタンパク質の非連続的な領域からなる。直鎖状エピトープは、一般的に少なくとも6アミノ酸残基長である。タンパク質配列の部分を模倣する比較的短い合成ペプチドは、この部分的に模倣されたタンパク質と反応する抗血清を、慣用的に誘起し得る。Sutcliffeら、Science 219:660-666 (1983)を参照のこと。短い、直鎖状エピトープを認識する抗体は、変性したタンパク質を使用する分析的用途および診断的用途（例えば、ウェスタンブロット）において特に有用である。例えば、Tobin Proc. Natl. Acad. Sci. USA、76:4350-4356 (1979)を参照のこと。短いペプチドに対する抗体はまた、ネイティブコンフォメーションのタンパク質を認識し得、従って、この抗体は、タンパク質発現およびタンパク質単離をモニターするため、および例えば、ELISAまたは免疫沈降的研究によって溶液中のMK61タンパク質を検出するのに有用である。

【0125】

さらに、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはMK61ポリペプチド改変体は、相同なポリペプチドに融合されてホモダイマーを形成し得るか、または異種のポリペプチドに融合されてヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：MK61融合ポリペプチドの検出および／または単離を可能するためのエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその一部分（例えば、細胞外ドメイン、または膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合するリガンドまたはその一部分；触媒活性である酵素またはその一部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加するポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、もしくは配列番号16に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはMK61ポリペプチド改変体とは異なる治療活性を有するポリペプチド。

【0126】

融合は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、もしくは配列番号16に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはMK61ポリペプチド改変体のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかでなされ得る。融合は、リンカー分子またはアダプター分子なしで直接的であり得るか、あるいはリンカー分子またはアダプター分子を使用して間接的であり得る。リンカー分子またはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基、代表的には約20~約50個までのアミノ酸残基であり得る。リンカー分子またはアダプター分子はまた、融合部分の分離を可能にするために、コードされるポリヌクレオチド中の、DNA制限エンドヌクレアーゼの切断部位、またはプロテアーゼの切断部位を有するように設計され得る。一旦構築されると、融合ポリペプチドは、本明細書中に記載される方法に従って誘導され得ることが理解される。

【0127】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはMK61ポリペプチド改変体は、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインに融合される。抗体は、2つの機能的に独立した部分（抗原に結合する、「Fab」として公知の変域ドメイン、および食細胞による攻撃および補体活性化のようなエフェクター機能に関係する、「Fc」として公知の定常ドメイン）を含む。Fcは、長い血清半減期を有し、一方、Fabは短寿命である（Caponら、Nature、337:525-31 (1989)）。治療タンパク質と一緒に構築される場合、Fcドメインは、より

長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテインA結合、補体固定およびおそらく胎盤輸送のような機能でさえ組み込み得る（同書）。表IIは、当該分野で公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

【0128】

【表2】

表2 治療学的タンパク質とのFc融合

Fcの形態	融合パートナー	治療学的な解釈	参考文献
IgG1	CD30-Lの N末端	ホジキン病； 異型性リンパ腫（ anaplastic lymphoma）；T細胞 白血病	U.S. Patent No. 5,480,981
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症；移植	Zheng et al. (1995), J. Immunol., 154:

10

			5590-5600
IgG1	TNF レセプター	敗血症性ショック	Fisher et al. (1996), N. Engl. J. Med., 334: 1697-1702; Van Zee et al., (1996), J. Immunol., 156: 2221-2230
IgG, IgA, IgM, or IgE (第1のドメ インを除く)	TNF レセプター	炎症、自己免疫障害	U.S. Pat. No. 5,808,029, issued September 15, 1998
IgG1	CD4 レセプター	AIDS	Capon et al. (1989), Nature 337: 525-531
IgG1, IgG3	IL-2 の N末端	抗癌、 抗ウイルス	Harvill et al. (1995), Immunotech., 1: 95-105
IgG1	OPG のC末端	変形性関節症；骨密 度	WO 97/23614, published July 3, 1997
IgG1	レプチンのN 末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
ヒト Ig Gγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley (1991), J. Exp. Med., 174:561-569

20

30

40

一例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH₂領域、およびCH₃領域の全てまたは一部が、当業者に公知の方法を使用して、MK61ポリペプチドのN末端またはC末端のいずれかにおいて、融合され得る。得られるMK61融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって、精製され得る。Fc領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物よりもインビボにおいて実質的に長い半減期を示すことが見出された。また、Fc領域への融合により、融合ポリペプチドの二量化／多量体化が可能になる。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または治療の質、

50

循環時間、減少した凝集などのような特定の質を改善するよう変更され得る。

【0129】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology (Lesk A. M. 編、Oxford University Press, New York, 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編、Academic Press New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, Griffin A. M. および Griffin H. G. 編、Humana Press, New Jersey, 1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J 編、M. Stockton Press, New York (1991); ならびに Carillo ら、SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988) に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0130】

同一性および／または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の適合を与えるように、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公共に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための、好ましいコンピュータプログラム方法としては、GCG プログラムパッケージ (GAP (Devereux ら、Nucl. Acids. Res. 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、および FASTA (Altschul ら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) を含む) が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTX プログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源 (Altschul ら、BLAST Manual (NCB/NLM/NIH, Bethesda, MD 20894; Altschul ら (前出) (1990)) から公共に利用可能である。周知の Smith Waterman アルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【0131】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のライメントスキームは、これら2つの配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、その2つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態において、選択されたライメント方法 (GAP プログラム) は、標的ポリペプチドの少なくとも50個連続するアミノ酸にわたるライメントを生じる。

【0132】

例えば、コンピュータアルゴリズム GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を使用して、配列同一性の百分率が決定されるべき2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合 (アルゴリズムによって決定される「適合したスパン」) のために、整列される。ギャップオープニングペナルティ (gap opening penalty) (これは、平均対角の3倍として計算される: 「平均対角」とは、使用される比較行列 (comparison matrix) の対角 (diagonal) の平均である; 「対角」とは、特定の比較行列によって各完全なアミノ酸一致に対して割り当てられたスコアまたは数である) およびギャップエクステンションペナルティ (gap extension penalty) (これは通常、ギャップオープニングペナルティの1/10倍である)、ならびに PAM 250 または BLOSUM 62 のような比較

行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列 (PAM 250 比較行列については、Dayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (3) (1978)) ; BLOSUM 62 比較行列については、Henikoffら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919を参照のこと) もまた、このアルゴリズムによって使用される。

【0133】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

アルゴリズム (Algorithm) : Needlemanら, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970) ;

比較マトリクス (Comparison matrix) : BLOSUM 62 (Henikoffら、(前出)) ;

ギャップペナルティー (Gap Penalty) : 12

ギャップレングスペナルティー (Gap Length Penalty) : 4

類似性閾値 (Threshold of Similarity) : 0。

10

【0134】

このGAPプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、GAPアルゴリズムを用いるポリペプチド比較のためのデフォルトパラメータ (末端ギャップに対してはペナルティーがないこととともに) である。

【0135】

核酸分子配列比較についての好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる：

アルゴリズム : Needlemanら (前出) (1970)

比較マトリクス : 一致 = +10、不一致 = 0

ギャップペナルティー : 50

ギャップレングスペナルティー : 3。

20

【0136】

GAPプログラムはまた、上記パラメータを用いても有用である。上記パラメータは、核酸分子比較についてのデフォルトパラメータである。

【0137】

他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較行列 (マトリクス)、類似性閾値などが当業者により使用され得、これには、Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを含む。なされる特定の選択は、当業者に明らかであり、なされる特定の比較 (例えば、DNA-DNA、タンパク質-タンパク質、タンパク質-DNA) ; さらに、比較が、所定の配列対の間である (この場合、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい) か、または一つの配列と大きな配列のデータベースとの間 (この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい) であるか) に依存する。

30

【0138】

(合成)

本明細書中に記載される核酸分子およびポリペプチド分子は組換え手段および他の手段によって産生され得ることが、当業者によって認識される。

40

【0139】

(核酸分子)

この核酸分子は、MK61ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、種々の方法 (化学合成、cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニングおよび/またはcDNAのPCR増幅を含むが、これらに限定されない) で容易に獲得され得る。

【0140】

本明細書中で使用される組換えDNA方法は、一般的に、Sambrookら (Mole

50

cular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)) および／または Ausubel ら編 (Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, NY (1994)) に記載される方法である。本発明は、本明細書中に記載される核酸分子およびこのような分子を得るための方法を提供する。

【0141】

MK61 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が一つの種から同定された場合、その遺伝子の全てまたは一部は、同じ種由来のオルソログ遺伝子または関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用され得る。このプローブまたはプライマーは、MK61 ポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。さらに、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13 または配列番号 15 に記載される配列を有する核酸分子の一部または全てを使用してゲノムライブラリーをスクリーニングし、MK61 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的には、中程度のストリンジェンシーの条件または高度なストリンジェンシーの条件をスクリーニングのために使用して、スクリーニングから得られる偽陽性の数を最小にする。

10

【0142】

MK61 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現クローニング（これは、発現されたタンパク質の性質に基づく陽性クローンの検出を使用する）によって同定され得る。代表的には、核酸ライブラリーは、宿主細胞表面において発現されそして提示されるクローン化タンパク質への抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）の結合によってスクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識を用いて修飾される。

20

【0143】

以下に記載される説明に従って行われる組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを作製し、そしてコードされるポリペプチドを発現させ得る。例えば、MK61 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、大量の所望のヌクレオチド配列を容易に作製し得る。次いで、この配列を使用して検出プローブまたは増幅プライマーを作製し得る。あるいは、MK61 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされる MK61 ポリペプチドは、大量に産生され得る。

30

【0144】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である。この方法において、cDNA は、酵素である逆転写酵素を使用して、poly (A) + RNA または全 RNA から調製される。次いで、2つのオリゴヌクレオチドプライマー（代表的には、MK61 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする cDNA（オリゴヌクレオチド）の 2つの別個の領域に対して相補的である）が、Taq ポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこの cDNA に添加され、そしてこのポリメラーゼが、これら 2つのプライマー間の cDNA の領域を増幅する。

40

【0145】

MK61 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engels ら、Angew. Chem. Intl. Ed. 28: 716-734 (1989) によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル法、ホスホロアミダイト法、および H-ホスホネート法が挙げられる。このような化学合成のために好ま

50

しい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、MK 6 1 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントが一緒に連結されて、MK 6 1 ポリペプチドの全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATGを有し、このATGは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されているか否かに依存して、MK 6 1 ポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

10

【0146】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるMK 6 1 ポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択されるMK 6 1 ポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先度に関する「Ecohigh.cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピューターアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI) によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、「Cellegans_high.cod」、「Cellegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、および「Yeast_high.cod」が挙げられる。

20

【0147】

（ベクターおよび宿主細胞）

MK 6 1 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入し得る。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および／または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である）。MK 6 1 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫（バキュロウイルス系）宿主細胞および／または真核生物宿主細胞において増幅／発現され得る。宿主細胞の選択は、MK 6 1 ポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および／またはリン酸化）されるか否かに一部依存する。そうである場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説については、Meth. Enz., 185巻、D. V. Goeddel編, Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)を参照のこと。

30

【0148】

代表的に、上記の宿主細胞のいずれかに使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列ならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」と呼ばれる）は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナースプライス部位およびアクセプタースプライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

40

【0149】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、MK 6 1 ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；この

50

オリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、または他の「タグ」（例えば、FLAG、HA（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）またはmyc）（これらに関して市販の抗体が存在する）をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にそのポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、MK61ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとしてタグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、その後、タグは、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたMK61ポリペプチドから除去され得る。

【0150】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および／または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または宿主細胞系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、MK61ポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0151】

本発明のベクターにおいて有用な隣接配列は、当該分野において周知であるいくつかの方法のいずれかによって得られ得る。代表的には、内因性MK61遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して、合成され得る。

【0152】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、PCRを使用して、そして／あるいは適切なオリゴヌクレオチドおよび／または同じ種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、隣接配列は得られ得る。隣接配列が公知でない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子（単数または複数）を含み得る大きなDNA断片から単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chattsworth, CA）、または当業者に公知の他の方法を使用する単離によって、達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【0153】

複製起点は、代表的に、商業的に購入した原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数へのベクターの増幅は、いくつかの場合において、MK61ポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、複製起点部位は、公知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドpBR322（製品番号303-3s、New England Biolabs, Beverly, MA）からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起点（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、またはHPVもしくはBPVのようなパピローマウイルス）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターに必要とされない（例えば、SV40起点は、ただそれが初期プロモーターを含むので、しばしば、使用される）。

10

20

30

40

50

【0154】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の3'側に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメント、およびそれに続くポリ-T配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化されるか、またはベクターの一部として商業的にさえ購入されるが、これはまた、本明細書中に記載されるような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0155】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核生物宿主細胞について、抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるタンパク質；(b) 細胞の栄養要求性の欠損を補うタンパク質；あるいは(c) 複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質を、コードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

10

【0156】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生により大きく要求される遺伝子が、連続する世代の組換え細胞の染色体において直列に反復される、プロセスである。哺乳動物細胞についての適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように唯一適合される、選択圧下に置かれる。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化する条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課され、それによって選択遺伝子とMK61ポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く。結果として、増加した量のMK61ポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

20

【0157】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてシャイン・ダルガルノ配列(原核生物)またはコザック配列(真核生物)によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現されるMK61ポリペプチドのプロモーターの3'側かつコード配列の5'側に配置される。シャイン・ダルガルノ配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン(すなわち、高いA-G含有量を有する)である。多くのシャイン・ダルガルノ配列が、同定されており、そのそれぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して容易に合成され得、そして原核生物ベクターにおいて使用され得る。

30

【0158】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞の外へとMK61ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、MK61核酸分子のコード領域に位置するか、または直接MK61ポリペプチドコード領域の5'末端に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能性である任意のシグナル配列が、MK61核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、MK61遺伝子またはMK61 cDNAに対して同種(天然に存在する)または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。ほとんどの場合、シグナルペプチドの存在による宿主細胞からのMK61ポリペプチドの分泌は、分泌されたMK61ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入されたMK61核酸分子の一部であり得る。

40

【0159】

MK61ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなMK61ポリペプチドシグナ

50

ル配列をコードするヌクレオチド配列またはMK61ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が、本発明の範囲内に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなMK61ポリペプチドシグナル配列を認識せずかつプロセシングしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼリーダー、ペニシリナーゼリーダー、または熱安定エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される、原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、ネイティブなMK61ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、 α 因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列が十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が使用され得る。 10

【0160】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいような、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のプレ配列（*pre sequence*）が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るか、または、これもまた、グリコシル化に影響し得るプレ配列を付加し得る。最終タンパク質産物は、（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）-1位に、発現に付随して1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全には除去されないかもしれない。例えば、最終タンパク質産物は、N末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域を切断する場合、所望のMK61ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。 20

【0161】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合、MK61遺伝子内に天然に存在し得る。（大部分のcDNAについて）イントロンが遺伝子内に天然に存在しない場合、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列およびMK61遺伝子に関するイントロンの位置は、イントロンが効果的に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、MK61 cDNA分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側でありかつ、ポリA転写終結配列の5'側である。好ましくは、イントロン（単数または複数）は、コード配列を妨害しないように、cDNAの一方の側またはもう一方の側（すなわち、5'側または3'側）に配置される。イントロンが、挿入される宿主細胞に適合性である場合、任意の供給源（任意のウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意のイントロンを使用して本発明を実行し得る。合成イントロンもまた本明細書に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。 30

【0162】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは各々、代表的には、宿主生物によって認識され、かつMK61ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、代表的には構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）（一般的に、約100~1000bp内）に配置される非転写配列である。プロモーターは、慣習的に、2つのクラス（誘導性プロモーターおよび構成性プロモーター）の1つにグループ化される。この状況で、誘導性プロモーターは、抑制性（*repressible*）／抑圧性（*depressible*）のプロモーターおよび従来の誘導性プロモーターである。誘導性プロモーターは、培養条件におけるいくらかの変化（例えば、栄養の存在または欠如、あるいは温度の変化）にตอบสนองして、その制御下にある、DNAからの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成性プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対して 40 50

ほとんど制御しないかまたは全く制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、例えば、供給源のDNAから制限酵素消化によってプロモーターを取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、MK61ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなMK61遺伝子プロモーター配列は、MK61核酸分子の増幅および／または発現を指向するために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して多量の転写およびより高い発現タンパク質の産生が可能であり、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

【0163】

原核生物宿主との使用に適切なプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系；ならびにハイブリッドプロモーター（例えば、tacプロモーター）が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた、適切である。これらの配列は、公開されており、それによって、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNA配列にそれらを連結し得る。

【0164】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターもまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス40（SV40）のようなウイルスのゲノムから得られる、プロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0165】

MK61遺伝子転写を制御する際に興味深くあり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40初期プロモーター領域（BernoisらおよびChambon, Nature 290:304-310, 1981）；CMVプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'側の長末端反復に含まれるプロモーター（Yamamotoら, Cell 22:787-797, 1980）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1444-1445, 1981）；メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinsterら, Nature 296:39-42, 1982）； β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Villa-Kamaroffら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:3727-3731, 1978）；またはtacプロモーター（DeBoerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25, 1983）。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている、以下の動物転写制御領域もまた関心が高い：脾臓腺房細胞において活性なエラストラーゼI遺伝子制御領域（Swiftら, Cell 38:639-646, 1984）；Ornitzら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986)；MacDonald, Hepatology 7:425-515, 1987）；脾臓 β 細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域（Hanahan, Nature 315:115-122, 1985）；リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedlら, Cell 38:647-658 (1984)；Adamesら, Nature 318:533-538 (1985)；Alexanderら, Mol. Cell. Biol., 7:1436-1444, 1987）；精巣細胞、乳房細胞、リンパ系細胞、および肥満細胞において活性なマウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域（Lederら, Cell 45:485-495, 1986）；肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert

ら、Genes and Devel. 1:268-276, 1987) ; 肝臓において活性な α -フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlaufら, Mol. Cell. Biol., 5:1639-1648, 1985; Hammerら, Science 235:53-58, 1987) ; 肝臓において活性な α 1-抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら, Genes and Devel. 1:161-171, 1987) ; 骨髄性細胞において活性な β -グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら, Nature 315:338-340, 1985; Kolliasら, Cell 46:89-94, 1986) ; 脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら, Cell 48:703-712, 1987) ; 骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (Sani, Nature 314:283-286, 1985) ; ならびに視床下部において活性な性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら, Science 234:1372-1378, 1986) 。

10

20

30

40

50

【0166】

エンハンサー配列は、高等真核生物による本発明のMK61ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるようにプロモーターに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシス作用性エレメントである。エンハンサーは、比較的方向および位置に非依存性である。これらは、転写ユニットに対して5'側および3'側に見出されている。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である (例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインスリン)。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、MK61核酸分子に対して5'側または3'側の位置でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'側の部位に配置される。

【0167】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、所望な隣接配列を全て含んでも良いし、含まなくても良い。所望される隣接配列の1つ以上が予めベクター内に存在しない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0168】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen Company, Carlsbad, CA)、pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA)、pET15 β (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA)、pETL (BlueBacII, Invitrogen)、pDSR- α (PCT公開番号WO 90/14363) ならびにpFastBacDual (Gibco/BRLL, Grand Island, NY) が挙げられる。

【0169】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならぬことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導體 (ColE1-ベースの高コピー数ファージミド、Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla, CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニ

ングプラスミド（例えば、TOPOTTM TA Cloning（登録商標）Kit、PCR2.1（登録商標）プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA）、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはバキュロウイルス発現系のようなウイルスベクター（pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA）のような、プラスミドが挙げられる。

【0170】

ベクターが構築され、そしてMK61ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完成したベクターが増幅および／またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。選択された宿主細胞へのMK61ポリペプチドについての発現ベクターの形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム媒介性形質転換、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクションまたはDEAE-デキストラン法のような方法を含む周知の方法、あるいは他の公知の技術によって達成され得る。選択される方法は、部分的には使用される宿主細胞の種類の関数である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら（前出）に記載される。

【0171】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞（例えば、E. coli）または真核生物宿主細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞）であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合にMK61ポリペプチドを合成し得、このMK61ポリペプチドは、続いて、（宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合）培養培地から収集され得るか、または（そのポリペプチドが分泌されない場合）直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）、および生物学的に活性な分子へと折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0172】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209から入手可能である。例としては、限定しないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) (ATCC受託番号CCL61)、CHO DHFR-細胞 (Urlaubら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 4216-4220 (1980))、ヒト胚性腎臓 (HEK) 293細胞または293T細胞 (ATCC受託番号CRL1573)、あるいは3T3細胞 (ATCC受託番号CCL92) のような哺乳動物細胞が挙げられる。適切な哺乳動物宿主細胞の選択、ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法は当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルのCOS-1 (ATCC受託番号CRL1650) およびCOS-7 (ATCC受託番号CRL1651) 細胞株、およびCV-1 (ATCC受託番号CCL70) 細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびげっ歯類細胞株（形質転換細胞株を含む）が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞株、ならびに初代外植片もまた、適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠失し得るか、または優性に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、限定しないが、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swissマウス、Balb-cマウスまたはNIHマウスから誘導された3T3株、BHKハムスター細胞株またはHakハムスター細胞株が挙げられ、これらはATCCより入手可能である。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現に関する分野の当業者にとって公知であり入手可能である。

【0173】

本発明に適切な宿主細胞として同様に、有用なのは細菌細胞である。例えば、E. coliの種々の菌株（例えば、HB101、(ATCC受託番号33694) DH5α、DH10、およびMC1061 (ATCC受託番号53338)）は、生物工学の分野におい

て宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp.、他の Bacillus spp.、Streptomyces spp. などの種々の菌株もまた、本方法において使用され得る。

【0174】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、Saccharomyces cerevisiae および Pichia pastoris が挙げられる。

【0175】

さらに、望ましい場合には、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kitts ら, Biotechniques, 14: 810-817 (1993); Lucklow, Curr. Opin. Biotechnol. 4: 564-572 (1993); および Lucklow ら, J. Virol., 67: 4566-4579 (1993) に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9 および Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA) である。

【0176】

グリコシル化 MK61 ポリペプチドを発現するために、トランスジェニック動物もまた使用され得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物（例えば、雌ウシまたはヤギ）を使用して、本発明のグリコシル化ポリペプチドを動物の乳汁中に得ることができる。MK61 ポリペプチドを産生するために、植物もまた使用し得るが、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において生じるものとは異なり、ヒト治療の用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0177】

（ポリペプチド産生）

MK61 ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養素を含む。E. coli 細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Luria Broth (LB) および／または Terrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、最小必須培地 (Minimal Essential Medium) (MEM) および／またはダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (DMEM) が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に示されるように血清および／または増殖因子を補充され得る。昆虫培養物についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および／またはウシ胎仔血清を補充した、グレース培地である。

【0178】

代表的に、形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物質として添加される。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカーエレメントによって指示される。例えば、選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に加えられる化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

【0179】

宿主細胞によって産生される MK61 ポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のようなクロマトグラフィー分離、免疫沈降のような免疫検出、および／または DNA 結合ゲルシフトアッセイのような活性アッセイが挙げられる。

【0180】

MK 6 1 ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計される場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、MK 6 1 ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、このポリペプチドは、細胞質および／または核（真核宿主細胞について）に、あるいは、細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に存在する。

【0181】

宿主細胞の細胞質および／または核（真核生物宿主細胞について）あるいは細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に位置するMK 6 1 ポリペプチドについて、細胞内物質（グラム陰性細菌についての封入体を含む）は、当業者に公知の標準的技術のいずれかを用いて宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、浸透圧性ショック、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および／または超音波破碎次いで遠心分離によって溶解され、ペリプラズム／細胞質の内容物を放出し得る。

10

【0182】

MK 6 1 ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、細胞内膜および／または細胞外膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後のペレット物質において見出される。次いで、ペレット物質は、極端なpHで、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性のpHで、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性のpHで、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理されて、封入体を放出させ、分断させ、そして可溶化させ得る。次いで、可溶化形態のMK 6 1 ポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。MK 6 1 ポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中およびMarstonら, Meth. Enz., 182: 264-275 (1990)に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

20

【0183】

いくつかの場合、MK 6 1 ポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でなくても良い。ポリペプチドをその三次構造に「リフォールディング」または変換し、そしてジスルフィド結合を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、可溶化されたポリペプチドを、一定のpH（通常は、7より上）および特定の濃度のカオトロピック剤（chaotrope）の存在に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、封入体可溶化に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤はより低い濃度で使用され、可溶化に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、リフォールディング／酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン／シスタミン、グルタチオン（GSH）／ジチオビスGSH、塩化第二銅、ジチオトレイトール（DTT）／ジチアンDTT、および2-2-メルカプトエタノール（bME）／ジチオーb（ME）が挙げられる。共溶媒が、リフォールディングの効率を増加するのに使用され得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

30

40

【0184】

封入体がMK 6 1 ポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後の上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるかまたは当該分野で公知の方法を使用して上清から単離され得る。

【0185】

溶液からのMK 6 1 ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン（MK 6 1 ポリペプチド／ヘキサHis（hexaHis））のようなタグまたは他の小さなペプチド（例えば、FLAG（Eastman Kodak Co., New Haven, CT）またはmyc（Invitrogen, Ca

50

rlsbald, CA)) をそのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがそのタグに対して高い親和性を有するアフィニティーカラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

【0186】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性で結合する。従って、ニッケルのアフィニティーカラム（例えば、Qiagen（登録商標）ニッケルカラム）は、MK61ポリペプチド／ポリHisの精製のために使用され得る。例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993) を参照のこと。

10

【0187】

さらに、MK61ポリペプチドは、MK61ポリペプチドを特異的に認識し得かつ結合し得る、モノクローナル抗体の使用を介して精製され得る。

【0188】

精製のための適切な手段としては、限定しないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー (molecular sieve chromatography)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）、続くゲル溶出、および分取用等電点電気泳動（「Isoprime」machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA）が挙げられる。いくつかの場合において、増加した純度を達成するために2つ以上の精製技術を組み合わせ得る。

20

【0189】

MK61ポリペプチドはまた、Merrifieldら, J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963); Houghtenら, Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132 (1985); ならびに、StewartおよびYoung, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）によって調製され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含むかまたは有さずに合成され得る。化学的に合成されたMK61ポリペプチドは、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化されて、ジスルフィド結合を形成し得る。化学的に合成されたMK61ポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製された対応のMK61ポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると期待され、従って、組換えまたは天然のMK61ポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

30

【0190】

MK61ポリペプチドを得る別の手段は、生物学的サンプル（例えば、MK61ポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および／または流体）からの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるかまたは当該分野で公知のタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、MK61ポリペプチドの存在は、例えば、組換え的に産生されたMK61ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用してモニターされ得る。

40

【0191】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、MK61に対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12303 (1997) を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Roberts, R., Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-273 (1999) もまた参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得

50

るオリゴヌクレオチドを得る方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、この異種プールのオリゴヌクレオチドは、それぞれが、5'ランダム化配列、中央部の予め選択された配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団（小集団）を、予め決定された生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0192】

米国特許第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,723,323号；および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。このプロセスは、確率論的な（stochastic）遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって行われ、その宿主細胞がその確率論的な遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する。次いで、この宿主細胞は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0193】

ペプチドまたはポリペプチドを産生するための別の方法は、Athersys, Inc.によって出願されたPCT/US98/20094（WO99/15650に記載される。これは、「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」（RAGE-GD）として知られており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法による、内因性遺伝子の発現の活性化または遺伝子の過剰発現を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、標的細胞中に調節配列を組み込むことによって、活性化または増加され、その標的細胞は、非相同組換えまたは非正統的（illegitimate）組換えによって、その遺伝子の発現を活性化し得る。この標的DNAは、まず、照射に供せられ、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、遺伝子の5'末端前方に切れ目（break）をランダムに配置し、遺伝子の転写を開始する。これが、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現を引き起こす。

【0194】

これらの方法はまた、包括的なIL-17様タンパク質発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ（例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび生物全体のアッセイ（例えば、植物、マウスなど））において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0195】

（化学的誘導体）

MK61ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、本明細書中以下に記載された開示を考慮して、当業者によって調製され得る。MK61ポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然で結合している分子の型または位置のいずれかにおいて異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の天然で結合している化学基の欠失によって形成される分子を含み得る。配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14もしくは配列番号16のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはMK61ポリペプチド改変体は、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、それが結合するタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物は、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終産物の調製物の治療学的用途のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0196】

これらのポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。これらのポリマーの各々は、代表的に、約2kDaと約100kDaとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、いくつかの分

子が示された分子量より多く、いくつかの分子は示された分子量より少ない分子量を有することを示す)。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約 5 k D a と約 5 0 k D a の間、より好ましくは、約 1 2 k D a と約 4 0 k D a との間、そして最も好ましくは、約 2 0 k D a と約 3 5 D a との間である。

【0197】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-結合型またはO-結合型炭水化物、糖、ホスフェート、ポリエチレングリコール (P E G) (これは、モノー (C₁ - C₁₀) アルコキシポリエチレングリコール、またはアリールオキシポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用される P E G の形態を含む)、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン (例えば、約 6 k D の低分子量デキストラン)、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ (N-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール)、およびポリビニルアルコール。配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または M K 6 1 ポリペプチド改変体の共有結合したマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に包含される。

10

【0198】

一般に、化学的誘導体化は、タンパク質と活性化されたポリマー分子とを反応させるために用いられる任意の適切な条件下で実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に、(a) ポリペプチドと活性化されたポリマー分子 (例えば、そのポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体) とを反応させる工程であって、この反応が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、または配列番号 16 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは M K 6 1 ポリペプチド改変体が、1つ以上のポリマー分子との結合を生じる条件下で行われる、工程、および (b) 反応産物を得る工程、を包含する。最適反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子：タンパク質の比がより大きくなればなるほど、結合されるポリマー分子の割合がより多くなる。1つの実施形態において、M K 6 1 ポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一のポリマー分子の部分をも有し得る。例えば、米国特許第 5, 234, 784 号を参照のこと。

20

30

【0199】

ポリペプチドのペグ化は、特に、例えば、以下の参考文献に記載されるような、当該分野で公知のペグ化反応のいずれかによって実施され得る：Francisら, Focus on Growth Factors, 3: 4-10 (1992); EP 0154316; EP 0401384 および米国特許第 4, 179, 337 号。例えば、ペグ化は、本明細書において記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子 (または、類似の反応性の水溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応について、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。還元アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。反応性アルデヒドは、例えば、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド (これは、水溶性である) であるか、またはそのモノ C₁ - C₁₀ アルコキシ誘導体もしくはそのアリールオキシ誘導体である (米国特許第 5, 252, 714 号を参照のこと)。

40

【0200】

別の実施形態において、M K 6 1 ポリペプチドは、ビオチンと化学的に結合し得、次いで、その結合体化されたビオチン/M K 6 1 ポリペプチド分子は、アビジンへの結合が可能となり、その結果、四価のアビジン/ビオチン/M K 6 1 ポリペプチド分子を生じる。M K 6 1 ポリペプチドはまた、ジニトロフェノール (D N P) またはトリニトロフェノール (T N P) に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗 D N P または抗 T N P - I g

50

Mとともに沈澱され、10の結合価の十量体の結合体を形成し得る。

【0201】

一般に、本発明のMK61ポリペプチド誘導体の投与によって緩和され得るかまたは調節され得る状態は、MK61ポリペプチドについて本明細書において記載される状態を含む。しかし、本明細書において開示されるMK61ポリペプチド誘導体は、誘導体化されていない分子と比較した場合、さらなる活性、増強した生物学的活性もしくは減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加した半減期もしくは減少した半減期）を有し得る。

【0202】

（遺伝的に操作された非ヒト動物）

非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、または他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、もしくはヒツジ、または他の家畜動物）は、本発明の範囲内にさらに含まれ、ここで、ネイティブMK61ポリペプチドをコードする遺伝子は、破壊されており（「ノックアウト」）、その結果、この遺伝子の発現レベルは、有意に減少されるかまたは完全に消失する。このような動物は、米国特許第5,557,032号に記載されるような技術および方法を用いて調製され得る。

【0203】

本発明はさらに、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、または他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜動物）を含み、ここで、この動物についてのMK61遺伝子のネイティブな形態または異種MK61遺伝子のいずれかは、この動物によって過剰に発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,743号およびPCT出願番号WO94/28122に記載されるような、周知の方法を用いて調製され得る。

【0204】

本発明はさらに、非ヒト動物を含み、ここで、本発明のMK61ポリペプチドの1つ以上についてのプロモーターが、1つ以上のネイティブMK61ポリペプチドの発現のレベルを変更するために、（例えば、相同組換え方法を用いることによって）活性化されているかまたは不活性化されている。

【0205】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングのために用いられ得る。このようなスクリーニングにおいて、動物に対する薬物候補の影響が測定され得る。例えば、薬物候補は、MK61遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生されるMK61ポリペプチドの量は、薬物候補への動物の曝露後、測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患または病理学的状態を生じる得るか、または付随し得る。このような場合、遺伝子の発現を減少させる薬物候補の能力、あるいは病理学的状態を予防、抑制または排除する薬物候補の能力を試験し得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の産生は、疾患または病理学的状態を、生じ得るか、またはこれらに関連し得る。このような場合、薬物候補がこのような代謝産物の産生を減少させる能力、あるいは薬物候補が病理学的状態を予防、抑制または排除する能力を試験し得る。

【0206】

（マイクロアレイ）

DNAマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置される核酸の小型かつ高密度アレイである。アレイ内の各セルまたはエレメントは、単一種のDNAの多数のコピーを有し、その同種mRNAに対するハイブリダイゼーションのための標的として働く。DNAマイクロアレイ技術を用いた発現プロファイリングにおいて、mRNAはまず、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素的に変換される。この物質は、このマイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAが洗浄

10

20

30

40

50

によって除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現が、各標的DNAに特異的に結合された標識cDNAの量を定量化することによって可視化される。このように、幾千もの遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットかつ並列様式で定量化され得る。

【0207】

このハイスループット発現プロファイリングは、以下を含むがこれらに限定されない、本発明のMK61分子に関する、広い範囲の適用を有する：治療剤のための標的としてのMK61疾患関連遺伝子の同定および検証；MK61分子およびそのインヒビターの分子毒物学；治験のための代理マーカーの集団および世代の階層化；ならびに、ハイスループットスクリーニング（HTS）における選択的化合物の同定を補助することによるMK61 10
関連低分子薬物発見の強化。

【0208】

（選択的結合剤）

本明細書で使用される場合、用語「選択的結合剤」とは、1つ以上のMK61ポリペプチドに対して特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子。適切な選択的結合剤は、当該分野で公知の方法を用いて調製され得る。本発明の例示的なMK61ポリペプチド選択的結合剤は、MK61ポリペプチドの特定の部分に結合し得、これによってMK61ポリペプチドレセプターへのこのポリペプチドの結合を阻害する。

【0209】

選択的結合剤（例えば、MK61ポリペプチドに結合する抗体および抗体フラグメント）は、本発明の範囲内にある。抗体は、単一特異性ポリクローナルを含むポリクローナル抗体、モノクローナル（MAb）抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体（例えば、CDRグラフト（grafted）抗体）、ヒト抗体、単鎖抗体および／または二重特異性抗体、ならびにそれらの、フラグメント、改変体または誘導体であり得る。抗体フラグメントは、MK61ポリペプチド上のエピトープに結合するそれらの抗体の部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素的切断によって生じるFabおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現）によって生じるものが挙げられる。 20
30

【0210】

MK61ポリペプチドに対するポリクローナル抗体は、一般に、動物（例えば、ウサギまたはマウス）において、MK61ポリペプチドおよびアジュバントの複数回の皮下注射、筋内注射または腹腔内注射によって産生される。MK61ポリペプチドを、免疫されるべき種において免疫原性であるキャリアタンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、または大豆トリプシンインヒビター）と結合体化させることが有用であり得る。また、凝集剤（例えば、ミョウバン）は、免疫応答を増強するために用いられる。免疫後、これらの動物を、採血し、そして血清を、抗MK61ポリペプチド抗体力価についてアッセイする。

【0211】

MK61ポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の方法を用いて産生される。モノクローナル抗体を調製するための適切な方法の例としては、Kohlerら、Nature, 256:495-497 (1975)のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)）；Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)が挙げられる。MK61ポリペプチドと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。 40

【0212】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤としての使用のために改変され得る。1つの実施形態は、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同であり、その鎖の残部が、別の種由来の抗体または別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかまたは相同である、「キメラ」抗体である。このような抗体のフラグメントもまた、これらのフラグメントもまた、所望の生物学的活性を示す限り、含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1985)を参照のこと。

【0213】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および同第5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源由来の抗体に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野で記載されている方法 (Jonesら, Nature 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, Science 239:1534-1536 (1988))を用いて、ヒト抗体の対応する領域についてのげっ歯類相補性決定領域 (CDR)の少なくとも一部分を置換することによって実施され得る。

【0214】

MK61ポリペプチドに結合するヒト抗体、フラグメント、改変体および／または誘導体もまた、本発明に包含される。内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体のレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物 (例えば、マウス)を用いて、このような抗体は、MK61抗原 (すなわち、少なくとも6個連続するアミノ酸を有する) (必要に応じてキャリアと結合体化される)での免疫によって産生される。例えば、Jakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555 (1993); Jakobovitsら, Nature 362:255-258 (1993); Bruggemannら, Year in Immunol., 7:33 (1993)を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、この動物における免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖をコードする内因性遺伝子座を無能化し、かつそのゲノム中に、ヒトの、重鎖および軽鎖のタンパク質をコードする遺伝子座を挿入することによって生成される。次いで、部分的に改変された動物 (すなわち、完全未満の補体の改変を有する動物)を交雑育種して、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得る。免疫原を投与された場合、これらのトランスジェニック動物は、これらの抗原に対して免疫特異的である可変領域を含む、(例えば、マウスではなく)ヒトのアミノ酸配列を含む抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT出願番号PCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、PCT出願番号PCT/US91/245、PCT/GB89/01207、ならびにEP 546073B1およびEP 546073A1に記載される。ヒト抗体はまた、本明細書中に記載されるように、宿主細胞における組換えDNAの発現によってか、またはハイブリドーマ細胞における発現によって産生され得る。

【0215】

別の実施形態において、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーから産生され得る (Hoogenboomら, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marksら, J. Mol. Biol. 222:581 (1991))。これらは、糸状バクテリオファージの表面上の抗体レパートリーの提示によって、免疫のプロセス識別子を模倣し、そしてその後、選りぬきの抗原に対するそれらの結合によってファージを選択する。このような技術の1つは、Adamsらによって出願された、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これは、このようなアプローチを用いた、MPL-レセプターおよびmsk-レセプターに対する高親和性かつ機能的アゴニスト抗体

10

20

30

40

50

の単離を記載している。

【0216】

キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、およびヒト化抗体は、代表的には、組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書に記載されるか、または当該分野で公知の材料および手順を用いて発現される。好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物の宿主細胞（例えば、CHO細胞）において産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書において記載されるように、宿主細胞における組換えDNAの発現によってかまたはハイブリドーマ細胞における発現によって産生され得る。

【0217】

本発明の抗MK61抗体は、MK61ポリペプチドの検出および定量的ための、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ（Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）のような任意の公知のアッセイ方法において用いられ得る。これらの抗体は、用いられるアッセイ方法に適切な親和性で、MK61ポリペプチドに結合する。

【0218】

診断適用について、特定の実施形態において、抗MK61抗体は、検出可能な部分で標識され得る。検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを生成し得る、任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、もしくは ^{125}I ）、蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）、または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ（Bayerら, Meth. Enz., 184: 138-163 (1990)））であり得る。

【0219】

競合的結合アッセイは、標識された標準物（例えば、MK61ポリペプチド、またはその免疫学的反応性部分）が、限られた量の抗MK61抗体との結合について、試験サンプルの分析物（MK61ポリペプチド）と競合する能力に依存する。試験サンプル中のMK61ポリペプチドの量は、抗体に結合する標準物の量に反比例する。結合する標準物の量を決定するのを容易にするため、これらの抗体は、代表的に、競合の前または後に不溶化され、その結果、これらの抗体に結合された標準物および分析物は、結合されていないままの標準物および分析物から、都合よく分離され得る。

【0220】

サンドイッチアッセイは、代表的に、検出および／または定量されるべきタンパク質の異なる免疫原性部分（またはエピトープ）に各々結合し得る、2つの抗体の使用を包含する。サンドイッチアッセイにおいて、試験サンプルの分析物は、代表的に、固体支持体上に固定化されている第1の抗体に結合し、その後、第2の抗体がこの分析物に結合し、従って、不溶性の3つの部分の複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、それ自体に検出可能な部分で標識されてもよいし（直接的サンドイッチアッセイ）、検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接的サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）であり、この場合、検出可能な部分は、酵素である。

【0221】

選択的結合剤（選択的結合因子）（抗MK61抗体を含む）はまた、インビボでのイメージングに有用である。検出可能な部分で標識された抗体を、動物に、好ましくは、血流中に投与し得、そして宿主における標識された抗体の存在および位置を、アッセイする。抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物において検出可能な任意の部分で標識され得る。

10

20

30

40

50

【0222】

本発明の選択的結合剤（抗体を含む）は、治療剤として用いられ得る。これらの治療剤は、一般に、これらが、MK61ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、それぞれ、増強または減少させる点で、アゴニストまたはアンタゴニストである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、MK61ポリペプチドに特異的に結合し得、そして、インビボまたはインビトロにおいてMK61ポリペプチドの機能的活性を阻害または排除し得る、抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合剤（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約50%、そして好ましくは、少なくとも約80%、MK61ポリペプチドの機能的活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合剤は、MK61結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得、これによって、インビボまたはインビトロにおいてMK61活性を阻害または排除する、抗体であり得る。選択的結合剤（アゴニストおよびアンタゴニスト抗MK61抗体を含む）は、当該分野で周知のスクリーニングアッセイによって同定される。

【0223】

本発明はまた、MK61選択的結合剤（例えば、抗体）および生物学的サンプルにおいてMK61ポリペプチドのレベルを検出するのに有用な他の試薬を備えるキットに関する。このような試薬は、検出可能な標識、ブロッキング血清、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬を含み得る。

【0224】

MK61ポリペプチドは、「発現クローニング」ストラテジーを用いてMK61リガンドをクローニングするために使用され得る。放射線標識（¹²⁵ヨウ素）されたMK61ポリペプチドまたは「親和性／活性－タグ化」MK61ポリペプチド（例えば、Fc融合体またはアルカリホスファターゼ融合体）を結合アッセイに用いて、MK61リガンドを発現する細胞型または細胞株あるいは組織を同定し得る。次いで、このような細胞または組織から単離されたRNAは、cDNAに変換され、哺乳動物発現ベクターにクローニングされ、そして哺乳動物細胞（例えば、COS、または293）中にトランスフェクトされて、発現ライブラリーを生成し得る。次いで、放射線標識されたかまたはタグ化されたMK61ポリペプチドを親和性試薬として用いて、MK61リガンドを発現するこのライブラリーにおける細胞のサブセットを同定し、そして単離し得る。次いで、DNAは、これらの細胞から単離され、次ぎに哺乳細胞中にトランスフェクトされて、MK61リガンドを発現する細胞の画分が、元のライブラリーにおける発現よりも何倍も高い、2次発現ライブラリーを生成する。この富化プロセスは、MK61リガンドを含む単一組換えクローンが単離されるまで、反復的に繰り返され得る。MK61リガンドの単離は、MK61シグナル伝達経路の新規のアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するのに有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、MK61リガンド、抗MK61リガンド抗体、低分子、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。これらは、本明細書中に記載の疾患または障害を含む、1以上の疾患または障害を、処置、予防または診断するために使用され得る。

【0225】

（MK61ポリペプチド活性の他のモジュレーターについてのアッセイ）
いくつかの状況において、MK61ポリペプチドの活性のモジュレーターである分子（すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト）を同定することが所望され得る。MK61様ポリペプチドを調節する天然の分子または合成分子は、1つ以上のスクリーニングアッセイ（例えば、本明細書において記載されるアッセイ）を用いて同定され得る。このような分子は、エキソビボ様式、または注射によるインビボ様式、または経口送達、移植装置などのいずれかによって投与され得る。

【0226】

「試験分子」とは、MK61ポリペプチドの活性を調節（すなわち、増加または減少）する能力についての評価下にある分子をいう。最も通常には、試験分子は、MK61ポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまた、MK61ポリペプチド活性を（例

えば、MK61 遺伝子発現に影響することによってか、またはMK61 結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって）間接的に調節し得ることもまた考慮される。1つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは約 10^{-8} M、より好ましくは約 10^{-9} M、そしてなおより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数で、MK61 ポリペプチドと結合する。

【0227】

MK61 ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、MK61 ポリペプチドは、試験分子とMK61 ポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で試験分子とともにインキュベートされ、そして相互作用の程度が測定され得る。試験分子は、実質的に精製された形態においてかまたは粗混合物においてスクリーニングされ得る。 10

【0228】

特定の実施形態において、MK61 ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、MK61 ポリペプチドと相互作用し、その活性を調節する、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得る。MK61 ポリペプチド発現を調節する分子は、MK61 ポリペプチドをコードする核酸に相補的であるか、あるいはMK61 ポリペプチドの発現を指向するかまたは制御する核酸配列に相補的である核酸を含み、そしてこれらの核酸は、発現のアンチセンス調節因子として作用する。

【0229】

一旦、試験分子のセットが、MK61 ポリペプチドと相互作用すると同定されると、この分子は、MK61 ポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とMK61 ポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形式で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、MK61 ポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてMK61 ポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するための1以上のアッセイによって決定される。 20

【0230】

試験分子とMK61 ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むMK61 ポリペプチドの改変形態が、免疫アッセイ中で使用され得る。 30

【0231】

MK61 ポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、多様なインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのMK61 ポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、その結合パートナーに対するMK61 ポリペプチドの結合の速度および／または程度を増加または減少させるその能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1つのアッセイにおいて、MK61 ポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中に固定される。次いで、放射標識したMK61 結合パートナー（例えば、ヨウ素化したMK61 結合パートナー）および試験分子が、このウェルに、1つずつ（いずれかの順序で）または同時にのいずれかで添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して）放射活性を計数し、結合パートナーがMK61 ポリペプチドに結合した程度を決定する。代表的に、分子は、一定の濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1以上の要素を欠く一連のコントロールウェルが、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代替法は、タンパク質の「位置」を逆にすること（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対してMK61 結合パートナーを固定し、試験分子および放射標識したMK61 ポリペプチドと共にインキュベートし、そしてMK61 ポリペプチド結合の程度を決定する工程）を包含する。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、第18章、A 40 50

usubelら編、John Wiley & Sons, New York, NY (1995)を参照のこと。

【0232】

放射性標識に対する代替として、MK61ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP））に結合したストレプトアビジン（これらは、比色定量的に検出されるかまたはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る）を使用して検出され得る。MK61ポリペプチドまたはMK61結合パートナーに対する、ビオチンに結合体化されている抗体もまた用いられ得、APまたはHRPに連結した酵素連結ストレプトアビジンとのインキュベーション後に、検出され得る。

10

【0233】

MK61ポリペプチドまたはMK61結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固相基材への付着によって固定され得る。基材-タンパク質複合体は、相補タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され、そしてMK61ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材-タンパク質複合体は、カラムに固定され、そして試験分子および相補タンパク質をこのカラムに通過させる。MK61ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成は、次いで、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合など）のいずれかを使用して評価され得る。

20

【0234】

MK61ポリペプチドとMK61結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、BIACoreアッセイシステム（Pharmacia, Piscataway, NJ））である。BIACoreシステムは、製造業者のプロトコルを用いて実行され得る。このアッセイは、本質的に、MK61ポリペプチドまたはMK61結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（これは、検出器に配置される）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバに注入され得る。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコートされた側面に物理的に会合する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定される。

30

【0235】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物を、MK61ポリペプチドとMK61結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について、一緒に評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に記載される通りである。

40

【0236】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるアッセイ）は、MK61ポリペプチドとMK61結合パートナーによる複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイライブラリー、合成ペプチドライブラリー、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0237】

MK61ポリペプチドとMK61結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少する化合物はまた、MK61ポリペプチドまたはMK61結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞

50

および細胞株は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌ類またはげっ歯類の供給源由来である。MK61結合パートナーをその表面で発現する細胞へのMK61ポリペプチドの結合は、試験化合物の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、MK61結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0238】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、MK61遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるMK61ポリペプチドの量は、薬物候補への細胞培養物の曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物への薬物候補の実際の影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物への特定の影響を有し得る。このような場合に、薬物候補が遺伝子の発現を増加または減少させる能力、またはその薬物候補が細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害する能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の生成が、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合、薬物候補が細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する能力が試験され得る。

【0239】

酵母ツーハイブリッド系（Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、88：9578～9583（1991））を使用して、MK61ポリペプチドに結合するかまたは相互作用する、新規なポリペプチドを同定し得る。例として、酵母GAL4-DNA結合ドメインに融合したMK61ポリペプチドの細胞質ドメインをコードするDNAを含むハイブリッド構築物が、ツーハイブリッドベイト（bait）プラスミドとして使用され得る。スクリーニングから出現する陽性クローンはさらに特徴付けられ、相互作用タンパク質を同定し得る。

【0240】

（P38インヒビター）

細胞外刺激と、細胞からの、IL-1およびTNF α の分泌との間への介入のための新規のアプローチは、このシグナル伝達経路に存在するキナーゼの阻害を通じたシグナル伝達の遮断を含む。1つの例は、既知のser/thrキナーゼ（Hanら、Biochimica Biophysica Acta、1265：224-227（1995）に報告されたクローン）であるP-38（「RK」または「SAPK-2」とも呼ばれる、Leeら、Nature、372：739（1994））の阻害による。P-38への競合結合アッセイにおける有効性について、直線的な関係が示されており、そして同じインヒビターは、LPSでの刺激後に、単球からのIL-1の分泌のレベルを減少させる。単球のLPSでの刺激後、TNF α についてのメッセンジャーRNAのレベルは100倍の増大を示したが、TNF α のタンパク質レベルは10,000倍に増大した。従って、TNFのシグナル伝達の相当の増幅が、翻訳レベルで生じる。P-38インヒビターの存在下での単球のLPSでの刺激後、mRNAのレベルは影響を受けないが、最終的なTNFタンパク質のレベルは劇的に（P-38インヒビターの有効性に依存して、80～90%まで）減少する。従って、上記の実験は、P-38の阻害が翻訳効率の減少を導くという結論の強力な支持を導く。さらに、TNF α が翻訳制御下にあるという証拠が、Beutlerら、およびLeeの欠失実験において見出される。ここでは、3'非翻訳mRNA（3'UTR）のセグメントが除去され、それによってTNF α の高い翻訳効率を生じる。より重要なことは、P-38インヒビターは、TNF α mRNAの適切なセグメントが欠失させられた場合には、TNF α のレベル（すなわち、翻訳効率）に対して作用を有しなかった。このように、P-38に対するインヒビターの結合のレベルと、同じインヒビターでのLPSでの刺激後のIL-1およびTNF α のレベルの低下との間での相関するデータ、ならびに、TNF α およびIL-1の両方の翻訳効率に対するP-38インヒビ

10

20

30

40

50

ターの作用に関する上記の生化学的な証拠が、相関関係の強力な原因でありそしてそれを達成する。細胞中での P-38 の役割もさらに詳細に記載されている；従って、その阻害によって得られる炎症性疾患または他の疾患状態に関する他の有利な影響が、おそらくすぐに使用され得る。

【0241】

TNF α および／または IL-1 のレベルの上昇は、以下を含むがこれらに限定されない多数の疾患状態の発症、病因、または悪化に寄与し得る：慢性関節リウマチ；変形性関節症；リウマチ様脊椎炎；通風性関節炎；炎症性腸疾患；成人呼吸窮迫症候群（ARDS）；乾癬；クローン病；アレルギー性鼻炎；潰瘍性大腸炎；過敏症；接触皮膚炎；喘息；TNF α の阻害に敏感なそのようなウイルス—HIV-1、HIV-2、HIV-3、サイトメガロウイルス（CMV）、インフルエンザ、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（HSV-1、HSV-2、および帯状ヘルペスを含む）を含む、抗ウイルス治療；筋肉の萎縮；悪態症；ライター症候群；II 型糖尿病；骨再吸収疾患；移植片対宿主反応；虚血性再灌流損傷；アテローム性動脈硬化症；脳の外傷；アルツハイマー病；多発性硬化症；大脳マラリア；敗血症；敗血症性ショック；毒性ショック症候群；感染症に起因する発熱および筋肉痛。

【0242】

置換されたイミダゾール、ピロール、ピリジン、ピリミジン、および同様の化合物は、プロ炎症性サイトカイン（例えば、IL-1、IL-6、IL-8、および TNF）の阻害による、サイトカインによって媒介される疾患の処置における使用について記載されている。サイトカインによって媒介される疾患の処置における使用のための置換されたイミダゾールは、米国特許第 5,593,992 号；WO 93/14081；WO 97/18626；WO 96/21452；WO 96/21654；WO 96/40143；WO 97/05875；および WO 97/05878 に記載されている。炎症の処置における使用のための置換されたイミダゾールは、米国特許第 3,929,807 号に記載されている。サイトカインによって媒介される疾患の処置における使用のための置換されたピロール化合物は、WO 97/05877；WO 97/05878 号；WO 97/16426；WO 97/16441；および WO 97/16442 に記載されている。サイトカインによって媒介される疾患の処置における使用のための置換されたアリールおよびヘテロアリールが融合されたピロール化合物は、WO 98/22457 に記載されている。サイトカインによって媒介される疾患の処置における使用のための置換されたピリジン、ピリミジン、ピリミジノン、およびピリダジン化合物は、WO 98/24780；WO 98/24782；WO 99/24404；および WO 99/32448 に記載されている。

【0243】

（内部移行タンパク質）

TAT タンパク質配列（HIV 由来）を、細胞膜の脂質二重層の成分へと標的化することによって、タンパク質を細胞内へ内向させるために使用することができる。例えば、Fallwell ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:664-668（1994）を参照のこと。例えば、HIV tat タンパク質の 11 個のアミノ酸配列（YGRKKRRQRRR；配列番号 X）（「タンパク質形質導入ドメイン」または TAT-PDT と呼ばれる）は、 β -ガラクトシダーゼのような大きな生体活性タンパク質の送達、ならびに^{P27}Kip の細胞の細胞質膜および核膜の通過を媒介することが示されている。Schwanrize ら、Science、285:1569-1572（1999）；および Nagahara ら、Nature Medicine、4:1449-1452（1998）を参照のこと。Schwarze ら、前出は、培養された細胞が、TAT-PDT と β -ガラクトシダーゼとの融合体に暴露された場合に、 β -ガラクトシダーゼ活性を獲得したことを示した。TAT- β -gal 融合タンパク質でのマウスの注射は、（肝臓、腎臓、肺、心臓、および脳組織を含む）多数の組織中で β -gal の発現を生じた。

【0244】

従って、T A Tタンパク質配列は、細胞中に所望されるタンパク質またはポリペプチドを内向させるために使用され得ることが理解される。本発明の状況では、T A Tタンパク質配列は、M K 6 1アンタゴニスト（すなわち、抗M K 6 1選択的結合試薬、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド）のような別の分子に融合され得、M K 6 1分子の活性を阻害するように細胞内に投与され得る。本明細書中で使用される場合には、用語「M K 6 1分子」は、本明細書中で定義されるように、M K 6 1核酸分子およびM K 6 1ポリペプチドの両方をいう。所望される場合には、M K 6 1タンパク質自体、またはM K 6 1のペプチドフラグメントもしくは改変された形態は、上記の手順を使用して、細胞への投与のためのそのようなタンパク質トランスデューサーに融合され得る。

10

【0245】

（M K 6 1ポリペプチドを使用する細胞供給源の同定）

本発明の特定の実施形態に従うと、M K 6 1ポリペプチドに関係している特定の細胞型の供給源を決定することが可能であることが、有用であり得る。例えば、適切な治療の選択の補助として、疾患または病理学的な状態の起源を決定することが有用であり得る。

【0246】

（治療的用途）

本発明のポリペプチドおよびアゴニストおよびアンタゴニストもまた、本明細書中に記載されているものを含む多数の疾患および障害の診断および処置に有用である。これらには、白血球および／または破骨細胞の増殖、分化、生存、および／またはアポトーシスに関係している疾患および障害が含まれるが、これらに限定されない。本発明のポリペプチドおよびアゴニストおよびアンタゴニストはまた、リンパ球、白血球、および他の癌細胞の増殖、生存性、および／またはアポトーシスを調節することにおいて有用である。

20

【0247】

h M K 6 1 T 1は、P M Aで処置された癌細胞株から同定された。従って、h M K 6 1 T 1細胞表面レセプターの産生は、P M Aおよび／またはR N Aスプライシングレベルでの他の増殖シグナルによって調節され得る。h M K 6 1 T 1の細胞外ドメインの一部に対応しているペプチドが、ヒトの尿および血清中で、プロテオミックス（p r o t e o m i c s）分析を通じて同定された。さらに、h M K 6 1の選択的な発現は、ノーザンブロットイングによって決定されたように、脾臓、リンパ節、末梢血白血球、および胎児の肝臓中で観察された。従って、本発明のポリペプチドおよびアゴニストおよびアンタゴニストはまた、免疫システムの障害の診断および／または処置（本明細書中で記載されているように）において、ならびに肝臓の保護および再生においても、有用である。

30

【0248】

多くの疾患および医学的状態はT N Fに関係しており、そして炎症性の症状としてしばしば分類される。T N Fに関係している疾患には、自然発生した疾患または病態モデル、あるいは、体液もしくは組織中のT N Fレベルの増大に関係しているか、または体から採取された細胞もしくは組織が培養物中でT N Fレベルの上昇を生じる場合の医学的な症状が含まれるが、これらに限定されない。多くの場合には、T N Fに関係している疾患はまた、以下によっても認識され得る：（1）疾患または医学的な症状に関係している病理学的知見が、T N Fの投与またはT N Fの発現のアプレギュレーションによって動物中で実験的に模倣され得る、あるいは（2）疾患または医学的な症状の実験用の動物モデルにおいて誘導される病理学が、T N Fの作用を阻害する試薬での処置によって阻害され得るかまたは完全に廃止され得る。しかし、M K 6 1ポリペプチドの作用機構が、T N Fの阻害を必ずしも必要としないことが理解される。

40

【0249】

急性および慢性的なT N Fに関係している疾患の排他的ではないリストには以下が含まれるが、これらに限定されない：悪態症／食欲低下；癌（例えば、白血病）；慢性疲労症候群；環状動脈の症状および適応症（うっ血性心不全、環状動脈の再狭窄、心筋梗塞、および環状動脈のバイパス移植を含む）；鬱状態；糖尿病（例えば、若年性発症1型、および

50

真性糖尿病)；子宮内膜症、子宮内膜炎および関連する症状；結合組織炎 (f i b r o m y a l g i a) または痛覚脱失症；移植片対宿主拒絶；痛覚過敏症；炎症性腸疾患 (クローン病、および *C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e* に関係している下痢を含む)；虚血 (大脳の虚血 (外傷、癲癇、出血、または発作 (これらのそれぞれが、神経変性を導き得る) の結果としての脳の損傷) を含む)；肺疾患 (例えば、成人呼吸窮迫症候群、喘息、および肺繊維症)；多発性硬化症；神経炎症疾患；眼の疾患および症状 (角膜移植、眼球の変性、およびブドウ膜炎を含む)；疼痛 (癌に関係している痛みを含む)；膵炎；歯周疾患；前立腺炎 (細菌性および非細菌性) および関連する症状；乾癬および関連する症状；肺繊維症；再灌流損傷；リウマチ病 (例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、若年性 (リウマチ) 関節炎、血清陰性の多発性関節炎、強直性脊椎炎、ライター症候群、および反応性関節炎、スティル病、乾癬性関節炎、腸性関節炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、強皮症、全身性硬化症、脈管炎 (例えば、川崎病)、大脳脈管炎、ライム病、ブドウ球菌によって誘導される (「敗血症性の」) 関節炎、シェーグレン症候群、リウマチ熱、多発性軟骨炎、および多発性筋痛リウマチ、ならびに巨大細胞動脈炎)；敗血症性ショック；放射線治療による副作用；全身性エリテマトーデス；一時的な下顎骨の関節疾患；甲状腺炎；緊張、捻挫、軟骨の損傷、外傷、整形外科手術、感染 (例えば、H I V、*C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e*、および関連する種) によって生じる組織移植または炎症性の症状、あるいは他の疾患プロセス。

【0250】

T N F α インヒビターは、T N F の産生をダウンレギュレーションまたは阻害すること、T N F を結合させないこと、そのレセプターへの T N F の結合を妨害すること、またはそのレセプターへの結合後の T N F のシグナル伝達の調節を妨害することによって、作用し得る。従って、用語「T N F α インヒビター」は、可溶化された T N F レセプター、T N F に対する抗体、T N F レセプターに対する抗体、T N F α 転換酵素 (T A C E) のインヒビター、および T N F 活性に影響を与える他の分子を含む。

【0251】

種々の種の T N F α のインヒビターは、以下の参考文献を含む当該分野で開示されている：

欧州特許出願番号第 3 0 8 3 7 8 号；同第 4 2 2 3 3 9 号；同第 3 9 3 4 3 8 号；同第 3 9 8 3 2 7 号；同第 4 1 2 4 8 6 号；同第 4 1 8 0 1 4 号；同第 4 1 7 5 6 3 号；同第 4 3 3 9 0 0 号；同第 4 6 4 5 3 3 号；同第 5 1 2 5 2 8 号；同第 5 2 6 9 0 5 号；同第 5 6 8 9 2 8 号；同第 6 6 3 2 1 0 号；同第 5 4 2 7 9 5 号；同第 8 1 8 4 3 9 号；同第 6 6 4 1 2 8 号；同第 5 4 2 7 9 5 号；同第 7 4 1 7 0 7 号；同第 8 7 4 8 1 9 号；同第 8 8 2 7 1 4 号；同第 8 8 0 9 7 0 号；同第 6 4 8 7 8 3 号；同第 7 3 1 7 9 1 号；同第 8 9 5 9 8 8 号；同第 5 5 0 3 7 6 号；同第 8 8 2 7 1 4 号；同第 8 5 3 0 8 3 号；同第 5 5 0 3 7 6 号；同第 9 4 3 6 1 6 号；

米国特許第 5, 1 3 6, 0 2 1 号；同第 5, 9 2 9, 1 1 7 号；同第 5, 9 4 8, 6 3 8 号；同第 5, 8 0 7, 8 6 2 号；同第 5, 6 9 5, 9 5 3 号；同第 5, 8 3 4, 4 3 5 号；同第 5, 8 1 7, 8 2 2 号；同第 5 8 3 0 7 4 2 号；同第 5, 8 3 4, 4 3 5 号；同第 5, 8 5 1, 5 5 6 号；同第 5, 8 5 3, 9 7 7 号；同第 5, 3 5 9, 0 3 7 号；同第 5, 5 1 2, 5 4 4 号；同第 5, 6 9 5, 9 5 3 号；同第 5, 8 1 1, 2 6 1 号；同第 5, 6 3 3, 1 4 5 号；同第 5, 8 6 3, 9 2 6 号；同第 5, 8 6 6, 6 1 6 号；同第 5, 6 4 1, 6 7 3 号；同第 5, 8 6 9, 6 7 7 号；同第 5, 8 6 9, 5 1 1 号；同第 5, 8 7 2, 1 4 6 号；同第 5, 8 5 4, 0 0 3 号；同第 5, 8 5 6, 1 6 1 号；同第 5, 8 7 7, 2 2 2 号；同第 5, 8 7 7, 2 0 0 号；同第 5, 8 7 7, 1 5 1 号；同第 5, 8 8 6, 0 1 0 号；同第 5, 8 6 9, 6 6 0 号；同第 5, 8 5 9, 2 0 7 号；同第 5, 8 9 1, 8 8 3 号；同第 5, 8 7 7, 1 8 0 号；同第 5, 9 5 5, 4 8 0 号；同第 5, 9 5 5, 4 7 6 号；同第 5, 9 5 5, 4 3 5 号；

国際 (W O) 特許出願番号第 9 0 / 1 3 5 7 5 号、同第 9 1 / 0 3 5 5 3 号、同第 9 2 / 0 1 0 0 2 号、同第 9 2 / 1 3 0 9 5 号、同第 9 2 / 1 6 2 2 1 号、同第 9 3 / 0 7 8 6

