

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-64585

(P2014-64585A)

(43) 公開日 平成26年4月17日(2014.4.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/715 (2006.01)	C O 7 K 14/715	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 123 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-253098 (P2013-253098)	(71) 出願人	592221528
(22) 出願日	平成25年12月6日 (2013.12.6)		バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2002-529502 (P2002-529502) の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ センター 1 4
原出願日	平成13年9月6日 (2001.9.6)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/233, 152		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成12年9月18日 (2000.9.18)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/234, 140	(72) 発明者	クリスティーン エム. アンブローズ
(32) 優先日	平成12年9月21日 (2000.9.21)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1 8 6 7, リーディング, ウェイクフィールド ストリート 1 9 7
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/268, 499		
(32) 優先日	平成13年2月13日 (2001.2.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規のレセプター核酸およびポリペプチド

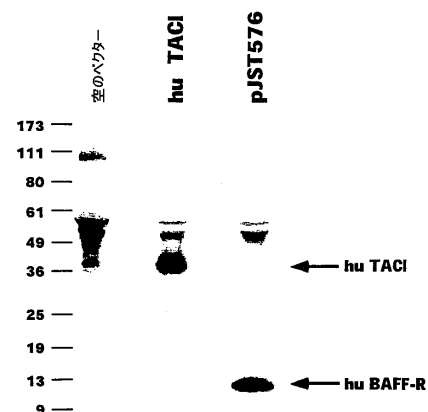
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 B細胞活性化因子 (BAFF) に対する新規のレセプター核酸およびポリペプチドの提供。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を含有しているポリペプチドに対して、少なくとも50%同一であるか、または少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸。BAFF-Rポリペプチドをコードする核酸、ならびにBAFF-Rポリペプチドに対する抗体、およびそれを含有している薬学的組成物。核酸、ポリペプチド、抗体、および薬学的組成物を使用する、腫瘍形成性状態および自己免疫性状態を処置する。

【選択図】 図8

Figure 8:



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、新規のレセプタータンパク質を提供する。本発明は、一般には、核酸およびポリペプチドに関する。より詳細には、本発明は、腫瘍壊死因子(「TNF」)ファミリーに属するB細胞活性化因子(これは、B細胞および免疫グロブリンの発現に関係している)である、BAFFに対するレセプターに関係しているポリペプチドをコードする核酸に関する。このレセプターは、癌、リンパ腫、自己免疫性疾患、B細胞に関係している遺伝性の遺伝的障害の処置に使用され得る。

10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

本発明は、TNFファミリーの新規のレセプターに関する。新規のレセプターは、BAFFレセプター(「BAFF-R」)として同定されている。

【0003】

20

TNFファミリーは、TNFファミリーリガンドおよびTNFファミリーレセプターと呼ばれる、リガンドおよびその特異的なレセプターの対から構成される(BazzoniおよびBeutler(1996)N. Engl. J. Med. 334(26):1717-1725)。このファミリーは、免疫系の調節、およびおそらく、他の非免疫学的系の調節に関係している。調節は、しばしば、「マスタースイッチ」レベルであり、その結果、TNFファミリーのシグナル伝達は、TNFによって最も代表される多数の引き続く事象を生じ得る。TNFは、外部からの侵襲に対する器官の全体的な防御性の炎症応答を開始し得、これには、細胞輸送、特定の区画中に特定の細胞を駆動するためのケモカイン産生、および種々のエフェクター細胞の感作に関係している接着性分子の異なった提示が含まれる。このように、これらの経路の調節は、臨床的な可能性を有する。

30

【0004】

このようなTNFファミリーのサイトカインによって媒介される種々の細胞応答の誘導は、特異的な細胞レセプターへのそれらの結合によって開始されると考えられている。少なくとも2つの異なるTNFレセプター(約55kDa(TNFR1)および75kDa(TNFR2))が同定されている(Hohmannら(1989)J. Biol. Chem. 264:14927-14934;およびBrockhausら(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3127-3131)。多数の多型が、両方のTNFレセプター遺伝子に関連している。両方のTNFRが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む細胞表面レセプターの典型的な構造を共有している。1型および2型のTNFRの細胞外部分は、4個のシステインリッチドメイン(CDR)の反復的なアミノ酸配列のパターンを含む。CDRの同様の反復的なパターンが、とりわけ、p75神経増殖因子レセプター、B細胞抗原CD40を含むいくつかの他の細胞表面タンパク質中に存在している。

40

【0005】

レセプターは、免疫グロブリン融合タンパク質へのそれらの容易な転換に起因して、生物学的経路を解明するための強力な道具である。これらの二量体可溶性レセプター形態は、分泌リガンドまたは表面結合リガンドのいずれかによって媒介される事象の良好なインヒビターである。これらのリガンドへの結合によって

50

、これらは、リガンドが、細胞が関連するシグナル伝達し得るレセプターと相互作用することを妨げる。これらのレセプター - Fc 融合タンパク質は、実験上の意味で有用であるだけでなく、炎症性腸疾患、慢性関節リウマチ、および OKT3 の投与に付随する急性の臨床上的症候群を処置するために、TNF - R - Fc の場合において臨床的に首尾よく使用されている (Eason ら (1996) Transplantation 61 (2) : 224 - 228 ; Feldmann ら (1996) Int. Arch. Allergy Immunol. 111 (4) : 362 - 365 ; および van Dullemen ら (1995) Gastroenterol. 109 (1) : 129 - 135)。TNF ファミリーのレセプターを通じるシグナル伝達によって媒介される多くの事象の操作が、免疫に基づく疾患の処置において、そして免疫系の関与に起因して病理学的な後遺症を有する広範囲の人の疾患においてもまた、広範囲の適用を有することを想定し得る。最近記載されたレセプターである、オステオプロテゲリン (osteoprotegerin) の可溶性形態は、骨量の減失をブロックすることが可能であり、そして従って、TNF ファミリーレセプターのシグナル伝達によって制御されている事象は、免疫系の調節には必ずしも限定されない (Simonet ら (1997) Cell 89 (2) : 309 - 319)。レセプターに対する抗体はリガンドの結合をブロックすることが可能であり、従って、これはまた、臨床上的適用を有し得る。このような抗体は、たいてい、非常に長命であり、そしてより短い血液での半減期を有する可溶性レセプター - Fc 融合タンパク質を上回る利点を有し得る。

10

20

【0006】

レセプターによって媒介される経路の障害は、これらのレセプターの最も開発された治療上の適用を示すが、当初、臨床的な見込みを示したのは、TNF レセプターの活性化であった (Aggarwal および Natarajan (1996) Eur. Cytokine Netw. 7 (2) : 93 - 124)。TNF レセプターの活性化は標的細胞において細胞死を開始し得、従って、腫瘍への適用は、魅力的であったし、今なお魅力的である (Eggermont ら (1996) Ann. Surg. 224 (6) : 756 - 765)。レセプターは、リガンドの投与 (すなわち、天然の経路) によって活性化され得るか、またはレセプターを架橋することができるいくつかの抗体もまた、強力なアゴニストであるかのいずれかである。抗体は、腫瘍学において利点を有する。なぜなら、リガンドは一般的には、血液中で短い寿命を有するにもかかわらず、抗体は、長期間の間血液中で存続することが可能であるからである。これらのレセプターの多くが腫瘍中でより選択的に発現され得るか、またはこれらは腫瘍中の細胞死もしくは分化をシグナル伝達するのみであり得るので、アゴニスト抗体は、癌の処置の良好な武器であり得る。同様に、多くのポジティブな免疫学的事象 (例えば、宿主の炎症反応、抗体の産生など) が TNF ファミリーのレセプターによって媒介され、従って、アゴニスト抗体は、他の腫瘍学以外の適用においても有用な作用を有する可能性がある。

30

40

【0007】

逆説的に、経路の障害は、腫瘍の処置において臨床的な利点を有し得る。例えば、Fas リガンドはいくつかの腫瘍によって発現され、そしてこの発現は、Fas ポジティブであるリンパ球の死を導き得、これによって免疫系を逃れる腫瘍の能力を促進する。この場合には、次いで、Fas 系の障害は、免疫系が、現在利用することが可能である他の経路において腫瘍に対して反応することを可能にし得る (Green および Ware (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (12) : 5986 - 90)。

【0008】

TNF ファミリーのリガンドである BAFF (TALL - 1、THANK、B

50

L y S、および z T N F 4) としてもまた公知である) (S c h n e i d e r ら (1 9 9 9) J . E x p . M e d . 1 8 9 (1 1) : 1 7 4 7 - 1 7 5 6 ; S h u ら (1 9 9 9) J . L e u k o c . B i o l . 6 5 (5) : 6 8 0 - 6 8 3 ; M u k h o p a d h y a y ら (1 9 9 9) J . B i o l . C h e m . 2 7 4 (2 3) : 1 5 9 7 8 - 1 5 9 8 1 ; M o o r e ら、 (1 9 9 9) S c i e n c e 2 8 5 (5 4 2 5) : 2 6 0 - 2 6 3 ; G r o s s ら (2 0 0 0) N a t u r e 4 0 4 (6 7 8 1) : 9 5 5 - 9 9 9) は、インビトロでのB細胞の生存を増進し (B a t t e n ら (2 0 0 0) J . E x p . M e d . 1 9 2 (1 0) : 1 4 5 3 - 1 4 6 6)、そしてインビボでの末梢B細胞の集団の重要な調節因子であることが明らかになっている。マウスでのB A F F の過剰発現は、成熟B細胞過形成症および全身性エリテマトーデス (S L E) の徴候を示す (M a c k a y ら (1 9 9 9) J . E x p . M e d . 1 9 0 (1 1) : 1 6 9 7 - 1 7 1 0)。同様に、いくつかのS L E 患者は、その血清中のB A F F レベルの有意な増大を有する (Z h a n g ら (2 0 0 1) J . I m m u n o l . 1 6 6 (1) : 6 - 1 0)。従って、異常に高いこのリガンドのレベルが、自己反応性B細胞の生存を増進することによって自己免疫性疾患の病因に寄与し得ることが提案されている (B a t t e n ら (2 0 0 0) J . E x p . M e d . 1 9 2 (1 0) : 1 4 5 3 - 1 4 6 6)。

10

【0009】

I I 型膜タンパク質であるB A F F は、骨髓起源の細胞によって産生され (S c h n e i d e r ら (1 9 9 9) J . E x p . M e d . 1 8 9 (1 1) : 1 7 4 7 - 1 7 5 6 ; M o o r e ら (1 9 9 9) S c i e n c e 2 8 5 (5 4 2 5) : 2 6 0 - 2 6 3)、そして細胞表面上にか、または可溶性形態でのいずれかで発現される (S c h n e i d e r ら (1 9 9 9) J . E x p . M e d . 1 8 9 (1 1) : 1 7 4 7 - 1 4 5 6)。2つのT N F レセプターファミリーのメンバーであるB C M A およびT A C I は、B A F F と相互作用することが以前に示されている (G r o s s ら (2 0 0 0) N a t u r e 4 0 4 : 9 9 5 - 9 9 9 ; T h o m p s o n ら (2 0 0 0) J . E x p . M e d . 1 9 2 (1) : 1 2 9 - 1 3 5 ; X i a ら (2 0 0 0) J . E x p . M e d . 1 9 2 : 1 3 7 - 1 4 3 ; M a r s t e r s ら (2 0 0 0) C u r r . B i o l . 1 0 (1 3) : 7 8 5 - 7 8 8 ; S h u ら (2 0 0 0) J . L e u k o c . B i o l . 6 5 (5) : 6 8 0 - 6 8 3 ; W u ら (2 0 0 0) J . B i o l . C h e m . 2 7 5 : 3 5 4 7 8 - 3 5 4 8 5)。

20

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、一部、B A F F レセプタータンパク質である「B A F F - R」、ポリヌクレオチド配列、およびこれらの核酸配列によってコードされるB A F F - R ポリペプチドの発見に基づく。

40

【0011】

1つの局面においては、本発明は、B A F F - R ポリペプチドをコードする単離された核酸、またはそれらのフラグメントもしくは誘導体を提供する。核酸は、例えば、図2D (配列番号5)のアミノ酸配列を含有しているポリペプチドに対して、少なくとも50%同一であるか、または少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードする核酸配列を含み得る。

【0012】

本発明はまた、ハイブリダイゼーションプローブに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含有している、実質的に純粋な核酸分子を提供する。プローブの核酸配列は、図2A (配列番号3)、図2C (配列番号4)

50

のコード配列、または上記のコード配列の相補物体から構成される。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態においては、核酸配列は、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、図2D（配列番号5）の配列を有しているポリペプチドをコードする。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態においては、核酸配列は、B A F Fを結合するポリペプチドをコードする。

【 0 0 1 5 】

核酸は、例えば、図1A（配列番号1）、図1B（配列番号2）、図2A（配列番号3）、図2C（配列番号4）、および図3（配列番号6）に示されているヌクレオチド配列を含む核酸を含み得る。

【 0 0 1 6 】

核酸は、例えば、ゲノムDNAフラグメントであり得るか、またはcDNA分子であり得る。本発明には、本明細書中に記載されている核酸の1つ以上を含有しているベクター、および本明細書中に記載されているベクターまたは核酸を含有している細胞もまた、含まれる。

【 0 0 1 7 】

別の局面においては、本発明は、少なくとも2つのセグメントを含有している融合タンパク質をコードする、実質的に純粋な核酸分子を提供する。ここでは、セグメントの1つは、本発明の上記の実施形態に示されているアミノ酸配列に記載されているような、ポリペプチドまたはそのフラグメントを含有する。本発明はまた、少なくとも2個または3個のセグメントを含有している融合タンパク質を提供する。ここでは、第1のセグメントは、異種シグナルポリペプチドを含み、第2のセグメントは、本発明の上記の実施形態に示されているB A F F - Rアミノ酸配列に記載されているような、ポリペプチドまたはそのフラグメントを含み、そして第3のセグメントは、免疫グロブリンポリペプチドを含む。あるいは、第1のセグメントは、シグナル配列を含有している免疫グロブリンポリペプチドフラグメントを含み、そして第2のセグメントは、B A F F - Rポリペプチドフラグメントを含む。

【 0 0 1 8 】

他の局面においては、本発明は、本発明の上記の実施形態のポリペプチドに特異的に結合する、実質的に純粋な結合剤を提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかを含有している組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞にも関する。

【 0 0 2 0 】

別の局面においては、本発明は、B A F F - R核酸、および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含有する、薬学的組成物を含む。

【 0 0 2 1 】

さらなる局面においては、本発明は、実質的に精製されたB A F F - Rポリペプチド（例えば、B A F F - R核酸によってコードされるポリペプチドのいずれか）を含む。

【 0 0 2 2 】

本発明には、B A F F - Rポリペプチド、および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含有する薬学的組成物もまた、含まれる。

【 0 0 2 3 】

なおさらなる局面においては、本発明は、B A F F - Rポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。抗体は、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。本発明には、B A F F - R抗体、および薬学的に受容

10

20

30

40

50

可能なキャリアまたは希釈剤を含有している薬学的組成物もまた含まれる。本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチド上のエピトープに結合する、単離された抗体にも関する。

【0024】

本発明はさらに、上記の核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチドに結合する抗体、およびネガティブコントロール抗体を含有しているキットに関する。

【0025】

本発明はさらに、BAFF-Rポリペプチドの産生のための方法を提供する。この方法は、BAFF-R核酸（例えば、BAFF-R核酸を含むベクター）を含有している細胞を提供する工程、および核酸によってコードされるBAFF-Rポリペプチドを発現させるために十分な条件下で細胞を培養する工程を包含する。次いで、発現されたBAFF-Rポリペプチドは、細胞から回収される。好ましくは、細胞は、内因性のBAFF-Rポリペプチドをほとんど産生しないか、または全く産生しない。細胞は、例えば、原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。

10

【0026】

本発明は、免疫応答を誘導するために十分なポリペプチドの量を、哺乳動物に投与することによる、上記に開示されている核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチドに対して、哺乳動物中の免疫応答を誘導する方法を提供する。

20

【0027】

本発明はまた、BAFF-Rポリペプチドを化合物と接触させる工程、および化合物がBAFF-Rポリペプチドに結合するかどうかを決定する工程による、BAFF-Rポリペプチドに結合する化合物を同定する方法に関する。

【0028】

本発明はまた、BAFF-R核酸を化合物と接触させる工程、および化合物が核酸分子に結合するかどうかを決定することによる、BAFF-Rポリペプチドをコードする核酸分子に結合する化合物を同定する方法にも関する。

30

【0029】

本発明はさらに、BAFF-Rポリペプチドを化合物と接触させる工程、およびBAFF-Rポリペプチド活性が改変されるかどうかを決定することによる、BAFF-Rポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法を提供する。

【0030】

本発明はまた、BAFF-Rポリペプチドを化合物と接触させる工程、および化合物がBAFF-Rポリペプチドの活性を改変するかどうか、化合物がBAFF-Rポリペプチドに結合するかどうか、またはBAFF-Rポリペプチドをコードする核酸分子に結合するかどうかを決定することによって同定される、BAFF-Rポリペプチド活性を調節する化合物にも関する。

40

【0031】

別の局面においては、本発明は、被験体のB細胞によって媒介される状態（例えば、自己免疫性障害またはガン）の診断方法を提供する。この方法は、被験体由来のタンパク質サンプルを提供する工程、および被検サンプル中のBAFF-Rポリペプチドの量を測定する工程を包含する。次いで、被検サンプル中のBAFF-Rの量が、コントロールタンパク質サンプル中のBAFF-Rポリペプチドの量に対して比較される。コントロールタンパク質サンプル中のBAFF-Rポリペプチドの量と比較した、被験タンパク質サンプル中のBAFF-Rポリペプチドの量の変化は、被験体がB細胞によって媒介される状態を有することを示す。コントロールサンプルは、好ましくは、適合する個体（例えば、類似の年齢、性別、または他の一般的な状態の個体であるが、その状態を有しているとの疑

50

いのない個体)から採取される。あるいは、コントロールサンプルは、被験体が障害を有しているとの疑いのない時に被験体から採取されることがある。いくつかの実施形態においては、B A F F - R ポリペプチドは、B A F F - R 抗体を使用して検出される。

【0032】

さらなる局面においては、本発明は、被験体のB細胞によって媒介される状態(例えば、自己免疫性障害)を診断する方法を含む。この方法は、被験体由来の核酸サンプル(例えば、RNAもしくはDNA、またはそれらの両方)を提供する工程、および被検核酸サンプル中のB A F F - R 核酸の量を測定する工程を包含する。次いで、被検核酸中のB A F F - R 核酸サンプルの量が、コントロールサンプル中のB A F F - R 核酸の量に対して比較される。コントロールサンプル中のB A F F - R の量と比較したサンプル中のB A F F - R 核酸の量における変化は、被験体が自己免疫性状態を有することを示す。

10

【0033】

さらなる局面においては、本発明は、被験体の腫瘍形成性または自己免疫性状態の診断方法を含む。この方法は、被験体由来の核酸サンプルを提供する工程、および被検核酸サンプル中のB A F F - R 核酸のヌクレオチド配列の少なくとも一部を同定する工程を包含する。次いで、被検サンプルのB A F F - R ヌクレオチド配列が、コントロールサンプルのB A F F - R ヌクレオチド配列に対して比較される。上記のコントロールサンプル中のB A F F - R ヌクレオチド配列と比較したサンプル中のB A F F - R ヌクレオチド配列における変化は、被験体がこのような状態を有することを示す。

20

【0034】

なおさらなる局面においては、本発明は、B細胞によって媒介される状態を処置する、または予防する、または遅延させる方法を提供する。この方法は、このような処置または予防または遅延が所望される被験体に対して、B A F F - R 核酸、B A F F - R ポリペプチド、または抗B A F F - R 抗体を、被験体の腫瘍形成性または免疫調節状態を処置、予防、または遅延させるために十分な量で投与することを含む。

30

【0035】

B A F F - R 核酸分子、ポリペプチド、または抗体を使用して診断される、処理される、予防される、または遅延させられる状態は、ガン、または免疫調節障害であり得る。これらの疾患には、自己免疫性の性質の疾患(例えば、全身性エリテマトーデス、慢性間接リウマチ、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、突発性血小板減少症紫斑、抗リン脂質(anti-phospholipid)症候群、シャーガス病、グレーブズ病、ヴェーゲナー肉芽種症、結節性多発動脈炎、および結節性進行性糸球体腎炎)が含まれる。治療薬はまた、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、H鎖病、原発性アミロイド症または免疫細胞関連アミロイド症、および意義不明性クローン性高ガンマグロブリン血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance; MGUS)のような、血漿細胞の障害における適用を有する。腫瘍学の標的には、B細胞ガン腫、白血病、およびリンパ腫が含まれる。

40

【0036】

本発明の核酸、ポリペプチド、および抗体を使用する組成物および処置方法は、所望されない細胞増殖に関係している任意の状態に使用され得る。詳細には、本発明は、B A F F および/またはB A F F - R を発現する腫瘍細胞を処置するために使用され得る。

【0037】

B A F F - R アゴニスト(例えば、B A F F - R に結合し、そしてB A F F を

50

模倣する抗体)を含有している本発明の組成物はまた、例えば、少量のB細胞によって特徴付けられる免疫不全を処置するためにも使用され得る。このような障害は、例えば、放射線治療および/または化学療法によって引き起こされる場合がある。

【0038】

本発明の別の局面においては、組換え発現されたタンパク質の凝集を減少させる方法が提供される。この方法は、保存されているドメイン、および保存されている領域内の同一ではないアミノ酸を決定するための、タンパク質またはその融合タンパク質の相同の比較を含む。一般的には、少なくとも1つの非極性のアミノ酸が、荷電していない極性のアミノ酸に、またはプロリン、アラニン、もしくはセリンに変更される。

10

【0039】

他の場所で特に記載されていない限りは、本明細書中で使用されている全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書中に記載されているものと同様または同等の方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料が以下に記載される。本明細書中に記載されている全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献が、それらの全体において参考として援用されている。コンフリクトの場合には、定義を含む本明細書が統制となる、さらに、材料、方法、および実施例は、説明にすぎず、そして限定としては意図されない。

20

【0040】

本発明の他の特徴および利点が、以下の詳細な記載および特許請求の範囲から明らかである。

例えば、本願発明は以下の項目を提供する。

(項目1) 配列番号5のアミノ酸配列を含有しているポリペプチドに対して少なくとも50%同一であるポリペプチドをコードする配列を含有している、単離された核酸。

(項目2) 前記核酸が、配列番号5に対して少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードする、項目1に記載の核酸。

30

(項目3) 前記コードされるポリペプチドがBAFFを結合する、項目1に記載の核酸。

(項目4) 前記核酸がDNAである、項目1に記載の核酸。

(項目5) 前記核酸がRNAである、項目1に記載の核酸

(項目6) 前記核酸がcDNA分子である、項目1に記載の核酸。

(項目7) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、または配列番号6の少なくとも一部に対して相補的であるヌクレオチド配列を含有している、単離された核酸。

(項目8) 項目1または2に記載の核酸を含有している、ベクター。

(項目9) 項目8に記載のベクターを含有している、細胞。

40

(項目10) 項目1に記載の核酸および薬学的に受容可能なキャリアを含有している、薬学的組成物。

(項目11) 項目1または2に記載の核酸によってコードされる、実質的に精製されたポリペプチド。

(項目12) 項目11に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含有している、薬学的組成物。

(項目13) 項目12に記載のポリペプチドに特異的に結合する、抗体

。

(項目14) 項目12に記載のポリペプチド上のエピトープに結合する、抗体。

50

(項目 15) 項目 12 に記載のポリペプチドに結合する抗体、および必要に応じて、ネガティブコントロール抗体を含有している、キット。

(項目 16) 項目 13 に記載の抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含有している、薬学的組成物。

(項目 17) B A F F - R ポリペプチドを産生する方法であって、該方法は、以下：

項目 9 に記載の細胞を提供する工程；

該 B A F F - R ポリペプチドの発現に十分な条件下で該細胞を培養する工程；
および

該 B A F F - R ポリペプチドを回収し、それによって該 B A F F - R ポリペプチドを産生する工程、
を包含する、方法。

(項目 18) 前記細胞が原核生物細胞である、項目 17 に記載の方法。

(項目 19) 前記細胞が真核生物細胞である、項目 17 に記載の方法。

(項目 20) 被検体の B 細胞によって媒介される状態を診断する方法であって、該方法は、以下：

該被験体由来のタンパク質サンプルを提供する工程；

該被検体サンプル中の B A F F - R ポリペプチドの量を測定する工程；および
コントロールタンパク質サンプル中の B A F F - R ポリペプチドの量に対して、
該被験体タンパク質サンプル中の B A F F - R ポリペプチドの量を比較する工程であって、ここで、
該コントロールタンパク質サンプル中の B A F F - R ポリペプチドの量と比較した該被験体タンパク質サンプル中の B A F F - R ポリペプチドの量の変化が、
該被験体が B 細胞によって媒介される状態を有することを示す、工程、
を包含する、方法。

(項目 21) 前記 B 細胞によって媒介される状態が自己免疫性障害である、項目 20 に記載の方法。

(項目 22) 前記 B 細胞によって媒介される状態が癌である、項目 20 に記載の方法。

(項目 23) 被検体の B 細胞によって媒介される状態を診断する方法であって、該方法は、以下：

該被験体由来の核酸サンプルを提供する工程；

該被験体核酸サンプル中の B A F F - R 核酸の量を測定する工程；および
コントロールサンプル中の B A F F - R 核酸の量に対して、該被験体核酸中の B A F F - R 核酸サンプルの量を比較する工程であって、ここで、
該コントロールサンプル中の B A F F - R の量と比較した、該サンプル中の B A F F - R 核酸の量の変化が、
該被験体が B 細胞によって媒介される状態を有すること示す、工程、
を包含する、方法。