3号、同第93/21946号、同第93/19777号、同第95/34326号、同第96/28546号、同第98/27298号、同第98/30541号、同第96/38150号、同第96/38150号、同第97/18207号、同第97/15561号、同第97/12902号、同第96/25861号、同第96/12735号、同第96/11209号、同第98/39326号、同第98/39316号、同第98/38859号、同第98/39315号、同第98/42659号、同第98/39329号、同第98/43959号、同第98/45268号、同第98/47863号、同第96/33172号、同第96/20926号、同第97/37974号、同第97/37973号、同第96/35711号、同第98/51665号、同第98/43946号、同第95/04045号、同第98/56377号、同第97/12244号、同第99/00364号、同第99/00363号、同第98/57936号、同第99/01449号、同第99/01139号、同第98/56788号、同第98/56756号、同第98/53842号、同第98/52948号、同第98/52937号、同第99/02510号、同第97/43250号、同第99/06410号、同第99/06042号、同第99/09022号、同第99/08688号、同第99/07679号、同第99/09965号、同第99/07704号、同第99/06041号、同第99/37818号、同第99/37625号、同第97/11668号；

日本国(JP)特許出願番号第10147531号、同第10231285号、同第10259140号、および同第10130149号、同第10316570号、同第11001481号、ならびに同第127,800号/1991年；ドイツ(DE)特許出願番号第19731521号；英国(GB)特許出願番号第2218101号、同第2326881号、同第2246569号。

10

20

【0252】

本発明の目的のために、これらの参考文献に開示されている分子、および参考文献（下記を参照のこと）に開示されている分子は、まとめて「TNF α インヒビター」と呼ばれる。

【0253】

例えば、EP393,438およびEP422,339は、可溶性のTNFレセプターI型(sTNFR-Iまたは30kDaのTNFインヒビターとしてもまた公知である)および可溶性のTNFレセプターII型(sTNFR-IIまたは40kDaのTNFインヒビターとしてもまた公知である)（これらはまとめて、「sTNFR」と呼ばれる)の

アミノ酸および核酸配列、ならびにそれらの改変型（例えば、フラグメント、機能的な誘導体、および変異体）を教示する。EP393,438およびEP422,339はまた、インヒビターをコードする応答性の遺伝子の単離、適切なベクターおよび細胞型中への遺伝子のクローニング、およびインヒビターを産生させるための遺伝子の発現のための方法を開示する。

30

【0254】

sTNFR-IおよびsTNFR-IIは、神経成長因子レセプター(NGF)、B細胞抗原CD40、4-1BB、ラットのT細胞抗原MRC OX40、fas抗原、ならびにCD27およびCD30抗原を含むレセプターの、神経成長因子/TNFレセプタースーパーファミリーのメンバーである(Smithら、Science, 248:1019-1023(1990))。細胞表面レセプターのこのグループの間で最も保存されている特徴は、システインリッチ細胞外リガンド結合ドメインである。これは、約4個のアミノ酸の4回の繰り返しモチーフに分けられ得、そしてこれは、良好に保存されている位置で4~6個のシステイン残基を含み得る(Smithら、(1990)、前出)。

40

【0255】

本発明によって企図されるように、MK61ポリペプチドは、他の治療と共に、そしてまた処置される適応症に適切な他の薬学的処方物と共に投与され得る。MK61ポリペプチドおよび1以上のさらなる治療または薬学的処方物のいずれかは、別々に、連続して、または同時に投与され得る。

50

【0256】

特定の実施形態では、本発明は、TNF応答性疾患の処置のための1以上のインターロイキン-1 (IL-1) インヒビターのうちのいずれかと組合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。インターロイキン-1 インヒビターのクラスとしては、以下が挙げられる：以下に記載されるような、インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1 に対する細胞レセプターの活性化を特異的に妨げ得る任意の化合物) (例えば、IL-1ra)；抗IL-1レセプターモノクローナル抗体 (例えば、EP 623, 674)；IL-1結合タンパク質 (例えば、可溶性IL-1レセプター (例えば、米国特許第5, 492, 888号、同第5, 488, 032号、同第5, 464, 937号、同第5, 319, 071号および同第5, 180, 812号) 10；抗IL-1モノクローナル抗体 (例えば、WO 95/01997、WO 94/02627、WO 90/06371、米国特許第4, 935, 343号、EP 364, 778、EP 267, 611およびEP 220, 063)；IL-1レセプター補助タンパク質 (例えば、WO 96/23067) ならびにIL-1のインビボでの合成または細胞外放出をブロックする、他の化合物およびタンパク質。

【0257】

インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト (IL-1ra) は、インターロイキン-1の天然のインヒビターとして作用するヒトタンパク質である。インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、ならびにそれらの作製方法および使用法は、米国特許第5, 075, 222号；WO 91/08285；WO 91/17184；AU 917 203636；WO 92/16221；WO 93/21946；WO 94/06457；WO 94/21275；FR 2706772；WO 94/21235；DE 4219626；WO 94/20517；WO 96/22793およびWO 97/28828 (これらの開示は、本明細書中で参考として援用される) に記載される。このタンパク質は、グリコシル化および非グリコシル化IL-1レセプターアンタゴニストを包含する。

【0258】

詳細には、3つの好ましい形態のIL-1ra (IL-1ra α 、IL-1ra β およびIL-1rax) (各々は、同じDNAコード配列およびその改変体によりコードされる) が、米国特許第5, 075, 222号に開示および記載される。IL-1インヒビター (特に、IL-1ras) を産生するための方法もまた、5, 075, 222号特許に開示される。 30

【0259】

さらなるクラスのインターロイキン-1インヒビターは、IL-1に対する細胞性レセプターの活性化を特異的に妨げ得る化合物を包含する。このような化合物としては、IL-1結合タンパク質 (例えば、可溶性レセプターおよびモノクローナル抗体) が挙げられる。このような化合物はまた、このレセプターに対するモノクローナル抗体を包含する。

【0260】

さらなるクラスのインターロイキン-1インヒビターとしては、IL-1のインビボでの合成および/または細胞外放出をブロックする化合物およびタンパク質が挙げられる。このような化合物としては、IL-1遺伝子の転写またはIL-1プレタンパク質のプロセシングに影響を与える因子が挙げられる。 40

【0261】

特定の実施形態において、本発明は、分泌または可溶性のヒトfas抗原またはその組換えバージョン (WO 96/20206およびMountzら、J. Immunology、155: 4829-4837；およびEP 510, 691 (これらの開示は本明細書中で参考として援用される)) と組合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。WO 96/20206は、分泌ヒトfas抗原 (ネイティブおよび組換え体 (Ig融合タンパク質を含む))、可溶性組換えヒトfas抗原のコードの原因である遺伝子を単離するための方法、適切なベクターおよび細胞型にこの遺伝子 50

をクローン化するための方法、およびこの遺伝子を発現させてインヒビターを産生するための方法を開示する。EP 510, 691は、ヒト f a s 抗原（可溶性 f a s 抗原を含む）をコードするDNA、このDNAを発現するためのベクター、およびこのベクターでトランスフェクトされた形質転換体を教示する。非経口的に投与される場合、分泌または可溶性の f a s 抗原融合タンパク質の用量は、それぞれ一般的に、約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ 約 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ である。

【0262】

TNF 応答性疾患（リウマチ性疾患のような急性および慢性の炎症を含む）の現在の処置は、通常、疼痛および炎症の制御のための第一線の薬物の使用を含み；これらの薬物は、非ステロイド抗炎症薬（NSAID）として分類される。二次的な処置は、コルチコステロイド、遅効性抗リウマチ薬（SAARD）または疾患改善（DM）薬を含む。以下の化合物に関する情報は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy、第16版、Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, N, J、（1992）およびPharmaprojects、PJB Publications Ltd.に見出され得る。

10

【0263】

特定の実施形態において、本発明は、リウマチ性疾患のような急性および慢性の炎症；ならびに対宿主性移植片病を含むTNF 応答性疾患の処置のためのMK 61 ポリペプチドおよび1以上のNSAIDのうちのいずれかの使用に関する。NSAIDは、少なくとも部分的に、その抗炎症性作用がプロスタグランジン合成の阻害であることが認められている（GoodmanおよびGilman、「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、MacMillan第7版（1985））。NSAIDは、以下の少なくとも9つのグループに特徴付けられ得る：（1）サリチル酸誘導体、（2）プロピオン酸誘導体、（3）酢酸誘導体、（4）フェナム酸誘導体、（5）カルボン酸誘導体、（6）酪酸誘導体、（7）オキシカム（oxicam）、（8）ピラゾール、および（9）ピラゾロン。

20

【0264】

さらに特定の実施形態において、本発明は、1つ以上のサリチル酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組合わせたMK 61 ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。このようなサリチル酸誘導体、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩としては、以下が挙げられる：アセトアミノザロール、アロキシブリン、アスピリン、ベノリラート、プロモサリゲニン、アセチルサリチル酸カルシウム、トリサリチル酸マグネシウムコリン、サリチル酸マグネシウム、サリチル酸コリン、ジフルシナル（diflusal）、エテルサレート、フェンドサール、ゲンチジン酸、サリチル酸グリコール、サリチル酸イミダゾール、アセチルサリチル酸リジン、メサラミン、サリチル酸モルホリン、1-ナフチルサリチレート、オルサラジン、バルサルミド、アセチルサリチル酸フェニル、サリチル酸フェニル、サラセタミド、サリチルアミドO-酢酸、サルサラート、サリチル酸ナトリウムおよびスルファサラジン。同様の鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したサリチル酸誘導体もまた、このグループに含まれることが意図される。

30

40

【0265】

さらなる具体的な実施形態において、本発明は、1つ以上のプロピオン酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK 61 ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。プロピオン酸誘導体、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩としては、以下が挙げられる：アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロクス酸、カルプロフェン、デキシンドプロフェン（dexindoprofen）、フェノプロフェン、フルノキサプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、フルクロプロフェン、イブプロフェン、イブプロフェンアルミニウム、イブプロキサム、インドプロフェン、イソプロフェン、ケトプロフェン

50

、ロキソプロフェン (loxoprofen)、ミロプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、オキサプロジン、ピケトプロフェン、ピメプロフェン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、プロチジン酸、ピリドキシプロフェン (pyridoxipropfen)、スプロフェン、チアプロフェン酸およびチオキサプロフェン。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したプロピオン酸誘導体もまた、このグループに含まれることが意図される。

【0266】

さらに具体的な実施形態において、本発明は、1つ以上の酢酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。酢酸誘導体、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩としては、以下が挙げられる：アセメタシン、アルクロフェナク、アムフェナク、ブフェキサマック、シンメタシン、クロピラク、デルメタシン (delmetacin)、ジクロフェナクカリウム、ジクロフェナクナトリウム、エトドラク、フェルピナク、フェンクロフェナク、フェンクロラク、フェンクロジン酸、フェンチアザク、フロフェナク、グルカメタシン、イブフェナック、インドメタシン、イソフェゾラク、イソキセバック、ロナゾラク、メチアジン酸、オキサメタシン、オキシピナク (oxpinac)、ピメタシン、プログルメタシン、スリンダク、タルメタシン、チアラミド、チオピナク、トルメチン、トルメチンナトリウム、ジドメタシンおよびゾメピラク。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連した酢酸誘導体もまた、このグループに含まれることが意図される。

10

20

【0267】

さらに具体的な特定の実施形態において、本発明は、1つ以上のフェナム酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。フェナム酸誘導体、そのプロドラッグエステル、およびその薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：エンフェナム酸、エトフェナマート、フルフェナム酸、イソニキシン、メクロフェナム酸、メクロフェナム酸ナトリウム、メドフェナム酸 (medofenamamic acid)、メフェナム酸、ニフルム酸、タルニフルマート、テロフェナマート、トルフェナム酸およびウフェナマート。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したフェナム酸誘導体もまた、このグループに含まれることが意図される。

30

【0268】

さらに別のより具体的な実施形態において、本発明は、1つ以上のカルボン酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。使用され得るカルボン酸誘導体、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩としては以下が挙げられる：クリダナク、ジフルニサル、フルフェニサル、イノリジン (inoridine)、ケトロラクおよびチノリジン。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したカルボン酸誘導体もまた、このグループに含まれることが意図される。

【0269】

より具体的な実施形態において、本発明は、1つ以上の酪酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。酪酸誘導体、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：ブマジソン、ブチブフェン、フェンブフェンおよびキセンブシン。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連した酪酸誘導体もまた、このグループに含まれることが意図される。

40

【0270】

より具体的な実施形態において、本発明は、1つ以上のオキシカム、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。オキシカム、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：ドロキシカム、エノリカム、イソキシカム

50

、ピロキシカム、スドキシカム、テノキシカムおよび4-ヒドロキシ-1, 2-ベンゾチアジン1, 1-ジオキシド4-(N-フェニル)-カルボキサミド。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したオキシカムもまた、このグループに含まれることが意図される。

【0271】

より具体的な特定の実施形態において、本発明は、1つ以上のピラゾール、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。使用され得るピラゾール、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩は以下を含む：ジフェナミゾールおよびエピリゾール。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したピラゾールもまた、このグループに含まれることが意図される。

10

【0272】

より具体的な特定の実施形態において、本発明は、1つ以上のピラズロン（pyrazolone）、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。使用され得るピラズロン、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：アパゾン、アザプロパゾン、ベンズピペリロン、フェブラゾン、モフェブタゾン、モラゾン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピペブゾン、プロピルフェナゾン、ラミフェナゾン、スキシブゾンおよびチアゾリノブタゾン。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したピラズロンもまた、このグループに含まれることが意図される。

20

【0273】

より具体的な実施形態において、本発明は、以下の1つ以上のNSAIDのいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する：ε-アセトアミドカプロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン、アニトラザフェン、アントラフェニン、ベンダザック、ベンダザックリジネート（bendazac lysinate）、ベンジダミン、ペプロジン（euprozin）、プロペラモール、ブコローム、ブフェゾラク、シプロカゾン、クロキシメート、ダジダミン、デボキサメト、デトミジン、ジフェンピラミド（difenpiramide）、ジフェンピラミド（difenpyramide）、ジフィサラミン（difisalamine）、ジタゾール、エモルファゾン、ファネチゾールメシレート、フェンフルミゾール、フロクタフェニン、フルミゾール、フルニキシン、フルプロカゾン、フォピルトリン（fopirtoline）、フォスフォサル、グアイメサル、グアイアゾレン（guaiazolene）、イソニキシン（isonixiryn）、レフェタミンHCl、レフルノミド、ロフェミゾール、ロチファゾール、リジンクロニキシネート（lysinc lonixinate）、メセクラゾン、ナブメトン、ニクチンドール、ニメスリド、オルゴテイン、オルパノキシン、オキサセプロール、オキサパドール、パラニリン（paranyline）、ペリソキサール、クエン酸ペリソキサール、ピフォキシム、ピプロキセン（piproxen）、ピラゾラク、ピルフェニドン、プロカゾン、プロキサゾール、チエラビンB（thielavin B）、チフラミゾール、チメガジン、トレクチン、トルパドール、トリプトアミド（tryptamid）ならびに480156S、AA861、AD1590、AFP802、AFP860、AI77B、AP504、AU8001、BPPC、BW540C、CHINOIN 127、CN100、EB382、EL508、F1044、FK-506、GV3658、ITF182、KCNT EI6090、KME4、LA2851、MR714、MR897、MY309、ONO3144、PR823、PV102、PV108、R830、RS2131、SCR152、SH440、SIR133、SPAS510、SQ27239、ST281、SY6001、TA60、TAI-901（4-ベンゾイル-1-インダンカルボン酸）、TVX2706、U60257、UR2301およびWY41770のような会社コード番号によって命名されるようなNSAID。NSAIDに類似した鎮痛特性

30

40

50

および抗炎症特性を有する構造的に関連したNSAIDもまた、このグループに含まれることが意図される。

【0274】

より具体的な実施形態において、本発明は、リウマチ性疾患、対宿主性移植片病、および多発性硬化症のような急性および慢性の炎症を含む、TNF応答性疾患の処置のための、1つ以上のコルチコステロイド、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。コルチコステロイド、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩は、ヒドロコルチゾンおよびヒドロコルチゾンに由来する化合物を含む：例えば、21-アセトキシプレグネノロン、アルクロメラゾン、アルゲストン、アムシノニド、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ベタメタゾンバレレート、ブデソニド、クロロプレドニゾン、クロベタゾール、クロベタゾールプロピオネート、クロベタゾン、クロベタゾンブチレート、クロコルトロン、クロプレドノール、コルチコステロン、コルチゾン、コルチバゾール、デフラザコン、デソニド、デスオキシメラゾン、デキサメタゾン、ジフロラゾン、ジフルコルトロン、ジフルプレドネート、エノキサロン、フルアザコート、フルクロロニド、フルメタゾン、フルメタゾンピバレート、フルシノロンアセトニド、フルニソリド、フルオシノニド、フルオロシノロン（fluorocinolone）アセトニド、フルオコルチンブチル、フルオコルトロン、フルオコルトロンヘキサノエート、吉草酸ジフルコルトロン、フルオロメトロン、フルペロロンアセテート、フルプレドニデンアセテート、フルプレドニゾロン、フルランデノリド（flurandrenolide）、フォルモコルタル、ハルシノニド、ハロメタゾン、ハロプレドンアセテート、ヒドロコルタメート、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾン、コハク酸ヒドロコルチゾン21-ナトリウム、ヒドロコルチゾンテブテート、マジプレドン、メドリゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニソロン、モメタゾンフロエート、パラメタゾン、プレドニカルベート、プレドニゾロン、プレドニゾロン21-ジエドリアミノアセテート、プレドニゾロンナトリウムホスフェート、プレドニゾロンナトリウムスクシネート、プレドニゾロンナトリウム21-m-スルホベンゾネート、プレドニゾロンナトリウム21-ステアログリコレート、プレドニゾロンテブテート、プレドニゾロン21-トリメチルアセテート、プレドニゾン、プレドニバル（prednisval）、プレドニリデン、プレドニリデン21-ジエチルアミノアセテート、チキソコルトール、

10

20

30

【0275】

より具体的な実施形態において、本発明は、リウマチ性疾患、対宿主性移植片病、および多発性硬化症のような急性および慢性の炎症を含む、TNF応答性疾患の処置のための、1つ以上の遅効性抗リウマチ薬（SAARD）または疾患改善抗リウマチ薬（DMARD）、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。SAARDまたはDMARD、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：

40

：アロクプレイドナトリウム、オーラノフィン、金チオグルコース、金チオグリカニド、アザチオプリン、ブレキナルナトリウム、ブシラミン、カルシウム3-金チオ-2-プロパノール-1-スルホネート、クロラムブシル、クロロキン、クロブザリト、クプロキソリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、ダブソン、15-デオキシスペルグアリン（15-deoxyspergualin）、ジアセレイン、グルコサミン、金塩（例えば、シクロキン金塩、金ナトリウムチオマレート、金ナトリウムチオスルフェート）、ヒドロキシクロロキン、硫酸ヒドロキシクロロキン、ヒドロキシ尿素、ケブゾン、レバミゾール、ロベンザリット、メリチン、6-メルカプトプリン、メトトレキセート、ミゾリビン、ミコフェノレートモフェチル（mofetil）、ミオラル（myoral）、ナイトロジェンマスタード、D-ペニシラミン、ピリジノール、イミダゾール（例えば、SK

50

NF86002およびSB203580)、ラパマイシン、チオール、サイモポエチンおよびピンクリスチン。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したSAAARDまたはDMARDもまた、この群に含まれることが意図される。

【0276】

より具体的な特定の実施形態において、本発明は、急性および慢性の炎症を含む、TNF応答性疾患の処置のための、1つ以上のCOX2インヒビター、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。COX2インヒビター、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩の例としては、例えば、セレコキシブ（celecoxib）が挙げられる。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したCOX2インヒビターもまた、この群に含まれることが意図される。

10

【0277】

より具体的な特定の実施形態において、本発明は、急性および慢性の炎症を含む、TNF応答性疾患の処置のための、1つ以上の抗菌剤、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせたMK61ポリペプチドの使用（前処置、後処置または同時処置）に関する。抗菌剤としては、例えば、ペニシリン、セファロスポリンおよび他のβ-ラクタム、アミノ配糖体、アゾール、キノロン、マクロライド、リファマイシン、テトラサイクリン、スルホンアミド、リンコサミド（lincosamide）およびポリミキシンの広範なクラスが挙げられる。ペニシリンは、以下を含むがこれらに限定されない：ペニシリンG、ペニシリンV、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フロキサシリン、アンピシリン、アンピシリン／スルバクタム、アモキシリン、アモキシリン／クラブラン酸、ヘタシリン、シクラシリン（cyclacillin）、バカンピシリン、カルベニシリン、カルベニシリンインダニル（carbenicillin indanyl）、チカルシリン、チカルシリン／クラブラン酸、アズロシリン、メズロシリン、ピペラシリン（peperacillin）、およびメシリナム。セファロスポリンおよび他のβ-ラクタムは、以下を含むがこれらに限定されない：セファロチン、セファピリン、セファレキシン、セフラジン、セファゾリン、セファドロキシル、セファクロール、セファマンドール、セフォテタン、セフォキシチン、セルロキシム（ceruroxime）、セフォニシド、セフォラジン（cefhradine）、セフィキシム、セフォタキシム、モキサラクタム、セフチゾキシム、セトリアキソン（ceftriaxone）、セフォペラゾン（cephoperazone）、セフタジジム、イミペネムおよびアズトレオナム。アミノ配糖体は、以下を含むがこれらに限定されない：ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、ネチルマイシン、カナマイシンおよびネオマイシン。アゾールは、フルコナゾールを含むがこれに限定されない。キノロンは、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、エノキサシン、シプロフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシンおよびテマフロキサシンを含むがこれらに限定されない。マクロライドは、エリスロマイシン（erythromycin）、スピラマイシンおよびアジスロマイシンを含むがこれらに限定されない。リファマイシンは、リファンピンを含むがこれに限定されない。テトラサイクリンは、スピサイクリン（spicycline）、クロルテトラサイクリン、クロモサイクリン、デメクロサイクリン、デオキシサイクリン（deoxycycline）、グアメサイクリン（guamecycline）、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、ペニメピサイクリン、ピパサイクリン、ロリテトラサイクリン、サンサイクリン、セノサイクリン（senocyclin）およびテトラサイクリンを含むがこれらに限定されない。スルホンアミドは、スルファニルアミド、スルファメトキサゾール、スルファセタミド、スルファジアジン、スルフィソキサゾールおよびコトリモキサゾール（トリメトプリム／スルファメトキサゾール）を含むがこれらに限定されない。リンコサミドは、クリンダマイシンおよびリンコマイシンを含むがこれらに限定されない。ポリミキシン（ポリペプチド）は、ポリミキシンBおよびコリスチンを含むがこれらに限定されない。

20

30

40

50

【0278】

(MK61組成物および投与)

本発明の範囲内にある治療用組成物としては、ヒトまたは非ヒト動物（哺乳動物など）に投与する様式との適合性について選択された、薬学的または生理学的に受容可能な処方剤と混合した、MK61ポリペプチドまたはMK61ヌクレオチド分子の治療有効量を含み得る、MK61薬学的組成物を含む。薬学的組成物は、投与の様式との適合性について選択された、薬学的または生理学的に受容可能な処方剤と混合した、1以上のMK61の選択的結合因子の治療有効量を含み得る。

【0279】

受容可能な処方物質は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で受容者（レシピエント）に対して好ましくは非毒性である。 10

【0280】

薬学的組成物は、例えば、pH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、匂、滅菌性、安定性、溶解または放出の速度、この組成物の吸収および透過を、改変、維持、または保存するための処方物質を含み得る。適切な処方物質としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）；抗菌剤；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム）；緩衝液（例えば、ホウ素酸塩、炭酸水素塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸または他の有機酸）；充填剤（マンニトールまたはグリシン）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、β-シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリン）；フィラー；モノサッカリド（単糖類）；ジサッカリド（二糖類）；および他の糖質（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）；タンパク質（例えば、血清アルブミン；ゼラチンまたは免疫グロブリン）；着色剤；芳香剤および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピナルパラベン、クロロヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）；溶液（例えば、グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニックス（pluronic）、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80、トリトン、トロメタミン（tromethamine）、レシチン、コレステロール、チロキサパル（tyloxapal）））；安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）；張性増強剤（例えば、アルカリ金属ハライド、好ましくは、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトール）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤および／または薬学的アジュバント（Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、A. R. Gennaro編、Mack Publishing Company（1990））。 20 30

【0281】

最適な薬学的組成物は、例えば、意図した投与経路、送達様式および所望の投薬量に依存して当業者によって決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences（前出）を参照のこと。このような組成物は、MK61分子の、物理学的状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響を与え得る。 40

【0282】

薬学的組成物における主なビヒクルまたはキャリアは、天然において水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、適切なビヒクルまたはキャリアは、注入のための水、薬学的生理的食塩水または人工脳脊髄液であり得、これらは、非経口投与のための組成物において共通する他の物質を補充し得る。中性緩衝化生理的食塩水または血清アルブミンを混合した生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、 50

pHが約7.0～約8.5のTris緩衝液、またはpH約4.0～約5.5の酢酸緩衝液を含み、この薬学的組成物は、ソルビトールまたはその適切な代用物であり得る。本発明の1つの実施形態において、MK61ポリペプチド組成物は、凍結乾燥したケーキまたは水溶液の形態で適切な処方剤（Remington's Pharmaceutical Sciences、前出）と、共に所望の純度を有する選択された組成物とを混合することによって、保存のために調製され得る。さらに、このMK61ポリペプチド生成物を、スクロースのような適切な賦形剤を使用して、凍結乾燥物として処方され得る。

【0283】

MK61薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、この組成物は、吸入のため、または消化管を介した送達（例えば、経口）のため、または当該分野で公知の送達経路を介して、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の投与は、当該分野の範囲である。 10

【0284】

この処方成分は、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液を使用して、生理学的pHまたは僅かに低いpH（代表的には、約5～約8の範囲内のpH）で組成物を維持する。

【0285】

非経口投与が企図される場合、本発明の用途のための治療組成物は、発熱物質を含有しない、非経口的に受容可能な水性溶液の形態であって、この水性溶液は、所望のMK61分子を薬学的に受容可能なビヒクル中に含有する。非経口注入のための特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、この滅菌蒸留水中に、MK61分子が、無菌、等張溶液として処方され、そして適切に保存される。さらに別の調製物は、薬剤（例えば、注射可能なミクロスフェア、生体分解性粒子、ポリマー化合物（例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸、ビーズまたはリポソーム）を有する所望の分子の処方物に関し、この調製物は、蓄積注射を介して送達され得る生成物の制御された放出または徐放を提供する。ヒアルロン酸もまた使用され得、そしてこれは、循環における徐放持続時間を増進させる効果を有する。所望の分子を導入するための他の適切な手段として、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。 20

【0286】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、MK61分子は、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。MK61ポリペプチドまたはMK61核酸分子の吸入溶液はまた、エアゾール送達のためのプロペラントを用いて処方され得る。さらに別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与は、PCT出願番号PCT/US94/001875にさらに記載され、これは、化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。 30

【0287】

特定の処方物は、経口投与され得ることもまた企図される。本発明の1つに実施形態において、この様式で投与されるMK61ポリペプチドは、錠剤およびカプセルのような固体投薬形態の処方において慣例的に使用されるそれらのキャリアとともにまたはそれを含まずに処方され得る。例えば、カプセルは、胃腸管において、バイオアベイラビリティが最大化され、そして全身前分解が最小化される時点で処方物の活性部分が放出されるように設計され得る。さらなる薬剤が、MK61分子の吸収を容易にするように含まれ得る。希釈剤、香料、低融点ろう、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた使用され得る。 40

【0288】

別の薬学的組成物は、MK61分子の有効量を、錠剤の製造のために適切な非毒性賦形剤と混合して含み得る。滅菌水または別の適切なビヒクル中にその錠剤を溶解することによって、溶液が単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：不活性希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、ラクトース、またはリン酸カルシウム；あるいは結合剤（例えば、デンプ 50

ン、ゼラチン、またはアラビアゴム）；あるいは滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

【0289】

さらなるMK61薬学的組成物は、当業者に明らかであり、これには、徐放処方物または制御された送達処方物中のMK61ポリペプチドを含む処方物が包含される。種々の他の徐放手段または制御された送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体分解性微粒子または多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術もまた、当業者に公知である。例えば、以下を参照のこと：PCT/US93/00829。これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー微粒子の制御された放出を記載する。徐放調製物のさらなる例としては、成型された物品の形態（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリクスを包含する。徐放マトリクスとしては以下が挙げられ得る：ポリエステル、ヒドロゲル、ポリ乳酸（米国特許第3,773,919号、EP 58,481）、L-グルタミン酸およびγエチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidmanら, Biopolymers, 22:547-556 (1983)）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langerら, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) および Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982)）、エチレンビニルアセテート（Langerら, 前出）またはポリ-D-(−)-3-ヒドロキシ酪酸（EP 133,988）。徐放組成物はまた、リポソームを含み得る。このリポソームは、当該分野において公知のいくつかの方法のいずれかにより調製され得る。例えば、以下を参照のこと：Eppsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985)；EP 036,676；EP 088,046；EP 143,949。

10

20

【0290】

インビボ投与のために使用されるMK61の薬学的組成物は、代表的には、無菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。この組成物が、凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構築の前または後のいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する、静脈内溶液バッグまたはバイアル）内に配置される。

30

【0291】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水和粉末もしくは凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、即時使用型（ready-to-use）の形態または投与の前に再構成を必要とする形態（例えば、凍結乾燥された形態）のいずれかで保存され得る。

【0292】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（lyosyringe））を含むキットが包含される。

40

【0293】

治療的に使用されるMK61の薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。従って、当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、従って、送達される分子、MK61分子が使用されている指標、投与の経路、および患者のサイズ（体重、体表面積、または器官の大きさ）および状態（年齢および一般的な健康）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床家は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し（titer）、投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約0.1 μg/kg～約100 mg/kg以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、0.1 μg/kg～約100 mg/kgまで；または1 μg

50

／k g ～約 1 0 0 m g ／k g まで；または 5 μ g ／k g ～約 1 0 0 m g ／k g までの範囲であり得る。

【0294】

投薬の頻度は、使用される処方物中でのMK61分子の薬物動態学のパラメーターに依存する。典型的に、臨床家は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。従って、組成物は、単一用量として、もしくは経時的に2以上の用量（これは、同量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、または移植デバイスもしくはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そしてそれらによって慣用的に実施される課題の範囲内である。適切な投薬量は、慣用的に得られる適切な用量－応答データの使用を介して確認され得る。

10

【0295】

薬学的組成物の投与の経路は、以下のような公知の方法と一致する：例えば、経口的投与、静脈内、腹腔内、脳内（実質内の）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注入を介する投与；または徐放性の系もしくは移植デバイスによる投与。所望される場合、これらの組成物は、ボーラス注射によって投与され得るか、もしくは注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

【0296】

あるいはまたはさらに、組成物は、膜、スポンジ、または他の適切な材料（その上に所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化される）の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ボーラスまたは連続的な投与を介し得る。

20

【0297】

いくつかの場合において、エキソピボ様式において、MK61薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から除去された細胞、組織、または器官は、これらの細胞、組織、および／または器官が引き続いて患者に移植し戻された後にMK61薬学的組成物に曝露される。

【0298】

他の場合において、MK61ポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して、このポリペプチドを発現および分泌するように遺伝的に操作された特定の細胞を移植することによって、送達され得る。このような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。必要に応じて、細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系による、または周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する。

30

【0299】

本発明のさらなる実施形態は、遺伝子治療または細胞治療による、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび／または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写に対してサイレントなMK61遺伝子、または過少発現される遺伝子を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のMK61ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

40

【0300】

相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である（K u c h e r l a p a t i , P r o g . i n N u c l . A c i d R e s . & M o l . B i o l . 3 6 : 3 0 1 , 1 9 8 9）。基本的な技術は、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するための方法（T h o m a s ら , C e l l 4 4 : 4 1 9 - 4 2 8 (1 9 8 6) ; T h o m a s および

50

Capecechi Cell 51:503-512 (1987); Doetschmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8583-8587 (1988))、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するための方法 (Doetschmanら、Nature 330:576-578 (1987)) の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5, 272, 071号 (欧州特許第9193051号、同第505500号; PCT/US90/07642、国際公開番号WO 91/09955) に記載されている。

【0301】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的DNAに付着させることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的 (相同) であるヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に対して相補的な標的DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、細胞に挿入されてハイブリダイズしたDNAの一般的な特性であり、そして従って、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組み換えられる。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに付着される場合には、これはまた、この組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれる。ブルーフリーディング機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして働くことが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。

10

【0302】

MK61ポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るDNAの領域 (例えば、隣接配列) が、標的DNAのこれらの断片に付着する。例えば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サプレッサ、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムに、所望のMK61ポリペプチドをコードするDNAの近位かつこのDNAの転写に影響を与えるに十分な配向で、挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在するDNAの一部を制御する。従って、所望のMK61ポリペプチドの発現は、MK61遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、むしろ、MK61ポリペプチドの転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合した標的DNA (目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む) の使用によって、達成され得る。

20

【0303】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子 (すなわち、所望の内因性細胞遺伝子) の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位を含むDNAの導入によって、変更される。これらの構成成分は、新たな転写ユニットの産生を実際に生じるような様式で、染色体 (ゲノム) DNAに導入される (ここで、DNA構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結する)。染色体DNAへのこれらの構成成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化する。

30

【0304】

本明細書中で記載されるように、変化された遺伝子発現は、通常は、得られた細胞においてサイレントな (発現されていない) 遺伝子の活性化する (または発現させる) こと、ならびに得られた細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加することを包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンが、得られたままの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そして得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を減少 (排除を含む) させるような、調節または誘導のパターンを変化させる工程を包含する。

40

【0305】

細胞の内在性MK61遺伝子からのMK61ポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同定組換えが使用され得る方法の1つは、最初に、相同性組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列 (例えば、Cre/loxP、FLP/

50

F R T) (S a u e r, C u r r e n t O p i n i o n I n B i o t e c h n o l o g y, 5 : 5 2 1 - 5 2 7, (1 9 9 4) ; S a u e r, M e t h o d s I n E n z y m o l o g y, 2 2 5 : 8 9 0 - 9 0 0, (1 9 9 3)) を、細胞の内在性ゲノム M K 6 1 ポリペプチドコード領域の上流 (すなわち、5') に配置する工程を包含する。ゲノム M K 6 1 ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼ酵素によって、プラスミドは、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノム M K 6 1 ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込み得る (B a u b o n i s および S a u e r, N u c l e i c A c i d s R e s. 2 1 : 2 0 2 5 - 2 0 2 9, 1 9 9 3 ; O ' G o r m a n ら, S c i e n c e 2 5 1 : 1 3 5 1 - 1 3 5 5 (1 9 9 1)) 。転写を増大させることが知られている任意の隣接配列 (例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、または翻訳エンハンサー) は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内在性 M K 6 1 遺伝子からの新たなまたは増加した M K 6 1 ポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で組み込まれる。

【0306】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノム M K 6 1 ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株のゲノムの他のいずれかの位置に第2の組換え部位を導入するために相同性組換えを使用することである。次いで、適切なリコンビナーゼ酵素が、二組換え部位細胞株に導入され、組換え現象 (欠失、転化、および転移) を生じ (S a u e r, C u r r e n t O p i n i o n I n B i o t e c h n o l o g y, 前出、(1 9 9 4) ; S a u e r, M e t h o d s I n E n z y m o l o g y (前出) (1 9 9 3)) 、これは、細胞の内在性 M K 6 1 遺伝子からの新規なまたは増加した M K 6 1 ポリペプチド産生を生じる、新しいかまたは改変された転写単位を作製する。

【0307】

細胞の内在性 M K 6 1 遺伝子からの M K 6 1 ポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性 M K 6 1 遺伝子からの新たなまたは増加した M K 6 1 ポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子 (例えば、転写因子) の発現を増加するかまたは引き起こし、そして/または遺伝子 (例えば、転写リプレッサ) の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド (例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的 D N A 結合ドメインを含むポリペプチド) を、細胞の内在性 M K 6 1 遺伝子からの新たなまたは増加した M K 6 1 ポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

【0308】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用な D N A 構築物に関する。特定の実施形態において、例示的な D N A 構築物は、以下を含む: (a) 1 つ以上の標的配列、(b) 制御配列、(c) エキソン、および (d) 不対スプライスドナー部位。D N A 構築物中の標的配列は、エレメント (a) ~ (d) の細胞中の標的遺伝子への組み込みを指向し、その結果、これらのエレメント (b) ~ (d) は、内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、D N A 構築物は、以下を含む: (a) 1 つ以上の標的配列、(b) 制御配列、(c) エキソン、(d) スプライスドナー部位、(e) イントロン、および (f) スプライスアクセプター部位。ここで、標的配列は、エレメント (a) ~ (f) の組み込みを指向し、その結果、これらのエレメント (b) ~ (f) は、内在性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同性組換えが生じる細胞染色体 D N A の予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エキソンは、一般的に、制御配列の 3' 側であり、そしてスプライスドナー部位は、このエキソンの 3' 側である。

【0309】

特定の遺伝子の配列 (例えば、本明細書中で記載される M K 6 1 ポリペプチドの核酸配列

）が公知である場合、遺伝子の選択された領域に対して相補的なDNAの部分は、合成されるか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブのDNAの適切な制限等によって得られ得る。この部分は、細胞に挿入された際に、標的配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。これまで、このハイブリダイゼーションが、DNA複製の間に生じる場合、このDNAの部分、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、Okazakiフラグメントとして作用し、そしてDNAの新たに合成された娘鎖に組み込まれると考えられている。従って、本発明は、MK61ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的配列として使用され得る。

【0310】

MK61ポリペプチド細胞治療（例えば、MK61ポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態のMK61ポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このようなMK61ポリペプチド産生細胞は、MK61ポリペプチドの天然産物である細胞であり得るか、または組換え細胞であって、MK61ポリペプチドを産生するその能力が、所望のMK61ポリペプチドをコードする遺伝子またはMK61ポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、そしてその発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。MK61ポリペプチドを投与されている患者における強力な免疫学的反応を最小化するために、異種のポリペプチドの投与と共に生じる得る場合、MK61ポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒトMK61ポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、MK61ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトMK61ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【0311】

移植された細胞は、周辺組織の浸透を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、MK61ポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）の形態で患者に移植され得る。あるいは、MK61ポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしで、患者に直接移植され得る。

【0312】

生きた細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびそれらの患者への移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgeら（WO95/05452およびPCT/US94/09299）は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に取り出し可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インビボで下方制御に供されないプロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、レシピエント内の特定の部位への生きた細胞由来の分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同第5,106,627号を参照のこと。生きた細胞をカプセル化するためのシステムは、AebischerらのPCT出願番号PCT/US91/00157に記載される。AebischerらのPCT出願番号PCT/US/91/00155；Winnら、Exper. Neurol. 113:322-329（1991）；Aebischerら、Exper. Neurol. 111:269-275（1991）；およびTrescoら、ASAIO 38:17-23（1992）もまた参照のこと。

【0313】

MK61ポリペプチドのインビボおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的または誘発性プロモーターに作動可能に連結され得るM

10

20

30

40

50

K 6 1 ポリペプチドをコードする M K 6 1 遺伝子（ゲノム D N A、c D N A および／または合成 D N A のいずれか）を使用して、「遺伝子治療 D N A 構築物」を形成することである。このプロモーターは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性であるという条件下では、内在性 M K 6 1 遺伝子に対して同種であっても異種であってもよい。遺伝子治療 D N A 構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計される D N A 分子（例えば、相同性組換えのために有用な内在性配列）、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を越える選択的優性を提供し得る D N A 分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用な D N A 分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化について）、細胞特異的内部移行因子、ベクターによる発現を増大する転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含み得る。

10

【0314】

遺伝子治療 D N A 構築物は、次いで、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して細胞に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）導入され得る。遺伝子治療 D N A 構築物を導入するための 1 つの手段は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターの使用による。特定のベクター（例えば、レトロウイルスベクター）は、D N A 構築物を細胞の染色体 D N A に送達し、そしてこの遺伝子は、染色体 D N A に組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療 D N A 構築物は、細胞質に残る。

【0315】

さらに他の実施形態において、制御エレメントが、標的細胞における M K 6 1 遺伝子の制御された発現のために含まれ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターにตอบสนองして刺激される。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1 つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメイン（例えば、D N A 結合タンパク質または転写活性タンパク質）を含むキメラタンパク質を二量化するために用いられる低分子二量化剤またはラパログ（r a p a l o g）（W O 9 6 4 1 8 6 5（P C T／U S 9 6／0 9 9 4 8 6）；W O 9 7 3 1 8 9 8（P C T／U S 9 7／0 3 1 3 7）および W O 9 7 3 1 8 9 9（P C T／U S 9 5／0 3 1 5 7）に記載のような）の使用を包含する。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

20

30

【0316】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、小胞体における凝集タンパク質の保持を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを特異的に破壊し、その結果、このタンパク質は細胞から分泌され得る。S c i e n c e 2 8 7：8 1 6－8 1 7 および 2 8 7：8 2 6－8 3 0（2 0 0 0）を参照のこと。

【0317】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、以下の系が挙げられるが、これらに限定されない。M i f e p r i s t o n e（R U 4 8 6）は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2 つの転写因子のダイマー（次いで、核に至り、D N A に結合する）を形成することによって、転写を活性化する。このリガンド結合ドメインは、レセプターが天然のリガンドに結合する能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第 5, 3 6 4, 7 9 1 号；W O 9 6 4 0 9 1 1、および W O 9 7 1 0 3 3 7 に記載される。

40

【0318】

さらに別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこれ

50

を活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは核に転移し、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するための、トランス活性化ドメイン／DNA結合ドメイン／リガンド結合ドメインを含む。エクジソン系はさらに、米国特許第5, 514, 578、WO9738117；WO9637609；およびWO9303162に記載されている。

【0319】

別の制御手段は、陽性テトラサイクリン制御可能トランス活性化因子を使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異したtetレプレッサタンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランス活性化因子タンパク質を生じた変異したtetR-4アミノ酸の変化、すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する）を含む。このような系は、米国特許第5, 464, 758号、同第5, 650, 298号、および同第5, 654, 168号に記載されている。

10

【0320】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、米国特許第5, 741, 679号および同第5, 834, 186号（Innovir Laboratories Inc.）に記載されている。

【0321】

インビボの遺伝子治療は、MK61ポリペプチドをコードする遺伝子を、MK61核酸分子の局所的な注射を介して、または他の適切なウイルスもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することによって達成され得る。Hefti、Neurobiology、25:1418-1435（1994）。例えば、MK61ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター中に含まれ得る（例えば、Johnson、国際公開番号WO95/34670；国際出願番号PCT/US95/07178）。組換えAAVゲノムは、代表的には、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結したMK61ポリペプチドをコードするDNA配列に隣接する、AAV逆方向末端反復を含む。

20

【0322】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、単純疱疹ウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、およびパピローマウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5, 672, 344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含むインビボのウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第5, 399, 346号は、治療的タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するためにインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、治療的タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術の実行のためのさらなる方法および材料は、アデノウイルスベクターに関する米国特許第5, 631, 236号；レトロウイルスベクターに関する米国特許第5, 672, 510号；およびサイトカインを発現するレトロウイルスベクターに関する米国特許第5, 635, 399号に記載されている。

30

40

【0323】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸のDNAの送達（直接注射）、レセプター媒介移入（リガンド-DNA複合体）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃）が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサープロモーター、部位特異的組み込みのために設計されたDNA配列、親細胞を超える選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全な測定）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のための）、細胞特異的内在化因子、ならびにベクター製造のための方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実行のためのこのようなさらなる方法および材料は、エレクト

50

トロポレーション技術に関する米国特許第4, 970, 154号；核リガンドに関するWO 96/40958；遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する米国特許第5, 679, 559号；リポソームキャリアに関する米国特許第5, 679, 954号；リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法に関する米国特許第5, 593, 875号；および米国特許第4, 945, 050号（ここで、生物学的に活性な粒子が、ある速度で細胞に噴射され、それによってこの粒子は細胞の表面を貫通し、そして細胞内部に取り込まれる）に記載される。

【0324】

MK 61 遺伝子治療または細胞治療はさらに、同じ細胞または異なる細胞において1以上のさらなるポリペプチドの送達を含み得ることがまた、意図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス（例えば、上記のようなカプセル化膜）中に含まれ得るか、またはこれらの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

10

【0325】

遺伝子治療を介して、細胞における内在性のMK 61 ポリペプチド発現を増大させる手段は、MK 61 ポリペプチドプロモーター中に1以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、MK 61 遺伝子の転写活性を増大するように作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される；この組織においてプロモーターの活性化を与えることが公知のエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、MK 61 ポリペプチドをコードする遺伝子が、T細胞において「オンにされる」場合、1 c kプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、添加されるべき転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、MK 61 ポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメント中に挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターならびに／または5'隣接配列および／もしくは3'隣接配列などの中に挿入される）。次いで、「相同組換え構築物」として公知のこの構築物は、エキソビボまたはインビボのいずれかで所望の細胞に導入され得る。

20

【0326】

遺伝子治療はまた、内在性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによってMK 61 ポリペプチドの発現を減少させるために使用され得る。このような改変は、代表的には、相同組換え方法を介して達成される。例えば、不活化のために選択されたMK 61 遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーターの断片を除去および／または置換するように操作され得る。例えば、T A T Aボックスおよび／またはプロモーターの転写活性化因子の結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得る；このような欠失は、プロモーターの活性を阻害し得、それによって対応するMK 61 遺伝子の転写を抑制する。T A T Aボックスまたはプロモーターの転写活性化因子結合部位の欠失は、MK 61 ポリペプチドプロモーター（調節されるべきMK 61 遺伝子と同種または関連の種由来の）の全てまたは関連部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、T A T Aボックスおよび／または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドの1以上は、1以上のヌクレオチドの置換、欠失および／または挿入を介して変異される。結果として、T A T Aボックスおよび／または活性化因子結合部位は、活性を減少させるかまたは完全に不活化される。この構築物は、代表的には、改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブな（内在性の）5'および3' DNA配列に対応するDNAの少なくとも約500塩基を含む。この構築物は、適切な細胞中に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）、直接または本明細書中に記載のウイルスベクターを介してかのいずれかで導入され得る。代表的には、細胞のゲノムDNAへの構築物の組み込みは、相同組換えを介してであり、ここで、プロモーター構築物の5'および3' DNA配列は、内在性の染色体DNAに対するハイブリダイゼーションを介して、改変されたプロモーター領域を組み込む際の補助として役立ち得る。

30

40

（MK 61 核酸およびポリペプチドのさらなる使用）

50

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、MK61遺伝子および関連する遺伝子の染色体上の位置をマッピングするために使用され得る。マッピングは、当該分野で公知の技術（例えば、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション）によってなされ得る。

【0327】

MK61核酸分子（それ自体が生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、定性的かまたは定量的にのいずれかで、哺乳動物の組織または体液のサンプル中の、MK61 DNAまたは対応するRNAの存在についての診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0328】

従って、本発明は、診断適応における使用のための試薬を提供する。ヒトMK61遺伝子は、染色体バンド19q13に配置されている。さらに詳細には、遺伝子は、19q13.1の内部、またはそれに近い領域に配置されている。いくつかの他の興味深い遺伝子が、第19染色体のこの領域に配置されている。これには、ヒト白血球レセプタークラスター（LRC）（これは、イムノグロブリン（Ig）スーパーファミリーの白血球によって発現されるレセプターをコードする19個の遺伝子を含むことが示されている）、ヒトKir2.4内部調整カリウムチャンネル遺伝子（inwardly rectifying potassium channel gene）（KCNJ14）、ヒトキラー細胞阻害レセプター遺伝子KIR103、リボソームタンパク質S19遺伝子、プロスターゼ（protease）、およびセリン様プロテアーゼ1（Protease Serine-Like 1）が含まれる。MK61は、以下を含む本明細書中に記載されている疾患および障害についての候補である：シスチン尿症、先天性ネフローゼ症候群、家族性ネフローゼ症候群、家族性焦点性体節性糸球体硬化症、家族性ウィルムス腫瘍FWT2、B細胞リンパ腫に関連赤血球貪食症候群、エンゲルマン（Camurati-Engelmann）病、進行性骨幹異常形成症、遺伝性痙攣性対麻痺、喘息、心臓の異常（heart defect）、眼の発達、全身性エリテマトーデス（hSLE1）、原発性小頭症（MCPH2）、常染色体劣性の脊椎骨形成不全症（spondylocostal dysostosis）、胎便性イレウスの嚢胞性繊維症の改変因子の遺伝子座、急性骨髄形成性白血病、赤血球貪食症候群に関係しているB細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、精巣の生殖細胞の腫瘍、悪性神経膠腫、家族性の良性の高カルシウム血症（hypercalcemia）。MK61遺伝子、MK61 DNAまたはRNAを含有しているプローブは、MK61遺伝子が第19染色体上に存在するかどうか、または変異が生じているかどうかを決定するために使用され得る。MK61遺伝子座での検出可能な染色体の異常には、異数性、遺伝子のコピー数の変化、挿入、欠失、制限部位の変化、および再配置が含まれるが、これらに限定されない。これらの異常性は、コード配列内で、イントロン内で、または隣接している配列（上流のプロモーターおよび調節領域を含む）内で生じ得、そしてコード配列内の物理的な変更、または遺伝子の発現レベルでの変化として明示され得る。分析用プローブは、一般的には、少なくとも20ヌクレオチドの長さであるが、いくらか短いプローブ（14～17ヌクレオチド）が使用され得る。PCRプライマーは、少なくとも5ヌクレオチドの長さであり、好ましくは、15またはそれ以上のヌクレオチド、より好ましくは、20～30ヌクレオチドの長さである。短いポリヌクレオチドは、遺伝子の小さい領域が分析のための標的化される場合に使用され得る。遺伝子の全体の分析のためには、ポリヌクレオチドプローブは、エキソン全体またはそれ以上を含み得る。プローブは、一般的には、放射標識ヌクレオチドのようなシグナルを生じる部分に連結されたポリヌクレオチドを含む。一般的には、これらの診断方法は、以下の工程を包含する：（a）患者から遺伝子サンプルを得る工程；（b）ポリヌクレオチドが相補的なポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする条件下で、遺伝子サンプルを上記に開示されているポリヌクレオチドプローブまたはプライマーとともにインキュベートして、第1の反応産物を生じる工程；および（c）コントロールの反応産物に対して第1の反応産物を比較する工程。第1の反応産物とコントロールの反応産物との間での差異が、患者の遺伝子の異

10

20

30

40

50

常性の指標である。本発明での使用のための遺伝子サンプルには、ゲノムDNA、cDNA、およびRNAが含まれる。ポリヌクレオチドプローブまたはプライマーはRNAまたはDNAであり得、そして配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、または配列番号15の一部、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、または配列番号15の相補体、あるいはそれらのRNA等価物を含む。これに関する適切なアッセイ方法には、以下のような当業者に公知の分子遺伝的技術が含まれる：制限酵素断片長多型（RFLP）の分析、PCR分析を使用する短いタンデムな反復の（STR）分析、鎖連結反応（Barany、PCR Methods and Applications 1：5-16（1991））、リボヌクレアーゼ保護アッセイ、および当該分野で公知の他の遺伝子連関分析。Sambrookら編；Ausubelら編、およびA. J. Marian, Chest 108：255-65（1995）を参照のこと。リボヌクレアーゼ保護アッセイ（Ausubelら編、第4章）は、患者のRNAサンプルへのRNAプローブのハイブリダイゼーションを含み、その後、反応産物（（RNA-RNA）ハイブリッド）がRNaseに曝される。RNAのハイブリダイズした領域は、消化から保護される。PCRアッセイにおいては、患者の遺伝子サンプルはオリゴヌクレオチドプライマーの対とともにインキュベートされ、そしてプライマーの間の領域が増幅されそして得られる。得られた産物の大きさ、量、または配列の変化は、患者における変異の指標である。使用され得る別のPCRに基づく技術は、一本鎖のコンフォメーション多型（Single strand conformational polymorphism）（SSCP）の分析である。Hayashi、PCR Methods and Applications 1：34-38（1991）を参照のこと。

【0329】

血清中のMK61タンパク質のアッセイは、本明細書中に記載されている疾患および障害を検出するために使用され得る。当業者は、MK61の過小発現または過剰発現に関係している症状が、MK61タンパク質のレベルの治療的な操作による処置に敏感に反応し得ることを認識する。

【0330】

MK61ポリペプチドは、処置される適応について適切である場合には、1つ以上のサイトカイン、成長因子、抗生物質、抗炎症薬、および／または化学療法薬との組合せで、（同時にまたは続いて）使用され得る。

【0331】

1つ以上のMK61ポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合には、他の方法もまた、使用され得る。このような阻害は、コントロール配列に相補的であり、その発現物にハイブリダイズする（三重らせんの形成）かまたはMK61 mRNAにハイブリダイズする核酸分子によって達成され得る。例えば、アンチセンスDNAまたはRNA分子（これらは、選択されたMK61遺伝子の少なくとも一部に対して相補的である配列を有する）が、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されているMK61ポリペプチドの配列を使用して利用可能な技術によって設計され得る。典型的には、それぞれのこのようなアンチセンス分子は、それぞれの選択されたMK61遺伝子の開始部位（5'末端）に対して相補的である。次いで、アンチセンス分子が対応するMK61 mRNAにハイブリダイズすると、このmRNAの翻訳が妨げられるかまたは減少させられる。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物体中のMK61ポリペプチドの減少またはその非存在に関する情報を提供する。

【0332】

あるいは、遺伝子治療は、1つ以上のMK61ポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターを作成するために使用され得る。この状況では、各々の選択されたMK61ポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするDNAが調製され得、そして本明細書中に記載されているウイルスまたは非ウイルス方法のいずれかを使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、典型的には、その生物学的役割において内因性のポ

リペプチドと競合するように設計される。

【0333】

さらに、MK61ポリペプチド（生物学的に活性であるかどうかにはかかわらず）は、免疫原として使用され得る。すなわち、ポリペプチドは、抗体がそれに対して惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。MK61ポリペプチドに結合する選択的結合試薬（本明細書中に記載されているような）は、体液または細胞サンプル中のMK61ポリペプチドの存在を検出するための標識された形態での使用を含むがこれに限定されない、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得る。抗体はまた、本明細書中に記載されているものを含む多数の疾患および障害を予防、処置、または診断するためにも使用され得る。抗体は、MK61ポリペプチドの特徴である少なくとも1つの活性を減少させるかまたは遮断するように、MK61ポリペプチドに結合し得るか、あるいは、MK61ポリペプチドの特徴である少なくとも1つの活性を増大させる（MK61ポリペプチドの薬物動態を増大させることを含む）ようにポリペプチドに対して結合し得る。

10

【0334】

以下の実施例は、説明の目的だけのために意図され、そしていかなる方法においても本発明の範囲の限定とは解釈されるべきではない。

【0335】

（実施例1）

（ヒトMK61 cDNAクローンの単離）

Amgen ESTデータベースのTNFレセプターファミリーのプロファイルファイルの検索を行った。1つのヒトEST配列（G-0042-B7）を、TNFレセプターファミリーの可能性のあるメンバーとして同定し、MK61と命名した。全長のヒトクローンを、続いて、当該分野で公知の標準的な条件下で以下のプライマーを使用して、ヒトリンパ節ライブラリーからPCR増幅した：ヒトMK61センスプライマー（5'-GGTGACCACTCTCGTGGGCAACGTCCT-3'；配列番号21）、アンチセンスプライマー（5'-GCCCAATTAGGATTGTACAAGAAG-3'；配列番号22）。ヒトのリンパ節由来のポリ（A）+RNAを逆転写し、そしてcDNAをSmart RACE cDNA増幅キット（Clontech, Palo Alto, CA）を使用して、製造業者の説明書に従って合成した。ヒトMK61遺伝子の全長のcDNAを、哺乳動物細胞での発現のためにpcDNA3ベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA）中にクローン化し、そして標準的な方法を使用して配列決定した。クローンの名称は、pcdna3hMK61#5であり、そしてこれは、ヒトMK61 T1アイソフォームcDNAを含む。

20

30

【0336】

ヒトMK61 cDNA配列は1668ヌクレオチド（配列番号1）であり、そして355アミノ酸のポリペプチド（配列番号2）をコードする。ポリペプチド（hMK61T1として本明細書中で記載される；図1を参照のこと）は、残基1～23にまたがるシグナルペプチド、TNFRスーパーファミリーのシステインリッチ領域の記号に適合する残基26～60にまたがるシステインリッチドメイン（Madryら、INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, 10:1693-1702, 1998、および本明細書中の参考文献）、残基157～185にまたがる膜貫通ドメイン、および長い細胞内ドメインを含む。公のデータベース、Amgen内部データベース、およびCeleraデータベースにおいて入手可能なcDNAおよびゲノム配列と適合している全ての入手可能なヒトMK61の慎重なアラインメントによって、5個のさらなる全長のヒトMK61のアイソフォームを同定した（本明細書中では、ヒトMK61T2、MK61T3、MK61T4、MK61T5、およびMK61T6と記載する）。

40

【0337】

hMK61T2ポリヌクレオチド配列は1525ヌクレオチド（配列番号3）であり、そして85アミノ酸のポリペプチド（配列番号4）をコードする。これは、シグナルペプチド（残基1～23）（しかし、推定される膜貫通ドメインではない）を含み、このアイソ

50

フォームが分泌されたポリペプチド（図2）をコードし得ることを示唆している。hMK61T2は、TNFRスーパーファミリーのシステインリッチ領域の特徴に対して不完全な適合（6個のシステインのうちの5個が適合）を示す、残基26～51にまたがるシステインリッチドメインを含む。hMK61T3ポリヌクレオチド配列は、1289ヌクレオチド（配列番号5）であり、そして136個のアミノ酸残基のポリペプチド（配列番号6）をコードする。これは、シグナルペプチド（残基1～23）（しかし、推定される膜貫通ドメインではない）を含み、このアイソフォームが分泌されたポリペプチド（図3）をコードし得ることを示唆している。hMK61T3は、TNFRスーパーファミリーのシステインリッチ領域の記号に適合している、残基26～60にまたがるシステインリッチドメインを含む。hMK61T4ポリヌクレオチド配列は、1164ヌクレオチド（配列番号7）であり、そして187個のアミノ酸残基を含有しているポリペプチド（配列番号8）をコードする。これは、シグナルペプチド（残基1～23）（しかし、推定される膜貫通ドメインではない）を含み、このアイソフォームが分泌されたポリペプチド（図4）をコードし得ることを示唆している。hMK61T4は、TNFRスーパーファミリーのシステインリッチ領域の特徴に対して不完全な適合（6個のシステイン残基のうちの5個が適合）を示す、残基26～51にまたがるシステインリッチドメインを含む。hMK61T5ポリヌクレオチド配列は、1483ヌクレオチド（配列番号9）であり、そして71個のアミノ酸残基のポリペプチド（配列番号10）をコードする。これは、シグナルペプチド（残基1～23）（しかし、推定される膜貫通ドメインではない）を有し、このアイソフォームが分泌されたポリペプチド（図5）をコードし得ることを示唆している。hMK61T5は、TNFRスーパーファミリーのシステインリッチ領域の記号に適合しているが、hMK61T1とはわずかに異なる、残基26～57にまたがるシステインリッチドメインを含む。hMK61T6ポリヌクレオチド配列は、1104ヌクレオチド（配列番号11）であり、そして167個のアミノ酸残基のポリペプチド（配列番号12）をコードする。これは、シグナルペプチド（残基1～23）（しかし、推定される膜貫通ドメインではない）を含み、このアイソフォームが分泌されたポリペプチド（図6）をコードし得ることを示唆している。hMK61T6は、TNFRスーパーファミリーのシステインリッチ領域の記号に対して不完全な適合（6個のシステインのうちの5個が適合）を示す残基26～51にまたがるシステインリッチドメインを含む。

10

20

30

40

【0338】

興味深いことに、全てのヒトMK61アイソフォームは、リガンド結合ドメインの一部を構成し得る、完全なまたは部分的なTNFR型のシステインリッチドメインを含む。従って、hMK61T1は真の新規のTNFRファミリーのメンバーである細胞表面レセプターをコードするようであるが、ヒトのアイソフォームMK61T2～T6は、分泌されたレセプターをコードするようである。分泌されたレセプターは、オステオプロテグリン（OPG）について以前に実証されているように、未知のMK61リガンドをそのレセプターとの相互作用から妨げる、デコイレセプターとして作用し得る。オステオプロテグリンリガンドは、破骨細胞の分化および活性化を調節するサイトカインである（Laceyら、Cell：93：165～176、1998）。さらに、MK61T1～T6アイソフォームは、未知のMK61リガンドに結合し得、そしてそれを通じて逆シグナル伝達を調節する。

【0339】

（実施例2）

（マウスのMK61 cDNAクローンの単離）

Amgen ESTデータベースのTNFレセプターファミリーのプロファイル検索を、実施例1において上記に記載するように行った。1つのヒトEST配列（G0042-B7）を、TNFレセプターファミリーの可能性のあるメンバーとして同定し、MK61と命名した。全長のマウスMK61クローンを、当該分野で公知の標準的な条件下で以下のプライマーを使用して、マウスA20細胞ライブラリーからPCR増幅した：マウスセンスプライマー（5'-CGGACGCGTGCGCGGACGCGTGCGG-3'；配

50

列番号23)、アンチセンスプライマー(5'-AGCAAACTCTGACTCAGCCAGTT-3';配列番号24)。マウスのBリンパ腫細胞株A20由来のポリ(A)+RNAを逆転写し、そしてcDNAをSmart RACE cDNA増幅キット(Clontech, Palo Alto, CA)を使用して、製造業者の説明書に従って合成した。マウス遺伝子の全長のcDNAを、哺乳動物細胞での発現のためにpcDNA3ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)中にクローン化し、そして標準的な方法を使用して配列決定した。

【0340】

マウスMK61ポリヌクレオチド配列は、1202ヌクレオチド(配列番号13)であり、そして345アミノ酸のポリペプチド(配列番号14)をコードする。マウスMK61 T1ポリペプチドは細胞表面レセプターであり、これは、残基1~21にまたがるシグナル配列、および膜貫通ドメインを有する(図7)。

【0341】

(実施例3)

(hMK61 mRNAの組織分布)

MK61 mRNAの分布を、ノーザンブロット分析および定量的PCRによって決定した。ヒトの末梢血T細胞、B細胞、および単球を、Rosette Sep enrichment cocktail(Stem Cell Technologies)によって製造業者の説明書に従って精製した。ヒトバーキットリンパ腫細胞、Raji細胞、Tリンパ腫細胞、Jukat細胞、K562細胞、およびU937細胞を、ATCC(Rockville, MD)から入手した。全RNAを、Rneasyキット(Qiagen, Valencia, CA)によって製造業者の説明書に従って、これらの細胞から単離した。

【0342】

ノーザンブロット分析を、当該分野で公知の標準的な条件を使用して行った。多組織ノーザンブロットおよび多組織cDNAを、Clontech(Palo Alto, CA)から購入した。ノーザンブロットを、ランダムプライムしたヒトおよびマウスのMK61放射活性プローブで55℃で3時間ハイブリダイズさせ、次いで2×SSC/0.1%のSDSで数回交換し、続いて0.1×SSC/0.1%のSDSで30分間、洗浄した。

【0343】

ノーザンブロット分析は、hMK61が末梢のリンパ系器官、脾臓、リンパ節、胸腺、骨髓、末梢血白血球、ならびに胎児の肝臓中で優先的に発現されることを示した(図13および14を参照のこと)。いくつかの種々のMK61アイソフォームがこれらの器官中で発現されたが、主な転写物は1.6kbpであった。

【0344】

リアルタイム定量的PCRを、種々のヒト組織および細胞株について行った。このアッセイは、特異的なPCR産物の検出を可能にする色素原性プローブおよびPCRプライマーを使用する。PCRプライマーおよびプローブを、PE BiosystemsのPrimer Expressソフトウェアを使用して設計し、そして必要とされる場合には、Amgen Boulderによって合成した。ヒトMK61に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブ(プローブ#2288-23 ETT CCC AGT TTT TCA TCT GCA CTG CCA X(配列番号40);5'プライマー#2288-22 TGC TGG ACC CAA CAC AAA TG(配列番号41);3'プライマー#2288-24 TGC CAT CCA ACC ACT CAG TC(配列番号42))、およびヒトシクロフィリン(プローブ#2661-92 ECT GCC TGC TGC CTG GTC CAC CTX(配列番号43)、5'プライマー#2661-90 ACA CCT GGC CGC AAG ATA TG(配列番号44);3'プライマー:#2661-91 GAC TCG GCC TCA GCG AAT AG(配列番号45))を、PE Biosystemsの標準的なプロトコールに従ってTaqmanのためのプライマーとして使用した。T

aqman PCR反応を、ABI PRISM 7700機器上で行い、そしてデータを、PE BiosystemsのSequence Detection Systemソフトウェアによって分析した（図15を参照のこと）。

【0345】

ヒトMK61 mRNAの発現は、単球（monozytic cell）、B細胞、リンパ節、脾臓、およびT細胞中で最も高かった。中程度のレベルのヒトMK61 mRNAの発現が、肝臓、骨髄、胸腺、扁桃腺、および胎児の肝臓で検出された。低いレベルのヒトMK61 mRNAが、肺、胎盤、およびJurkat細胞中で検出された。興味深いことに、ヒトMK61 mRNAの発現は、対応している腫瘍細胞株Raji、K562、およびU937よりも、初代B細胞、T細胞、および単球（monozytic cell）中で高かった。この発現パターンは、MK61の発現がリンパ腫特異的であり、そして腫瘍細胞中でダウンレギュレートされ得るという見解と一致した。

【0346】

（実施例4）

（mMK61-Fc融合構築物の調製）

Smil2-00051-f3の推定される175アミノ酸の細胞外部分を、PEF-BOSベクター（pEF-BOS；強力な哺乳動物発現ベクター；Mizushimaら、Nuc. Acids Res. 18:5322、1990）中にサブクローン化し、そしてFc部分を遺伝子の末端に付着させた。mMK61-Fcをコードするヌクレオチド配列を、配列番号15に示す。トランスフェクションを、トランスフェクション試薬としてBio-Rad Cytfecteneを使用して行った。トランスフェクションの48時間後に馴化培地を回収し、そしてCMを、Centricon 10カラム（Millipore Corp., Bedford, MA）によって10倍に濃縮した。レーン6、7、および8に充填したサンプルは、濃縮した馴化培地であった（図9を参照のこと）。

【0347】

mMK61 Fc融合タンパク質（配列番号16）を、抗ヒトIgG（Fc）（Pierce）によって、1:3000希釈で検出し、次いで化学発光の増強（ECL）によって視覚化した。露光時間は、15秒であった。2933個の細胞溶解物をポジティブコントロールとして使用し、そして以下のように調製した：293細胞（ATCC検索番号CRL-1573のもとで入手可能）を、200μlの2×SDS充填緩衝液中に懸濁し、そして加熱した。次いで、細胞溶解物（5μl）をそれぞれのレーンに充填した。ウェスタンブロット（図9）は、MK61-Fc融合タンパク質が分泌され、そして細胞の馴化培地中で検出可能であることを示す。

【0348】

（実施例5）

（組換えMK61-Fc融合タンパク質の産生および精製）

A. ヒトMK61-Fcタンパク質のクローニングおよび細菌での発現：
以下に記載するプライマー対および鋳型を使用するPCR増幅を、種々の形態のヒトMK61タンパク質を作成するための使用した。それぞれの対の1つのプライマーに、遺伝子のカルボキシ末端の後に、終止コドン（TAA）および特有のXhoI部位を導入した。それぞれの対の他方のプライマーには、特有のNdeI部位、N末端メチオニン、遺伝子のアミノ酸末端部分について最適なコドンを導入した。PCRおよびサーモサイクリング（thermocycling）を、標準的な組換えDNA方法論を使用して行った。PCR産物を精製し、制限消化し、そしてベクターpAMG21（ATCC検索番号第98113号）の特有のNdeIおよびXhoI部位に挿入した。続いて、原栄養性E. coli株393または2596をベクターで形質転換した。他の一般的に使用されるE. coli発現ベクターおよび宿主細胞もまた、発現に適切である。形質転換後、クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、そしてMK61タンパク質の挿入物の配列を確認した。

【0349】

1. pAMG21-ヒトMK61 21-160 His :
 pAMG21-hMK61 21-160 His 構築物を、147アミノ酸の長さであり、そして以下のN末端およびC末端残基を有するように操作した：NH₂-Met-Glu-Ala-Ser-Gln-----Gln-Ala-Trp-Pro-Asn-His-His-His-His-His-His-COOH（配列番号25）。以下のオリゴヌクレオチドプライマーの対（#2609-87および#2609-88）を、この遺伝子構築物のPCRおよびクローニングに使用した（2609-87：5'-GAG GAA TAA CAT ATG GAA GCC TCT CAG TAT TGC GGC CGC-3'（配列番号26）；2609-88：5'-CGG CCG A TC CTC GAG TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG A TT CGG CCA GGC CTG CTG-3'（配列番号27））。 10

【0350】

2. pAMG21-ヒトMK61 21-160 Fc（ヒトIgG1）
 pAMG21-ヒトMK61 21-160 Fc 構築物を、373アミノ酸の長さであり、そして以下のN末端およびC末端残基を有するように操作した：NH₂-Met-Glu-Ala-Ser-Gln-----Ser-Pro-Gly-Lys-COOH（配列番号28）。5個のグリシン残基から構成されるリンカーを、MK61タンパク質のC末端とヒトIgG1 FcのN末端の間に挿入した。MK61-Fc連結分の配列は以下であった：Gln-Ala-Trp-Pro-Asn-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Asp-Lys-Thr-His（配列番号29）。この構築物のPCR増幅を、2段階で行った。最初の工程では、遺伝子のMK61およびFc部分を増幅した。オリゴ#2609-87（5'-GAG GAA TAA CAT ATG GAA GCC TCT CAG TAT TGC GGC CGC-3' 配列番号30）；および#2609-97（5'-ACA TGT GTG AGT TTT GTC ACC ACC ACC ACC ACC ATT CGG CCA GGC CTG CTG-3' 配列番号31）を、MK61部分を増幅するために使用した。オリゴ#2609-98（5'-CAG CAG GCC TGG CCG AAT GGT GGT GGT GGT GAC AAA ACT CAC ACA TGT-3' 配列番号32）および#2293-10（5'-CCG CGG ATC CTC GAG TTA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG-3' 配列番号33）を、ヒトIgG1 fc部分を増幅するために使用した。第2の工程では、第1回目の増幅による反応産物をゲル精製し、そして最終的なMK61::fc構築物を作成するための鋳型として使用した。オリゴ#2609-87（配列番号30）および#2293-10（配列番号33）を、この構築物のPCR増幅に使用した。 20 30

【0351】

DNA配列の確認後、形質転換したE. coliを対数期中期まで37℃で増殖させ、そして250ng/mlの最終濃度のホモセリンラクトン（HSL）で処理して、MK61-Fc融合タンパク質の発現を誘導した。誘導後、細胞を、37℃で数時間増殖させ、続いて、遠心分離によって回収し、そして-80℃で凍結させた。トランスフェクトしたE. coliの増殖、MK61-Fcタンパク質の発現の誘導、およびMK61-Fcを含有している封入体の単離を、本明細書中で参考として援用されている、1995年12月22日に提出された米国特許出願番号第08/577,788号に記載されている手順に従って行った。 40

【0352】

E. coli中で発現させたMK61-Fc融合タンパク質の精製およびリフォールディングを、以下の方法を使用して達成した。MK61-Fc融合タンパク質を可溶化させるために、細菌細胞をマイクロフルイダイザー（microfluidizer）中で壊し、そして12,000gで1時間遠心分離した。得られた封入体を水で洗浄し、そして12,000gで1時間遠心分離した。次いで、ペレットを、50mMのTris、8Mの 50

G u H C l、および 7 m M の D T T (p H 8 . 5) 中 で 1 時 間 可 溶 化 し、そ し て 1 2 , 0 0 0 g で 1 時 間 遠 心 分 離 し た。

【 0 3 5 3 】

M K 6 1 - F c 融 合 タ ン パ ク 質 を リ フ ォ ー ル デ ィ ン グ す る た め に、上 清 を 5 0 m M の T r i s、2 M の 尿 素、0 . 2 M の ア ル ギ ニ ン (p H 8 . 5) で 1 : 2 0 に 稀 釈 し、そ し て E l m a n 試 験 で 遊 離 の チ オ ー ル に つ い て ネ ガ テ ィ ブ に な る ま で 4 ° C で イ ン キ ュ ベ ー ト し た (約 4 日 間)。次 い で、上 清 を 2 0 倍 に 濃 縮 し、4 倍 容 量 の 5 0 m M の T r i s (p H 8 . 5) で 透 析 し た。稀 釈 し た 上 清 を、2 5 m M の T r i s (p H 8 . 5) の 1 0 倍 の 溶 液 で 稀 釈 し、そ し て p H を 5 . 0 に 下 げ る こ と に よ っ て 沈 殿 さ せ た。次 い で、稀 釈 し た 溶 液 を 5 分 間 攪 拌 し、そ し て 1 2 , 0 0 0 g で 3 0 分 間 遠 心 分 離 し た。

10

【 0 3 5 4 】

精 製 の た め に、上 清 を S P 高 速 カ ラ ム 上 に 充 填 し、そ し て 0 ~ 6 0 0 m M の N a C l 勾 配 上 で N a O A c (p H 5 . 0) の 存 在 下 で 6 0 倍 以 上 の カ ラ ム 容 量 で 実 行 し た。融 合 タ ン パ ク 質 は、5 0 0 m M の N a C l の 周 辺 で 溶 出 さ れ た。プ ー ル し た 画 分 を p H 7 . 0 に 滴 定 し、1 M の 硫 酸 ア ン モ ニ ウ ム (A S) 濃 度 に し、そ し て 1 2 , 0 0 0 g で 3 0 分 間 遠 心 分 離 し た。次 い で、上 清 を プ チ ル 高 速 カ ラ ム 上 に 充 填 し、そ し て 1 M の A S か ら 0 M の A S の 勾 配 上 で、1 0 m M の N a P i (p H 7 . 0) の 存 在 下 で 5 0 倍 以 上 の カ ラ ム 容 量 で 実 行 し た。こ の 融 合 タ ン パ ク 質 は、お よ そ 3 0 m M の A S で 溶 出 さ れ た。プ ー ル し た 画 分 を、P B S に 対 し て 透 析 し た。

B . 哺 乳 動 物 細 胞 培 養 物 中 で の M K 6 1 - F c の ク ロ ー ニ ン グ、発 現、お よ び 精 製 :

20

ヒ ト M K 6 1 - F c の ア ミ ノ 酸 1 か ら 1 5 3 を コ ー ド す る c D N A フ ラ グ メ ン ト を、鋳 型 と し て の p c d n a 3 h u M K 6 1 # 5、な ら び に プ ラ イ マ ー # 2 6 2 3 - 8 1 (C A G C C C A A G C T T T A G A C C A C C A T G G G G C C T G G A C G A T G C ; 配 列 番 号 3 4) お よ び 2 6 2 3 - 8 3 (C A G G T C G A C A G G C T C A G G G G T C C T ; 配 列 番 号 3 5) を 使 用 し て P C R に よ っ て 増 幅 し た。こ れ ら の プ ラ イ マ ー に、そ れ ぞ れ 遺 伝 子 の 5 ' お よ び 3 ' 末 端 に H i n d I I I お よ び S a l I 部 位 を 挿 入 し た。P C R 産 物 を 精 製 し、H i n d I I I お よ び S a l I で 消 化 し、そ し て H i n d I I I お よ び S a l I で 消 化 し そ し て 脱 リ ン 酸 化 し た h u O P G 1 9 4 F c Δ C ベ ク タ ー (第 W O 0 1 / 1 8 2 0 3 号 お よ び 第 E P 1 1 2 7 1 1 7 号 に 記 載 さ れ て い る) 中 に 連 結 し た。連 結 産 物 を、D H 5 α コ ン ピ テ ン ト 細 胞 (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) 中 に 形 質 転 換 し、そ し て L B + ア ン ピ シ リ ン プ レ ー ト 上 に プ レ ー ト し た。

30

【 0 3 5 5 】

形 質 転 換 し た D H 5 α コ ン ピ テ ン ト 細 胞 の 8 個 の コ ロ ニ ー を、ミ ニ プ レ ッ プ 技 術 (Q i a g e n) を 使 用 し て D N A を 単 離 す る た め に 増 殖 さ せ た。単 離 し た D N A を、N o t I お よ び P v u I で の 消 化 に よ っ て ス ク リ ー ニ ン グ し た。5 個 の ク ロ ー ン が、予 想 さ れ た 1 5 1 2 塩 基 対 の フ ラ グ メ ン ト を 生 じ た。ポ ジ テ ィ ブ ク ロ ー ン の ク ロ ー ン 1 お よ び 7 を、5 0 0 m l の 調 製 物 中 で 増 幅 し、D N A を 単 離 し、そ し て 標 準 的 な 方 法 を 使 用 し て 配 列 決 定 し た。

【 0 3 5 6 】

40

ク ロ ー ン 7 か ら 単 離 し た D N A は、正 確 な 配 列 で あ っ た。M K 6 1 - F c の ア ミ ノ 酸 配 列 を、配 列 番 号 3 6 と し て 図 2 4 に 示 す。ク ロ ー ン 7 の D N A (1 5 μ g) を、P v u I で 直 鎖 状 に し、そ し て A M - 1 / D 細 胞 中 に ト ラ ン ス フ ェ ク ト し た。A M - 1 / D は、血 清 を 含 ま ない 条 件 に 適 合 さ せ ら れ た、D H F R を 欠 失 し て い る チ ェ イ ニ ー ズ ハ ム ス タ ー 卵 巢 細 胞 (U r l a u b お よ び C h a s i n 1 9 8 0 P N A S 第 7 7 巻 4 2 1 6 - 4 2 2 0) (米 国 特 許 第 6 , 2 1 0 , 9 2 4 号 に 記 載 さ れ て い る) で あ る。安 定 な ク ロ ー ン を、選 択 マ ー カ ー D H F R (ジ ヒ ド ロ 葉 酸 レ ダ ク タ ー ゼ) に 基 づ い て 作 成 し た。9 個 の 安 定 な ク ロ ー ン を、発 現 分 析 の た め に 拡 大 さ せ た。M K 6 1 - F c の 発 現 を、抗 ヒ ト I g G 1 F c 抗 体 (P i e r c e) を 使 用 し て ウ ェ ス タ ン ブ ロ ッ テ ィ ン グ に よ っ て 決 定 し た。高 発 現 ク ロ ー ン を 選 択 し、そ し て 標 準 的 な 方 法 を 使 用 し て ロ ー ラ ー ボ ト ル 中 で の 細 胞 の 増

50

殖によって拡大させた。

【0357】

ヒトMK61-Fc融合タンパク質を精製するために、馴化CHO-MK61-Fc培地を、PBS中で平衡化したプロテインGカラム上に充填した。このカラムを20倍のカラム容量のPBSで洗浄し、そして融合タンパク質を、100mMのグリシン(pH2.6)で溶出し、そしてプールした画分を1MのTris(pH8.5)で中和し、そしてPBS中に透析した。

【0358】

C. マウスMK61/FcΔC融合タンパク質の産生：

タンパク質の細胞外ドメインをコードするマウスMK61 cDNAを、全長のmuMK61 cDNA(配列番号13)から、プライマー#2664-83(CAG CCC AAG CTT TAG ACC ACC ATG GGG CCC AGC TGG CTT; 配列番号37)および#2664-84(CAG GTC GAC CTC ATT CTT GGT TGT; 配列番号38)を使用して増幅した。これらのプライマーには、それぞれ、遺伝子の5'および3'末端にHindIIIおよびSalI部位を挿入した。PCR産物を精製し、HindIIIおよびSalIで消化し、そしてHindIIIおよびSalIで消化しそして脱リン酸化したhuOPG194 FcΔCベクター中に連結した。連結産物を、DH5αコンピテント細胞中に形質転換し、そしてLB+アンピシリンプレート上にプレートした。

【0359】

形質転換したDH5αコンピテント細胞の16個のコロニーを、ミニプレップ技術によってそれらのDNAを単離するために増殖させた。単離したDNAを、MSC1(MK61に特有の酵素)およびPvu1(pDSRaベクターに特有の酵素)での消化によってスクリーニングした。15個のクローンが、予想された1523塩基対のフラグメントを生じた。これらのポジティブクロンのクローン2および4を、500mlのプレップ中で増幅し；DNAを単離し、そして標準的な方法を使用して配列決定した。

【0360】

クローン2および4の両方から単離したDNAは、MK61-Fc融合タンパク質の発現のための正確な配列を有した(図25; 配列番号39)。クローン2のDNA(15μg)をPvu1で直鎖状にし、そしてチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株から誘導されたAM-1/D細胞中にトランスフェクトした。安定なクローンを、選択マーカーDHFRに基づいて作成した。9個のクローンを、発現分析のために拡大させた。MK61-Fcの発現を、抗ヒトFc抗体を使用してウェスタンブロッティングによって決定した。

【0361】

(実施例6)

(FACS分析によって決定したMK61-Fcの結合)

MK61-Fcタンパク質の結合を、蛍光活性化細胞分類(FACS)によってヒト細胞上で検出した。Raji細胞、Molt-4細胞、U937細胞、K562細胞、A20細胞、およびJurkat細胞を、ATCCから入手した。細胞を回収し、そして結合緩衝液(10mMのHEPES緩衝液、2%のヤギ血清、5%のウサギ血清、1μg/mlの抗マウスCD16/CD32モノクローナル抗体(PharMingen, San Diego, CA)を含有しているDMEM培地)中の1μg/mlのヒトMK61-Fcとともに室温で30分間インキュベートし、続いて、2%のFBSを含有しているPBSで3回洗浄した。MK61-Fc融合タンパク質の細胞表面への結合を、FITC結合抗ヒトIgG Fc二次抗体(PharMingen, San Diego, CA)を使用して免疫蛍光染色によって評価した。蛍光を、FACSstar(Becton and Dickinson, Mountain View, CA)を使用して検出した。

【0362】

MK61-Fcの結合を、U937細胞およびJurkat細胞上で検出した(図16を

参照のこと)。MK61-Fcの結合を増強させるために、U937細胞およびJurkat細胞を、分析の前に、ヒトインターフェロン γ (10 ng/ml) で24時間処理した。インターフェロン γ での事前処理によって、MK61-Fcの結合を増強させた(図17を参照のこと)。MK61-Fc融合タンパク質のこれらの細胞への結合は、MK61リガンドが、単球(monozytic) (U937) およびT細胞(Jurkat)の細胞表面上に存在することを示す。

【0363】

免疫細胞の表面上の未知のMK61リガンドの存在は、MK61(例えば、MK61-Fc融合タンパク質)のリガンドに結合する可溶性の形態が、MK61レセプターのシグナル伝達経路を活性化する「ポジティブな試薬」として作用し得ることを示唆する。このことは、免疫細胞の表面上に存在する未だ未知のMK61リガンドに対するポジティブな結合試薬によって達成され得、そしてそれによってリガンドを通じる逆のシグナル伝達を誘発する。このようなシグナル伝達は、リンパ球の拡大および免疫グロブリンの産生を生じる免疫系を調節する事象である。

10

【0364】

(実施例7)

(初代脾臓細胞中での、MK61-Fcによって阻害されるイムノグロブリンの産生)
脾臓細胞の全てを、リンパ球分離培地(ICN, Aurora, OH)の遠心分離を使用してマウスの脾臓から単離した。脾臓細胞を、150 ng/mlのリボポリサッカライド(LPS)とともに72~96時間の間、マウスまたはヒトの Δ C MK61-Fc Δ 融合タンパク質の存在下で、インビトロで培養した。続いて、処理した細胞に由来する培養上清を、種々のIgアイソフォームの産生を分析するために4日後に除去した(PharMingen, CA)。

20

【0365】

マウスおよびヒトの両方のMK61-Fc融合タンパク質での処理は、マウスの脾臓細胞培養物中でのIgAおよびIgGの産生において用量依存性の減少を生じた(図18を参照のこと)。最大の阻害は、MK61-Fcを100 ng/mlの濃度で使用した場合に達成された。このデータは、MK61-Fc融合タンパク質が、免疫システムの強力なインヒビターであることを示す。このデータはまた、MK61レセプターが、可溶性のMK61-Fc融合タンパク質のような「ネガティブな調節因子」によってアンタゴナイズされ得る免疫システムのシグナル伝達経路を活性化することを示唆する。

30

【0366】

免疫グロブリンの産生の阻害がB細胞の増殖のMK61-Fc融合タンパク質によって誘導される阻害に起因するかどうかを決定するために、B細胞の増殖に対するMK61-Fcの影響を測定した。マウスB細胞を、マウスB細胞回収カラム(Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada)を使用してC57B/6マウスの脾臓からネガティブ選択によって精製した。この方法によって単離された細胞は、FACS分析によって決定すると、B220染色については90%以上がポジティブであった。 1×10^6 個/mlを、培地(RPMI-1640、5%のFBS、 5×10^{-5} Mの2ME、2 μ g/mlののアフィニティー精製したヤギF(ab')₂抗マウスIgM)中の96ウェル平底組織培養プレート中に播種した。次いで、B細胞を、漸増量のCD40L、APRIL、またはTALL-1の存在下またはその非存在下で、100 ng/mlのヒトまたはマウスのMK61-Fcタンパク質とともに72時間インキュベートした。DNA合成を、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの測定によって定量した。0.5 μ Ciの $[^3\text{H}]$ チミジンを添加し、18時間後に細胞を回収し、そして $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを計数した。MK61-Fc融合タンパク質での処理は、このアッセイではB細胞の増殖には影響を与えなかった。

40

【0367】

(実施例8)

(インビボでのB細胞応答に対するMK61-Fc融合タンパク質での処理の影響)

50

MK 6 1 ポリペプチドの機能的な重要性を特徴付けるために、融合タンパク質MK 6 1 - F c Δ C をマウスを処置するために使用した。

【0368】

最初に、Balb/c マウス（8～12 週齢の雌、Charles River Laboratories）を、0 日目に開始して7 日間連続して1 日に1 回、5 mg/Kg の MK 6 1 - F c で腹膜内で処置した。コントロールのマウスを、上記と同様に、5 mg/Kg の Ig G 1 - F c または生理食塩水で処置した。マウスを、MK 6 1 - F c の最後の注射の1 日後（すなわち、7 日目）に屠殺した、脾臓を組織学的試験、FACS 分析、および血清 Ig の測定のために切り出した。

【0369】

10

A. 組織学的分析：

組織学的試験のために、脾臓をホルマリン中に固定し、標準的な手順に従ってパラフィン中に包埋し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。MK 6 1 - F c 融合タンパク質での処置は、コントロールの F c タンパク質または生理食塩水と比較して、脾臓の重量を75% 増大させた（図19、上段のパネル）。脾臓の重量の増大は、脾臓のリンパ球の数の匹敵する増大を反映する（図19、下段のパネル）。脾臓細胞の総数を、Technicon H. I. E. Counter（Bayer Co. Diagnostic Division, Northwood, MD）を使用して、製造業者によって推奨される標準的な手順に従って決定した。MK 6 1 - F c で処置したマウス由来の脾臓の組織学的試験は、以下によって特徴付けられるリンパ球の過形成の存在を示した：（1）中程度から十分に発達した卵胞胚芽中心の数の増大、ならびに（2）白色パルプと赤色パルプとの間の界面での局所的な堆積に通常局在する血漿細胞の数の増大（図20を参照のこと）。リンパ球の過形成は、F c タンパク質または生理食塩水で処置したコントロールマウス中では観察されなかった。

20

【0370】

B. FACS 分析

FACS 分析のために、脾臓を生理食塩水中に回収し、そして細胞懸濁物を生じるようにホモジナイズした。全リンパ球数を、細胞計数器を用いて得、一方で、リンパ球のサブセットの割合を、免疫蛍光二重染色およびフローサイトメトリーによって導いた。MK 6 1 - F c 融合タンパク質は、コントロールの F c または生理食塩水と比較して、脾臓のリンパ球の総数を90% 増大させた（図21、上段のパネル）。MK 6 1 - F c は、T細胞、B細胞、および非T細胞、非B細胞を指数的に増加させた。実際、MK 6 1 - F c は、CD3+（T細胞）、CD3-/B220+（B細胞）、およびCD3-/B220-（非T細胞および非B細胞）細胞の絶対数を増加させたが、これらの細胞の割合には有意な影響を与えなかった（図21、下段のパネル）。MK 6 1 - F c は、B細胞のサブセットの割合を変化させた。実際、MK 6 1 - F c は、CD19+/CD5+（B）細胞の割合を減少させたが、それらの絶対数はなお増大した（図21）。

30

【0371】

C. 血清イムノグロブリンの測定：

血清免疫グロブリンを、以前に記載されたサンドイッチELISA（Guoら、J. Immunol. 166:5578-84, 2001）によって測定した。コントロールの F c と比較して、MK 6 1 - F c は、全IgG、IgG1、およびIgG2bの血清濃度を増大させたが、他のIg型およびサブタイプの濃度は有意には変化させなかった（図22）。IgG1の増大は、全てのIgGサブタイプの中で最も顕著であった（約6倍）。

40

【0372】

（実施例8）

（インビボでのT細胞応答に対するMK 6 1 - F c 融合タンパク質での処置のさらなる影響）

別のインビボでの実験では、マウスを、マウスのMK 6 1 - F c 融合タンパク質またはF c タンパク質コントロールの最初の注射の前に、0 日目に、フロイトの完全なアジュバン

50

ト (CFA) 中の T 細胞非依存性抗原 P n e u m o v a x (115 μ g、M e r c k、W e s t P o i n t, P A) または T 細胞依存性抗原キーホールリンペットヘモシアニン (K L H, P i e r c e, R o c k f o r d, I L) で免疫した。事前処置後、動物を、実施例 7 に上記に記載したように処置した。マウスを、抗原特異的抗体を測定するための血清を得るために、7 日目および 14 日目に放血させた。

【0373】

抗 K L H および抗 P n e u m o v a x I g G および I g M を、以前に記載されているような E L I S A (Y u r a, N a t u r e I m m u n o l. 1:252-256, 2000) によって血清中で測定した。簡潔には、抗 K L H の測定のために、プレートを、P B S 中の K L H でコーティングし、ブロックし、そして種々の稀釈の標準サンプルおよび試験サンプルを添加した。捕捉された抗 K L H I g G または I g M を、抗 I g G または抗 I g M ビオチニル化抗体およびニュートラアビジン結合 H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ) を使用して明らかにした。抗 P n e u m o v a x I g M の測定のために、プレートを、ポリ-L-リジンを使用して P n e u m o v a x でコーティングし、ブロックし、そして種々の稀釈の標準および試験サンプルを添加した。捕捉された抗 P n e u m o v a x I g M を、抗 I g M ビオチニル化抗体およびニュートラアビジン結合 H R P を使用して明らかにした。

10

【0374】

コントロールの F c タンパク質と比較して、M K 6 1 - F c 融合タンパク質は、抗 P n e u m o v a x 抗体 (I g M; データは示さない) の血清濃度を変化させなかった; しかし、特定の I g クラスおよびサブクラスの抗 K L H 抗体の血清濃度を変化させた (図 23 を参照のこと)。免疫化の 7 日目および / または 14 日目に、M K 6 1 - F c 融合タンパク質は、抗 K L H I g G、全てのサブクラス、および抗 I g E の血清濃度を増大させた (図 23)。

20

【0375】

実施例 8 および 9 のインビボでの研究は、免疫性を適合させるための特定の参照を用いて、M K 6 1 ポリペプチドが免疫性を調節することを示す。分子の推定されるリガンドに結合する可溶性形態 (M K 6 1 - F c 融合タンパク質) を使用する、結合 M K 6 1 とその未だ未知のリガンドとの間での相互作用の破壊は、リンパ球の拡大と I g の産生を生じる。このことは、「ネガティブ試薬」 (例えば、M K 6 1 - F c 融合タンパク質、同様の M K 6 1 由来の分子、または M K 6 1 もしくはそのリガンドを指向するアンタゴニスト抗体) を使用するこの相互作用の破壊が、免疫刺激を導き得ることを示す。一方、「ポジティブな試薬」 (例えば、M K 6 1 リガンドの M K 6 1 に結合する可溶性形態、M K 6 1 レセプターを活性化する M K 6 1 または他の分子に対するアゴニスト抗体) を使用するこの相互作用の人工的な作成は、免疫抑制を導き得る。

30

【0376】

以下の図面においては、シグナルペプチドをコードするこれらのヌクレオチドの 5'ヌクレオチドが、5'-非翻訳 (5'-UTR) 隣接配列の一部であることが理解される。さらに、終止コドンの 3'ヌクレオチドは、3'-非翻訳 (3'-UTR) 配列を示す。

【図面の簡単な説明】

40

【図 1】

図 1 は、ヒト M K 6 1 T 1 (h M K 6 1 T 1) をコードする核酸配列 (配列番号 1) を示す。ヒト h M K 6 1 T 1 のアミノ酸配列 (配列番号 2) もまた示される。h M K 6 1 T 1 は細胞表面レセプターであり、シグナルペプチド (S P)、1 つの T N F r 型のシステインリッチドメイン (C R D)、スパーサー、膜貫通ドメイン (T M)、および種間で高度に保存されている 2 つの領域を有する長い細胞内ドメインを含む。推定のシグナルペプチドをこの図中に下線で示し、そして配列番号 1 の終止コドンには二重下線を付ける。

【図 2】

図 2 は、可溶性のレセプターと考えられるヒト M K 6 1 T 2 (h M K 6 1 T 2) をコードする核酸配列 (配列番号 3) を示す。ヒト h M K 6 1 T 2 のアミノ酸もまた示される (配

50

列番号 4)。推定されるシグナルペプチドは、この図中に下線で示され、そして配列番号 3 の終止コドンには、二重下線を付ける。

【図 3】

図 3 は、ヒト MK 6 1 T 3 (hMK 6 1 T 3) をコードする核酸配列 (配列番号 5) を示す。ヒト hMK 6 1 T 3 のアミノ酸もまた示される (配列番号 6)。hMK 6 1 T 3 は、可溶性のレセプターと考えられ、シグナルペプチドおよび TNF r 型 CRD を有している。推定されるシグナルペプチドは、この図中に下線で示され、そして配列番号 5 の終止コドンには、二重下線を付ける。

【図 4】

図 4 は、可溶性のレセプターと考えられるヒト MK 6 1 T 4 (hMK 6 1 T 4) をコードする核酸配列 (配列番号 7) およびアミノ酸配列 (配列番号 8) を示す。推定されるシグナルペプチドは、この図中に下線で示され、そして配列番号 7 の終止コドンには、二重下線を付ける。

【図 5】

図 5 は、可溶性のレセプターと考えられるヒト MK 6 1 T 5 (hMK 6 1 T 5) をコードする核酸配列 (配列番号 9) およびアミノ酸配列 (配列番号 10) を示す。推定されるシグナルペプチドは、この図中に下線で示され、そして配列番号 9 の終止コドンには、二重下線を付ける。

【図 6】

図 6 は、可溶性のレセプターと考えられるヒト MK 6 1 T 6 (hMK 6 1 T 6) をコードする核酸配列 (配列番号 11) およびアミノ酸配列 (配列番号 12) を示す。推定されるシグナルペプチドは、この図中に下線で示され、そして配列番号 11 の終止コドンには、二重下線を付ける。

【図 7】

図 7 は、「Smil2-00051-F3」または「Smil2-00051」とも呼ばれる、マウス MK 6 1 (mMK 6 1) をコードする核酸配列 (配列番号 13) およびアミノ酸配列 (配列番号 14) を示す。この図中で、推定されるシグナルペプチドは下線で示され、そして配列番号 13 の終止コドンには、二重下線を付ける。

【図 8】

図 8 は、マウス mMK 6 1-Fc 融合ポリペプチド (mMK 6 1-Fc) をコードする核酸配列 (配列番号 15) およびアミノ酸配列 (配列番号 16) を示す。この図中で、推定されるシグナルペプチドは下線で示され、そして配列の Fc 部分には二重下線を付け、MK 6 1 の Fc への連結のための Not I 制限部位は太字であり、そして Kozak コンセンサス配列 (翻訳されない) は斜字である。

【図 9】

図 9 は、mMK 6 1-Fc 融合タンパク質 (mMK 6 1-Fc) が哺乳動物細胞から分泌され得ることを示すウェスタンブロットを示す。

【図 10】

図 10 は、OPG レセプター、Mrank (配列番号 17)、既知の TNF r ファミリーのメンバーとの、mMK 6 1 (配列番号 14) のアミノ酸配列の比較を示す。Mrank は、マウス OPG (オステオプロテゲリン) レセプター前駆体である。

【図 11】

図 11 は、Fas リガンドレセプター (mfas) (配列番号 18) との mMK 6 1 (配列番号 14) のアミノ酸配列の比較を示す。mfas は、アポトーシスを媒介する表面抗原レセプター前駆体である。

【図 12】

図 12 は、既知のマウスのリンホトキシン-β レセプター (Tnfrc) (配列番号 19) との mMK 6 1 (配列番号 14) のアミノ酸配列の比較を示す。Tnfrc は、リンホトキシン-β レセプター前駆体であり、そして「腫瘍壊死因子レセプター 2 関連タンパク質」または「腫瘍壊死因子-c レセプター前駆体」とも呼ばれる。

【図 1 3】

図 1 3 は、ランダムプライムされたヒト M K 6 1 放射活性プローブでプローブした、他組織ノーザンブロットを示す。これらのブロットは、ヒト M K 6 1 m R N A がヒトリンパ組織中で発現されることを示す。

【図 1 4】

図 1 4 は、ランダムプライムされたヒト M K 6 1 放射活性プローブでプローブした、他組織ノーザンブロットを示す。これらのブロットは、ヒト M K 6 1 m R N A がヒトリンパ組織中で発現されることを示す。

【図 1 5】

図 1 5 は、定量 P C R によって測定した、種々のヒト組織および細胞株中でのヒト M K 6 1 m R N A の発現を比較するヒストグラムを示す。 10

【図 1 6】

図 1 6 は、F A C S 分析によって測定した、ヒト細胞の表面上の M K 6 1 - F c 融合タンパク質の結合を定量するヒストグラムを示す。ヒストグラムは、M K 6 1 - F c 融合タンパク質が、U 9 3 7 および J u r k a t 細胞の細胞表面に結合することを示す。

【図 1 7】

図 1 7 は、インターフェロン γ での処理後の、J u r k a t および U 9 3 7 細胞の細胞表面上の M K 6 1 - F c 融合タンパク質の結合の増大を示すヒストグラムを示す。

【図 1 8】

図 1 8 は、M K 6 1 - F c 融合タンパク質での処理後の、マウスの脾臓細胞培養物中の I g G (上段のパネル) および I g A (下段のパネル) の産生を定量するヒストグラムを示す。 20

【図 1 9】

図 1 9 は、マウスの脾臓の重量 (上段のパネル) および脾臓リンパ球 (下段のパネル) に対する M K 6 1 - F c 融合タンパク質の影響を定量するヒストグラムを示す。これらのヒストグラムは、M K 6 1 - F c 融合タンパク質での処理が、脾臓の重量および脾臓リンパ球数を増大させることを示す。

【図 2 0】

図 2 0 は、M K 6 1 - F c で処理したマウスの脾臓の組織学的分析を示す。組織学的分析は、リンパ球の過形成の存在を示した。 30

【図 2 1】

図 2 1 は、M K 6 1 - F c 融合タンパク質で処置したマウスにおける、脾臓 B 細胞および T 細胞の数を定量するヒストグラムを示す。

【図 2 2】

図 2 2 は、M K 6 1 - F c 融合タンパク質で処置したマウスにおける、血漿イムノグロブリンレベルを定量するヒストグラムを示す。

【図 2 3】

図 2 3 は、M K 6 1 - F c 融合タンパク質で処置したマウスにおける、抗 - K L H 特異的抗体の作成を定量するヒストグラムを示す。

【図 2 4】

図 2 4 は、ヒト M K 6 1 - Δ F c C H O のアミノ酸配列を示す (配列番号 3 6) 。 40

【図 2 5】

図 2 5 は、ヒト M K 6 1 - F c C H O のアミノ酸配列を示す (配列番号 3 9) 。

【図 1】

FIGURE 1
ヒト MK61T1(hMK61T1)をコードする
核酸配列 (配列番号1) およびアミノ酸配列 (配列番号2)

核酸配列
1 GTAAAGATGG GGTTCATTT TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG 51 GGCTCAAGTG ATCTCTCTGT CTGTGCTCTC CAAGTGTGTG GGAATACAGG 101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCGTCTTTA CTTCATATGA CGGTCTAAT 151 TCTCCACAAT AACCCATATGA GACAGGTGCT ATCATTTGTCT TATTTTAGGG 201 ATGGA AAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAAGAC ACGGACAGAG TGGGATATGC 251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTT 301 GGCTTCTCTG ATAAACGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT 351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAAGATTTCT GTTCCCCCAC ATCACCGCGT 401 CCTTCTCTCT GCCCGATTTC CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT 451 GGAAGTCCCG CTATACAGGC CCCCAGATG GGGCTTGGAC GATGCTCTCT 501 GAGGCGCTTG TTGCTTCTGG CCGTGGAGCC AGCGCGGAA GCCTCCAGT 551 ACTGGGCGCG CCTTGAATAC TGGAAACCCAG ACAACAAGTG CTGACAGCAGC 601 TGCTTGCAAC GCTTGGGCGC GCCCCCTGCG CGGGAATATG AGTTCGCGGA 651 AAAGTGCAGG CTCAATGACC ACGGCGATTT CGTAAAGGCC CGGTTCGAAA 701 AGTGTCTCTC TGGGCGTGGC AACCCTGAGC GCGCGAGGCT ATGTAGCCCC 751 TGGCGGGCGG GAGCGGTGAC CCTACTCCCG GCCGCGGGCG GGGGAGAAAC 801 CCGCTGGCGG TGCAGAGAGA GCGCGGTCCC TGCAGAGGGG CACTGCCCCC 851 TCACACCTGG AAAACCGAGG CGCCCTAGCT CCAGAGAGCG CAGCTACCCA 901 GCAAGTTCCA TTGCTCTGGG GACCCCTGAG CCGTTCCTCT AGCAGGCTTG 951 GCCGAATTTT CTTCGCTCGG TGGTGGTGGC AAGGAGAGCC TCTGCTCCCT 1001 TGATAGCGAT CCTCTCTGTT ATCTCTCTCT GGCATCTCTG CTGGCCGAA 1051 GAGAAAGCCG ACCCCTATCT CTATCTCTGG TGTGCTGCGG GAGTCCGCCA 1101 CAGCCACACC CCTTCTCTCT GGCATCTCTG CTCCCGAGCG GCCCTGGAGA 1151 CAGGGGACAG ATGGAAGGAG GCTCTACTAT TTCACTCTCT GAGCGAGGAA 1201 CTGTCCAGTG CTGACTCACA ACCCCTGTCT CGCCTCTGGG ATGAGCTGGA 1251 GGTGCTGGAA GAGCTGATGT TACTGTGAGA CCTTGAGCCT GGGCAAGGTG 1301 GGGGTATGGC CATGGCAGT ACTGACACCT TGCGCGCAAG ATATGGGCTG 1351 CCGTCTGCGT GGTCCACCTT TGCCTATTGG CTGAGGCGGA GTGCGTGGCC 1401 GCTGCGGACT CTGATTTAGA TGGTGGTGGC AAGGAGAGCC TCTGCTCCCT 1451 TGCGCGAGCT CTGACACAGC CTGCGCCAGC TAGGGCGGGC AGATGAGAGT 1501 CGGGTCTGTG CCAGGCTTGG CTACTCTGGG GTTTGCTGGG CTTAACACCC 1551 AATAAAGAAC TTGCTGACTT ACTAGGCCA GTATACAATT AGCACTGAAG 1601 TACTTCTTGA AGTACAATCC TAATTGGGCA AAGACCCAAC AGATAGCCTC 1651 ACTGCTCTTC GCCCTAGA

アミノ酸配列

1 MGPGRCLLTA LLLLLALPPP EASQYCGRL EYWNPNKCCS SCLQRFGPPP
51 CPDYEFRENC GLNDHSDPVT PPRKCSGSG CNPDGAEKCS PCGGAVTPT
101 PAAGGGRTPW RCRERPEPAK GHCLPTGNP GAPSSQRRSS PASSIAWRPT
151 BPVPPQAWFN FLPLVLVLVL LTLAVIALLL FTLVHLCWP KEXADVPYVP
201 GLVCOVPNTH TPSSSHLSSP GALETGDTWK EASLLPLLR ELSSLASQPL
251 SRLDLDELVL ERLVLVLDLP PPGGGMAHG TTRHLAARYG LPAAMSTFAY
301 SLRPSRSLR ALIEMVARE PSASLGQLT HLAQLGRADA LRLSLKLGSS
351 GVCNA

【図 3】

FIGURE 3
ヒト MK61T3(hMK61T3)をコードするおよび
核酸配列 (配列番号5)アミノ酸配列 (配列番号6)

核酸配列
1 GTAAAGATGG GGTTCATTT TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG 51 GGCTCAAGTG ATCTCTCTGT CTGTGCTCTC CAAGTGTGTG GGAATACAGG 101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCGTCTTTA CTTCATATGA CGGTCTAAT 151 TCTCCACAAT AACCCATATGA GACAGGTGCT ATCATTTGTCT TATTTTAGGG 201 ATGGA AAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAAGAC ACGGACAGAG TGGGATATGC 251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTT 301 GGCTTCTCTG ATAAACGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT 351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAAGATTTCT GTTCCCCCAC ATCACCGCGT 401 CCTTCTCTCT GCCCGATTTC CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT 451 GGAAGTCCCG CTATACAGGC CCCCAGATG GGGCTTGGAC GATGCTCTCT 501 GAGGCGCTTG TTGCTTCTGG CCGTGGAGCC AGCGCGGAA GCCTCCAGT 551 ACTGGGCGCG CCTTGAATAC TGGAAACCCAG ACAACAAGTG CTGACAGCAGC 601 TGCTTGCAAC GCTTGGGCGC GCCCCCTGCG CGGGAATATG AGTTCGCGGA 651 AAAGTGCAGG CTCAATGACC ACGGCGATTT CGTAAAGGCC CGGTTCGAAA 701 AGTGTCTCTC TGGGCGTGGC AACCCTGAGC GCGCGAGGCT ATGTAGCCCC 751 TGGCGGGCGG GAGCGGTGAC CCTACTCCCG GCCGCGGGCG GGGGAGAAAC 801 CCGCTGGCGG TGCAGAGAGA ACTGTCCAGT CTGCGGTAC AACCCTGTCT 851 TGCCCTCTCT GATGAGCTGG AGGTGCTGGA AGAGCTGATT GTACTGTGG 901 ACCCTGAGCG TGGGCGAGGT GGGGGTATGG CCGATGGCAC TACTCGACAC 951 CTGGCCGCGA GATATGGGCT GCTTGTGCCC TGGTCCACCT TTGCTTATTC 1001 GCTGAGGCGG AGTGTCTGCG CGCTGCGGGC TCTGATTGAG ATGGTGGTGG 1051 CAAGGGAGCC CTCTGCTCC CTGGGCGAGG TTGCGACACA CCTCGCCAG 1101 CTAGGGCGGG CAGATGCATT GGGGGTGGTG TCCAAGCTTG GCTCATCTGG 1151 GGTTTGCTGG GCTTAAACCC CAATAAGAA CTTTGTCTGAC TACTAAGGCC 1201 AGTATACAA TTAGACTGAA GTACTCTTG AGATGACATC CTAATTGGGC 1251 AAGACCCCAA CAGATGACCT CACTGCTCTT GCGCCCTAGA

アミノ酸配列

1 MGPGRCLLTA LLLLLALPPP EASQYCGRL EYWNPNKCCS SCLQRFGPPP
51 CPDYEFRENC GLNDHSDPVT PPRKCSGSG CNPDGAEKCS PCGGAVTPT
101 PAAGGGRTPW RCRENCPRVR HNPCLASWMS RWCKWS*

【図 2】

FIGURE 2
ヒト MK61T2(hMK61T2)をコードする
核酸配列 (配列番号3) およびアミノ酸配列 (配列番号4)

核酸配列
1 GTAAAGATGG GGTTCATTT TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG 51 GGCTCAAGTG ATCTCTCTGT CTGTGCTCTC CAAGTGTGTG GGAATACAGG 101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCGTCTTTA CTTCATATGA CGGTCTAAT 151 TCTCCACAAT AACCCATATGA GACAGGTGCT ATCATTTGTCT TATTTTAGGG 201 ATGGA AAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAAGAC ACGGACAGAG TGGGATATGC 251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTT 301 GGCTTCTCTG ATAAACGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT 351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAAGATTTCT GTTCCCCCAC ATCACCGCGT 401 CCTTCTCTCT GCCCGATTTC CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT 451 GGAAGTCCCG CTATACAGGC CCCCAGATG GGGCTTGGAC GATGCTCTCT 501 GAGGCGCTTG TTGCTTCTGG CCGTGGAGCC AGCGCGGAA GCCTCCAGT 551 ACTGGGCGCG CCTTGAATAC TGGAAACCCAG ACAACAAGTG CTGACAGCAGC 601 TGCTTGCAAC GCTTGGGCGC GCCCCCTGCG CGGGAATATG AGTTCGCGGA 651 GAGCCTTGCT TGGGCGGAGC TTGACAGAGC CGTCTCTCTC CAAGGGGACG 701 TGCCCCCTCA CACTTGAAGA CCGGAGGCG CCTAGTCTCC AGGAGCGGAG 751 CTCACACAGA AGTTCCATAT CCGGAGGAGC CCTGAGGCTT GTCCTCTGAG 801 AGGCTTGCGC GAATTTCTCT CCGCTGTGG TGGTGTCTCT GCTCTTGAGC 851 TTGGCGGTGA TAGCGATCTC CTGTTTATT CTGCTCTGGC ATCTCTCTG 901 GCCCAAGGAG AAAGCCGACC CCTATCCCTA TCCTTGGCTTG GTCTTGGGAG 951 TCCCCACACG CACACCCCTT TCCTCTGCG ATCTGTCTGC CCCAGGCGCC 1001 CTGAGAGAG GGGACAGATG GAGGAGAGCT TCATCTATCT CACTCTGAG 1051 CAGGGAAGCT TCCAGTCTGG CTTCAACACC CCGTCTCTGC CTCTCTGAGT 1101 AGCTGGAGGT GCTGGAAGAG CTGATTGTAT TGGTGAACCC TGAGCCTGGG 1151 CCAGGTGGGG GTATGGGCCA TGGCACTACT GCACACCTGG CCGCAAGATA 1201 TGGGCTGGCT GCTGCTGAGT CCACCTTTGC CTATTCTGCT AGGCGAGTCT 1251 GCTGCGCGCT GCGGCTCTTG ATTGAGATGG TGGTGGCAAG GCGCGCTCTT 1301 GCCTCCCTGG GCCAGCTTGG CACACACCTC GCGGACGTAG GGGCGGACGA 1351 TGCAATTGGG GTGCTGTCCA AGCTTGGCTC ATCTGGGGTT TGCTGGCTCT 1401 AACACCCCAT AAGAACTTT GCTGACTACT AAGCCAGATA TACAATTAGC 1451 ACTGAAATAC TTCTTGAAT ACTATCTCTA TTGGGCAAGG ACCCAACAGA 1501 TAGCCTCACT GCTCTTCCGC CTAGA

アミノ酸配列

1 MGPGRCLLTA LLLLLALPPP EASQYCGRL EYWNPNKCCS SCLQRFGPPP
51 CPGENPRPSL AWAEIABAGP CQGALPHHTW KPRRP*

【図 4】

FIGURE 4
ヒト MK61T4(hMK61T4)をコードする
核酸配列 (配列番号7) およびアミノ酸配列 (配列番号8)

核酸配列
1 GTAAAGATGG GGTTCATTT TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG 51 GGCTCAAGTG ATCTCTCTGT CTGTGCTCTC CAAGTGTGTG GGAATACAGG 101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCGTCTTTA CTTCATATGA CGGTCTAAT 151 TCTCCACAAT AACCCATATGA GACAGGTGCT ATCATTTGTCT TATTTTAGGG 201 ATGGA AAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAAGAC ACGGACAGAG TGGGATATGC 251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTT 301 GGCTTCTCTG ATAAACGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT 351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAAGATTTCT GTTCCCCCAC ATCACCGCGT 401 CCTTCTCTCT GCCCGATTTC CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT 451 GGAAGTCCCG CTATACAGGC CCCCAGATG GGGCTTGGAC GATGCTCTCT 501 GAGGCGCTTG TTGCTTCTGG CCGTGGAGCC AGCGCGGAA GCCTCCAGT 551 ACTGGGCGCG CCTTGAATAC TGGAAACCCAG ACAACAAGTG CTGACAGCAGC 601 TGCTTGCAAC GCTTGGGCGC GCCCCCTGCG CGGGAATATG AGTTCGCGGA 651 GGAACATGG AGGAGGCGCT CACTACTTCC ACTCCTGAGC AGGGAACGTG 701 CAGCTTGGC GTACAAACC CTGTCTCGCC TCCTGGATGA GCTGGAGGTG 751 CTGGAAGAGC TGATTGTACT GCTGAGCCCT GAGCCTGGGC CAGGTGGGGG 801 TATGGCCCAT GGCATCTACT GACACTTGGC CGCAAGATAT GGTCTGTCTG 851 CTGCTGTGTC CACTGTGCT TATTGCTGCA GCGCGAGTGC CTGCGCGCTG 901 CGGGCTCTGA TTGAGATGGT GGTGGCAAGG GAGCCCTCTG CTTCTCTGGG 951 CCAGCTTGGC ACACACTTGC CCGAGCTAGG GCGGGCAAT GCAATTGGGG 1001 TGCTGTCCAA GCTTGGCTCA TCTGGGGTTT GCTGGGCTTA ACACCAATA 1051 AAGAACTTTG CTGACTACTA AGCCAGTAGT ACAATTAGCA CTGGAAGTACT 1101 TCTTGAAGTA CAATCTAAT TGGGCAAGA CCAACAGAT AGCCTCACTG 1151 CTCTTCGCCC TAGA

アミノ酸配列

1 MGPGRCLLTA LLLLLALPPP EASQYCGRL EYWNPNKCCS SCLQRFGPPP
51 CPGALETGDT WKEASLLPLL SRELSLASQ PLRLLLELE VLEELIVLDD
101 PEPGPGGGMA HGTTTHLAAR YGLPAWSTF AYSLRPSRSP LRALIEMVVA
151 REPASLGLQ LTHLAQLGRA DALVLSKLIG SSGVCWA*

【図 5】

FIGURE 5
ヒト MK61T5 (hMK61T5) をコードする
核酸配列 (配列番号9) およびアミノ酸配列 (配列番号10)。

核酸配列

```
1 GTAAAGATGG GGTTCATTT TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51 GGCTCAAGTG ATCTCTCTGT CTGTGCTTCC CAAAGTGTTG GGATTACAGG
101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTTA CTCTTAATGA CGGTTCTAAT
151 TCTCCACAAT AACCTTATGA GACAGGTGCT ATCATTTGCT TATTTTAGGG
201 ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGACAGAG TGGGATATGC
251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCTTAG TGGCCTTGTT
301 GCCTTCTCTG ATACCGGCT CAGTTGGGSG ATGAGGCTCT GGGGTAGAT
351 TCCGCGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAAATTT GTTCCCCAC ATACCCGCT
401 CCTTCTCTCT GCCGATTTTC CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451 GGAAGTCCCG CTATCAGCGC CCCCAGATG GGGCTTGGAC GATGCTCTCT
501 GACGCGCTTG TTGCTCTGCG CCTGGGCGCC ACCGCGCGAA GCCTCCAGT
551 ACTGCGCGCG CCTTGAATAC TGGAAACCAG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601 TGCCCTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCCCTGC CCGGAGGCGG GTCCCTGCCA
651 AGGGGACCTG CCCCCTCACA CTTGGAACCC CAGGCGCCCC TAGCTCCAG
701 GAGCUCAGCT CACCAGCAAG TTCCATTGCC TGGAGGACCC CTGAGCTGT
751 CCTCAGACAG GCTTGGCGGA ATTTCCTCCC GCTGTGTGIG CTGGTCTGTC
801 TCTGTACCTT GCGGTGATA GCGATCTCTC TGTATTCTCT GCTCTGGAT
851 CTCTGCTGGC CCAAGAGAAA AGCCGACCCC TATCCCTATC CTGGCTTGTT
901 CTGCGGAGTC CCAACACCCC ACACCCCTCT CTCTCTGAGT CTGTCTCTCC
951 CAGGCGCCCT GGAGACAGGG GACACATGGA AGGAGGCTCT ACTACTTCCA
1001 CTCTTGAGCA GGGAACTGTC CAGTCTGGCG TCACAAACCC TGTCTGCTCT
1051 CTTGAGTAGT CTGAGAGTGC TGGAGAGAGT GATTGTACTG CTGGAACCTG
1101 AGCCTGGGCC AGGTGGGGGT ATGGCCATAG GCACTACTCG ACACCTGGCC
1151 GCAAGATATG GGTGCTCTGC TGCTGTGTTCC ACCTTGTGCT ATTGCTGAG
1201 GCGAGGTGTC TGCCGCTGTC GGGCTCTGAT TGAAGTGTTG GTGGCAAGG
1251 AGCCCTCTGC CTCCCTGGGC CAGCTTGGCA CACACCTGCG CCAGCTAGGG
1301 CGGGCAGATG CATTTGCGGT GCTGTCCAAG CTGGCTCAT CTGGGGTTTG
1351 CTGGGCTTAA CACCAATAAA AGAACTTTGC TGACTACTAA GCCCAGTATA
1401 CAATTAGACG TGAAGTACTT CTTGAAGTAC AATCTTAATT GGGCAAGAC
1451 CCAACAGATA GCTTCACTGC TCTTGCCTCT AGA
```

アミノ酸配列

```
1 MGPGRCLLTA LLLLALAPP EASQYQGRLE YWNPDKKCS SCLQRFPPPP
51 CPEAGPQGA LPPHTMKPRR P*
```

【図 6】

FIGURE 6
ヒト MK61T6 (hMK61T6) をコードする
核酸配列 (配列番号11) およびアミノ酸配列 (配列番号12)。

核酸配列

```
1 GTAAAGATGG GGTTCATTT TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51 GGCTCAAGTG ATCTCTCTGT CTGTGCTTCC CAAAGTGTTG GGATTACAGG
101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTTA CTCTTAATGA CGGTTCTAAT
151 TCTCCACAAT AACCTTATGA GACAGGTGCT ATCATTTGCT TATTTTAGGG
201 ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGACAGAG TGGGATATGC
251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCTTAG TGGCCTTGTT
301 GGCTTCTCTG ATACCGGCT CAGTTGGGSG ATGAGGCTCT GGGGTAGAT
351 TCCGCGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAAATTT GTTCCCCAC ATACCCGCT
401 CCTTCTCTCT GCCGATTTTC CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451 GGAAGTCCCG CTATCAGCGC CCCCAGATG GGGCTTGGAC GATGCTCTCT
501 GACGCGCTTG TTGCTCTGCG CCTGGGCGCC ACCGCGCGAA GCCTCCAGT
551 ACTGCGCGCG CCTTGAATAC TGGAAACCAG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601 TGCCCTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCCCTGC CCGGAGGCGG GTCCCTGCCA
651 GTACAAACCC CTGCTCGGCC TCCCTGGATGA GCTGGAGGTG CTGGAAGAGC
701 TGATTGTACT GCTGGACCTC GAGCCTGGGG CAGGTGGGGG TATGGGCCAT
751 GGCCTACTC GACACCTGGC CGCAAGATAT GGGCTGCTGT GCGCTTGCTC
801 CACCTTTGCC TATTGCTTGA GGGCGAGTGC CTGCGCGCTG CGGGCTCTGA
851 TTGAGATGGT GTTGGCAAGG GAGCTCTCTG CTCTCTGGG CCACTTGGC
901 ACACACCTCG CCGAGTAGG GGGGCGAAT GCATGCGGG TCGTCTCAA
951 GCTTGGCTCA TCTGGGTTT GCTGGCTTGA ACACCAATA AAGAACTTTG
1001 CTGACTACTA AGCCAGTAT ACAATTAGCA CTGAGTACTT TCTTGAAGTA
1051 CAATCTTAAT TGGGCAAGA CCCAACAGAT AGCCTCACTG CTCTTCGCCC
1105 TAGA
```

アミノ酸配列

```
1 MGPGRCLLTA LLLLALAPP EASQYQGRLE YWNPDKKCS SCLQRFPPPP
51 CPELSSLASQ PLRLLDELE VLEELIVLD PEPGPGGMA HTTHRLAAR
101 YGLPAANSTF AYSLRPSRSP LRALIEMVVA REPSSASLQL GTHLQILGRA
151 DALRVLKSLG SSGVCWA*
```

【図 7】

Figure 7
マウスMK61 (mMK61: Smi12-0.0.0.51-F3) をコードする
核酸配列 (配列番号13) およびアミノ酸配列 (配列番号14)。

核酸配列

```
1 CGGACGCGTG GCGGAGCGCG TGGGTGGGTC TGCACTGAAA CAGTGTGGGT
51 GGAAGTGGTC ACAGCCCTCA AGCTGCAGGG TCTGTGAGA TGGGGCCAG
101 CTGGCTCTCT TGGACAGTGG CGGTGGCAGT GCTGCTCCTG ACCCGGGCTG
151 CGTCAATGGA AGCCTCTAGC TTCTGTGGCC ACCTTGAGTA CTGGAACCTG
201 GACAAGAGGT GCTGCAGCGG CTGCTGCAA CGCTTGGGCG CTCTGTCATG
251 TCCTGATCAC GAGTTCACGG AAAACTCGGG GCTCAATGAC TTGCGCGATA
301 CTGTAGCACA TCTTTTCAAA AAGTGTTCCT CTGGGTATTG CAACCCCAAT
351 GGCACAGAGC TGTGTAGCCA GTGTAGCAGC GGAGCGCGCG CAGCCCCAGC
401 TCACTGGGAG AGCCTTGSTA GAACCCACA CCACTGTAGA AAGAGCCCG
451 TCCCTCCCAA GGATGTCTST CTTCTTAAAC CTGAAGACGC AGTGTCTCTC
501 AGCTCACCTG GGAAGTGGAG CTTTGGGAG ACAACCAAGA ATGAGGTCTC
551 CAGCCGACCA GGTTTTGTCT CAGCCTCAGT GCTGCCCTCG GCAAGTGTTC
601 CACTGTGTCT GGTGTGCTCT CTGATATTGG CAGTGTCTCT GCTCTCTTTG
651 TTCAAGAGAA AAGTCCGCTC CCGTCTGTGT TCCAGCTCAG CTTTGGGAGA
701 TCCAGCAGCC TCTCTACATT ACTTGGCCCTG CCCAGGTACC CTGGAAGTAT
751 TGGAAAGTAG AAACAGAGGG AAAGCTAATC TGCTGCAGCT CTCAGGCTGG
801 GAGCTTCAGG GTCTGCTCTC TCAAGCCCTC TCCTCTCTGC TGGATGAGCT
851 GBAAGTCTGA GAGAGCTGA TTATCTATT GAACTCTGAG CTTGGGCCA
901 GCGGAGACAC GCTCTATGCT ACCACAACAC ACCTTGGCTG AAGATACGGG
951 CTGCTGACCA CTTGCTCTAC CTTCGCCCTAC TCACTTCGCG CCAAGTGCCTC
1001 ACCCTTGGCG GCCCTGATTG AGATGGTTGT GGCAAGGGAG CCTTCTGCTA
1051 CTCTGGGTGA ATTCGGCACA TATTTGCTCT AGCTAGGTGC CACAGATGCT
1101 CTGAGGTGTC TATCTAAACT TGGTGTGAGT AGAGTTTGCT GGGGCTTACT
1151 ACTCCATCAA TAAAGTTTCC CTTGAAGCCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
1201 AA
```

アミノ酸配列

```
1 MGPSWLLMTV AVAVILLTRA ASMEASSFCG HLEYWNSDKR CCSRLQRFQ
51 PPAFCPDHEFT ENCGLNDFGD TVAHFPFKCS PGYCNPNGTB LCSQCSSGAA
101 AAPAHVESPG RTHKQCRKKP VPPKDVCPKL PRDAGASSP GRWSLGGTTK
151 NEVAARRAS VEPKSKDTH TCPCPCAPEL LGQSPVFLFF PPKDLMIS
201 RTPEVTCVVV DVSHEDPRVK FNVVVDGVEV HNAKTPREE QVNSTYRVVS
251 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQRP EPQVYTLPPS
301 RDELKNOVS LTLVLKGPYV SDIAVEWRSN GQPNNNYKT PVLDSDSGF
FLSKLVTDK SRWQGNVFS CSMVHEALHN HYTKSLSLSS EGRKRASLHH
```

【図 8】

Figure 8
マウスmMK61-F融合ポリペプチド (mMK61-Fc) をコードする
核酸配列 (配列番号15) およびアミノ酸配列 (配列番号16)。

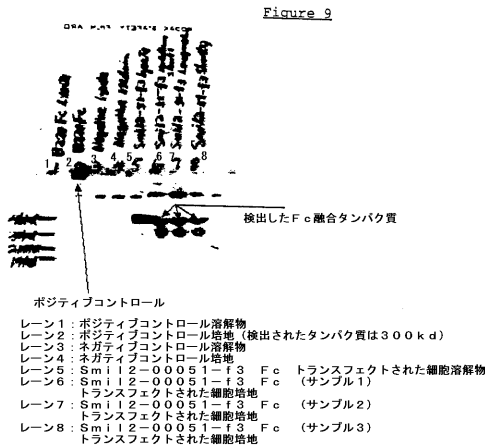
核酸配列

```
1 CCACCATGGG GCCACBCTGG CTCTCTGGA CAGTGGGGST GGCATGCTG
51 CTCTGACC GGCCTGCTC AATGGAAGGC TCTAGCTCT CTGGCCACTC
101 TGAGTACTGG AACTCTGACA AGAGGTGCTG CAGCCGCTGC TCGAAAGCT
151 TTGGGCTCCT TGCACTTCTT GATCAGAGT TCAAGGAAA CTGGGGCTG
201 AATGACTTGG GCGATACTGT AGCACATCTC TTCAAAAAGT GTTCCCTGG
251 GTATTGCAAC CCCAATGGCA CAGAGCTGTG TAGCAGTGT AGCAGCGAG
301 CCGCGCGAGC CCCAGCTCAC GTGGAGAGCC CTGGTAGAAC CCACAAAGCA
351 TGTAGAAAGA AGCCGCTCCC TCCCAAGGAT GTCTGTCTCT TTAACCTGA
401 AGACGAGGT GCCTCTAGCT CACCTGGGAG GTGGAGCTTT GGGCAGACAA
451 CCAAGATGA GTTCGCGGCC GCTGCTCTG CATCAGTACA GCCCAATCT
501 TGTGACAAA CTCACAGATG CCACTCTGC CAGACACTG AACTCTGGG
551 GGGACCTGA GTCTCTCT CTCCCCCAA ACCCAAGAC ACCCTATGA
601 TCTCCGGAC CCTTGAGTCT ACATGCGTGG TGTGTGACT GAGCAGCAA
651 GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACTGT GACGCGTGG AGGTGCATTA
701 TGCCAGACA AAGCGCGCGG AGGAGCAGTA CACAGCAGC TACCCTTGG
751 TCAGGTCTCT CACCTCTCTG CACCGAGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC
801 AAGTGGAAGG TCTCCACACA AGCCCTCCCA GCCCCATCG AGAAGACCAT
851 CTCCTAAGCC AAAGGGCAGC CCGAGAACCC ACAGTGTATC ACCTTCCCTC
901 CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACAGG TCAGCTCAGC CAGCTGTGTT
951 AAGGCTTCT ATCCACACA CATGCGCTVY GATGTGAGA GCAATGGGA
1001 GCGGAGAAC AACTACAGA CCAAGCTCTC GCTCTGAGC TCGACGCTC
1051 CCTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCTGGS ACAAGAGAC GTGCAGCAG
1101 GGGACGCTCT TCTCATGCTC CTGATGCTAT GAGGCTCTGC ACACACACTA
1151 CACGAGAGG AGCTCTCCC TGTCTCCGG TAAAGAGAA GCTATGCTCC
1201 ATCATCATCA TCATCATTGA TAAGTCAGC
```

アミノ酸配列

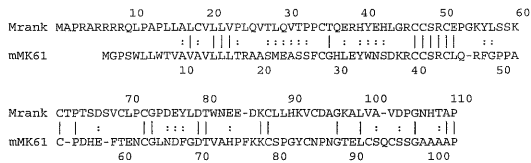
```
1 MGPSWLLMTV AVAVILLTRA ASMEASSFCG HLEYWNSDKR CCSRLQRFQ
51 PPAFCPDHEFT ENCGLNDFGD TVAHFPFKCS PGYCNPNGTB LCSQCSSGAA
101 AAPAHVESPG RTHKQCRKKP VPPKDVCPKL PRDAGASSP GRWSLGGTTK
151 NEVAARRAS VEPKSKDTH TCPCPCAPEL LGQSPVFLFF PPKDLMIS
201 RTPEVTCVVV DVSHEDPRVK FNVVVDGVEV HNAKTPREE QVNSTYRVVS
251 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQRP EPQVYTLPPS
301 RDELKNOVS LTLVLKGPYV SDIAVEWRSN GQPNNNYKT PVLDSDSGF
FLSKLVTDK SRWQGNVFS CSMVHEALHN HYTKSLSLSS EGRKRASLHH
HHHHH*
```

【図 9】



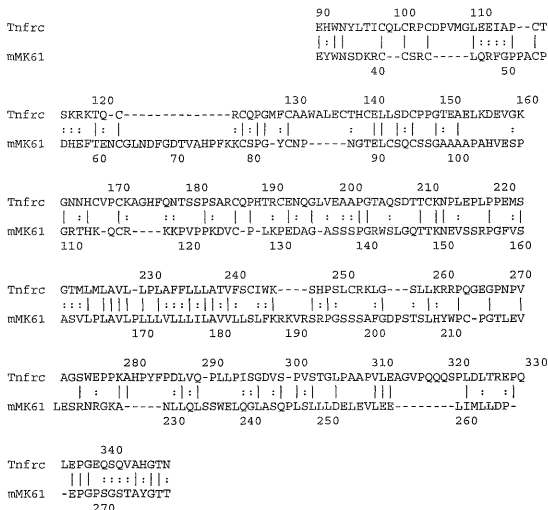
【図 10】

Figure 10
 mMK61アミノ酸配列 (配列番号14)、(mMK61) とOPGレセプター、
 Mrank、既知のTNFRファミリーメンバーのアミノ酸配列との比較



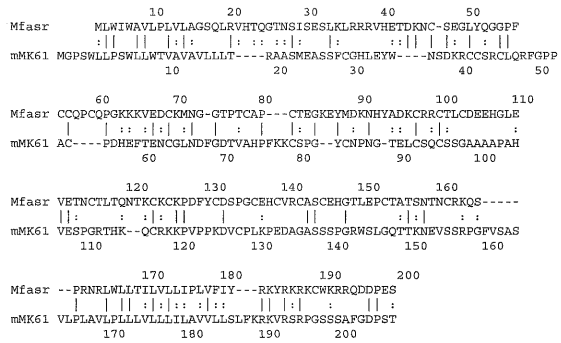
【図 12】

Figure 12
 mMK61アミノ酸配列 (配列番号14)、(mMK61) と、
 既知のマウスリンホトキシン-Bレセプター、Tnfrc (配列番号19)
 のアミノ酸配列との比較



【図 11】

Figure 11
 アミノ酸配列 (配列番号14)、(mMK61) と、FcγR1γレセプター、
 Mfascr (配列番号18) のアミノ酸配列との比較



【図 13】

Figure 13

ノーザンブロッティングによって決定された、ヒト組織における
 ヒトMK61 mRNA発現

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.