(項目 24) 前記測定された B A F F - R 核酸が B A F F - R RNA である、項目 23 に記載の方法。

(項目 25) 前記測定された B A F F - R 核酸が B A F F - R DNA である、項目 23 に記載の方法。

(項目 26) 前記 B A F F - R 核酸が項目 1 に記載の核酸を使用して測定される、項目 23 に記載の方法。

(項目 27) 前記 B A F F - R 核酸が、項目 1 に記載の核酸を増幅する 1 つ以上の核酸を使用することによって測定される、項目 23 に記載の方法。

(項目 28) 被検体の B 細胞によって媒介される状態を診断する方法であって、該方法は、以下：

該被験体由来の核酸サンプルを提供する工程；

10

20

30

40

50

該被験体核酸サンプル中の B A F F - R 核酸のヌクレオチド配列の少なくとも一部を同定する工程；および

コントロールサンプルの B A F F - R ヌクレオチド配列に対して、該被験体サンプルの B A F F - R ヌクレオチド配列を比較する工程であって、ここで、該コントロールサンプル中の B A F F - R ヌクレオチド配列と比較した、該サンプル中の B A F F - R ヌクレオチド配列の変化が、該被験体が B 細胞によって媒介される状態を有すること示す、工程、
を包含する、方法。

(項目 2 9) 自己免疫性状態または腫瘍形成性状態を、処置または予防または遅延させる方法であって、該方法は、以下：

このような処置または予防または遅延が所望される被験体に、該被験体の自己免疫性状態または腫瘍形成性状態の処置、予防または遅延に十分な量の項目 1 に記載の核酸を投与する工程、
を包含する、方法。

(項目 3 0) 自己免疫性状態または腫瘍形成性状態を、処置または予防または遅延させる方法であって、該方法は、以下：

このような処置または予防または遅延が所望される被験体に、該被験体の自己免疫性状態または腫瘍形成性状態の処置、予防または遅延に十分な量の項目 1 2 に記載のポリペプチドを投与する工程、
を包含する、方法。

(項目 3 1) 自己免疫性状態または腫瘍形成性状態を、処置または予防または遅延させる方法であって、該方法は、以下：

このような処置または予防または遅延が所望される被験体に、該被験体の自己免疫性状態または腫瘍形成性状態の処置、予防または遅延に十分な量の項目 1 6 に記載の抗体を投与する工程、
を包含する、方法。

(項目 3 2) B A F F - R タンパク質を結合する化合物を同定するための方法であって、該方法は、以下：

a) B A F F - R タンパク質を化合物と接触させる工程；および
b) 該化合物が B A F F - R タンパク質を結合するかどうかを決定する工程、
を包含する、方法。

(項目 3 3) 前記化合物の B A F F - R タンパク質への結合が、タンパク質結合アッセイによって決定される、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4) 項目 3 2 に記載の方法によって同定される、化合物。

(項目 3 5) B A F F - R タンパク質をコードする核酸を結合する化合物を同定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 該 B A F F - R タンパク質をコードする核酸を化合物と接触させる工程；
および

b) 該化合物が該核酸分子を結合するかどうかを決定する工程、
を包含する、方法。

(項目 3 6) 項目 3 5 に記載の方法によって同定される、化合物。

(項目 3 7) B A F F - R タンパク質の活性を調節する化合物を同定するための方法であって、該方法は、以下：

a) B A F F - R タンパク質を化合物と接触させる工程；および
b) B A F F - R タンパク質活性が調節されているかどうかを決定する工程、
を包含する、方法。

(項目 3 8) 項目 3 7 に記載の方法によって同定される、化合物。

(項目 3 9) 組換え発現されたタンパク質の凝集を減少させる方法であって、該方法は、以下：

a) 組換え発現されたタンパク質として凝集する標的タンパク質のホモログ間

10

20

30

40

50

で保存されているアミノ酸の領域を同定する工程；

b) 該標的タンパク質中の少なくとも1つの保存されていないアミノ酸で置換を行って、変異した標的タンパク質を形成する工程；
を包含し、

ここで、該変異した標的タンパク質は、組換え発現された場合に減少した凝集を示す、方法。

(項目40) 前記保存されていないアミノ酸が非極性のアミノ酸である、項目39に記載の方法。

(項目41) 前記非極性のアミノ酸が、荷電していない極性のアミノ酸に変更される、項目39に記載の方法。

(項目42) 前記非極性のアミノ酸が、プロリン、セリン、またはアラニンからなる群より選択されるアミノ酸に変更される、項目39に記載の方法。

(項目43) 前記非極性のアミノ酸がプロリンに変更される、項目39に記載の方法。

(項目44) 以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含有している B A F F - R タンパク質の少なくとも一部をコードする、単離された核酸分子：配列番号13；配列番号15；配列番号16；配列番号17；配列番号18；配列番号19；配列番号20；配列番号21；配列番号22；配列番号23；配列番号24；配列番号25；配列番号26；配列番号27；配列番号28；配列番号29；配列番号30；配列番号31；および配列番号32。

(項目45) 前記核酸が、キメラタンパク質の一部として前記 B A F F - R タンパク質をコードする、項目44に記載の単離された核酸分子。

(項目46) 前記キメラタンパク質が、免疫グロブリン定常領域を含む、項目45に記載の単離された核酸。

(項目47) 配列番号14のアミノ酸配列を含有している B A F F - R タンパク質をコードする、単離された核酸分子。

(項目48) 前記核酸が、キメラタンパク質の一部として前記 B A F F - R タンパク質をコードする、項目47に記載の単離された核酸分子。

(項目49) 前記キメラタンパク質が、免疫グロブリン定常領域を含む、項目48に記載の単離された核酸。

(項目50) 以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含有している、単離されたポリペプチド：配列番号13；配列番号15；配列番号16；配列番号17；配列番号18；配列番号19；配列番号20；配列番号21；配列番号22；配列番号23；配列番号24；配列番号25；配列番号26；配列番号27；配列番号28；配列番号29；配列番号30；配列番号31；および配列番号32。

(項目51) 前記ポリペプチドがキメラタンパク質である、項目50に記載の単離されたポリペプチド。

(項目52) 前記キメラタンパク質が免疫グロブリン定常領域を含む、請求項51に記載の単離されたポリペプチド。

(項目53) 配列番号14のアミノ酸配列を含有している、単離されたマウス B A F F - R ポリペプチド。

(項目54) 前記ポリペプチドがキメラタンパク質である、項目53に記載の単離されたポリペプチド。

(項目55) 前記キメラタンパク質が免疫グロブリン定常領域を含む、請求項54に記載の単離されたポリペプチド。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1A】図1Aは、p J S T 5 7 6 中にクローン化された B J A B c D N A の D N A 配列（配列番号1）を示す。

10

20

30

40

50

【図1B】図1Bは、IMAGEクローン2000271 (EST AI250289) のcDNA (配列番号2) の完全なDNA配列を示す。

【図2A】図2Aは、GENESCANプログラムによって推定された、イントロンを含まないJST576のヌクレオチド配列 (配列番号3) を示す。

【図2B】図2Bは、BJABもしくはIM-9 RNAから作製された、またはJST576 cDNAについてのいずれかの1本鎖のcDNAを使用して、BAFF-Rについて得られたPCR産物の1%アガロースゲルを示す。レーン1は、λDNA HindIII消化物である。レーン2は、BJABオリゴdTでプライムしたBAF-225/BAF-191である。レーン3は、BJABオリゴdTでプライムしたBAF-226/BAF-191である。レーン4は、BJABでランダムプライムしたBAF-225/BAF-191である。レーン5は、BJABでランダムプライムしたBAF-226/BAF-191である。レーン6は、IM-9オリゴdTでプライムしたBAF-225/BAF-191である。レーン7は、IM-9オリゴdTでプライムしたBAF-226/BAF-191である。レーン8は、IM-9でランダムプライムしたBAF-225/BAF-191である。レーン9は、IM-9でランダムプライムしたBAF-226/BAF-191である。レーン10は、JST576 cDNA BAF-225/BAF-191である。レーン11は、JST576 cDNA BAF-226/BAF-191である。レーン12は、鋳型を含まないBAF-225/BAF-191である。レーン13は、鋳型を含まないBAF-226/BAF-191である。

【図2C】図2Cは、BJABの1本鎖cDNAから推定されたイントロンに隣接している、バルクなPCR産物の集団の配列決定によって決定した、成熟JST576 (BAFF-R) 配列 (配列番号4) (また、GenBank登録番号第AF373846) を示す。

【図2D】図2Dは、BAFF-R (JST576) のアミノ酸配列 (配列番号5) を示す。太字のA (Ala) 残基は、別のスプライシングアクセプター部位の使用によって生じる配列を示す。推定される膜貫通ドメインは四角で囲み、そして推定の停止導入シグナルは下線で示す。

【図3】図3は、ヒト脾臓の1本鎖cDNAからRT-PCRによって得られた、5' UTR配列を含有しているJST576のスプライシングされたバージョン (配列番号6) 、および推定されるアミノ酸配列 (配列番号7) を示す。この配列は、ATGを有するフレーム中に上流の停止コドンを含む。

【図4A】図4Aは、マウスのBAFF-R cDNAの配列 (配列番号8) (また、GenBank登録番号第AF373847) を示す。

【図4B】図4Bは、マウスBAFF-Rのアミノ酸配列 (配列番号9) を示す。Cys残基は太字および下線で、そして推定される膜貫通領域は四角で囲って示す。

【図4C】図4Cは、ヒトBAFF-Rタンパク質配列 (配列番号10) およびマウスBAFF-Rタンパク質配列 (配列番号9) 間の相同性を示す。

【図5】図5は、JST576トランスフェクト細胞に対するヒトBAFFの結合を示す。293EBNA細胞を、pJST576またはCA336 (huTACI) 、およびGFPレポーター構築物で同時トランスフェクトした。細胞を、1 μg/mlのビオチン化myc-huBAFFと、続いてSAV-PEとの、BAFFの結合についてアッセイした。

【図6】図6は、JST576トランスフェクト細胞へのヒトおよびマウスのBAFFの結合を示す。293EBNA細胞を、pJST576およびGFPレポーター構築物で同時トランスフェクトした。細胞を、5 μg/mlのflag-huBAFFまたはflag-muBAFF、続く抗flagモノクローナル抗体M2およびロバ抗-マウスIgG-PEとの、BAFFの結合について、24時間後にアッセイした。

【図7】図7は、APRILがJST576トランスフェクト細胞には結合しないことを示す。293EBNA細胞を、pJST576またはCA336 (huTACI) およびGFPレポーター構築物で同時トランスフェクトした。細胞を、1 μg/mlのmyc-

10

20

30

40

50

mu A P R I L と、続いて抗 mu - A P R I L ラット - I g G 2 b、ビオチン化抗ラット F c G 2 b、および S A V - P E との A P R I L 結合についてアッセイした。

【図 8】図 8 は、B A F F が J S T 5 7 6 トランスフェクト細胞由来のタンパク質を沈殿させることを示す。2 9 3 E B N A 細胞を、B A F F - R (p J S T 5 7 6)、ベクターのみ (C H 2 6 9)、または h u T A C I (C A 3 3 6) のいずれかでトランスフェクトし、そして³⁵S システインおよびメチオニンでパルスした。抽出物を、f l a g - h u B A F F とともに免疫沈降させ、そして還元性 S D S - P A G E ゲル上で泳動した。分子量マーカーを左に示す。

【図 9】図 9 は、ヒト B A F F - R : F c をコードする遺伝子の核酸配列 (配列番号 1 1)、およびその誘導されるアミノ酸配列 (配列番号 1 2) を示す：核酸残基 1 ~ 6 3 は、マウス I g G - κ シグナル配列をコードする；核酸残基 6 4 ~ 6 6 は、制限酵素部位を導入するために使用した；核酸残基 6 7 ~ 2 7 6 は、B A F F - R 細胞外ドメインの一部をコードする；核酸残基 2 7 7 ~ 2 7 9 は、制限酵素部位を導入するために使用した；そして核酸残基 2 8 0 ~ 9 6 0 は、ヒト I g G 1 の F c 領域をコードする。

【図 1 0 A】図 1 0 A は、プローブとして J S T 5 6 の E c o N I フラグメントを使用した、ノーザンブロット分析の結果を示す。すべての露光は 4 日間である。1 0 A は、C l o n t e c h ヒト I m m u n e I I プロットである。

【図 1 0 B】図 1 0 B は、プローブとして J S T 5 6 の E c o N I フラグメントを使用した、ノーザンブロット分析の結果を示す。すべての露光は 4 日間である。1 0 B は、C l o n t e c h ヒト 1 2 レーン多組織プロットである。

【図 1 0 C】図 1 0 C は、プローブとして J S T 5 6 の E c o N I フラグメントを使用した、ノーザンブロット分析の結果を示す。すべての露光は 4 日間である。1 0 C は、C l o n t e c h ヒト多組織 I I プロットである。

【図 1 1】図 1 1 は、種々の細胞株から単離した 2 0 μ g の全 R N A のノーザンブロット分析の結果を示す。プロットを、J S T 5 7 6 の E c o N I 制限フラグメントでプローブし、そして 4 日間露光させた。F A C S 分析によって決定した、細胞株の B A F F に結合する能力を、レーンの下に示す。

【図 1 2】図 1 2 は、B A F F - R : F c を使用する免疫沈降の結果を示す。ヒト B A F F は、B A F F - R : F c または B C M A : F c で沈降させられたが、F n 1 4 - F c ではそうではなかった。コントロール B A F F タンパク質をレーン 1 に示す。

【図 1 3】図 1 3 は、ヒト B A F F : F c が、B J A B 細胞へのヒト B A F F の結合をブロックすることを示す。F A C S 分析の結果を、図 1 3 A に示す。曲線 E は、B A F F - R : F c の非存在下での B J A B 細胞へのビオチン化 B A F F の結合を示す。曲線 B ~ D は、それぞれ、5 μ g / m l、1 μ g / m l、または 0 . 2 μ g / m l の存在下での B J A B 細胞に結合する B A F F の能力を示す。曲線 A は、第 2 工程のみの曲線である。図 1 3 B は、T A C I : F c (三角)、または非特異的融合タンパク質 L T _ R : F c (丸) と比較した、種々の濃度の B A F F - R : F c (四角) の、レセプターを発現する B J A B 細胞への B A F F の結合をブロックする能力を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、脾臓 B 細胞の B A F F によって誘導される同時刺激をブロックする、B A F F - R : F c の能力を示す。漸増量の h B A F F (n g / m l) に対する [³ H] チミジンの取り込み (c p m) のグラフを示す。

【図 1 5】図 1 5 は、B A F F - R : F c 1 での処置が正常なマウスにおいて末梢 B 細胞の減少を生じることを示す。

【図 1 6】図 1 6 は、ヒト B A F F - R : F c およびマウス B A F F - R : F c でのマウスの処置が、脾臓 B 2 2 0 + B 細胞の数を減少させることを示す。

【図 1 7】図 1 7 は、B A F F - R : F c のマウスへの投与がリンパ節 B 2 2 0 + B 細胞の割合を減少させることを示す。

【図 1 8】図 1 8 は、B A F F - R : F c のマウスへの投与が末梢血 B 2 2 0 + 細胞を減少させることを示す。

【図 1 9】図 1 9 A は、B A F F - R に結合する抗体を産生する 4 個のクローンの上清か

10

20

30

40

50

らのFACSデータを示す。BAFF-Rに結合する抗体を含まないコントロール上清もまた示す。図19Bは、BAFF-RへのBAFFの結合をブロックする2個のクローンを示すヒストグラムである。(a)は、BAFFコントロールなしを示す；(b)は、クローン2による抗体のブロック能力を示す；(c)は、クローン9による抗体のブロック能力を示す；そして(d)は、BAFF-Rには結合しないコントロール抗体による曲線を示す。

【図20】図20は、ヒトBAFF-R:Fc(hBAFF-R)およびマウスBAFF-R:Fc(mBAFF-R)細胞外ドメインのアミノ酸配列のアラインメント、ならびに示した配列を含有しているFc融合タンパク質の発現の際に観察される凝集の割合を示す。番号を付けたJSTクローンは、親配列において変異を示すアミノ酸配列(下線で示す)、およびそれによって生じる発現されたタンパク質の凝集を示す。ヒト(配列番号10のアミノ酸2~71；配列番号13)およびマウス(配列番号9のアミノ酸2~71；配列番号14)のBAFF-Rについての部分的な配列；ならびに以下のクローンについての対応している部分を示す：JST659(配列番号15)、JST660(配列番号16)、JST661(配列番号17)、JST662(配列番号18)、JST663(配列番号19)、JST673(配列番号20)、JST674(配列番号21)、JST675(配列番号22)、JST672(配列番号23)、JST676(配列番号24)、JST671(配列番号25)、JST677(配列番号26)、JST678(配列番号27)、JST664(配列番号28)、JST668(配列番号29)、JST665(配列番号30)、JST666(配列番号31)、およびJST667(配列番号32)。

【図21】図21は、BAFF-R-i.c.d.(BAFF-R細胞内ドメイン)でトランスフェクトした細胞(レーン1)またはコントロールベクターでトランスフェクトした細胞(レーン2)から調製した溶解物を使用して免疫沈降させたタンパク質のオートラジオグラフを示す。約 6×10^6 個の293E細胞を、BAFFR-i.c.d.をコードする構築物または模擬プラスミドでトランスフェクトした。48時間後に、細胞を、 ^3S で代謝によって24時間標識し、溶解緩衝液で溶解させ、予め明澄化させ、そして抗myc mAb、9E10で免疫沈降させた。免疫沈降物を、還元条件下での10~20%のSDS-PAGEによって分離させた。

【発明を実施するための形態】

【0042】

(発明の詳細な説明)

本明細書中で援用されている、参考文献、特許、特許出願、および学術文献(GenBankデータベース配列についての登録番号を含む)は、当業者の知見を確立し、そしてそれぞれが詳細にそして個々に参考として援用されていることが示されるかのように同じ程度で、それらの全体において本明細書中で参考として援用されている。本明細書中で引用されているいずれかの参考文献と、本明細書の特異的な教示との間での全てのコンフリクトは、本明細書の恩恵と考えるべきである。同様に、当該分野で理解されている用語または句の定義と、本明細書中での詳細な教示としての用語または句の定義との間での全てのコンフリクトは、本発明の恩恵と考えるべきである。

【0043】

当業者に公知である組換えDNA技術の一般原理を示す標準的な参考文献には、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York(1998)；Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York(1989)；Kaufmanら編、HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN B

IOLOGY AND MEDICINE、CRC Press、Boca Raton (1995) ; McPherson 編、DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford (1991) が含まれる。

【0044】

本発明は、BAFF-R 核酸、BAFF-R ポリペプチドをコードする単離された核酸またはその一部、BAFF-P ポリペプチド、これらの核酸を含有しているベクター、BAFF-R 核酸で形質転換された宿主細胞、抗BAFF-R 抗体、および薬学的組成物を開示する。BAFF-R ポリペプチドを作製する方法、ならびに、これらの化合物を使用する症状のスクリーニング、診断、処置方法、およびBAFF-R ポリペプチド活性を調節する化合物をスクリーニングする方法もまた、開示される。

10

【0045】

本明細書中で議論されているBAFF-R 核酸およびポリペプチド、ならびにBAFF-R 抗体、ならびに薬学的組成物は、とりわけ、ガンおよび/または免疫調節状態の処置に有用である。これらの障害には、例えば、自己免疫性の性質であるB細胞によって媒介される疾患(例えば、全身性エリテマトーデス、慢性間接リウマチ、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、突発性血小板減少症紫斑、抗リン脂質症候群、シャーガス病、グレーブズ病、ヴェーゲナー肉芽腫症、結節性多発動脈炎、および結節性進行性糸球体腎炎)が含まれる。この治療薬はまた、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、H鎖病、原発性アミロイド症または免疫細胞関連アミロイド症、および意義不明性クローン性高ガンマグロブリン血症(MGUS)のような、プラズマ細胞の障害における適用を有する。腫瘍学の標的には、B細胞ガン腫、白血病、およびリンパ腫が含まれる。

20

【0046】

(BAFF-R 核酸)

本発明の1つの局面は、BAFF-R タンパク質またはその生物学的に活性な部分をコードする、単離された核酸分子に関する。BAFF-R をコードする核酸(例えば、BAFF-R mRNA)を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分な核酸フラグメント、およびBAFF-R 核酸分子の増幅もしくは変異のためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマーとしての使用のためのフラグメントもまた、含まれる。本明細書中で使用される場合には、用語「核酸分子」は、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)、RNA分子(例えば、mRNA)、ヌクレオチドアナログを使用して作製したDNAまたはDNAのアナログ、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、およびホモログが意図される。核酸分子は、1本鎖または2本鎖であり得るが、好ましくは、2本鎖のDNAである。

30

【0047】

「プローブ」は、用途に応じた種々の長さの(好ましくは、少なくとも約10ヌクレオチド(nt)またはそれ以上(例えば、約6000nt))核酸配列をいう。プローブは、同一の、類似の、または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長いプローブは、通常は、天然のまたは組換えの供給源から得られ、オリゴマーよりも高く特異的であり、そしてはるかにゆっくりとハイブリダイズする。プローブは、1本鎖または2本鎖であり得、そしてPCR、膜に基づくハイブリダイゼーション技術、またはELISA様技術における特異性を有するように設計され得る。

40

【0048】

「単離された核酸分子」は、核酸の天然の供給源に存在する他の核酸分離から分離されたものである。単離された核酸分子の例には、ベクター中に含まれる組

50

換えDNA分子、異種宿主細胞中で維持される組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成のDNAまたはRNA分子が含まれるがこれらに限定されない。好ましくは、「単離された」核酸は、核酸が由来する生物体のゲノムDNA中で天然の状態で核酸に隣接している配列（すなわち、核酸の5'および3'末端に存在する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態においては、単離されたBAFF-R核酸分子は、約50kb、25kb、5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、または0.1kb未満のヌクレオチド配列を含有し得る。これは、核酸が由来する細胞のゲノムDNA中の核酸分子に天然の状態で隣接している。さらに、「単離された」核酸分子（例えば、cDNA分子）は、組換え技術によって産生される場合には、他の細胞の材料または培養培地を、あるいは化学的に合成される場合には化学的な前駆体または他の化合物を、実質的に含有し得ない。

10

【0049】

本発明の核酸分子（例えば、図1A（配列番号1）、図1B（配列番号2）、図2A（配列番号3）、図2C（配列番号4）、および図3（配列番号6）のヌクレオチド配列、またはこれらのヌクレオチド配列のいずれかの相補物を有している核酸分子）は、標準的な分子生物学的技術、および本明細書中で提供される配列情報を使用して単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして図1A、B、2A、C、および3の核酸配列の全てまたは一部を使用して、BAFF-R核酸配列が、標準的なハイブリダイゼーションおよびクロニング技術を使用して単離され得る（例えば、Sambrookら編、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989；およびAusubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993に記載されている）。

20

【0050】

本発明の核酸は、cDNA、mRNA、あるいはゲノムDNAを鋳型として、そして適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、標準的なPCR増幅技術に従って増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され得、そしてDNA配列分析によって特徴付けられ得る。さらに、BAFF-Rヌクレオチド配列に対応しているオリゴヌクレオチドは、例えば、自動DNA合成装置を使用して、標準的な合成技術によって調製され得る。

30

【0051】

本明細書中で使用される場合には、用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいう。オリゴヌクレオチドは、PCR反応において使用される十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノムもしくはcDNA配列に基づき得るか、またはゲノムもしくはcDNA配列から設計され得、そして特定の細胞または組織中の同一の、類似の、または相補的なDNAもしくはRNAを増幅、確認、またはその存在を明らかにするために使用され得る。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約10ntそして多くても50nt（好ましくは、約15ntから30nt）を有している核酸配列の一部を含む。これらは、化学的に合成され得、そしてプローブとして使用され得る。

40

【0052】

別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、図1A（配列番号1）、図1B（配列番号2）、図2A（配列番号3）、図2C（配列番号4）、および図3（配列番号6）に示されているヌクレオチド配列の相補物である核酸分子を含む。別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、図1A

50

(配列番号 1)、図 1 B (配列番号 2)、図 2 A (配列番号 3)、図 2 C (配列番号 4)、および図 3 (配列番号 6) に示されているヌクレオチド配列の相補物、またはこのヌクレオチド配列の一部である核酸分子を含む。図 1 A (配列番号 1)、図 1 B (配列番号 2)、図 2 A (配列番号 3)、図 2 C (配列番号 4)、および図 3 (配列番号 6) に示されているヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、図 1 A (配列番号 1)、図 1 B (配列番号 2)、図 2 A (配列番号 3)、図 2 C (配列番号 4)、および図 3 (配列番号 6) に示されているヌクレオチド配列に対して十分に相補的であるものである。これは、図 1 A (配列番号 1)、図 1 B (配列番号 2)、図 2 A (配列番号 3)、図 2 C (配列番号 4)、および図 3 (配列番号 6) に示されているヌクレオチド配列と、わずかな不適合を有してまたは不適合を有せずに水素結合し得、それによって安定な 2 本鎖を形成し得る。