1. 脾臓
2. 胸腺
3. 胸腺髄質
4. 胸腺皮質
5. 胸腺髄質
6. 胸腺皮質
7. 結腸
8. 末梢血白血球

【図 14】

Figure 14

ノーザンブロッティングによって決定された、
 ヒトリンパ球組織におけるヒトMK61 mRNAの発現

1. 2. 3. 4. 5. 6.

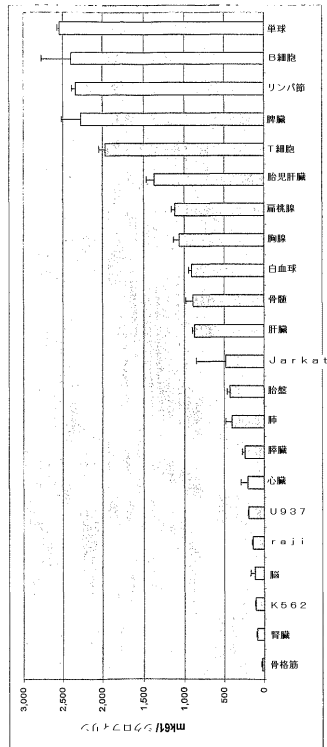


1. 脾臓
2. リンパ節
3. 胸腺
4. 末梢血白血球
5. 骨髄
6. 胎児肝臓

【図 15】

Figure 15

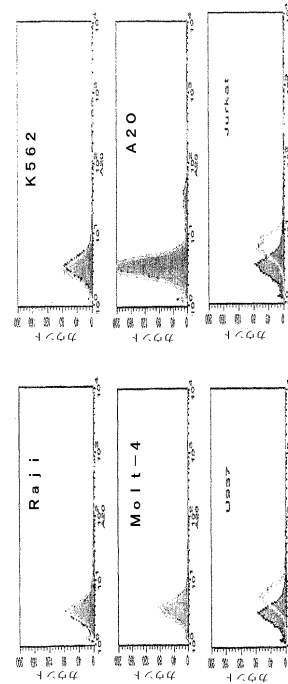
定量PCRによって決定された、ヒト組織および細胞株における
hMK61 mRNA発現



【図 16】

Figure 16

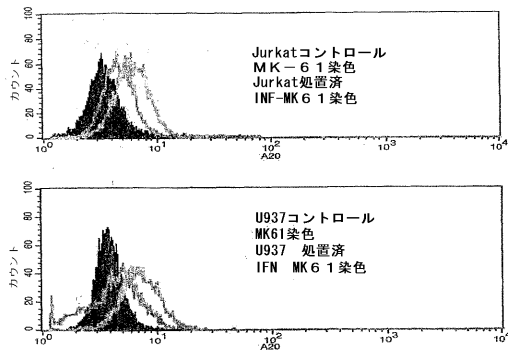
FACS分析によって決定された、細胞株に対するMK61-Fc結合



【図 17】

Figure 17

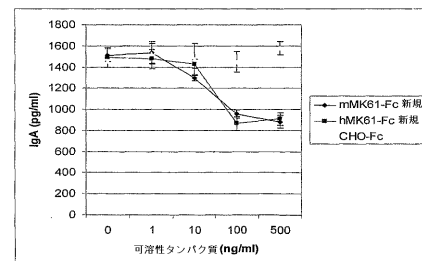
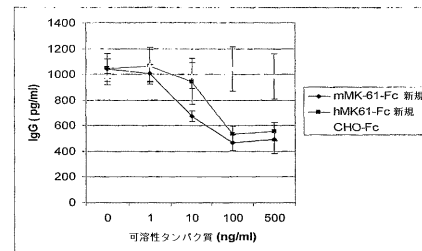
FACS分析によって決定した、インターフェロンでの事前処理を行った単球およびT細胞、
および事前処理していない単球およびT細胞へのMK61-Fcの結合



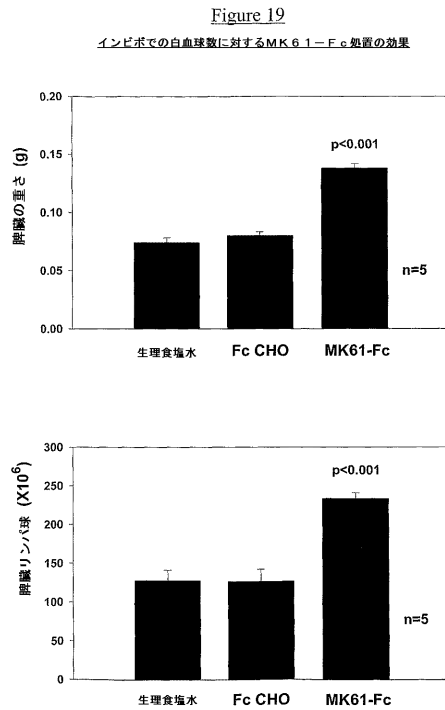
【図 18】

Figure 18

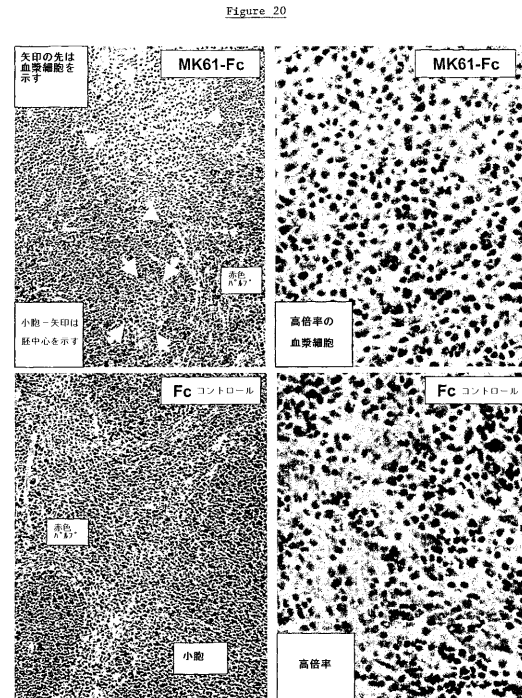
マウスの脾臓培養物中のLPS (150 ng/ml) で誘導したIgGおよびIgAの
減少に対するMK61-Fcの効果



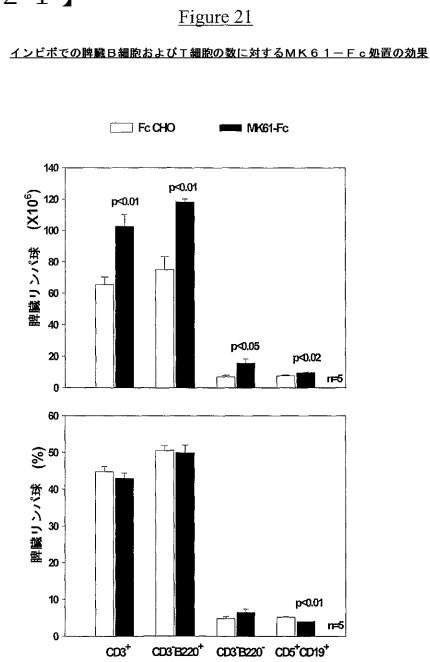
【図 19】



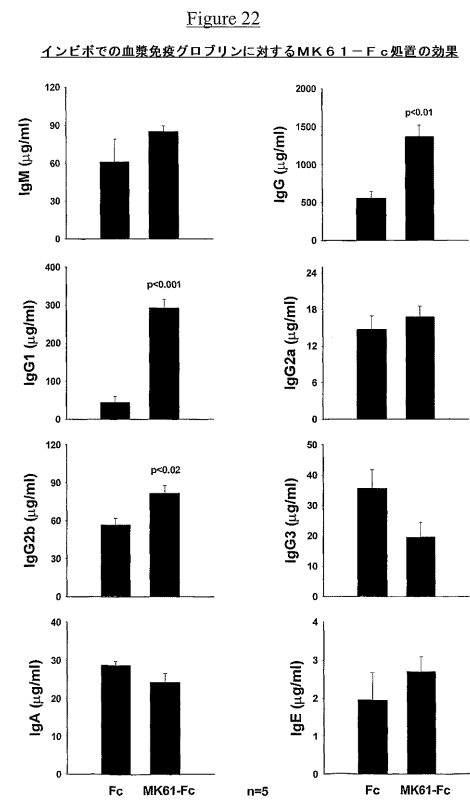
【図 20】



【図 21】

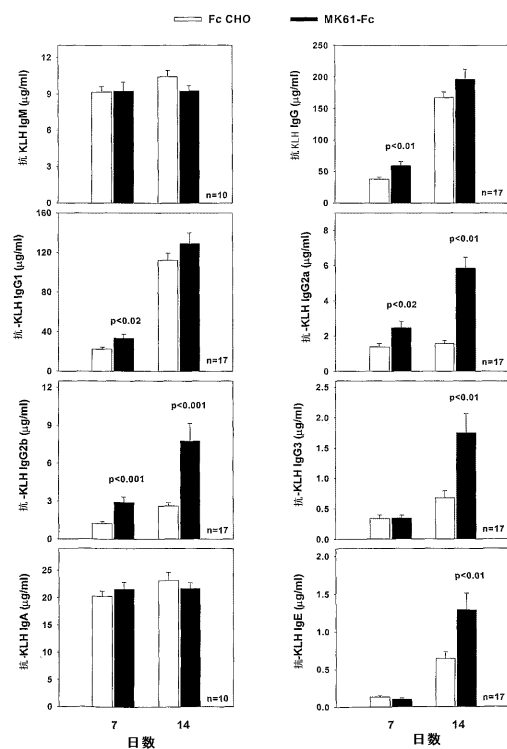


【図 22】



【図 23】

Figure 23
インビオでの抗KLH特異的抗体の作成に対する
MK61-Fcの効果



【図 24】

Figure 24
F-TMK61-ΔFc-CHOの7ミ/複製型

MGPRCLLTA LLLALAPP EASQYCGRL EYWNPDNKKCS SCLQRFGPP
CPDYEFENC GLNDHGFVT PPRKSSGQ CNPDGAELCS PCGGAVTPT
PAAAGGRTPW RCRRPVPK GHPLTPGNP GAPSSQERS PASSIAWRTP
EPVDKTHTCP PCAPPELLGG PSVFLPPKP KDTLMISRT EYTCVVDVS
HEDPEVKENW YVDGVEVHNA KTKPREQYN STYRVSVLT VHQDWLNGK
EYCKVSNKA LPAPKEKIS KAKGPREFQ VYTLPPSRDE LTKNOVSLTC
LYKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPV LDSDSGFILY SKLTYDKSRW
QQGNVFCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

【図 25】

Figure 25
F-TMK61-ΔFc-CHOの7ミ/複製型

MGPSWLLWTV AVAVLLITRA ASMEASSFCG HLEYWNSDKR CCSRLQRFQ
PPACPDHFT ENCLNDFGD TVAHFVKCS PGYCNPNNGTE LCSQSSGAA
AAPAHVESP RTHKQCRKRP VPKDVCPLK PEDAGASSP GRWSLGOTTK
NEVDKTHTCP PCAPPELLGG PSVFLPPKP KDTLMISRT EYTCVVDVS
HEDPEVKENW YVDGVEVHNA KTKPREQYN STYRVSVLT VHQDWLNGK
EYCKVSNKA LPAPKEKIS KAKGPREFQ VYTLPPSRDE LTKNOVSLTC
LYKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPV LDSDSGFILY SKLTYDKSRW
QQGNVFCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/20762 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/00 (74) Agents: BORUN, Michael, F. et al., Marshall, Gerstein & Borun, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606-6402 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/27631
- (22) International Filing Date: 5 September 2001 (05.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/230,191 5 September 2000 (05.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): THEILL, Lars, Eyde [US/US]; 1874 Calle Borrego, Thousand Oaks, CA 91360 (US); YEH, Richard [US/US]; 624 Hawthorne Avenue, Apt. 4P1C, Princeton, NY 08540 (US); SILBIGER, Scott, Michael [US/US]; 21520 Burbank Blvd., #301 (US); YU, Gang [CN/US]; 3924 Rodene Street, Thousand Oaks, CA 91320 (US); SENALDI, Giorgio [IT/US]; 2846 White Ridge Place #24, Thousand Oaks, CA 91362 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/20762 A2

(54) Title: TNF RECEPTOR-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: Novel MK61 polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides vectors, host cells, selective binding agents, and methods for producing MK61 polypeptides. Also provided are methods for the treatment, diagnosis, amelioration, or prevention of diseases with MK61 polypeptides.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

TNF RECEPTOR-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

This application claims benefit of U.S. provisional application 60/230,191 filed September 5, 2000, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Field of the Invention

The present invention relates to novel TNF receptor (TNFr)-like polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same, termed "MK61" herein.

The invention also relates to vectors, host cells, pharmaceutical compositions, selective binding agents and methods for producing MK61 polypeptides. Also provided for are methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases associated with MK61 polypeptides.

Background of the Invention

Technical advances in identification, cloning, expression and manipulation of nucleic acid molecules and deciphering of the human genome have greatly accelerated discovery of novel therapeutics based upon deciphering of the human genome. Rapid nucleic acid sequencing techniques can now generate sequence information at unprecedented rates and, coupled with computational analyses, allow the assembly of overlapping sequences into the partial and entire genomes as well as identification of polypeptide-encoding regions. A comparison of a predicted amino acid sequence against a database compilation of known amino acid sequences allows one to determine the extent

WO 02/20762

PCT/US01/27631

of homology to previously identified sequences and/or structural landmarks. The cloning and expression of a polypeptide-encoding region of a nucleic acid molecule provides a polypeptide product for structural and functional analyses. The manipulation of nucleic acid molecules and encoded polypeptides to create variant and derivatives thereof may confer advantageous properties on a product for use as a therapeutic.

In spite of significant technical advances in genome research over the past decade, the potential for development of novel therapeutics based on the human genome is still largely unrealized. Many genes encoding potentially beneficial polypeptide therapeutics or those encoding polypeptides, which may act as "targets" for therapeutic molecules, have still not been identified.

Accordingly, it is an object of the invention to identify novel polypeptides, and nucleic acid molecules encoding the same, which have diagnostic or therapeutic benefit.

After years of study in necrosis of tumors, tumor necrosis factors (TNFs) α and β were finally cloned in 1984. The ensuing years witnessed the emergence of a superfamily of TNF cytokines, including fas ligand (FasL), CD27 ligand (CD27L), CD30 ligand (CD30L), CD40 ligand (CD40L), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL, also designated AGP-1), osteoprotegerin binding protein (OPG-BP or OPG ligand), 4-1BB ligand, LIGHT, APRIL, and TALL-1. Smith et al. (1994), *Cell*, 76: 959-962; Lacey et al. (1998), *Cell*, 93: 165-176; Chichepotiche et al. (1997), *J. Biol.*

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Chem., 272: 32401-32410; Mauri et al. (1998), *Immunity*,
 8: 21-30; Hahne et al. (1998), *J. Exp. Med.*, 188: 1185-
 90; Shu et al. (1999), *J. Leukocyte Biology*, 65: 680-3.
 This family is unified by its structure, particularly
 5 at the C-terminus. In addition, most members known to
 date are expressed in immune compartments, although
 some members are also expressed in other tissues or
 organs, as well. Smith et al. (1994), *Cell* 76: 959-62.
 All ligand members, with the exception of LT- α , are
 10 type II transmembrane proteins, characterized by a
 conserved 150 amino acid region within C-terminal
 extracellular domain. Though restricted to only 20-25%
 identity, the conserved 150 amino acid domain folds
 into a characteristic β -pleated sheet sandwich and
 15 trimerizes. This conserved region can be proteolytically
 released, thus generating a soluble functional form.
 Banner et al. (1993), *Cell*, 73: 431-445.

Many members within this ligand family are
 expressed in lymphoid enriched tissues and play
 20 important roles in the immune system development and
 modulation. Smith et al. (1994). For example, TNF α is
 mainly synthesized by macrophages and is an important
 mediator for inflammatory responses and immune
 defenses. Tracey & Cerami (1994), *Annu. Rev. Med.*, 45:
 25 491-503. Fas-L, predominantly expressed in activated T
 cell, modulates TCR-mediated apoptosis of thymocytes.
 Nagata et al. (1995) *Immunology Today*, 16:39-43;
 Castrim et al. (1996), *Immunity*, 5:617-27. CD40L, also
 expressed by activated T cells, provides an essential
 30 signal for B cell survival, proliferation and
 immunoglobulin isotype switching. Noelle (1996),
Immunity, 4: 415-9.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

The cognate receptors for most of the TNF ligand family members have been identified. These receptors share characteristic multiple cysteine-rich repeats within their extracellular domains, and do not possess catalytic motifs within cytoplasmic regions. Smith et al. (1994) . Two subgroups of TNFR homologues: Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5, and DR6 contains intracellular death domain which bind TRAD or FADD. This leads to activation of caspase 8 and apoptosis. Locksley et al. (2001) *Cell* 104: 487-501. However, signaling through death-receptors can also be required for proliferation of hepatocytes and T cells. Strasser et al., (1999) *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 533-537, Yamada et al. (1997), *Proc. Natl. Acad. Of Sci. U.S.A.*, 94: 1441-6.. The other group including TNFR2, CD40, or CD30 bind TNF-Receptor Associated Factors (TRAFs), molecular adapters that couple these surface receptors to downstream signaling cascades. This leads to activation of JNK and NFkB which can promote cell growth and survival. These proteins therefore play critical roles in morphogenesis, the control of apoptosis, differentiation, or proliferation. TNF/TNFR superfamily proteins are now extensively studied as targets for therapies against many human diseases such as atherosclerosis, allograft rejection, arthritis, and cancer. Locksley et al. (2001), Williams et al. (2000), *Ann. Rheum. Dis.* 59: 175-80.

In addition to the membrane associated receptor molecules described above, a number the receptors belonging to the TNF-receptor supergene family exist as soluble ligand binding proteins. Many of the soluble forms of the transmembrane receptors

WO 02/20762

PCT/US01/27631

were subsequently identified as containing only the extracellular ligand binding domain(s) of the receptors. For example, a soluble form of TNF receptor has been found in urine and serum (see U.S. Patent No.: 5, 843,789 and Nophar et al., *EMBO J.*, 9(10):3269-3278, 1990), and have been shown to arise by proteolytic cleavage of cell surface TNF-receptors (Wallach et al., *Agents Actions Suppl.*, 35:51-57, 1991). These soluble forms of receptor molecules have been implicated in the modulation of TNF activity by not only interfering with TNF binding to its receptor, but also by stabilizing the TNF structure and preserving its activity, thus prolonging some of its effects (Aderka et al, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7(3):231-240, 1996).

Members of the tumor necrosis factor superfamilies of ligands and cell-surface receptors regulate immune function and most TNF/TNFR superfamily proteins, such as FASL/FAS, CD40L/CD40, TNF/TNFR, or LT β /LT β R to name a few, are expressed in the immune system, where the coordinate immune cell homeostasis, activation induced cell death, T cells priming, functions and survival of dendritic cells, or the formation of germinal centers and lymphoid organs such as Peyer's patches and lymph nodes. Fu et al. (1999), *Ann. Rev. Immunol.* 17: 399-433, Grewal et al. (1998), *Ann. Rev. Immunol.* 16: 111-135. Recently, novel members of this large families have been identified that have critical functions in immunity and couple lymphoid cells with other organ systems such as bone morphogenesis and mammary gland formation in pregnancy.

Because of the crucial role that members of the TNF family of ligands and their receptors

WO 02/20762

PCT/US01/27631

(membrane-associated and soluble) play in the immunological system and in a variety of disease processes, a need exists to identify and characterize novel members of these families, for use to improve
 5 diagnosis and therapy.

Summary of the Invention

The present invention relates to novel MK61 nucleic acid molecules and encoded polypeptides.

10 In accordance with the invention, a number of human MK61 isoforms are described herein: "hMK61T1", "hMK61T2", "hMK61T3", "hMK61T4", "hMK61T5", and "hMK61T6". Additionally, a mouse isoform ("mMK61") and an Fc-fusion polypeptide thereof ("mMK61-Fc" and
 15 "hMK61-Fc") are described herein.

The invention provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) the nucleotide sequence as set
 20 forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15;

(b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, 25 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(c) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of (a) or (b), wherein the
 30 encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14,
or SEQ ID NO:16; and

(d) a nucleotide sequence complementary
to any of (a) through (c).

5 The invention also provides for an isolated
nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence
selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a
polypeptide that is at least about 70, 75, 80, 85, 90,
10 95, 96, 97, 98 or 99 percent identical to the
polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4,
SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12,
SEQ ID NO:14, OR SEQ ID NO:16, wherein the encoded
polypeptide has an activity of the polypeptide as set
15 forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID
NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ
ID NO:16;

(b) a nucleotide sequence encoding an
allelic variant or splice variant of the nucleotide
20 sequence as set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ
ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID
NO:13, or SEQ ID NO:15, wherein the encoded polypeptide
has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ
ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID
25 NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(c) a nucleotide sequence of SEQ ID
NO:1, (a), or (b) encoding a polypeptide fragment of at
least about 25 amino acid residues, wherein the
polypeptide has an activity of the polypeptide as set
30 forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID
NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ

WO 02/20762

PCT/US01/27631

ID NO:16;

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that has at least one amino acid substitution and/or deletion of the amino sequence set forth in any of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(e) a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or (a)-(d) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(f) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a)-(e), wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, OR SEQ ID NO:16; and

(g) a nucleotide sequence complementary to any of (a)-(e).

The invention further provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide

WO 02/20762

PCT/US01/27631

as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6,
SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14,
or SEQ ID NO:16;

(b) a nucleotide sequence encoding a
5 polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4,
SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12,
SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one amino
acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an
activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID
10 NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID
NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(c) a nucleotide sequence encoding a
polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4,
SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12,
15 SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one amino
acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an
activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID
NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID
NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(d) a nucleotide sequence encoding a
20 polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4,
SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12,
SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 which has a C- and/or N-
terminal truncation, wherein the encoded polypeptide
25 has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ
ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID
NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(e) a nucleotide sequence encoding a
polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4,
30 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12,
SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one

WO 02/20762

PCT/US01/27631

modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(f) a nucleotide sequence of (a)-(e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a)-(f), wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16; and

(h) a nucleotide sequence complementary to any of (a)-(e).

The invention also provides for an expression vector comprising the isolated nucleic acid molecules set forth herein; recombinant host cells (eukaryotic and/or prokaryotic) that comprise the vector; the process for producing a h2520 polypeptide comprising culturing the host cell under suitable conditions to express the polypeptide and optionally isolating the polypeptide from the culture; and the isolated polypeptide produced by this process. The nucleic acid molecule used in this process may also comprise promoter DNA other than the promoter DNA for the native MK61 polypeptide operatively linked to the nucleotide sequence encoding the MK61 polypeptide.

The invention also provides for a nucleic

WO 02/20762

PCT/US01/27631

acid molecule as described in the previous paragraphs wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

The present invention provides a process for identifying candidate inhibitors and/or stimulators of MK61 polypeptide activity or production comprising exposing a host cell to the candidate inhibitors and/or stimulators, measuring MK61 polypeptide activity or production in the host cell, and comparing this activity with control cells (i.e., cells not exposed to the candidate inhibitor and/or stimulator). In a related aspect, the invention provides for the inhibitors and/or stimulators identified by any of the preceding methods.

The invention also provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 or SEQ ID NO: 16.

The invention also provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the mature amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, and optionally further comprising an amino-terminal methionine;

(b) an amino acid sequence for an ortholog of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or

WO 02/20762

PCT/US01/27631

SEQ ID NO:16, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

5 (c) an amino acid sequence exhibits at least about 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 or 99 percent identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16,
10 wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 as determined using a computer program selected from the group consisting of
15 GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit and the Smith-Waterman algorithm.;

(d) a fragment of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 comprising at least about 25
20 amino acid residues, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16; and

25 (e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of either the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, or at least one of (a)-
30 (c) wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

The invention further provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

- 5 (a) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;
- 15 (b) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;
- 20 (c) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;
- 25 (d) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ

WO 02/20762

PCT/US01/27631

ID NO:16 which has a C- and/or N-terminal truncation,
wherein the polypeptide has an activity of the
polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4,
SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12,
5 SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16; and

(e) the amino acid sequence as set
forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID
NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ
ID NO:16, with at least one modification selected from
10 the group consisting of amino acid substitutions, amino
acid insertions, amino acid deletions, C-terminal
truncation, and N-terminal truncation, wherein the
polypeptide has an activity of the polypeptide as set
forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID
15 NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ
ID NO:16.

Analogues of MK61 are provided for in the present
invention which result from conservative and non-
conservative amino acid substitutions of the MK61
20 polypeptide of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:
6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID
NO:14, or SEQ ID NO:16. Such analogues include a MK61
polypeptide wherein the amino acid corresponding to
position 38, 39 or 51 of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10 or
25 12 is cysteine, serine or alanine; a MK61 polypeptide
wherein the amino acid corresponding to position 60 or
76 of SEQ ID NOS: 2 or 6 is cysteine, serine or alanine
a MK61 polypeptide wherein the amino acid corresponding
to position 41, 42, 54, 63 or 79 of SEQ ID NOS: 14 or
30 16 is cysteine, serine or alanine; a MK61 polypeptide
wherein the amino acid corresponding to position 171 or
172 of SEQ ID NO: 2 is leucine, norleucine, valine,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

methionine, alanine or phenylalanine; a MK61 polypeptide wherein the amino acid corresponding to position 178 or 180 of SEQ ID NOS: 14 or 16 is leucine, norleucine, valine, methionine, alanine or

5 phenylalanine; a MK61 polypeptide wherein the amino acid corresponding to position 141 of SEQ ID NOS: 14 or 16 is glycine, proline or alanine.

The invention also provides methods of inhibiting MK61 receptor and/or ligand activity in a

10 mammal, which comprises administering at least one polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

Also provided are fusion polypeptides

15 comprising the amino acid sequences of (a)-(e) above. In addition, the invention encompasses fusion polypeptides comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 36 and SEQ ID NO: 39.

The present invention also provides for an

20 expression vector comprising the isolated nucleic acid molecules as set forth herein, recombinant host cells comprising recombinant nucleic acid molecules as set forth herein, and a method of producing an MK61 polypeptide comprising culturing the host cells and

25 optionally isolating the polypeptide so produced.

A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding an MK61 polypeptide is also encompassed by the invention. The MK61 nucleic acid molecules are introduced into the animal in a

30 manner that allows expression and increased levels of the MK61 polypeptide, which may include increased

WO 02/20762

PCT/US01/27631

circulating levels. The transgenic non-human animal is preferably a mammal.

Also provided are derivatives of the MK61 polypeptides of the present invention.

5 The present invention further provides for an antibody or fragment thereof that specifically binds an MK61 polypeptide as set forth herein. This antibody can be polyclonal or monoclonal, and can be produced by immunizing an animal with a peptide comprising an amino
10 acid sequence of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, or SEQ ID NO: 16.

Also provided is the hybridoma that produces a monoclonal antibody that binds to a peptide
15 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 2

The present invention also provides for a method of detecting or quantitating the amount of MK61 polypeptide in a sample comprising contacting a sample suspected of containing MK61 polypeptide with the anti-
20 MK61 antibody or antibody fragment set forth herein and detecting the binding of said antibody or antibody fragment.

Additionally provided by the invention are selective binding agents or fragments thereof that are
25 capable of specifically binding the MK61 polypeptides, derivatives, variants, and fragments (preferably having sequences of at least about 25 amino acids) thereof. These selective binding agents may be antibodies such as humanized antibodies, human
30 antibodies, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies, complementarity determining region (CDR)-grafted antibodies, anti-

WO 02/20762

PCT/US01/27631

idiotypic antibodies, and fragments thereof.

Furthermore, the selective binding agents may be antibody variable region fragments, such as Fab or Fab' fragments, or fragments thereof, and may comprise at

5 least one complementarity determining region with specificity for a MK61 polypeptide set forth herein. The selective binding agent may also be bound to a detectable label, such as a radiolabel, a fluorescent label, an enzyme label, or any other label known in the art. Further, the selective binding agent may
10 antagonize MK61 polypeptide biological activity, and/or be produced by immunizing an animal with a MK61 polypeptide as set forth herein.

The present invention also provides for a
15 hybridoma that produces a selective binding agent capable of binding MK61 polypeptide as set forth herein.

Also provided is a method for treating, preventing, or ameliorating a disease, condition, or
20 disorder comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent as set forth herein. An effective amount, or a therapeutically effective amount, is an amount sufficient to result in a detectable change in the
25 course or magnitude of the disease, condition or disorder, such as the intensity or duration of presentment of any symptom associated therewith.

Pharmaceutical compositions comprising the above-described nucleic acid molecules, polypeptides or
30 selective binding agents and one or more pharmaceutically acceptable formulation agents are also encompassed by the invention. The pharmaceutical

WO 02/20762

PCT/US01/27631

acceptable formulation agent may be a carrier, adjuvant, soubilizer, stabilizer, or anti-oxidant. The nucleic acid molecules of the present invention may be contained in viral vectors. The compositions are used to provide therapeutically effective amounts of the nucleic acid molecules or polypeptides of the present invention. The invention is also directed to methods of using the polypeptides, nucleic acid molecules, and selective binding agents.

Also provided are derivatives of the MK61 polypeptides of the present invention. These polypeptides may be covalently modified with a water-soluble polymer wherein the water-soluble polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols, and polyvinyl alcohol.

The present invention also provides for fusion polypeptides comprising the polypeptide sequences set forth herein fused to a heterologous amino acid sequence, which may be an IgG constant domain or fragment thereof.

Methods for treating, preventing or ameliorating a medical condition, such as cancer, in a mammal resulting from decreased levels of MK61 polypeptide are also included in the present invention. These methods include administering to a patient a therapeutically effective amount of an antagonist selected from the group consisting of selective binding agents, small molecules, peptides, peptide derivatives and antisense oligonucleotides. These medical

WO 02/20762

PCT/US01/27631

conditions may include those characterized by immune system stimulation such as autoimmune diseases and leukemias and lymphomas.

Methods for treating, preventing or
5 ameliorating a medical condition in a mammal resulting from increased levels of MK61 polypeptide are also included in the present invention. These methods comprise administering to a patient a therapeutically effective amount of a MK61 polypeptide; a nucleic acid
10 molecule encoding a MK61 polypeptide; or a nucleic acid molecule comprising elements that regulate or modulate the expression of a MK61 polypeptide. Examples of these methods include gene therapy and cell therapy and are further described herein. These medical conditions
15 may include those characterized by immune system suppression such as AIDs and cancers.

The invention encompasses methods of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject caused by or
20 resulting from abnormal levels of MK61 polypeptide comprising determining the presence or amount of expression of the MK61 polypeptide in a biological, tissue, or cellular sample; and comparing the level of said polypeptide in a biological, tissue, or cellular
25 sample from either normal subjects or the subject at a different time, wherein susceptibility to a pathological condition is based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

The MK61 polypeptides and nucleic acid
30 molecules of the present invention may be used to treat, prevent, ameliorate and/or detect diseases and disorders, including those recited herein.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

The present invention also provides a method of identifying compounds which bind to a MK61 polypeptide. The method comprises contacting an MK61 polypeptide with a test molecule and determining the extent of binding of the test molecule to the polypeptide. The method may further comprise determining whether such test molecules are agonists or antagonists of an MK61 polypeptide. The present invention further provides a method of testing the impact of molecules on the expression of an MK61 polypeptide or on the activity of an MK61 polypeptide.

Methods of regulating expression and modulating (i.e., increasing or decreasing) levels of an MK61 polypeptide are also encompassed by the invention. One method comprises administering to an animal a nucleic acid molecule encoding an MK61 polypeptide. In another method, a nucleic acid molecule comprising elements that regulate or modulate the expression of an MK61 polypeptide may be administered. Examples of these methods include gene therapy, cell therapy and anti-sense therapy as further described herein.

The present invention further provides a method of modulating levels of a MK61 polypeptide in an animal comprising administering to the animal the nucleic acid molecule set forth herein.

A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding a MK61 polypeptide is also encompassed by the invention. The MK61 nucleic acid molecule is introduced into the animal in a manner that allows expression and increased levels of the MK61 polypeptide, which may include increased circulating

WO 02/20762

PCT/US01/27631

levels. The transgenic non-human animal is preferably a mammal.

The present invention provides for a diagnostic reagent comprising a detectably labeled polynucleotide encoding the amino acid sequence set out in SEQ ID NO: 2, or a fragment, variant or homolog thereof, including allelic variants and spliced variants thereof. The detectably labeled polynucleotide may be a first-strand cDNA, DNA, or RNA.

10 The invention also provides a method for detecting the presence of MK61 nucleic acid molecules in a biological sample comprising the steps of:

- (a) providing a biological sample suspected of containing MK61 nucleic acid molecules;
- 15 (b) contacting the biological sample with a diagnostic reagent under conditions wherein the diagnostic reagent will hybridize with MK61 nucleic acid molecules contained in said biological sample;
- (c) detecting hybridization between
- 20 MK61 nucleic acid molecules in the biological sample and the diagnostic reagent; and
- (d) comparing the level of hybridization between the biological sample and diagnostic reagent with the level of hybridization
- 25 between a known concentration of MK61 nucleic acid molecules and the diagnostic reagent.

The invention also provides a method for detecting the presence of MK61 nucleic acid molecules in a tissue or cellular sample comprising the steps of:

- 30 (a) providing a tissue or cellular sample suspected of containing MK61 nucleic acid molecules;
- (b) contacting the tissue or cellular

WO 02/20762

PCT/US01/27631

sample with a diagnostic reagent under conditions wherein the diagnostic reagent will hybridize with MK61 nucleic acid molecules;

- (c) detecting hybridization between
5 MK61 nucleic acid molecules in the tissue or cellular sample and the diagnostic reagent; and
- (d) comparing the level of
hybridization between the tissue or cellular sample and
diagnostic reagent with the level of hybridization
10 between a known concentration of MK61 nucleic acid
molecules and the diagnostic reagent.

The invention provides for methods of inhibiting MK61 receptor activity in a mammal comprising administering at least one of the amino acid
15 sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 36 and 38.

The invention provides for methods of inhibiting MK61 ligand activity in a mammal comprising administering at least one of the amino acid sequences
20 selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 36 and 38.

The invention provides for methods of stimulating an immune response in a mammal by administering a negative regulator of MK61 receptor
25 signaling. A negative regulator is a molecule which inhibits the signaling of the MK61 receptor. Negative regulators include but are not limited to fusion proteins, such as those set out in SEQ ID NOS: 16, 36 and 39, antibodies, small molecules, peptides and
30 peptide derivatives.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

The invention also provides for methods of inhibiting an immune response comprising administering a positive regulator or MK61 receptor signaling. A positive regulator is a molecule which activates the signaling of MK61 receptor. Positive regulators include MK61 ligands and agonistic antibodies.

The invention provides for methods of stimulating reverse signaling through a cell surface bound MK61 ligand comprising a positive regulator of MK61 ligand reverse signaling. The positive regulators include but are not limited to MK61 fusion proteins, antibodies, small molecules and peptide derivatives. The term "reverse signaling" refers to activation of cellular signaling induced by a molecule binding to a cell surface bound ligand such as binding by the ligand's receptor or an anti-ligand antibody.

The invention also provides for methods of inhibiting reverse signaling through a cell surface bound MK61 ligand comprising a negative regulator of MK61 ligand reverse signaling. The negative regulators include but are not limited to MK61 fusion proteins, antibodies, small molecules and peptide derivatives.

The invention provides for methods of treating a B cell or T cell lymphoproliferative disorder, an autoimmune disease or an inflammatory disease in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of MK61-Fc fusion protein, an anti-MK-61 antibody, an antisense oligonucleotide, a MK61 ligand, or a anti-MK61 ligand antibody to said mammal. The lymphoproliferative diseases that may be treated include but are not limited to myeloma; B lymphoma, leukemia; and non-

WO 02/20762

PCT/US01/27631

hodgkins lymphoma. The autoimmune diseases include but are not limited to rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, intestinal bowel disease and Crohn's Disease. The inflammatory diseases include but are not
5 limited to rheumatoid arthritis, sepsis, intestinal bowel disease and Crohn's Disease.

The invention also encompasses a polypeptide fragment having an amino acid sequence comprising the cysteine rich domain residues 26-60 of SEQ ID NO: 36.
10 The cysteine rich domain matches the TNFR superfamily cysteine-rich region signature as defined in Madry et. al (Intl. Immunol. 10:1693-1702, 1998) and references therein and is expected to encompass the MK61 ligand-binding domain.

15 The MK61 polypeptides can be used for identifying ligands thereof. Various forms of "expression cloning" have been used for cloning ligands for receptors, see e.g., Davis et al., Cell, 87:1161-1169 (1996). These and other MK61 ligand cloning
20 experiments are described in greater detail herein. Isolation of the MK61 ligand(s) allows for the identification or development of novel agonists and/or antagonists of the MK61 signaling pathway. Such agonists and antagonists include MK61 ligand(s), anti-
25 MK61 ligand antibodies and derivatives thereof, small molecules, carbohydrates, lipid, polynucleotides (including antisense oligonucleotides), any of which can be used for potentially treating one or more diseases or disorders, including those recited herein.

30 Brief Description of the Figures

It will be understood that in the figures

WO 02/20762

PCT/US01/27631

described below, the nucleotides 5' to those nucleotides encoding the signal peptide are part of the 5'-untranslated (5'-UTR) flanking sequence.

Additionally, nucleotides 3' to the stop codon
5 represent the 3'-untranslated (3'-UTR) sequence.

Figure 1 depicts a nucleic acid sequence (SEQ ID NO:1) encoding human MK61T1 (hMK61T1). Also depicted is the amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of human hMK61T1. hMK61T1 is a cell surface receptor
10 which contains a signal peptide (SP), one TNFr type cysteine rich domain (CRD), spacer, transmembrane domain (TM), and a long intracellular domain with two regions highly conserved between species. The predicted signal peptide is underlined in this figure,
15 and the stop codon in SEQ ID NO:1 is double-underlined.

Figure 2 depicts a nucleic acid sequence (SEQ ID NO:3) encoding human MK61T2 (hMK61T2), believed to be a soluble receptor. Also depicted is the amino acid sequence (SEQ ID NO:4) of human hMK61T2. The
20 predicted signal peptide is underlined in this figure, and the stop codon in SEQ ID NO:3 is double-underlined.

Figure 3 depicts a nucleic acid sequence (SEQ ID NO:5) encoding human MK61T3 (hMK61T3). Also depicted is the amino acid sequence (SEQ ID NO:6) of
25 human hMK61T3. hMK61T3 is believed to be a soluble receptor, having a signal peptide and TNFr-type CRD. The predicted signal peptide is underlined in this figure, and the stop codon in SEQ ID NO:5 is double-underlined.

30 Figure 4 depicts a nucleic acid sequence (SEQ ID NO:7) and amino acid sequence (SEQ ID NO:8)

WO 02/20762

PCT/US01/27631

encoding human MK61T4 (hMK61T4), believed to be a soluble receptor. The predicted signal peptide is underlined in this figure, and the stop codon in SEQ ID NO:7 is double-underlined.

5 Figure 5 depicts a nucleic acid sequence (SEQ ID NO:9) and amino acid sequence (SEQ ID NO:10) encoding human MK61T5 (hMK61T5), believed to be a soluble receptor. The predicted signal peptide is underlined in this figure, and the stop codon in SEQ ID
10 NO:9 is double-underlined.

 Figure 6 depicts a nucleic acid sequence (SEQ ID NO:11) and amino acid sequence (SEQ ID NO:12) encoding human MK61T6 (hMK61T6), believed to be a
15 soluble receptor. The predicted signal peptide is underlined in this figure, and the stop codon in SEQ ID NO:11 is double-underlined.

 Figure 7 depicts the nucleic acid sequence (SEQ ID NO:13) and amino acid sequence (SEQ ID NO:14)
20 encoding mouse MK61 (mMK61), also called "Sm12-00051-F3", or "Sm12-00051". In this figure, the predicted signal peptide is underlined, and the stop codon in SEQ ID NO:13 is double-underlined.

 Figure 8 depicts the nucleic acid sequence
25 (SEQ ID NO:15) and amino acid sequence (SEQ ID NO:16) encoding the mouse mMK61-Fc fusion polypeptide (mMK61-Fc). In this figure, the predicted signal peptide is underlined, the Fc portion of the sequence is double-underlined, the *NotI* restrict site for joining MK61 to
30 Fc is in bold, and the Kozak consensus sequence (which is not translated) is in italics.

 Figure 9 sets forth a Western Blot showing

WO 02/20762

PCT/US01/27631

that the mMK61 Fc fusion protein (mMK61-Fc) is capable of being secreted from mammalian cells.

Figure 10 sets forth an amino acid comparison of mMK61 (SEQ ID NO:14) with an OPG receptor, Mrank, (SEQ ID NO:17), a known TNFr family member. Mrank is the mouse OPG (osteoprotegerin) receptor precursor.

Figure 11 sets forth an amino acid comparison of mMK61 (SEQ ID NO:14) with the Fas ligand receptor (mfas), (SEQ ID NO:18). mfas is an apoptosis-mediating surface antigen receptor precursor.

Figure 12 sets forth an amino acid comparison of mMK61 (SEQ ID NO:14) with a known mouse lymphotoxin-beta receptor (Tnfr), SEQ ID NO:19. Tnfr is a lymphotoxin-beta receptor precursor, and is also called "tumor necrosis factor receptor 2 related protein" or "tumor necrosis factor-c receptor precursor".

Figures 13 and 14 depict multiple tissue Northern blots which were probed with a random primed human MK61 radioactive probe. These blots demonstrate that human MK61 mRNA is expressed in human lymphoid tissues.

Figure 15 depicts a histogram comparing human MK61 mRNA expression in various human tissues and cell lines as measured by quantitative PCR.

Figure 16 depicts histograms quantitating the binding of the MK61-Fc fusion protein on the surface of human cells as measured by FACS analysis. The histograms indicate that MK61-Fc fusion protein binds to the cell surface of U937 and Jurkat cells.

Figure 17 displays histograms demonstrating

WO 02/20762

PCT/US01/27631

enhanced binding of the MK61-Fc fusion protein on the cell surface of Jurkat and U937 cells after treatment with interferon gamma.

Figure 18 depicts histograms quantitating the production of IgG (top panel) and IgA (bottom panel) in mouse splenocyte cultures after treatment with MK61-Fc fusion protein.

Figure 19 depicts histograms quantitating the effect of MK61-Fc fusion protein on spleen weights in mice (top panel) and spleen lymphocytes (bottom panel). These histograms demonstrate that treatment with the MK61-Fc fusion protein increased the spleen weight and the number of spleen lymphocytes.

Figure 20 depicts the histological analysis of the spleens of MK61-Fc treated mice. The histological analysis indicated the presence of lymphoid hyperplasia.

Figure 21 depicts histograms quantitating the numbers of spleen B and T cells in mice treated with MK61-Fc fusion protein.

Figure 22 depicts histograms quantitating plasma immunoglobulin levels in mice treated with MK61-Fc fusion protein.

Figure 23 depicts histograms quantitating the generation of anti-KLH specific antibodies in mice treated with MK61-Fc fusion protein.

Figure 24 sets out the amino acid sequence of the human MK61-delta Fc CHO (SEQ ID NO: 36).

Figure 25 sets out the amino acid sequence of the human MK61-Fc CHO (SEQ ID NO: 39).

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Detailed Description of the Invention

The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described. All references cited in this application are expressly incorporated by reference herein.

The hMK61T1 isoform is a cell-surface receptor having a signal peptide, a TNF receptor (TNFR) cysteine rich domain (CRD), a transmembrane domain (TM), and a long and highly conserved intracellular domain.

The remaining five human isoforms (hMK61T2, hMK61T3, hMK61T4, hMK61T5, and hMK61T6) are believed to be soluble receptor forms of MK61. hMK61T3 and hMK61T5 each contain a complete TNFR CRD, and are likely naturally-occurring inhibitors of the hMK61T1 mediated signal transduction. The hMK61T2, hMK61T4, and hMK61T6 isoforms each contain partial CRD's.

mMK61 is a mouse MK61 isoform, and mMK61-Fc is an Fc-fusion polypeptide thereof.

Definitions

The terms "MK61 gene" or "MK61 nucleic acid molecule" or "polynucleotide" refers to a nucleic acid molecule comprising or consisting of a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID

WO 02/20762

PCT/US01/27631

NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, and nucleic acid molecules as defined herein.

The term "MK61 polypeptide" refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, and related polypeptides. Related polypeptides include: MK61 polypeptide allelic variants, MK61 polypeptide orthologs, MK61 polypeptide splice variants, MK61 polypeptide variants and MK61 polypeptide derivatives. MK61 polypeptides may be mature polypeptides, as defined herein, and may or may not have an amino terminal methionine residue, depending on the method by which they are prepared.

The term "MK61 polypeptide allelic variant" refers to the polypeptide encoded by one of several possible naturally occurring alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism or a population of organisms.

The term "MK61 polypeptide derivatives" refers to a polypeptide having the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, MK61 polypeptide allelic variants, MK61 polypeptide orthologs, MK61 polypeptide splice variants, or MK61 polypeptide variants, as defined herein, that have been chemically modified.

The term "MK61 polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises a truncation at the amino terminus (with or without a leader sequence)

WO 02/20762

PCT/US01/27631

and/or a truncation at the carboxy terminus of the polypeptide whose sequence is as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16,

5 MK61 polypeptide allelic variants, MK61 polypeptide orthologs, MK61 polypeptide splice variants and/or an MK61 polypeptide variant having one or more amino acid additions or substitutions or internal deletions (wherein the resulting polypeptide is at least six (6) amino acids or more in length) as compared to the MK61

10 polypeptide amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16. MK61 polypeptide fragments may result from alternative

15 RNA splicing or from *in vivo* protease activity. For transmembrane or membrane-bound forms of the MK61 polypeptides, preferred fragments include soluble forms such as those lacking a transmembrane or membrane-binding domain.

20 In preferred embodiments, truncations comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. The polypeptide fragments so produced will

25 comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids. Such MK61 polypeptide fragments may optionally comprise an amino terminal methionine

30 residue. It will be appreciated that such fragments can be used, for example, to generate antibodies to MK61 polypeptides.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

The term "MK61 fusion polypeptide" refers to a fusion of one or more amino acids (such as a heterologous peptide or polypeptide) at the amino or carboxy terminus of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, MK61 polypeptide allelic variants, MK61 polypeptide orthologs, MK61 polypeptide splice variants, or MK61 polypeptide variants having one or more amino acid deletions, substitutions or internal additions as compared to the MK61 polypeptide amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

The term "MK61 polypeptide ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to an MK61 polypeptide amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16. For example, mouse and human MK61 polypeptides are considered orthologs of each other.

The term "MK61 polypeptide splice variant" refers to a nucleic acid molecule, usually RNA, which is generated by alternative processing of intron sequences in an RNA primary transcript containing the non-contiguous coding region of the MK61 polypeptide amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

The term "MK61 polypeptide variants" refers to MK61 polypeptides comprising amino acid sequences

WO 02/20762

PCT/US01/27631

having one or more amino acid sequence substitutions, deletions (such as internal deletions and/or MK61 polypeptide fragments), and/or additions (such as internal additions and/or MK61 fusion polypeptides) as compared to the MK61 polypeptide amino acid sequences set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 (with or without a leader sequence). Variants may be naturally occurring (e.g., MK61 polypeptide allelic variants, MK61 polypeptide orthologs and MK61 polypeptide splice variants) or may be artificially constructed. Such MK61 polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules having a DNA sequence that varies accordingly from the DNA sequence as set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15. In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 50, or from 1 to 75, or from 1 to 100, or more than 100 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

The term "antigen" refers to a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by a selective binding agent, such as an antibody, and additionally capable of being used in an animal to produce antibodies capable of binding to an epitope of each antigen. An antigen may have one or more epitopes.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

The term "biologically active MK61 polypeptides" refers to MK61 polypeptides having at least one activity characteristic of the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, 5 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

The terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" each refer to the amount of a MK61 polypeptide or MK61 nucleic acid molecule used to 10 support an observable level of one or more biological activities of the MK61 polypeptides as set forth herein.

The term "expression vector" refers to a vector which is suitable for use in a host cell and 15 contains nucleic acid sequences which direct and/or control the expression of heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

20 The term "host cell" is used to refer to a cell which has been transformed, or is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not 25 the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

The term "identity" as known in the art refers to a relationship between the sequences of two 30 or more polypeptide molecules or two or more nucleic

WO 02/20762

PCT/US01/27631

acid molecules, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between nucleic acid molecules or polypeptides, as the case may be, as
5 determined by the match between strings of two or more nucleotide or two or more amino acid sequences. "Identity" measures the percent of identical matches between the smaller of two or more sequences with gap alignments (if any) addressed by a particular
10 mathematical model or computer program (i.e., "algorithms").

The term "similarity" is a related concept but, in contrast to "identity", refers to a measure of similarity which includes both identical matches and
15 conservative substitution matches. If two polypeptide sequences have, for example, 10/20 identical amino acids, and the remainder are all non-conservative substitutions, then the percent identity and similarity would both be 50%. If, in the same example, there are
20 five more positions where there are conservative substitutions, then the percent identity remains 50%, but the percent similarity would be 75% (15/20). Therefore, in cases where there are conservative substitutions, the degree of percent similarity between
25 two polypeptides will be higher than the percent identity between those two polypeptides.

The term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule of the invention that
(1) has been separated from at least about 50 percent
30 of proteins, lipids, carbohydrates or other materials with which it is naturally found when total DNA is

WO 02/20762

PCT/US01/27631

isolated from the source cells, (2) is not linked to all or a portion of a polynucleotide to which the "isolated nucleic acid molecule" is linked in nature, (3) is operably linked to a polynucleotide which it is not linked to in nature, or (4) does not occur in nature as part of a larger polynucleotide sequence. Preferably, the isolated nucleic acid molecule of the present invention is substantially free from any other contaminating nucleic acid molecule(s) or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its use in polypeptide production or its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of polynucleotides, lipids, carbohydrates or other materials with which it is naturally found when isolated from the source cell, (2) is not linked (by covalent or noncovalent interaction) to all or a portion of a polypeptide to which the "isolated polypeptide" is linked in nature, (3) is operably linked (by covalent or noncovalent interaction) to a polypeptide with which it is not linked in nature, or (4) does not occur in nature. Preferably, the isolated polypeptide is substantially free from any other contaminating polypeptides or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

The term "mature MK61 polypeptide" refers to an MK61 polypeptide lacking a leader sequence. A

WO 02/20762

PCT/US01/27631

mature MK61 polypeptide may also include other modifications such as proteolytic processing of the amino terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxy terminus, cleavage of a smaller
 5 polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like.

An exemplary mature MK61 polypeptide is depicted by amino acid residue 24 through amino acid residue 355 of SEQ ID NO:2; by amino acid residue 24
 10 through amino acid residue 85 of SEQ ID NO:4; by amino acid residue 24 through amino acid residue 136 of SEQ ID NO:6; by amino acid residue 24 through amino acid residue 187 of SEQ ID NO:8; by amino acid residue 24 through amino acid residue 71 of SEQ ID NO:10; by amino
 15 acid residue 24 through amino acid residue 167 of SEQ ID NO:12; by amino acid residue 22 through amino acid residue 345 of SEQ ID NO:14; and by amino acid residue 22 through amino acid residue 404 of SEQ ID NO:16.

The terms "nucleic acid sequence" or "nucleic acid molecule" refer to a DNA or RNA sequence. The terms encompass molecules formed from any of the known base analogs of DNA and RNA such as, but not limited to
 20 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N6-methyladenine, aziridinyl-cytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxy-methylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N6-iso-pentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine,
 25 2,2-dimethyl-guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyamino-methyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonyl-methyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, 5 uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, 10 queosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine.

The term "naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refer to materials which are found in 15 nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

20 The term "operably linked" is used herein to refer to a method of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Thus, a flanking sequence operably linked to a coding 25 sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A 30 flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence and the coding sequence, and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

The terms "pharmaceutically acceptable carrier" or "physiologically acceptable carrier" as used herein refer to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of the MK61 polypeptide, MK61 nucleic acid molecule or MK61 selective binding agent as a pharmaceutical composition.

The term "selective binding agent" refers to a molecule or molecules having specificity for an MK61 polypeptide. As used herein the terms, "specific" and "specificity" refer to the ability of the selective binding agents to bind to human MK61 polypeptides and not to bind to human non-MK61 polypeptides. It will be appreciated, however, that the selective binding agents may also bind orthologs of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, that is, interspecies versions thereof, such as mouse and rat polypeptides.

The term "transduction" is used to refer to the transfer of nucleic acids from one bacterium to another, usually by a phage. "Transduction" also refers to the acquisition and transfer of eukaryotic cellular sequences by retroviruses.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

The term "transfection" is used to refer to the uptake of foreign or exogenous DNA by a cell, and a cell has been "transfected" when the exogenous DNA has been introduced inside the cell membrane. A number of
5 transfection techniques are well known in the art and are disclosed herein. See, for example, Graham *et al.*, *Virology*, 52:456 (1973); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, (1989); Davis *et al.*, *Basic*
10 *Methods in Molecular Biology*, Elsevier, (1986); and Chu *et al.*, *Gene*, 13:197 (1981). Such techniques can be used to introduce one or more exogenous DNA moieties into suitable host cells.

The term "transformation" as used herein
15 refers to a change in a cells genetic characteristics, and a cell has been transformed when it has been modified to contain new DNA. For example, a cell is transformed where it is genetically modified from its native state. Following transfection or transduction,
20 the transforming DNA may recombine with that of the cell by physically integrating into a chromosome of the cell, it may be maintained transiently as an episomal element without being replicated, or it may replicate independently as a plasmid. A cell is considered to
25 have been stably transformed when the DNA is replicated with the division of the cell.

The term "vector" is used to refer to any molecule (*e.g.*, nucleic acid, plasmid or virus) used to transfer coding information to a host cell.

30 Relatedness of Nucleic Acid Molecules
and/or Polypeptides

WO 02/20762

PCT/US01/27631

It is understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of the nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a substitution, modification, addition and/or deletion of one or more amino acid residues compared to the polypeptide in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

Fragments include molecules which encode a polypeptide of at least about 25 amino acid residues, or about 50, or about 75, or about 100, or greater than about 100, amino acid residues of the polypeptide of SEQ ID NO:2.

In addition, related MK61 nucleic acid molecules include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of the nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid fragment encoding a

WO 02/20762

PCT/US01/27631

polypeptide as defined herein. Hybridization probes may be prepared using the MK61 sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of MK61 polypeptide that exhibit significant identity to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein, and those regions may be used to design probes for screening.

10 The term "highly stringent conditions" refers to those conditions that are designed to permit hybridization of DNA strands whose sequences are highly complementary, and to exclude hybridization of significantly mismatched DNAs. Hybridization stringency is principally determined by temperature, ionic strength and the concentration of denaturing agents such as formamide. Examples of "highly stringent conditions" for hybridization and washing are 0.015M sodium chloride, 0.0015M sodium citrate at 65-15 68°C or 0.015M sodium chloride, 0.0015M sodium citrate, and 50% formamide at 42°C. See Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) and Anderson et al., *Nucleic Acid* 25 Hybridization: a practical approach, Ch. 4, IRL Press Limited, Oxford, England (1985).

More stringent conditions (such as higher temperature, lower ionic strength, higher formamide, or other denaturing agent) may also be used; however, the degree of hybridization will be affected. Other agents may be included in the hybridization and washing

WO 02/20762

PCT/US01/27631

buffers for the purpose of reducing non-specific and/or background hybridization. Examples are 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinyl-pyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate (NaDodSO₄ or SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or another non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4; however, at typical ionic strength conditions, the rate of hybridization is nearly independent of pH. See Anderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited, Oxford, England (1985).

Factors affecting the stability of a DNA duplex include base composition, length, and degree of base pair mismatch. Hybridization conditions can be adjusted by one skilled in the art in order to accommodate these variables and allow DNAs of different sequence relatedness to form hybrids. The melting temperature of a perfectly matched DNA duplex can be estimated by the following equation:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{G+C}) - 600/N - 0.72(\% \text{formamide})$$

where N is the length of the duplex formed in nucleotides, [Na⁺] is the molar concentration of the sodium ion in the hybridization or washing solution, and %G+C is the percentage of (guanine+cytosine) bases in the hybrid. For imperfectly matched hybrids, the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

melting temperature is reduced by approximately 1°C for each 1% mismatch.

The term "moderately stringent conditions" refers to conditions under which a DNA duplex with a greater degree of base pair mismatching than could occur under "highly stringent conditions" is able to form. Examples of typical "moderately stringent conditions" are 0.015M sodium chloride, 0.0015M sodium citrate at 50-65°C or 0.015M sodium chloride, 0.0015M sodium citrate, and 20% formamide at 37-50°C. By way of example, a "moderately stringent" condition of 50°C in 0.015 M sodium ion will allow about a 21% mismatch.

It will be appreciated by those skilled in the art that there is no absolute distinction between "highly" and "moderately" stringent conditions. For example, at 0.015M sodium ion (no formamide), the melting temperature of perfectly matched long DNA is about 71°C. With a wash at 65°C (at the same ionic strength), this would allow for approximately a 6% mismatch. To capture more distantly related sequences, one skilled in the art can simply lower the temperature or raise the ionic strength.

A good estimate of the melting temperature in 1M NaCl* for oligonucleotide probes up to about 20 nucleotides is given by:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C per A-T base pair} + 4^{\circ}\text{C per G-C base pair}$$

*The sodium ion concentration in 6X salt sodium citrate (SSC) is 1M. See Suggs et al., Developmental Biology Using Purified Genes, p. 683, Brown and Fox (eds.)

WO 02/20762

PCT/US01/27631

(1981).

High stringency washing conditions for oligonucleotides are usually at a temperature of 0-5°C below the T_m of the oligonucleotide in 6x SSC, 0.1% SDS for longer oligonucleotides.

In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is about 70 percent (70%) identical to the nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15, or comprise or consist essentially of a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is about 70 percent (70%) identical to the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1, or the nucleotide sequences encode a polypeptide that is about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the polypeptide sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

Differences in the nucleic acid sequence may result in conservative and/or non-conservative modifications of the amino acid sequence relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12,
SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

Conservative modifications to the amino acid
sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ
5 ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or
SEQ ID NO:16 (and corresponding modifications to the
encoding nucleotides) will produce MK61 polypeptides
having functional and chemical characteristics similar
to those of a naturally occurring MK61 polypeptide. In
10 contrast, substantial modifications in the functional
and/or chemical characteristics of MK61 polypeptides
may be accomplished by selecting substitutions in the
amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID
NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID
15 NO:14, or SEQ ID NO:16 that differ significantly in
their effect on maintaining (a) the structure of the
molecular backbone in the area of the substitution, for
example, as a sheet or helical conformation, (b) the
charge or hydrophobicity of the molecule at the target
20 site, or (c) the bulk of the side chain.

For example, a "conservative amino acid
substitution" may involve a substitution of a native
amino acid residue with a nonnative residue such that
there is little or no effect on the polarity or charge
25 of the amino acid residue at that position.
Furthermore, any native residue in the polypeptide may
also be substituted with alanine, as has been
previously described for "alanine scanning
mutagenesis."

Conservative amino acid substitutions also
encompass non-naturally occurring amino acid residues
which are typically incorporated by chemical peptide

WO 02/20762

PCT/US01/27631

synthesis rather than by synthesis in biological systems. These include peptidomimetics and other reversed or inverted forms of amino acid moieties.

Naturally occurring residues may be divided
5 into classes based on common side chain properties:

- 1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 10 3) acidic: Asp, Glu;
- 4) basic: His, Lys, Arg;
- 5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- 6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

15 For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human MK61 polypeptide that are homologous, or
20 similar, with non-human MK61 polypeptide orthologs, or into the non-homologous regions of the molecule.

In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of its
25 hydrophobicity and charge characteristics. They are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9);
30 tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2);

WO 02/20762

PCT/US01/27631

glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5);
asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is understood in the art. Kyte *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 157:105-131 (1982). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydropathic index, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity, particularly where the biologically functional equivalent protein or peptide thereby created is intended, in part, for use in immunological embodiments, as in the present case. The greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, *i.e.*, with a biological property of the protein.

The following hydrophilicity values have been assigned to these amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 $\pm$ 1); glutamate (+3.0 $\pm$ 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 $\pm$ 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0);

WO 02/20762

PCT/US01/27631

methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8);
isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-
2.5) and tryptophan (-3.4). In making changes based
upon similar hydrophilicity values, the substitution of
5 amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2
is preferred, those which are within ± 1 are
particularly preferred, and those within ± 0.5 are even
more particularly preferred. One may also identify
epitopes from primary amino acid sequences on the basis
10 of hydrophilicity. These regions are also referred to
as "epitopic core regions."