10

【0053】

本明細書中で使用される場合には、用語「相補性」は、核酸分子のヌクレオチド単位間でのワトソクリックまたは H o o g s t e e n の塩基対合をいい、そして用語「結合」は、2つのポリペプチドもしくは化合物、または関連するポリペプチドもしくは化合物、あるいはそれらの組合せ間での物理的または化学的な相互作用を意味する。結合には、イオン結合、非イオン結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用などが含まれる。物理的な相互作用は、直接的または間接的のいずれかであり得る。間接的な相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物の作用を通じてであり得るか、またはそれに起因し得る。直接的な結合は、別のポリペプチドまたは化合物の作用は利用しないか、またはそれには起因しないが、その代わりに、他の実質的な化学的な中間体を伴わない相互作用をいう。

20

【0054】

さらに、本発明の核酸分子は、図 1 A (配列番号 1)、図 1 B (配列番号 2)、図 2 A (配列番号 3)、図 2 C (配列番号 4)、および図 3 (配列番号 6) の核酸配列の一部 (例えば、B A F F - R の生物学的に活性な部分をコードするプロープまたはプライマーまたはフラグメントとして使用され得るフラグメント) のみを含み得る。本明細書中で提供されるフラグメントは、少なくとも 6 個の (連続する) 核酸または少なくとも 4 個の (連続する) アミノ酸の配列として定義され、これは、核酸の場合には特異的なハイブリダイゼーション、またはアミノ酸の場合にはエピトープの特異的な認識をそれぞれ可能にするに十分な長さであり、そして多くても、全長の配列よりもいくつか少ない。フラグメントは、選択される核酸またはアミノ酸配列の任意の連続している部分に由来し得る。誘導体は、直接、または改変もしくは部分的な置換のいずれかによって、天然の化合物から形成された核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、天然の化合物と同様であるが同一ではない構造を有する、核酸配列またはアミノ酸配列であるが、特定の成分または側鎖を含む点でそれとは異なる。アナログは、合成であり得るかまたは種々の進化上の起源に由来し得、そして野生型と比較して同様のまたは反対の代謝活性を有する場合がある。

30

40

【0055】

誘導体およびアナログは、全長であり得るか、または誘導体もしくはアナログが、下記のような改変された核酸またはアミノ酸を含む場合には、全長ではない場合がある。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、種々の実施形態において、同一の大きさの核酸またはアミノ酸配列の全体にわたって、または、アラインメントが当該分野で公知のコンピューターによる相同プログラムによって行われた並べられた配列に対して比較される場合、またはそのコードする核酸が、上記のタンパク質をコードする配列の相補物に対して、ストリンジェントな、中程度のストリンジェントな、または低いストリンジェントの条件下でハイブリダイズすることができる場合に、少なくとも約 45%、50%、70

50

%、80%、95%、98%、またなお99%の同一性(80~99%の同一性が好ましい)によって、本発明の核酸またはタンパク質と実質的に相同である領域を含有している分子を含むが、これに限定されない。例えば、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993、および下記を参照のこと。例示的なプログラムは、デフォルトセッティングを使用するGapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package、バージョン8 for UNIX(登録商標)、Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI)である。これは、SmithおよびWaterman(1981)Adv. Appl. Math. 2: 482-489(これは、その全体において本明細書中で参考として援用されている)のアルゴリズムを使用する。

10

【0056】

「相同核酸配列」もしくは「相同アミノ酸配列」、またはそれらのバリエーションは、上記に議論されているようなヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの同一性によって特徴付けられる配列をいう。相同ヌクレオチド配列は、BAFF-Rポリペプチドのイソ型をコードするような配列をコードする。イソ型は、例えば、RNAの選択的スプライシングの結果として、同じ生物体の異なる組織中で発現され得る。あるいは、イソ型は、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明においては、相同ヌクレオチド配列には、哺乳動物を含むがこれらに限定されないヒト以外の種(従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、および他の生物体が含まれ得る)のBAFF-Rポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が含まれる。相同ヌクレオチド配列には、天然に存在している対立遺伝子のバリエーション、および本明細書中に示されているヌクレオチド配列の変異体もまた含まれるが、これらに限定されない。しかし、相同ヌクレオチド配列には、ヒトBAFF-Rタンパク質をコードするヌクレオチド配列は含まれない。相同核酸配列は、図2D(配列番号5)の保存的アミノ酸置換(以下に示される)、ならびにBAFF-R活性を有しているポリペプチドをコードするそのような核酸配列が含まれる。相同アミノ酸配列は、ヒトBAFF-Rポリペプチドのアミノ酸配列はコードしない。

20

30

【0057】

ヒトBAFF-R遺伝子のクローニングによって決定したヌクレオチド配列は、他の細胞型(例えば、他の組織から)中のBAFF-Rホモログ、および他の哺乳動物からのBAFF-Rホモログの、同定および/またはクローニングにおける使用のために設計された、プローブおよびプライマーの作製を可能にする。プローブ/プライマーは、典型的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、典型的には、図1A(配列番号1)、図1B(配列番号2)、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、および図3(配列番号6)のいずれかの連続しているセンス鎖のヌクレオチド配列、または図1A(配列番号1)、図1B(配列番号2)、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、および図3(配列番号6)いずれかのアンチセンス鎖のヌクレオチド配列、または図1A(配列番号1)、図1B(配列番号2)、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、および図3(配列番号6)のいずれかの天然に存在している変異体の、少なくとも約12、25、50、100、150、200、250、300、350、または400個に対して、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の領域を含む。

40

【0058】

ヒトBAFF-Rヌクレオチド配列に基づくプローブは、同じタンパク質または相同タンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用さ

50

れ得る。種々の実施形態においては、プローブはさらに、それに付着させられた標識基を含む。例えば、標識基は放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、B A F F - Rタンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断用試験キットの一部として、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のB A F F - Rをコードする核酸のレベルを測定することによって（例えば、B A F F - R mRNAのレベルを検出することによって）、あるいは、ゲノムB A F F - R遺伝子に変異させられているかまたは欠失させられているかどうかを決定することによって、使用され得る。

【0059】

「B A F F - Rの生物学的に活性な部分を有しているポリペプチド」は、特定の生物学的アッセイにおいて測定された場合に、用量依存的にまたはそうではなく、本発明のポリペプチドの活性と同様の（必ずしも同一である必要はない）活性を示すポリペプチド（成熟形態を含む）をいう。「B A F F - Rの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、図1 A（配列番号1）、図1 B（配列番号2）、図2 A（配列番号3）、図2 C（配列番号4）、および図3（配列番号6）（これは、B A F F - Rの生物学的活性（B A F F - Rタンパク質の生物学的活性は以下に記載される）を有しているポリペプチドをコードする）のいずれかの一部を単離すること、B A F F - Rタンパク質のコードされる部分を発現させること（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてB A F F - Rのコードされる部分の活性を評価することによって調製され得る。例えば、B A F F - Rの生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、必要に応じて、B A F F 結合ドメインを含む。別の実施形態においては、B A F F - Rの生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、1つ以上の領域を含む。

【0060】

（B A F F - R 改変体）

本発明はさらに、遺伝子コードの縮重に起因して、図1 A（配列番号1）、図1 B（配列番号2）、図2 A（配列番号3）、図2 C（配列番号4）、および図3（配列番号6）に示されているヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を含む。従って、これらの核酸は、図1 A（配列番号1）、図1 B（配列番号2）、図2 A（配列番号3）、図2 C（配列番号4）、および図3（配列番号6）に示されているヌクレオチド配列によってコードされるものと同じB A F F - Rタンパク質をコードする。別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、図2 D（配列番号5）に示されているアミノ酸配列を有しているタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0061】

図1 A（配列番号1）、図1 B（配列番号2）、図2 A（配列番号3）、図2 C（配列番号4）、および図3（配列番号6）のいずれかに示されているヒトB A F F - Rヌクレオチド配列に加えて、B A F F - Rのアミノ酸配列中の変化を導くDNA配列の多形現象が集団（例えば、ヒトの集団）中に存在し得ることが、当業者に理解される。このような、B A F F - R遺伝子の遺伝子多形現象は、天然の対立遺伝子のパリエーションに起因して、集団中の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合には、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、B A F F - Rタンパク質（好ましくは、哺乳動物のB A F F - Rタンパク質）をコードするオープンリーディングフレームを含有している核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のパリエーションは、典型的には、B A F F - R遺伝子のヌクレオチド配列中に1～5%の相違を生じ得る。B A F F - Rにおけるこのようなヌクレオチドのパリエーションおよび得られるアミノ酸の多形現象のいずれかおよび全て（これらは、天然の対立遺伝子のパリエーションの結果であり、そしてB A F F - Rの機能的活性は変更しない）が、本発明の範囲内であること

が意図される。

【 0 0 6 2 】

さらに、他の種に由来し、従って、図 1 A (配列番号 1)、図 1 B (配列番号 2)、図 2 A (配列番号 3)、図 2 C (配列番号 4)、および図 3 (配列番号 6) のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する B A F F - R タンパク質をコードする核酸分子が、本発明の範囲内であることが意図される。本発明の B A F F - R c D N A の天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子が、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下での標準的なハイブリダイゼーション技術に従って、ハイブリダイゼーションプローブとしてヒト c D N A またはその一部を使用して、本明細書中に開示されているヒト B A F F - R 核酸に対するそれらの相同性に基づいて単離され得る。例えば、可溶性のヒト B A F F - R c D N A が、ヒトの膜に結合した B A F F - R に対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜に結合したヒト B A F F - R c D N A が、可溶性のヒト B A F F - R に対するその相同性に基づいて単離され得る。

10

【 0 0 6 3 】

従って、別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも 6 ヌクレオチドの長さであり、そしてストリンジェントな条件下で、図 1 A (配列番号 1)、図 1 B (配列番号 2)、図 2 A (配列番号 3)、図 2 C (配列番号 4)、および図 3 (配列番号 6) のいずれかのヌクレオチド配列を含有している核酸分子に対してハイブリダイズする。別の実施形態においては、核酸は、少なくとも 1 0、2 5、5 0、1 0 0、2 5 0、または 5 0 0 ヌクレオチドの長さである。別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で使用される場合には、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、互いに少なくとも 6 0 % 相同であるヌクレオチド配列が、典型的には互いにハイブリダイズしたままである、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を記載するように意図される。

20

【 0 0 6 4 】

ホモログ (すなわち、ヒト以外の種に由来する B A F F - R タンパク質をコードする核酸) または他の関連する配列 (例えば、パラログ) は、核酸のハイブリダイゼーションおよびクローニングのための当該分野で周知の方法を使用して、プローブとして特定のヒト配列の全てまたは一部を用いて、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって得ることができる。

30

【 0 0 6 5 】

本明細書中で使用される場合には、句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、プローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は、配列に依存し、そして種々の環境下で異なる。より長い配列は、より短い配列よりも高温で特異的にハイブリダイズする。一般的には、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度および pH での、特異的な配列についての融点 (T_m) よりも約 5 °C 低くなるように選択される。 T_m は、標的配列に相補的なプローブの 5 0 % が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度 (定義されたイオン強度、pH、および核酸濃度下で) である。標的配列は、一般的には、過剰に存在するので、 T_m では、プローブの 5 0 % が平衡状態で占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、pH 7 . 0 ~ 8 . 3 で、塩濃度が約 1 . 0 M 未満のナトリウムイオン (典型的には、約 0 . 0 1 M ~ 1 . 0 M のナトリウムイオン (または他の塩)) であり、そして温度は、短いプローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチド (例えば、1 0 n t ~ 5 0 n t) については少なくとも約 3 0 °C、そしてより長いプローブ、プライマー、およびオリゴヌクレオチドについては少なくとも約 6 0 °C である。ストリンジェン

40

50

トな条件はまた、不安定化剤 (destabilizing agent) (例えば、ホルムアミド) の添加によって達成され得る。

【0066】

ストリンジェントな条件は当業者に公知であり、そしてCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY (1998)、6.3.1-6.3.6に見出され得る。好ましくは、典型的には、互いに少なくとも約65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%、または99%相同である配列が、互いにハイブリダイズしたままである条件である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の限定的ではない例は、6×SSC、50mMのTris-HCl (pH 7.5)、1mMのEDTA、0.02%のPVP、0.02%のFicoll、0.02%のBSA、および500mg/mlの変性させたサケ精子DNAを含有している高塩緩衝液中で65℃でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションには、0.2×SSC、0.01%のBSA中で50℃での、1回以上の洗浄が続く。配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6の配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする本発明の単離された核酸は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合には、「天然に存在する」核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド配列を有しているRNA分子またはDNA分子をいう(例えば、天然のタンパク質をコードする)。

10

20

【0067】

第2の実施形態においては、図1A(配列番号1)、図1B(配列番号2)、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、および図3(配列番号6)のいずれかのヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメント、アナログ、もしくは誘導体を含む核酸分子に対して、中程度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする核酸配列が、提供される。中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の限定的ではない例は、6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%のSDS、および100mg/mlの変性させたサケ精子DNA中で55℃でのハイブリダイゼーション、これに続く、1×SSC、0.01%のSDS中で37℃での、1回以上の洗浄である。使用され得る他の中程度のストリンジェンシーの条件は、当該分野で周知である。例えば、Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, 1993; およびKriegler、GENE TRANSFER AND EXPRESSION、A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY, 1990を参照のこと。

30

【0068】

第3の実施形態においては、図1A(配列番号1)、図2B(配列番号2)、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、および図3(配列番号6)のいずれかのヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメント、アナログ、もしくは誘導体を含む核酸分子に対して、低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸が、提供される。低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の限定的ではない例は、35%のホルムアミド、5×SSC、50mMのTris-HCl (pH 7.5)、5mMのEDTA、0.02%のPVP、0.02%のFicoll、0.2%のBSA、100mg/mlの変性させたサケ精子DNA、10%(wt/vol)のデキストラン硫酸中で40℃でのハイブリダイゼーション、これに続く、2×SSC、25mMのTris-HCl (pH 7.4)、5mMのEDTA、および0.1%のSDS中で50℃での1回以上の洗浄である。使用され得る他の低いストリンジェンシーの条件は、当該分野で周知である(例えば、交差種ハイブリダイゼーションのために使用

40

50

される)。例えば、Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons、NY、1993；およびKriegler、GENE TRANSFER AND EXPRESSION、A LABORATORY MANUAL, Stockton Press、NY、1990；ShilkoおよびWeinberg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6789 - 6792を参照のこと。

【0069】

(保存的変異)

集団中に存在し得るBAFF-R配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、変化が、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、図3(配列番号6)のヌクレオチド配列中への変異によって導入され得、それによって、BAFF-Rタンパク質の機能的な能力を変更することなく、コードされるBAFF-Rタンパク質のアミノ酸配列中に変化を導き得ることが、当業者にさらに明らかである。例えば、「必須ではない」アミノ酸残基でのアミノ酸置換を導くヌクレオチド置換が、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、および図3(配列番号6)のいずれかの配列中に作製され得る。「必須ではない」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更させることなくBAFF-Rの野生型配列から変更させられ得る残基であるが、「必須の」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要である。例えば、本発明のBAFF-Rタンパク質間で保存されているアミノ酸残基は、特に、変更されにくいと推定される。

10

20

【0070】

さらに、本発明のBAFF-Rタンパク質のファミリーのメンバーの間で保存されているアミノ酸残基もまた、変更されにくいと推定される。例えば、本発明のBAFF-Rタンパク質は、TNFファミリーのメンバーにおいて典型的に保存されている領域である少なくとも1つのドメインを含み得る。このように、これらの保存されたドメインは、おそらく、変異されやすい。しかし、他のアミノ酸残基(例えば、BAFF-Rタンパク質のメンバーの間で保存されていないかまたは半分だけ保存されている(only semi-conserved)アミノ酸残基)は、活性に必須ではなく、従って、おそらく、変更されやすい。

30

【0071】

本発明の別の局面は、活性のためには必須ではないアミノ酸残基に変化を含む、BAFF-Rタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなBAFF-Rタンパク質は、図2D(配列番号5)のアミノ酸配列とは異なるが、なお生物学的活性を保持している。1つの実施形態においては、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでは、タンパク質は、図2D(配列番号5)のアミノ酸配列に対して、少なくとも約45%相同であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、核酸分子によってコードされるタンパク質は、図2D(配列番号5)に対して少なくとも約60%相同、より好ましくは、図2D(配列番号5)に対して少なくとも約70%、80%、90%、95%、98%、そして最も好ましくは、少なくとも約99%相同である。

40

【0072】

図2Dのタンパク質に対して相同であるBAFF-Rタンパク質をコードする単離された核酸分子は、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、および図3(配列番号6)のヌクレオチド配列中に1つ以上のヌクレオチドの置換、付加、または欠失を導入することによって作製される。その結果、1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失がコードされるタンパク質中に導入される。

【0073】

変異は、標準的な技術(例えば、部位特異的変異誘発、およびPCRによって媒介される変異誘発によって)、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)

50

、または図 3 (配列番号 6) 中に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1 つ以上の推定される必須ではないアミノ酸残基で作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有しているアミノ酸残基で置きかえられる置換である。類似の側鎖を有しているアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーには、以下が含まれる：塩基性の側鎖を有するアミノ酸 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性の側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、荷電していない極性の側鎖を有するアミノ酸 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性の側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β -分岐側鎖を有するアミノ酸 (例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖を有するアミノ酸 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)。このように、B A F F - R 中の推定される必須ではないアミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリーに由来する別のアミノ酸残基で置きかえられる。あるいは、別の実施形態においては、変異は、B A F F - R をコードする配列の全てまたは一部にわたってランダムに (例えば、飽和変異誘発によって) 導入され得、そして得られた変異体は、活性を保持している変異体を同定するために、B A F F - R の生物学的活性についてスクリーニングされ得る。図 2 A (配列番号 3)、図 2 C (配列番号 4)、および図 3 (配列番号 6) のいずれかの変異誘発後、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現させられ得、そしてタンパク質の活性が決定され得る。

【0074】

1 つの実施形態においては、変異体 B A F F - R タンパク質は、以下についてアッセイされ得る：(1) 他の B A F F - R タンパク質、他の細胞表面タンパク質、またはそれらの生物学的に活性な部分とのタンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力；(2) 変異体 B A F F - R タンパク質と B A F F - R リガンドとの間での複合体の形成；(3) 細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分 (例えば、アビジンタンパク質) に結合する、変異体 B A F F - R タンパク質の能力；(4) B A F F に結合する能力；あるいは (5) B A F F - R タンパク質抗体に特異的に結合する能力。

【0075】

本発明は、B A F F 結合活性を維持しながら、発現されるタンパク質の凝集を緩和するように設計された、B A F F - R : F c ポリペプチドをコードする特異的な変異体を提供する。このような変異体には、例えば、J S T 6 6 1 (配列番号 17)、J S T 6 6 2 (配列番号 18)、J S T 6 6 3 (配列番号 19)、J S T 6 7 3 (配列番号 20)、J S T 6 7 4 (配列番号 21)、J S T 6 7 5 (配列番号 22)、J S T 6 7 2 (配列番号 23)、J S T 6 7 6 (配列番号 24)、J S T 6 7 1 (配列番号 25)、J S T 6 7 7 (配列番号 26)、および J S T 6 7 8 (配列番号 27) のアミノ酸配列をコードするクローンが含まれる。他の実施形態には、B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドをコードする変異体が含まれる。これは、天然のヒト B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドの特徴と同様の凝集特性を有するが、これはまた、例えば、J S T 6 5 9 (配列番号 15)、J S T 6 6 0 (配列番号 16)、J S T 6 6 4 (配列番号 28)、J S T 6 6 8 (配列番号 29)、J S T 6 6 5 (配列番号 30)、J S T 6 6 6 (配列番号 31)、および J S T 6 6 7 (配列番号 32) のアミノ酸配列を含有している配列を含む B A F F にも結合する。他の実施形態には、B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドをコードする変異体が含まれる。ここでは、ヒトの B A F F - R とマウスの B A F F - R との間で保存されるアミノ酸は、他の保存されるアミノ酸に変化させられており、そしてここ

10

20

30

40

50

では、B A F F に対する B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドの結合活性は保持されている。他の実施形態においては、変異体は、他のアミノ酸に変化させられている、ヒトの B A F F - R とマウスの B A F F - R との間では保存されていないアミノ酸を有している、B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドをコードする。好ましくは、少なくとも 1 つの非極性のアミノ酸が、プロリン残基に、または荷電していない極性のアミノ酸に変化させられている。

【0076】

(アンチセンス)

本発明の別の局面は、図 2 A、C、3 のヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメント、アナログ、もしくは誘導体を含む核酸分子にハイブリダイズし得るか、またはそれと相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、2 本鎖 c D N A 分子のコード鎖に相補的であるか、または m R N A 配列に相補的である）ヌクレオチド配列を含む。特定の局面においては、B A F F - R コード鎖の少なくとも約 10、25、50、100、250、もしくは 500 ヌクレオチド、またはその全体に対して、あるいはその一部だけに相補的な配列を含むアンチセンス核酸分子が提供される。図 2 A（配列番号 3）、図 2 C（配列番号 4）、図 3（配列番号 6）のいずれかの B A F F - R タンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体、およびアナログをコードする核酸分子、または図 2 A（配列番号 3）、図 2 C（配列番号 4）、図 3（配列番号 6）の B A F F - R 核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

【0077】

1 つの実施形態においては、アンチセンス核酸分子は、B A F F - R をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」は、アミノ酸残基（例えば、ヒト B A F F - R のタンパク質コード領域は、図 2 A（配列番号 3）のヌクレオチド 13 ~ 568、または図 2 C（配列番号 4）のヌクレオチド 13 ~ 565、または図 3（配列番号 6）のヌクレオチド 298 ~ 849 に対応する）に翻訳されるコドンを含むしているヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態においては、アンチセンス核酸分子は、B A F F - R をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」は、アミノ酸に翻訳されないコード領域に隣接している 5' および 3' 配列をいう（すなわち、5' および 3' 非翻訳領域とも呼ばれる）。

【0078】

本明細書中で開示されている B A F F - R をコードするコード鎖の配列を仮定すると、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソンクリックまたは H o o g e s t e e n の塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、B A F F - R m R N A のコード領域全体に相補的であり得るが、B A F F - R m R N A のコード領域または非コード領域の一部だけに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドが、より好ましい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、B A F F - R m R N A の翻訳開始部位の周辺領域に対して相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50 ヌクレオチドの長さであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用して、化学合成または酵素連結反応を使用して構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在しているヌクレオチドを使用して化学的に合成され得るか、あるいは、分子の生物学的安定性を増大させるように、またはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される 2 本鎖の物理的な安定性を増大させるように設計された種々の改変されたヌクレオチド（例えば、

ホスホロチオエート誘導体およびアクリジンで置換されたヌクレオチド)が、使用され得る。

【0079】

アンチセンス核酸を作製するために使用され得る改変されたヌクレオチドの例には、以下が含まれる：5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β - D - ガラクトシルキューオシン (galactosylqueosine)、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 β - D - マンノシルキューオシン (mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイブトキシソシン (wybutoxosine)、シュードウラシル、キューオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2, 6 - ジアミノプリン。あるいは、アンチセンス核酸は、その中に核酸がアンチセンス方向でサブクロン化されている発現ベクターを使用して生物学的に産生され得る (すなわち、挿入された核酸から転写されるRNAは、以下の節でさらに記載される目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である)。

【0080】

本発明のアンチセンス核酸は、典型的には、被験体に投与されるか、またはインサイチュで作製され、その結果、これらは、BAFF - Rタンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするかまたはそれに結合して、それにより、例えば、転写および/または翻訳の阻害によってタンパク質の発現を阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な2本鎖を形成するための従来のヌクレオチド相補性により得るか、または例えば、DNA2本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重螺旋の主溝における特異的相互作用を介する。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例には、組織部位での直接の注射が含まれる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身的に投与され得る。例えば、全身的投与については、アンチセンス分子は、それらが、選択された細胞表面上で発現されるレセプターまたは抗原に特異的に結合するように、例えば、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に対してアンチセンス核酸分子を連結することによって、改変され得る。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書中で記載されているベクターを使用して細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、アンチセンス核酸分子が、強力なpolIIまたはpolIIIプロモーターの制御下に配置されているベクター構築物が好ましい。

【0081】

なお別の実施形態においては、本発明のアンチセンス核酸分子は、a - アノマー核酸分子である。a - アノマー核酸分子は、鎖が互いに平行に伸びる通常のbユニットとは対照的に、相補RNAと特異的な2本鎖のハイブリッドを形成する (Gaultierら (1987) Nuc l . A c i d s R e s . 15 : 66

10

20

30

40

50

25 - 6641)。アンチセンス核酸分子はまた、2' - O - メチルリボヌクレオチドクレオチド (Inoueら (1987) *Nucl. Acid Res.* 15: 6131 - 6148) またはキメラRNA - DNAアナログ (Inoueら (1987) *FEBS Lett.* 215: 327 - 330) を含むことが可能である。

【0082】

(リボザイムおよびPNA部分)

なお別の実施形態においては、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、1本鎖の核酸 (例えば、mRNA) を切断し得る (リボザイムは、この1本鎖の核酸に対して相補性を有する) リボヌクレアーゼ活性を有している触媒性RNA分子である。このように、リボザイム (例えば、ハンマーヘッドリボザイム (HaselhoffおよびGerlach (1988) *Nature* 334: 585 - 591 に記載されている)) は、BAFF - R mRNA転写物を触媒によって切断するために使用され得、それによってBAFF - R mRNAの翻訳を阻害する。BAFF - Rをコードする核酸について特異性を有しているリボザイムは、本明細書中で開示されているBAFF - R DNAのヌクレオチド配列 (すなわち、配列番号3、配列番号4、配列番号6) に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、BAFF - RをコードするmRNA中で切断されるヌクレオチド配列に対して相補的である、Tetrahymena L - 19 IVS RNAの誘導体が、構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号; およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、BAFF - R mRNAは、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有している触媒性RNAを選択するために使用され得る。例えば、Bartelら (1993) *Science* 261: 1411 - 1418を参照のこと。

10

20

【0083】

あるいは、BAFF - R遺伝子の発現は、標的細胞中のBAFF - R遺伝子の転写を妨げる3重螺旋構造を形成するように、BAFF - Rの調節領域 (例えば、BAFF - Rプロモーターおよび/またはエンハンサー) に相補的なヌクレオチド配列を標的化することによって、阻害され得る。一般的には、Helene (1991) *Anticancer Drug Des.* 6: 569 - 84; Heleneら (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660: 27 - 36; およびMaher (1992) *Bioassays* 14: 807 - 15を参照のこと。

30

【0084】

種々の実施形態においては、BAFF - Rの核酸は、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または可溶性を改善するように改変され得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格が、ペプチド核酸を作製するために改変され得る (Hyrupら (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5 - 23を参照のこと)。本明細書中で使用される場合には、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置きかえられ、そして4個の天然のヌクレオ塩基のみが保持される核酸模倣物 (例えば、DNA模倣物) をいう。中性のPNA骨格は、低いイオン強度の条件下で、DNAおよびRNAへの特異的なハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrupら (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5 - 23; Perry - O'Keefeら (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670 - 675に記載されているような標準的な固相ペプチド合成プロトコールを使用して行われ得る。

40

【0085】

50

B A F F - R の P N A は、治療用途および診断用途において使用され得る。例えば、P N A は、例えば、転写または翻訳の停止を誘導するか、あるいは複製を阻害することによる遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子因子として使用され得る。B A F F - R の P N A はまた、例えば、遺伝子中の単一の塩基対変異の分析においては、例えば、P N A 特異的 P C R クランピングにおいて使用され得；他の酵素（例えば、S 1 ヌクレアーゼ（H y r u p B . (1 9 9 6) B i o o r g . M e d . C h e m . 4 : 5 - 2 3 ））と組合せて使用される場合には、人工的な制限酵素として使用され得；あるいは、D N A 配列決定およびハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーとして使用され得（H y r u p ら（1 9 9 6 ）B i o o r g . M e d . C h e m . 4 : 5 - 2 3 ; P e r r y - O ' K e e f f e (1 9 9 6) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 : 1 4 6 7 0 - 6 7 5 ））。

10

【0086】

別の実施形態においては、B A F F - R の P N A は、例えば、それらの安定性または細胞による取り込みを増進するために、P N A に親油性基または他のヘルパー基を付着させることによって、P N A - D N A キメラの形成によって、あるいは、リボソームまたは当該分野で公知の薬物送達のための技術の使用によって、改変され得る。例えば、P N A と D N A との有利な特性を組み合わせ得る B A F F - R の P N A - D N A キメラが、作製され得る。このようなキメラは、D N A 認識酵素（例えば、R N a s e H および D N A ポリメラーゼ）が D N A 部分と相互作用し、一方で P N A 部分が高い結合親和性および特異性を提供することを可能にする。P N A - D N A キメラは、塩基スタッキング、ヌクレオ塩基間の結合数、および方向に関して選択された適切な長さのリンカーを使用して連結され得る（H y r u p ら（1 9 9 6 ）B i o o r g . M e d . C h e m . 4 : 5 - 2 3 ）。P N A - D N A キメラの合成は、H y r u p (1 9 9 6) B i o o r g . M e d . C h e m . 4 : 5 - 2 3 ; および F i n n ら（1 9 9 6 ）N u c l . A c i d R e s . 2 4 : 3 3 5 7 - 6 3 に記載されているように行われ得る。例えば、D N A 鎖は、標準的なホスホルアミダイトカップリング化学を使用して固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ（例えば、5 ' - (4 - メトキシトリチル) アミノ - 5 ' - デオキシ - チミジンホスホルアミダイト）が、P N A と D N A の 5 ' 末端との間で使用され得る（M a g ら（1 9 8 9 ）N u c l . A c i d R e s . 1 7 : 5 9 7 3 - 8 8 ）。次いで、P N A 単量体が、5 ' P N A セグメントと 3 ' D N A セグメントとのキメラ分子を生成するために段階的にカップリングされる（F i n n ら（1 9 9 6 ）前出）。あるいは、5 ' D N A セグメントと 3 ' P N A セグメントとのキメラ分子が、合成され得る。P e t e r s e n ら（1 9 7 5 ）B i o o r g . M e d . C h e m . L e t t . 5 : 1 1 1 9 1 - 1 1 1 2 4 を参照のこと。

20

30

【0087】

他の実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付属基（例えば、インビボでの宿主細胞レセプターの標的化のため）、または細胞膜を通過する輸送を促進する試薬（例えば、L e t s i n g e r ら（1 9 8 9 ）P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 6 5 5 3 - 6 5 5 6 ; L e m a i t r e ら（1 9 8 7 ）P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 4 : 6 4 8 - 6 5 2 ; P C T 国際公開番号第 W O 8 8 / 0 9 8 1 0 号を参照のこと）、または血液 - 脳関門（例えば、P C T 国際公開番号第 W O 8 9 / 1 0 1 3 4 号を参照のこと）を含有し得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションを誘発する切断試薬（h y b r i d i z a t i o n t r i g g e r e d c l e a v a g e a g e n t ）（例えば、K r o l ら（1 9 8 8 ）B i o T e c h n i q u e s 6 : 9 5 8 - 9 7 6 を参照のこと）またはインターカレート剤（例えば、Z o n (1 9 8 8) P h a r m . R e s . 5 : 5 3 9

40

50

- 549を参照のこと)を用いて改変され得る。最後に、オリゴヌクレオチドは、別の分子(例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションを誘発する架橋剤(hybridization triggered cross-linking agent)、輸送剤、ハイブリダイゼーションを誘発する切断試薬など)と連結され得る。

【0088】

(BAFF-Rポリペプチド)

本発明の1つの局面は、単離されたBAFF-Rタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログに関する。抗BAFF-R抗体を惹起するための免疫原としての使用に適切なポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態においては、天然のBAFF-Rタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用して適切な精製スキームによって細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態においては、BAFF-Rタンパク質は、組換えDNA技術によって生成される。組換え発現の代替として、BAFF-Rタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して化学的に合成され得る。

【0089】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、BAFF-Rタンパク質が由来する細胞または組織供給源から、細胞の材料または他の混入しているタンパク質を実質的に含まないか、あるいは、化学的に合成される場合には、化学的な前駆体または他の化合物を実質的に含まない。語句「細胞の材料を実質的に含まない」は、タンパク質が、そのタンパク質が単離されるかまたはそのタンパク質を組換え生成する細胞の細胞成分から分離されている、BAFF-Rタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態においては、語句「細胞の材料を実質的に含まない」は、約30%未満(乾燥重量で)の非BAFF-Rタンパク質(本明細書中では、「混入タンパク質」とも呼ばれる)を有している、より好ましくは、約20%未満の非BAFF-Rタンパク質を有する、なおより好ましくは、約10%未満の非BAFF-Rタンパク質を有する、そして最も好ましくは、約5%未満の非BAFF-Rタンパク質を有するBAFF-Rタンパク質の調製物を含む。BAFF-Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合には、培養培地を実質的に含まない、すなわち、培養培地がタンパク質調製物の容量の約20%未満、より好ましくは、約10%未満、そして最も好ましくは、約5%未満を示すこともまた、好ましい。

【0090】

語句「化学前駆体または他の化合物を実質的に含まない」は、タンパク質がタンパク質の合成に関係している化学前駆体または他の化合物から分離されている、BAFF-Rタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態においては、語句「化学的な前駆体または他の化合物を実質的に含まない」は、約30%未満(乾燥重量で)の化学前駆体または非BAFF-R化合物を有する、より好ましくは、約20%未満の化学前駆体または非BAFF-R化合物を有する、なおより好ましくは、約10%未満の化学前駆体または非BAFF-R化合物を有する、そして最も好ましくは、約5%未満の化学前駆体または非BAFF-R化合物を有するBAFF-Rタンパク質の調製物を含む。

【0091】

BAFF-Rタンパク質の生物学的に活性な部分は、全長のBAFF-Rタンパク質よりも短いアミノ酸を含み、そしてBAFF-Rタンパク質の少なくとも1つの活性を示すBAFF-Rタンパク質(例えば、配列番号5に示されるアミノ酸配列)のアミノ酸配列に対して十分に相同であるか、またはそのアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含有するペプチドを含む。典型的には、生物学的に

活性な部分は、B A F F - R タンパク質の少なくとも 1 つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。B A F F - R タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100、またはそれより長いアミノ酸長のポリペプチドであり得る。

【0092】

本発明の B A F F - R タンパク質の生物学的に活性な部分は、B A F F - R タンパク質間で保存されている、上記で同定されたドメインの少なくとも 1 つを含み得る。B A F F - R タンパク質の別の生物学的に活性な部分は、上記で同定されたドメインの少なくとも 2 つを含み得る。B A F F - R タンパク質の別の生物学的に活性な部分は、上記で同定されたドメインの少なくとも 3 個を含み得る。本発明の B A F F - R タンパク質のなお別の生物学的に活性な部分は、上記で同定されたドメインの少なくとも 4 個を含み得る。

10

【0093】

さらに、タンパク質の他の領域が欠失した他の生物学的に活性な部分が、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブの B A F F - R タンパク質の機能的活性の 1 つ以上について評価され得る。

【0094】

1 つの実施形態においては、B A F F - R タンパク質は、図 2 D (配列番号 5) に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態においては、B A F F - R タンパク質は、図 2 D (配列番号 5) に対して実質的に相同であり、そして図 2 D (配列番号 5) のタンパク質の機能的活性を保持しているが、以下に詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子のバリエーションまたは突然変異誘発に起因して、アミノ酸配列において異なる。従って、別の実施形態においては、B A F F - R タンパク質は、図 2 D (配列番号 5) のアミノ酸に対して少なくとも約 45 % 相同であるアミノ酸配列を含み、そして図 2 D (配列番号 5) の B A F F - R タンパク質の機能的な活性を保持するタンパク質である。

20

【0095】

いくつかの実施形態においては、本発明は、B A F F 結合活性を維持したまま発現されるタンパク質の凝集を緩和するように設計された、B A F F - R : F c ポリペプチドの特異的な変異体を含む。このような変異体には、例えば、J S T 6 6 1 (配列番号 17)、J S T 6 6 2 (配列番号 18)、J S T 6 6 3 (配列番号 19)、J S T 6 7 3 (配列番号 20)、J S T 6 7 4 (配列番号 21)、J S T 6 7 5 (配列番号 22)、J S T 6 7 2 (配列番号 23)、J S T 6 7 6 (配列番号 24)、J S T 6 7 1 (配列番号 25)、J S T 6 7 7 (配列番号 26)、および J S T 6 7 8 (配列番号 27) のアミノ酸配列をコードするクローンが含まれる。他の実施形態には、B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドをコードする変異体が含まれる。これは、ネイティブのヒト B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドの特徴と同様の凝集を有するが、これはまた、例えば、J S T 6 5 9 (配列番号 15)、J S T 6 6 0 (配列番号 16)、J S T 6 6 4 (配列番号 28)、J S T 6 6 8 (配列番号 29)、J S T 6 6 5 (配列番号 30)、J S T 6 6 6 (配列番号 31)、および J S T 6 6 7 (配列番号 32) のアミノ酸配列を含有する配列を含む B A F F にも結合する。他の実施形態には、B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドをコードする変異体が含まれる。ここで、ヒト B A F F - R とマウス B A F F - R との間で保存されたアミノ酸が、他の保存的アミノ酸に変化しており、そしてここで、B A F F に対する B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドの結合活性は保持されている。他の実施形態においては、変異体は、他のアミノ酸に変化したヒト B A F F - R とマウス B A F F - R との間で保存されていないアミノ酸を有する、B A F F - R または B A F F - R : F c ポリペプチドをコードする。好ましくは、非極性アミノ酸が、プロリン残基または非荷電極性アミノ酸に変化

30

40

50

している。

【0096】

(2つ以上の配列間での相同性の決定)

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の相同性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較の目的のために整列される(例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアラインメントのために、第1のアミノ酸または核酸配列の配列中にギャップが導入され得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが、比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有されている場合、分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書中で使用する場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸「同一性」と等価である)。

10

【0097】

核酸配列の相同性は、2つの配列間の同一性の程度として決定され得る。相同性は、当該分野で公知のコンピュータープログラム(例えば、GCGプログラムパッケージとして提供されているGAPソフトウェア)を使用して決定され得る。NeedlemanおよびWunsch(1970)J. Mol. Biol. 48:443-453を参照のこと。核酸配列の比較のための以下の設定(5.0のGAPクリエーションペナルティーおよび0.3のGAPエクステンションペナルティー)を用いてGCG GAPソフトウェアを使用すると、上記のアナログ核酸配列のコード領域は、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、図3(配列番号6)に示されるDNA配列のCDS(コード)部分と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の好ましい程度の同一性を示す。

20

【0098】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列が、特定の比較領域にわたって、残基毎の基準で同一である程度をいう。用語「配列同一性の割合」は、その比較領域にわたって最適に並べられた2つの配列を比較すること、同一の核酸塩基(例えば、核酸の場合は、A、T、C、G、U、またはI)が両方の配列中に存在する位置の数を決定し、それによって一致する位置の数を得ること、比較領域中の位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)によって一致した位置の数を除算すること、そして配列同一性の割合を得るために結果に100を掛けることによって、計算される。用語「実質的な同一性」は、本明細書中で使用される場合には、ポリヌクレオチド配列の特徴を示す。ここでは、ポリヌクレオチドは、比較領域の全体について参照配列と比較した場合に、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは、少なくとも85%の配列同一性、そしてしばしば、90~95%の配列同一性、より通常は、少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0099】

(キメラおよび融合タンパク質)

本発明はまた、BAFF-Rのキメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合には、BAFF-R「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非BAFF-Rポリペプチドに対して作動可能に連結されたBAFF-Rポリペプチドを含む。「BAFF-Rポリペプチド」は、BAFF-Rに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、一方、「非BAFF-Rポリペプチド」は、BAFF-Rタンパク質と実質的に相同ではないタンパク質(例えば、BAFF-Rタンパク質とは異なり、そして同じまたは異なる生物体由来するタンパク質)に対応しているアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。BAFF-R融合タンパク質中では、BAFF-Rポリペプチドは、BAFF-Rタンパク質の全体または一部に対応し得る。1つの実施形態においては

40

50

、B A F F - R 融合タンパク質は、B A F F - R タンパク質の少なくとも 1 つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態においては、B A F F - R 融合タンパク質は、B A F F - R タンパク質の少なくとも 2 つの生物学的に活性な部分を含む。なお別の実施形態においては、B A F F - R 融合タンパク質は、B A F F - R タンパク質の少なくとも 3 個の生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質中では、用語「作動可能に連結された」は、B A F F - R ポリペプチドおよび非 B A F F - R ポリペプチドが、互いにインフレームで融合されていることを示すことが意図される。非 B A F F - R ポリペプチドは、B A F F - R ポリペプチドの N 末端または C 末端に融合され得る。非 B A F F - R ポリペプチドは、例えば、抗体の F c 部分であり得る。これは、B A F F - R ポリペプチドの N 末端または C 末端のいずれかに作動可能に連結され得る。F c 標的タンパク質融合体は、L o r a (1 9 9 8) P r o t e i n E n g i n e e r i n g 1 1 : 4 9 5 - 5 0 0、ならびに米国特許第 5, 5 4 1, 0 8 7 号および同第 5, 7 2 6, 0 4 4 号に記載されている。その開示は、本明細書中で参考として援用される。

10

【 0 1 0 0 】

例えば、1 つの実施形態においては、B A F F - R 融合タンパク質は、第 2 のタンパク質の細胞外ドメインに作動可能に連結された B A F F - R ドメインを含む。このような融合タンパク質はさらに、B A F F - R 活性を調節する化合物のスクリーニングアッセイに利用され得る（このようなアッセイは、以下に詳細に記載される）。

20

【 0 1 0 1 】

なお別の実施形態においては、融合タンパク質は、B A F F - R 配列が G S T（すなわち、グルタチオン S - トランスフェラーゼ）配列の C 末端に融合されている、G S T - B A F F - R 融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、組換え B A F F - R の精製を容易にし得る。

【 0 1 0 2 】

別の実施形態においては、融合タンパク質は、その N 末端に異種シグナル配列を含む B A F F - R タンパク質である。例えば、B A F F - R はそれ自身のシグナル配列を含まないので、異種シグナル配列が、B A F F - R 融合タンパク質の十分な分泌のために、B A F F - R コード配列の 5 ' 末端に融合されなければならない。B A F F - R の発現および / または分泌は、異なる異種シグナル配列の使用を通じて増大され得る。

30

【 0 1 0 3 】

なお別の実施形態においては、融合タンパク質は、1 つ以上のドメインを含有している B A F F - R 配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合された、B A F F - R - 免疫グロブリン融合タンパク質である。本発明の B A F F - R - 免疫グロブリン融合タンパク質は薬学的組成物中に取り込まれ得、そして細胞表面上での B A F F - R リガンドと B A F F - R タンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボでの B A F F - R 媒介性のシグナル伝達を抑制するために、被験体に投与され得る。B A F F - R - 免疫グロブリン融合タンパク質は、B A F F - R の同族リガンドの生体利用可能性に影響を与えるように使用され得る。B A F F - R リガンド / B A F F - R の相互作用の阻害は、増殖性障害および分化の障害の両方の処置、ならびに細胞生存性の調節（例えば、促進または阻害）のために治療的に有用であり得る。さらに、本発明の B A F F - R - 免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中での抗 B A F F - R 抗体の産生、B A F F - R リガンドの精製のために、および B A F F - R リガンドと B A F F - R との相互作用を阻害する分子を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて、免疫原として使用され得る。

40

【 0 1 0 4 】

本発明の B A F F - R キメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換え D N A

50

技術によって産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードする DNA フラグメントは、従来技術に従って（例えば、連結のための平滑末端または突出末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合には粘着末端のフィルイン、所望されない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素連結によって）、互いにインフレイムで連結される。別の実施形態においては、融合遺伝子は、自動 DNA 合成装置を含む従来技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントの PCR 増幅は、2つの連続する遺伝子フラグメント間の突出部に相補性を生じるアンカープライマーを使用して実施され得る。その後、キメラ遺伝子配列を作成するためのアニーリングおよび再増幅され得る（例えば、Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons、1992を参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードする多くの発現ベクターが市販されている。BAFF-Rをコードする核酸はこのような発現ベクター中にクローン化され得、その結果、融合部分がBAFF-Rタンパク質にインフレイムで連結される。

10

【0105】

好ましい実施形態においては、BAFF-R融合体が、図9の核酸（配列番号11）およびアミノ酸（配列番号12）配列によって提供される。

【0106】

（BAFF-Rアゴニストおよびアンタゴニスト）

20

本発明はまた、BAFF-Rアゴニスト（模倣物）またはBAFF-Rアンタゴニストのいずれかとして機能する、BAFF-Rタンパク質の変異体にも関する。BAFF-Rタンパク質の改変体は、突然変異誘発（例えば、別個の点変異またはBAFF-Rタンパク質の短縮型）によって作製され得る。BAFF-Rタンパク質のアゴニストは、BAFF-Rタンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同じものを保持し得るか、またはそのサブセットを保持し得る。BAFF-Rタンパク質のアンタゴニストは、BAFF-Rタンパク質の天然に存在する形態の1つ以上の活性を、例えば、BAFF-Rタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流のメンバーに競合して結合することによって阻害し得る。このように、特異的な生物学的作用は、限定された作用を有する改変体による処置によって誘発され得る。1つの実施形態においては、天然に存在する形態のタンパク質の生物学的活性のサブセットを有する改変体による被験体の処置は、天然に存在する形態のBAFF-Rタンパク質による処置と比較して、被験体における副作用が少ない。

30

【0107】

BAFF-Rアゴニスト（模倣物）またはBAFF-Rアンタゴニストのいずれかとして作用するBAFF-Rタンパク質の変異体は、BAFF-Rタンパク質の変異体（例えば、短縮変異体）のコンビナトリアルライブラリーを、BAFF-Rタンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって同定され得る。1つの実施形態においては、BAFF-R変異体の多彩なライブラリーは、核酸レベルでの組合せ突然変異誘発によって作製され、そしてこれは、多彩な遺伝子ライブラリーによってコードされる。BAFF-R改変体の多彩なライブラリーは、例えば、遺伝子配列中に合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素によって連結することによって生成され得る。その結果、潜在的なBAFF-R配列の縮重セットは、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にBAFF-R配列のセットを含むより大きな融合タンパク質のセット（例えば、ファージディスプレイのために）として発現可能である。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なBAFF-R改変体のライブラリーを生成するために使用され得る種々の方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動DNA合成装置中で行われ得、次いで、合成遺伝子が適切な発現ベクター中に連

40

50

結される。遺伝子の縮重セットの使用は、可能性のある B A F F - R 配列の所望されるセットをコードする配列の全てを 1 つの混合物中に提供することを可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当該分野で公知である（例えば、N a r a n g (1 9 8 3) T e t r a h e d r o n 3 9 : 3 ; I t a k u r a ら (1 9 8 4) A n n . R e v . B i o c h e m . 5 3 : 3 2 3 ; I t a k u r a ら (1 9 7 7) S c i e n c e 1 9 8 : 1 0 5 6 - 1 0 6 3 ; I k e ら (1 9 8 3) N u c l . A c i d R e s . 1 1 : 4 7 7 - 4 8 8 を参照のこと）。

【 0 1 0 8 】

（ポリペプチドライブラリー）

さらに、B A F F - R タンパク質をコードする配列のフラグメントのライブラリーは、B A F F - R タンパク質の改変体のスクリーニングおよびその後の選択のための B A F F - R フラグメントの多彩な集団を作製するために、使用され得る。1 つの実施形態においては、コード配列のフラグメントのライブラリーは、ニックングが 1 分子あたり約 1 回だけ生じる条件下でヌクレアーゼを用いて B A F F - R をコードする配列の 2 本鎖の P C R フラグメントを処理し、2 本鎖の D N A を変性し、異なるニック産物由来のセンス / アンチセンス対を含み得る 2 本鎖の D N A を形成するように D N A を再生 (r e n a t u r e) させ、S 1 ヌクレアーゼ処理によって再形成された 2 本鎖から 1 本鎖部分を除去し、そして得られたフラグメントのライブラリーを発現ベクター中に連結することによって作製され得る。この方法によって、N 末端、および種々の大きさの B A F F - R タンパク質の内部フラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導し得る。

【 0 1 0 9 】

点変異または短縮によって作製されるコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、および選択された特性を有する遺伝子産物の c D N A ライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術が、当該分野で公知である。このような技術は、B A F F - R タンパク質の組合せ突然変異誘発によって作成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適合可能である。大きな遺伝子ライブラリーのスクリーニングのための最も広く使用される、高スループット分析が可能な技術には、典型的には、複製可能な発現ベクター中への遺伝子ライブラリーのクローニング、得られたベクターのライブラリーによる適切な細胞の形質転換、および所望される活性の検出が検出される産物の遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現させることが含まれる。自己調和変異誘発 (R e c r u s i v e e n s e m b l e m u t a g e n e s i s) (R E M)、ライブラリー中の機能的な変異体の頻度を増大させる新しい技術は、B A F F - R 変異体を同定するためのスクリーニングアッセイと組合せて使用され得る (A r k i n および Y o u r v a n (1 9 9 2) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 7 8 1 1 - 7 8 1 5 ; D e l g r a v e ら (1 9 9 3) P r o t e i n E n g i n e e r i n g 6 : 3 2 7 - 3 3 1)。

【 0 1 1 0 】

（抗 B A F F - R 抗体）

単離された B A F F - R タンパク質、またはその一部もしくはフラグメントは、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製のための標準的な技術を使用して、B A F F - R に結合する抗体を作製するための免疫原として使用され得る。全長の B A F F - R タンパク質が使用され得るか、あるいは、本発明は、免疫原として使用するために、B A F F - R の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。B A F F - R の抗原性ペプチドは、図 2 D (配列番号 5) に示されるアミノ酸配列の少なくとも 8 つのアミノ酸残基を含み、そして B A F F - R のエピートプを含有する。その結果、このペプチドに対して惹起された抗体は、B A F F -

R との特異的な免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも 10 個のアミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも 15 個のアミノ酸残基、なおより好ましくは、少なくとも 20 個のアミノ酸残基、そして最も好ましくは、少なくとも 30 個のアミノ酸残基を含む。好ましくは、抗原性ペプチドに含まれるエピトープは、タンパク質表面に存在する B A F F - R の領域（例えば、親水性領域）である。