Desired amino acid substitutions (whether
conservative or non-conservative) can be determined by
those skilled in the art at the time such substitutions
15 are desired. For example, amino acid substitutions can
be used to identify important residues of the MK61
polypeptide, or to increase or decrease the affinity of
the MK61 polypeptides for their substrates, described
herein.

20 Exemplary amino acid substitutions are set
forth in Table I.

Table I
Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino- butyric Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

A skilled artisan will be able to determine suitable variants of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2 using well-known techniques. For identifying suitable areas of the molecule that may be

5 changed without destroying activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important for activity. For example, when similar polypeptides with similar activities from the same species or from other species are known, one skilled in the art may compare

10 the amino acid sequence of an MK61 polypeptide to such similar polypeptides. With such a comparison, one can identify residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be

WO 02/20762

PCT/US01/27631

appreciated that changes in areas of an MK61 polypeptide that are not conserved relative to such similar polypeptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of the MK61 polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues in similar polypeptides that are important for activity or structure. In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in an MK61 polypeptide that correspond to amino acid residues which are important for activity or structure in similar polypeptides. One skilled in the art may opt for chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of MK61 polypeptides.

One skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of such information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of an MK61 polypeptide with respect to its three dimensional

WO 02/20762

PCT/US01/27631

structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules. Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each desired amino acid residue. The variants can then be screened using activity assays known to those skilled in the art. Such variants could be used to gather information about suitable variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination with other mutations.

20 The MK61 polypeptide analogs of the invention can be determined by comparing the amino acid sequence of MK1 polypeptides with related family members. Exemplary MK61 polypeptide-related family members may include, but are not limited to TNF receptor family members such as Mrank (SEQ ID NO: 17), Fas ligand receptor family members such as Mfasr (SEQ ID NO: 18), and lymphotoxin-beta receptor family members such as TNFrc (SEQ ID NO: 19). This comparison can be accomplished by using a Pileup alignment (Wisconsin GCG Program Package, ver. 8.1; as shown in Figures 10, 11 and 12) or an equivalent (overlapping) comparison with multiple family members within conserved and non-

WO 02/20762

PCT/US01/27631

conserved regions. As shown in Figures 10-12, the predicted amino acid sequence of a mMK61 polypeptide (SEQ ID NO: 14) is aligned with the known amino acid sequences of Mrank (SEQ ID NO: 17), Mfasr (SEQ ID NO: 18) and Tnfr (SEQ ID NO: 19), respectively.

Other MK61 polypeptide analogs can be identified using these or other methods known to those of skill in the art. These overlapping sequences provide guidance for conservative and non-conservative amino acids substitutions resulting in additional MK61 analogs. It will be appreciated that these amino acid substitutions can consist of naturally occurring or non-naturally occurring amino acids. For example, the alignments depicted in Figures 10-12, indicate potential MK61 analogs may have the Cys residue at position 38, 39, or 51 of SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10 and 12 substituted with a Ser or Ala residue; the Cys residue at position 60 or 76 of SEQ ID NOS: 2 and 6 substituted with a Ser or Ala residue; the Cys residue at position 41, 42, 54, 63 or 79 of SEQ ID NOS: 14 and 16 substituted with a Ser or Ala residue; the Leu residue at position 171 or 172 of SEQ ID NOS: 2 substituted with a norleucine, Ile, Val, Met, Ala or Phe; the Leu residue at position 178 or 180 of SEQ ID NOS: 14 and 16 substituted with a norleucine, Ile, Val, Met, Ala or Phe; and the Gly residue at position 141 or SEQ ID NO: 14 or 16 substituted with a Pro or Ala residue.

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. See Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4):422-427 (1996), Chou et al., *Biochemistry*, 13(2):222-245 (1974); Chou

WO 02/20762

PCT/US01/27631

et al., *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou et al., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47:45-148 (1978); Chou et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 and Chou et al., *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979). Moreover, 5 computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins which have a sequence identity of greater than 30%, or 10 similarity greater than 40% often have similar structural topologies. The recent growth of the protein structural database (PDB) has provided enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within a polypeptide's or 15 protein's structure. See Holm et al., *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247 (1999). It has been suggested (Brenner et al., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):369-376 (1997)) that there are a limited number of folds in a given polypeptide or protein and that once a critical 20 number of structures have been resolved, structural prediction will become dramatically more accurate.

Additional methods of predicting secondary structure include "threading" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3):377-87 (1997); Sippl et al., 25 *Structure*, 4(1):15-19 (1996)), "profile analysis" (Bowie et al., *Science*, 253:164-170 (1991); Gribskov et al., *Meth. Enzym.*, 183:146-159 (1990); Gribskov et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13):4355-4358 (1987)), and "evolutionary linkage" (See Holm, *supra* (1999), and 30 Brenner, *supra* (1997)).

Preferred MK61 polypeptide variants include glycosylation variants wherein the number and/or type

WO 02/20762

PCT/US01/27631

of glycosylation site has been altered compared to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16. In one embodiment, MK61 polypeptide variants comprise a greater or a lesser number of N-linked glycosylation sites than the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16. An N-linked glycosylation site is characterized by the sequence: Asn-X-Ser or Asn-X-Thr, wherein the amino acid residue designated as X may be any amino acid residue except proline. The substitution of amino acid residues to create this sequence provides a potential new site for the addition of an N-linked carbohydrate chain. Alternatively, substitutions which eliminate this sequence will remove an existing N-linked carbohydrate chain. Also provided is a rearrangement of N-linked carbohydrate chains wherein one or more N-linked glycosylation sites (typically those that are naturally occurring) are eliminated and one or more new N-linked sites are created. Additional preferred MK61 variants include cysteine variants wherein one or more cysteine residues are deleted from or substituted for another amino acid (e.g., serine) as compared to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16. Cysteine variants are useful when MK61 polypeptides must be refolded into a biologically active conformation such as after the isolation of insoluble inclusion bodies. Cysteine variants generally have fewer cysteine residues than the native protein, and typically have an

WO 02/20762

PCT/US01/27631

even number to minimize interactions resulting from unpaired cysteines.

The invention further provides polypeptides that comprise an epitope-bearing portion of a protein as shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16. The term, "epitope" refers to a region of a protein to which an antibody can bind. See e.g., Geysen et al., *PNAS, USA* 81:3998-4002 (1984). Epitopes can be linear or conformational, the latter being composed of discontinuous regions of the protein that form an epitope upon folding of the protein. Linear epitopes are generally at least 6 amino acid residues in length. Relatively short synthetic peptides that mimic part of a protein sequence are routinely capable of eliciting an antiserum that reacts with the partially mimicked protein. See, Sutcliffe et al., *Science* 219:660-666 (1983). Antibodies that recognize short, linear epitopes are particularly useful in analytic and diagnostic applications that employ denatured protein, such as Western blotting. See Tobin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4356 (1979). Antibodies to short peptides may also recognize proteins in native conformation and will thus be useful for monitoring protein expression and protein isolation, and in detecting MK61 proteins in solution, such as by ELISA or in immunoprecipitation studies.

In addition, the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, or an MK61 polypeptide variant may be fused to a homologous polypeptide to form a

WO 02/20762

PCT/US01/27631

homodimer or to a heterologous polypeptide to form a heterodimer. Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to: an epitope to allow for the detection and/or isolation of an MK61 fusion polypeptide; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain, or a transmembrane and intracellular domain; a ligand or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a polypeptide or peptide which increases stability, such as an immunoglobulin constant region; and a polypeptide which has a therapeutic activity different from the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, or an MK61 polypeptide variant.

Fusions can be made either at the amino terminus or at the carboxy terminus of the polypeptides comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, or SEQ ID NO:14, or an MK61 polypeptide variant. Fusions may be direct with no linker or adapter molecule, or indirect using a linker or adapter molecule. A linker or adapter molecule may be one or more amino acid residues, typically from about 20 to about 50 amino acid residues. A linker or adapter molecule may also be designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease in an encoding polynucleotide or for a protease to allow for the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

separation of the fused moieties. It will be appreciated that once constructed, the fusion polypeptides can be derivatized according to the methods described herein.

5 In a further embodiment of the invention, the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or an MK61 polypeptide variant is fused to one or more domains of
 10 an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab", which binds antigens, and a constant domain known as "Fc", which is involved in effector functions such as complement activation and attack by phagocytic
 15 cells. An Fc has a long serum half-life, whereas an Fab is short-lived. Capon et al., Nature, 337:525-31 (1989). When constructed together with a therapeutic protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding,
 20 protein A binding, complement fixation and perhaps even placental transfer. Id. Table II summarizes the use of certain Fc fusions known in the art.

25 Table II
Fc Fusion with Therapeutic Proteins

Form of Fc	Fusion partner	Therapeutic implications	Reference
IgG1	N-terminus of CD30-L	Hodgkin's disease; anaplastic lymphoma; T-cell leukemia	U.S. Patent No. 5,480,981
Murine Fcγ2a	IL-10	anti-inflammatory; transplant	Zheng et al. (1995), J. Immunol., 154:

WO 02/20762

PCT/US01/27631

IgG1	TNF receptor	rejection septic shock	5590-5600 Fisher et al. (1996), <i>N. Engl.</i> <i>J. Med.</i> , 334: 1697-1702; Van Zee et al., (1996), <i>J.</i> <i>Immunol.</i> , 156: 2221-2230
IgG, IgA, IgM, or IgE (excluding the first domain)	TNF receptor	inflammation, autoimmune disorders	U.S. Pat. No. 5,808,029, issued September 15, 1998
IgG1	CD4 receptor	AIDS	Capon et al. (1989), <i>Nature</i> 337: 525-531
IgG1, IgG3	N-terminus of IL-2	anti-cancer, antiviral	Harvill et al. (1995), <i>Immunotech.</i> , 1: 95-105
IgG1	C-terminus of OPG	osteoarthritis; bone density	WO 97/23614, published July 3, 1997
IgG1	N-terminus of leptin	anti-obesity	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
Human Ig G1	CTLA-4	autoimmune disorders	Linsley (1991), <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-569

In one example, all or a portion of the human IgG hinge, CH₂ and CH₃ regions may be fused at either the N-terminus or C-terminus of the MK61 polypeptides using methods known to the skilled artisan. The resulting MK61 fusion polypeptide may be purified by use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life *in vivo* than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

fusion polypeptide. The Fc region may be a naturally occurring Fc region, or may be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, reduce aggregation, etc.

- 5 Identity and similarity of related nucleic acid molecules and polypeptides can be readily calculated by known methods. Such methods include, but are not limited to, those described in Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and
10 Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in
15 Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo et al., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988).
- 20 Preferred methods to determine identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are described in publicly available computer programs. Preferred
25 computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux et al., *Nucl. Acid. Res.*, 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin,
30 Madison, WI, BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990)). The BLASTX

WO 02/20762

PCT/US01/27631

program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., *supra* (1990)). The well-known
5 Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Certain alignment schemes for aligning two amino acid sequences may result in the matching of only a short region of the two sequences, and this small
10 aligned region may have very high sequence identity even though there is no significant relationship between the two full-length sequences. Accordingly, in a preferred embodiment the selected alignment method (GAP program) will result in an alignment that spans at
15 least 50 contiguous amino acids of the target polypeptide.

For example, using the computer algorithm GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), two polypeptides for which the percent
20 sequence identity is to be determined are aligned for optimal matching of their respective amino acids (the "matched span", as determined by the algorithm). A gap opening penalty (which is calculated as 3x the average diagonal; the "average diagonal" is the average of the
25 diagonal of the comparison matrix being used; the "diagonal" is the score or number assigned to each perfect amino acid match by the particular comparison matrix) and a gap extension penalty (which is usually 1/10 times the gap opening penalty), as well as a
30 comparison matrix such as PAM 250 or BLOSUM 62 are used in conjunction with the algorithm. A standard

WO 02/20762

PCT/US01/27631

comparison matrix (see Dayhoff et al., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5(3)(1978) for the PAM 250 comparison matrix; Henikoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:10915-10919 (1992) for the BLOSUM 62 comparison matrix) is also used by the algorithm.

Preferred parameters for a polypeptide sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman et al., *J. Mol. Biol.*, 48:443-453 (1970);
Comparison matrix: BLOSUM 62 from Henikoff et al., *supra* (1992);
Gap Penalty: 12
Gap Length Penalty: 4
Threshold of Similarity: 0

The GAP program is useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for polypeptide comparisons (along with no penalty for end gaps) using the GAP algorithm.

Preferred parameters for nucleic acid molecule sequence comparisons include the following:

Algorithm: Needleman et al., *supra* (1970);
Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0
Gap Penalty: 50
Gap Length Penalty: 3

The GAP program is also useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for nucleic acid molecule comparisons.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices, thresholds of similarity, etc. may be used by those of skill in the art, including those set forth in the Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997. The particular choices to be made will be apparent to those of skill in the art and will depend on the specific comparison to be made, such as DNA-to-DNA, protein-to-protein, protein-to-DNA; and additionally, whether the comparison is between given pairs of sequences (in which case GAP or BestFit are generally preferred) or between one sequence and a large database of sequences (in which case FASTA or BLASTA are preferred).

Synthesis

It will be appreciated by those skilled in the art that the nucleic acid and polypeptide molecules described herein may be produced by recombinant and other means.

Nucleic Acid Molecules

The nucleic acid molecules encode a polypeptide comprising the amino acid sequence of an MK61 polypeptide and can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, cDNA or genomic library screening, expression library screening and/or PCR amplification of cDNA.

Recombinant DNA methods used herein are generally those set forth in Sambrook et al., *Molecular*

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Cloning: *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), and/or Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, NY (1994). The present invention provides for nucleic acid molecules as described herein and methods for obtaining such molecules.

Where a gene encoding the amino acid sequence of an MK61 polypeptide has been identified from one species, all or a portion of that gene may be used as a probe to identify orthologs or related genes from the same species. The probes or primers may be used to screen cDNA libraries from various tissue sources believed to express the MK61 polypeptide. In addition, part or all of a nucleic acid molecule having the sequence as set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15 may be used to screen a genomic library to identify and isolate a gene encoding the amino acid sequence of an MK61 polypeptide. Typically, conditions of moderate or high stringency will be employed for screening to minimize the number of false positives obtained from the screening.

Nucleic acid molecules encoding the amino acid sequence of MK61 polypeptides may also be identified by expression cloning which employs the detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding of an antibody or other binding partner (e.g., receptor or ligand) to cloned proteins which are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is

WO 02/20762

PCT/US01/27631

modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce these polynucleotides and to express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence which encodes the amino acid sequence of an MK61 polypeptide into an appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid sequence of an MK61 polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded MK61 polypeptide may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from poly(A)+RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two oligonucleotide primers, typically complementary to two separate regions of cDNA (oligonucleotides) encoding the amino acid sequence of an MK61 polypeptide, are then added to the cDNA along with a polymerase such as Taq polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region between the two primers.

Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of an MK61 polypeptide is chemical synthesis using methods well

WO 02/20762

PCT/US01/27631

known to the skilled artisan, such as those described by Engels et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28:716-734 (1989). These methods include, *inter alia*, the phosphotriester, phosphoramidite and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of an MK61 polypeptide will be several hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several fragments using these methods. The fragments can then be ligated together to form the full-length nucleotide sequence of an MK61 polypeptide. Usually, the DNA fragment encoding the amino terminus of the polypeptide will have an ATG, which encodes a methionine residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the MK61 polypeptide, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is designed to be secreted from that cell. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for the optimal expression of an MK61 polypeptide in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the MK61 polypeptide(s) and host cell(s) selected for expression. Such "codon optimization" can be carried out by a variety of methods, for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Ecohigh.cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

University of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics
Computer Group, Madison, WI. Other useful codon
frequency tables include "Celegans_high.cod",
"Celegans_low.cod", "Drosophila_high.cod",
5 "Human_high.cod", "Maize_high.cod", and
"Yeast_high.cod".

Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino
acid sequence of an MK61 polypeptide may be inserted
10 into an appropriate expression vector using standard
ligation techniques. The vector is typically selected
to be functional in the particular host cell employed
(i.e., the vector is compatible with the host cell
machinery such that amplification of the gene and/or
15 expression of the gene can occur). A nucleic acid
molecule encoding the amino acid sequence of an MK61
polypeptide may be amplified/expressed in prokaryotic,
yeast, insect (baculovirus systems), and/or eukaryotic
host cells. Selection of the host cell will depend in
20 part on whether an MK61 polypeptide is to be post-
translationally modified (e.g., glycosylated and/or
phosphorylated). If so, yeast, insect, or mammalian
host cells are preferable. For a review of expression
vectors, see *Meth. Enz.*, vol.185, D.V. Goeddel, ed.,
25 Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

Typically, expression vectors used in any of
the host cells will contain sequences for plasmid
maintenance and for cloning and expression of exogenous
nucleotide sequences. Such sequences, collectively,
30 referred to as "flanking sequences" in certain
embodiments, will typically include one or more of the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

following nucleotide sequences: a promoter, one or more enhancer sequences, an origin of replication, a transcriptional termination sequence, a complete intron sequence containing a donor and acceptor splice site, a
5 sequence encoding a leader sequence for polypeptide secretion, a ribosome binding site, a polyadenylation sequence, a polylinker region for inserting the nucleic acid encoding the polypeptide to be expressed, and a selectable marker element. Each of these sequences is
10 discussed below.

Optionally, the vector may contain a "tag"-encoding sequence, *i.e.*, an oligonucleotide molecule located at the 5' or 3' end of the MK61 polypeptide coding sequence; the oligonucleotide sequence encodes
15 polyHis (such as hexaHis), or another "tag" such as FLAG, HA (hemagglutinin influenza virus) or myc for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means
20 for affinity purification of the MK61 polypeptide from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently be removed from
25 the purified MK61 polypeptide by various means such as using certain peptidases for cleavage.

Flanking sequences may be homologous (*i.e.*, from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (*i.e.*, from a species other than the host
30 cell species or strain), hybrid (*i.e.*, a combination of flanking sequences from more than one source) or synthetic, or the flanking sequences may be native

WO 02/20762

PCT/US01/27631

sequences which normally function to regulate MK61 polypeptide expression. As such, the source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic organism, any vertebrate or invertebrate organism, or
5 any plant, provided that the flanking sequence is functional in, and can be activated by, the host cell machinery.

The flanking sequences useful in the vectors of this invention may be obtained by any of several
10 methods well known in the art. Typically, flanking sequences useful herein other than the endogenous MK61 gene flanking sequences will have been previously identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from
15 the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid
20 synthesis or cloning.

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragments from
25 the same or another species. Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be
30 accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by isolation using agarose gel purification, Qiagen® column

WO 02/20762

PCT/US01/27631

chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

5 An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be
10 important for the optimal expression of an MK61 polypeptide. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example, the origin of replication
15 from the plasmid pBR322 (Product No. 303-3s, New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most gram-negative bacteria, and various origins (e.g., SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitis virus (VSV) or papillomaviruses such as HPV or BPV) are
20 useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (for example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

25 A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment followed by a poly T
30 sequence. While the sequence is easily cloned from a library or even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using

WO 02/20762

PCT/US01/27631

methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

A selectable marker gene element encodes a protein necessary for the survival and growth of a host cell grown in a selective culture medium. Typical selection marker genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, *e.g.*, ampicillin, tetracycline, or kanamycin for prokaryotic host cells, (b) complement auxotrophic deficiencies of the cell; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. Preferred selectable markers are the kanamycin resistance gene, the ampicillin resistance gene, and the tetracycline resistance gene. A neomycin resistance gene may also be used for selection in prokaryotic and eukaryotic host cells.

Other selection genes may be used to amplify the gene which will be expressed. Amplification is the process wherein genes which are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidine kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection pressure which only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

selection gene and the DNA that encodes an MK61 polypeptide. As a result, increased quantities of MK61 polypeptide are synthesized from the amplified DNA.

A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to the coding sequence of an MK61 polypeptide to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (i.e., having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

A leader, or signal, sequence may be used to direct an MK61 polypeptide out of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of an MK61 nucleic acid molecule, or directly at the 5' end of an MK61 polypeptide coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be used in conjunction with an MK61 nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may be homologous (naturally occurring) or heterologous to an MK61 gene or cDNA. Additionally, a signal sequence may be chemically synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of an MK61 polypeptide from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted MK61 polypeptide. The signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of an

WO 02/20762

PCT/US01/27631

MK61 nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

Included within the scope of this invention is the use of either a nucleotide sequence encoding a native MK61 polypeptide signal sequence joined to an MK61 polypeptide coding region or a nucleotide sequence encoding a heterologous signal sequence joined to an MK61 polypeptide coding region. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, i.e., cleaved by a signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native MK61 polypeptide signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion, the native MK61 polypeptide signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell expression the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be used.

In some cases, such as where glycosylation is desired in a eukaryotic host cell expression system, one may manipulate the various presequences to improve glycosylation or yield. For example, one may alter the peptidase cleavage site of a particular signal peptide, or add presequences, which also may affect glycosylation. The final protein product may have, in the -1 position (relative to the first amino acid of the mature protein), one or more additional amino acids incident to expression which may not have been totally

WO 02/20762

PCT/US01/27631

removed. For example, the final protein product may have one or two amino acid residues found in the peptidase cleavage site, attached to the N-terminus. Alternatively, use of some enzyme cleavage sites may
5 result in a slightly truncated form of the desired MK61 polypeptide, if the enzyme cuts at such area within the mature polypeptide.

In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or
10 more introns in the vector; this is particularly true where a polypeptide is produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells. The introns used may be naturally occurring within the MK61 gene, especially where the gene used is a full length genomic
15 sequence or a fragment thereof. Where the intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron(s) may be obtained from another source. The position of the intron with respect to flanking sequences and the MK61 gene is generally
20 important, as the intron must be transcribed to be effective. Thus, when an MK61 cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site, and 5' to the polyA transcription termination sequence. Preferably, the
25 intron or introns will be located on one side or the other (i.e., 5' or 3') of the cDNA such that it does not interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used to practice
30 this invention, provided that it is compatible with the host cell(s) into which it is inserted. Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one intron may be used in the vector.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

The expression and cloning vectors of the present invention will each typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding an MK61 polypeptide. Promoters are untranscribed sequences typically located upstream (5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes, inducible promoters and constitutive promoters. In this context, inducible promoters include repressible/depressible promoters and conventional inducible promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding an MK61 polypeptide by, e.g., removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the desired promoter sequence into the vector. The native MK61 gene promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of an MK61 nucleic acid molecule. A heterologous promoter is preferred, however, if it permits greater transcription and higher yields of the expressed protein as compared to the native promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for use.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems; alkaline phosphatase, a tryptophan (trp) promoter system; and hybrid promoters such as the tac promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Their sequences have been published, thereby enabling one skilled in the art to ligate them to the desired DNA sequence(s), using linkers or adapters as needed to supply any useful restriction sites.

10 Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are not limited to, those
15 obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowl pox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus (CMV), a retrovirus, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40 (SV40).
20 Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, e.g., heat-shock promoters and the actin promoter.

Additional promoters which may be of interest in controlling MK61 gene transcription include, but are
25 not limited to: the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, *Nature*, 290:304-310, (1981)), the CMV promoter, the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto et al., *Cell*, 22:787-797, (1980)); the herpes thymidine kinase
30 promoter (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:144-145, (1981)), the regulatory sequences of the metallothioneine gene (Brinster et al., *Nature*, 296:39-

WO 02/20762

PCT/US01/27631

42, (1982)), prokaryotic expression vectors such as the beta-lactamase promoter (Villa-Kamaroff, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3727-3731, (1978)), or the tac promoter (DeBoer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25, (1983)). Also of interest are the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells [Swift et al., *Cell*, 38:639-646, (1984); Ornitz et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology*, 7:425-515, (1987)]; the insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, *Nature*, 315:115-122, (1985)); the immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl et al., *Cell*, 38:647-658 (1984)); Adames et al., *Nature*, 318:533-538 (1985)); (Alexander et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-1444, (1987)); the mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder et al., *Cell*, 45:485-495, (1986)); the albumin gene control region which is active in liver (Pinkert et al., *Genes and Devel.*, 1:268-276, (1987)); the alphafetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-1648, (1985)); Hammer et al., *Science*, 235:53-58, (1987)); the alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey et al., *Genes and Devel.*, 1:161-171, (1987)); the beta-globin gene control region which is active in myeloid cells [Mogram et al., *Nature*, 315:338-340, (1985); Kollias et al., *Cell*, 46:89-94, (1986)]; the myelin basic protein

WO 02/20762

PCT/US01/27631

gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead et al., *Cell*, 48:703-712, (1987)); the myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, *Nature*, 5 314:283-286, (1985)); and the gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason et al., *Science*, 234:1372-1378, (1986)).

An enhancer sequence may be inserted into the 10 vector to increase the transcription of a DNA encoding an MK61 polypeptide of the present invention by higher eukaryotes. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10-300 bp in length, that act on the promoter to increase its transcription. Enhancers are 15 relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (e.g., globin, elastase, albumin, alpha-feto-protein and insulin). Typically, however, 20 an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced 25 into the vector at a position 5' or 3' to an MK61 nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors of the invention may be constructed from a starting vector such as a 30 commercially available vector. Such vectors may or may not contain all of the desired flanking sequences. Where one or more of the desired flanking sequences are

WO 02/20762

PCT/US01/27631

not already present in the vector, they may be individually obtained and ligated into the vector. Methods used for obtaining each of the flanking sequences are well known to one skilled in the art.

5 Preferred vectors for practicing this invention are those which are compatible with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, *inter alia*, pCRII, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen Company, Carlsbad, CA), pBSII (Stratagene
10 Company, La Jolla, CA), pET15 β (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Publication No. WO 90/14363) and pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island,
15 NY).

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such
20 vectors include, but are not limited to, plasmids such as Bluescript[®] plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA), PCR cloning plasmids designed for cloning Tag-amplified PCR products (e.g., TOPO[™] TA Cloning[®]
25 Kit, PCR2.1[®] plasmid derivatives, Invitrogen, Carlsbad, CA), and mammalian, yeast, or virus vectors such as a baculovirus expression system (pBacPAK plasmid derivatives, Clontech, Palo Alto, CA).

After the vector has been constructed and a
30 nucleic acid molecule encoding an MK61 polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

completed vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide expression. The transformation of an expression vector for an MK61 polypeptide into a selected host cell may be
5 accomplished by well-known methods such as transfection, infection, calcium chloride-mediated transformation, electroporation, microinjection, lipofection or the DEAE-dextran method or other known techniques. The method selected will in part be a
10 function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan and are set forth, for example, in Sambrook et al., supra.

Host cells may be prokaryotic host cells
15 (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as yeast, an insect or vertebrate cells). The host cell, when cultured under appropriate conditions, may synthesizes an MK61 polypeptide which can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell
20 secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or
25 necessary for activity (such as glycosylation or phosphorylation), and ease of folding into a biologically active molecule.

A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type
30 Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Examples include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese

WO 02/20762

PCT/US01/27631

hamster ovary cells (CHO) (ATCC No. CCL61); CHO DHFR-cells (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:4216-4220 (1980)); human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells (ATCC No. CRL1573); or 3T3 cells (ATCC No. CCL92). The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening, product production and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines are the monkey COS-1 (ATCC No. CRL1650) and COS-7 (ATCC No. CRL1651) cell lines, and the CV-1 cell line (ATCC No. CCL70). Further exemplary mammalian host cells include primate cell lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell strains derived from in vitro culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominant acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines include, but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A cells, HeLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell lines, which are also available from the ATCC. Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

Similarly useful as host cells suitable for the present invention are bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* (e.g., HB101, (ATCC No. 33694) DH5 α , DH10 and MC1061 (ATCC No. 53338)) are well known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Pseudomonas spp., other *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., and the like may also be employed in this method.

Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for
5 expression of the polypeptides of the present invention. Preferred yeast cells include, for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized in the methods of the present
10 invention. Such systems are described for example in Kitts et al., *Biotechniques*, 14:810-817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4:564-572 (1993); and Lucklow et al., *J. Virol.*, 67:4566-4579 (1993). Preferred insect cells are Sf-9 and Hi5 (Invitrogen,
15 Carlsbad, CA).

One may also use transgenic animals to express glycosylated MK61 polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow or goat, for example) and obtain the present
20 glycosylated polypeptide in the animal milk. One may also use plants to produce MK61 polypeptides; however, in general, the glycosylation occurring in plants is different from that produced in mammalian cells, and may result in a glycosylated product which is not
25 suitable for human therapeutic use.

Polypeptide Production

Host cells comprising an MK61 polypeptide expression vector may be cultured using standard media
30 well known to the skilled artisan. The media will

WO 02/20762

PCT/US01/27631

usually contain all nutrients necessary for the growth and survival of the cells. Suitable media for culturing *E. coli* cells include, for example, Luria Broth (LB) and/or Terrific Broth (TB). Suitable media
5 for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as indicated by the
10 particular cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate and/or fetal calf serum, as necessary.

Typically, an antibiotic or other compound
15 useful for selective growth of transformed cells is added as a supplement to the media. The compound to be used will be dictated by the selectable marker element present on the plasmid with which the host cell was transformed. For example, where the selectable marker
20 element is kanamycin resistance, the compound added to the culture medium will be kanamycin. Other compounds for selective growth include ampicillin, tetracycline and neomycin.

The amount of an MK61 polypeptide produced by
25 a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing gel
electrophoresis, chromatographic separation such as Hgh
30 Performance Liquid Chromatography (HPLC), immunodetection such as immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

If an MK61 polypeptide has been designed to be secreted from the host cells, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If however, the MK61 polypeptide is not secreted from
5 the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells).

For an MK61 polypeptide situated in the host cell cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host
10 cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), intracellular material (including inclusion bodies for gram-negative bacteria) can be extracted from the host cell using any standard technique known to the skilled artisan. For example, the host cells can be lysed to
15 release the contents of the periplasm/cytoplasm by osmotic shock French press, homogenization, enzymatic disruption, exposure to detergents or chaotropes, and/or sonication followed by centrifugation.

If an MK61 polypeptide has formed inclusion
20 bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such
25 as a detergent, guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. The MK61
30 polypeptide in its now soluble form can then be analyzed using gel electrophoresis, immunoprecipitation or the like. If it is desired to isolate the MK61

WO 02/20762

PCT/US01/27631

polypeptide, isolation may be accomplished using standard methods such as those described herein and in Marston et al., *Meth. Enz.*, 182:264-275 (1990).

In some cases, an MK61 polypeptide may not be biologically active upon isolation. Various methods for "refolding" or converting the polypeptide to its tertiary structure and generating disulfide linkages can be used to restore biological activity. Such methods include exposing the solubilized polypeptide to a pH usually above 7 and in the presence of a particular concentration of a chaotrope. The selection of chaotrope is very similar to the choices used for inclusion body solubilization, but usually the chaotrope is used at a lower concentration and is not necessarily the same as chaotropes used for the solubilization. In most cases the refolding/oxidation solution will also contain a reducing agent or the reducing agent plus its oxidized form in a specific ratio to generate a particular redox potential allowing for disulfide shuffling to occur in the formation of the protein's cysteine bridge(s). Some of the commonly used redox couples include cysteine/cystamine, glutathione (GSH)/dithiobis GSH, cuprous chloride, dithiothreitol (DTT)/ dithiane DTT, and 2-mercaptoethanol (BME)/dithio-b (ME). A cosolvent may be used to increase the efficiency of the refolding, and the more common reagents used for this purpose include glycerol, polyethylene glycol of various molecular weights, arginine and the like.

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of an MK61 polypeptide, then the polypeptide will be found

WO 02/20762

PCT/US01/27631

primarily in the supernatant after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein or otherwise known in the art.

5 The purification of an MK61 polypeptide from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine (MK61 polypeptide/hexaHis) or other small peptide such as
10 FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or myc (Invitrogen, Carlsbad, CA) at either its carboxyl or amino terminus, it may be purified in a one-step process by passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for
15 the tag.

For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel; thus an affinity column of nickel (such as the Qiagen® nickel columns) can be used for purification of MK61
20 polypeptide/polyHis. See for example, Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993).

Additionally, the MK61 polypeptide may be purified through use of a monoclonal antibody which is
25 capable of specifically recognizing and binding to the MK61 polypeptide.

Suitable procedures for purification thus include, without limitation, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography, ion exchange
30 chromatography, molecular sieve chromatography, High

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Performance Liquid Chromatography (HPLC),
electrophoresis (including native gel electrophoresis)
followed by gel elution, and preparative isoelectric
focusing ("Isoprime" machine/technique, Hoefer
5 Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or
more purification techniques may be combined to achieve
increased purity.

MK61 polypeptides may also be prepared by
chemical synthesis methods (such as solid phase peptide
10 synthesis) using techniques known in the art, such as
those set forth by Merrifield et al., *J. Am. Chem.*
Soc., 85:2149 (1963), Houghten et al., *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA, 82:5132 (1985), and Stewart and Young,
"Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Co.,
15 Rockford, IL (1984). Such polypeptides may be
synthesized with or without a methionine on the amino
terminus. Chemically synthesized MK61 polypeptides may
be oxidized using methods set forth in these references
to form disulfide bridges. Chemically synthesized MK61
20 polypeptides are expected to have comparable biological
activity to the corresponding MK61 polypeptides
produced recombinantly or purified from natural
sources, and thus may be used interchangeably with a
recombinant or natural MK61 polypeptide.

25 Another means of obtaining an MK61
polypeptide is via purification from biological samples
such as source tissues and/or fluids in which the MK61
polypeptide is naturally found. Such purification can
be conducted using methods for protein purification as
30 described herein or as otherwise known in the art. The
presence of the MK61 polypeptide during purification
may be monitored, for example, using an antibody

WO 02/20762

PCT/US01/27631

prepared against recombinantly produced MK61 polypeptide or peptide fragments thereof.

- A number of additional methods for producing nucleic acids and polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce polypeptides having specificity for MK61. See for example, Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12297-12303 (1997), which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. See also Roberts, R., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3:268-273 (1999). Additionally, U.S. Patent No. 5,824,469 describes methods of obtaining oligonucleotides capable of carrying out a specific biological function. The procedure involves generating a heterogeneous pool of oligonucleotides, each having a 5' randomized sequence, a central preselected sequence, and a 3' randomized sequence. The resulting heterogeneous pool is introduced into a population of cells that do not exhibit the desired biological function. Subpopulations of the cells are then screened for those which exhibit a predetermined biological function. From that subpopulation, oligonucleotides capable of carrying out the desired biological function are isolated.
- U.S. Patent Nos. 5,763,192, 5,814,476, 5,723,323 and 5,817,483 describe processes for producing peptides or polypeptides. This is done by producing stochastic genes or fragments thereof, and then introducing these genes into host cells which produce one or more proteins encoded by the stochastic genes. The host cells are then screened to identify those clones producing peptides or polypeptides having

WO 02/20762

PCT/US01/27631

the desired activity.

Another method for producing peptides or polypeptides is described in PCT/US98/20094 (WO99/15650) filed by Athersys, Inc. Known as "Random
5 Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RAGE-GD), the process involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or
10 increased by integrating a regulatory sequence into the target cell which is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The
15 promoter randomly locates a break at the front 5' end of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

It will be appreciated that these methods can
20 also be used to create comprehensive IL-17 like protein expression libraries, which can subsequently be used for high throughput phenotypic screening in a variety of assays, such as biochemical assays, cellular assays, and whole organism assays (e.g., plant, mouse, etc.).

25 Chemical Derivatives

Chemically modified derivatives of the MK61 polypeptides may be prepared by one skilled in the art, given the disclosures set forth hereinbelow. MK61 polypeptide derivatives are modified in a manner that
30 is different either in the type or location of the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

molecules naturally attached to the polypeptide. Derivatives may include molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups. The polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, or an MK61 polypeptide variant, may be modified by the covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is typically water soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable.

The polymers each may be of any molecular weight and may be branched or unbranched. The polymers each typically have an average molecular weight of between about 2kDa to about 100kDa (the term "about" indicating that in preparations of a water soluble polymer, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferably between about 5kDa, about 50kDa, more preferably between about 12kDa to about 40kDa and most preferably between about 20kDa to about 35kDa.

Suitable water soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates; sugars; phosphates; polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been

WO 02/20762

PCT/US01/27631

used to derivatize proteins, including mono-(C₁-C₁₀) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol); monomethoxy-polyethylene glycol; dextran (such as low molecular weight dextran of, for example, about 6 kDa);, 5 cellulose; or other carbohydrate-based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, a polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymer, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol) and polyvinyl alcohol. Also encompassed by 10 the present invention are bifunctional crosslinking molecules which may be used to prepare covalently attached multimers of the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID 15 NO:14, or SEQ ID NO:16, or an MK61 polypeptide variant.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for preparing chemical derivatives of polypeptides will 20 generally comprise the steps of (a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ 25 ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, or an MK61 polypeptide variant becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction product(s). The optimal reaction conditions will be 30 determined based on known parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of polymer molecules:protein, the greater the percentage of

WO 02/20762

PCT/US01/27631

attached polymer molecule. In one embodiment, the MK61 polypeptide derivative may have a single polymer molecule moiety at the amino terminus (see, for example, U.S. Patent No. 5,234,784).

5 The pegylation of the polypeptide may be specifically carried out by any of the pegylation reactions known in the art, as described for example in the following references: Francis et al., *Focus on Growth Factors*, 3:4-10 (1992); EP 0154316; EP 0401384
10 and U.S. Patent No. 4,179,337. For example, pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein. For the acylation
15 reactions, the polymer(s) selected should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, the polymer(s) selected should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water
20 stable, or mono C₁-C₁₀ alkoxy or aryloxy derivatives thereof (see U.S. Patent No. 5,252,714).

 In another embodiment, MK61 polypeptides may be chemically coupled to biotin, and the biotin/MK61 polypeptide molecules which are conjugated are then
25 allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent avidin/biotin/MK61 polypeptide molecules. MK61 polypeptides may also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or
30 anti-TNP-IgM to form decameric conjugates with a valency of 10.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Generally, conditions which may be alleviated or modulated by the administration of the present MK61 polypeptide derivatives include those described herein for MK61 polypeptides. However, the MK61 polypeptide derivatives disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to the non-derivatized molecules.

10 Genetically Engineered Non-Human Animals

Additionally included within the scope of the present invention are non-human animals such as mice, rats, rabbits, or other rodents, rabbits, goats or sheep, or other farm animals, in which the gene (or genes) encoding the native MK61 polypeptide has (have) been disrupted ("knocked out") such that the level of expression of this gene or genes is significantly decreased or completely abolished. Such animals may be prepared using techniques and methods such as those described in U.S. Patent No. 5,557,032.

The present invention further includes non-human animals such as mice, rats or other rodents, rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which either the native form of the MK61 gene(s) for that animal or a heterologous MK61 gene(s) is (are) over-expressed by the animal, thereby creating a "transgenic" animal. Such transgenic animals may be prepared using well-known methods such as those described in U.S. Patent No. 5,489,743 and PCT Application No. WO94/28122.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

The present invention further includes non-human animals in which the promoter for one or more of the MK61 polypeptides of the present invention is either activated or inactivated (e.g., by using
5 homologous recombination methods) to alter the level of expression of one or more of the native MK61 polypeptides.

These non-human animals may be used for drug candidate screening. In such screening, the impact of
10 a drug candidate on the animal may be measured; for example, drug candidates may decrease or increase the expression of the MK61 gene. In certain embodiments, the amount of MK61 polypeptide that is produced may be measured after the exposure of the animal to the drug
15 candidate. Additionally, in certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the animal. For example, the overexpression of a particular gene may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one
20 may test a drug candidate's ability to decrease expression of the gene or its ability to prevent, inhibit, or eliminate a pathological condition. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide,
25 may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product or its ability to prevent inhibit, or eliminate a pathological condition.

30

Microarray

It will be appreciated that DNA microarray

WO 02/20762

PCT/US01/27631

technology can be utilized in accordance with the present invention. DNA microarrays are miniature, high density arrays of nucleic acids positioned on a solid support, such as glass. Each cell or element within the array has numerous copies of a single species of DNA which acts as a target for hybridization for its cognate mRNA. In expression profiling using DNA microarray technology, mRNA is first extracted from a cell or tissue sample and then converted enzymatically to fluorescently labeled cDNA. This material is hybridized to the microarray and unbound cDNA is removed by washing. The expression of discrete genes represented on the array is then visualized by quantitating the amount of labeled cDNA which is specifically bound to each target DNA. In this way, the expression of thousands of genes can be quantitated in a high throughput, parallel manner from a single sample of biological material.

This high throughput expression profiling has a broad range of applications with respect to the MK61 molecules of the invention, including but not limited to: the identification and validation of MK61 disease-related genes as targets for therapeutics; molecular toxicology of MK61 molecules and inhibitors thereof; stratification of populations and generation of surrogate markers for clinical trials; and the enhancement of an MK61 related small molecule drug discovery by aiding in the identification of selective compounds in high throughput screens (HTS).

Selective Binding Agents

WO 02/20762

PCT/US01/27631

As used herein, the term "selective binding agent" refers to a molecule which has specificity for one or more MK61 polypeptides. Suitable selective binding agents include, but are not limited to, antibodies and derivatives thereof, polypeptides, and small molecules. Suitable selective binding agents may be prepared using methods known in the art. An exemplary MK61 polypeptide selective binding agent of the present invention is capable of binding a certain portion of the MK61 polypeptide thereby inhibiting the binding of the polypeptide to the MK61 polypeptide receptor(s).

Selective binding agents such as antibodies and antibody fragments that bind MK61 polypeptides are within the scope of the present invention. The antibodies may be polyclonal including monospecific polyclonal, monoclonal (MAbs), recombinant, chimeric, humanized such as CDR-grafted, human, single chain, and/or bispecific, as well as fragments, variants or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody which bind to an epitope on the MK61 polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions.

Polyclonal antibodies directed toward an MK61 polypeptide generally are produced in animals (e.g., rabbits or mice) by means of multiple subcutaneous, intramuscular or intraperitoneal injections of MK61

WO 02/20762

PCT/US01/27631

polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate an MK61 polypeptide to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet hemocyanin, serum, albumin, bovine
5 thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-MK61 polypeptide antibody titer.

10 Monoclonal antibodies directed toward an MK61 polypeptide are produced using any method which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing monoclonal antibodies include the
15 hybridoma methods of Kohler et al., *Nature*, 256:495-497 (1975) and the human B-cell hybridoma method, Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984) and Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York,
20 1987). Also provided by the invention are hybridoma cell lines which produce monoclonal antibodies reactive with MK61 polypeptides.

Monoclonal antibodies of the invention may be modified for use as therapeutics. One embodiment is a
25 "chimeric" antibody in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the
30 chain(s) is/are identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class

WO 02/20762

PCT/US01/27631

or subclass. Also included are fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. See, U.S. Patent No. 4,816,567 and Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1985).

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art (see U.S. Patent Nos. 5,585,089, and 5,693,762). Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. Humanization can be performed, for example, using methods described in the art (Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)), by substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region (CDR) for the corresponding regions of a human antibody.

Also encompassed by the invention are human antibodies which bind MK61 polypeptides, fragments, variants, and/or derivatives. Using transgenic animals (e.g., mice) that are capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production, such antibodies are produced by immunization with an MK61 antigen (i.e., having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a carrier. See, for example, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-2555 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993) and Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993). In

WO 02/20762

PCT/US01/27631

one method, such transgenic animals are produced by incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin chains therein, and inserting nucleic acids encoding human heavy and light chain proteins into the genome thereof. Partially modified animals, that is those having less than the full complement of modifications, are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human variable regions, including human (rather than, e.g., murine) amino acid sequences, including variable regions which are immunospecific for these antigens. See PCT application nos. PCT/US96/05928 and PCT/US93/06926. Additional methods are described in U.S. Patent No. 5,545,807, PCT application nos. PCT/US91/245, PCT/GB89/01207, and in EP 546073B1 and EP 546073A1. Human antibodies may also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

In an alternative embodiment, human antibodies can be produced from phage-display libraries (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991)). These processes mimic immune identification through the display of antibody repertoires on the surface of filamentous bacteriophage, and subsequent selection of phage by their binding to an antigen of choice. One such technique is described in PCT Application No. PCT/US98/17364, filed in the name of Adams *et al.* which describes the isolation of high affinity and

WO 02/20762

PCT/US01/27631

functionally agonistic antibodies for MPL- and msk-receptors using such an approach.

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein or known in the art.. In a preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO cells. Monoclonal (e.g., human) antibodies may be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-MK61 antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of MK61 polypeptides. The antibodies will bind MK61 polypeptides with an affinity which is appropriate for the assay method being employed.

For diagnostic applications, in certain embodiments, anti-MK61 antibodies may be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one which is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , or ^{125}I ; a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; or an enzyme, such as alkaline

WO 02/20762

PCT/US01/27631

phosphatase, β -galactosidase, or horseradish peroxidase (Bayer et al., *Meth. Enz.*, 184:138-163 (1990)).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard (e.g., an MK61 polypeptide, or an immunologically reactive portion thereof) to compete with the test sample analyte (an MK61 polypeptide) for binding with a limited amount of anti-MK61 antibody. The amount of an MK61 polypeptide in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies typically are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte which remain unbound.

Sandwich assays typically involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected and/or quantitated. In a sandwich assay, the test sample analyte is typically bound by a first antibody which is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. See, e.g., U.S. Patent No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assays). For example, one type of sandwich assay is an enzyme-linked

WO 02/20762

PCT/US01/27631

immunosorbent assay (ELISA), in which case the detectable moiety is an enzyme.

The selective binding agents, including anti-MK61 antibodies, are also useful for *in vivo* imaging.

5 An antibody labeled with a detectable moiety may be administered to an animal, preferably into the bloodstream, and the presence and location of the labeled antibody in the host is assayed. The antibody may be labeled with any moiety that is detectable in an
10 animal, whether by nuclear magnetic resonance, radiology, or other detection means known in the art.

Selective binding agents of the invention, including antibodies, may be used as therapeutics. These therapeutic agents are generally agonists or
15 antagonists in that they either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of an MK61 polypeptide. In one embodiment, antagonist antibodies of the invention are antibodies or binding fragments thereof which are capable of specifically
20 binding to an MK61 polypeptide and which are capable of inhibiting or eliminating the functional activity of an MK61 polypeptide *in vivo* or *in vitro*. In preferred embodiments, the selective binding agent, e.g., an antagonist antibody, will inhibit the functional
25 activity of an MK61 polypeptide by at least about 50%, and preferably by at least about 80%. In another embodiment, the selective binding agent may be an antibody that is capable of interacting with an MK61 binding partner (a ligand or receptor) thereby
30 inhibiting or eliminating MK61 activity *in vitro* or *in vivo*. Selective binding agents, including agonist and

WO 02/20762

PCT/US01/27631

antagonist anti-MK61 antibodies, are identified by screening assays which are well known in the art.

The invention also relates to a kit comprising MK61 selective binding agents (such as
5 antibodies) and other reagents useful for detecting MK61 polypeptide levels in biological samples. Such reagents may include a detectable label, blocking serum, positive and negative control samples, and detection reagents.

10 MK61 polypeptides can be used to clone MK61 ligand(s) using an "expression cloning" strategy. Radiolabeled (¹²⁵Iodine) MK61 polypeptide or "affinity/activity-tagged" MK61 polypeptide (such as an Fc fusion or an alkaline phosphatase fusion) can be
15 used in binding assays to identify a cell type or a cell line or tissue that expresses MK61 ligand(s). RNA isolated from such cells or tissues can then be converted to cDNA, cloned into a mammalian expression vector, and transfected into mammalian cells (for
20 example, COS, or 293) to create an expression library. Radiolabeled or tagged MK61 polypeptide can then be used as an affinity reagent to identify and isolate the subset of cells in this library expressing MK61 ligand(s). DNA is then isolated from these cells and
25 transfected into mammalian cells to create a secondary expression library in which the fraction of cells expressing MK61 ligand(s) would be many-fold higher than in the original library. This enrichment process can be repeated iteratively until a single recombinant
30 clone containing an MK61 ligand is isolated. Isolation of MK61 ligand(s) is useful for identifying or

WO 02/20762

PCT/US01/27631

developing novel agonists and antagonists of the MK61 signaling pathway. Such agonists and antagonists include MK61 ligand(s), anti-MK61 ligand antibodies, small molecules or antisense oligonucleotides. These
5 may be used for treating, preventing, or diagnosing one or more diseases or disorders, including those described herein.

10 Assaying for other modulators of MK61 polypeptide activity

In some situations, it may be desirable to identify molecules that are modulators, *i.e.*, agonists or antagonists, of the activity of MK61 polypeptide. Natural or synthetic molecules that modulate MK61 like
15 polypeptide may be identified using one or more screening assays, such as those described herein. Such molecules may be administered either in an *ex vivo* manner, or in an *in vivo* manner by injection, or by oral delivery, implantation device or the like.

20 "Test molecule(s)" refers to the molecule(s) that is/are under evaluation for the ability to modulate (*i.e.*, increase or decrease) the activity of an MK61 polypeptide. Most commonly, a test molecule will interact directly with an MK61 polypeptide.
25 However, it is also contemplated that a test molecule may also modulate MK61 polypeptide activity indirectly, such as by affecting MK61 gene expression, or by binding to an MK61 binding partner (*e.g.*, receptor or ligand). In one embodiment, a test molecule will bind
30 to an MK61 polypeptide with an affinity constant of at least about 10^{-6} M, preferably about 10^{-8} M, more

WO 02/20762

PCT/US01/27631

preferably about 10^{-9} M, and even more preferably about 10^{-10} M.

Methods for identifying compounds which interact with MK61 polypeptides are encompassed by the present invention. In certain embodiments, an MK61 polypeptide is incubated with a test molecule under conditions which permit the interaction of the test molecule with an MK61 polypeptide, and the extent of the interaction can be measured. The test molecule(s) can be screened in a substantially purified form or in a crude mixture.

In certain embodiments, an MK61 polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule which interacts with MK61 polypeptide to regulate its activity. Molecules which regulate MK61 polypeptide expression include nucleic acids which are complementary to nucleic acids encoding an MK61 polypeptide, or are complementary to nucleic acid sequences which direct or control the expression of MK61 polypeptide, and which act as anti-sense regulators of expression.

Once a set of test molecules has been identified as interacting with an MK61 polypeptide, the molecules may be further evaluated for their ability to increase or decrease MK61 polypeptide activity. The measurement of the interaction of test molecules with MK61 polypeptides may be carried out in several formats, including cell-based binding assays, membrane binding assays, solution-phase assays and immunoassays. In general, test molecules are incubated with an MK61

WO 02/20762

PCT/US01/27631

polypeptide for a specified period of time, and MK61 polypeptide activity is determined by one or more assays for measuring biological activity.

5 The interaction of test molecules with MK61 polypeptides may also be assayed directly using polyclonal or monoclonal antibodies in an immunoassay. Alternatively, modified forms of MK61 polypeptides containing epitope tags as described herein may be used in immunoassays.

10 In the event that MK61 polypeptides display biological activity through an interaction with a binding partner (e.g., a receptor or a ligand) are assessed by a variety of *in vitro* assays may be used to measure the binding of an MK61 polypeptide to the
15 corresponding binding partner (such as a selective binding agent, receptor or ligand). These assays are used to screen test molecules for their ability to increase or decrease the rate and/or the extent of binding of an MK61 polypeptide to its binding partner.
20 In one assay, an MK61 polypeptide is immobilized in the wells of a microtiter plate. Radiolabeled MK61 binding partner (for example, iodinated MK61 binding partner) and the test molecule(s) are added either one at a time (in either order) or simultaneously to the wells.
25 After incubation, the wells are washed and counted (using a scintillation counter) for radioactivity to determine the extent to which the binding partner bound to MK61 polypeptide. Typically, the molecules will be tested over a range of concentrations, and a series of
30 control wells lacking one or more elements of the test assays can be used for accuracy in the evaluation of

WO 02/20762

PCT/US01/27631

the results. An alternative to this method involves reversing the "positions" of the proteins, i.e., immobilizing MK61 binding partner to the microtiter plate wells, incubating with the test molecule and radiolabeled MK61 polypeptide, and determining the extent of MK61 polypeptide binding. See, for example, chapter 18, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, New York, NY (1995).

As an alternative to radiolabeling, an MK61 polypeptide or its binding partner may be conjugated to biotin and the presence of biotinylated protein can then be detected using streptavidin linked to an enzyme, such as horseradish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP), is detected colorimetrically or by fluorescent tagging of streptavidin. An antibody directed to an MK61 polypeptide or to an MK61 binding partner and conjugated to biotin may also be used and can be detected after incubation with enzyme-linked streptavidin linked to AP or HRP.

An MK61 polypeptide or an MK61 binding partner can also be immobilized by attachment to agarose beads, acrylic beads or other types of such inert solid phase substrates. The substrate-protein complex can be placed in a solution containing the complementary protein and the test compound. After incubation the beads is precipitated by centrifugation, and the amount of binding between an MK61 polypeptide and its binding partner can be assessed using the methods described herein. Alternatively, the substrate-protein complex is immobilized in a column,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

and the test molecule and complementary protein are passed through the column. The formation of a complex between an MK61 polypeptide and its binding partner is assessed using any of the techniques set forth herein, 5 i.e., radiolabeling, antibody binding or the like.

Another *in vitro* assay that is useful for identifying a test molecule that increases or decreases the formation of a complex between an MK61 polypeptide and an MK61 binding partner is a surface plasmon 10 resonance detector system such as the BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway, NJ). The BIAcore system may be carried out using the manufacturer's protocol. This assay essentially involves the covalent binding of either MK61 polypeptide or an MK61 binding partner to a 15 dextran-coated sensor chip which is located in a detector. The test compound and the other complementary protein can then be injected, either simultaneously or sequentially, into the chamber containing the sensor chip. The amount of 20 complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass which is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip. The change in molecular mass can be measured by the detector system.

25 In some cases, it may be desirable to evaluate two or more test compounds together for their ability to increase or decrease the formation of a complex between an MK61 polypeptide and an MK61 binding partner. In these cases, the assays set forth herein 30 can be readily modified by adding such additional test compound(s) either simultaneous with, or subsequent to,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

the first test compound. The remainder of the steps in the assay are as set forth herein.

In vitro assays such as those described herein may be used advantageously to screen large numbers of compounds for effects on complex formation by an MK61 polypeptide and an MK61 binding partner. The assays may be automated to screen compounds generated in phage display, synthetic peptide and chemical synthesis libraries.

Compounds which increase or decrease the formation of a complex between an MK61 polypeptide and an MK61 binding partner may also be screened in cell culture using cells and cell lines expressing either MK61 polypeptide or MK61 binding partner. Cells and cell lines may be obtained from any mammal, but preferably will be from human or other primate, canine or rodent sources. The binding of an MK61 polypeptide to cells expressing MK61 binding partner at the surface is evaluated in the presence or absence of test molecules, and the extent of binding may be determined by, for example, flow cytometry using a biotinylated antibody to an MK61 binding partner. Cell culture assays can be used advantageously to further evaluate compounds that score positive in protein binding assays described herein.

Cell cultures can also be used to screen the impact of a drug candidate. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the MK61 gene. In certain embodiments, the amount of MK61 polypeptide that is produced may be measured after exposure of the cell culture to the drug candidate. In

WO 02/20762

PCT/US01/27631

certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the cell culture. For example, the overexpression of a particular gene may have a particular impact on the cell culture. In such cases, one may test a drug candidate's ability to increase or decrease the expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a particular impact on the cell culture. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product in a cell culture.

15 A yeast two-hybrid system (Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9583 (1991)) can be used to identify novel polypeptides that bind to, or interact with, MK61 polypeptides. As an example, hybrid constructs comprising DNA encoding a cytoplasmic domain of an MK61 polypeptide fused to a yeast GAL4-DNA binding domain may be used as a two-hybrid bait plasmid. Positive clones emerging from the screening may be characterized further to identify interacting proteins.

25 P38 Inhibitors

 A new approach to intervention between the extracellular stimulus and the secretion of IL-1 and TNF α from the cell involves blocking signal transduction through inhibition of a kinase which lies on the signal pathway. One example is through inhibition of P-38 (also called "RK" or "SAPK-2", Lee

WO 02/20762

PCT/US01/27631

et al., *Nature*, 372:739 (1994)), a known ser/thr kinase (clone reported in Han et al., *Biochimica Biophysica Acta*, 1265:224-227 (1995)). A linear relationship has been shown for effectiveness in a competitive binding assay to P-38, and the same inhibitor diminishing the levels of IL-1 secretion from monocytes following LPS stimulation. Following LPS stimulation of monocytes, the levels of messenger RNA for TNF α have been shown to increase 100 fold, but the protein levels of TNF α are increased 10,000 fold. Thus, a considerable amplification of the TNF signaling occurs at the translational level. Following LPS stimulation of monocytes in the presence of a P-38 inhibitor, the levels of mRNA are not affected, but the levels of final TNF protein are dramatically reduced (up to 80-90% depending on the effectiveness of the P-38 inhibitor). Thus, the above experiments lend strong support to the conclusion that inhibition of P-38 leads to diminished translational efficiency. Further evidence that TNF α is under translational control is found in the deletion experiments of Beutler et al. and Lee, wherein segments of 3' untranslated mRNA (3' UTR) are removed resulting in high translational efficiency for TNF α . More importantly, the P-38 inhibitors did not have an effect on the level of TNF α (i.e., translational efficiency) when the appropriate segments of TNF α mRNA are deleted. Thus, the correlative data between the level of binding of inhibitors to P-38 and the diminished IL-1 and TNF α levels following LPS stimulation with the same inhibitors, plus the above biochemical evidence regarding the effect of P-38

WO 02/20762

PCT/US01/27631

inhibitors on translational efficiency of both TNF α and IL-1 make a strong cause and effect relationship. The role of P-38 in the cell is still being delineated; so therefore, other beneficial effects regarding
5 inflammatory diseases or other disease states obtained from its inhibition maybe forthcoming.

Elevated levels of TNF α and/or IL-1 may contribute to the onset, etiology, or exacerbate a number of disease states, including, but not limited to:
10 rheumatoid arthritis; osteoarthritis; rheumatoid spondylitis; gouty arthritis; inflammatory bowel disease; adult respiratory distress syndrome (ARDS); psoriasis; Crohn's disease; allergic rhinitis; ulcerative colitis; anaphylaxis; contact dermatitis;
15 asthma; antiviral therapy including those viruses sensitive to TNF α inhibition - HIV-1, HIV-2, HIV-3, cytomegalovirus (CMV), influenza, adenovirus, and the herpes viruses including HSV-1, HSV-2, and herpes zoster; muscle degeneration; cachexia; Reiter's
20 syndrome; type II diabetes; bone resorption diseases; graft vs. host reaction; ischemia reperfusion injury; atherosclerosis; brain trauma; Alzheimer's disease; multiple sclerosis; cerebral malaria; sepsis; septic shock; toxic shock syndrome; fever and myalgias due to
25 infection.

Substituted imidazole, pyrrole, pyridine, pyrimidine and the like compounds have been described for use in the treatment of cytokine mediated diseases by inhibition of proinflammatory cytokines, such as IL-
30 1, IL-6, IL-8, and TNF. Substituted imidazoles for use in the treatment of cytokine mediated diseases have been described in U.S. Patent No. 5,593,992;

WO 02/20762

PCT/US01/27631

WO93/14081; WO97/18626; WO96/21452; WO96/21654;
WO96/40143; WO97/05878; and WO97/05878. Substituted
imidazoles for use in the treatment of inflammation has
been described in U.S. Patent No. 3,929,807.

- 5 Substituted pyrrole compounds for use in the treatment
of cytokine mediated diseases have been described in
WO97/05877; WO97/05878; WO97/16426; WO97/16441; and
WO97/16442. Substituted aryl and heteroaryl fused
pyrrole compounds for use in the treatment of cytokine
10 mediated diseases have been described in WO98/22457.
Substituted pyridine, pyrimidine, pyrimidinone, and
pyridazine compounds for use in the treatment of
cytokine mediated diseases have been described in
WO98/24780; WO98/24782; WO99/24404; and WO99/32448.

15

Internalizing Proteins

- The TAT protein sequence (from HIV) can be
used to internalize proteins into a cell by targeting
the lipid bi-layer component of the cell membrane. See
20 e.g., Falwell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
91:664-668 (1994). For example, an 11 amino acid
sequence (YGRKKRRQRRR; SEQ id NO: X) of the HIV tat
protein (termed the "protein transduction domain", or
TAT PDT) has shown to mediate delivery of large
25 bioactive proteins such as β -galactosidase and $\text{p}27^{\text{Kip}}$
across the cytoplasmic membrane and the nuclear
membrane of a cell. See Schwarze et al., *Science*,
285:1569-1572 (1999); and Nagahara et al., *Nature*
Medicine, 4:1449-1452 (1998). Schwarze et al., *supra*,
30 demonstrated that cultured cells acquired β -
galactosidase activity when exposed to a fusion of the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

TAT-PDT and β -galactosidase. Injection of mice with TAT- β -gal fusion proteins resulted in β -gal expression in a number of tissues, including liver, kidney, lung, heart and brain tissue.

5 It will thus be appreciated that the TAT protein sequence may be used to internalize a desired protein or polypeptide into a cell. In the context of the present invention, the TAT protein sequence can be fused to another molecule such as a MK61 antagonist
10 (i.e. anti-MK61 selective binding agent, small molecule, soluble receptor, or antisense oligonucleotide) can be administered intracellularly to inhibit the activity of an MK61 molecule. As used herein, the term "MK61 molecule" refers to both MK61
15 nucleic acid molecules and MK61 polypeptides as defined herein. Where desired, the MK61 protein itself or a peptide fragment or modified form of MK61, may be fused to such a protein transducer for administering to cells using the procedures described above.

20 Cell Source Identification Using MK61 Polypeptides

In accordance with certain embodiments of the invention, it may be useful to be able to determine the source of a certain cell type associated with an MK61 polypeptide. For example, it may be useful to
25 determine the origin of a disease or pathological condition as an aid in selecting an appropriate therapy.

Therapeutic Uses

The polypeptides and agonists and antagonists
30 of the invention are also useful in the diagnosis and

WO 02/20762

PCT/US01/27631

treatment of a number of diseases and disorders, including those recited herein. These include, but are not limited to diseases and disorders involving leukocyte and/or osteoclast proliferation,

5 differentiation, survival, and/or apoptosis. The polypeptides and agonists and antagonists of the invention are also useful in regulating growth, survival and/or apoptosis of lymphoma, leukemia, and other cancer cells.

10 hMK61T1 was identified from a PMA treated cancer cell line. Therefore, production of the hMK61T1 cell-surface receptor may be regulated by PMA and/or other growth signals at the RNA splicing level. A peptide corresponding to a part of the extracellular
15 domain of hMK61T1 was identified in human urine and serum through proteomics analysis. Furthermore, selective expression of hMK61 was observed in spleen, lymph nodes, peripheral blood leukocytes, and fetal liver as determined by Northern blotting. The
20 polypeptides and agonists and antagonists of the invention are thus also useful in the diagnosis and/or treatment of disorders of the immune system (as is described herein), as well as in the protection and regeneration of the liver.

25 Many diseases and medical conditions are associated with TNF and are often categorized as inflammatory conditions. TNF-associated diseases include, but are not limited to, spontaneous or experimental diseases or medical conditions if
30 associated with elevated levels of TNF in bodily fluids or tissue, or if cells or tissues taken from the body produce elevated levels of TNF in culture. In many

WO 02/20762

PCT/US01/27631

cases, TNF-associated diseases may also be recognized by: (1) pathological findings associated with the disease or medical condition can be mimicked experimentally in animals by the administration or upregulation of expression of TNF, or (2) a pathology induced in experimental animal models of the disease or medical condition can be inhibited or abolished by treatment with agents that inhibit the action of TNF. It will be understood, however, that the mechanism of action of the MK61 polypeptides is not necessarily the inhibition of TNF.