本明細書中で開示されるように、図 2 D（配列番号 5）の B A F F - R タンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログは、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の作製において免疫原として利用され得る。用語「抗体」は、本明細書中で使用される場合には、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分（すなわち、抗原に特異的に結合する（それと免疫反応する）抗原結合部位を含む分子（例えば、B A F F - R））をいう。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、F a b および F (a b ')₂ フラグメント、ならびに F a b 発現ライブラリーが含まれるが、これらに限定されない。特異的な実施形態においては、ヒト B A F F - R タンパク質に対する抗体が開示される。当該分野で公知の種々の手順が、図 2 D（配列番号 5）の B A F F - R タンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生に使用され得る。これらのタンパク質のいくつかは、以下で議論される。

【0111】

ポリクローナル抗体の産生のためには、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物）が、天然のタンパク質、またはその合成改変体、または上記の誘導体の注射によって免疫され得る。適切な免疫原性調製物には、例えば、組換え発現された B A F F - R タンパク質、または化学的に合成された B A F F - R ポリペプチドが含まれ得る。調製物はさらに、アジュバントを含み得る。免疫学的応答を増大させるために使用される種々のアジュバントとして、以下が挙げられるがこれらに限定されない：フロイトの（完全なおよび不完全な）アジュバント、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性剤（例えば、リソレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノールなど）、ヒトアジュバント（例えば、カルメット - ゲラン桿菌（B C G）および *C o r y n e b a c t e r i u m p a r v u m*）、または同様の免疫賦活剤。所望される場合には、B A F F - R に対して指向された抗体分子が哺乳動物から（例えば、血液から）単離され得、そしてさらに、I g G 画分を得るためのプロテイン A クロマトグラフィーのような、周知の技術によって精製され得る。

【0112】

用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、本明細書中で使用される場合には、B A F F - R の特定のエピトープと免疫反応することが可能な抗原結合部位の 1 つの種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、モノクローナル抗体組成物は、典型的には、特定の B A F F - R タンパク質に対する単一の結合親和性を示し、免疫反応する。特定の B A F F - R タンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログに対して指向されたモノクローナル抗体の調製のためには、連続的な細胞株の培養によって抗体分子の産生を提供する任意の技術が利用され得る。このような技術には、ハイブリドーマ技術（K o h l e r および M i l s t e i n (1 9 7 5) N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 を参照のこと）；トリオーマ技術；ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術（K o z b o r ら (1 9 8 3) I m m u n o l . T o d a y 4 : 7 2 を参照のこと）、およびヒトモノクローナル抗体を産生するための E B V ハ

イブリドーマ技術 (Coleら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liss, Inc., 1985、77-96頁を参照のこと) が含まれるが、これらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施において利用され得、そしてヒトハイブリドーマを使用することによって (Coteら (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030) またはエプスタインバーウイルスを用いてインビトロでヒトB細胞を形質転換することによって (Coleら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liss, Inc., 1985、77-96頁を参照のこと) 産生され得る。

10

【0113】

本発明に従って、技術は、BAFF-Rタンパク質に特異的な単鎖抗体の産生に適合させられ得る (例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、方法は、BAFF-Rタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログについて所望される特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速でありそして効率的な同定を可能にするための、Fab発現ライブラリーの構築 (例えば、Huseら (1989) Science 246:1275-1281を参照のこと) に適合させられ得る。ヒト以外の抗体は、当該分野で周知の技術によって「ヒト化」され得る。例えば、米国特許第5,225,539号を参照のこと。BAFF-Rタンパク質に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントが、以下を含むがこれに限定されない当該分野で公知の技術によって産生され得る: (i) 抗体分子のペプシン消化によって産生されたF(ab')₂フラグメント; (ii) F(ab')₂フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって作成されたFabフラグメント; (iii) パパインおよび還元剤での抗体分子の処理によって作成されたFabフラグメント; ならびに (iv) Fvフラグメント。

20

【0114】

さらに、標準的な組換えDNA技術を使用して作成され得る、ヒトおよびヒト以外の部分の両方を含む組換え抗BAFF-R抗体 (例えば、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体) は、本発明の範囲内である。このようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術によって、例えば、以下に記載されている方法を使用して、産生され得る: PCT国際出願番号第PCT/US86/02269号; 欧州特許出願番号第184,187号; 欧州特許出願番号第171,496号; 欧州特許出願番号第173,494号; PCT国際公開番号第WO86/01533号; 米国特許第4,816,567号; 欧州特許出願番号第125,023号; Betterら (1988) Science 240:1041-1043; Liuら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liuら (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sunら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimuraら (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Woodら、(1985) Nature 314:446-449; Shawら (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oiら (1986) BioTechniques 4:214; 米国特許第5,225,539号; Jonesら (1986) Nature 321:552-555; Verhoevenら (1988) Science 239:1534; および Beidlerら (1988) J. Immunol. 141:4053-4060。

30

40

【0115】

50

1つの実施形態において、所望される特異性を有している抗体のスクリーニングのための方法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）および当該分野で公知の他の免疫学的に媒介される技術が含まれるが、これらに限定されない。特異的な実施形態においては、B A F F - Rタンパク質の特定のドメインに特異的な抗体の選択は、このようなドメインを保有しているB A F F - Rファミリーのタンパク質のフラグメントに結合するハイブリドーマの作成によって容易になる。B A F F - Rタンパク質中の1つ以上のドメイン（例えば、B A F F - Rタンパク質、その誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログの上記で同定された保存されている領域にまたがるドメイン）に特異的な抗体もまた、本明細書中で提供される。

10

【0116】

抗B A F F - R抗体は、B A F F - Rタンパク質の局在化および/または定量（例えば、適切な生理学的サンプル中のB A F F - Rタンパク質のレベルの測定における使用のため。診断方法における使用のため、タンパク質の画像化における使用のためなど）に関係している当該分野で公知の方法において使用され得る。所定の実施形態においては、抗体由来の結合ドメインを含む、B A F F - Rタンパク質、その誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログについての抗体は、薬理的に活性な化合物（本明細書中以後、「治療薬」として利用される。

20

【0117】

抗B A F F - R抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準的な技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降）によって、B A F F - Rを単離するために使用され得る。抗B A F F - R抗体は、細胞由来の天然のB A F F - R、および宿主細胞中で発現された組換え産生されたB A F F - Rの精製を容易にすることができる。さらに、抗B A F F - R抗体は、B A F F - Rタンパク質の発現量およびパターンを評価するために、（例えば、細胞溶解物または細胞上清中の）B A F F - Rタンパク質を検出するために使用され得る。抗B A F F - R抗体は、例えば、所定の所持レジメの効率を決定するために、臨床試験手順の一部として組織中のタンパク質レベルをモニターするために診断的に使用され得る。検出は、検出可能な基質への抗体のカップリング（すなわち、物理的な連結）によって容易にされ得る。検出可能な基質の例には、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、および放射活性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる；適切な補欠分子団複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチン、およびアビジン/ビオチンが含まれる；適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフィコエリスリンが含まれる；発光物質の例には、ルミノールが含まれる；生体発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる；そして、適切な放射活性物質の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が含まれる。

30

40

【0118】

（B A F F - R組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、B A F F - Rタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする核酸を含有しているベクター（好ましくは、発現ベクター）に関する。本明細書中で使用される場合には、用語「ベクター」は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子をいう。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントがその中に連結され得る環状の2本鎖のDNAループをいう。ベクターの別の型はウイルスベクターであり、ここでは、さらなるDNAセグメント

50

がウイルスゲノム中に連結され得る。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自律複製し得る（例えば、細菌の複製起点を有している細菌ベクター、およびエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」と呼ばれる。一般には、組換えDNA技術において有用である発現ベクターは、たいてい、プラスミドの形態である。本明細書中では、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるので、互換的に使用され得る。しかし、本発明は、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）のような同等の機能を示す発現ベクターのこのような他の形態を含むように意図される。

10

【0119】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中の核酸の発現に適切な形態で、本発明の核酸を含む。これは、組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択される1つ以上の調節配列（これは、発現される核酸配列に作動可能に連結される）を含むことを意味する。組換え発現ベクター中で「作動可能に連結される」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現（例えば、インビトロの転写/翻訳システム中で、またはベクターが宿主細胞に導入される場合には宿主細胞中で）を可能にする様式で調節配列に連結されることを意味するように意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むように意図される。このような調節配列は、例えば、Goeddel「Gene Expression Technology」METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press, San Diego, Calif., 1990に記載されている。調節配列には、多くの型の宿主細胞中でヌクレオチド配列の構成的な発現を指向するもの、および特定の宿主細胞中でのみヌクレオチド配列の発現を指向するもの（例えば、組織特異的調節配列）が含まれる。発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現レベルなどの因子に依存し得ることが、当業者に明らかである。本発明の発現ベクターは、宿主細胞中に導入され得、それによって、本明細書中に記載されているような核酸によってコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質またはペプチドを含む）（例えば、BAFF-Rタンパク質、BAFF-Rの変異体タンパク質、融合タンパク質など）を産生する。

20

30

【0120】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞中でのBAFF-Rの発現のために設計され得る。例えば、BAFF-Rは、Escherichia coliのような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用する）、酵母細胞、または哺乳動物細胞中で発現され得る。適切な宿主細胞はさらに、Goeddel「Gene Expression Technology」METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press, San Diego, Calif., 1990において議論されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写されそして翻訳され得る。

40

【0121】

原核生物中でのタンパク質の発現は、最も頻繁には、E. coli中で、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する、構成性または誘導性プロモーターを含有しているベクターを用いて、行われる。融合ベクター

50

は、その中のコードされるタンパク質に対して（通常は、組換えタンパク質のアミノ末端に対して）多数のアミノ酸を付加させる。このような融合ベクターは、典型的には、3個の目的を提供する：（1）組換えタンパク質の発現を増大させること；（2）組換えタンパク質の可溶性を増大させること；および（3）親和性精製においてリガンドとして作用することによって、組換えタンパク質の精製を補助すること。融合発現ベクターにおいては、たいてい、融合部分から組換えタンパク質の分離、続く融合タンパク質の精製を可能にするために、タンパク質分解切断部位が、融合部分と組換えタンパク質の連結部に導入される。このような酵素、およびそれらの同性質の認識配列には、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼが含まれる。典型的な融合発現ベクターには、pGEX（Pharmacia Biotech Inc；SmithおよびJohnson（1988）Gene 67：31-40）、pMAL（New England Biolabs、Beverly, Mass）、およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, N.J.）が含まれる。これらはそれぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを標的組換えタンパク質に融合する。

10

【0122】

適切な誘導性の非融合E.coli発現ベクターの例には、pTrc（Amrannら（1988）Gene 69：301-315）およびpET 11d（Studierら、「Gene Expression Technology」METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press, San Diego, Calif., 1990、60-89頁）が含まれる。

20

【0123】

E.coli中での組換えタンパク質の発現を最大にするための1つの方法論は、組換えタンパク質をタンパク質溶解によって切断する能力を損傷している宿主細菌中でタンパク質を発現させることである。Gottesman、「Gene Expression Technology」METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press, San Diego, Calif., 1990、119-128頁を参照のこと。別の方法論は、それぞれのアミノ酸についての個々のコドンが、E.coli中で優先的に利用されるものになるように、発現ベクター中に挿入される核酸の核酸配列を変更することである（Wadaら、（1992）、Nucleic Acid Res. 20：2111-2118）。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なDNA合成技術によって行うことができる。

30

【0124】

別の実施形態においては、BAFF-R発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母（例えば、Saccharomyces cerevisiae）中での発現のためのベクターの例には、pYepSec1（Baldariら、（1987）EMBO J. 6：229-234）、pMFa（KurjanおよびHerskowitz（1982）Cell 30：933-943）、pJRY88（Schultzら（1987）Gene 54：113-123）、pYES2（Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.）が含まれ、そしてP.pastorisについては、pPICファミリーのベクター（Invitrogen, Corp, San Diego, Calif.）が含まれる。

40

【0125】

あるいは、BAFF-Rは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して昆虫細胞中で発現され得る。培養された昆虫細胞（例えば、SF9細胞）中でのタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ

50

(Smithら(1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165) および pVL シリーズ (Lucklow および Summers (1989) Virology 170:31-39) が含まれる。

【0126】

なお別の実施形態においては、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8 (Seed (1987) Nature 329:840-842) および pMT2PC (Kaufmanら(1987) EMBO J. 6:187-195) が含まれる。哺乳動物細胞中で使用される場合には、発現ベクターの制御機能は、たいいてい、ウイルス調節エレメントによって提供される。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方に適切な他の発現システムについては、例えば、Sambrookら編、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、第16章および第17章、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y., 1989を参照のこと。

10

【0127】

別の実施形態においては、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指向し得る(例えば、組織特異的調節エレメントが、核酸を発現させるために使用される)。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの限定的ではない例には、以下が含まれる: アルブミンプロモーター(肝臓特異的; Pinkertら(1987) Genes Dev. 1:268-277)、リンパ球系特異的プロモーター(Calame および Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275)、T細胞レセプターの特定のプロモーター(Winoto および Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733)、および免疫グロブリン(Banerjiら(1983) Cell 33:729-740; Wueen および Baltimore (1983) Cell 33:741-748)、ニューロン特異的プロモーター(例えば、神経繊維プロモーター; Byrne および Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477)、膵臓特異的プロモーター(Edlundら(1985) Science 230:912-916)、および乳腺特異的プロモーター(例えば、乳清プロモーター; 米国特許第4,873,316号、および欧州特許出願公開番号第264,166号)。発達によって調節されるプロモーター(例えば、マウス hox プロモーター(Kessel および Gruss (1990) Science 249:374-379) および α -フェトプロテインプロモーター(Campes および Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546)) もまた、含まれる。

20

30

40

【0128】

本発明は、さらに、アンチセンス方向で発現ベクター中にクローン化された本発明のDNA分子を含有している、組換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、BAFF-R mRNA に対してアンチセンスであるRNA分子の発現(DNA分子の転写による)を可能にする様式で、調節配列に対して作動可能に連結される。種々の細胞型中でのアンチセンスRNA分子の持続的な発現を指向する、アンチセンス方向でクローン化された核酸に対して作動可能に連結された調節配列(例えば、ウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサー)が選択され得るか、あるいは、アンチセンスRNAの構成的、組織特異的、または細胞型特異的発現を指向する調節配列が、選択され得る。アンチセンス発現ベ

50

クターは、組換えプラスミド、ファージミド、またはアンチセンス核酸が高効率の調節領域の制御下で産生される弱毒化ウイルスの形態であり得る。その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、Weintraubら(1986)「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」、Review - Trends in Genetics, 1(1)を参照のこと。

【0129】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入されている宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中では互換的に使用される。このような用語が、特定の被検細胞のみをいうのではなく、このような細胞の子孫または可能性のある子孫をもまたいうことが理解される。特定の改変は、変異または環境のいずれかの影響に起因して良好な発生を生じ得るので、このような子孫が、実際には、親細胞と同一ではない場合があるが、なお本明細書中で使用される場合には、この用語の範囲内に含まれる。

10

【0130】

宿主細胞は、原核生物細胞または真核生物細胞のいずれかであり得る。例えば、BAFF-Rタンパク質は、E. coli、昆虫細胞、酵母、または哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)またはCOS細胞)中で発現させられ得る。他の適切な宿主細胞が、当業者に公知である。

20

【0131】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を通じて、原核生物細胞または真核生物細胞中に導入され得る。本明細書中で使用される場合には、「形質転換」および「トランスフェクション」は、宿主細胞中に外来核酸(例えば、DNA)を導入するための種々の当該分野で認識されている技術をいうように意図される。これには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするために適切な方法は、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y., 1989、および他の研究室用マニュアルに見ることができる。

30

【0132】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションのためには、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞の小さい画分のみが、それらのゲノム中に外来DNAを組み込む場合がある。これらの組み込み体を同定しそして選択するために、選択マーカー(例えば、抗生物質耐性)をコードする遺伝子が、一般的には、目的の遺伝子とともに宿主細胞中に導入される。種々の選択マーカーには、薬物(例えば、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキセート)に対する耐性を付与するマーカーが含まれる。選択マーカーをコードする核酸が、BAFF-Rをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞中に導入され得るか、または別のベクター上で導入され得る。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定され得る(例えば、選択マーカーを取り込んだ細胞は生存しているが、他の細胞は死滅する)。

40

【0133】

本発明の宿主細胞(例えば、培養物中の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞)は、BAFF-Rタンパク質を産生(すなわち、発現)するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用してBAFF-Rタ

50

ンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態においては、この方法は、本発明の宿主細胞（B A F F - Rをコードする組換え発現ベクターがその中に導入されている）を適切な培地中で培養する工程を包含する。その結果、B A F F - Rタンパク質が産生される。別の実施形態においては、この方法は、培地または宿主細胞からB A F F - Rを単離する工程をさらに包含する。

【0134】

（トランスジェニック動物）

本発明の宿主細胞は、ヒト以外のトランスジェニック動物を産生するためにもまた使用され得る。例えば、1つの実施形態においては、本発明の宿主細胞は、その中にB A F F - Rをコードする配列が導入されている受精可能な卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような細胞は、外因性のB A F F - R配列がそれらのゲノム中に導入されているヒト以外のトランスジェニック動物、または内因性のB A F F - R配列が変更させられている相同組換え動物を作成するために、使用され得る。このような動物は、B A F F - Rの機能および/または活性を研究するため、ならびに、B A F F - R活性の調節因子を同定および/または評価するために、有用である。本明細書中で使用される場合には、「トランスジェニック動物」は、ヒト以外の動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラット、マウスのようなげっ歯類である。ここでは、1つ以上の動物細胞が導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、ヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが含まれる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物がそれから発生する細胞のゲノム中に組み込まれ、そして成熟した動物のゲノム中に留まり、それによってトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織中でのコードされる遺伝子産物の発現を指向する、外因性のDNAである。本明細書中で使用される場合には、「相同組換え動物」は、ヒト以外の動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはマウスである。ここでは、内因性のB A F F - R遺伝子は、内因性遺伝子と、動物の発生の前に動物の細胞（例えば、動物の胚性細胞）中に導入された外因性のDNA分子との間での相同組換えによって変更されている。

【0135】

本発明のトランスジェニック動物は、B A F F - Rをコードする核酸を受精可能な卵母細胞の雄性前核に導入することによって（例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって）作成され得、そしてこれによって偽妊娠させた雌性育成動物中での卵母細胞を発育させる。図2A（配列番号3）、図2C（配列番号4）、および図3（配列番号6）のヒトB A F F - R DNA配列が、ヒト以外の動物のゲノム中に導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトB A F F - R遺伝子のヒト以外のホモログ（例えば、マウスのB A F F - R遺伝子（図4A）（配列番号8））が、ヒトB A F F - R cDNAに対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得（上記にさらに記載されている）、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた、導入遺伝子の発現効率を増大させるために導入遺伝子中に含まれ得る。組織特異的調節配列は、特定の細胞に対してB A F F - Rタンパク質の発現を指向させるために、B A F F - R導入遺伝子に対して作動可能に連結され得る。胚の操作およびマイクロインジェクションを通じてトランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を作成するための方法は、当該分野で通常となっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号；同第4,870,009号；および同第4,873,191号；ならびにHogan、MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986に記載されている。同様の方法が、他のトランスジェニック動物の産生のために使用される。トランスジェニックが確立された

10

20

30

40

50

(founder)動物が、動物の組織または細胞中でのそのゲノム中のBAFF-R導入遺伝子の存在および/またはBAFF-R mRNAの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニックが確立された動物は、導入遺伝子を保有しているさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、BAFF-Rをコードする導入遺伝子を保有しているトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を保有している他のトランスジェニック動物と交配させられ得る。

【0136】

相同組換え動物を作成するために、それによってBAFF-R遺伝子を変更する(例えば、機能を破壊する)ためにその中に欠失、付加、または置換が導入されているBAFF-R遺伝子の少なくとも一部を含むベクターが、調製される。BAFF-R遺伝子は、ヒト遺伝子(例えば、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、図3(配列番号6))であり得るが、より好ましくは、ヒトBAFF-R遺伝子のヒト以外のホモログである。例えば、図2A(配列番号3)、図2C(配列番号4)、図3(配列番号6)のヒトBAFF-R遺伝子のマウスホモログ(図4a)が、マウスのゲノム中の内因性のBAFF-R遺伝子を変更するために適切な相同組換えベクターを構築するために、使用され得る。1つの実施形態においては、ベクターは、相同組換えの際に、内因性のBAFF-R遺伝子が機能的に破壊される(すなわち、もはや機能的なタンパク質はコードしない;「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる)ように、設計される。

10

20

【0137】

あるいは、ベクターは、相同組換えの際に、内因性のBAFF-R遺伝子が変わりさせられるか、または他の方法で変更されるが、なお機能的タンパク質をコードするように、設計され得る(例えば、上流の調節領域が、それによって内因性のBAFF-Rタンパク質の発現を変更するように変更させられ得る)。相同組換えベクターにおいては、BAFF-R遺伝子の変更させられた部分は、ベクターによって保有される外因性のBAFF-R遺伝子と胚性幹細胞中の内因性のBAFF-R遺伝子との間で相同組換えが生じるように、BAFF-R遺伝子のさらなる核酸によってその5'および3'末端に隣接している。さらなる隣接しているBAFF-R核酸は、内因性の遺伝子との良好な相同組換えのために十分な長さである。典型的には、数千塩基の隣接しているDNA(5'および3'末端の両方)がベクター中に含まれる。相同組換えベクターの記載については、例えば、Thomasら(1987)Cell 51:503を参照のこと。ベクターは、胚性幹細胞株中に(例えば、エレクトロポレーションによって)導入され、そして導入されたBAFF-R遺伝子が内因性のBAFF-R遺伝子と相同組換えされた細胞が選択される(例えば、Liら(1992)Cell 69:915を参照のこと)。

30

【0138】

次いで、選択された細胞は、キメラの凝集を形成するように動物(例えば、マウス)の芽細胞に注入される。例えば、Bradley、TERATO CARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH、Robertson編、IRL、Oxford, 1987、133-152頁を参照のこと。キメラ胚は、次いで、適切な偽妊娠させた雌性育成動物中に移植され、そして胚はそれに従わされる。相同組換えされたDNAをそれらの生殖細胞中に保有している子孫は、動物の全ての細胞が導入遺伝子の生殖系伝達(germline transmission)によって相同組換えされたDNAを含む動物を繁殖させるために、使用され得る。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法は、さらに、Bradley(1991)Curr. Opin. Biotechnol. 2:823-829; PCT国際公開番号第WO90/11354号; 同第WO91

40

50

/ 0 1 1 4 0 号 ; 第 W O 9 2 / 0 9 6 8 号 ; および第 W O 9 3 / 0 4 1 6 9 号 に記載されている。

【 0 1 3 9 】

別の実施形態においては、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択されたシステムを含むトランスジェニックのヒト以外の動物が、産生され得る。このようなシステムの1つの例は、バクテリオファージ P 1 の *cre / loxP* リコンビナーゼシステムである。*cre / loxP* リコンビナーゼシステムの記載については、例えば、Lakso ら (1 9 9 2) *Proc . Natl . Acad . Sci . USA* 8 9 : 6 2 3 2 - 6 2 3 6 を参照のこと。リコンビナーゼシステムの別の例は、S . cerevisiae の *FLP* リコンビナーゼシステム (O ' Gorman ら (1 9 9 1) *Science* 2 5 1 : 1 3 5 1 - 1 3 5 5) である。*cre / loxP* リコンビナーゼシステムが導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合には、*Cre* リコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が、必要である。このような動物は、「二重」トランスジェニック動物の構築を通じて、例えば、2 つのトランスジェニック動物 (一方は選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を含むし、そして他方はリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含む) を交配させることによって提供され得る。

10

【 0 1 4 0 】

本明細書中に記載されているヒト以外のトランスジェニック動物のクローンもまた、Wilmut ら (1 9 9 7) *Nature* 3 8 5 : 8 1 0 - 8 1 3 に記載されている方法に従って産生され得る。簡潔には、トランスジェニック動物に由来する細胞 (例えば、体細胞) が単離され得、そして増殖周期を脱出し、そして G₀ 期に入るように誘導される。次いで、静止状態の細胞は、例えば、電気的パルスの使用を通じて、休止期の細胞が単離された同じ種の動物に由来する核を取り除かれた (*enucleated*) 卵母細胞に対して融合され得る。次いで、再構築された卵母細胞は、それが桑実胚または芽細胞を生じるように培養され、次いで偽妊娠させた雌性の育成動物に移される。この雌性の育成動物の誕生した子孫は、細胞 (例えば、体細胞) が単離された動物のクローンである。

20

【 0 1 4 1 】

(薬学的組成物)

本発明の *B A F F - R* 核酸分子、*B A F F - R* タンパク質、および抗 *B A F F - R* 抗体 (本明細書中では「活性化化合物」とも呼ばれる)、およびそれらの誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログは、投与に適切な薬学的組成物中に取り込まれ得る。このような組成物は、典型的には、核酸分子、タンパク質、または抗体、および薬学的に需要可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合には、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与に適合する、溶媒、分散媒体、コーティング、抗生物質、抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などのいずれかまたは全てを含むように意図される。適切なキャリアは、Remington's *Pharmaceutical Sciences* の最新版、当該分野での標準的な参照テキストに記載されている。これらは本明細書中で参考として援用されている。このようなキャリアまたは希釈剤の好ましい例には、水、生理食塩水、リンガー (*finger's*) 溶液、デキストロース溶液、および 5 % のヒト血清アルブミンが含まれるが、これらに限定されない。リポソーム、および不揮発性油のような非水性のビヒクルもまた、使用され得る。薬学的に活性な物質についてのこのような媒体および試薬の使用は、当該分野で周知である。任意の従来媒体または試薬が活性な化合物と非適合性である場合を除いて、組成物中でのそれらの使用が企図される。追加の活性な化合物もまた、組成物中に取り込まれ得る。

30

40

【 0 1 4 2 】

50

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合するように処方される。投与経路の例には、非経口的（例えば、静脈内、経皮、皮内）、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与が含まれる。非経口、皮内、または皮下での適用に使用される溶液または坐剤には、以下の成分を含むことができる：滅菌の希釈液（例えば、注射のための水）、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成の溶媒；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコール、またはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、または亜硫酸水素ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA））；緩衝剤（例えば、酢酸、クエン酸、またはリン酸）；および弾力性の調節のための試薬（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）で調節され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨ての注射器、またはガラスもしくはプラスチック製の多量のバイアル中に閉じられ得る。

10

【0143】

注射可能な用途に適切な薬学的組成物は、滅菌の水溶液（水溶性である場合）または分散剤、および滅菌の注射可能な溶液もしくは分散剤の即座の調製のための滅菌の散剤を含む。静脈内投与については、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（BASF Parsippany, N. J.）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が含まれる。全ての場合において、組成物は滅菌でなければならず、そして容易に注射器の中に存在する程度に流動性であるべきである。これは、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、そして細菌および真菌のような微生物の混入作用から保護されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体のポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含有している溶媒、または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散の場合には必要とされる粒子の大きさの維持によって、そして界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の保護は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合には、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）、組成物中の塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能な組成物の遅延させられた吸収は、吸収を遅延させる試薬（例えば、一ステアリン酸アルミニウム、およびゼラチン）を組成物中に含むことによってもたらされ得る。

20

30

【0144】

滅菌の注射可能な溶液は、必要とされる場合には上記に列挙されている成分の1つまたはそれらの組合せとともに、適切な溶媒中に必要とされる量で活性な化合物（例えば、BAFF-Rタンパク質または抗BAFF-R抗体）を取り込むこと、続いて濾過滅菌することによって、調製され得る。一般的には、分散物は、塩基性の分散媒体および上記に列挙されているものから必要とされる他の成分を含有している滅菌のビヒクル中に、活性な化合物を取り込むことによって調製される。滅菌の注射可能な溶液の調製のための滅菌の粉末の場合においては、調製方法は、減圧乾燥および凍結乾燥である。これによって、事前に滅菌濾過されたその溶液から、有効成分の粉末、および任意のさらなる所望される成分を生じる。

40

【0145】

経口用組成物には、一般的には、不活性な希釈剤または食用のキャリアが含まれる。これらは、ゼラチンカプセル中に閉じられ得るか、または錠剤に圧縮され得る。経口による治療的投与の目的のためには、活性な化合物は賦形剤とともに

50

取り込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口用組成物はまた、歯磨き剤としての用途のために液体のキャリアを使用して調製され得る。ここでは、液体のキャリア中の化合物は、経口によって適用され、そして漱がれ、そして吐き出されるかまたは飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤および/またはアジュバント材料が、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分、または同様の性質の化合物のいずれかを含有することができる：結合剤（例えば、微結晶セルロース、トラガカントガム、またはゼラチン）；賦形剤（例えば、澱粉またはラクトース）；崩壊剤（例えば、アルギン酸、PrimoGel、またはトウモロコシ澱粉）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、またはSterotes）；滑走剤（glidant）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味料（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは、香料（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ香料）。

10

【0146】

吸入による投与については、化合物は、適切な噴射剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含有している加圧された容器またはディスペンサー、あるいは噴霧吸入器から、噴霧剤の形態で送達される。

【0147】

全身的な投与はまた、経粘膜または経皮的な手段により得る。経粘膜または経皮的な投与については、浸透されるバリアに適切な浸透剤が処方物中で使用される。このような浸透剤は、一般的に当該分野で公知であり、そして例えば、経粘膜的な投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜的な投与は、鼻腔スプレーまたは坐剤の使用によって達成され得る。経皮的な投与については、活性な化合物は、当該分野で一般的に公知であるように、軟膏、膏薬、ゲル剤、またはクリーム剤に処方される。

20

【0148】

化合物はまた、直腸送達のためには、坐剤の形態（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤を用いて）または保持浣腸剤の形態に調製され得る。

【0149】

1つの実施形態においては、活性な化合物は、移植およびマイクロカプセル化送達システムを含む、体による迅速な排除に対して化合物を防御するキャリアを用いて調製される（例えば、徐放処方物）。生体分解性の生体適合性ポリマー（例えば、エチレンビニル酢酸、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当業者に明らかである。材料はまた、Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手することが可能である。リボソーム懸濁物（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染させられた細胞に対して標的化させられたリボソームを含む）もまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されているように、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

30

40

【0150】

投与の容易さおよび投与量の均質性のために、投与量単位の形態で経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有利である。本明細書中で使用されるような投与量の単位形態は、処置される被験体についての単位投与量として適切な、物理的に個別の単位をいい；それぞれの単位は、必要とされる薬学的キャリアと組合せて、所望される効果を生じるように計算された活性な化合物の予め決定された量を含む。本発明の投与量の単位形態についての詳細は、活性な化合物の固有の特徴、および達成される特定の治療効果によって指図されそ

50

してそれに直接依存する。

【0151】

本発明の核酸分子は、ベクター中に挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、米国特許第5,703,055号に記載されているように、多数の経路のうちのいずれかによって被験体に送達され得る。従って、送達にはまた、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）、または定位注射（例えば、Chenら、(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3054-3057を参照のこと）が含まれる。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物には、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターが含まれ得るか、またはこれには、遺伝子送達ビヒクルがその中に包埋されているゆっくりと放出されるマトリックスが含まれ得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞（例えば、レトロウイルスベクター）から完全なまま産生され得る場合には、薬学的調製物は、遺伝子送達システムを生じる1つ以上の細胞を含み得る。

10

【0152】

薬学的組成物は、投与についての説明書とともに、容器、パッケージ、またはディスペンサー中に含まれ得る。

【0153】

（発明の用途および方法）

本明細書中で記載されている核酸分子、タンパク質、タンパク質ホモログ、および抗体は、以下の方法の1つ以上において使用され得る：（a）スクリーニングアッセイ；（b）検出アッセイ（例えば、染色体マッピング、組織分類、法医学生理学）；（c）予知用医薬品（*predictive medicine*）（例えば、診断アッセイ、予測アッセイ、臨床試験のモニタリング、および生薬遺伝学）；ならびに（d）処置方法（例えば、治療的および予防的）。本明細書中に記載されているように、1つの実施形態においては、本発明のBAFF-Rタンパク質はBAFFに結合する能力を有する。

20

【0154】

本発明の単離された核酸分子は、BAFF-Rタンパク質を発現するために（例えば、遺伝子治療適用において宿主細胞中の組換え発現ベクターを通じて）、BAFF-R mRNAを検出する（例えば、生物学的サンプル中で）かまたはBAFF-R遺伝子中の遺伝子の損傷を検出するために、および以下にさらに記載されるように、BAFFおよび/またはBAFF-R活性を調節するために、使用され得る。さらに、BAFF-Rタンパク質は、BAFF-R活性またはその発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングするために、ならびに、不十分なもしくは過剰なBAFFおよび/もしくはBAFF-Rタンパク質の産生によって、またはBAFF-Rの野生型タンパク質と比較して減少した活性もしくは異常な活性を有するBAFF-Rタンパク質の形態の産生によって特徴付けられる障害を処置するために、使用され得る。さらに、本発明の抗BAFF-R抗体が、BAFF-Rタンパク質を検出しそして単離するために、ならびに、BAFFおよび/またはBAFF-R活性を調節するために、使用され得る。

30

40

【0155】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定された新規の試薬、および本明細書中に記載されているような処置のためのその用途に関する。

【0156】

（スクリーニングアッセイ）

本発明は、BAFF-Rタンパク質に結合するか、または例えば、BAFF-Rの発現もしくはBAFF-Rの活性に対して刺激的作用または阻害的作用を有する調節因子（すなわち、候補、または試験化合物、または試薬（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子、もしくは他の薬物））を同定するための方法

50

(本明細書中では「スクリーニングアッセイ」とも呼ばれる)を提供する。

【0157】

1つの実施形態においては、本発明は、BAFF-Rタンパク質もしくはペプチド、またはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはその活性を調節する、候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、以下を含む当該分野で公知の組合せライブラリー方法において、多数のアプローチのいずれかを使用して得ることができる：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相または液相ライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー方法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、他の4個のアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の低分子ライブラリーに適用することができる(Lam(1997)、Anticancer Drug Des. 12:145-167)。

10

【0158】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、例えば、以下において、当該分野で見出され得る：DeWittら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909-6013；Erbら(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426；Zuckermannら(1994)J. Med. Chem. 37:2678-2685；Chorら(1993)Science 261:1303；Carrellら(1994)Angew Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059；Carrellら(1994)Angew Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061；およびGallopら(1994)J. Med. Chem. 37:1233-1251。

20

【0159】

化合物のライブラリーは、溶液中で(例えば、Houghten(1992)Biotechniques 13:412-421)、またはビーズ上で(Lam(1991)Nature 354:82-84)、チップ上で(Fodor(1993)Nature 364:555-556)、細菌上で(Ladner、米国特許第5,223,409号)、胞子上で(Ladner、米国特許第5,223,409号)、プラスミド上で(Cullら(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869)、またはファージ上で(ScottおよびSmith(1990)Science 249:386-390；Devlin(1990)Science 249:404-406；Cwirllaら(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382；Felicci(1991)J. Mol. Biol. 222:301-310；Ladner、米国特許第5,223,409号)、調製され得る。

30

【0160】

1つの実施形態においては、アッセイは、BAFF-Rタンパク質の膜に結合した形態またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞が、試験化合物と接触させられ、そしてBAFF-Rタンパク質に結合する試験化合物の能力が決定される、細胞に基づくアッセイである。例えば、細胞は、哺乳動物起源であり得るかまたは酵母細胞であり得る。BAFF-Rタンパク質に結合する試験化合物の能力の決定は、例えば、試験化合物を放射性同位元素または酵素標識とカップリングさせることによって達成され得る。その結果、BAFF-Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分への試験化合物の結合は、複合体中の標識された化合物を検出することによって決定され得る。例えば、試験化合物は、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³Hで、直接または間接的のいずれかで標

40

50

識され得、そして放射性同位元素は、放射線の放出を直接計数することによって、またはシンチレーションカウンティングによって検出される。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素標識され得、そして酵素標識は、適切な基質の生成物への転換の決定によって検出される。1つの実施形態においては、アッセイは、細胞表面上にB A F F - Rタンパク質の膜に結合した形態またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を、B A F F - Rに結合してアッセイ混合物を形成することが既知である化合物と接触させること、アッセイ混合物を試験化合物と接触させること、およびB A F F - Rタンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定することを包含する。ここでは、B A F F - Rタンパク質と相互作用する試験化合物の能力の決定は、既知の化合物と比較して、B A F F - Rまたはその生物学的に活性な部分に対して優先的に結合する試験化合物の能力を決定することを含む。

10

【0161】

別の実施形態においては、アッセイは、細胞に基づくアッセイである。これは、細胞表面上にB A F F - Rタンパク質の膜に結合した形態またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を試験化合物と接触させること、そしてB A F F - Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する（例えば、刺激するかまたは阻害する）試験化合物の能力を決定することを包含する。B A F F - Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する試験化合物の能力の決定は、例えば、B A F F - Rの標的分子に結合するかまたはそれと相互作用するB A F F - Rタンパク質の能力を決定することによって達成され得る。本明細書中で使用される場合には、「標的分子」は、B A F F - Rタンパク質が自然な状態で結合するかまたは相互作用する分子であり、例えば、B A F F - Rタンパク質を発現する細胞の表面上の分子、第2の細胞の表面上の分子、細胞外環境にある分子、細胞膜の内表面に会合している分子、または細胞質分子である。B A F F - Rの標的分子は、B A F F - R以外の分子、本発明のB A F F - Rタンパク質、またはポリペプチドであり得る。1つの実施形態においては、B A F F - Rの標的分子は、細胞膜を通じる細胞内への細胞外シグナル（例えば、膜に結合したB A F F - R分子への化合物の結合によって生成されるシグナル）の伝達を促進する、シグナル伝達経路の成分である。標的は、例えば、触媒活性を有する第2の細胞内タンパク質、または下流のシグナル伝達分子とB A F F - Rとの会合を促進するタンパク質であり得る。

20

30

【0162】

B A F F - Rの標的分子に結合するかまたはそれと相互作用するB A F F - Rタンパク質の能力の決定は、直接的な結合の決定のための上記の方法の1つによって達成され得る。1つの実施形態においては、B A F F - Rの標的分子に結合するかまたはそれと相互作用するB A F F - Rタンパク質の能力の決定は、標的分子の活性の決定によって達成され得る。例えば、標的分子の活性は、標的の細胞性セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、IP3など）の誘導の検出、適切な基質である標的の触媒/酵素活性の検出、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動可能に連結されたB A F F - R応答性調節エレメントを含有している）の誘導の検出、あるいは、細胞応答（例えば、細胞の生存性、細胞の分化、または細胞増殖）の検出によって決定され得る。

40

【0163】

なお別の実施形態においては、本発明のアッセイは細胞を含まないアッセイである。これは、B A F F - Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させること、そしてB A F F - Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する試験化合物の能力を決定することを含む。B A F F - Rタ

50

ンパク質に対する試験化合物の結合は、上記のように直接または間接的のいずれかで決定され得る。1つの実施形態においては、アッセイは、B A F F - Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、B A F F - Rに結合してアッセイ混合物を形成することが既知である化合物と接触させること、アッセイ混合物を試験化合物と接触させること、およびB A F F - Rタンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定することを含む。ここでは、B A F F - Rタンパク質と相互作用する試験化合物の能力は、既知の化合物と比較して、B A F F - Rまたはその生物学的に活性な部分に対して優先的に結合する試験化合物の能力を決定することを含む。

【0164】

別の実施形態においては、アッセイは、細胞を含まないアッセイである。これは、B A F F - Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させること、そしてB A F F - Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する（例えば、刺激するかまたは阻害する）試験化合物の能力を決定することを含む。B A F F - Rの活性を調節する試験化合物の能力の決定は、例えば、直接的な結合の決定のための上記の方法の1つによって、B A F F - Rの標的分子に結合するB A F F - Rタンパク質の能力を決定することによって達成され得る。別の実施形態においては、B A F F - Rの活性を調節する試験化合物の能力の決定は、B A F F - Rの標的分子をさらに調節するB A F F - Rタンパク質の能力を決定することによって達成され得る。例えば、適切な基質に対する標的分子の触媒/酵素活性が、先に記載されているように決定され得る。

【0165】

なお別の実施形態においては、細胞を含まないアッセイは、B A F F - Rタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、B A F F - Rに結合してアッセイ混合物を形成することが既知である化合物と接触させること、アッセイ混合物を試験化合物と接触させること、およびB A F F - Rタンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定することを含む。ここでは、B A F F - Rタンパク質と相互作用する試験化合物の能力の決定は、B A F F - Rの標的分子に対して優先的に結合するかまたはその活性を調節する、B A F F - Rタンパク質の能力を決定することを含む。

【0166】

本発明の細胞を含まないアッセイは、B A F F - Rの可溶性形態または膜に結合した形態の両方の使用に敏感に反応する。B A F F - Rの膜に結合した形態を含有している細胞を含まないアッセイの場合においては、B A F F - Rの膜に結合した形態が溶液中で維持される可溶化剤を利用することが所望され得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤（例えば、n - オクチルグルコシド、n - ドデシルグルコシド、n - ドデシルマルトシド、オクタノイル - N - メチルグルカミド、デカノイル - N - メチルグルカミド、T r i t o n（登録商標）X - 100、T r i t o n（登録商標）X - 114、T h e s i t（登録商標）、イソトリデシポリ（エチレングリコールエーテル）_n、3 - （3 - コラミドプロピル）ジメチルアンミニオール - 1 - プロパンスルホネート（CHAPS）、3 - （3 - コラミドプロピル）ジメチルアンミニオール - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホン酸（CHAPSO）、またはN - ドデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホン酸）が含まれる。

【0167】

本発明の上記のアッセイ方法の1つ以上の実施形態においては、タンパク質の1つまたは両方の複合体化されていない形態からの複合体の分離を容易にするために、ならびにアッセイを自動化に順応させるために、B A F F - Rまたはその標的分子のいずれかを固定することが、所望され得る。B A F F - Rに対する試験化合物の結合、またはB A F F - Rと標的分子との、候補の化合物の存在下も

10

20

30

40

50

しくは非存在下での相互作用は、反応物の含有に適切な任意の容器中で達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験チューブ、および微量遠心分離用チューブが含まれる。1つの実施形態においては、タンパク質の1つまたは両方がマトリックスに結合させられるドメインが付加されている融合タンパク質が、提供され得る。例えば、GST-BAFF-R融合タンパク質、またはGST-標的融合タンパク質が、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオンで導出した(derivatized)マイクロタイタープレート上に吸着させられ得、次いで、試験化合物、または試験化合物および吸着されていない標的タンパク質もしくはBAFF-Rタンパク質のいずれかと混合され得る。そして混合物が、複合体の形成の助けとなる条件下でインキュベートされる(例えば、塩およびpHについて生理学的条件で)。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートのウェルは、全ての結合していない成分を除去するために洗浄され、マトリックスは、ビーズの場合には固定化され、複合体は、例えば、上記に記載されているように、直接または間接的のいずれかで決定される。あるいは、複合体は、マトリックスから解離させられ、そしてBAFF-Rの結合または活性のレベルが、標準的な技術を使用して決定される。

10

【0168】

マトリックス上のタンパク質を固定するための他の技術もまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、BAFF-Rまたはその標的分子のいずれかが、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合を利用して固定され得る。ビオチン化BAFF-Rまたは標的分子は、当該分野で周知の技術(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.)を使用してビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から調製され得、そしてストレプトアビジンでコーティングした96ウェルプレートのウェル(Pierce Chemical)中に固定される。あるいは、BAFF-Rまたは標的分子と反応するが、BAFF-Rタンパク質のその標的分子への結合は妨害しない抗体が、プレートのウェルから導出され得、そして結合していない標的またはBAFF-Rが抗体結合によってウェル中に捕捉される。このような複合体の検出のための方法は、GST-固定化複合体についての上記の記載に加えて、BAFF-Rまたは標的分子と反応する抗体を使用する複合体の免疫検出、ならびにBAFF-Rまたは標的分子に伴う酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイを含む。

20

30

【0169】

別の実施形態においては、BAFF-Rの発現の調節因子は、細胞が候補の化合物と接触させられ、そして細胞中でのBAFF-R mRNAまたはタンパク質の発現が検出される方法において同定される。候補の化合物の存在下での、BAFF-R mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、候補の化合物の非存在下での、BAFF-R mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較される。次いで、候補の化合物はこの比較に基づいて、BAFF-Rの発現の調節因子として同定され得る。例えば、BAFF-R mRNAまたはタンパク質の発現が、候補の化合物の存在下でその非存在下よりも大きい(統計学的に有意に大きい)場合には、候補の化合物は、BAFF-R mRNAまたはタンパク質の発現の刺激因子として同定される。あるいは、BAFF-R mRNAまたはタンパク質の発現が、候補の化合物の存在下でその非存在下よりも少ない(統計学的に有意に少ない)場合には、候補の化合物は、BAFF-R mRNAまたはタンパク質の発現の阻害因子として同定される。BAFF-R mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、BAFF-R mRNAまたはタンパク質を検出するための、本明細書中に記載されている方法によって決定され得る。

40

【0170】

50

本発明のなお別の局面においては、B A F F - Rタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ（例えば、米国特許第5,283,317号；Zervosら（1993）Cell 72:223-232；Maduraら（1993）J. Biol. Chem. 268:12046-12054；Bartelら（1993）Biotechniques 14:920-924；Iwabuchiら（1993）Oncogene 8:1693-1696；およびBrent 第WO94/10300号を参照のこと）において、B A F F - Rに結合するかまたはそれと相互作用する他のタンパク質（「B A F F - R結合タンパク質」または「B A F F - R - b p」）、およびB A F F - R活性を調節する他のタンパク質を同定するために、「ベイトタンパク質」として使用され得る。このようなB A F F - R結合タンパク質はまた、例えば、B A F F - R経路の上流または下流のエLEMENTとして、B A F F - Rタンパク質によるシグナルの増幅に関係しているようである。

10

20

30

40

50

【0171】

ツーハイブリッドシステムは、異なるDNA結合および活性化ドメインから構成される、ほとんどの転写因子の調節因子の性質に基づく。簡潔には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。1つの構築物中では、B A F F - Rをコードする遺伝子が、既知の転写因子（例えば、G A L - 4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物中では、同定されていないタンパク質（「獲物（prey）」または「サンプル」）をコードするDNA配列のライブラリーに由来するDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合させられる。「ベイト」および「獲物」タンパク質がインビボで相互作用することが可能である場合には、転写因子のDNA結合ドメインと活性化ドメインである、B A F F - R依存性の複合体の形成が、非常に近接して生じる。この近接によって、転写因子に応答性である転写調節部位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子（例えば、L a c Z）の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そして機能的な転写因子を含有している細胞コロニーが単離され得、そしてB A F F - Rと相互作用するタンパク質をコードするクローン化された遺伝子を得るために使用され得る。

【0172】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定された新規の試薬、および本明細書中に記載される処置のためのその用途に関する。

【0173】

（検出アッセイ）

本明細書中で同定されるcDNA配列の一部またはフラグメント（および対応している完全な遺伝子配列）は、ポリヌクレオチド試薬として多数の方法において使用され得る。例えば、これらの配列は、以下のために使用され得る：（i）それらのそれぞれの遺伝子を染色体上にマップし、それによって遺伝的疾患に関係している遺伝子領域の位置を決定するため；（ii）微小な生物学的サンプルから個体を同定するため（組織分類）；および（iii）生物学的サンプルの法医学的同定を補助するため。これらの適応は、以下の節で記載される。

【0174】

（染色体マッピング）

一旦、遺伝子の配列（または配列の一部）が単離されると、この配列は、染色体上の遺伝子の位置をマップするために使用され得る。このプロセスは、染色体マッピングと呼ばれる。従って、B A F F - Rの一部またはフラグメント、本明細書中に記載される配列は、それぞれ、B A F F - R遺伝子の位置を染色体上にマップするために使用され得る。染色体へのB A F F - R配列のマッピングは、これらの配列を疾患に関係している遺伝子と相関させることにおいて重要な最初の工程である。

【0175】

簡潔には、BAFF-R遺伝子は、BAFF-R配列からPCRプライマー（好ましくは、15～25bpの長さ）を調製することによって、染色体にマップされ得る。BAFF-R配列のコンピューター分析は、ゲノムDNA中の1つ以上のエキソンにはまたがらない（従って、増幅プロセスを複雑にはしない）プライマーを迅速に選択するために使用され得る。次いで、これらのプライマーは、所定の種の個々の染色体を含有している体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングに使用され得る。BAFF-R配列に対応している種特異的遺伝子を含有しているこのようなハイブリッドのみが、増幅されたフラグメントを生じる。

【0176】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に対して特定の配列を割り当てるための迅速な手順である。1日あたり3個以上の配列が、1つのサーマルサイクラーを使用して割り当てられ得る。オリゴヌクレオチドプライマーを設計するためにBAFF-R配列を使用すると、特異的な染色体に由来するフラグメントのパネルを用いて、仮の位置決め（sublocalization）が達成され得る。

【0177】

染色体分裂中期の染色体スプレッドに対するDNA配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）はさらに、1工程で正確な染色体位置を提供するために使用され得る。染色体スプレッドは、その分離が有糸分裂期の紡錘系を崩壊させる化学薬品様コロセミドによって、分裂中期でブロックされている細胞を使用して行われ得る。簡潔には、染色体はトリプシンで処理され得、次いでGiemsaで染色され得る。明るいバンドと暗いバンドのパターンが、それぞれの染色体について生じ、その結果、染色体は、個々に同定され得る。FISH技術が、500または600塩基程度の短いDNA配列とともに使用され得る。しかし、1000塩基より長いクローンが、単純な検出に十分なシグナル強度を有する固有の染色体位置への結合の高い可能性を有する。好ましくは、1000塩基、そしてより好ましくは、2000塩基が、合理的な時間で良好な結果を得るために十分である。この技術の概要については、Vermaら、HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES、Pergamon Press, N.Y., 1988を参照のこと。

【0178】

染色体マッピングのための試薬は、単一の染色体を、またはその染色体上の単一の部位を記録するために個別に使用され得る。または試薬のパネルが、複数の部位および/または複数の染色体を記録するために使用され得る。遺伝子の非コード領域に対応している試薬が、実際には、マッピングの目的に好ましい。コード配列は、おそらく、遺伝子ファミリー内でより保存されており、従って、染色体マッピングの間の交差ハイブリダイゼーションの選択が増大する。

【0179】

一旦、配列が正確な染色体位置に対してマップされると、染色体上の配列の物理的な位置が、遺伝子マップのデータと相関させられ得る。このようなデータは、例えば、McKusick、MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能である)に見られる。次いで、同じ染色体領域にマップされた遺伝子と疾患との関係が、例えば、Egelandら(1987)Nature、325:783-787に記載されている連関分析（物理的に隣接している遺伝子の共同遺伝）を通じて同定され得る。