A non-exclusive list of acute and chronic TNF-associated diseases includes, but is not limited to, the following: cachexia/anorexia; cancer (e.g., leukemias); chronic fatigue syndrome; coronary conditions and indications, including congestive heart failure, coronary restenosis, myocardial infarction, and coronary artery bypass graft; depression; diabetes (e.g., juvenile onset Type 1 and diabetes mellitus); endometriosis, endometritis, and related conditions; fibromyalgia or analgesia; graft versus host rejection; hyperalgesia; inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and *Clostridium difficile*-associated diarrhea; ischemic, including cerebral ischemia (brain injury as a result of trauma, epilepsy, hemorrhage or stroke, each of which may lead to neurodegeneration); lung diseases (e.g., adult respiratory distress syndrome, asthma, and pulmonary fibrosis); multiple sclerosis; neuroinflammatory diseases; ocular diseases and conditions, including corneal transplant, ocular degeneration and uveitis; pain, including cancer-related pain; pancreatitis; periodontal diseases;

WO 02/20762

PCT/US01/27631

prostatitis (bacterial or non-bacterial) and related conditions; psoriasis and related conditions; pulmonary fibrosis; reperfusion injury; rheumatic diseases (e.g., rheumatoid arthritis, osteoarthritis, juvenile
5 (rheumatoid) arthritis, seronegative polyarthritis, ankylosing spondylitis, Reiter's syndrome and reactive arthritis, Still's disease, psoriatic arthritis, enteropathic arthritis, polymyositis, dermatomyositis, scleroderma, systemic sclerosis, vasculitis (e.g.,
10 Kawasaki's disease), cerebral vasculitis, Lyme disease, staphylococcal-induced ("septic") arthritis, Sjögren's syndrome, rheumatic fever, polychondritis and polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis);
septic shock; side effects from radiation therapy;
15 systemic lupus erythematosus; temporal mandibular joint disease; thyroiditis; tissue transplantation or an inflammatory condition resulting from strain, sprain, cartilage damage, trauma, orthopedic surgery, infection (e.g., HIV, *Clostridium difficile* and related species)
20 or other disease process.

TNF α inhibitors may act by downregulating or inhibiting TNF production, binding free TNF, interfering with TNF binding to its receptor, or interfering with modulation of TNF signaling after
25 binding to its receptor. The term "TNF α inhibitor" thus includes solubilized TNF receptors, antibodies to TNF, antibodies to TNF receptor, inhibitors of TNF α converting enzyme (TACE), and other molecules that affect TNF activity.

30 TNF α inhibitors of various kinds are disclosed in the art, including the following

WO 02/20762

PCT/US01/27631

references:

- European patent applications 308 378; 422
339; 393 438; 398 327; 412 486; 418 014, 417 563, 433
900; 464 533; 512 528; 526 905; 568 928; 663 210; 542
5 795; 818 439; 664 128; 542 795; 741 707; 874 819 ; 882
714; 880 970; 648 783; 731 791; 895 988; 550 376; 882
714; 853 083; 550 376; 943 616;
- U.S. Patent Nos. 5,136,021; 5,929,117;
5,948,638; 5,807,862; 5,695,953; 5,834,435; 5,817,822;
10 5830742; 5,834,435; 5,851,556; 5,853,977; 5,359,037;
5,512,544; 5,695,953; 5,811,261; 5,633,145; 5,863,926;
5,866,616; 5,641,673; 5,869,677; 5,869,511; 5,872,146;
5,854,003; 5,856,161; 5,877,222; 5,877,200; 5,877,151;
5,886,010; 5,869,660; 5,859,207; 5,891,883; 5,877,180;
15 5,955,480; 5,955,476; 5,955,435;
- International (WO) patent applications
90/13575, 91/03553, 92/01002, 92/13095, 92/16221,
93/07863, 93/21946, 93/19777, 95/34326, 96/28546,
98/27298, 98/30541, 96/38150, 96/38150, 97/18207,
20 97/15561, 97/12902, 96/25861, 96/12735, 96/11209,
98/39326, 98/39316, 98/38859, 98/39315, 98/42659,
98/39329, 98/43959, 98/45268, 98/47863, 96/33172,
96/20926, 97/37974, 97/37973, 96/35711, 98/51665,
98/43946, 95/04045, 98/56377, 97/12244, 99/00364,
25 99/00363, 98/57936, 99/01449, 99/01139, 98/56788,
98/56756, 98/53842, 98/52948, 98/52937, 99/02510,
97/43250, 99/06410, 99/06042, 99/09022, 99/08688,
99/07679, 99/09965, 99/07704, 99/06041, 99/37818,
99/37625, 97/11668;
- 30 Japanese (JP) patent applications 10147531,
10231285, 10259140, and 10130149, 10316570, 11001481,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

and 127,800/1991; German (DE) application 19731521;
British (GB) applications 2 218 101, 2 326 881, 2 246
569.

For purposes of this invention, the molecules
5 disclosed in these references and the molecules
disclosed in the references (see below) are
collectively termed "TNF α inhibitors".

For example, EP 393,438 and EP 422,339 teach
the amino acid and nucleic acid sequences of a soluble
10 TNF receptor type I (also known as sTNFR-I or 30kDa TNF
inhibitor) and a soluble TNF receptor type II (also
known as sTNFR-II or 40kDa TNF inhibitor), collectively
termed "sTNFRs", as well as modified forms thereof
(e.g., fragments, functional derivatives and variants).
15 EP 393,438 and EP 422,339 also disclose methods for
isolating the genes responsible for coding the
inhibitors, cloning the gene in suitable vectors and
cell types, and expressing the gene to produce the
inhibitors.

20 sTNFR-I and sTNFR-II are members of the nerve
growth factor/TNF receptor superfamily of receptors
which includes the nerve growth factor receptor (NGF),
the B-cell antigen CD40, 4-1BB, the rat T-cell antigen
MRC OX40, the fas antigen, and the CD27 and CD30
25 antigens (Smith et al., *Science*, 248:1019-1023 (1990)).
The most conserved feature among this group of cell
surface receptors is the cysteine-rich extracellular
ligand binding domain, which can be divided into four
repeating motifs of about forty amino acids and which
30 contains 4-6 cysteine residues at positions which are
well conserved (Smith et al. (1990), *supra*).

WO 02/20762

PCT/US01/27631

As contemplated by the present invention, an MK61 polypeptide may be administered as an adjunct to other therapy and also with other pharmaceutical formulations suitable for the indication being treated.

5 A MK61 polypeptide and any of one or more additional therapies or pharmaceutical formulations may be administered separately, sequentially, or simultaneously.

In a specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more interleukin-1 (IL-1) inhibitors for the treatment of TNF-responsive disease. Classes of interleukin-1 inhibitors include interleukin-1 receptor antagonists (any compound capable of specifically preventing activation of cellular receptors to IL-1) such as IL-1ra, as described below; anti-IL-1 receptor monoclonal antibodies (e.g., EP 623,674); IL-1 binding proteins such as soluble IL-1 receptors (e.g., U.S. Patent Nos. 5,492,888, 5,488,032, 5,464,937, 5,319,071 and 5,180,812); anti-IL-1 monoclonal antibodies (e.g., WO95/01997, WO94/02627, WO90/06371, U.S. Patent No. 4,935,343, EP 364,778, EP 267,611 and EP 220,063); IL-1 receptor accessory proteins (e.g., WO96/23067), and other compounds and proteins which block *in vivo* synthesis or extracellular release of IL-1.

Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is a human protein that acts as a natural inhibitor of interleukin-1. Interleukin-1 receptor antagonists, as well as the methods of making and methods of using thereof, are described in U.S. Patent No. 5,075,222;

WO 02/20762

PCT/US01/27631

WO91/08285; WO91/17184; AU9173636; WO92/16221;
WO93/21946; WO94/06457; WO94/21275; FR2706772;
WO94/21235; DE4219626; WO94/20517; WO96/22793 and
WO97/28828, the disclosures of which are incorporated
5 herein by reference. The proteins include glycosylated
as well as non-glycosylated IL-1 receptor antagonists.

Specifically, three preferred forms of IL-1ra
(IL-1ra α , IL-1ra β and IL-1rax), each being encoded by
the same DNA coding sequence and variants thereof, are
10 disclosed and described in U.S. Patent No. 5,075,222.
Methods for producing IL-1 inhibitors, particularly IL-
1ras, are also disclosed in the 5,075,222 patent.

An additional class of interleukin-1
inhibitors includes compounds capable of specifically
15 preventing activation of cellular receptors to IL-1.
Such compounds include IL-1 binding proteins, such as
soluble receptors and monoclonal antibodies. Such
compounds also include monoclonal antibodies to the
receptors.

20 A further class of interleukin-1 inhibitors
includes compounds and proteins which block *in vivo*
synthesis and/or extracellular release of IL-1. Such
compounds include agents which affect transcription of
IL-1 genes or processing of IL-1 preproteins.

25 In a specific embodiment, the present
invention is directed to the use of an MK61 polypeptide
in combination (pretreatment, post-treatment or
concurrent treatment) with secreted or soluble human
fas antigen or recombinant versions thereof (WO96/20206
30 and Mountz et al., *J. Immunology*, 155:4829-4837; and EP
510,691, the disclosures of which are hereby

WO 02/20762

PCT/US01/27631

incorporated by reference). WO96/20206 discloses secreted human fas antigen (native and recombinant, including an Ig fusion protein), methods for isolating the genes responsible for coding the soluble

5 recombinant human fas antigen, methods for cloning the gene in suitable vectors and cell types, and methods for expressing the gene to produce the inhibitors. EP 510,691 teaches DNAs coding for human fas antigen, including soluble fas antigen, vectors expressing for

10 said DNAs and transformants transfected with the vector. When administered parenterally, doses of a secreted or soluble fas antigen fusion protein each are generally from about 1 micrograms/kg to about 100 micrograms/kg.

15 Present treatment of TNF-responsive diseases, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases, commonly includes the use of first line drugs for control of pain and inflammation; these drugs are classified as non-steroidal, anti-

20 inflammatory drugs (NSAIDs). Secondary treatments include corticosteroids, slow acting antirheumatic drugs (SAARDs) or disease modifying (DM) drugs. Information regarding the following compounds can be found in The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,

25 Sixteenth Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, N.J. (1992) and in Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.

In a specific embodiment, the present invention is directed to the use of an MK61 polypeptide

30 and any of one or more NSAIDs for the treatment of TNF-responsive diseases, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases; and graft

WO 02/20762

PCT/US01/27631

versus host disease. NSAIDs owe their anti-inflammatory action, at least in part, to the inhibition of prostaglandin synthesis (Goodman and Gilman in "The Pharmacological Basis of Therapeutics," 5 MacMillan 7th Edition (1985)). NSAIDs can be characterized into at least nine groups: (1) salicylic acid derivatives; (2) propionic acid derivatives; (3) acetic acid derivatives; (4) fenamic acid derivatives; (5) carboxylic acid derivatives; 10 (6) butyric acid derivatives; (7) oxicams; (8) pyrazoles and (9) pyrazolones.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or 15 concurrent treatment) with any of one or more salicylic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. Such salicylic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: acetaminosalol, 20 aloxiprin, aspirin, benorylate, bromosaligenin, calcium acetylsalicylate, choline magnesium trisalicylate, magnesium salicylate, choline salicylate, diflusal, etersalate, fendosal, gentisic acid, glycol salicylate, imidazole salicylate, lysine acetylsalicylate, 25 mesalamine, morpholine salicylate, 1-naphthyl salicylate, olsalazine, parsalimide, phenyl acetylsalicylate, phenyl salicylate, salacetamide, salicylamide O-acetic acid, salsalate, sodium salicylate and sulfasalazine. Structurally related 30 salicylic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more propionic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The propionic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: alminoprofen, benoxaprofen, bucloxic acid, carprofen, dexindoprofen, fenoprofen, flunoxaprofen, fluprofen, flurbiprofen, furocloprofen, ibuprofen, ibuprofen aluminum, ibuprofen, indoprofen, isoprofen, ketoprofen, loxoprofen, miroprofen, naproxen, naproxen sodium, oxaprozin, piroxicam, piroxicam, piroxicam, pranoprofen, protizine acid, pyridoxipirofen, suprofen, tiaprofenic acid and tiaprofen. Structurally related propionic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more acetic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The acetic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: acetaminophen, alclufenac, amfenac, buprenorphine, cinmetacin, clopirac, delmetacin, diclofenac potassium, diclofenac sodium, etodolac, felbinac, fenclofenac, fenclorac, fenclozic acid, fentiazac, furofenac, glucametacin, ibufenac, indomethacin, isofezolac, isoxepac, lonazolac, metiazinic acid,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

oxametacin, oxpinac, pimetacin, proglumetacin, sulindac, talmetacin, tiaramide, tiopinac, tolmetin, tolmetin sodium, zidometacin and zomepirac.

Structurally related acetic acid derivatives having
5 similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or
10 concurrent treatment) with any of one or more fenamic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The fenamic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: enfenamic acid,
15 etofenamate, flufenamic acid, isonixin, meclofenamic acid, meclofenamate sodium, medofenamic acid, mefenamic acid, niflumic acid, talniflumate, terofenamate, tolfenamic acid and ufenamate. Structurally related fenamic acid derivatives having similar analgesic and
20 anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or
25 concurrent treatment) with any of one or more carboxylic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The carboxylic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof which can be
30 used comprise: clidanac, diflunisal, flufenisal, inoridine, ketorolac and tinoridine. Structurally related carboxylic acid derivatives having similar

WO 02/20762

PCT/US01/27631

analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

5 In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more butyric acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The butyric acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: bumadizon, 10 butibufen, fenbufen and xenbucin. Structurally related butyric acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

15 In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more oxicams, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The oxicams, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: 20 droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam and 4-hydroxyl-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide 4-(N-phenyl)-carboxamide. Structurally related oxicams having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group. 25

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide 30 in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more pyrazoles, prodrug esters or pharmaceutically

WO 02/20762

PCT/US01/27631

acceptable salts thereof. The pyrazoles, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof which may be used comprise: difenamizole and epirizole. Structurally related pyrazoles having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more pyrazolones, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The pyrazolones, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof which may be used comprise: apazone, azapropazone, benzpiperylon, feprazone, mofebutazone, morazone, oxyphenbutazone, phenylbutazone, pipebuzone, propylphenazone, ramifenazone, suxibuzone and thiazolinobutazone. Structurally related pyrazalones having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more of the following NSAIDs: s-acetamidocaproic acid, S-adenosylmethionine, 3-amino-4-hydroxybutyric acid, amixetrine, anitrazafen, antrafenine, bendazac, bendazac lysinate, benzydamine, beprozoin, broperamole, bucolome, bufezolac, ciproquazone, cloximate, dazidamine, deboxamet, detomidine, difenpiramide, difenpyramide, difisalamine, ditazol, emorfazone,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

fanetizole mesylate, fenflumizole, floctafenine, flumizole, flunixin, fluproquazone, fopirtoline, fosfosal, guaimesal, guaiazolene, isonixirn, lefetamine HCl, leflunomide, lofemizole, lotifazole, lysin

5 clonixinate, meseclazone, nabumetone, nictindole, nimesulide, orgotein, orpanoxin, oxaceprol, oxapadol, paranyline, perisoxal, perisoxal citrate, pifoxime, piroxalen, pirazolac, pirfenidone, proquazone, proxazole, thielavin B, tiflamizole, timegadine,

10 tolectin, tolpadol, tryptamid and those designated by company code number such as 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897,

15 MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (4-benzoyl-1-indancarboxylic acid), TVX2706, U60257, UR2301 and WY41770. Structurally related NSAIDs having similar analgesic and anti-

20 inflammatory properties to the NSAIDs are also intended to be encompassed by this group.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or

25 concurrent treatment) with any of one or more corticosteroids, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of TNF-responsive diseases, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases, graft versus

30 host disease and multiple sclerosis. Corticosteroids, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof include hydrocortisone and compounds which are

WO 02/20762

PCT/US01/27631

derived from hydrocortisone, such as 21-
 acetoxypregnenolone, alclomerasone, algestone,
 amcinonide, beclomethasone, betamethasone,
 betamethasone valerate, budesonide, chloroprednisone,
 5 clobetasol, clobetasol propionate, clobetasone,
 clobetasone butyrate, clocortolone, clocprednol,
 corticosterone, cortisone, cortivazol, deflazacort,
 desonide, desoximetasone, dexamethasone, diflorasone,
 diflucortolone, difluprednate, enoxolone, fluazacort,
 10 fluciloronide, flumethasone, flumethasone pivalate,
 flucinolone acetonide, flunisolide, fluocinonide,
 fluorocinolone acetonide, fluocortin butyl,
 fluocortolone, fluocortolone hexanoate, diflucortolone
 valerate, fluorometholone, fluperolone acetate,
 15 fluprednidene acetate, fluprednisolone, flurandrenolide,
 formocortol, halcinonide, halometasone, halopredone
 acetate, hydrocortamate, hydrocortisone, hydrocortisone
 acetate, hydrocortisone butyrate, hydrocortisone
 phosphate, hydrocortisone 21-sodium succinate,
 20 hydrocortisone tebutate, mazipredone, medrysone,
 meprednisone, methylprednisolone, mometasone furoate,
 paramethasone, prednicarbate, prednisolone,
 prednisolone 21-diedryaminoacetate, prednisolone sodium
 phosphate, prednisolone sodium succinate, prednisolone
 25 sodium 21-*m*-sulfobenzoate, prednisolone sodium 21-
 stearoglycolate, prednisolone tebutate, prednisolone
 21-trimethylacetate, prednisone, prednival,
 prednylidene, prednylidene 21-diethylaminoacetate,
 tixocortol, triamcinolone, triamcinolone acetonide,
 30 triamcinolone benetonide and triamcinolone
 hexacetonide. Structurally related corticosteroids
 having similar analgesic and anti-inflammatory
 properties are also intended to be encompassed by this

WO 02/20762

PCT/US01/27631

group.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment

5 or concurrent treatment) with any of one or more slow-acting antirheumatic drugs (SAARDs) or disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs), prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of TNF-responsive diseases, including acute

10 and chronic inflammation such as rheumatic diseases, graft versus host disease and multiple sclerosis. SAARDs or DMARDs, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: allocupreide sodium, auranofin, aurothioglucose, aurothioglycanide,

15 azathioprine, brequinar sodium, bucillamine, calcium 3-aurothio-2-propanol-1-sulfonate, chlorambucil; chloroquine, clobuzarit, cuproxoline, cyclophosphamide, cyclosporin, dapsone, 15-deoxyspergualin, diacerein, glucosamine, gold salts (e.g., cycloquine gold salt,

20 gold sodium thiomalate, gold sodium thiosulfate), hydroxychloroquine, hydroxychloroquine sulfate, hydroxyurea, kebuzone, lévamisole, lobenzarit, melittin, 6-mercaptopurine, methotrexate, mizoribine, mycophenolate mofetil, myoral, nitrogen mustard, D-

25 penicillamine, pyridinol imidazoles such as SKNF86002 and SB203580, rapamycin, thiols, thymopoietin and vincristine. Structurally related SAARDs or DMARDs having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this

30 group.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide

WO 02/20762

PCT/US01/27631

in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more COX2 inhibitors, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of TNF-responsive diseases, including acute and chronic inflammation. Examples of COX2 inhibitors, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof include, for example, celecoxib. Structurally related COX2 inhibitors having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In a more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a MK61 polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more antimicrobials, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of TNF-responsive diseases, including acute and chronic inflammation. Antimicrobials include, for example, the broad classes of penicillins, cephalosporins and other beta-lactams, aminoglycosides, azoles, quinolones, macrolides, rifamycins, tetracyclines, sulfonamides, lincosamides and polymyxins. The penicillins include, but are not limited to penicillin G, penicillin V, methicillin, nafcillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, floxacillin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, hetacillin, cyclacillin, bacampicillin, carbenicillin, carbenicillin indanyl, ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, azlocillin, mezlocillin, peperacillin, and mecillinam. The cephalosporins and other beta-lactams include, but are

WO 02/20762

PCT/US01/27631

not limited to cephalothin, cephapirin, cephalixin, cephradine, cefazolin, cefadroxil, cefaclor, cefamandole, cefotetan, cefoxitin, ceruroxime, cefonicid, ceforadine, cefixime, cefotaxime, 5 moxalactam, ceftizoxime, ceftriaxone, cephoerazone, ceftazidime, imipenem and aztreonam. The aminoglycosides include, but are not limited to streptomycin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin, kanamycin and neomycin. The azoles 10 include, but are not limited to fluconazole. The quinolones include, but are not limited to nalidixic acid, norfloxacin, enoxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin and temafloxacin. The macrolides include, but are not limited to erythromycin, spiramycin and 15 azithromycin. The rifamycins include, but are not limited to rifampin. The tetracyclines include, but are not limited to spicycline, chlortetracycline, clomocycline, demeclocycline, deoxycycline, guamecycline, lymecycline, meclocycline, methacycline, 20 minocycline, oxytetracycline, penimepicycline, pipacycline, rolitetracycline, sancycline, senociclin and tetracycline. The sulfonamides include, but are not limited to sulfanilamide, sulfamethoxazole, sulfacetamide, sulfadiazine, sulfisoxazole and co- 25 trimoxazole (trimethoprim/sulfamethoxazole). The lincosamides include, but are not limited to clindamycin and lincomycin. The polymyxins (polypeptides) include, but are not limited to polymyxin B and colistin.

30

MK61 Compositions and Administration

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Therapeutic compositions within the scope of the present invention include MK61 pharmaceutical compositions that may comprise a therapeutically effective amount of an MK61 polypeptide or an MK61 nucleic acid molecule in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration to a human or non-human animal such as a mammal. Pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of one or more MK61 selective binding agents in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration.

Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

The pharmaceutical composition may contain formulation materials for modifying, maintaining or preserving, for example, the pH, osmolality, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption or penetration of the composition. Suitable formulation materials include, but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine); antimicrobials; antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite or sodium hydrogen-sulfite); buffers (such as borate, bicarbonate, Tris-HCl, citrates, phosphates or other organic acids); bulking agents (such as mannitol or glycine); chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid

WO 02/20762

PCT/US01/27631

(EDTA)); complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin or hydroxypropyl-beta-cyclodextrin); fillers; monosaccharides; disaccharides; and other carbohydrates
5 (such as glucose, mannose or dextrans); proteins (such as serum albumin, gelatin or immunoglobulins); coloring, flavoring and diluting agents; emulsifying agents; hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone); low molecular weight
10 polypeptides; salt-forming counterions (such as sodium); preservatives (such as benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid or hydrogen peroxide); solvents (such as
15 glycerin, propylene glycol or polyethylene glycol); sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol); suspending agents; surfactants or wetting agents (such as pluronics, PEG, sorbitan esters, polysorbates such as polysorbate 20, polysorbate 80, triton,
20 tromethamine, lecithin, cholesterol, tyloxapal); stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol); tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides, preferably sodium or potassium chloride, mannitol sorbitol); delivery vehicles; diluents;
25 excipients and/or pharmaceutical adjuvants.
(*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).

The optimal pharmaceutical composition will be determined by one skilled in the art depending upon,
30 for example, the intended route of administration, delivery format and desired dosage. See, for example, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, *supra*. Such

WO 02/20762

PCT/US01/27631

compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release and rate of *in vivo* clearance of the MK61 molecule.

The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition may be either aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier may be water for injection, physiological saline solution or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may further include sorbitol or a suitable substitute therefor. In one embodiment of the present invention, MK61 polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional formulation agents (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the MK61 polypeptide product may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

The MK61 pharmaceutical compositions can be selected for parenteral delivery. Alternatively, the compositions may be selected for inhalation or for delivery through the digestive tract, such as orally, or through other delivery routes known in the art. The preparation of such pharmaceutically acceptable compositions is within the skill of the art.

The formulation components are present in

WO 02/20762

PCT/US01/27631

concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range of from
5 about 5 to about 8.

When parenteral administration is contemplated, the therapeutic compositions for use in this invention may be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution comprising the
10 desired MK61 molecule in a pharmaceutically acceptable vehicle. A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile distilled water in which an MK61 molecule is formulated as a sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another
15 preparation can involve the formulation of the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles, polymeric compounds (such as polylactic acid or polyglycolic acid), beads or liposomes, that provides for the
20 controlled or sustained release of the product which may then be delivered via a depot injection. Hyaluronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting sustained duration in the circulation. Other suitable means for the
25 introduction of the desired molecule include implantable drug delivery devices.

In one embodiment, a pharmaceutical composition may be formulated for inhalation. For example, an MK61 molecule may be formulated as a dry
30 powder for inhalation. MK61 polypeptide or MK61 nucleic acid molecule inhalation solutions may also be formulated with a propellant for aerosol delivery. In

WO 02/20762

PCT/US01/27631

yet another embodiment, solutions may be nebulized. Pulmonary administration is further described in PCT application no. PCT/US94/001875, which describes pulmonary delivery of chemically modified proteins.

5 It is also contemplated that certain formulations may be administered orally. In one embodiment of the present invention, MK61 molecules which are administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily
10 used in the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule may be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is maximized and pre-systemic
15 degradation is minimized. Additional agents can be included to facilitate absorption of the MK61 molecule. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders may also be
20 employed.

 Another pharmaceutical composition may involve an effective quantity of MK61 molecules in a mixture with non-toxic excipients which are suitable for the manufacture of tablets. By dissolving the
25 tablets in sterile water, or another appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit-dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium
30 phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, or talc.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Additional MK61 pharmaceutical compositions will be evident to those skilled in the art, including formulations involving MK61 polypeptides in sustained- or controlled-delivery formulations. Techniques for

5 formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, bio-erodible microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those skilled in the art. See for example, PCT Application No. PCT/US93/00829

10 which describes the controlled release of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions. Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles, e.g.

15 films, or microcapsules. Sustained release matrices may include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. 3,773,919 and EP 058,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman et al., *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), poly (2-hydroxyethyl-

20 methacrylate) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981) and Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)), ethylene vinyl acetate (Langer et al., *supra*) or poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988). Sustained release compositions may also include

25 liposomes, which can be prepared by any of several methods known in the art. See e.g., Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985); EP 036,676; EP 088,046 and EP 143,949.

30 The MK61 pharmaceutical composition to be used for in vivo administration typically must be sterile. This may be accomplished by filtration

WO 02/20762

PCT/US01/27631

through sterile filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using this method may be conducted either prior to or following lyophilization and reconstitution. The composition for parenteral administration may be stored in lyophilized form or in a solution. In addition, parenteral compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Once the pharmaceutical composition has been formulated, it may be stored in sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or lyophilized powder. Such formulations may be stored either in a ready-to-use form or in a form (e.g., lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits may each contain both a first container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation. Also included within the scope of this invention are kits containing single and multi-chambered pre-filled syringes (e.g., liquid syringes and lyosyringes).

The effective amount of an MK61 pharmaceutical composition to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives. One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon

WO 02/20762

PCT/US01/27631

the molecule delivered, the indication for which the MK61 molecule is being used, the route of administration, and the size (body weight, body surface or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician may titer the dosage and modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage may range from about 0.1 µg/kg to up to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage may range from 0.1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 5 µg/kg up to about 100 mg/kg.

The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the MK61 molecule in the formulation used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition may therefore be administered as a single dose, or as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages may be ascertained through use of appropriate dose-response data which is routinely obtained.

The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, e.g. orally, through injection by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenchymal),

WO 02/20762

PCT/US01/27631

intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems or by implantation devices. Where desired, the compositions may be administered by
5 bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

Alternatively or additionally, the composition may be administered locally via implantation of a membrane, sponge or another
10 appropriate material onto which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device may be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the desired molecule may be via diffusion,
15 timed-release bolus, or continuous administration.

In some cases, it may be desirable to use MK61 pharmaceutical compositions in an *ex vivo* manner. In such instances, cells, tissues or organs that have been removed from the patient are exposed to MK61
20 pharmaceutical compositions after which the cells, tissues and/or organs are subsequently implanted back into the patient.

In other cases, an MK61 polypeptide can be delivered by implanting certain cells that have been
25 genetically engineered, using methods such as those described herein, to express and secrete the polypeptide. Such cells may be animal or human cells, and may be autologous, heterologous, or xenogeneic. Optionally, the cells may be immortalized. In order to
30 decrease the chance of an immunological response, the cells may be encapsulated to avoid infiltration of

surrounding tissues. The encapsulation materials are typically biocompatible, semi-permeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of the protein product(s) but prevent the destruction of the
5 cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissues.

Additional embodiments of the present invention relate to cells and methods (e.g., homologous recombination and/or other recombinant production
10 methods) for both the in vitro production of therapeutic polypeptides and for the production and delivery of therapeutic polypeptides by gene therapy or cell therapy. Homologous and other recombination methods may be used to modify a cell that contains a
15 normally transcriptionally-silent MK61 gene, or an underexpressed gene, and thereby produce a cell which expresses therapeutically efficacious amounts of MK61 polypeptides.

Homologous recombination is a technique
20 originally developed for targeting genes to induce or correct mutations in transcriptionally active genes (Kucherlapati, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.*, 36:301, (1989)). The basic technique was developed as a method for introducing specific mutations into
25 specific regions of the mammalian genome (Thomas et al., *Cell*, 44:419-428 (1986); Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503-512 (1987); Doetschman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:8583-8587 (1988)) or to correct specific mutations within defective genes (Doetschman et al.,
30 *Nature*, 330:576-578 (1987)). Exemplary homologous recombination techniques are described in U.S. Patent No. 5,272,071 (EP 9193051, EP Publication No. 505500

WO 02/20762

PCT/US01/27631

and PCT/US90/07642, International Publication No.

WO 91/09955).

Through homologous recombination, the DNA sequence to be inserted into the genome can be directed to a specific region of the gene of interest by attaching it to targeting DNA. The targeting DNA is a nucleotide sequence that is complementary (homologous) to a region of the genomic DNA. Small pieces of targeting DNA that are complementary to a specific region of the genome are put in contact with the parental strand during the DNA replication process. It is a general property of DNA that has been inserted into a cell to hybridize and therefore, recombine with other pieces of endogenous DNA through shared homologous regions. If this complementary strand is attached to an oligonucleotide that contains a mutation or a different sequence or an additional nucleotide, it too is incorporated into the newly synthesized strand as a result of the recombination. As a result of the proofreading function, it is possible for the new sequence of DNA to serve as the template. Thus, the transferred DNA is incorporated into the genome.

Attached to these pieces of targeting DNA are regions of DNA which may interact with or control the expression of an MK61 polypeptide, e.g., flanking sequences. For example, a promoter/enhancer element, a suppressor or an exogenous transcription modulatory element is inserted in the genome of the intended host cell in proximity and orientation sufficient to influence the transcription of DNA encoding the desired MK61 polypeptide. The control element controls a

WO 02/20762

PCT/US01/27631

portion of the DNA present in the host cell genome.
Thus, the expression of the desired MK61 polypeptide
may be achieved not by transfection of DNA that encodes
the MK61 gene itself, but rather by the use of
5 targeting DNA (containing regions of homology with the
endogenous gene of interest), coupled with DNA
regulatory segments that provide the endogenous gene
sequence with recognizable signals for transcription of
an MK61 gene.

10 In an exemplary method, the expression of a
desired targeted gene in a cell (i.e., a desired
endogenous cellular gene) is altered via homologous
recombination into the cellular genome at a preselected
site by the introduction of DNA which includes at least
15 a regulatory sequence, an exon and a splice donor site.
These components are introduced into the chromosomal
(genomic) DNA in such a manner that this, in effect,
results in the production of a new transcription unit
(in which the regulatory sequence, the exon and the
20 splice donor site present in the DNA construct are
operatively linked to the endogenous gene). As a
result of the introduction of these components into the
chromosomal DNA, the expression of the desired
endogenous gene is altered.

25 Altered gene expression, as described herein,
encompasses activating (or causing to be expressed) a
gene which is normally silent (unexpressed) in the cell
as obtained, as well as increasing the expression of a
gene which is not expressed at physiologically
30 significant levels in the cell as obtained. The
embodiments further encompass changing the pattern of

WO 02/20762

PCT/US01/27631

regulation or induction such that it is different from the pattern of regulation or induction that occurs in the cell as obtained, and reducing (including eliminating) the expression of a gene which is
5 expressed in the cell as obtained.

One method by which homologous recombination can be used to increase, or cause, MK61 polypeptide production from a cell's endogenous MK61 gene involves first using homologous recombination to place a
10 recombination sequence from a site-specific recombination system (e.g., Cre/loxP, FLP/FRT) (see, Sauer, *Current Opinion In Biotechnology*, 5:521-527 (1994) and Sauer, *Methods In Enzymology*, 225:890-900 (1993)) upstream (that is, 5' to) of the cell's
15 endogenous genomic MK61 polypeptide coding region. A plasmid containing a recombination site homologous to the site that was placed just upstream of the genomic MK61 polypeptide coding region is introduced into the modified cell line along with the appropriate
20 recombinase enzyme. This recombinase enzyme causes the plasmid to integrate, via the plasmid's recombination site, into the recombination site located just upstream of the genomic MK61 polypeptide coding region in the cell line (Baubonis and Sauer, *Nucleic Acids Res.*,
25 21:2025-2029, 1993 and O'Gorman *et al.*, *Science*, 251:1351-1355 (1991)). Any flanking sequences known to increase transcription (e.g., enhancer/promoter, intron or translational enhancer), if properly positioned in this plasmid, would integrate in such a manner as to
30 create a new or modified transcriptional unit resulting in de novo or increased MK61 polypeptide production from the cell's endogenous MK61 gene.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

A further method to use the cell line in which the site-specific recombination sequence has been placed just upstream of the cell's endogenous genomic MK61 polypeptide coding region is to use homologous recombination to introduce a second recombination site elsewhere in the cell line's genome. The appropriate recombinase enzyme is then introduced into the two-recombination-site cell line, causing a recombination event (deletion, inversion, or translocation) (Sauer, *Current Opinion In Biotechnology*, *supra* (1994) and Sauer, *Methods In Enzymology*, *supra*, (1993)) that would create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased MK61 polypeptide production from the cell's endogenous MK61 gene.

15 An additional approach for increasing, or causing, the expression of MK61 polypeptide from a cell's endogenous MK61 gene involves increasing, or causing, the expression of a gene or genes (e.g., transcription factors) and/or decreasing the expression of a gene or genes (e.g., transcriptional repressors) in a manner which results in *de novo* or increased MK61 polypeptide production from the cell's endogenous MK61 gene. This method includes the introduction of a non-naturally occurring polypeptide (e.g., a polypeptide comprising a site-specific DNA binding domain fused to a transcriptional factor domain) into the cell such that *de novo* or increased MK61 polypeptide production from the cell's endogenous MK61 gene results.

30 The present invention further relates to DNA constructs useful in the method of altering expression of a target gene. In certain embodiments, the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

exemplary DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences; (b) a regulatory sequence; (c) an exon and (d) an unpaired splice-donor site. The targeting sequence in the DNA construct directs the integration of elements (a)-(d) into a target gene in a cell such that the elements (b)-(d) are operatively linked to sequences of the endogenous target gene. In another embodiment, the DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, (d) a splice-donor site, (e) an intron and (f) a splice-acceptor site, wherein the targeting sequence directs the integration of elements (a)-(f) such that the elements of (b)-(f) are operatively linked to the endogenous gene. The targeting sequence is homologous to the preselected site in the cellular chromosomal DNA with which homologous recombination is to occur. In the construct, the exon is generally 3' of the regulatory sequence and the splice-donor site is 3' of the exon.

If the sequence of a particular gene is known, such as the nucleic acid sequence of MK61 polypeptide presented herein, a piece of DNA that is complementary to a selected region of the gene can be synthesized or otherwise obtained, such as by appropriate restriction of the native DNA at specific recognition sites bounding the region of interest. This piece serves as a targeting sequence(s) upon insertion into the cell in that it will hybridize to its homologous region within the genome. It is conventionally believed that if this hybridization occurs during DNA replication, this piece of DNA, and any additional sequence attached thereto, will act as

WO 02/20762

PCT/US01/27631

an Okazaki fragment and will be incorporated into the newly synthesized daughter strand of DNA. The present invention, therefore, includes nucleotides encoding a MK61 polypeptide, which nucleotides may be used as
5 targeting sequences.

MK61 polypeptide cell therapy, e.g., the implantation of cells producing MK61 polypeptides, is also contemplated. This embodiment involves implanting cells capable of synthesizing and secreting a
10 biologically active form of MK61 polypeptide. Such MK61 polypeptide-producing cells can be cells that are natural producers of MK61 polypeptides or may be recombinant cells whose ability to produce MK61 polypeptides has been augmented by transformation with
15 a gene encoding the desired MK61 polypeptide or with a gene augmenting the expression of MK61 polypeptide. Such a modification may be accomplished by means of a vector suitable for delivering the gene as well as promoting its expression and secretion. In order to
20 minimize a potential immunological reaction in patients being administered an MK61 polypeptide, as may occur with the administration of a polypeptide of a foreign species, it is preferred that the natural cells producing MK61 polypeptide be of human origin and
25 produce human MK61 polypeptide. Likewise, it is preferred that the recombinant cells producing MK61 polypeptide be transformed with an expression vector containing a gene encoding a human MK61 polypeptide.

Implanted cells may be encapsulated to avoid
30 the infiltration of surrounding tissue. Human or non-human animal cells may be implanted in patients in

WO 02/20762

PCT/US01/27631

biocompatible, semipermeable polymeric enclosures or in membranes that allow the release of MK61 polypeptide but prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors
5 from the surrounding tissue. Alternatively, the patient's own cells, transformed to produce MK61 polypeptides ex vivo, may be implanted directly into the patient without such encapsulation.

Techniques for the encapsulation of living
10 cells are known in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be routinely accomplished. For example, Baetge et al. (WO 95/05452 and PCT/US94/09299) describe membrane capsules containing genetically engineered cells for
15 the effective delivery of biologically active molecules. The capsules are biocompatible and are easily retrievable. The capsules encapsulate cells transfected with recombinant DNA molecules comprising DNA sequences coding for biologically active molecules
20 operatively linked to promoters that are not subject to down-regulation in vivo upon implantation into a mammalian host. The devices provide for delivery of the molecules from living cells to specific sites within a recipient. In addition, see U.S. Patent Nos.
25 4,892,538, 5,011,472 and 5,106,627. A system for encapsulating living cells is described in PCT Application no. PCT/US91/00157 of Aebischer et al. See also, PCT Application no. PCT/US91/00155 of Aebischer et al.; Winn et al., *Exper. Neurol.*, 113:322-329
30 (1991), Aebischer et al., *Exper. Neurol.*, 111:269-275 (1991); and Tresco et al., *ASAIO*, 38:17-23 (1992).

WO 02/20762

PCT/US01/27631

In vivo and in vitro gene therapy delivery of MK61 polypeptides is also envisioned. One example of a gene therapy technique is to use the MK61 gene (either genomic DNA, cDNA and/or synthetic DNA) encoding an

5 MK61 polypeptide which may be operably linked to a constitutive or inducible promoter to form a "gene therapy DNA construct". The promoter may be homologous or heterologous to the endogenous MK61 gene, provided that it is active in the cell or tissue type into which

10 the construct will be inserted. Other components of the gene therapy DNA construct may optionally include, DNA molecules designed for site-specific integration (e.g., endogenous sequences useful for homologous recombination); tissue-specific promoter, enhancer(s)

15 or silencer(s); DNA molecules capable of providing a selective advantage over the parent cell; DNA molecules useful as labels to identify transformed cells; negative selection systems; cell-specific binding agents (as, for example, for cell targeting); cell-

20 specific internalization factors; and transcription factors to enhance expression by a vector, as well as factors to enable vector manufacture.

A gene therapy DNA construct can then be introduced into cells (either ex vivo or in vivo) using

25 viral or non-viral vectors. One means for introducing the gene therapy DNA construct is by means of viral vectors as described herein. Certain vectors, such as retroviral vectors, will deliver the DNA construct to the chromosomal DNA of the cells, and the gene can

30 integrate into the chromosomal DNA. Other vectors will function as episomes, and the gene therapy DNA construct will remain unintegrated.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

In yet other embodiments, regulatory elements can be included for the controlled expression of the MK61 gene in the target cell. Such elements are turned on in response to an appropriate effector. In this way, a therapeutic polypeptide can be expressed when desired. One conventional control means involves the use of small molecule dimerizers or rapalogs (as described in WO9641865 (PCT/US96/099486); WO9731898 (PCT/US97/03137) and WO9731899 (PCT/US95/03157)) used to dimerize chimeric proteins which contain a small molecule-binding domain and a domain capable of initiating biological process, such as a DNA-binding protein or a transcriptional activation protein. The dimerization of the proteins can be used to initiate transcription of the transgene.

An alternative regulation technology uses a method of storing proteins expressed from the gene of interest inside the cell as an aggregate or cluster. The gene of interest is expressed as a fusion protein that includes a conditional aggregation domain which results in the retention of the aggregated protein in the endoplasmic reticulum. The stored proteins are stable and inactive inside the cell. The proteins can be released, however, by administering a drug (e.g., small molecule ligand) that removes the conditional aggregation domain and thereby specifically breaks apart the aggregates or clusters so that the proteins may be secreted from the cell. See, *Science* 287:816-817 and 826-830 (2000).

Other suitable control means or gene switches include, but are not limited to, the following systems.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Mifepristone (RU486) is used as a progesterone antagonist. The binding of a modified progesterone receptor ligand-binding domain to the progesterone antagonist activates transcription by forming a dimer
5 of two transcription factors which then pass into the nucleus to bind DNA. The ligand-binding domain is modified to eliminate the ability of the receptor to bind to the natural ligand. The modified steroid hormone receptor system is further described in U.S.
10 5,364,791; WO9640911 and WO9710337.

Yet another control system uses ecdysone (a fruit fly steroid hormone) which binds to and activates an ecdysone receptor (cytoplasmic receptor). The receptor then translocates to the nucleus to bind a
15 specific DNA response element (promoter from ecdysone-responsive gene). The ecdysone receptor includes a transactivation domain/DNA-binding domain/ligand-binding domain to initiate transcription. The ecdysone system is further described in U.S. Patent No.
20 5,514,578; WO9738117; WO9637609; and WO9303162.

Another control means uses a positive tetracycline-controllable transactivator. This system involves a mutated tet repressor protein DNA-binding domain (mutated tet R-4 amino acid changes which
25 resulted in a reverse tetracycline-regulated transactivator protein, i.e., it binds to a tet operator in the presence of tetracycline) linked to a polypeptide which activates transcription. Such systems are described in U.S. Patent Nos. 5,464,758;
30 5,650,298, and 5,654,168.

Additional expression control systems and

WO 02/20762

PCT/US01/27631

nucleic acid constructs are described in U.S. Patent Nos. 5,741,679 and 5,834,186, to Innovir Laboratories Inc.

In vivo gene therapy may be accomplished by introducing the gene encoding an MK61 polypeptide into cells via local injection of an MK61 nucleic acid molecule or by other appropriate viral or non-viral delivery vectors (Hefti, *Neurobiology*, 25:1418-1435 (1994)). For example, a nucleic acid molecule encoding an MK61 polypeptide may be contained in an adeno-associated virus (AAV) vector for delivery to the targeted cells (e.g., Johnson, International Publication No. WO95/34670 and International Application No. PCT/US95/07178). The recombinant AAV genome typically contains AAV inverted terminal repeats flanking a DNA sequence encoding an MK61 polypeptide operably linked to functional promoter and polyadenylation sequences.

Alternative suitable viral vectors include, but are not limited to, retrovirus, adenovirus, herpes simplex virus, lentivirus, hepatitis virus, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alphavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramyxovirus, and papilloma virus vectors. U.S. Patent No. 5,672,344 describes an *in vivo* viral-mediated gene transfer system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic protein by the delivery of human cells which have been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for the practice of

WO 02/20762

PCT/US01/27631

gene therapy techniques are described in U.S. Patent No. 5,631,236 involving adenoviral vectors; U.S. Patent No. 5,672,510 involving retroviral vectors; and U.S. Patent No. 5,635,399 involving retroviral vectors

5 expressing cytokines.

Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated transfer, naked DNA delivery (direct injection), receptor-mediated transfer (ligand-DNA complex), electroporation, calcium
10 phosphate precipitation, and microparticle bombardment (e.g., gene gun). Gene therapy materials and methods may also include the use of inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for site-specific integration, DNA sequences
15 capable of providing a selective advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems (safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization
20 factors, and transcription factors to enhance expression by a vector as well as methods of vector manufacture. Such additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent No. 4,970,154 involving electroporation
25 techniques; WO96/40958 involving nuclear ligands; U.S. Patent No. 5,679,559 describing a lipoprotein-containing system for gene delivery; U.S. Patent No. 5,676,954 involving liposome carriers; U.S. Patent No. 5,593,875 concerning methods for calcium phosphate
30 transfection; and U.S. Patent No. 4,945,050 wherein biologically active particles are propelled at cells at a speed whereby the particles penetrate the surface of

WO 02/20762

PCT/US01/27631

the cells and become incorporated into the interior of the cells.

It is also contemplated that MK61 gene therapy or cell therapy can further include the
5 delivery of one or more additional polypeptide(s) in the same or a different cell(s). Such cells may be separately introduced into the patient, or the cells may be contained in a single implantable device, such as the encapsulating membrane described above, or the
10 cells may be separately modified by means of viral vectors.

A means to increase endogenous MK61 polypeptide expression in a cell via gene therapy is to insert one or more enhancer element(s) into the MK61
15 polypeptide promoter, where the enhancer element(s) can serve to increase transcriptional activity of the MK61 gene. The enhancer element(s) used will be selected based on the tissue in which one desires to activate the gene(s); enhancer element(s) known to confer
20 promoter activation in that tissue will be selected. For example, if a gene encoding an MK61 polypeptide is to be "turned on" in T-cells, the *lck* promoter enhancer element may be used. Here, the functional portion of the transcriptional element to be added may be inserted
25 into a fragment of DNA containing the MK61 polypeptide promoter (and optionally, inserted into a vector and/or 5' and/or 3' flanking sequence(s), etc.) using standard cloning techniques. This construct, known as a "homologous recombination construct", can then be
30 introduced into the desired cells either *ex vivo* or *in vivo*.

Gene therapy also can be used to decrease

WO 02/20762

PCT/US01/27631

MK61 polypeptide expression by modifying the nucleotide sequence of the endogenous promoter(s). Such modification is typically accomplished via homologous recombination methods. For example, a DNA molecule

5 containing all or a portion of the promoter of the MK61 gene(s) selected for inactivation can be engineered to remove and/or replace pieces of the promoter that regulate transcription. For example the TATA box and/or the binding site of a transcriptional activator

10 of the promoter may be deleted using standard molecular biology techniques; such deletion can inhibit promoter activity thereby repressing the transcription of the corresponding MK61 gene. The deletion of the TATA box or the transcription activator binding site in the

15 promoter may be accomplished by generating a DNA construct comprising all or the relevant portion of the MK61 polypeptide promoter(s) (from the same or a related species as the MK61 gene(s) to be regulated) in which one or more of the TATA box and/or

20 transcriptional activator binding site nucleotides are mutated via substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides. As a result, the TATA box and/or activator binding site has decreased activity or is rendered completely inactive. The construct will

25 typically contain at least about 500 bases of DNA that correspond to the native (endogenous) 5' and 3' DNA sequences adjacent to the promoter segment that has been modified. The construct may be introduced into the appropriate cells (either *ex vivo* or *in vivo*)

30 either directly or via a viral vector as described herein. Typically, the integration of the construct into the genomic DNA of the cells will be via homologous recombination, where the 5' and 3' DNA

WO 02/20762

PCT/US01/27631

sequences in the promoter construct can serve to help integrate the modified promoter region via hybridization to the endogenous chromosomal DNA.

5 Additional Uses of MK61 Nucleic Acids
and Polypeptides

Nucleic acid molecules of the present invention (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides) may be used to
10 map the locations of the MK61 gene and related genes on chromosomes. Mapping may be done by techniques known in the art, such as PCR amplification and *in situ* hybridization.

MK61 nucleic acid molecules (including those
15 that do not themselves encode biologically active polypeptides), may be useful as hybridization probes in diagnostic assays to test, either qualitatively or quantitatively, for the presence of an MK61 DNA or corresponding RNA in mammalian tissue or bodily fluid
20 samples.

The present invention thus provides reagents for use in diagnostic applications. The human MK61 gene has been localized to chromosome band 19q13. More specifically, the gene locates to a region within, or
25 close to, 19q13.1. Several other genes of interest have been localized to this region of chromosome 19, including the human leukocyte receptor cluster (LRC) which has been demonstrated to contain 19 genes encoding leukocyte-expressed receptors of the
30 immunoglobulin (Ig) superfamily, the human Kir2.4 inwardly rectifying potassium channel gene (KCNJ14), the human killer cell inhibitory receptor gene KIR103,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

the ribosomal protein S19 gene, prostase, and Protease Serine-Like 1. MK61 is a candidate for the diseases and disorders recited herein including Cystinuria, Congenital nephrotic syndrome, Familial nephrotic syndrome, Familial focal segmental glomerulosclerosis, 5 familial Wilms tumor FWT2, B-cell lymphoma-associated hemophagocytic syndrome, Camurati-Engelmann disease, progressive diaphyseal dysplasia, hereditary spastic paraplegia, asthma, heart defects, eye development, systemic lupus erythematosus (hSLE1), primary 10 microcephaly (MCPH2), autosomal recessive spondylocostal dysostosis, cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus, acute myelogenous leukemia, B-cell lymphoma associated with haemophagocytic 15 syndrome, multiple myeloma, testicular germ cell tumors, malignant glioma, familial benign hypercalcemia, the MK61 gene, a probe comprising MK61 DNA or RNA can be used to determine if the MK61 gene is present on chromosome 19, or if a mutation has 20 occurred. Detectable chromosomal aberrations at the MK61 gene locus include, but are not limited to, aneuploidy, gene copy number changes, insertions, deletions, restriction site changes and rearrangements. These aberrations can occur within the coding sequence, 25 within introns, or within flanking sequences, including upstream promoter and regulatory regions, and may be manifested as physical alterations within a coding sequence or changes in gene expression level. Analytical probes will generally be at least 20 30 nucleotides in length, although somewhat shorter probes (14-17 nucleotides) can be used. PCR primers are at least 5 nucleotides in length, preferably 15 or more nucleotides, more preferably 20-30 nucleotides in

WO 02/20762

PCT/US01/27631

length. Short polynucleotides can be used when a small region of the gene is targeted for analysis. For gross analysis of genes, a polynucleotide probe may comprise an entire exon or more. Probes will generally comprise

5 a polynucleotide linked to a signal-generating moiety such as a radionucleotide. In general, these diagnostic methods comprise the steps of (a) obtaining a genetic sample from a patient; (b) incubating the genetic sample with a polynucleotide probe or primer as

10 disclosed above, under conditions wherein the polynucleotide will hybridize to complementary polynucleotide sequence, to produce a first reaction product; and (c) comparing the first reaction product to a control reaction product. A difference between

15 the first reaction product and the control reaction product is indicative of a genetic abnormality in the patient. Genetic samples for use within the present invention include genomic DNA, cDNA, and RNA. The polynucleotide probe or primer can be RNA or DNA, and

20 will comprise a portion of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15, the complement of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15, or

25 an RNA equivalent thereof. Suitable assay methods in this regard include molecular genetic techniques known to those in the art, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, short tandem repeat (STR) analysis employing PCR techniques,

30 ligation chain reaction (Barany, *PCR Methods and Applications* 1:5-16 (1991)), ribonuclease protection assays, and other genetic linkage analysis techniques known in the art. See Sambrook et al., *Id.*; Ausubel et.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

al., *Id.*, and A.J. Marian, *Chest* 108:255-65 (1995).
Ribonuclease protection assays (Ausubel et al., *Id.*,
ch. 4) comprise the hybridization of an RNA probe to a
patient RNA sample, after which the reaction product
5 (RNA-RNA) hybrid) is exposed to RNase. Hybridized
regions of the RNA are protected from digestion.
Within PCR assays, a patient genetic sample is
incubated with a pair of oligonucleotide primers, and
the region between the primers is amplified and
10 recovered. Changes in size, amount, or sequence of
recovered product are indicative of mutations in the
patient. Another PCR-based technique that can be
employed is single strand conformational polymorphism
(SSCP) analysis. See Hayashi, *PCR Methods and*
15 *Applications* 1:34-38 (1991).

Assays for MK61 protein in serum may be used
to detect the diseases and disorders recited herein.
Those skilled in the art will recognize that conditions
related to MK61 underexpression or overexpression may
20 be amenable to treatment by therapeutic manipulation of
MK61 protein levels.

The MK61 polypeptides may be used
(simultaneously or sequentially) in combination with
one or more cytokines, growth factors, antibiotics,
25 anti-inflammatories and/or chemotherapeutic agents as
is appropriate for the indication being treated.

Other methods may also be employed where it
is desirable to inhibit the activity of one or more
MK61 polypeptides. Such inhibition may be effected by
30 nucleic acid molecules which are complementary to and
which hybridize to expression control sequences (triple
helix formation) or to MK61 mRNA. For example,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

antisense DNA or RNA molecules, which have a sequence that is complementary to at least a portion of the selected MK61 gene(s) can be introduced into the cell. Anti-sense probes may be designed by available techniques using the sequence of MK61 polypeptide disclosed herein. Typically, each such antisense molecule will be complementary to the start site (5' end) of each selected MK61 gene. When the antisense molecule then hybridizes to the corresponding MK61 mRNA, translation of this mRNA is prevented or reduced. Anti-sense inhibitors provide information relating to the decrease or absence of an MK61 polypeptide in a cell or organism.

Alternatively, gene therapy may be employed to create a dominant-negative inhibitor of one or more MK61 polypeptides. In this situation, the DNA encoding a mutant polypeptide of each selected MK61 polypeptide can be prepared and introduced into the cells of a patient using either viral or non-viral methods as described herein. Each such mutant is typically designed to compete with endogenous polypeptide in its biological role.

In addition, an MK61 polypeptide, whether biologically active or not, may be used as an immunogen, that is the polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised. Selective binding agents that bind to an MK61 polypeptide (as described herein) may be used for *in vivo* and *in vitro* diagnostic purposes, including but not limited to, use in labeled form to detect the presence of MK61 polypeptide in a body fluid or cell sample. The antibodies may also be used to prevent,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

treat or diagnose a number of diseases and disorders, including those recited herein. The antibodies may bind to an MK61 polypeptide so as to diminish or block at least one activity characteristic of an MK61 polypeptide, or may bind to a polypeptide to increase at least one activity characteristic of an MK61 polypeptide (including by increasing the pharmacokinetics of the MK61 polypeptide).

The following examples are intended for illustration purposes only and should not be construed as limiting the scope of the invention in any way.

EXAMPLE 1
Isolation of human MK61 cDNA clones

A TNF receptor family profile search of the Amgen EST database was performed. One human EST sequence (G-0042-B7) was identified as a possible member of the TNF receptor family name as MK61. The full-length human clone was subsequently PCR amplified from a human lymphnode library using the following primers: human MK61 sense primer (5'-GGTGACCACCTCGTGGGCAACGTCT-3'; SEQ ID NO: 21), antisense primer (5'-GCCCAATTAGGATTGTACAAGAAG-3; SEQ ID NO: 22) under standard conditions known in the art. Poly (A)+ RNA from the human lymph node was reverse-transcribed, and the cDNAs were synthesized using the Smart RACE cDNA amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA) according to the manufacturer's instructions. The full-length cDNA of the human MK61 gene was cloned into the pcDNA3 vector for mammalian cell expression (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced using standard methods. The name of the clone is pcdna3huMK61#5 and

WO 02/20762

PCT/US01/27631

it contains the human MK61 T1 isoform cDNA.

The human MK61 cDNA sequence is 1668 nucleotides (SEQ ID NO: 1) and encodes a 355 amino acid polypeptide (SEQ ID NO: 2). The polypeptide (denoted
5 herein as hMK61T1; see Figure 1) contains a signal peptide spanning residues 1-23, a cysteine rich domain spanning residues 26-60 that matches the TNFR superfamily cysteine-rich region signature (Madry et al. INTERNATIONAL IMMUNOLOGY.10:1693-1702,1998, and
10 references therein), a transmembrane domain spanning residues 157-185, and a long intracellular domain. Careful alignment of all available human MK61 matching cDNA and genomic sequences available in public databases, Amgen internal databases, and the Celera
15 database, identified five additional full length human MK61 isoforms (denoted herein as human MK61T2, MK61T3, MK61T4, MK61T5, and MK61T6).

hMK61T2 polynucleotide sequence is 1525 nucleotides (SEQ ID NO: 3) and encodes a polypeptide of
20 85 amino acids (SEQ ID NO: 4) containing a signal peptide (residues 1-23) but not a predicted transmembrane domain, suggesting that this isoform may encode a secreted polypeptide (Figure 2). hMK61T2 contains cysteine rich domain spanning residues 26-51
25 that exhibit an imperfect match (5 out of 6 cysteine match) to the TNFR superfamily cysteine-rich region signature. hMK61T3 polynucleotide sequence is 1289 nucleotides (SEQ ID NO: 5) and encodes a 136 amino acid residue polypeptide (SEQ ID NO: 6) containing a signal
30 peptide (residues 1-23) but not contain a predicted transmembrane domain, suggesting that this isoform may encode a secreted polypeptide (Figure 3). hMK61T3 contains a cysteine rich domain spanning residues 26-60

WO 02/20762

PCT/US01/27631

that matches the TNFR superfamily cysteine-rich region signature. hMK61T4 polynucleotide sequence is 1164 nucleotides (SEQ ID NO: 7) and encodes a 187 amino acid residues polypeptide (SEQ ID NO: 8) containing a signal peptide (residues 1-23) but not a predicted transmembrane domain, suggesting that this isoform may encode a secreted polypeptide (Figure 4). hMK61T4 contains cysteine rich domain spanning residues 26-51 that exhibit an imperfect match (5 out of 6 cysteine match) to the TNFR superfamily cysteine-rich region signature. hMK61T5 polynucleotide sequence is 1483 nucleotides (SEQ ID NO: 9) and encodes an 71 amino acid residues polypeptide (SEQ ID NO: 10) with a signal peptide (residues 1-23) but not a predicted transmembrane domain, suggesting that this isoform may encode a secreted polypeptide (Figure 5). hMK61T5 contains a cysteine rich domain spanning residues 26-57 that matches the TNFR superfamily cysteine-rich region signature but varies slightly from that of hMK61T1. hMK61T6 polynucleotide sequence is 1104 nucleotides (SEQ ID NO: 11) and encodes a 167 amino acid residues polypeptide (SEQ ID NO: 12) containing a signal peptide (residues 1-23) but not a predicted transmembrane domain, suggesting that this isoform may encode a secreted polypeptide (Figure 6). hMK61T6 contains cysteine rich domain spanning residues 26-51 that exhibit an imperfect match (5 out of 6 cysteine match) to the TNFR superfamily cysteine-rich region signature.

Interestingly all the human MK61 isoforms contain a complete or partial TNFR-type cysteine rich domain which may constitute part of the ligand-binding domain. Hence, while hMK61T1 appears to encode a bona fide novel TNFR family member cell-surface receptor,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

human isoforms MK61T2-T6 appear to encode secreted receptors. Secreted receptors may function as decoy-receptors which prevent the unknown MK61 ligand from interacting with its receptor as it was previously demonstrated for Osteoprotegerin (OPG).
Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. (Lacey *et al.* Cell:93: 165-176, 1998). In addition, the MK61T1-T6 isoforms may bind and regulate reverse signaling through the unknown MK61 ligand.

EXAMPLE 2

Isolation of Murine MK61 cDNA Clone

A TNF receptor family profile search of the Amgen EST database was performed as described above in Example 1. One human EST sequence (G-0042-B7) was identified as a possible member of the TNF receptor family name as MK61. The full-length murine MK61 clone was PCR amplified from a mouse A20 cell library using the following primers: mouse sense primer (5'-CGGACGCGTGGGCGGACGCGTGGG-3' SEQ ID NO: 23) antisense primer (5'-AGCAAACCTCTGACTCAGCCAAGTT-3'; SEQ ID NO: 24) under standard conditions known in the art. Poly (A)+ RNA from the mouse B lymphoma cell line A20 was reverse-transcribed, and the cDNA was synthesized using the Smart RACE cDNA amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA) according to the manufacturer's instructions. The full-length cDNA of the mouse gene was cloned into the pCDNA3 vector for mammalian cell expression (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced using standard methods.

The murine MK61 polynucleotide sequence is 1202 nucleotides (SEQ ID NO: 13) and encodes a 345 amino

WO 02/20762

PCT/US01/27631

acid polypeptide (SEQ ID NO:14). The murine MK61T1 polypeptide is a cell surface receptor which has a signal sequence spanning residues 1 to 21 and a transmembrane domain (Figure 7).

5

EXAMPLE 3
Tissue Distribution of hMK61 mRNA

10 MK61 mRNA distribution was determined by Northern blot analysis and quantitative PCR. Human peripheral blood T cells, B cells and monocytes were purified by Rosette Sep enrichment cocktail (Stem Cell Technologies) according to the manufacturer's

15 instructions. Human Burkitt's Lymphoma cells, Raji cells, T lymphoma cells, Jukat cells, K562 cells and U937 cells were obtained from the ATCC (Rockville, MD). Total RNA was isolated from these cells by the Rneasy Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the

20 manufacturer's instructions.

Northern blots analysis was performed using standard conditions known in the art. Multiple tissue Northern blot and multiple tissue cDNAs were purchased from Clontech (Palo Alto, CA). The Northern blots were

25 hybridized with random primed human and mouse MK61 radioactive probes for 3 hours at 55°C, and then washed with several changes of 2X SSC/0.1% SDS followed by 0.1X SSC/0.1% SDS for 30 minutes.

The Northern blot analysis demonstrated that

30 hMK61 was predominantly expressed in peripheral lymphoid organs, spleen, lymph nodes, thymus, bone marrow, in peripheral blood leukocytes, as well as in fetal liver. (See figures 13 and 14) Several different MK61 isoforms were expressed in those organs but the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

major transcript was 1.6 kbp.

Real-time quantitative PCR was carried out on various human tissues and cell lines. This assay uses a fluorogenic probe and PCR primers to enable the detection of a specific PCR product. The PCR primers and the probe were designed using PE Biosystems' Primer Express software and were synthesized by Amgen Boulder as requested. Oligonucleotide primers specific and probes for human MK61 (Probe #2288-23 ETT CCC AGT TTT TCA TCT GCA CTG CCA X (SEQ ID NO: 40); 5' primer #2288-22 TGC TGG ACC CAA CAC AAA TG (SEQ ID NO: 41); 3' primer #2288-24 TGC CAT CCA ACC ACT CAG TC (SEQ ID NO: 42)) and human cyclophilin (Probe #2661-92 ECT GCC TGC TGC CTG GTC CAC CTX (SEQ ID NO: 43), 5' primer #2661-90 ACA CCT GGC CGC AAG ATA TG (SEQ ID NO: 44); 3' primer: #2661-91 GAC TCG GCC TCA GCG AAT AG (SEQ ID NO: 45)) were used as primers for Taqman. Following the PE Biosystems' standard protocol, the Taqman PCR reactions were performed on ABI PRISM 7700 instrument and the data were analyzed by PE Biosystems's Sequence Detection System software (See Figure 15).

Human MK61 mRNA expression was the greatest in monozytic cells, B cells, lymph nodes, spleen and T cells. Intermediate levels of human MK61 mRNA expression were detected in liver, bone marrow, thymus, tonsil, and fetal liver. Low levels of human MK61 mRNA were detected in lung, placenta and Jurkat cells. Interestingly, the expression of human MK61 mRNA was higher in primary B cells, T cells and monozytic cells than in the corresponding tumor cells lines Raji, K562 and U937. This expression pattern would be consistent with the notion that MK61 expression is lymphoid-specific and may be downregulated in tumor cells.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

EXAMPLE 4Preparation of the mMK61-Fc Fusion Construct

5 portion of Smil2-00051-f3 was subcloned into the PEFBOS
vector (pEF-BOS; a powerful mammalian expression
vector; Mizushima et al. *Nuc. Acids Res.* 18: 5322,
1990), and an Fc portion was attached at the end of the
gene. The nucleotide sequence encoding the mMK61-Fc is
10 set out as SEQ ID NO: 15. Transfection was performed
using Bio-Rad Cytofectene as a transfection reagent.
The condition medium was collected 48 hours after the
transfection, and CM was 10X concentrated by Centricon
10 columns (Millipore Corp., Bedford, MA). The samples
15 loaded in lanes 6, 7, and 8 were the concentrated
conditioned media (See Figure 9).

The mMK61 Fc fusion protein (SEQ ID NO: 16)
was detected by an anti-human IgG(Fc) (Pierce), at a
dilution of 1:3000, and then visualized by enhanced
20 chemical luminescence (ECL). The exposure time was 15
seconds. 2933 cell lysate was used as a positive
control and was prepared as follows: 293 cells
(available under ATCC Accession Number CRL-1573) were
suspended in 200µl 2XSDS loading buffer, and were
25 heated. The cell lysates (5 µl) was then loaded into
each lane. The Western blot (Figure 9) indicates that
the MK61-Fc fusion protein was secreted and is
detectable in the cellular conditioned media.