【0180】

さらに、BAFF-R遺伝子に関係している疾患に罹患している個体と罹患し

10

20

30

40

50

ていない個体との間でのDNA配列の差異が、決定され得る。変異が罹患している個体の一部または全てにおいて観察されが、全ての罹患していない個体においては観察されない場合には、変異はおそらく、特定の疾患の原因因子である。罹患した個体と罹患していない個体との間での比較には、一般的には、染色体の構造変化（例えば、染色体スプレッドから見ることもできるかまたはそのDNA配列に基づいてPCRを使用して検出することができる、欠失または転移）を最初に観察することを含む。最終的には、いくつかの個体に由来する遺伝子の完全な配列決定が、変異の存在を確認するため、および多型による変異体を区別するために、行われ得る。

【0181】

10

（組織分類）

本発明のBAFF-R配列はまた、微小な生物学的サンプルから個体を同定するためにも使用され得る。この技術においては、個体のゲノムDNAが、1つ以上の制限酵素で消化され、そして同定のための固有のバンドを生じるようにサザンブロットでプローブされる。本発明の配列は、RFLP（米国特許第5,272,057号に記載されている、「制限断片長多型」）についてのさらなるDNAマーカーとして有用である。

【0182】

さらに、本発明の配列は、個体のゲノムの選択された部分のDNA配列を実際に1塩基ずつ（base-by-base）決定する、別の技術を提供するために使用され得る。このように、本明細書中に記載されているBAFF-R配列は、配列の5'および3'末端から2つのPCRプライマーを調製するために使用され得る。これらのプライマーは、次いで、個々のDNAを増幅し、続いてそれを配列決定するために使用され得る。

20

【0183】

この様式で調製された個体に由来する対応するDNA配列のパネルは、各々の個体が、対立遺伝子の差異に起因して、このようなDNA配列の固有のセットを有するので、固有の個体の同定を提供することができる。本発明の配列は、個体由来および組織由来の配列のこのような同定を得るために使用され得る。本発明のBAFF-R配列は、ヒトゲノムの一部を独自に示す。対立遺伝子のバリエーションは、これらの配列のコード領域においてある程度で生じ、そして非コード領域においてはより大きい程度で生じる。個々のヒトの間での対立遺伝子のバリエーションは、各500塩基あたり約1つの頻度で生じると概算される。はるかに多い対立遺伝子のバリエーションは、制限断片長多型（RFLP）を含む一塩基多型（SNP）に起因する。

30

【0184】

本明細書中に記載される配列のそれぞれは、ある程度で、同定目的のために比較され得る固体に由来するDNAに対して標準として使用され得る。より多数の多型が非コード領域中に生じるので、より少ない配列が個体を区別するために必要である。図1A（配列番号1）、図1B（配列番号2）、図2A（配列番号3）、図2B（配列番号4）、および図3（配列番号6）の非コード配列は、それぞれが100塩基の増幅された非コード配列を生じる、約10から1000個のプライマーのパネルを用いて、ポジティブな個体の同定を十分に提供することができる。推定されるコード配列（例えば、図1A（配列番号1）、図1B（配列番号2）、図2A（配列番号3）、図2B（配列番号4）、および図3（配列番号6）中のコード配列）が使用される場合は、ポジティブな個体の同定のためのより適切な数のプライマーは、500～2,000である。

40

【0185】

（予測用（predictive）医薬品）

本発明はまた、予測用医薬品の分野にも関する。ここでは、診断アッセイ、予

50

後アッセイ、生薬遺伝学、および臨床試験のモニタリングが、予後（予測）目的のために使用され、それによって個体を予防的に処置する。従って、本発明の1つの局面は、B A F F - Rタンパク質および/または核酸の発現、ならびにB A F F - R活性を、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞、組織）の状況下で決定し、それによって個体が疾患もしくは障害に罹患しているかどうか、または個体が異常なB A F F - Rの発現もしくは活性に関係している障害を発症する危険があるかどうかを決定するための診断アッセイに関する。本発明はまた、個体がB A F F - Rタンパク質、核酸の発現または活性に関係している障害を発症する危険があるかどうかを決定するための予後（または予測）アッセイを提供する。例えば、B A F F - R遺伝子の変異が生物学的サンプル中でアッセイされ得る。このようなアッセイは、それによってB A F F - Rタンパク質、核酸の発現または活性によって特徴付けられるかまたはそれに関係している障害の発症前に個体を予防的に処置するための、予後または予測目的のために、使用され得る。

10

【0186】

本発明の別の局面は、それによってその個体について適切な治療薬または予防薬（本明細書中では、「生薬遺伝学」と呼ばれる）を選択するための、個体におけるB A F F - Rタンパク質、核酸の発現、またはB A F F - Rの活性を決定するための方法を提供する。生薬遺伝学は、個体の遺伝子型に基づいて（例えば、特定の試薬に応答する個体の能力を決定するために試験される個体の遺伝子型）、個体の治療的または予防的処置のための試薬（例えば、薬物）の選択を可能にする。

20

【0187】

本発明のなお別の局面は、臨床試験においけるB A F F - Rの発現または活性に対する試薬（例えば、薬物、化合物）の影響のモニタリングに関する。

【0188】

これらおよび他の試薬が、以下の節でさらに詳細に記載される。

【0189】

（診断アッセイ）

生物学的サンプル中のB A F F - Rの存在または非存在の検出のための例示的な方法には、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、および生物学的サンプルを、B A F F - Rタンパク質またはB A F F - Rタンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出することができる化合物または試薬と接触させ、その結果、B A F F - Rの存在が生物学的サンプル中で検出される工程を包含する。B A F F - R mRNAまたはゲノムDNAの検出のための試薬は、B A F F - R mRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズすることが可能である標識された核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、全長のB A F F - R核酸（例えば、図1A（配列番号1）、図1B（配列番号2）、図2A（配列番号3）、図2B（配列番号4）、および図3（配列番号6）のいずれかの核酸、またはそれらの一部）であり、例えば、少なくとも15、30、50、100、250、または500ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドであり、そしてB A F F - R mRNAまたはゲノムDNAに対してストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズするために十分である。本発明の診断アッセイにおける使用に適切な他のプローブが、本明細書中に記載される。

30

40

【0190】

B A F F - Rタンパク質の検出のための試薬は、B A F F - Rタンパク質に結合することができる抗体、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体はポリクローナルであり得るか、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。完全な抗体またはそのフラグメント（例えば、FabもしくはF(ab')₂）が使用され得る。用語「標識された」は、プローブまたは抗体に関して

50

、プローブまたは抗体に対する検出可能な物質のカップリング（すなわち、物理的な連結）によるプローブまたは抗体の直接的な標識、ならびに直接標識される別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的な標識を含むように意図される。直接的な標識の例には、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、およびビオチンでのDNAプローブの末端標識（その結果、これは、蛍光標識されたストレプトアビジンで検出され得る）が含まれる。用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞、および生物学的液体、ならびに被験体中に存在する組織、細胞、および液体を含むように意図される。すなわち、本発明の検出方法は、インビトロならびにインビボで、生物学的サンプル中のBAFF-R mRNA、タンパク質、またはゲノムDNAを検出するために使用され得る。例えば、BAFF-R mRNAの検出のためのインビトロ技術には、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。BAFF-Rタンパク質の検出のためのインビトロ技術には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降、および免疫蛍光が含まれる。BAFF-RゲノムDNAの検出のためのインビトロ技術には、サザンハイブリダイゼーションが含まれる。さらに、BAFF-Rタンパク質の検出のためのインビボ技術には、標識した抗BAFF-R抗体を被験体に導入することが含まれる。例えば、抗体は、被験体中でのその存在および位置が標準的な画像化技術によって検出され得る放射活性マーカーで標識され得る。

10

20

【0191】

1つの実施形態においては、生物学的サンプルは、試験被験体由来のタンパク質分子を含む。あるいは、生物学的サンプルは、試験被験体由来のmRNA分子または試験被験体由来のゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来の手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

【0192】

別の実施形態においては、この方法はさらに、コントロールの被験体由来のコントロールの生物学的サンプルを得る工程、コントロールサンプルを、BAFF-Rタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAを検出することができる化合物または試薬と接触させ、その結果、BAFF-Rタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在が生物学的サンプル中で検出される工程、ならびに試験サンプル中のBAFF-Rタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在と、コントロールサンプル中のBAFF-Rタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

30

【0193】

本発明はまた、生物学的サンプル中のBAFF-Rの存在を検出するためのキットを含む。例えば、キットは、生物学的サンプル中のBAFF-Rタンパク質またはmRNAを検出することができる、標識された化合物または試薬；サンプル中のBAFF-R量を決定するための手段；および標準と、サンプル中のBAFF-R量とを比較するための手段を含有し得る。化合物または試薬は、適切な容器中にパッケージされ得る。キットはさらに、BAFF-Rタンパク質または核酸を検出するためにキットを使用するための説明書を含み得る。

40

【0194】

（予後アッセイ）

本明細書中に記載される診断方法はさらに、異常なBAFF-Rの発現または活性に関係している疾患または障害を有しているか、またはそれらを発症する危険のある被験体を同定するために利用され得る。例えば、本明細書中に記載されているアッセイ（例えば、上記の診断アッセイまたは以下のアッセイ）は、例えば、自己免疫性溶血性貧血および全身性エリテマトーデスのような自己免疫性状態においてBAFF-Rタンパク質、核酸の発現または活性に関係している障害を有しているかまたはそれを発症する危険のある被験体を同定するために、利用

50

され得る。あるいは、予後アッセイは、疾患または障害を有しているかまたはそれらを発症する危険のある被験体を同定するために利用され得る。従って、本発明は、異常な B A F F - R の発現または活性に関係している疾患または障害を同定するための方法を提供する。ここでは、試験サンプルが被験体から得られ、そして B A F F - R タンパク質または核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）が検出される。ここでは、B A F F - R タンパク質または核酸の存在は、異常な B A F F - R の発現または活性に関係している疾患または障害を有しているかまたはそれらを発症する危険のある被験体についての診断である。本明細書中で使用される場合には、「試験サンプル」は、目的の被験体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的液体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織であり得る。

10

【0195】

さらに、本明細書中に記載されている予後アッセイは、被験体に、異常な B A F F - R の発現または活性に関係している疾患または障害を処置するための試薬（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）を投与することができるかどうかを決定するために使用され得る。例えば、このような方法は、被験体が障害について試薬で効率よく処置され得るかどうかを決定するために使用され得る。従って、本発明は、被験体が異常な B A F F - R の発現または活性に関係している障害について試薬で効率よく処理され得るかどうかを決定するための方法を提供する。ここでは、試験サンプルが得られ、そして B A F F - R タンパク質または核酸が検出される（例えば、ここでは、B A F F - R タンパク質または核酸の存在は、異常な B A F F - R の発現または活性に関係している障害を処置するために試薬を投与され得る被験体についての診断である）。

20

【0196】

本発明の方法はまた、B A F F - R 遺伝子中の遺伝子の損傷を検出するために使用され得、それによって損傷を起こした遺伝子を有する被験体が、腫瘍形成性障害または自己免疫性障害の危険があるかまたはそれを罹患しているかどうかを決定する。種々の実施形態においては、この方法は、被験体由来の細胞サンプル中で、B A F F - R タンパク質をコードする遺伝子の完全性に影響を与える変化の少なくとも1つ、またはB A F F - R 遺伝子の誤った発現によって特徴付けられる遺伝子の損傷の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、このような遺伝子の損傷は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：（1）B A F F - R 遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；（2）B A F F - R 遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；（3）B A F F - R 遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換；（4）B A F F - R 遺伝子の染色体再配置；（5）B A F F - R 遺伝子のメッセンジャーRNAの転写レベルの変化；（6）B A F F - R 遺伝子の（例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの）異常な改変；（7）B A F F - R 遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の野生型ではないスプライシングパターンの存在；（8）B A F F - R タンパク質の野生型ではないレベル；（9）B A F F - R 遺伝子の対立遺伝子の欠失、および（10）B A F F - R タンパク質の不適切な翻訳後改変。本明細書中に記載されているように、B A F F - R 遺伝子の損傷を検出するために使用され得る、当該分野で公知の多数のアッセイ技術が存在する。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来の手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、核を有する細胞を含有している任意の生物学的サンプル（例えば、頬の粘膜細胞を含む）が、使用され得る。

30

40

【0197】

特定の実施形態においては、損傷の検出には、アンカーPCRまたはRACE PCRのようなポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,6

50

83, 195号および同第4, 683, 202号を参照のこと)における、あるいは、鎖連結反応(LCR)(例えば、Landegranら(1988) Science 241:1077-1080; およびNakazawaら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364を参照のこと)における、プローブ/プライマーの使用を含む。これらの後者は、BAFF-R遺伝子中の点変異の検出に特に有用である(Abravayaら(1995) Nucleic Acid Res. 23:675-682を参照のこと)。この方法は、患者から細胞のサンプルを回収する工程、サンプルの細胞から核酸(例えば、ゲノム、mRNA、または両方)を単離する工程、BAFF-R遺伝子(存在する場合には)のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じる条件下で、核酸サンプルをBAFF-R遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させる工程、および増幅産物の存在または非存在を検出する工程、あるいは、増幅産物の大きさを検出しそしてコントロールサンプルと長さを比較する工程を包含し得る。PCRおよび/またはLCRは、本明細書中に記載されている変異体の検出に使用される技術のいずれかと組合せて、予備的な増幅工程として使用されることが所望される場合がある。

10

【0198】

別の増幅方法には、以下が含まれる: 自己維持配列の複製(Guatelliら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム(Kwohら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-βレプリカゼ(Lizardiら(1988) Biotechnology 6:1197)、または任意の他の核酸増幅方法、それに続く当業者に周知の技術を使用する増幅された分子の検出。これらの検出体系は、このような分子が非常に少ない数で存在する核酸分子の検出に特に有用である。

20

【0199】

代替の実施形態においては、サンプル細胞由来のBAFF-R遺伝子中の変異は、制限酵素切断パターンの変化によって同定することができる。例えば、サンプルおよびコントロールDNAが単離され、増幅され(必要に応じて)、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、そしてフラグメント長の大きさがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルとコントロールDNAとの間でのフラグメント長の大きさの差異は、サンプルDNA中での突然変異を示す。さらに、配列特異的リボザイムの使用(例えば、米国特許第5,493,531号)は、リボザイム切断部位の発生または消滅によって特異的突然変異の存在を記録するために使用することができる。

30

【0200】

他の実施形態においては、BAFF-Rの遺伝子変異は、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含有している高密度アレイに対して、サンプルおよびコントロール核酸(例えば、DNAまたはRNA)をハイブリダイズさせることによって同定され得る(Croninら(1996) Human Mutation 7:244-255; Kozalら(1996) Nature Med. 2:753-759)。例えば、BAFF-Rの遺伝子変異は、Croninら(1996) Human Mutation 7:244-255に記載されているような、光によって作成したDNAプローブを含有している二次元アレイ中で同定することができる。簡潔には、プローブの第1のハイブリダイゼーションアレイは、連続して重複しているプローブの直線的な並びを作成することによって配列間での塩基変化を同定するために、サンプルおよびコントロール中のDNAの長いストレッチを徹底的にスキャンするために使用され得る。この工程は、点変異の同定が可能である。この工程には、検出される全ての改変体または変異体に相補的である、より小さい特殊化されたプローブアレイを使用することに

40

50

よって、特異的な変異体の特徴付けを可能にする第2回目のハイブリダイゼーションアレイが続く。それぞれの変異体アレイは、類似のプロープのセット、野生型遺伝子に相補的なもの、および変異遺伝子に相補的な他のものから構成される。

【0201】

なお別の実施形態においては、当該分野で公知の任意の種々の配列決定反応が、B A F F - R 遺伝子を直接配列決定し、そして対応している野生型（コントロール）配列とサンプル B A F F - R の配列とを比較することによって変異体を検出するために、使用され得る。配列決定反応の例には、Maxim および Gilbert (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560 または Sanger (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 によって開発された技術に基づく反応が含まれる。質量スペクトル分析による配列決定（例えば、PCT 国際公開番号第 WO 94 / 16101 号；Cohen ら (1996) Adv. Chromatogr. 36: 127 - 162；および Griffin ら (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147 - 159 を参照のこと）を含む、任意の種々の自動配列決定手順が、診断アッセイ（Naevé ら (1995) Biotechniques 19: 448）を行う場合に利用され得ることもまた、意図される。

10

20

【0202】

B A F F - R 遺伝子の変異の検出のための他の方法には、切断試薬からの保護が、RNA / RNA または RNA / DNA ヘテロ二重螺旋中の不適合の塩基を検出するために使用される方法が含まれる（Myers ら (1985) Science 230: 1242）。一般的には、「不適合切断」の技術分野は、野生型 B A F F - R 配列を含有している（標識された）RNA または DNA を、組織サンプルから得られた可能性のある変異体 RNA または DNA とともにハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重螺旋を提供することによって開始する。2本鎖二重螺旋は、コントロール鎖とサンプル鎖との間での塩基対不適合に起因して存在する、二重螺旋の1本鎖領域を切断する試薬で処理される。例えば、RNA / DNA 二重螺旋は、RNAse で処理され得、そして DNA / DNA ハイブリッドは S1 ヌクレアーゼで処理されて、不適合の領域を酵素的に消化することができる。他の実施形態においては、DNA / DNA または RNA / DNA 二重螺旋のいずれかが、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで、および不適合の領域を消化するためにピペリジンで処理され得る。不適合の領域の消化後、得られた材料は、次いで、変異部位を決定するために、変性ポリアクリルアミドゲル上で大きさによって分離される。例えば、Cotton ら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397；Saleeba ら (1992) Methods Enzymol. 217: 286 - 295 を参照のこと。1つの実施形態においては、コントロール DNA または RNA を、検出のために標識することが可能である。

30

40

【0203】

なお別の実施形態においては、不適合切断反応は、細胞サンプルから得られた B A F F - R cDNA 中の点変異を検出およびマッピングするために定義されたシステム中で、2本鎖の DNA 中の不適合の塩基対を認識する1つ以上のタンパク質（いわゆる、「DNA 不適合修復」酵素）を使用する。例えば、E. coli の mutY 酵素は、G / A 不適合の A を切断し、そして HeLa 細胞由来のチミジン DNA グリコシラーゼは G / T 不適合の T を切断する（Hsu ら (1994) Carcinogenesis 15: 1657 - 1662）。例示的な実施形態に従うと、B A F F - R 配列（例えば、野生型 B A F F - R 配列）に基づくプロープが、試験細胞由来の cDNA または他の DNA 産物にハイブリダイ

50

ズさせられる。二重螺旋は、DNA不適合修復酵素で処理され、そして切断産物（存在する場合）は、電気泳動プロトコールなどによって検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

【0204】

他の実施形態においては、電気泳動の移動度の変化は、BAFF-R遺伝子中の変異の同定のために使用される。例えば、1本鎖の立体構造の多型(SSCP)は、変異体と野生型の核酸との間での電気泳動の移動度の差異を検出するために使用され得る(Oritaら(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:2766、Cotton(1993)Mutat.Res.285:125-144;Hayashi(1992)Genet.Anal.Tech.Appl.9:73-79もまた参照のこと)。サンプルおよびコントロールBAFF-R核酸の1本鎖のDNAフラグメントは変性させられ、そして再生させられる。1本鎖核酸の二次構造は配列に従って変化し、得られる電気泳動の移動度の変化は、単一の塩基の変化をもなお検出することが可能である。DNAフラグメントは標識され得るか、または標識されたプローブを用いて検出され得る。アッセイの感受性は、(DNAよりもむしろ)RNA(その二次構造は配列の変化により敏感である)の使用によって増大させることができる。1つの実施形態においては、本発明の方法は、電気泳動の移動度の変化に基づいて2本鎖のヘテロ二重螺旋分子を分類するためのヘテロ二重螺旋分析を利用する(Keenら(1991)Trends Genet.7:5)。

10

20

【0205】

なお別の実施形態においては、変性剤の勾配を含有しているポリアクリルアミドゲル中での変異体または野生型フラグメントの移動が、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)を使用してアッセイされる(Myersら(1985)Nature 313:495)。DGGEが分析方法として使用される場合は、DNAは、それが完全には変性させられないことを確実にするために、例えば、PCRによって、約40bpの高い融点のGCリッチDNAのGCクランプを付加させることによって、改変される。さらなる実施形態においては、温度勾配が、コントロールおよびサンプルDNAの移動度の差異を同定するために、変性勾配の代わりに使用される(RosenbaumおよびReissner(1987)Biophys.Chem.265:12753)。

30

【0206】

点変異の検出のための他の技術の例には、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマーエクステンションが含まれるがこれらに限定されない。例えば、既知の変異が中心に配置され、次いで完全な適合が見られる場合にのみハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的DNAにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドプライマーが調製され得る(Saikiら(1986)Nature 324:163;Saikiら(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:6230)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーション膜に付着させられ、そして標識された標的DNAとハイブリダイズする場合に、PCR増幅された標的DNAまたは多数の種々の変異体にハイブリダイズする。

40

【0207】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術が、本発明と組合せて使用され得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心に(その結果、増幅はディファレンシャルハイブリダイゼーションに依存する)(Gibbsら(1989)Nuc1.Acid.Res.17:2437-2448)または一方のプライマーの3'末端の先端(ここでは、適切な条件下で、不適合が妨げられるかまたはポリメラーゼエク

50

ステンションが減少する)に、目的の変異を保有し得る(Prossner(1993)Tibtech 11:238)。さらに、切断に基づく検出を生じるように、変異の領域に新規の制限部位を導入することが所望される場合がある(Gaspariniら(1992)Mol. Cell Probes 6:1)。特定の実施形態においては、増幅はまた、増幅のためのTaqリガーゼを使用して行われ得ることが予測される(Barany(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189)。このような場合には、連結は、5'配列の3'末端に完全な適合が存在する場合にのみ生じ、それによって増幅の存在または非存在の観察から特異的部位での既知の変異の存在を検出することを可能にする。

10

【0208】

本明細書中に記載されている方法は、例えば、本明細書中に記載されている少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含有している、予めパッケージされた診断キットの利用によって行われ得る。これらは、例えば、BAFF-R遺伝子が関係している疾患または疾病の徴候または家族性病歴を示す患者を診断するための臨床的な設定において、便利に使用され得る。

【0209】

さらに、BAFF-Rが発現される任意の細胞型または組織は、本明細書中に記載されている予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、核を有している細胞を含有している任意の生物学的サンプル(例えば、頬の粘膜細胞を含む)が、使用され得る。

20

【0210】

(薬理ゲノム学)

本明細書中に記載されているスクリーニングアッセイによって同定されるような、BAFF-R活性(例えば、BAFF-R遺伝子の発現)に対して刺激性または阻害性の作用を有する試薬または調節因子は、障害(例えば、ガンに関連する障害または自己免疫生障害)を処置(予防的または治療的に)するために個体に対して投与され得る。このような処置と組合せて、個体の薬理ゲノム学(すなわち、個体の遺伝子型と個体の外来化合物もしくは薬物に対する応答との間の関係の研究)が考慮され得る。治療薬の代謝の差異は、薬理学的に活性な薬剤の用量と血中濃度との間の関係を変化させることによって、重篤な毒性または治療の失敗を導くことが可能である。このように、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づいて、予防的または治療的処置に有効な試薬(例えば、薬物)の選択を可能にする。このような薬理ゲノム学はさらに、適切な投与量および治療レジメを決定するために使用され得る。従って、BAFF-Rタンパク質の活性、BAFF-R核酸の発現、または個体中でのBAFF-R遺伝子の変異の内容が、それによって個体の治療的または予防的処置に適切な試薬(単数または複数)を選択するために決定され得る。

30

【0211】

薬理ゲノム学は、罹患しているヒトにおける薬物の生体内分布の変化および異常な作用に起因して、薬物に対する応答の臨床的に有意な遺伝性のバリエーションを処理する。例えば、Eichelbaum(1996)Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23:983-985およびLinder(1997)Clin. Chem. 43:254-266を参照のこと。一般的には、薬理ゲノム学的状態の以下の2つの型が区別され得る;体に対する薬物の作用方法を変更する(薬物作用の変更)シグナル因子として伝達される遺伝的状态、または薬物の対する体の作用を変更する(薬物代謝の変更)シグナル因子として伝達される遺伝的状态。薬理ゲノム学的状態は、まれな異常としてまたは多型現象としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)欠損は、一般的な遺伝性の酵素欠損症である。ここでは

40

50

、主な臨床的な合併症は、酸化剤（抗マラリア薬、スルホンアミド、鎮痛剤、ニトロフラン）の経口摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