30

EXAMPLE 5Production and purification of recombinant MK61-FcFusion ProteinsA. Cloning and Bacterial Expression of Human MK61-Fc

WO 02/20762

PCT/US01/27631

protein:

PCR amplification employing the primer pairs and templates described below were used to generate various forms of human MK61 proteins. One primer of each pair introduced a stop codon (TAA) and a unique XhoI site following the carboxy terminus of the gene. The other primer of each pair introduced a unique NdeI site, an N-terminal methionine, and optimized codons for the amino terminal portion of the gene. PCR and thermocycling were performed using standard recombinant DNA methodology. The PCR products were purified, restriction digested, and inserted into the unique NdeI and XhoI sites of vector pAMG21 (ATCC accession no. 98113). Subsequently, prototrophic *E. coli* strains 393 or 2596 were transformed with the vector. Other commonly used *E. coli* expression vectors and host cells are also suitable for expression. After transformation, the clones were selected, plasmid DNA was isolated and the sequence of the MK61 protein insert were confirmed.

1. pAMG21-human MK61 21-160 His:

The pAMG21-h MK61 21-160 His construct was engineered to be 147 amino acids in length and have the following N-terminal and C-terminal residues: NH₂-Met-Glu-Ala-Ser-Gln-----Gln-Ala-Trp-Pro-Asn-His-His-His-His-His-COOH (SEQ ID NO: 25). The following oligonucleotides primer pair (#2609-87 and #2609-88) was used for PCR and cloning this gene construct (2609-87: 5'-GAG GAA TAA CAT ATG GAA GCC TCT CAG TAT TGC GGC CGC-3' (SEQ ID NO: 26); 2609-88: 5'-CGG CCG ATC CTC GAG TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATT CGG CCA GGC CTG CTG-3' (SEQ ID NO: 27)).

WO 02/20762

PCT/US01/27631

2. pAMG21-human MK61 21-160 Fc (human IgG1)

The pAMG21-human MK61 21-160 Fc construct was engineered to be 373 amino acids in length and have the following N-terminal and C-terminal residues: NH₂-Met-Glu-Ala-Ser-Gln-----Ser-Pro-Gly-Lys-COOH (SEQ ID NO: 28). A linker composed of five glycine residues was inserted between the C-terminus of the MK61 protein and the N-terminus of human IgG1 Fc. The sequence of the MK61-Fc junction was as follows: Gln-Ala-Trp-Pro-Asn-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Asp-Lys-Thr-His (SEQ ID NO: 29). PCR amplification of this construct was performed in two steps. In the first step, the MK61 and Fc portions of the gene were amplified. Oligos #2609-87 (5'-GAG GAA TAA CAT ATG GAA GCC TCT CAG TAT TGC GGC CGC-3' SEQ ID NO: 30); and #2609-97 (5'-ACA TGT GTG AGT TTT GTC ACC ACC ACC ACC ACC ATT CGG CCA GGC CTG CTG-3' SEQ ID NO: 31) were used to amplify the MK61 portion. Oligos #2609-98 (5'-CAG CAG GCC TGG CCG AAT GGT GGT GGT GGT GGT GAC AAA ACT CAC ACA TGT-3' SEQ ID NO: 32) and #2293-10 (5'-CCG CGG ATC CTC GAG TTA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG-3' SEQ ID NO: 33) were used to amplify the human IgG1 fc portion. In the second step, the reaction products from the first amplification were gel purified and used as templates to create the final MK61::fc construct. Oligos #2609-87 (SEQ ID NO: 30) and #2293-10 (SEQ ID NO: 33) were used for PCR amplification of this construct.

After confirmation of the DNA sequence, the transformed *E. coli* were grown at 37°C to mid-log phase and treated with homoserine lactone (HSL) at a final concentration of 250 ng/ml to induce expression of MK61-Fc fusion protein. Following induction, the cells were grown at 37°C for several hours and subsequently

WO 02/20762

PCT/US01/27631

harvested by centrifugation and frozen at -80°C.

Growth of the transfected *E. coli*, induction of MK61-Fc protein expression and isolation of inclusion bodies containing MK61-Fc was carried out according to

- 5 procedures described in U.S. Patent Application Serial No. 08/577,788 filed December 22, 1995 incorporated herein by reference.

- Purification and refolding of the MK61-Fc fusion protein expressed in *E. coli* was accomplished using the following methods. To solubilize the MK61-Fc fusion protein, the bacterial cells were broken in a microfluidizer and centrifuged at 12,000g for 1 hour. The resulting inclusion bodies were washed with water and centrifuged at 12,000g for 1 hour. The pellet was then solubilized for 1 hour in 50 mM Tris, 8 M GuHCl and 7 mM DTT (pH 8.5) and centrifuged at 12,000g for 1 hour.

- To refold the MK61-Fc fusion protein, the supernatant was diluted 1:20 with 50 mM Tris, 2 M Urea, 0.2 M arginine (pH 8.5) and incubated at 4°C until the Elman test was negative for free thiol (approximately 4 days). The supernatant was then concentrated 20 fold and diafiltered with 4 volumes of 50 mM Tris (pH 8.5). The diluted supernatant was acid precipitated by diluting the solution 10 fold with 25 mM Tris (pH 8.5) and lowering the pH to 5.0. The diluted solution was then stirred for 5 minutes and centrifuged at 12,000g for 30 minutes.

- For purification, the supernatant was loaded onto a SP high performance column and run on a 0-600 mM NaCl gradient in the presence of NaOAc (pH 5.0) over 60 column volumes. The fusion protein eluted at around 500 mM NaCl. Pooled fractions were titrated to pH 7.0,

WO 02/20762

PCT/US01/27631

brought up to a concentration of 1M in ammonium sulfate (AS) and centrifuged at 12,000g for 30 minutes. The supernatant was then loaded onto a butyl high performance column and run on a gradient of 1M AS to 0M AS in the presence of 10 mM NaPi (pH 7.0) over 50 column volumes. The fusion protein eluted approximately at 30 mM AS. The pooled fractions were diafiltered into PBS.

B. Cloning, expression and purification of MK61-Fc in mammalian cell culture:

A cDNA fragment encoding human MK61-Fc amino acids 1 to 153 was amplified by PCR using the pcDNA3huMK61#5 as a template and the primers #2623-81 (CAG CCC AAG CTT TAG ACC ACC ATG GGG CCT GGA CGA TGC; SEQ ID NO: 34) and 2623-83 (CAG GTC GAC AGG CTC AGG GGT CCT; SEQ ID NO: 35). These primers inserted HindIII and SalI sites at the 5' and 3' end of the gene respectively. PCR product were purified, digested with HindIII and SalI and ligated into huOPG194 Fc delta C vector, 9described in WO 01/18203 and in EP1127117), digested with HindIII and SalI and dephosphorylated. The products of the ligation were transformed into DH5α competent cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) and plated onto LB+ ampicillin plates.

Eight colonies of the transformed DHα competent cells were grown to isolate DNA using the mini-prep technique (Qiagen) The isolated DNA was screened by digestion with NotI and PvuI. Five of the clones generated a 1512 base pair fragment as expected. Clones 1 and 7 of the positive clones were amplified in 500 ml preparations, the DNA isolated and sequenced using standard methods.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

The DNA isolated from clone 7 was the correct sequence. The amino acid sequence of MK61-Fc is shown in Figure 24 as SEQ ID NO: 36. Clone 7 DNA (15 µg) was linearized with PvuI and transfected into AM-1/D cells. AM-1/D are Chinese Hamster Ovary cells devoid of DHFR (Urlaub and Chasin 1980 PNAS vol 77 4216-4220) adapted to serum free conditions (described in US Patent NO.6,210,924). Stable clones were generated based on the selection marker DHFR (dihydrofolate reductase). Nine stable clones were expanded for expression analysis. Expression of MK61-Fc was determined by Western-blotting, using anti-human IgG1 Fc antibodies (Pierce). A high-expressing clone was selected and expanded by growing the cells in roller bottles using standard methods.

To purify human MK61-Fc fusion protein, conditioned CHO-MK61-Fc media was loaded onto a protein G column equilibrated in PBS. The column was washed with 20 column volumes of PBS and the fusion protein was eluted with 100 mM Glycine (pH 2.6), and the pooled fractions were neutralized with 1 M Tris (pH 8.5) and diafiltered into PBS.

C. Production of murine Mk61/Fc delta C fusion protein:

The murine MK61 cDNA encoding the extracellular domain of the protein was amplified from the full-length muMK61 cDNA (SEQ ID NO: 13) using primers #2664-83 (CAG CCC AAG CTT TAG ACC ACC ATG GGG CCC AGC TGG CTT; SEQ ID NO: 37) and #2664-84 (CAG GTC GAC CTC ATT CTT GGT TGT; SEQ ID NO: 38). These primers inserted HindIII and SalI sites at the 5' and 3' end of the gene respectively. The PCR product was purified, digested with HindIII and SalI and ligated into

WO 02/20762

PCT/US01/27631

huOPG194 Fc delta C vector digested with HindIII and SalI and dephosphorylated. The ligation product was transformed into DH5 α competent cells and plated onto LB+ ampicillian plates.

5 Sixteen colonies of transformed DH α competent cells were grown to isolate their DNA by the mini-prep technique. The isolated DNA was screened by digestion with MSC1 (unique enzyme for MK61) and PvuI (unique enzyme for pDSR α vectors). Fifteen of the clones
10 generated a 1523 base pair fragment as expected. Clones 2 and 4 of these positive clones were amplified in 500 ml preps; DNA isolated and sequenced using standard methods.

 The DNA isolated from both clones 2 and 4 had
15 the correct sequence for expression of MK61-Fc fusion protein (Figure 25; SEQ ID NO: 39). Clone 2 DNA (15 μ g) was linearized with PvuI and transfected in to AM-1/D cells which are derived from the Chinese Hamster Ovary (CHO) cell-line. Stable clones were generated
20 based on the selection marker DHFR [WHAT DOES DHFR STAND FOR?]. Nine clones were expanded for expression analysis. Expression of MK61-Fc was determined by Western-blotting, using anti-human Fc antibodies.

25

EXAMPLE 6**MK61-Fc Binding as Determined by FACS Analysis**

 Binding of the MK61-Fc proteins was detected on human cells by florescent activated cell sorting (FACS). Raji, Molt-4, U937, K562, A20 and Jurkat
30 cells were obtained from the ATCC. The cells were collected and incubated at room temperature with 1

WO 02/20762

PCT/US01/27631

µg/ml of human MK61-Fc in binding buffer (DMEM medium containing 10 mM HEPES buffer, 2% goat serum, 5% rabbit serum, 1 µg/ml anti-mouse CD16/CD32 monoclonal antibody (PharMingen, San Diego, CA)) for 30 minutes followed by 3 washes with PBS containing 2% FBS. Binding of the MK61-Fc fusion proteins to the cell surface was assessed by immunofluorescent staining using FITC conjugated anti-human IgG Fc secondary antibody (PharMingen, San Diego, CA). Fluorescence was detected using a FACStar (Becton and Dickinson, Mountain View, CA).

MK61-Fc binding was detected on U937 and Jurkat cells. (See Figure 16) To enhance the MK61-Fc binding, U937 and Jurkat cells were treated with human interferon gamma (10 ng/ml) for 24 hours prior to analysis. The pre-treatment with interferon gamma enhanced MK61-Fc binding. (See Figure 17) The binding of MK61-Fc fusion protein to these cells indicates that the MK61 ligand exists on the cell surface of monozytic (U937) and T cells (Jurkat).

The existence of the unknown MK61 ligand on the surface of immune cells suggests that ligand binding soluble forms of MK61 (such as MK61-Fc fusion protein) may act as "positive reagents" which activate the MK61 receptor signaling pathway. This may be accomplished by the positive reagents binding to the yet unknown MK61 ligand(s) located on the surface of the immune cells and thereby triggering reverse signaling through the ligand. Such signaling would be the immune system regulating event resulting in lymphocyte expansion and immunoglobulin production

EXAMPLE 7MK61-Fc Inhibited Immunoglobulin Production in PrimarySplenocytes

Total spleen cells were isolated from mice
5 spleens using lymphocyte separation medium (ICN,
Aurora, OH) centrifugation. Splenocytes were cultured
in vitro with 150 ng/ml lipo-poly-saccharide (LPS) for
72-96 hours in the presence of mouse or human delta C
MK61-Fc delta fusion protein. Subsequently, the culture
10 supernatants from the treated cells were removed after
4 days to analyze the production of various Ig
isotypes. (PharMingen, Ca).

Treatment with both murine and human MK61-Fc
fusion proteins caused a dose-dependent decrease in IgA
15 and IgG production in the mouse splenocyte cultures
(See Figure 18). Maximum inhibition was achieved when
MK61-Fc was used at a concentration of 100 ng/ml. This
data indicates that MK61-Fc fusion protein is a potent
inhibitor of the immune system. This data also
20 suggests that the MK61 receptor activates the immune
system signaling pathway that may be antagonized by
"negatives regulators" such as the soluble MK61-Fc
fusion protein.

To determine if the MK61-Fc fusion protein-
25 induced inhibition of immunoglobulin production was due
to inhibition of B cell proliferation, the effect of
MK61-Fc on B cell proliferation was measured. Mouse B
cells were purified by negative selection from spleens
of C57Bl/6 mice using a mouse B cell recovery column
15 (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada). The cells
30 isolated by this method were more than 90% positive for
B220 staining as determined by FACS analysis. 1×10^6 /ml

WO 02/20762

PCT/US01/27631

were seeded in 96 well flat bottom tissue culture plates in medium (RPMI-1640, 5% FBS, 5×10^{-5} M 2ME, 2 μ g/ml of affinity-purified goat F (ab')₂ anti-mouse IgM). The B cells were then incubated with 100 ng/ml human or mouse MK61-Fc protein in the presence or
5 absence of increasing amounts of CD40L, APRIL or TALL-1 for 72 hours. DNA synthesis was quantitated by measuring the incorporation of [³H]thymidine. 0.5 μ Ci of [³H]thymidine was added 18 hours prior to harvesting
10 the cells and counting the incorporation of [³H]thymidine. Treatment with MK61-Fc fusion proteins did not effect B cell proliferation in this assay.

EXAMPLE 8

15 Effect of MK61-Fc Fusion Protein Treatment on B Cell

Responses In Vivo

To characterize the functional significance of the MK61 polypeptide, the fusion protein MK61-Fc
delta C used to treat mice.

20 Initially, Balb/c mice (females of 8-12 weeks of age, Charles River Laboratories) were treated interperitoneally with 5 mg/Kg of MK61-Fc once a day for seven consecutive days starting on day 0. Control mice were treated with 5 mg/Kg of IgG1 Fc or saline as
25 above. Mice were sacrificed one day following the last injection of MK61-Fc, i.e., on day 7. The spleens were dissected for histological examination, FACS analysis and for serum Ig measurements.

A. Histological Analysis:

30 For histological examination, spleens were fixed in formalin, embedded in paraffin following standard procedures, and stained with hematoxylin and

WO 02/20762

PCT/US01/27631

eosin. Treatment with MK61-Fc fusion protein increased spleen weight by 75% compared to control Fc protein or saline (Figure 19, top panel). The spleen weight increase reflects a comparable increase in the number of spleen lymphocytes (Figure 19, bottom panel). The total number of lymphocytes was determined using a Technicon H.I.E. Counter (Bayer Co. Diagnostic Division, Northwood, MD) following the standard procedure recommended by the manufacturer. The histological examination of the spleens from the MK61-Fc-treated mice indicated the presence of lymphoid hyperplasia, characterized by (1) increased numbers of moderately- to well-developed follicular germinal centers as well as (2) increased numbers of plasma cells that were usually located in focal accumulations at the interface between the white and red pulp (See Figure 20). Lymphoid hyperplasia was not observed in Fc-protein or saline-treated control mice.

B. FACS Analysis

For FACS analysis, spleens were collected in saline and homogenized to yield a cell suspension. The total lymphocyte number was obtained with a cell counter, while lymphocyte subset percentages were derived by immunofluorescence double staining and flow cytometry. MK61-Fc fusion protein increased the total number of spleen lymphocytes compared to control Fc or saline by 90% (Fig. 21 top panel). MK61-Fc proportionally increased T, B, and non-T non-B cells. In fact, MK-61-Fc increased the absolute numbers of CD3+ (T cells), CD3-/B220+ (B cells), and CD3-/B220- (non-T and non-B cells) cells but did not significantly affect the percentages of these cells (Fig. 21 bottom panel). MK61-Fc modified the proportions of B cell

WO 02/20762

PCT/US01/27631

subsets. In fact, MK61-Fc decreased the percentage of CD19+/CD5+ (B) cells but still increased their absolute number (Fig. 21).

C. Serum Immunoglobulin Measurements:

5 Serum immunoglobulins were measured by sandwich ELISA as previously described (Guo et al. J. Immunol. 166: 5578-84, 2001). Compared to control Fc, MK61-Fc increased the serum concentrations of total IgG, IgG1, and IgG2b but did not significantly modify the
10 concentrations of other Ig types and subtypes (Fig. 22). The increase in IgG1 was the most pronounced if all IgG subtypes (by about 6 fold).

EXAMPLE 8

15 **Additional Effects of MK61-Fc Fusion Protein Treatment on T Cell Response In Vivo**

In another *in vivo* experiment, mice were immunized on day 0, prior to the first injection of murine MK61-Fc fusion protein or FC-protein control,
20 with the T cell independent antigen Pneumovax(115 µg, Merck, West Point, PA) or the T cell dependent antigen keyhole limpet hemocyanin (KLH, Pierce, Rockford, IL) in complete Freund's adjuvant (CFA). Following the pre-treatment, the animals were treated as described
25 above in Example 7. The mice were bled on days 7 and 14 to obtain serum to measure antigen-specific antibodies..

Anti-KLH and anti-Pneumovax IgG and IgM were measured in serum by ELISA as previously described (Yu
30 et al. Nature Immunol. 1: 252-256, 2000). Briefly, for the measurement of anti-KLH, plates were coated with KLH in PBS, blocked, and various dilutions of standard

WO 02/20762

PCT/US01/27631

and test samples were added. Captured anti-KLH IgG or IgM were revealed using anti-IgG or anti-IgM biotinylated antibodies and neutravidin-conjugated HRP (horse-radish peroxidase). For the measurement of anti-Pneumovax IgM, plates were coated with Pneumovax using poly-L-lysine, blocked, and various dilutions of standard and test samples were added. Captured anti-Pneumovax IgM were revealed using an anti-IgM biotinylated antibody and neutravidin-conjugated HRP

10 Compared to control Fc-protein, MK61-Fc fusion protein did not change the serum concentration of anti-Pneumovax antibodies (IgM; data not shown); but changed that of anti-KLH antibodies of certain Ig classes and subclasses (See Figure 23). On days 7 and/or 14 of immunization, MK61-Fc fusion protein increased the serum concentrations of anti-KLH IgG, total and of all subclasses, and anti-IgE (Fig. 23).

The *in vivo* studies in Example 8 and 9 show that MK61 polypeptide regulates immunity, with particular reference to adaptive immunity. The disruption of the interaction between MK61 and its as yet unknown ligand(s) using a putatively ligand binding soluble form of the molecule (MK61-Fc fusion protein) results in lymphocyte expansion and Ig production.

25 This indicates that disrupting this interaction using "negative reagents" (such as MK61-Fc fusion protein, similar MK61-derived molecules or antagonistic antibodies directed against MK61 or its ligand(s)) may lead to immunostimulation. While, artificially

30 creating this interaction using "positive reagents" (such as MK61 binding soluble forms of MK61 ligand(s), agonistic antibodies to MK61 or other molecules which activate the MK61 receptor) may lead to

WO 02/20762

PCT/US01/27631

immunosuppression.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

WHAT IS CLAIMED

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- 5 (a) the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15;
- (b) the MK61 coding portion of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, or SEQ ID NO: 15;
- (c) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, 15 SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;
- (d) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately stringent conditions to the complement of (a) or (b), wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set 20 forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16; and
- (e) a nucleotide sequence complementary to any of (a)-(d).
- 25 2. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- (a) a nucleotide sequence encoding a 30 polypeptide that exhibits at least about 70 percent

WO 02/20762

PCT/US01/27631

identity to the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2,
 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10,
 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, wherein
 the polypeptide has an activity of the polypeptide as
 5 set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ
 ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or
 SEQ ID NO:16;

(b) a nucleotide sequence encoding an
 allelic variant or splice variant of the nucleotide
 10 sequence set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID
 NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID
 NO:13, or SEQ ID NO:15, wherein the encoded polypeptide
 has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID
 NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID
 15 NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(c) a nucleotide sequence of SEQ ID
 NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID
 NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15; (a)
 or (b) encoding a polypeptide fragment of at least
 20 about 25 amino acid residues, wherein the encoded
 polypeptide has an activity of the polypeptide set
 forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID
 NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ
 ID NO:16;

(d) a nucleotide sequence of SEQ ID
 25 NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID
 NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15, or
 (a)-(c) comprising a fragment of at least about 16
 nucleotides;

(e) a nucleotide sequence which
 30 hybridizes under moderately stringent conditions to the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

complement of any of (a)-(d), wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16; and

- 5 (f) a nucleotide sequence complementary to any of (a)-(c).

3. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

20 (b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one amino acid

WO 02/20762

PCT/US01/27631

deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

5 (d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 which has a C- and/or N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an
10 activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ
15 ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal
20 truncation wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(f) a nucleotide sequence of (a)-(e)
25 comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately stringent conditions to the complement of any of (a)-(f), wherein the polypeptide
30 has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16; and

WO 02/20762

PCT/US01/27631

(h) a nucleotide sequence complementary to any of (a)-(e).

4. A vector comprising the nucleic acid molecule of claims 1, 2, or 3.

5. A host cell comprising the vector of claim 4.

10 6. The host cell of claim 5 that is a eukaryotic cell.

7. The host cell of claim 5 that is a prokaryotic cell.

15 8. A process of producing an MK61 polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 5 under suitable conditions to express the polypeptide, and optionally isolating the polypeptide from the culture.

9. An isolated polypeptide produced by the process of claim 8.

25 10. The process of claim 8, wherein the nucleic acid molecule comprises promoter DNA other than the promoter DNA for the native MK61 polypeptide operatively linked to the nucleotide sequence encoding the MK61 polypeptide.

30 11. The isolated nucleic acid molecule according to claim 2, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the

WO 02/20762

PCT/US01/27631

group consisting of GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit and the Smith-Waterman algorithm.

12. A process for identifying candidate
5 inhibitors of MK61 polypeptide activity or production
comprising exposing a cell according to claim 5, 6 or 7
to the candidate inhibitors, measuring MK61 polypeptide
activity or production in said cell, and comparing
activity of MK61 in cells exposed to the candidate
10 inhibitor with activity in cells not exposed to the
candidate inhibitor.

13. A process for identifying candidate
stimulators of MK61 polypeptide activity or production
15 comprising exposing a cell according to claims 5, 6 or
7 to candidate stimulators, measuring MK61 polypeptide
activity in said cell, and comparing activity of MK61
in cells exposed to the candidate stimulator with
activity in cells not exposed to the candidate
20 stimulator.

14. An isolated polypeptide comprising
the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ
ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID
25 NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

15. An isolated polypeptide comprising
the amino acid sequence selected from the group
consisting of:

30 (a) an amino acid sequence comprising
the mature form of the polypeptide set forth in SEQ ID
NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID

WO 02/20762

PCT/US01/27631

NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, and optionally further comprising an amino-terminal methionine;

(b) an amino acid sequence for an
 5 ortholog of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, wherein the ortholog has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12,
 10 SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(c) an amino acid sequence that exhibits at least about 70 percent identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, wherein the encoded polypeptide
 15 has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

(d) a fragment of the amino acid
 20 sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in SEQ
 25 ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16; and

(e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of either the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, or at least one of (a)-
 30 (c) wherein the encoded polypeptide has an activity of

WO 02/20762

PCT/US01/27631

the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

- 5 16. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

 (a) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, 10 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, 15 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

 (b) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one amino acid insertion, wherein 20 the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16;

 (c) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, 25 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ 30 ID NO:16;

WO 02/20762

PCT/US01/27631

(d) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 which has a C- and/or N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16; and

(e) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16, with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

17. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 38 of SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 or 12 is cysteine, serine or alanine.

18. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 39 of SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 or 12 is cysteine, serine or alanine.

19. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 51 of SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 or 12 is cysteine, serine or alanine.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

20. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 60 of SEQ ID NO: 2, or 6 is cysteine,
5 serine or alanine.
21. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 76 of SEQ ID NO: 2, or 6 is cysteine,
10 serine or alanine.
22. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 41 of SEQ ID NO: 14 or 16 is cysteine,
15 serine or alanine.
23. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 42 of SEQ ID NO: 14 or 16 is cysteine,
20 serine or alanine.
24. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 54 of SEQ ID NO: 14 or 16 is cysteine,
25 serine or alanine.
25. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 63 of SEQ ID NO: 14 or 16 is cysteine,
30 serine or alanine.
26. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid

WO 02/20762

PCT/US01/27631

at position 79 of SEQ ID NO: 14 or 16 is cysteine, serine or alanine.

27. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 171 of SEQ ID NO: 2 is leucine, norleucine, isoleucine, valine, methionine, alanine or phenylalanine.

10 28. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 172 of SEQ ID NO: 2 is leucine, norleucine, isoleucine, valine, methionine, alanine or phenylalanine.

15 29. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 178 of SEQ ID NO: 14 or 16 is leucine, norleucine, isoleucine, valine, methionine, alanine or phenylalanine.

30. A polypeptide comprising the amino acid sequence of claims 15 or 16 wherein the amino acid at position 180 of SEQ ID NO: 14 or 16 is leucine, norleucine, isoleucine, valine, methionine, alanine or phenylalanine.

31. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of claims 1, 2, or 3.

30 32. The isolated polypeptide according to Claim 15 wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group

WO 02/20762

PCT/US01/27631

consisting of GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit and the Smith-Waterman algorithm.

33. An antibody produced by immunizing
5 an animal with a peptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.
- 10 34. An antibody or fragment thereof that specifically binds the polypeptide of any one of claims 14, 15, or 16.
35. The antibody of claim 34 that is a
15 monoclonal antibody.
36. A hybridoma that produces a monoclonal antibody that binds to a peptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ
20 ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.
37. A method of detecting or
quantitating the amount of MK61 polypeptide in a sample
25 comprising contacting a sample suspected of containing MK61 with the anti-MK61 antibody or antibody fragment of any of claims 33, 34 or 35 and detecting said binding of said antibody or antibody fragment.
- 30 38. A selective binding agent or fragment thereof that specifically binds at least one polypeptide wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence selected from the group consisting

WO 02/20762

PCT/US01/27631

of:

(a) the amino acid sequence set forth
in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8,
SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID
5 NO:16; and

(b) a fragment of at least about 25
amino acids the amino acid sequence set forth in at
least one of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ
ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or
10 SEQ ID NO:16; and

(c) a naturally occurring variant of
(a) or (b).

39. The selective binding agent of
15 claim 38 that is an antibody or a fragment thereof.

40. The selective binding agent of
claim 38 that is a humanized antibody.

20 41. The selective binding agent of
claim 38 that is a human antibody or a fragment
thereof.

42. The selective binding agent of
25 Claim 38 that is a polyclonal antibody or a fragment
thereof.

43. The selective binding agent of
claim 38 that is a monoclonal antibody or a fragment
30 thereof.

44. The selective binding agent of

WO 02/20762

PCT/US01/27631

claim 38 that is a chimeric antibody or a fragment thereof.

45. The selective binding agent of
5 claim 38 that is a complementarity determining region
(CDR0-grafted antibody or a fragment thereof.

46. The selective binding agent of
claim 38 that is an anti-idiotypic antibody or a
10 fragment thereof.

47. The selective binding agent of
claim 38 which is an antibody variable region fragment.

15 48. The variable region fragment of
claim 38 which is a Fab or a Fab' fragment.

49. A selective binding agent or
fragment thereof comprising at least one
20 complementarity-determining region with specificity for
a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID
NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID
NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

25 50. The selective binding agent of
claim 38 which is bound to a detectable label.

51. The selective binding agent of
claim 38 which is an antagonist or agonist of MK61
30 polypeptide biological activity.

52. A method for treating, preventing
or ameliorating a disease, condition or disorder

WO 02/20762

PCT/US01/27631

comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent according to claim 38.

5 53. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

 54. A hybridoma that produces a selective binding agent capable of binding a polypeptide according to claims 1, 2, or 3.

15 55. A composition comprising the polypeptide of claims 14, 15, or 16 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

20 56. The composition of claim 55 wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer or anti-oxidant.

25 57. The composition of claim 55 wherein the polypeptide comprises the mature form of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, or SEQ ID NO:16.

30 58. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of claims 14, 15, or 16.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

59. The polypeptide of claim 58 which is covalently modified with a water-soluble polymer.

60. The polypeptide of claim 51, wherein the water-soluble polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide copolymers, polyoxyethylated polyols, and polyvinyl alcohol.

61. A composition comprising a nucleic acid molecule of claims 1, 2 or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

62. The composition of claim 61, wherein said nucleic acid molecule is contained in a viral vector.

63. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of any of claims 1, 2, or 3.

64. A polypeptide comprising the polypeptide of any of claims 14, 15, or 16 fused to a heterologous amino acid sequence.

65. The fusion polypeptide of claim 64 wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.

66. A fusion polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 36.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

67. A fusion polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39.

5 68 A method for treating, preventing or ameliorating a medical condition in a mammal resulting from increased levels of MK61 polypeptide comprising administering to said mammal a therapeutically effective amount of an antagonist
10 selected from the group consisting of selective binding agents, small molecules, peptides, peptide derivatives and antisense oligonucleotides.

69. A method for treating, preventing
15 or ameliorating a medical condition in a mammal resulting from decreased levels of MK61 polypeptide comprising administering to said mammal a therapeutically effective amount of the polypeptide of any of claims 14, 15, or 16 or the polypeptide encoded
20 by the nucleic acid of any of claims 1, 2, or 3 to said mammal.

70. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a
25 pathological condition in a subject caused by or resulting from abnormal levels of MK61 polypeptide comprising:

(a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of any of claims 14, 15, or 16 or the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of claims 1, 2 or 3 in a sample;
30 and

WO 02/20762

PCT/US01/27631

(b) comparing the level of MK61 polypeptide in a biological, tissue or cellular sample from normal subjects or the subject at a different time, wherein susceptibility to a pathological condition is based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

71. A device comprising:

(a) a membrane suitable for implantation; and

(b) cells encapsulated within said membrane, wherein said cells secrete a polypeptide of any of claims 14, 15 or 16, and wherein said membrane is permeable to said protein.

15

72. A device comprising:

(a) a membrane suitable for implantation; and

(b) the MK61 polypeptide encapsulated within said membrane, wherein said membrane is permeable to said polypeptide.

20

73. A method of identifying a compound which binds to a polypeptide comprising:

(a) contacting the polypeptide of any of claims 14, 15 or 16 with a compound; and

(b) determining the extent of binding of the polypeptide to the compound.

25

74. A method of modulating levels of a

30

WO 02/20762

PCT/US01/27631

polypeptide in an animal comprising administering to the animal the nucleic acid molecule of any of claims 1, 2, or 3.

5 75. A method of inhibiting MK61
receptor activity in a mammal, comprising
administering at least one polypeptide having an amino
acid sequence selected from the group consisting of
SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ
10 ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ
ID NO: 36 and SEQ ID NO: 39.

 76. A method of inhibiting MK61 ligand
activity in a mammal, comprising administering at least
15 one polypeptide having the amino acids sequence
selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ
ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID
NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 36 and
SEQ ID NO: 39.

20 77. A method of stimulating an immune
response in a mammal comprising administering a
negative regulator of MK61 receptor signaling.

25 78. The method of claim 77 wherein the
negative regulator is selected from the group
consisting of a fusion protein, an antibody, a small
molecule, a peptide and a peptide derivative.

30 79. The method of claim 78 wherein the
fusion protein comprises the amino acid sequence of SEQ
ID NO: 16, SEQ ID NO: 36 or SEQ ID NO: 39.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

80. A method of inhibiting an immune response comprising administering a positive regulator of MK61 receptor signaling.
- 5
81. The method of claim 80 wherein the positive regulator is selected from the group consisting of a fusion protein, an antibody, a small molecule, a peptide and a peptide derivative.
- 10
82. A method of stimulating reverse signaling through a cell surface bound MK61 ligand comprising administering a positive regulator of MK61 ligand reverse signaling.
- 15
83. The method of claim 84 wherein the positive regulator is selected from the group consisting of a fusion protein, an antibody, a small molecule, a peptide and a peptide derivative.
- 20
84. The method of claim 83 wherein the fusion protein comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 36 or SEQ ID NO: 39.
- 25
85. A method of inhibiting reverse signaling through cell surface bound MK61 ligand comprising administering a negative regulator of MK61 ligand reverse signaling.
- 30
86. The method of claim 87 wherein the negative regulator is selected from the group consisting of a fusion protein, an antibody, a small molecule, a peptide and a peptide derivative.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

87. A method of treating a B and T cell lymphoproliferative disorder in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of
5 MK61-Fc fusion protein, an anti-MK-61 antibody, an antisense oligonucleotide, a MK61 ligand, or a anti-MK61 ligand antibody to said mammal.

88. The method of claim 87 wherein the
10 lymphoproliferative disorder is leukemia, myeloma, B lymphoma, or non-hodgkins lymphoma.

89. A method of treating an autoimmune disease comprising administering a therapeutically
15 effective amount of MK61-Fc fusion protein, an anti-MK-61 antibody, an antisense oligonucleotide, a MK61 ligand, or a anti-MK61 ligand antibody to said mammal.

90. The method of claim 89 wherein the
20 autoimmune disease is rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), intestinal bowel disease, or Crohn's disease.

91. A method of treating an
25 inflammatory disease comprising administering a therapeutically effective amount of MK61-Fc fusion protein, an anti-MK-61 antibody, an antisense oligonucleotide, a MK61 ligand, or a anti-MK61 ligand antibody to said mammal.

30
92. The method of claim 91 wherein the inflammatory disease is rheumatoid arthritis, sepsis, intestinal bowel disease, or Crohn's disease.

WO 02/20762

PCT/US01/27631

93. . . A polypeptide fragment having an
amino acid sequence comprising the cysteine rich domain
residues 26-60 of SEQ ID NO: 36.

5

WO 02/20762

PCT/US01/27631

1/24

FIGURE 1
Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO:1) and Amino Acid
Sequence (SEQ ID NO:2) Encoding Human MK61T1 (hMK61T1)

Nucleic Acid Sequence

```

1  GTAAAGATGG GGTTCATTI TGTTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTGGGCTTCC CAAAGTGTG GGAATTACAGG
101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTTA CTCTAATGA CGGTTCTAAT
151 TCTCCACAAT AACCCATGA GACAGGTGCT ATCATGTCT TATTTTAGGG
201 ATGGAAAAGG GAGGGTGGT GGGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGATATGC
251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCTAG TGGCCTTGIG
301 GGCTTCTCTG ATAACCGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAATTCT GTTCCCCAC ATCACCGCGT
401 CCTTCTCTCT GCCCGATTTC CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTI
451 GGAAGTCCCG CTATCACGGC CCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCTCCTT
501 GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCTTGGCGCC ACCGCCGGA GCCTCCAGT
551 ACTGGGCGCG CCTTGAATAC TGGAAACCAG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601 TGCTTCAACG GCTTGGGGCC GCCCCCTGCG CCGGACTATG AGTTCGGGA
651 AAAGTGGGGA CTCATAGACC ACGGCGATT CTAAACGCC CCGTCCGAA
701 AGTGTCTCTC TGGGCGAGTG AACCCGACG GCGGCGAGCT ATGTAGCCCC
751 TGCGGCGGCG GAGCCGTGAC CCTACTCCC GCGGCGGCG GGGGCGAAGC
801 CCGTGGCGCG TGCGAGAGAG GCGCGTCCC TGCGAGGGG CACTGCCCCC
851 TCACACCTGG AAACCCAGGC GCCCTAGCT CCGAGGAGCG CAGCTCAGCA
901 GCAAGTCCCA TTGCTGGGAG GACCCCTGAG CCTGTCCCTC AGCAGGCGTG
951 GCGGAATTTC CTTCGCTCG TGGTGTGTT CTGTCTCTG ACCTTGGCGG
1001 TGATAGCGAT CCTCCTGTT ATTCTGCTCT GGCATCTCTG CTGGCCCAAG
1051 GAGAAAGCCG ACCCCTATCC CTATCCTGGC TTGCTCTGCG GAGTCCCAAA
1101 CACCCACACC CCTTCTCTCT GGCATCTGTC CTCCCAAGG GCCTTGGAGA
1151 CAGGGGAGAC ATGGAAGGAG GCCTCACTAC TTCCACTCTC GAGCAGGGAA
1201 CTGTCCAGTC TGGCCTCACA ACCCTGTCT CCGCTCTCTG ATGAGCTGGA
1251 GGTGCTGGAA GAGCTGATTG TACTGTCTGA CCCTGAGCCT GGGCCAGGTG
1301 GGGTATAGGC CCATGGCACT ACTCGACACC TGGCCGCAAG ATATGGGCTG
1351 CCTGCTGGCT GGTCCACCTT TGCTATTTCG CTGAGGCGCA GTCCCTGCTC
1401 GCTGGGCGCT CTGATTGAGA TGGTGTGTTG AAGGGAGCCC TCTGCTCTCC
1451 TGGGCCAGCT TGGCACACAC CTCGCCAGC TAGGGCGGGC AGATGCAATG
1501 CGGGTGTCTG CCAAGCTTGG CTCATCTGGG GTTTGCTGGG CTAAACCCC
1551 AATAAAGAAC TTTGCTGACT ACTAAGCCCA GTATACAATT AGCACTGAAG
1601 TACTTCTTGA AGTACAATCC TAATTGGGCA AAGACCCAAC AGATAGCCTC
1651 ACTGCTCTTC GCCCTAGA

```

Amino Acid Sequence

```

1  MGPGRCILTA LLLLALAPPP EASQYCGRL EYWNPDNKCCS SCLQRFQPPP
51  CPDYEFRENC GLNDHGDFTV PPRKCSGGQ CNPDGAE LCS PCGGGAVTPT
101 PAAGGGRTFP RCRERPVPAK GHCPLTEGNP GAPSSQRRSS PASSIAWRTP
151 EPVPQQAWPN FLPLVLVLVL LTLAVIAILL FILLWHLCPW KEKADPYPPY
201 GLVCGVPNTN TPSSSHLSSP GALETGDTWK EASLLPLLSR ELSSLASQPL
251 SRLDLEVLV EELIVLLDPE PGPGGMAHG TTRHLAARYG LFAAWSTFAY
301 SLRPSRSPRL ALIEMVVARE PSASLGQLGT HLAQLGRADA LRVLSKLGSS
351 GVCWA

```


WO 02/20762

PCT/US01/27631

2/24

FIGURE 2
Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO:3) and Amino Acid Sequence (SEQ
ID NO:4) Encoding Human MK61T2 (hMK61T2)

Nucleic Acid Sequence

```
1   GTAAAGATGG GGTTCATTG TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCTCCTGT CTGGGCTCC CAAAGTGTG GGATTACAGG
101 CATGAGCCAC CACACCCAG CCTGCTTTA CTTCTAATGA CGGTTCIAAT
151 TCTCCACAAT AACCTTATGA GACAGGTGCT ATCAITGTCT TATTTTAGGG
201 ATGGAAAAAG GAGGGTGGGT GGTGAGGAC ACGGCAGAG TGGGATATGC
251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTG
301 GGCTTCTCTG ATAACCGGCT CAGTTGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGG TGAGAATTCT GTTCCCCAC ATCACCCTGT
401 CCTTCTTCTT GCCCGATTTC CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTSTTT
451 GGAAGTCCCG CTATCACTGC CCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCTCCT
501 GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCTGGGCGC ACGCCGGA GCCTCCAGT
551 ACTGCGGCGG CCTTGAATAC TGGAAACCA ACAACAAGT CTGCAGCAGC
601 TGCTTGCAAC GCTTCGGGCG GCCCCTGCG CCGGTGAGA ATCCGAGACC
651 GAGCCTTGCT TGGGCGGAGC TTGCAGAGG CGGTCCCTGC CAGGGGSCAC
701 TGCCCCCTCA CACCTGGAAG CCCAGGCGCC CCTAGCTCCC AGGAGCGCAG
751 CTCACAGCA AGTTCATTG CTTGAGGAC CCTGAGCCT GTCCCTCAGC
801 AGGCCTGGCC GAATTCCTT CCGCTCGTG TGCTGTCTT GCTCCTGACC
851 TTGGCGGTGA TAGCGATCT CTTGTTTAT CTGCTCTGGC ATCTCTGCTG
901 GCCCAAGGAG AAAGCCGACC CCTATCCCTA TCCTGGCTTG GTCTGCGGAG
951 TCCCAACAC CCACACCCCT TCTCTCTCGC ATCTGTCTCT CCCAGGCGCC
1001 CTGGAGACAG GGGACACATG GAAGGAGGCC TCACTACTTC CACTCCTGAG
1051 CAGGGAACTG TCCAGTCTGG CGTCAACAC CTTGTCTCGC CTCTCTGATG
1101 AGCTGGAGGT GCTGGAAGAG CTGATTGTAC TGCTGGACCC TGAGCCTGGG
1151 CCAGGTGGGG GTATGGCCCA TGGCACTACT CGACACCTGG CCGCAAGATA
1201 TGGGCTGCCCT GCTGCCTGGT CCACCTTTGC CTATTCGCTG AGGCCGAGTC
1251 GCTCGCGCT GCGGCTCTG ATTGAGATGG TGGTGGCAAG GGAGCCCTCT
1301 GCCTCCCTGG GCCAGCTTGG CACACACCTC GCCAGCTAG GGGGGCAGA
1351 TGCAATGCGG GTGCTGTCCA AGCTTGGCTC ATCTGGGGTT TGCTGGGCTT
1401 AACACCCAAT AAAGAACTTT GCTGACTACT AAGCCAGTA TACAATTAGC
1451 ACTGAAGTAC TTCTTGAAGT ACAATCTAA TTGGGCAAG ACCCAACAGA
1501 TAGCTCACT GCTTTCGCC CTAGA
```

Amino Acid Sequence

```
1   MGPGRCLLTA LLLLALAPFF EASQVGRLE YWNPDKCCS SCLQRFGPPP
51  CPGENFRPSL AWABLAEGAP CQALPPHTW KPRRP*
```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

3/24

FIGURE 3
Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO:5) and Amino Acid Sequence
(SEQ ID NO:6) Encoding Human MK61T3 (hMK61T3)

Nucleic Acid Sequence

```
1  GTAAAGATGG GGTTCATTT TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTTGGCCTCC CAAAGTGTTG GGATTACAGG
101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCTTGCTTTA CTTCTAATGA CGGTTCTAAT
151 TCTCCACAAT AACCCATAGA GACAGGTGCT ATCATTTGCT TATTTTAGGG
201 ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGATATGC
251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCTAG TGGCCTTGTG
301 GGCTTCTCTG ATAACGGCT CAGTTGGGG ATGAGGGCTC GGGGTTAGAT
351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAAATCT GTTCCCCAC ATCACCCTGT
401 CCTTTCTTCT GCCCGATTTC CCCGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451 GGAAGTCCCG CTATCAGGCG CCCCGAAGT GGGCTGGAC GATGCTCCTT
501 GACGGCCCTG TTGCTTCTGG CCTTGGCGCC ACCGCGGAA GCCTCCAGT
551 ACTGGGCGCG CCTTGAATAC TGGAAACCAG ACACAAAGT CTGCAGCAGC
601 TGCTTGCAAC GCTTGGGCC GCCCCCTGCG CCGAATATG AGTTCCGGGA
651 AAAGTGCAGA CTCAATGACC ACGCGGATTT CGTAACGCC CCGTCCGAA
701 AGTGTTCCTC TGGGCAATGC AACCCGAGC GCGCGAGCT ATGTAGCCCC
751 TGCGGCGGCG GAGCGGTGAC CCTTACTCCC GCGCGGGCG GGGCAGAAC
801 CCGGTGGCGC TGCAGAGAGA ACTGTCCAGT CTGGCGTCA AACCCTGTG
851 TGCCCTCCTG GATGAGCTGG AGGTGCTGGA AGAGCTGATT GTACTGCTGG
901 ACCCTGAGCC TGGGCCAGGT GGGGATATGG CCCATGACAC TACTCGACAC
951 CTGGCCGCAA GATATGGGCT GCCTGCTGCC TGGTCCACCT TTGCTATTTC
1001 GCTGAGGCGG AGTCGCTCGC CGCTGCGGGC TCTGATTGAG ATGGTGGTGG
1051 CAAGGGAGCC CTCTGCCTCC CTGGGCCAGC TTGGCACACA CTTGCCCCAG
1101 CTAGGGCGGG CAGATGCATT GCGGCTGCTG TCCAAGCTTG GCTCATCTGG
1151 GGTTTGCTGG GCTTAACACC CAATAAAGAA CTTTGTGAC TACTAAGCCC
1201 AGTATACAAT TAGCACTGAA GTACTTCTTG AAGTACAATC CTAATTGGGG
1251 AAAGACCCAA CAGATAGCCT CACTGCTCTT CGCCCTAGA
```

Amino Acid Sequence

```
1  MGPGRCLLTA LLLLALAPPP EASQYCGRL EYWNPDNKCCS SCLQRFGPPP
51  CPDYEFRENC GLNDHGDFVT PPRKCSSGQ CNPDGABLCS PCGGGAVTPT
101 PAAGGGRTPW RCRENCVWVR HNPCLASWMS WRCKWS*
```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

4/24

FIGURE 4
Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO:7) and Amino Acid Sequence
(SEQ ID NO:8) Encoding Human MK61T4 (hMK61T4)

Nucleic Acid Sequence

```

1   GTAAGATGG GGTTCATTT TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTGGGCTTCC CAAAGTGTIG GGATTACAGG
101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCTGCTTTA CTTCTAATGA CGGTTCTAAT
151 TCTCCACAAT AACCTATGA GACAGGTGCT ATCATTGTCT TATTTTAGGG
201 ATGGAAAAGG GAGGTTGGGT GGGTGAGGAC ACCGCAGAGG TGGGATATGC
251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCTTAG TGGCCTTGTG
301 GGCTTCTCTG ATAACCGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAATTCT GTTCCCCAC ATCACCSCGT
401 CCTTCTTCTT GCCCGATTTC CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451 GGAAGTCCCG CTATCAGGCG CCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCTCCT
501 GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCTTGGCGCC ACCGCCGGA GCCTCCCACT
551 ACTGCGGCCG CCTTGAATAC TGGAAACCAG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601 TGCTTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCTTGC CCGGGCGCCC TGGAGACAGG
651 GGACACATGG AAGGAGGCGT CACTACTTCC ACTCTGAGC AGGGAACTGT
701 CCAGTCTGGC GTCAACAACC CTGTCTCGCC TCCTGGATGA GCTGGAGGTG
751 CTGGAAGAGC TGATTGTACT GCTGGACCTT GAGCCTGGGC CAGGTGGGGG
801 TATGGCCCAT GGCCTACTC GACACCTGGC CGCAGATAT GGGGTGCTG
851 CTGCTTGCTC CACCTTGGC TATTCGTGA GGCAGATCG CTCGCGCTG
901 CGGCTCTGTA TTGAGATGGT GGTGGCAAGG GAGCCCTCTG CCTCCTGGG
951 CCAGCTTGGC ACACACTCG CCCAGCTAGG GCGGCGAGAT GCATTGCGGG
1001 TGCTGTCCAA GCTTGGCTCA TCTGGGGTTT GCTGGGCTTA ACACCAATA
1051 AAGAACTTTG CTGACTACTA AGCCAGTAT ACAATTAGCA CTGAAGTACT
1101 TCTTGAAGTA CAATCCTAAT TGGGCAAAGA CCCACAGAT AGCCTCACTG
1151 CTCTTCGCCC TAGA

```

Amino Acid Sequence

```

1   MGFGRCLLTA LLLLALAPP EASQYCGRL YWNPDKCCS SCLRFGPPP
51  CPGALETGDT WKEASLLPLL SRELSSLASQ PLSRLLELE VLEELIVLLD
101 PEPGPGGGMA HGTTTRHLAAR YGLPAAWSTF AYSLRPSRSP LRALIEMVVA
151 REPSASLGQL GTHLAQLGRA DALRVLSKLG SSGVCWA*

```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

5/24

FIGURE 5

Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO:9) and Amino Acid Sequence
(SEQ ID NO:10) Encoding Human MK61T5 (hMK61T5).

Nucleic Acid Sequence

```

1  GTAAAGATGG GGTTCATTT TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTTGGCCTCC CAAAGTGTGG GGATTACAGG
101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTGA CTTCTAATGA CGGTTCTAAT
151 TCTCCACCAAT AACCCATATG GACAGGTGCT ATCATTGTCT TATTTTAGGG
201 ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGAIATGC
251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCTAG TGGCCTTGTG
301 GGCTTCTCTG ATAACCGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAAATCT GTTCCCCAC ATCACCGCGT
401 CCTTCTTCTT GCCCGATTTT CCCGGAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451 GGAAGTCCCG CTATCACGGC CCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCCTCT
501 GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCTTGGCGCC ACCCGCGGAA GCCTCCAGT
551 ACTGGCGCCG CCTTGAATAC TGGAAACCCG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601 TGCTTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCCTGCG CCGGAGGCGG GTCCCTGCCA
651 AGGGGSCATG CCCCCTCACA CTTGGAAACC CAGGCGCCCC TAGCTCCAG
701 GAGGCGAGCT CACCAGCAAG TTCCATTGCC TGGAGGACCC CTGAGCCTGT
751 CCTCAGCAG GCTTGGCCGA ATTCTCTTCC GCTCGTGGTG CTGGTCCCTG
801 TCCTGACCTT GCGGTGATA GCGATCCTCC TGTTTATTCT GCTCTGGCAT
851 CTCTGCTGGC CCAAGGAGAA AGCCGACCCC TATCCCTATC CTGGCTTGGT
901 CTGCGGAGTC CCCAACACCC ACACCCCTTC CTCTCGCAT CTGTCTCCCT
951 CAGGCGCCCT GGAGACAGGG GACACATGGA AGGAGGCCTC ACTACTTCCA
1001 CTCTGAGCA GGAACATGTC CAGTCTGGCG TCACAACCCC TGTCTGCCCT
1051 CTTGATGAG CTGGAGGTGC TGGAGAGGCT GATTGTACTG CTGGACCCCTG
1101 AGCCTGGGCG AGGTGGGGGT ATGGCCCATG GCATTAATCG ACACCTGGCC
1151 GCAAGATATG GGCTGCTGCG TGCTTGTGCT ACCTTTGCTT ATTCGCTGAG
1201 GCCGAGTCG TCGCCGCTGC GGGCTCTGAT TGAGATGGTG GTGGCAAGGG
1251 AGCCCTCTGC CTCCCTGGGC CAGCTTGGCA CACACCTGCG CCAGCTAGGG
1301 CGGCGAGATG CATTTGCGGT GCTGTCCAAG CTTGGCTCAT CTGGGTTTGG
1351 CTGGGCTTAA CACCAATAAA AGAACTTTGC TGACTACTAA GCCCGATATA
1401 CAATTAGCAC TGAAGTACTT CTTGAAGTAC AATCTTAATT GGGCAAGAC
1451 CCAACAGATA GCCTCACTGC TCTTGGCCCT AGA

```

Amino Acid Sequence

```

1  MGPGRCLLTA LLLLALAPP EASQYCGRL EYWNPDNKKCS SCLQRFGPPP
51  CPEAGPCQGA LPPHTWKPRR P*

```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

6/24

FIGURE 6
Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO:11) and Amino Acid Sequence
(SEQ ID NO:12) Encoding Human MK61T6 (hMK61T6)

Nucleic Acid Sequence

```
1   GTAAAGATGG GGTTCATTG TGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCTCCTGT CTGGCCTCC CAAAGTGTG GGATTACAGG
101 CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTA CTCTAATGA CGGTCTAAT
151 TCTCCACAAT AACCTATGA GACAGTGCT ATCAATTGCT TATTTTAGGG
201 ATGGAAAAGG GAGGGTGGT GGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGATATGC
251 ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGT AGTCCCTAG TGGCCTTGTG
301 GGCTTCTCTG ATAACCGGT CAGTTGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351 TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAATTCT GTTCCCCAC ATCACCGCGT
401 CCTTCTTCT GCGCGAATT CCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451 GGAAGTCCCG CTATCACGGC CCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCCTCT
501 GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCTTGGGCC ACCGCGGAA GCCTCCAGT
551 ACTGCGGCCG CCTTGAATAC TGGAACCCAG ACAACAAGTG CTGACAGCAG
601 TGCTTCAAC GCTTCGGGCC GCGCCCTGC CCGGAAGTGT CCACTCTGGC
651 GTCACAACCC CTGTCTCGCC TCCTGGATGA GCTGGAGGTG CTGGAAGAGC
701 TGATTGTACT GCTGGACCTT GAGCCTGGG CAGGTGGGGG TATGGCCCAT
751 GGCACTACTC GACACCTGGC CGCAAGATAT GGGCTGCCTG CTGCCTGGTC
801 CACCTTGGCC TATTGCTGTA GCGCGAGTC CTCGCGCTG CGGGCTTGA
851 TTGAGATGGT GGTGGCAAGG GAGCCCTCTG CCTCCCTGGG CCAGCTTGGC
901 ACACACCTCG CCCAGCTAGG GCGGGCAGAT GCATGCGGGG TGCTGTCCAA
951 GCTTGGCTCA TCTGGGGTTT GCTGGGCTTA ACACCAATA AAGAACTTTG
1001 CTGACTACTA AGCCCAAGT ACAATTAGCA CTGAAGTACT TCTTGAAGTA
1051 CAATCCTAAT TGGGCAAAGA CCAACAGAT AGCCTCACTG CTCTTCGCCC
1105 TAGA
```

Amino Acid Sequence

```
1   MGPGRCLLTA LLLLLALAPP EASQYCGRL YWNPDKCCS SCLQRFGPPP
51  CPPLSSLASQ PLRLLLELE VLEELIVLD PEPGPGGMA HGTTRHLAAR
101 YGLPAWSTF AYSLRPSRSP LRALIEMVVA REPSASLGQL GTHLAQLGRA
151 DALRVLSKLG SSGVCWA*
```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

7/24

Figure 7

Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO:13) and Amino Acid
Sequence (SEQ ID NO:14) Encoding Mouse MK61 (mMK61;
Smi12-00051-F3)

Nucleic Acid Sequence

```
1 CGGACGCGTG GCGGACGCG TGGGTGGGTC TGCACGAAA CAGTGTGGGT
51 GGAAGTGGTC ACAGCCCTCA AGCTGCAGGC TCTGCTGAGA TGGGGCCCAG
101 CTGGCTTCTC TGGACAGTGG CGGTGGCAGT GCTGCTCCTG ACCCGGGCTG
151 CGTCAATGGA AGCCTCTAGC TTCTGTGGCC ACCTTGAGTA CTGGAACCTCT
201 GACAAGAGGT GCTGCAGCCG CTGCCCTGCAA CGCTTTGGGC CTCTGCATG
251 TCCTGATCAC GAGTTCAAGG AAAACTGCGG GCTCAATGAC TTCGGCGATA
301 CTGTAGCACA TCCTTTCAAA AAGTGTTCCT CTGGGTATTG CAACCCCAAT
351 GGCACAGAGC TGTGTAGCCA GTGTAGCAGC GGAGCCGCGC CAGCCCCAGC
401 TCACGTGGAG AGCCCTGGTA GAACCCACAA GCAGTGTAGA AAGAAGCCCG
451 TCCTCTCCAA GGATGTCTGT CCTCTTAAAC CTGAAGACGC AGGTGCCCTCT
501 AGCTCACCTG GGAGGTGGAG CCTTGGGCAG ACAACCAAGA ATGAGGTCTC
551 CAGCCGACCA GGTTTTGTCT CAGCCTCAGT GCTGCCCTCT GCAGTGTGTC
601 CACTGTTGCT GGTGCTGCTT CTGATATTGG CAGTGGTCTT GCTCTCTTTC
651 TTCAAGAGAA AAGTCCGCTC CCGTCCCTGT TCCAGCTCAG CTTTGGGAGA
701 TCCAGCACC TCTCTACATT ACTGGCCCTG CCCAGGTACC CTGGAGGTAT
751 TGGAAGTAGG AAACAGAGGG AAGCTTAATC TGCTGCAGCT CTCAGCTGG
801 GAGCTTCAGG GTCTGGCCTC TCAGCCCTTC TCCTCCTGTC TGGATGAGCT
851 GGAAGTTCTG GAGGAGCTGA TTATGCTATT GGACCTTAGC CCTGGGCGGA
901 GGGGGAGCAC GGCTTATGTT ACCACACGAC ACCTGGCTGC AAGATACGGG
951 CTGCCTGCCA CCTGGTCTAC CTTCGCTTAC TCACTTCGGC CAGTCTGCTC
1001 ACCCTGCGG GCCCTGATTG AGATGGTTGT GGCAGGGGAG CCTCTGCTA
1051 CTCTGGGTCA ATTCCGACCA TATTGGCTC AGCTAGGTGC CACAGATGCT
1101 CTGCAGGTGC TATCTAAACT TGGCTGAGTC AGAGTTTGCT GGGGCTTACT
1151 ACTCCATCAA TAAAGTTTCC CTTGAAGCCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
1201 AA
```

Amino Acid Sequence

```
1 MGPSWLLWTV AVAVLLLTTRA ASMEASSFCG HLEYWNSDKR CCSRCLQRFG
51 PPACPDHEFT ENGLNDFGD TVAHPPFKCS PGYCNPNGTG LCSQCSSGAA
101 AAPAHVESPG RTHKQCRKPK VPPKDVCPK PEDAGASSSP GRWSLGQTTK
151 NEVSSRPGFV SASVLPFLAVL PLLLVLLLLI AVLLSLFKR KVRSRPGSSS
201 AFGDPSTSLH YWPCPGTLEV LBSRNRKAN LLQLSSWELQ GLASQPLSL
251 LDELEVLEEL IMLDFEPGP SGSTAYGTTT HLAARYGLPA TWSTFAYSLR
301 PRSPRLRALI EMVAREPFA TLGQFGTYLA QLGRIDALQV LSLKLG*
```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

8/24

Figure 8
Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO:15) and Amino Acid Sequence
(SEQ ID NO:16) Encoding Mouse mMK61-Fc Fusion Polypeptide
(mMK61-Fc)

Nucleic Acid Sequence

```

1  CCACCATGGG GCCCAGCTGG CTCTCTGGA CAGTGGCGGT GGCAGTGCCT
51  CTCTTGACCC GGGCTGCGTC AATGGAAGCC TCTAGCTTCT GTGGCCACCT
101  TGAGTACTGG AACTCTGACA AGAGGTGCTG CAGCGCTGCT GTGCACGCT
151  TTGGGCTTCC TGCATGTCTT GATCAGGAGT TCACGGAAAA CTGCGGGCTC
201  AATGACTTCG GCGATACTGT AGCACATCCT TTCAAAAAAGT GTTCCCTGG
251  GTATTGCAAC CCCAATGGCA CAGAGCTGTG TAGCCAAGTGT AGCAGCGGAG
301  CCGCCGACAG CCCAGCTCAC GTGGAGAGCC CTGGTAGAAC CCACAAGCAG
351  TGTAGAAAGA AGCCCGTCCC TCCCAAGGAT GTCTGTCTCT TTAACCTGA
401  AGACGCAGGT GCCTCTAGCT CACCTGGGAG GTGGAGCCTT GGGCAGACAA
451  CCAAGAAATGA GGTGCGGGCC GCTCGTCGTG CATCAGTAGA GCCCAAATCT
501  TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG
551  GGGACCGTCA GTCTTCTCTT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA
601  TCTCCCGGAC CCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
651  GACCTTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA
701  TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG
751  TCAGCGTCTT CACCGTCCGT CACGAGGACT GGTGATGAG CAAGGAGTAC
801  AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCATCG AGAAAAACAT
851  CTCCAAGGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC
901  CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTTGGTC
951  AAAGGCTTCT ATCCACGCGA CTGCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA
1001  GCCGGAGAAC AACTACAGGA CCACGCTTCC CGTGTGGAG TCCGACGGCT
1051  CCTTCTTCTT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
1101  GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
1151  CAGCAGAAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAAGAAGA GCTAGTCTCC
1201  ATCATCATCA TCATCATTGA TAAGTCGAC

```

Amino Acid Sequence

```

1  MGPFWLLWTV AVAVLLLLTRA ASMEASSPCG HLEYWNSDKR CCSRLQRFQ
51  PPACPDHEFT ENCGLNDFGD TVAHPPKKCS PGYCNFNGTE LCSQCSSGAA
101  AAPAHVESPG RTHKQCRKKE VPPKDVCPK PEDAGASSSP GRWSLGQTTK
151  NEVAAAARRAS VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
201  RTPEVTCVIV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEY HNAKTKPREB QYNSTYRVVS
251  VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPLEK TISKARGQPR EPOVYTLPPS
301  RDELTKNOVS LTCLVKGFPY SDIAVEWESN GQPNNNYKTT PPVLDSGSP
351  FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSMVHEALHN HYTKSLSLSS PGKRRASLHH
401  HHHH**

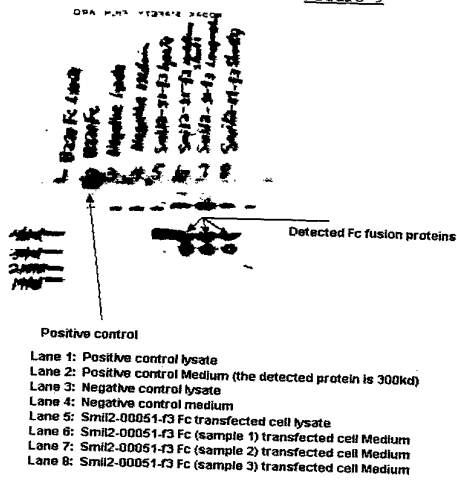
```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

9/24

Figure 9



WO 02/20762

PCT/US01/27631

10/24

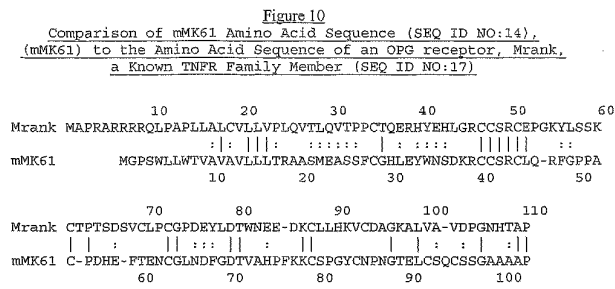


Figure 11

```

      10      20      30      40      50
Mfasr  MLMIWAVLPLVLGASQLRVHTQGTNISISLKLRRRVHETDKNC-SEGLYQGGPF
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
mMk61  MGPSWLLPSWLLTWAVAVLLLT-----RAASMEASSFCGLHEYW----NSDKRCCSRLQRFQGP
      10      20      30      40      50

      60      70      80      90      100     110
Mfasr  CQCPQCPQKKKVBDCKMNG-GTPTCAP-----CTEGKEYMDKNHYADKRCRCLTCDBEHHGLE
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
mMk61  AC-----PDHEFTENGLNDGFGTVAHPFKCSCSP- YCNFNG- TELCSQCSCSGAAAPAH
      60      70      80      90      100     110

      120     130     140     150     160
Mfasr  VETNCTLTQNTCKCKKDPFYCDSPGCEHCVRCAACEBHGLTEPCTATSTNTNCRKQS-----
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
mMk61  VESPGRTHK---QCRKKVPFVKDVLCPKPEDAGASSSPGRWSLGGTTKNEVSSRPFVFSAS
      110     120     130     140     150     160

      170     180     190     200
Mfasr  --PNRLWLLTLVLVLIPLVFYI---RKYRKRCWKWRQDDPES
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
mMk61  VLPLAVLPLLLVLLLLILAVLLSLFKRKVRSRPGSSAFQDPST
      170     180     190     200

```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

12/24

Figure 12
Comparison of mMKG1 Amino Acid Sequence (SEQ ID NO:14),
(mMK61) to the Amino Acid Sequence of a Known Mouse
Lymphotoxin-Beta Receptor, Tnfrc, (SEQ ID NO:19)

Tnfrc	90	100	110
	EHWNLTICQLCRPCDPVNGLEETAP--CT		
mMK61	40	50	
	EYWNSDKRC--CSRC-----LQRFPGPPACP		
	120	130	140
Tnfrc	SKRKTC-C-----RCQPGMFCAAWALECTHCELLSDCPPGTEAELEKDEVGK	150	160
	::: :	: : :	: : :
mMK61	DHEPTENCGLNDFGDTVAHPFKCSPG-YCNP-----NGTELCSCSSGAAAPAHVESP	90	100
	60	70	80
	170	180	190
Tnfrc	GMNHCVPCKAGHFQNTSSPSARCQPHTRCENQGLVEAAPGTAQSDTTCKNPLEPLPEMS	200	210
	: : :	: : :	: : :
mMK61	GRTHK-QCR---KKPVPPKDVCP-P-LKPEDAG-ASSSPGRWSLGQTTKNEVSSRPGFVS	110	120
	110	120	130
	230	240	250
Tnfrc	GTMLMLAVL-LPLAFFLLLATVFSCTWK---SHPSLCRKLG---SLLKRRPQGEGPNPV	260	270
	::: : :	: : :	: : :
mMK61	ASVLPPLAVLPLLLVLLILAVVLSLFRKVRSRPGSSSAFGDPSTSLHYWPC-PGTLEV	170	180
	170	180	190
	280	290	300
Tnfrc	AGSWPEPPKAHPYFPDLVQ-PLLPISGDVS-PVSTGLPAAPVLEAGVPQQSPDLDTREPO	310	320
	: :	: :	: :
mMK61	LESRRRGKA-----NLLQLSSWELQGLASQPLSLLELEVLEE-----LIMLLDP-	230	240
	230	240	250
	340		
Tnfrc	LEPGEQSQVAHGNTN		
	: : :		
mMK61	-BPGFSGSTAYGTT		
	270		

WO 02/20762

PCT/US01/27631

13/24

Figure 13
Human MK61 mRNA expression in human tissues,
as determined by Northern blotting

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.



1. spleen
2. thymus
3. prostate
4. testis
5. ovary
6. small int
7. colon
8. peripheral
blood leukocyte

WO 02/20762

PCT/US01/27631

14/24

Figure 14

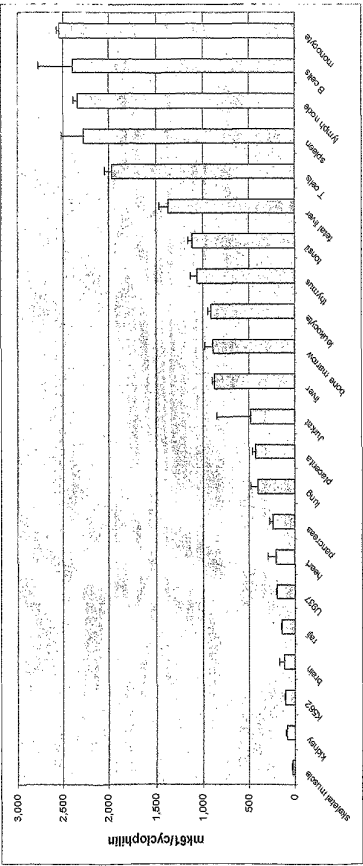
Human MK61 mRNA expression in human
lymphoid tissues, as determined by Northern blotting

1. 2. 3. 4. 5. 6.



1. spleen
2. lymph node
3. thymus
4. peripheral
blood leukocyte
5. bone marrow
6. fetal liver

Figure 15
Human MK61 mRNA expression in human tissues and cell lines, as determined by
quantitative PCR

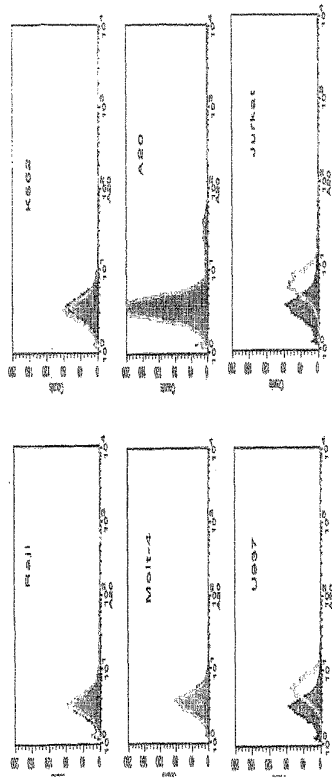


WO 02/20762

PCT/US01/27631

16/24

Figure 16
MK61-Fc binding to cell lines, as determined by FACS analysis



WO 02/20762

PCT/US01/27631

17/24

Figure 17

MK61-Fc binding to monozytic and T cell lines with and without pretreatment with interferon gamma, as determined by FACS analysis

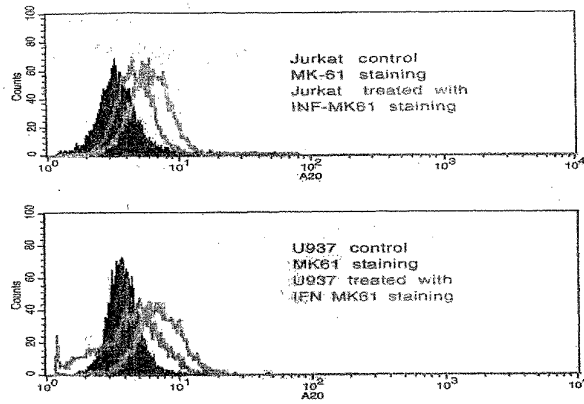


Figure 18
Effect of MK61-Fc on LPS (150 ng/ml) induced IgG and IgA reduction
in mouse splenocyte cultures

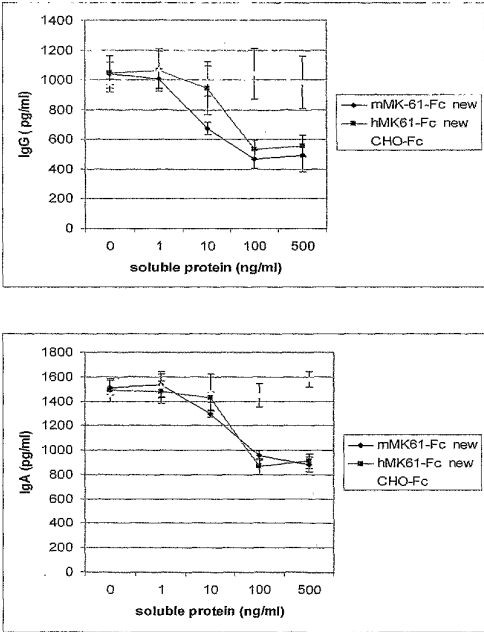
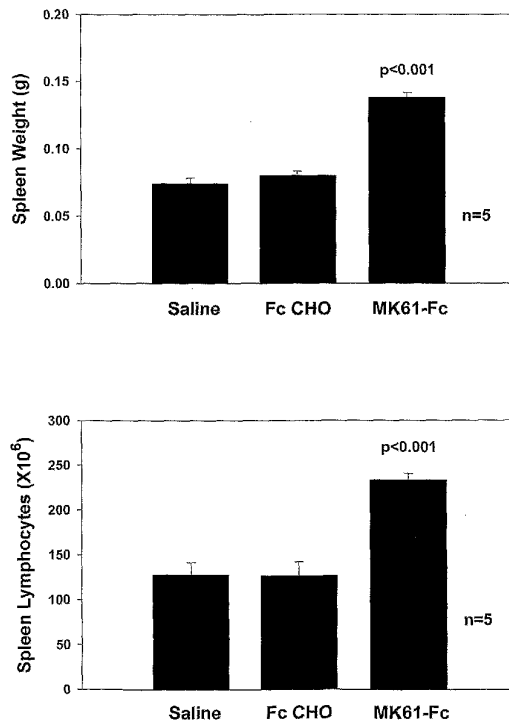


Figure 19

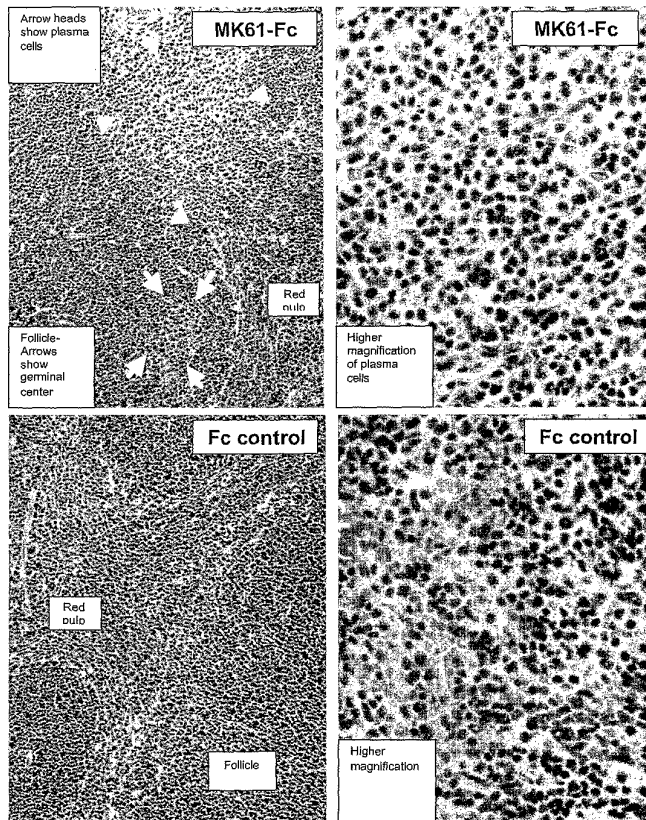
Effect of MK61-Fc treatment on lymphocyte numbers *in vivo*

WO 02/20762

PCT/US01/27631

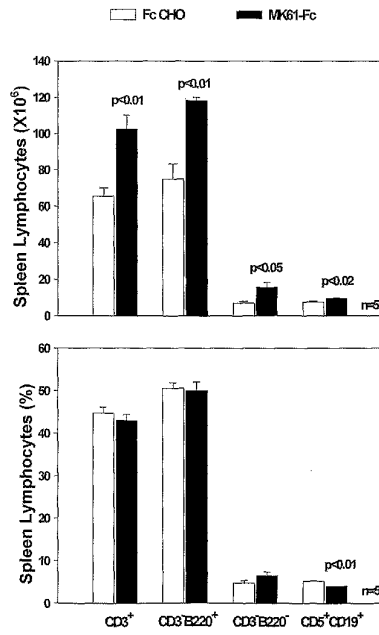
20/24

Figure 20



WO 02/20762

PCT/US01/27631

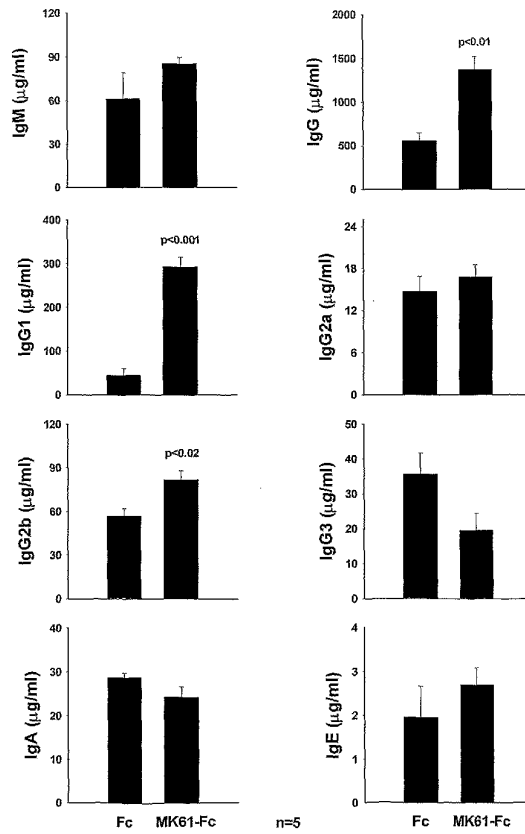
21/24
Figure 21Effect of MK61-Fc treatment on spleen B and T cell numbers *in vivo*

WO 02/20762

PCT/US01/27631

22/24

Figure 22
Effect of MK61-Fc treatment on plasma I
mmunoglobulin levels *in vivo*



WO 02/20762

PCT/US01/27631

23/24

Figure 23

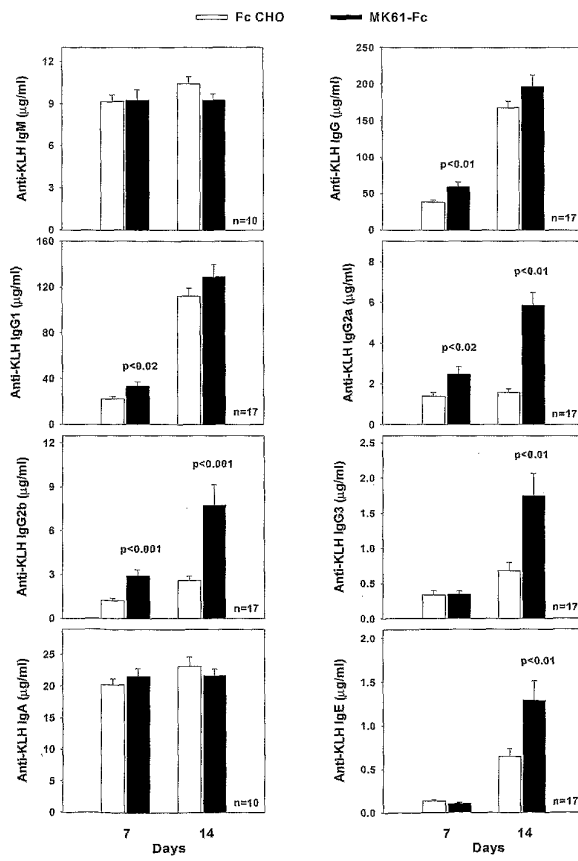
Effect of MK61-Fc treatment on generation of
anti-KLH specific antibodies *in vivo*

Figure 24
human MK61-deltaFc CHO aa sequence

1	MGFGRCLTA LLLALAPP EASOYCGRL E YWNPDKKCS SCLQRFPPP
51	CPDYERENC GLNDHGDFT PPRKCSSGQ CNPDGAELCS PCGGGAVTPT
101	PAAAGGRTPW RCRERVPK GHCLTPGNP GAPSSQERS PASSIAWRTP
151	EPVDKTHTCP PCAPELLGG PSVFLPPKP KDTLMISRT EYTCVVVDVS
201	HEDPEVKFNW YYDQVEVHNA KTKPREQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK
251	EYKCKVSNKA LPAPIEKTHS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLT
301	LVKGFYPSDI AVEVESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFELY SKLTVDKSRW
351	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Figure 25
human MK61-Fc CHO aa sequence

1	MGPSWLLWTV AVAVLLTRA ASMEASSFCG HLEYVNSDKR CCSRCLOREG
51	PPACTDHEFT ENGLNDFGD TVAHPKKCS PGYCNPNGB LCSCQSSGAA
101	AAPAHVESPG RTHKQCRKP VPKDYCPK PEDAGASSP GRWSLGQITK
151	NEVDKTHTCP PCAPELLGG PSVFLPPKP KDTLMISRT EYTCVVVDVS
201	HEDPEVKFNW YYDQVEVHNA KTKPREQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK
251	EYKCKVSNKA LPAPIEKTHS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLT
301	LVKGFYPSDI AVEVESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFELY SKLTVDKSRW
351	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

WO 02/20762

PCT/US01/27631

SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN Inc.

<120> TNF RECEPTOR-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

<130> 01017/37677

<150> US 60/230,191

<151> 2000-09-05

<160> 45

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1668

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
gtaaagatgg gggttcattt tgtgtccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtg 60
atcctcctgt ctgggcctcc caaagtgttg ggattacagg catgagccac cacaccacgc 120
ccctgcttta ctctaatga cggttctaatt tctccacaat aacctatga gacaggtgct 180
atcattgtct tatcttaggg atggaagagg gaggtgggt gggtaggac acggcagagg 240
tgaggatagc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtccctag tggccttggtg 300
ggcttctctg ataaccggct cagttggggg atgagggctc ggggtagat tcccgcttc 360
cgaagaggcg tgagaattct gttccccac atcacgcgt cctttcttct gcccgatttc 420
ccggaaaagt gtagcagagg cgctgtgttt ggaagtcccg ctatcacggc cccccagatg 480
gggcctggac gatgctcct gacggccttg ttgcttctgg cctggcgcc accgcccga 540
gcctccagtg actgcccgg ccttgaatac tggaaccag acaacaagtg ctgcagcagc 600
tgctgcaac gcttcggggc gcccccctgc ccgactatg agttccggga aaactgcgga 660

WO 02/2762

PCT/US01/27631

```

ctcaatgacc acggcgattt cgtaacgccc ccgttcgaa agtggtcttc tgggcagtgc 720
aaccocgacg gcgcggagct atgtagcccc tgcggcggcg gagccgtgac cccactccc 780
gcgcggggcg ggggcagaaac ccctggcgcg tgcagagaga ggccgggtccc tgccaagggg 840
cactgcccc tcacacctgg aaacccaggc gccctagct cccaggagcg cagctcacca 900
gcaagttcca ttgctggag gacccctgag cctgtccctc agcaggcctg gcogaatttc 960
cttcgctcg tggctctggt cctgctcctg acctggcgg tgatagcgat cctcctgttt 1020
attctgctct ggcactctcg ctggcccaag gagaagccg acccctatcc ctatcctggc 1080
ttggtctgag gagtcccaa caccacacc ccttctcct cgcactctgc ctcccaggc 1140
gccctggaga caggggacac atggaaggag gcctcactac ttccactcct gacgagggaa 1200
ctgtccagtc tggcgtcaca acccctgtct cgcctcctgg atgagctgga ggtgctggaa 1260
gagctgattg tactgctgga cctgagcct gggccaggcg ggggtatggc ccatggcact 1320
actcgacacc tggcgcgaag atatgggctg cctgctgcct ggtccacctt tgcctattcg 1380
ctgaggccga gtgcctgccc gctgcgggct ctgattgaga tgggtgtggc aaggagagcc 1440
tctgcctccc tggccagct tggcacacac ctgcccagc tagggcgggc agatgcattg 1500
cgggtgctgt ccaagcttg ctcatctggg gtttgcctgg ctaaacacc aataaagaac 1560
tttgcctgact actaagccca gtatacaatt agcactgaag tacttcttga agtacaatcc 1620
taattgggca aagacccaac agatagcctc actgctcttc gccctaga 1668

```

<210> 2

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Ala Leu
1           5           10          15

```

```

Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp
20          25          30

```

```

Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro
35          40          45

```

```

Pro Pro Cys Pro Asp Tyr Glu Phe Arg Glu Asn Cys Gly Leu Asn Asp
50          55          60

```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

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

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Ser Arg Ser Pro Leu Arg Ala Leu Ile Glu Met Val Val Ala Arg Glu
305 310 315 320

Pro Ser Ala Ser Leu Gly Gln Leu Gly Thr His Leu Ala Gln Leu Gly
325 330 335

Arg Ala Asp Ala Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Gly Ser Ser Gly Val
340 345 350

Cys Trp Ala
355

<210> 3

<211> 1525

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3
gtaaagatgg ggtttcattt tgtgtccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtg 60
atcctcctgt ctggcctcc caaagtgtt ggattacagg catgagccac cacaccagc 120
ccctgcttta ctctaatga cggttctaata tctccacaat aacctatga gacagggtgt 180
atcattgtct tatTTtaggg atggaaaagg gagggtaggt gggtgaggac acggcagagg 240
tgggatatgc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtccctag tggccttgtg 300
ggcttctctg ataacggcct cagttggggg atgagggtctc ggggtagat tcccgcttc 360
cgaagaggcg tgagaattct gttccccac atcaccgct cctttcttct gcccgatttc 420
cccgaaaagt gtagcagagg cgtgtgttt ggaagtccc ctatcaggc cccccagatg 480
gggcctggac gatgctcct gacggccttg ttgcttctgg cctggcgcc acgccggaa 540
gcctccagct actgoggcg cttgaatac tggaaaccag acaacaagt ctgcagcagc 600
tgctgcaac gcttcgggccc gcccccctgc ccgggtgaga atccgagacc gagccttgc 660
tggcgaggac ttgcagaggc cggctccctgc caaggggac tgcacctca cacctggaaa 720
cccaggcgcc cctagctccc aggagcgag ctcaccagca agttocattg cctggaggac 780
ccctgagcct gtccctcagc aggcctggcc gaatttcct cgcctcgtgg tgctggtcct 840
gctcctgacc ttggcggtag tagcgtacct cctgtttatt ctgctctggc atctctgctg 900
gcccaggag aaagccgacc cctatcccta tcctggcttg gtctgcggag tccccaacac 960
ccacaccct tcctctcgc atctgtcctc ccaggcgcc ctggagacag gggacacatg 1020
gaaggaggcc tcaactctc cactcctgag cagggaactg tccagtctgg cgtcacacc 1080
cctgtctcgc ctctgggatg agctggagggt gctggaagag ctgattgtac tgctggaccc 1140

WO 02/20762

PCT/US01/27631

tgagcctggg ccaggtgggg gtatggccca tggcactact cgacacctgg ccgcaagata 1200
 tggggtgcct gctgcctggt ccacctttgc ctattcgctg aggcagagtc gctgcgcgct 1260
 gggggctctg attgagatgg tgggtggcaag ggagccctct gcctccctgg gccagcttgg 1320
 cacacacctc gccagctag ggcgggcaga tgcattgcgg gtgctgtcca agcttggtctc 1380
 atctgggggtt tgcggggctt aacacccaat aaagaacttt gctgactact aagccacagta 1440
 tacaattagc actgaagtac ttcttgaagt acaatcctaa ttgggcaaag acccaacaga 1500
 tagcctcact gctcttcgcc ctaga 1525

<210> 4

<211> 85

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp
 20 25 30

Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro
 35 40 45

Pro Pro Cys Pro Gly Glu Asn Pro Arg Pro Ser Leu Ala Trp Ala Glu
 50 55 60

Leu Ala Glu Ala Gly Pro Cys Gln Gly Ala Leu Pro Pro His Thr Trp
 65 70 75 80

Lys Pro Arg Arg Pro
 85

<210> 5

<211> 1289

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gtaaatgagg ggtttcattt tgtgtccag gctgatctct cgaactcctg ggtcaaagt 60
 atcctcctgt ctgggcctcc caaagtgttg ggattacagg catgagccac cacaccacgc 120

WO 02/20762

PCT/US01/27631

```

cctgcttta cttctaata cggttctaata tctccacaat aaccctatga gacaggtgct 180
atcattgtct tatttttaggg atggaaaagg gagggtaggt gggtagggac acggcagagg 240
tgggatatgc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtcccttag tggccttgtg 300
ggcttctctg ataaocggct cagttggggg atgagggctc gggggtagat tcccggttc 360
cgaagaggcg tgagaattct gtccccccac atcacgcgt cctttctct gcccgatctc 420
ccggaaaagt gtagcagagg cgtgtgtttt ggaagtcgc ctatcacggc ccccagatg 480
gggcctggac gatgcctcct gacggccttg ttgcttctgg cctggcgcc accgccgaa 540
gcctccagct actgogggcg ccttgaatac tggaaccag acaacaagt ctgcagcagc 600
tgctgcaac gcttggggcc gcccccctgc ccggactatg agttccggga aaactgcgga 660
ctcaatgacc acgocgattt cgtaacgcc ccgttccgaa agtgttcttc tgggcagtgc 720
aaccocgacg gcgcggagct atgtagcccc tgogggcgcg gacccgtgac cctactccc 780
gcgcggggcg ggggcagaac cccgtggcg cgcagagaga actgtccagt ctggcgctac 840
aaccctgtc tgcctcctg gatgagctgg aggtgctgga agagctgatt gtactgctgg 900
accctgagcc tgggcaggt gggggtatgg cccatggcac tactgcacac ctggccgcaa 960
gatatgggct gcctgctgcc tggccacct ttgcctatto gctgagggcg agtcgctcgc 1020
cgctgcgggc tctgattgag atgggtgtgg caaggagacc ctctgcctcc ctgggcccagc 1080
ttggcacaca cctgcgccag ctaggggcggg cagatgcatt gcgggtgctg tccaagcttg 1140
gctcatctgg ggtttgctgg gcttaacacc caataaagaa ctttgcgtac tactaagccc 1200
agtatacaat tagcactgaa gtacttcttg aagtacaatc ctaattgggc aaagacccaa 1260
cagatagcct cactgctctt cgccttaga 1289

```

<210> 6

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Ala Leu
1           5           10          15

```

```

Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp
20          25          30

```

```

Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro
35          40          45

```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Pro Pro Cys Pro Asp Tyr Glu Phe Arg Glu Asn Cys Gly Leu Asn Asp
 50 55 60

His Gly Asp Phe Val Thr Pro Pro Phe Arg Lys Cys Ser Ser Gly Gln
 65 70 75 80

Cys Asn Pro Asp Gly Ala Glu Leu Cys Ser Pro Cys Gly Gly Gly Ala
 85 90 95

Val Thr Pro Thr Pro Ala Ala Gly Gly Gly Arg Thr Pro Trp Arg Cys
 100 105 110

Arg Glu Asn Cys Pro Val Trp Arg His Asn Pro Cys Leu Ala Ser Trp
 115 120 125

Met Ser Trp Arg Cys Trp Lys Ser
 130 135

<210> 7

<211> 1164

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7
 gtaagatgg ggtttcattt tgtgtccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtg 60
 atcctcctgt ctggcctcc caaagtgttg ggattacagg catgagccac cacaccagc 120
 cctgcttta ctctaatga cggttctaatt tctccacaat aacctatga gacaggtgct 180
 atcattgtct tattttaggg atggaaaagg gaggtgggt gggtgaggac acgcagagag 240
 tgggatatgc attcttgcaa tctagatcgg cagccctgtt agtccctag tggccttggt 300
 ggcttctctg ataaccggct cagttggggg atgagggtc ggggtagat tccggcttc 360
 cgaagaggcg tgagaattct gttccccac atcaccgct ccttctctt gcccgatttc 420
 ccggaaagt gtagcagag cyctgtgttt ggaagtccg ctatcacggc ccccgatg 480
 gggcctggac gatgctcct gacggccttg ttgcttctgg cctggcgcc accgcggaa 540
 gcctccagt actgcggcgg ccttgaatac tggaaaccag acaacaagt ctgcagcagc 600
 tgctgcaac gcttcgggccc gccccctgc cggggcgccc tggagacagg ggacacatgg 660
 aaggaggcct cactacttcc actcctgagc agggaaactgt ccagtctggc gtcacaaccc 720
 ctgtctcgcc tcttgatga gctggagggt ctggaagagc tgattgtact gctggacct 780
 gagcctgggc caggtggggg tatggcccat ggcactact gacacctggc cgcaagatat 840
 gggctgcctg ctgcctggtc cacccttgcc tattcgtga ggcgagtcg ctgcgcctg 900

WO 02/20762

PCT/US01/27631

```

ggggctctga ttgagatggt ggtggcaagg gagccctctg cctccctggg ccagcttggc 960
acacacctcg cccagctagg gctgggcagat gcattgcggg tgctgtccaa gcttggctca 1020
tctgggggtt gctgggctta acaccaata aagaactttg ctgactacta agcccagtat 1080
acaattagca ctgaagtact tcttgaagta caatccta atgggcaaaga cccaacagat 1140
agcctcactg ctcttcgccc taga 1164

```

<210> 8

<211> 187

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

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

```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Gly Thr His Leu Ala Gln Leu Gly Arg Ala Asp Ala Leu Arg Val Leu
 165 170 175

Ser Lys Leu Gly Ser Ser Gly Val Cys Trp Ala
 180 185

<210> 9

<211> 1493

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9
 gtaaagatgg ggtttcattt tgtgtccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtg 60
 atcctcctgt cttggcctcc caaagtgttg ggattacagg catgagccac cacccccagc 120
 ccctgcttta cttctaataa cggttctaata tctccacaat aacctatga gacaggtgct 180
 atcattgtct tattttaggg atggaaaagg gaggggtggg gggtagggac accgcagagg 240
 tgggatatgc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtccctag tggccttggtg 300
 ggcttctctg ataaccggct cagttggggg atgagggctc gggggtagat tcccggttc 360
 cgaagaggcg tgagaattct gtccccccac atcacgcgt ctttcttct gcccgatttc 420
 cccggaagt gtagcagagg cgtgtgtttt ggaagtccg ctatcacggc ccccagatg 480
 gggcctggac gatgcctcct gacggccttg ttgcttctgg cctgggccc accgcgggaa 540
 gcctcccagt actgoggcgg ccttgaatac tggaaaccag acaacaagtg ctgcagcagc 600
 tgcttgaac gcttcgggccc gccccctgc ccggaggccc gtccctgcca aggggcactg 660
 cccctcaca cctggaaaac caggcgcccc tagctccag gagcgagct caccagcaag 720
 ttccattgcc tggaggaccc ctgagcctgt ccctcagcag gcttggcga atttccttc 780
 gctcgtggtg ctggtcctgc tctgacctt ggcggtgata gcgatcctcc tgtttattct 840
 gctctggcat ctctgctggc ccaaggagaa agccgacccc tatcctatc ctggcttggg 900
 ctgcggagtc ccaaacaccc acaccccttc ctctctgcat ctgtcctccc caggcgccct 960
 ggagacaggg gacacatgga aggaggcctc actacttcca ctctgagca gggaaactgtc 1020
 cagtctggcg tcacaacccc tgtctcgct cctggatgag ctggaggtgc tggaaagagct 1080
 gattgtactg ctggacctg agcctgggccc aggtgggggt atggcccatg gcaactactcg 1140
 acacctggcc gcaagatatg ggtgctctgc tgctgggtcc acctttgct attogctgag 1200
 gccgagtcgc tcgcccgtgc gggctctgat tgagatgggt gtggcaaggg agccctctgc 1260
 ctccctgggc cagcttgga cacaacctgc ccagctaggg cgggcagatg cattcgggg 1320

WO 02/20762

PCT/US01/27631

gctgtccaag cttgggtcat ctgggggttg ctggggttaa cacccaataa agaactttgc 1380
 tgactactaa gccagatata caattagcac tgaagtactt ctgaagtac aatcctaatt 1440
 gggcaaagac ccaacagata gctcactgc tcttcgcctt aga 1483

<210> 10

<211> 71

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp
 20 25 30

Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro
 35 40 45

Pro Pro Cys Pro Glu Ala Gly Pro Cys Gln Gly Ala Leu Pro Pro His
 50 55 60

Thr Trp Lys Pro Arg Arg Pro
 65 70

<210> 11

<211> 1104

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11
 gtaaagatgg gggttcattt tgtgtccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtg 60
 atcctcctgt cttggcctcc caaagtgttg ggattacagg catgagccac cacaccagc 120
 ccctgcttta cttctaataa cgggttctaat tctccacaat aacctatga gacaggtgct 180
 atcattgtct tatttttaggg atggaaaagg gaggggtggg gggtgaggac acggcagagg 240
 tgggatatgc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtccctag tggccttgtg 300
 ggcttctctg ataaccggct cagttggggg atgagggctc gggggtagat tcccggttc 360
 cgaagaggcg tgagaattct gtccccccac atcaccgcgt cctttcttct gcccgatttc 420
 ccggaaaagt gtagcagagg cgtctgtgtt ggaagtcccg ctatcacggc cccccagatg 480

WO 02/20762

PCT/US01/27631

```

gggcctggac gatgctcct gacggccttg ttgcttctgg cctggcgcc accgccggaa 540
gcctccagtg actgcgcccg cttgaatac tggaaaccag acaacaagtg ctgcagcagc 600
tgcttgcac gcttcgggccc gcccccctgc ccggaactgt ccagtcctggc gtcacaaccc 660
ctgtctcgcc tcctggatga gctggaggtg ctggaagagc tgattgtact gctggacct 720
gagcctgggc caggtggggg tatggcccat ggcactactc gacacctggc cgcaagatat 780
gggctgcttg ctgctgggc cacttttgcc tattcgtga gcccgagtcg ctgcgcgctg 840
cgggctctga ttgagatggt ggtggcaagg gagcctctg cctccctggg ccagcttggc 900
acacacctcg ccagctagg gcgggcagat gcattgoggg tgctgtccaa gcttggctca 960
tctggggttt gctgggotta acaccaata aagaactttg ctgactacta agcccagtat 1020
acaattagca ctgaagtact tctgaagta caatcctaata tgggaaaga cccaacagat 1080
agcctcactg ctcttcgccc taga 1104

```

<210> 12

<211> 167

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Ala Leu
1           5           10          15

```

```

Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp
20          25          30

```

```

Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro
35          40          45

```

```

Pro Pro Cys Pro Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Arg
50          55          60

```

```

Leu Leu Asp Glu Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu Ile Val Leu Leu Asp
65          70          75          80

```

```

Pro Glu Pro Gly Pro Gly Gly Gly Met Ala His Gly Thr Thr Arg His
85          90          95

```

```

Leu Ala Ala Arg Tyr Gly Leu Pro Ala Ala Trp Ser Thr Phe Ala Tyr
100         105         110

```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Ser Leu Arg Pro Ser Arg Ser Pro Leu Arg Ala Leu Ile Glu Met Val
115 120 125

Val Ala Arg Glu Pro Ser Ala Ser Leu Gly Gln Leu Gly Thr His Leu
130 135 140

Ala Gln Leu Gly Arg Ala Asp Ala Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Gly
145 150 155 160

Ser Ser Gly Val Cys Trp Ala
165

<210> 13

<211> 1202

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13
 cggacgctg ggcggacgctg tgggtgggtc tgcactgaaa cagtgtgggt ggaagtgggt 60
 acagccctca agctgcaggc tctgctgaga tggggcccag ctggcttctc tggacagtgg 120
 cgggtggcagt gctgctcctg acccgggctg cgtcaatgga agcctotagc ttctgtggcc 180
 accttgagta ctggaactct gacaagaggt gctgcagccg ctgcctgcaa cgccttgggc 240
 ctctctcatg tctgatcac gagtacacgg aaaactgagg gctcaatgac ttccggcgata 300
 ctgtagcaca tcttttcaaa aagtgttccc ctgggtattg caaccccaat ggcacagagc 360
 tgtgtagcca gtgtagcagc ggagccgccc cagccccagc tcacgtggag agccctggta 420
 gaaccacaaa gcagtgtaga aagaagccc tccctcccaa gcatgtctgt cctcttaaac 480
 ctgaagacgc aggtgctct agctcacctg ggaggtggag ccttgggcag acaaccaaga 540
 atgaggtctc cagccgacca ggttttgtct cagcctcagt gctgctctg gcagtgttgc 600
 cactgttgcg ggtgctgctt ctgatatggc cagtggctct gctctcttg tccaagagaa 660
 aagtccgttc ccgtcctgg tccagctcag cttttggaga tcccagacc tctctacatt 720
 actggccctg cccaggtacc ctggaggtat tggaaagtag aaacagagg aaagctaata 780
 tgcctgagct ctcaagctgg gagcttcagg gtctggcctc tcagccctc tccctcctgc 840
 tggatgagct ggaagtctct gaggagctga ttatgctatt ggaccctgag cctgggcccga 900
 gcgggagcac ggcttatggg accacacgac acctggctgc aagatacggg ctgcctgccca 960
 cctggtctac cttgcctac tcacttcggc ccagtcgctc acccctgagg gccctgattg 1020
 agatggttgt ggcgaaggag ccttctgcta ctctgggtca attcggcaca tatttggtctc 1080

WO 02/20762

PCT/US01/27631

agctaggctg cacagatgct ctgcagggtgc tatctaaact tggctgagtc agagtttgct 1140
 ggggcttact actccatcaa taaagtgttc cttgaagcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
 aa 1202

<210> 14

<211> 345

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Met Gly Pro Ser Trp Leu Leu Trp Thr Val Ala Val Ala Val Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Thr Arg Ala Ala Ser Met Glu Ala Ser Ser Phe Cys Gly His Leu
 20 25 30

Glu Tyr Trp Asn Ser Asp Lys Arg Cys Cys Ser Arg Cys Leu Gln Arg
 35 40 45

Phe Gly Pro Pro Ala Cys Pro Asp His Glu Phe Thr Glu Asn Cys Gly
 50 55 60

Leu Asn Asp Phe Gly Asp Thr Val Ala His Pro Phe Lys Lys Cys Ser
 65 70 75 80

Pro Gly Tyr Cys Asn Pro Asn Gly Thr Glu Leu Cys Ser Gln Cys Ser
 85 90 95

Ser Gly Ala Ala Ala Ala Pro Ala His Val Glu Ser Pro Gly Arg Thr
 100 105 110

His Lys Gln Cys Arg Lys Lys Pro Val Pro Pro Lys Asp Val Cys Pro
 115 120 125

Leu Lys Pro Glu Asp Ala Gly Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Trp Ser
 130 135 140

Leu Gly Gln Thr Thr Lys Asn Glu Val Ser Ser Arg Pro Gly Phe Val
 145 150 155 160

Ser Ala Ser Val Leu Pro Leu Ala Val Leu Pro Leu Leu Val Leu
 165 170 175

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Leu Leu Ile Leu Ala Val Val Leu Leu Ser Leu Phe Lys Arg Lys Val
 180 185 190

Arg Ser Arg Pro Gly Ser Ser Ser Ala Phe Gly Asp Pro Ser Thr Ser
 195 200 205

Leu His Tyr Trp Pro Cys Pro Gly Thr Leu Glu Val Leu Glu Ser Arg
 210 215 220

Asn Arg Gly Lys Ala Asn Leu Leu Gln Leu Ser Ser Trp Glu Leu Gln
 225 230 235 240

Gly Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Leu Leu Asp Glu Leu Glu Val
 245 250 255

Leu Glu Glu Leu Ile Met Leu Leu Asp Pro Glu Pro Gly Pro Ser Gly
 260 265 270

Ser Thr Ala Tyr Gly Thr Thr Arg His Leu Ala Ala Arg Tyr Gly Leu
 275 280 285

Pro Ala Thr Trp Ser Thr Phe Ala Tyr Ser Leu Arg Pro Ser Arg Ser
 290 295 300

Pro Leu Arg Ala Leu Ile Glu Met Val Val Ala Arg Glu Pro Ser Ala
 305 310 315 320

Thr Leu Gly Gln Phe Gly Thr Tyr Leu Ala Gln Leu Gly Arg Thr Asp
 325 330 335

Ala Leu Gln Val Leu Ser Lys Leu Gly
 340 345

<210> 15

<211> 1229

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15
 ccaccatggg gccagctgg cttctctgga cagtgggggt ggcagtgtg ctctgaccc 60
 gggctgcgc aatggaagcc tctagcttct gtggccacct tgagtactgg aactctgaca 120
 agaggtgctg cagcogctgc ctgcaacgct ttgggcctcc tgcattgtcct gatcagcagt 180

WO 02/20762

PCT/US01/27631

```

tcacggaaaa ctgcgggctc aatgacttcg gcgatactgt agcacatcct ttcaaaaagt 240
gttcccctgg gtattgcaac cccaatggca cagagctgtg tagccagtgt agcagcggag 300
ccgcgcgcagc cccagctcac gtggagagcc ctggtagaac ccacaagcag tgtagaaga 360
agcccgctcc tcccaaggat gtctgtcctc ttaaacctga agacgcaggt gcctctagct 420
cacctgggag gtggagcctt gggcagacaa ccaagaatga ggtcgcggcc gctcgtcgtg 480
catcagtaga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg 540
aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga 600
tctcccgagc cctgaggtc acatgcgtgg tggtyggact gagccaagaa gacctgagg 660
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 720
aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtctg caccaggact 780
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg 840
agaaaaccat ctccaagcc aaagggcagc ccgcgagacc acaggtgtac accctgcccc 900
catcccgagg tagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgttc aaagcttct 960
atcccagcga catgcctgg gagtgggaga gcaatgggga gccggagAAC aactacaaga 1020
ccacgcctcc cgtgctggac tccgaaggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgtgg 1080
acaagagcag gtggcagcag gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcac gaggtctgac 1140
acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaaagaaga gctagtctcc 1200
atcatcatca tcatcattga taagtgcac . 1229

```

<210> 16

<211> 404

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

```

Met Gly Pro Ser Trp Leu Leu Trp Thr Val Ala Val Ala Val Leu Leu
1          5          10          15

```

```

Leu Thr Arg Ala Ala Ser Met Glu Ala Ser Ser Phe Cys Gly His Leu
20          25          30

```

```

Glu Tyr Trp Asn Ser Asp Lys Arg Cys Cys Ser Arg Cys Leu Gln Arg
35          40          45

```

```

Phe Gly Pro Pro Ala Cys Pro Asp His Glu Phe Thr Glu Asn Cys Gly
50          55          60

```

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Leu Asn Asp Phe Gly Asp Thr Val Ala His Pro Phe Lys Lys Cys Ser
 65 70 75 80
 Pro Gly Tyr Cys Asn Pro Asn Gly Thr Glu Leu Cys Ser Gln Cys Ser
 85 90 95
 Ser Gly Ala Ala Ala Ala Pro Ala His Val Glu Ser Pro Gly Arg Thr
 100 105 110
 His Lys Gln Cys Arg Lys Lys Pro Val Pro Pro Lys Asp Val Cys Pro
 115 120 125
 Leu Lys Pro Glu Asp Ala Gly Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Trp Ser
 130 135 140
 Leu Gly Gln Thr Thr Lys Asn Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 165 170 175
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 180 185 190
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 195 200 205
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 210 215 220
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 245 250 255
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 260 265 270
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 275 280 285
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 290 295 300
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 305 310 315 320

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 325 330 335

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 340 345 350

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 355 360 365

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 370 375 380

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Arg Ala Ser Leu His His
 385 390 395 400

His His His His

<210> 17

<211> 110

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu
 1 5 10 15

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

Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro
 100 105 110

WO 02/20762

PCT/US01/27631

<210> 18

<211> 204

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Met Leu Trp Ile Trp Ala Val Leu Pro Leu Val Leu Ala Gly Ser Gln
 1 5 10 15

Leu Arg Val His Thr Gln Gly Thr Asn Ser Ile Ser Glu Ser Leu Lys
 20 25 30

Leu Arg Arg Arg Val His Glu Thr Asp Lys Asn Cys Ser Glu Gly Leu
 35 40 45

Tyr Gln Gly Gly Pro Phe Cys Cys Gln Pro Cys Gln Pro Gly Lys Lys
 50 55 60

Lys Val Glu Asp Cys Lys Met Asn Gly Gly Thr Pro Thr Cys Ala Pro
 65 70 75 80

Cys Thr Glu Gly Lys Glu Tyr Met Asp Lys Asn His Tyr Ala Asp Lys
 85 90 95

Cys Arg Arg Cys Thr Leu Cys Asp Glu Glu His Gly Leu Glu Val Glu
 100 105 110

Thr Asn Cys Thr Leu Thr Gln Asn Thr Lys Cys Lys Cys Lys Pro Asp
 115 120 125

Phe Tyr Cys Asp Ser Pro Gly Cys Glu His Cys Val Arg Cys Ala Ser
 130 135 140

Cys Glu His Gly Thr Leu Glu Pro Cys Thr Ala Thr Ser Asn Thr Asn
 145 150 155 160

Cys Arg Lys Gln Ser Pro Arg Asn Arg Leu Trp Leu Leu Thr Ile Leu
 165 170 175

Val Leu Leu Ile Pro Leu Val Phe Ile Tyr Arg Lys Tyr Arg Lys Arg
 180 185 190

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Lys Cys Trp Lys Arg Arg Gln Asp Asp Pro Glu Ser
 195 200

<210> 19

<211> 257

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Glu His Trp Asn Tyr Leu Thr Ile Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp
 1 5 10 15

Pro Val Met Gly Leu Glu Glu Ile Ala Pro Cys Thr Ser Lys Arg Lys
 20 25 30

Thr Gln Cys Arg Cys Gln Pro Gly Met Phe Cys Ala Ala Trp Ala Leu
 35 40 45

Glu Cys Thr His Cys Glu Leu Leu Ser Asp Cys Pro Pro Gly Thr Glu
 50 55 60

Ala Glu Leu Lys Asp Glu Val Gly Lys Gly Asn Asn His Cys Val Pro
 65 70 75 80

Cys Lys Ala Gly His Phe Gln Asn Thr Ser Ser Pro Ser Ala Arg Cys
 85 90 95

Gln Pro His Thr Arg Cys Glu Asn Gln Gly Leu Val Glu Ala Ala Pro
 100 105 110

Gly Thr Ala Gln Ser Asp Thr Thr Cys Lys Asn Pro Leu Glu Pro Leu
 115 120 125

Pro Pro Glu Met Ser Gly Thr Met Leu Met Leu Ala Val Leu Leu Pro
 130 135 140

Leu Ala Phe Phe Leu Leu Leu Ala Thr Val Phe Ser Cys Ile Trp Lys
 145 150 155 160

Ser His Pro Ser Leu Cys Arg Lys Leu Gly Ser Leu Leu Lys Arg Arg
 165 170 175

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Pro Gln Gly Glu Gly Pro Asn Pro Val Ala Gly Ser Trp Glu Pro Pro
 180 185 190

Lys Ala His Pro Tyr Phe Pro Asp Leu Val Gln Pro Leu Leu Pro Ile
 195 200 205

Ser Gly Asp Val Ser Pro Val Ser Thr Gly Leu Pro Ala Ala Pro Val
 210 215 220

Leu Glu Ala Gly Val Pro Gln Gln Gln Ser Pro Leu Asp Leu Thr Arg
 225 230 235 240

Glu Pro Gln Leu Glu Pro Gly Glu Gln Ser Gln Val Ala His Gly Thr
 245 250 255

Asn

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> primer

<400> 20

ggtagaccacc tegtgggcaa cgtct

25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> primer

<400> 21

gggtcagggt ccagcagtagc aatca

25

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Peptide of HIV TAT protein

WO 02/20762

PCT/US01/27631

<400> 22

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> primer

<400> 23

cggaagcgtg ggaggacgag tggg

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> primer

<400> 24

agcaaaactct gactcagcca agtt

24

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Glu Ala Ser Gln Gln Ala Trp Pro Asn His His His His His His
1 5 10 15

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> primer

<400> 26

gaggaataac atatggaagc ctctcagtat tgcggcgc

39

WO 02/20762

PCT/US01/27631

<210> 27

<211> 54

<212> DNA

<213> primer

<400> 27

eggccgatcc togagttaat gatgatgatg atgatgatto gccaggcct gctg

54

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Glu Ala Ser Gln Ser Pro Gly Lys

1

5

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Gln Ala Trp Pro Asn Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His

1

5

10

<210> 30

<211> 39

<212> DNA

<213> primer

<400> 30

gaggaataac atatggaagc ctctcagtat tggggccgc

39

<210> 31

<211> 51

WO 02/20762

PCT/US01/27631

<212> DNA

<213> primer

<400> 31
acatgtgtga gttttgtcac caccaccacc accattoggc caggcctgct g 51

<210> 32

<211> 51

<212> DNA

<213> primer

<400> 32
cagcaggcct ggccgaatgg tgggtggtggt ggtgacaaaa ctacacatg t 51

<210> 33

<211> 39

<212> DNA

<213> primer

<400> 11
ccgcggatcc tcgagttatt taccgggaga caggagag 39

<210> 34

<211> 39

<212> DNA

<213> primer

<400> 34
cagcccaagc ttagaaccac catggggcct ggaagatgc 39

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> primer

<400> 35

WO 02/20762

PCT/US01/27631

caggtcgaca ggctcagggg tctt

24

<210> 36

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp
20 25 30

Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro
35 40 45

Pro Pro Cys Pro Asp Tyr Glu Phe Arg Glu Asn Cys Gly Leu Asn Asp
50 55 60

His Gly Asp Phe Val Thr Pro Pro Phe Arg Lys Cys Ser Ser Gly Gln
65 70 75 80

Cys Asn Pro Asp Gly Ala Glu Leu Cys Ser Pro Cys Gly Gly Gly Ala
85 90 95

Val Thr Pro Thr Pro Ala Ala Gly Gly Gly Arg Thr Pro Trp Arg Cys
100 105 110

Arg Glu Arg Pro Val Pro Ala Lys Gly His Cys Pro Leu Thr Pro Gly
115 120 125

Asn Pro Gly Ala Pro Ser Ser Gln Glu Arg Ser Ser Pro Ala Ser Ser
130 135 140

Ile Ala Trp Arg Thr Pro Glu Pro Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
145 150 155 160

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
165 170 175

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
180 185 190

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
195 200 205

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
210 215 220

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
225 230 235 240

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
245 250 255

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
260 265 270

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
275 280 285

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
290 295 300

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
305 310 315 320

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
340 345 350

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
355 360 365

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 37

<211> 39

<212> DNA

<213> primer

<400> 37
cagcccaagc tttagaccac catggggccc agctggcctt

39

<210> 38

WO 02/20762

PCT/US01/27631

<211> 24

<212> DNA

<213> primer

<400> 38

caggctgacc tcattcttgg ttgt

24

<210> 39

<211> 380

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

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

WO 02/20762

PCT/US01/27631

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 165 170 175
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 180 185 190
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 195 200 205
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 210 215 220
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 245 250 255
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 260 265 270
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 275 280 285
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 290 295 300
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 305 310 315 320
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 325 330 335
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 340 345 350
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 355 360 365
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

WO 02/20762

PCT/US01/27631

<213> primer

<400> 40
ttcccagttt ttcacatgca ctgcca

26

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 41
tgctggagcc aacacaaatg

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 42
tgccatccaa ccactcagtc

20

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> primer

<400> 43
ctgcctgctg cctgggccac ct

22

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 44
acacotggcc gcaagatatg

20

WO 02/20762

PCT/US01/27631

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 45
gactggcct cagcgaatag

20

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/020762 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/00 (74) Agents: BORUN, Michael, F. et al.; Marshall, Gerstein & Borun, 6300 Sears Tower, 253 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606-6402 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/27631
- (22) International Filing Date:
5 September 2001 (05.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/230,191 5 September 2000 (05.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN INC., [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): THEILL, Lars, Eyde [US/US]; 1874 Calle Boregas, Thousand Oaks, CA 91360 (US). YEH, Richard [US/US]; 624 Hawdorne Avenue, Apt. 4P1C, Princeton, NY 08540 (US). SILBIGER, Scott, Michael [US/US]; 21520 Burbank Blvd., #301 (US). YU, Gang [CN/US]; 3924 Rodene Street, Thousand Oaks, CA 91320 (US). SENALDI, Giorgio [IT/US]; 2846 White Ridge Place #24, Thousand Oaks, CA 91362 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
8 August 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/020762 A3

(54) Title: TNF RECEPTOR-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: Novel MK61 polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides vectors, host cells, selective binding agents, and methods for producing MK61 polypeptides. Also provided are methods for the treatment, diagnosis, amelioration, or prevention of diseases with MK61 polypeptides.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

REVISED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/020762 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/00 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GU, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/27631
- (22) International Filing Date: 5 September 2001 (05.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/230,191 5 September 2000 (05.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): THEILL, Lars, Eyde [US/US]; 1874 Calle Borrego, Thousand Oaks, CA 91360 (US); YEH, Richard [US/US]; 624 Hawthorne Avenue, Apt. 411C, Princeton, NY 08540 (US); SILBIGER, Scott, Michael [US/US]; 21520 Burhunk Blvd., #301 (US); YU, Gang [CN/US]; 3924 Rodene Street, Thousand Oaks, CA 91320 (US); SENALDI, Giorgio [IT/US]; 2846 White Ridge Place #24, Thousand Oaks, CA 91362 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 8 August 2002
Date of publication of the revised international search report: 5 December 2002
- (15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 49/2002 of 5 December 2002, Section II
- (74) Agents: BORUN, Michael, E. et al.; Marshall, Gerstein & Borun, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606-6402 (US).
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/020762 A3

(54) Title: TNF RECEPTOR-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: Novel MK61 polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides vectors, host cells, selective binding agents, and methods for producing MK61 polypeptides. Also provided for are methods for the treatment, diagnosis, amelioration, or prevention of diseases with MK61 polypeptides.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/27631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] Accession number: A1819838, 23 December 1999 (1999-12-23) XP002197573 the whole document	1-5,7,11
X	DATABASE EMBL [Online] Accession number: A1597639, 4 March 2000 (2000-03-04) XP002197574 the whole document	1-5,7,11
X	DATABASE EMBL [Online] Accession number: A1806948, 22 December 1999 (1999-12-22) XP002197575 the whole document	1-5,7,11
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 May 2002

Date of mailing of the international search report

17. 05. 2002

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340 2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/27631

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] Accession number: BE254397, 14 July 2000 (2000-07-14) XP002197576 the whole document	1-5,7,11
X	DATABASE EMBL [Online] Accession number: AI571409, 4 March 2000 (2000-03-04) XP002197577 the whole document	1-5,7,11
X	DATABASE EMBL [Online] Accession number: AI090681, 3 March 2000 (2000-03-03) XP002197578 the whole document	1-5,7,11
X	DATABASE EMBL [Online] Accession number: AW274489, 6 January 2000 (2000-01-06) XP002197579 the whole document	1-5,7,11
X	DATABASE EMBL [Online] Accession number: AW553050, 13 March 2000 (2000-03-13) XP002197580 the whole document	1-5,7,11
P,X	DATABASE EMBL [Online] Accession number: AK026226, 29 September 2000 (2000-09-29) "Homo sapiens cDNA: FLJ22573 fis, clone HSI02387" XP002197581 the whole document	1-5,7,11
P,X	WO 01 55314 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC. (US); ROSEN C.A.; BARASH S.C.; RUBEN S.M.) 2 August 2001 (2001-08-02) abstract SEQ ID NO:3419, SEQ ID NO:3421 claims	1-11, 15-19, 31-36, 38-50, 53,54, 58,64,65
T	DATABASE EMBL [Online] Accession number: AAK89843, 5 November 2001 (2001-11-05) "SEQ ID NO:3419 of WO 01/55314" XP002197582 the whole document	

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/27631

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	DATABASE EMBL [Online] Accession number: AAK89845, 5 November 2001 (2001-11-05) "SEQ ID NO:3421 of WO 01/55314" XP002197583 the whole document ---	
P,X	WO 01 55206 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC. (US); ROSEN C.A.; BARASH S.C.; RUBEN S.M.) 2 August 2001 (2001-08-02) abstract SEQ ID NO:530, SEQ ID NO:532 claims ---	1-11, 15-19, 31-36, 38-50, 53,54, 58,64,65
T	DATABASE EMBL [Online] Accession number: ABA07211, 14 January 2002 (2002-01-14) "SEQ ID NO:530 of WO 01/55206" XP002197584 the whole document ---	
T	DATABASE EMBL [Online] Accession number: ABA07213, 14 January 2002 (2002-01-14) "SEQ ID NO:532 of WO 01/55206" XP002197585 the whole document ---	
A	NAISMITH J.H. AND SPRANG S.R.: "Modularity in the TNF-receptor family" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, vol. 23, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 74-79, XP004108007 ISSN: 0968-0004 ---	
A	IDRISS H.T. AND NAISMITH J.H.: "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)" MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE, vol. 50, 2000, pages 184-195, XP000918058 ISSN: 1059-910X -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/27631
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. ☒	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 52, 68, 69 and 74-92 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☒	Claims Nos.: 38, 50-52, 68, 77, 78, 80-83, 85-92 all partially because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1. ☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 01/27631

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 38, 50-52, 68, 77, 78, 80-83, 85-92 all partially

Claims 38, 50 and 51 refer to an agent, defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its capability of binding to the polypeptides of present invention, and, additionally for claim 51, its capability to act as agonist or antagonist of the polypeptides of present invention, without giving a true technical characterization of said agent. Claims 52 (totally) and 68 (in part) refer to therapeutical applications of said agent.

The claims cover all agents having these characteristics or properties, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such agents.

In fact, present application recites on page 96 that " suitable selective binding agents include antibodies, polypeptides and small molecules ". However, no specific polypeptides other than antibodies and no specific small molecules are disclosed in present application. Moreover, it should also be noted that on pages 165 and 175 of present application, it is stated that the ligand of the polypeptide(s) of present invention is unknown. In addition to this, no agonistic / antagonistic activity of any agent is disclosed in present application.

Claim 68 refers to a method involving an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its capability to act as antagonist of the polypeptides of present invention, without giving a true technical characterization of said agent.

The claim itself makes reference to selective binding agents, small molecules, peptides, peptides derivatives and antisense oligonucleotides having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products.

In fact, no specific selective binding agents other than antibodies, no specific small molecules, no specific peptides and peptides derivatives other than antibodies are disclosed in present application. In addition to this, no antagonistic activity of any agent is disclosed in present application.

Claims 77, 80, 82, 85 refer to a method involving an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its capability to act as " negative / positive regulator of MK61 receptor signalling " or as " positive / negative regulator of MK61 ligand reverse signalling " respectively, without giving a true technical characterization of said regulator.

The claims cover all agents having these characteristics or properties,

International Application No. PCT/US 01/27631

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such agents.

In fact, claims 78, 81, 83, 86 make reference to a fusion protein, an antibody, a small molecule, a peptide or a peptide derivative, as regulators to be used in the methods concerned.

However, no specific fusion proteins other than the ones comprising the polypeptides of present application, no specific small molecules, no specific peptides and peptides derivatives other than antibodies, are disclosed in present application. In addition to this, no such regulatory activity of any agent is disclosed in present application.

Therefore, in the present case, these claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define an agent by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies against the polypeptides of present invention and, where applicable, to antisense oligonucleotides against the nucleic acid sequences of present invention and to fusion proteins comprising (part of) the polypeptides of present invention.

Claims 87-92 refer in part to methods involving an "MK61-ligand" or an "anti-MK61 ligand antibody", without giving any true technical characterization of said ligand. As a matter of fact, on pages 165 and 175 of present application, it is stated that the ligand of the polypeptide(s) of present invention is unknown. In consequence, the scope of said claims (insofar as they refer to said ligand or said antibody) is ambiguous and vague, and their subject-matter not sufficiently disclosed and supported (Articles 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims (insofar as they refer to said ligand or said antibody) whose wording is, in fact, a mere recitation of the result to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No
 PCT/US 01/27631

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0155314	A	02-08-2001	AU 2950801 A
			07-08-2001
			AU 3095801 A
			07-08-2001
			AU 3645901 A
			07-08-2001
			AU 3646001 A
			07-08-2001
			AU 3646101 A
			07-08-2001
			AU 3646201 A
			07-08-2001
			AU 3646301 A
			07-08-2001
			AU 3646401 A
			07-08-2001
			AU 3646501 A
			07-08-2001
			AU 3646601 A
			07-08-2001
			AU 3794301 A
			07-08-2001
			AU 3794401 A
			07-08-2001
			AU 3794701 A
			07-08-2001
			AU 3794901 A
			07-08-2001
			AU 3795001 A
			07-08-2001
			AU 3795101 A
			07-08-2001
			AU 3795201 A
			07-08-2001
			AU 3795301 A
			07-08-2001
			AU 3795401 A
			07-08-2001
			AU 3795501 A
			07-08-2001
			AU 3795701 A
			07-08-2001
			AU 3795801 A
			07-08-2001
			AU 3972601 A
			07-08-2001
			AU 3972701 A
			07-08-2001
			AU 3972801 A
			07-08-2001
			AU 4140201 A
			07-08-2001
			AU 4140301 A
			07-08-2001
			AU 4140401 A
			07-08-2001
			AU 4140501 A
			07-08-2001
			AU 4140601 A
			07-08-2001
			AU 4140701 A
			07-08-2001
			AU 4140801 A
			07-08-2001
			AU 4140901 A
			07-08-2001
			AU 4141001 A
			07-08-2001
			AU 4141101 A
			20-08-2001
			AU 4141201 A
			07-08-2001
			AU 4141301 A
			07-08-2001
			AU 4141401 A
			07-08-2001
			AU 4141501 A
			07-08-2001
			AU 4141601 A
			07-08-2001
			AU 4141701 A
			07-08-2001
			AU 4141801 A
			07-08-2001
			AU 4141901 A
			07-08-2001
			AU 4313401 A
			07-08-2001
			AU 4313501 A
			07-08-2001
			AU 4313601 A
			07-08-2001
			AU 4313701 A
			14-08-2001
			AU 4526201 A
			07-08-2001
			AU 4719901 A
			07-08-2001
			AU 4719101 A
			07-08-2001
WO 0155206	A	02-08-2001	AU 2950801 A
			07-08-2001
			AU 3095801 A
			07-08-2001
			AU 3645901 A
			07-08-2001
			AU 3646001 A
			07-08-2001
			AU 3646101 A
			07-08-2001
			AU 3646201 A
			07-08-2001
			AU 3646301 A
			07-08-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No
 PCT/US 01/27631

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0155206 A		AU 3646401 A	07-08-2001
		AU 3646501 A	07-08-2001
		AU 3646601 A	07-08-2001
		AU 3794301 A	07-08-2001
		AU 3794401 A	07-08-2001
		AU 3794701 A	07-08-2001
		AU 3794901 A	07-08-2001
		AU 3795001 A	07-08-2001
		AU 3795101 A	07-08-2001
		AU 3795201 A	07-08-2001
		AU 3795301 A	07-08-2001
		AU 3795401 A	07-08-2001
		AU 3795501 A	07-08-2001
		AU 3795701 A	07-08-2001
		AU 3795801 A	07-08-2001
		AU 3972601 A	07-08-2001
		AU 3972701 A	07-08-2001
		AU 3972801 A	07-08-2001
		AU 4140201 A	07-08-2001
		AU 4140301 A	07-08-2001
		AU 4140401 A	07-08-2001
		AU 4140501 A	07-08-2001
		AU 4140601 A	07-08-2001
		AU 4140701 A	07-08-2001
		AU 4140801 A	07-08-2001
		AU 4140901 A	07-08-2001
		AU 4141001 A	07-08-2001
		AU 4141101 A	20-08-2001
		AU 4141201 A	07-08-2001
		AU 4141301 A	07-08-2001
		AU 4141401 A	07-08-2001
		AU 4141501 A	07-08-2001
		AU 4141601 A	07-08-2001
		AU 4141701 A	07-08-2001
		AU 4141801 A	07-08-2001
		AU 4141901 A	07-08-2001
		AU 4313401 A	07-08-2001
		AU 4313501 A	07-08-2001
		AU 4313601 A	07-08-2001
		AU 4313701 A	14-08-2001
		AU 4526201 A	07-08-2001
		AU 4719001 A	07-08-2001
		AU 4719101 A	07-08-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 C 0 7 6
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	4 C 0 8 6
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 29/00 1 0 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 14/715	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 14/715	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02 C	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53 M	
	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00 A	
	C 1 2 N 5/00 B	
	A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 イェー, リチャード
アメリカ合衆国 ニューヨーク 0 8 5 4 0, プリンストン, ホーソーシ アベニュー 6 2
4, アpartmentメント 4ピー1シー

(72)発明者 シルビガー, スコット マイケル
アメリカ合衆国, バーバンク ブールバード 2 1 5 2 0, ナンバー 3 0 1

(72)発明者 ユー, ガン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 2 0, サウザンド オークス, ロデン ストリート
3 9 2 4

(72)発明者 セナルディ, ジョージオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 6 2, サウザンド オークス, ホワイト リッジ
プレイス ナンバー 2 4 2 8 4 6

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
FB03

4B024	AA01	AA11	AA15	BA41	BA63	CA04	CA07	DA02	DA06	EA04
	GA11	HA01								
4B063	QA01	QA18	QA19	QQ08	QQ79	QR48	QS07	QS31	QS33	
4B064	AG20	AG27	CA02	CA10	CA19	CC24	DA01			
4B065	AA26X	AA90X	AA99Y	AB01	AC14	BA02	CA24	CA25	CA44	CA46
4C076	CC04	CC07	CC16	CC27	EE59					
4C084	AA02	AA03	AA07	BA01	BA08	BA20	BA21	BA22	BA23	CA18
	NA14	ZA662	ZA962	ZB052	ZB082	ZB112	ZB152	ZB262	ZB352	
4C085	AA13	AA14	AA15	AA16	BB31	BB41	CC02	CC22	CC23	
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA66	ZA96	ZB05
	ZB08	ZB11	ZB15	ZB26	ZB35					
4C087	AA01	AA02	BC83	CA12	NA14	ZA66	ZA96	ZB05	ZB08	ZB11
	ZB15	ZB26	ZB35							
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA40	DA51	DA76	EA27
	EA28	FA74								