【0212】

例示的な実施形態として、薬物を代謝する酵素の活性は、薬物作用の強度および持続期間の両方の主用な決定因子である。薬物を代謝する酵素（例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2（NAT2）、ならびにチトクロームP450酵素CYP2D6およびCYP2C19）の遺伝子の多型現象の発見は、一部の患者が期待される薬物効果を得られないか、または誇張された薬物応答および重篤な毒性を薬物の標準用量および安全用量の服用後に示す理由の説明を提供した。これらの多型現象は、集団中の2つの表現形（多量の代謝因子（metabolizer）（EM）および少量の代謝因子（PM））で発現される。PMの出現率は、種々の集団間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度の多型現象があり、そしていくつかの変異がPMにおいて同定されている。これらは、全て、機能的なCYP2D6が存在しないことを導く。CYP2D6およびCYP2C19の少量の代謝因子は、それらが標準的な用量で受容された場合に、極めて頻繁に、誇張された薬物応答および副作用を示す。転写因子が活性な治療部分である場合は、PMは、そのCYP2D6を形成する代謝生成物であるモルヒネによって媒介されるコデリンの鎮痛作用について示されるように、治療応答を示さない。他の極端な作用は、いわゆる超迅速な代謝因子であり、これは標準的な用量には応答しない。最近、超迅速な代謝の分子機構が、CYP2D6遺伝子の増幅に起因することが同定されている。

10

20

【0213】

このように、BAFF-Rタンパク質の活性、BAFF-R核酸の発現、または個体中でのBAFF-R遺伝子の変異の内容が、それによって個体の治療的または予防的処置に適切な試薬（単数または複数）を選択するために、決定され得る。さらに、薬理ゲノム学の研究は、個体の薬物応答性の表現形の同定のために、薬物を代謝する酵素をコードする多型性対立遺伝子の遺伝子分類への適用に使用され得る。この知見は、用量または薬物の選択に適用される場合には、有害な反応または治療の失敗を回避することが可能であり、従って、BAFF-R調節因子（例えば、本明細書中に記載されている例示的なスクリーニングアッセイの1つによって同定される調節因子）で被験体を処置した場合の治療または予防効率を増大させることができる。

30

【0214】

（臨床的有效性のモニタリング）

BAFF-Rの発現または活性に対する試薬（例えば、薬物または化合物）の影響（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力）のモニタリングは、基本的な薬物スクリーニングだけではなく、臨床試験においてもまた適用され得る。例えば、本明細書中に記載されているスクリーニングアッセイによって決定される試薬の、BAFF-R遺伝子の発現、タンパク質レベルを増大させること、またはBAFF-R活性をアップレギュレートすることの有効性は、BAFF-R遺伝子の発現、タンパク質レベルの低下、またはBAFF-R活性のダウンレギュレーションを示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、BAFF-R遺伝子の発現、タンパク質レベルを減少させるかまたはBAFF-R活性をダウンレギュレートするためのスクリーニングアッセイによって決定された試薬の有効性は、BAFF-R遺伝子の発現、タンパク質レベルの増大、またはBAFF-R活性のアップレギュレーションを示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験においては、BAFF-Rおよび好ましくは、例えば、障害に関係している他の遺伝子の発現または活性が、特定の細胞の免疫応答性の「読み出し」またはマーカーとして使用され得る。

40

【0215】

50

例えば、B A F F - Rを含む、B A F F - R活性を調節する試薬（例えば、化合物、薬物、または低分子）での処置によって細胞中で調節される遺伝子が、同定され得る（例えば、本明細書中に記載されているようなスクリーニングアッセイにおいて同定される）。このように、（例えば、臨床試験において）細胞増殖性障害に対する試薬の作用を研究するためには、細胞が単離され得、そしてR N Aが調製され得、そしてB A F F - Rおよび障害に関係している他の遺伝子の発現レベルについて分析され得る。遺伝子の発現レベル（すなわち、遺伝子の発現パターン）は、本明細書中に記載されているように、ノーザンブロット分析もしくはR T - P C Rによって、あるいは、産生されるタンパク質の量を測定することによって、本明細書中に記載されている方法の1つによって、あるいは、B A F F - Rまたは他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この方法においては、遺伝子の発現パターンは、試薬に対する細胞の生理学的応答の指標であるマーカーとして作用し得る。従って、この応答状態は、試薬での個体の処置の前、処置の間の種々の時点で決定され得る。

10

20

30

40

50

【0216】

1つの実施形態においては、本発明は、以下の工程を包含している、試薬（例えば、本明細書中に記載されているスクリーニングアッセイによって同定された、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、低分子、または他の薬物候補）での被験体の処置の有効性をモニタリングするための方法を提供する：（i）試薬の投与前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；（ii）投与前サンプル中のB A F F - Rタンパク質、m R N A、またはゲノムD N Aの発現レベルを検出する工程；（iii）被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程；（iv）投与後サンプル中のB A F F - Rタンパク質、m R N A、またはゲノムD N Aの発現または活性のレベルを検出する工程；（v）投与前サンプル中のB A F F - Rタンパク質、m R N A、またはゲノムD N Aの発現または活性のレベルを、投与後サンプル（単数または複数）中のB A F F - Rタンパク質、m R N A、またはゲノムD N Aと比較する工程；ならびに（vi）それに従って、被験体への試薬の投与を変更する工程。例えば、試薬の投与の増大は、検出されたものよりも高いレベルにB A F F - Rの発現または活性を増大させるために（すなわち、試薬の有効性を増大させるために）、所望され得る。あるいは、試薬の投与の減少は、検出されたものよりも低いレベルにB A F F - Rの発現または活性を減少させるために（すなわち、試薬の有効性を減少させるために）所望され得る。

【0217】

（処置方法）

本発明は、異常なB A F F - Rの発現または活性に関係している障害の危険がある（またはその疑いのある）か、またはそのような障害を有している被験体を処置する、予防的および治療的方法を提供する。

【0218】

レベルまたは生物学的活性の増大（疾患または障害を罹患していない被験体と比較して）によって特徴付けられる疾患および障害は、活性をアンタゴナイズする（すなわち、減少させるかまたは阻害する）治療薬で処置され得る。活性をアンタゴナイズする治療薬は、治療的または予防的な様式で投与され得る。利用され得る治療薬には、以下が含まれるがこれらに限定されない：（i）B A F F - Rポリペプチド、またはそれらのアナログ、誘導体、フラグメント、もしくはホモログ；（ii）B A F F - Rポリペプチドに対する抗体；（iii）B A F F - Rペプチドをコードする核酸；（iv）アンチセンス核酸および「機能不全」の核酸（すなわち、B A F F - Rペプチドに対するコード配列中への異種の挿入物に起因する）の投与が、相同組換えによるB A F F - Rペプチドの内因性機能の「ノックアウト」のために利用される（例えば、C a p e c c h i（1989

Science 244:1288-1292を参照のこと) ;あるいは(v)
BAFF-Rペプチドとその結合パートナーとの間での相互作用を変更する調節因子(すなわち、阻害因子、アゴニスト、およびアンタゴニスト(本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに特異的な抗体を含む)))。

【0219】

レベルまたは生物学的活性の低下(疾患または障害を罹患していない被験体と比較して)によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増大させる(すなわち、それに対するアゴニストである)治療薬で処置され得る。活性をアップレギュレートする治療薬が、治療的または予防的な様式で投与され得る。利用され得る治療薬には、BAFF-Rペプチド、またはそれらのアナログ、誘導体、フラグメント、もしくはホモログ;あるいは、生体利用可能性を増大させるアゴニストが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0220】

レベルの増大または減少は、ペプチドおよび/またはRNAを定性することによって、(例えば、生検組織から)患者の組織サンプルを得ること、ならびにRNAもしくはペプチドのレベル、または発現されたペプチド(またはBAFF-RペプチドのmRNA)の構造、および/もしくは活性についてインビトロでアッセイすることによって、容易に検出することができる。当該分野で周知の方法には、イムノアッセイ(例えば、ウェスタンブロット分析、免疫沈降、それに続くドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学などによる)、および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど)が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0221】

1つの局面においては、本発明は、被験体の、異常なBAFF-Rの発現または活性に関係している疾患または状態を、BAFF-Rの発現を調節するかまたは少なくとも1つのBAFF-R活性を調節する試薬を被験体に投与することによって、予防するための方法を提供する。異常なBAFF-Rの発現または活性によって引き起こされるかまたはそれに寄与する疾患の危険がある被験体は、例えば、本明細書中に記載されている診断的または予防的アッセイのいずれかまたはそれらの組合せによって同定され得る。予防薬の投与は、BAFF-Rの異常性の特徴である徴候の発現の前に行われ得る。その結果、疾患または障害は予防されるか、あるいはその進行が遅延させられる。BAFF-Rの異常性の型に依存して、例えば、BAFF-Rアゴニスト試薬またはBAFF-Rアンタゴニスト試薬が、被験体の処置に使用され得る。適切な試薬は、本明細書中に記載されているスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

30

【0222】

本発明の別の局面は、治療目的のためにBAFF-Rの発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法には、細胞に関係しているBAFF-Rタンパク質活性の1つ以上の活性を調節する試薬を細胞と接触させる工程を包含する。BAFF-Rタンパク質の活性を調節する試薬は、核酸、またはタンパク質、BAFF-Rタンパク質の天然に存在している同性質のリガンド、ペプチド、BAFF-Rペプチド模倣物、または他の低分子であり得る。1つの実施形態においては、試薬は、1つ以上のBAFF-Rタンパク質活性を刺激する。このような刺激因子の例には、活性なBAFF-Rタンパク質、および細胞中に導入されているBAFF-Rをコードする核酸分子が含まれる。別の実施形態においては、試薬は、1つ以上のBAFF-Rタンパク質活性を阻害する。このような阻害性の試薬の例には、アンチセンスBAFF-R核酸分子および抗BAFF-R抗体が含まれる。これらの調節方法は、インビトロで(例えば、細胞を試薬とともに培養することによって)、あるいはインビボで(例えば、被験体に対して試

40

50

薬を投与することによって)行われ得る。このように、本発明は、B A F F - Rタンパク質または核酸分子の異常な発現または活性によって特徴付けられる疾患または障害に罹患している個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態においては、この方法は、B A F F - Rの発現または活性を調節する(例えば、アップレギュレートするかまたはダウンレギュレートする)試薬(例えば、本明細書中に記載されているスクリーニングアッセイによって同定される試薬)、またはそのような試薬の組合せを投与する工程を包含する。別の実施形態においては、この方法は、B A F F - Rの発現または活性の減少またはその異常を補うための治療として、B A F F - Rタンパク質または核酸分子を投与する工程を包含する。

10

【0223】

1つの実施形態においては、本発明は、B A F F - Rを使用する方法を提供する。このような方法には、B細胞の増殖、樹状細胞によって誘導されるB細胞の増殖、およびB A F F - Rの少なくともB A F F結合部分を含有しているB A F F - Rポリペプチドを使用する、動物中での成熟または免疫グロブリンの産生を阻害する方法が含まれる。他の実施形態には、B細胞の増殖、樹状細胞によって誘導されるB細胞の増殖、およびB A F F - Rポリペプチドを使用して、動物中での成熟または免疫グロブリンの産生を刺激する方法(例えば、B A F F - Rの十分な発現を可能にするベクターでB A F F - R欠損細胞をトランスフェクトすることによるか、またはB A F F - Rに結合するかB A F Fを模倣する抗体を投与することによる)が含まれる。

20

【0224】

別の実施形態においては、本発明は、自己免疫性疾患、高血圧、心臓血管障害、腎臓障害、B細胞リンパ増殖障害、免疫抑制性疾患、器官の移植、およびH I Vの処置においてB A F F - Rを使用する方法を提供する。B A F F - Rとそのリガンドとの間でのシグナル伝達に関係している免疫応答を処置、抑制、または変更するために試薬を使用する方法、およびB A F F - Rまたはそのエピトープに特異的な抗体の投与によって炎症を阻害する方法もまた、含まれる。

【0225】

本発明の方法は、好ましくは、治療有効量のB A F F - Rポリペプチド、異種アミノ酸配列に融合されたB A F F - Rポリペプチドを含有しているキメラ分子、または抗B A F F - R抗体ホモログを投与することによって行われる。

30

【0226】

1つの実施形態においては、本発明は、B A F F - Rポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含有している薬学的組成物を提供する。

【0227】

別の実施形態においては、本発明は、異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合されたB A F F - Rポリペプチドを含有しているキメラ分子を提供する。このようなキメラ分子の例には、免疫グロブリンのF c領域またはエピトープタグ配列に融合されたB A F F - Rが含まれる。

40

【0228】

別の実施形態においては、本発明は、B A F F - Rポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。必要に応じて、抗体はモノクローナル抗体である。

【0229】

本発明の1つの実施形態は、B A F F - Rアンタゴニストを含有している組成物の治療有効量を哺乳動物に投与することによって、所望されない細胞増殖に係している状態について哺乳動物を処置する方法である。ここでは、B A F F - Rアンタゴニストは、B A F F - Rとその同性質のレセプター(単数または複数)との間での相互作用をアンタゴナイズするポリペプチドを、薬学的に受容可能な賦形剤とともに含む。

50

【0230】

好ましい実施形態においては、細胞表面上のBAFFの同性質のレセプターは、BAFF-Rである。

【0231】

この方法は、BAFFとその同性質のレセプター（単数または複数）との間での相互作用をアンタゴナイズするポリペプチドを有する、任意のBAFF-Rアンタゴニストとともに使用され得る。BAFF-Rアンタゴニストの例には、可溶性BAFF-Rポリペプチド、可溶性キメラBAFF-R分子（これには、BAFF-R-IgG-Fcおよび抗BAFF-R抗体ホモログが含まれるがこれらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0232】

本発明の方法は、所望されない細胞増殖に関係している任意の状態とともに使用され得る。詳細には、本発明の方法は、BAFFおよび/またはBAFF-Rを発現する腫瘍細胞を処置するために使用され得る。

【0233】

その細胞増殖がBAFFによって調節されるガンの例は、腫瘍組織ライブラリー中で発現されるBAFFおよび/またはBAFF-Rメッセージのレベルをインビトロで測定することによってスクリーニングされ得る。BAFFおよび/またはBAFF-Rメッセージが高度に発現される腫瘍組織ライブラリーが候補である。あるいは、公的なおよび個人的なデータベース（すなわち、Incyteデータベース）を、例えば、全長のヒトBAFF cDNA配列を用いて候補を検索するために、スクリーニングし得る。

20

【0234】

所望されない細胞増殖に関係している状態の処置（詳細には、腫瘍の治療）に使用される本発明のBAFF-Rアンタゴニストは、有利には、細胞増殖の10%、20%、30%、または40%以上を阻害し、そして最も有利には、50%以上を阻害する。BAFF-Rアンタゴニストは、スクリーニングによって得られる。例えば、BAFF-Rアンタゴニストは、ヒトの結腸がん腫HT29またはヒト肺がん腫A549（これらは、それぞれ結腸および肺の腫瘍に由来する）に対する増殖阻害活性（すなわち、10%、20%、30%、40%、または50%以上）に基づいて選択され得る。

30

【0235】

本発明の別の実施形態は、B細胞の増殖およびB細胞以外の細胞増殖、樹状細胞によって誘導されるB細胞の増殖、ならびに上記に記載されているようなBAFF-Rポリペプチドを使用する、動物中での成熟または免疫グロブリンの産生を阻害する方法を提供する。

【0236】

B細胞およびB細胞以外の細胞の増殖、樹状細胞によって誘導されるB細胞の増殖、ならびに成熟または免疫グロブリンの産生を阻害する方法はまた、BAFF-Rに結合し、そしてBAFFのBAFF-Rへの結合を阻害する、抗BAFF-R抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）の投与を含む場合がある。抗体の投与は、それによってB細胞およびB細胞以外の細胞の増殖、樹状細胞によって誘導されるB細胞の増殖、ならびに成熟または免疫グロブリンの産生を阻害する。使用に適切であり得る抗体の量は、本明細書中に提供されるインビボでのデータから推定され得る。例えば、体重または表面積に基づく推論法を含む、動物実験から投与量を推論するための種々の方法が、当該分野で公知である。

40

【0237】

本発明のいくつかの実施形態においては、BAFF-R:Fcポリペプチドまたは抗BAFF-R抗体は、約1から20mg/kg/用量の量で投与される。複数の用量が、必要に応じて、1週間に2回、1週間に1回、2週間に1回、ま

50

たは1ヶ月に1回与えられ得る。医師は、全ての不適切な治療効果を減少させるように考慮した効率を決定することによって、適切な用量を決定することができる。

【0238】

別の実施形態においては、本発明は、自己免疫性疾患、高血圧、心臓血管障害、腎臓障害、B細胞リンパ増殖障害、免疫抑制性疾患、器官の移植、炎症、およびHIVの処置において、BAFF-Rまたは抗BAFF-R抗体を使用する方法を提供する。BAFF-Rとそのリガンドとの間のシグナル伝達経路に関係している免疫応答を処置、抑制、または変更するための試薬の使用方法もまた、含まれる。

10

【0239】

(BAFF-RおよびBAFF-R:Fcを含む、発現されたタンパク質の凝集を阻害する方法)

本発明はまた、発現されたタンパク質特に、ヒトBAFF-RおよびBAFF-R:Fc)の凝集を阻害するかまたは減少させる方法を提供する。発現されたタンパク質は、発現の間に凝集する傾向があり、これは高い収量での精製を失敗させる。本発明の方法においては、組換えシステム中で発現させられた場合に凝集する傾向にあるタンパク質のアミノ酸配列は、低い凝集活性を示すタンパク質ホモログのアミノ酸配列と比較される。2つのホモログは、それらの間に保存されたドメインおよび保存されていないアミノ酸を有し、そしてこれらはおそらくその中に散在している。一般的には、凝集タンパク質の少なくとも1つの保存されていないアミノ酸が、凝集を緩和するためにホモログ中のアミノ酸で置換され得る。いくつかの実施形態においては、非極性のアミノ酸が置換される。非極性のアミノ酸には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、およびシステインが含まれる、いくつかの実施形態においては、非極性のアミノ酸は、他の非極性のアミノ酸を置換する。凝集を阻害するかまたは減少させるために好ましい非極性のアミノ酸は、プロリンおよびアラニンである。他の実施形態においては、荷電していない極性のアミノ酸は、非極性のアミノ酸で置換される。荷電していない極性のアミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、およびチロシンが含まれる。

20

30

【0240】

本発明の方法においては、好ましくは、タンパク質の生物学的活性を保持する置換が行われる、一般的には、保存されていないアミノ酸は、生物学的活性に対して評価されるほどの影響を与えることなく、状況に順応させられる。

【0241】

本発明の方法の特異的な例においては、ヒトBAFF-Rタンパク質は、配列番号5のV20、P21、A22、およびL27位(配列番号12のV41、P42、A43、およびL48位)で、ならびにそれらの種々の組合せで導入されるアミノ酸置換を有する場合がある。これらは、タンパク質の凝集を大きく緩和させる。同様の方法論が、組換えシステム中で発現された場合に凝集する傾向がある他のタンパク質について使用され得る。操作の特定の理論のいずれにも束縛されることは望まないが、荷電していない極性のアミノ酸の非極性のアミノ酸での置換は、タンパク質に可溶性を与え、そしてタンパク質間の非極性領域の凝集を防止すると考えられている。

40

【0242】

本発明は、本明細書中に記載されている特異的な実施形態によっては、範囲は限定されない。実際、本明細書中に記載されているものに加えて、発明の種々の改変が、上記および添付の図面から当業者に明らかとなる。このような改変は、添付の特許請求の範囲に入ると思われる。

50

【0243】

(実施例)

(実施例1)

本実施例は、BAFFの新規のレセプターであるBAFF-Rの分子クローニングを記載する。

【0244】

(材料および方法)

オリゴdTでプライムしたcDNAライブラリーを、ヒトBAFFに結合するヒトB細胞株であるBJAB細胞から作成し、そして発現ベクターCH269中に直接クローン化した。CH269は、クローン化されたDNAの発現を駆動するためのCMVプロモーターを含み、そしてEBVのoriPをもまた含む、pCEP4(Invitrogen)の誘導体である。これは、EBNA-1で安定に形質転換された細胞(例えば、293EBNA)中でのこれらのプラスミドの多コピーの自律複製を可能にする。BJAB cDNAライブラリーをE.coli DH10B細胞中にトランスフェクトし、そして1ウェルあたり約25000個の独立コロニーのプールとして96ウェル形式で播種した。Qiagen BioRobot 9600を使用してこれらのプールからDNAを調製した。DNAのプールを、Lipofectamine(Life Technologies)を使用して、フィブロネクチンでコートした6ウェルディッシュ中に播種した293EBNA細胞中にトランスフェクトした。感染の48時間後に、培地を除去し、そして細胞を、プレートアッセイ洗浄緩衝液(20mMのHEPES、0.5mg/mlのウシ血清アルブミン、0.1%のNaN₃)で洗浄した。細胞の単層を、結合緩衝液(PBS, 2%のウシ胎児血清、0.1%のNaN₃)中の100mg/mlのビオチン化したヒト組換え可溶性myc-BAFF(myc-huBAFF)で重層し、そして室温で1時間インキュベートした。アッセイに使用したmyc-huBAFF(アミノ酸136~285)を、Pichia pastoris中で発現させ、そして陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製し、その後ゲル濾過した。

10

20

【0245】

BAFF溶液を除去し、そして細胞を洗浄し、PBS中の1.8%のホルムアルデヒド-0.2%のグルタルアルデヒドでの5分間のインキュベーションによって固定した。細胞を再び洗浄し、次いで30分間、結合緩衝液中のストックから1:3000希釈で、アルカリホスファターゼと結合させたストレプトアビジン(SAV-AP)(Jackson ImmunoResearch)とともにインキュベートした。細胞を洗浄し、そしてファストレッド/ナフトールホスフェート(Pierce)で染色した。ビオチン-BAFF/SAV-AP複合体を結合している細胞を、低パワー顕微鏡下での目視検査後に赤色の沈殿の存在によって同定した。二次スクリーニングは、単一コロニーについてのBAFF結合プールのDH10Bグリセロールストックをプレートアウトすること、100のプールにおいて培養物に接種すること、および上記のようなBAFF結合アッセイを繰り返すことを要した。二次スクリーニングのポジティブなプールを、個々のクローンに同様に分解させ、そして上記のように、293EBNAへのトランスフェクションの際のBAFFの結合についてアッセイした。個々のBAFF結合クローンのDNA配列を決定した。

30

40

【0246】

(結果)

BAFFに結合するクローンの1つは、pJST576であった。これは、ポリAテールを含まない1201塩基対(bp)の挿入物の大きさを有する。pJST576の挿入物の配列を、図1A(配列番号1)に示す。このクローンのBLAST分析は、染色体22のBACクローンHS250D10(検索番号Z9

50

9716) に対して、Genbank データベースにおいて相同性を示した。pJST576 の全体の配列を、このBAC 中に見出した。相同性をまた、ヒトEST、AI250289 (IMAGE クローン2000271) の3' 末端に対しても見出した。EST を、ヒトの濾胞性リンパ腫のライブラリーから作成した。EST AI250289 を Incyte から得、そして挿入物の配列を決定した (図1B) (配列番号2)。この配列は、15bp の5' 配列をpJST576 配列に対して付加しており (これはゲノム配列と連続している)、そして23bp はそうではない。EST 配列の残りは、pJST576 と完全な相同性を有する。オープンリーディングフレームは、これらのクローンにおいては同一ではあり得ない。

10

【0247】

(実施例2)

本実施例において、本発明者らは、JST576 cDNA がイントロンを含み、次いでオープンリーディングフレームを確立することを決定する。

【0248】

(方法)

GENSCAN (Burge, C. および Karlin, S. J. (1997) Mol. Biol. 268: 78-94) エキソン推定プログラムを、JST576 cDNA 配列について行った。このプログラムの結果は、cDNA 中にイントロンが存在することを推定した。推定が正確であるかどうかを決定するために、PCR 分析を、JST576 を発現する2つの細胞株由来の第1鎖cDNA について行った。RNA を、RNeasy キット (Qiagen) を使用して、約107個のBJAB またはIM-9細胞から、製造業者によって提案されるプロトコールに従って精製した。RNA を定量し、そして5µg を、Superscript 予備増幅キット (Life Technologies) を使用して第1鎖のcDNA 反応に使用した。オリゴdT およびランダムヘキサマーの両方を、第1鎖生成物を作製するために使用した。第1鎖の合成を、推奨されるプロトコールに従って行った。次いで、3個 (それぞれの反応のうちの1つ) においては、10ng のJST576 またはDNA を含まないものを、推定したイントロンに隣接しているオリゴヌクレオチドを使用するPCR のための鋳型として使用した。反応に使用したオリゴヌクレオチドは、5' オリゴは、BAF-225 [5' - GGCCGAGTGCTTCGACCTGCT - 3'] (配列番号33) またはBAF-226 [5' - GGTC CGCCACTGCGTG G C C T G - 3'] (配列番号34) であり、そして3' オリゴは、BAF-191 [5' - CACCAAGACGGCCGGCCCTGA - 3'] (配列番号35) である。それぞれの反応には、1×Pfu 緩衝液 (Stratagene)、200M のdNTP、10% のDMSO、150ng の各オリゴ、および1.25単位のTurbo Pfu ポリメラーゼ (Stratagene) を含んだ。反応を、35サイクルの、94 で30秒間、60 で1分間、および72 で1.5分間で行った。10µl の各反応物を1%のアガロースゲル上で泳動した。BJAB およびIM-9 BAF-225 / 191 反応物に由来する残りの生成物を、High Pure PCR 生成物精製キット (Roche Molecular Biochemicals) を使用して精製し、そして生成物の集団をDNA 配列決定に供した。さらに、プライマーBAF-225 およびBAF-191 を使用したPCR 産物を、休止B細胞のcDNA から生成し、サブクローン化し、そして個々のクローンを配列決定した。ここで、5µl の休止B細胞のcDNA (Clontech) を、上記のBAF-225 およびBAF-191 プライマーを用いるPCR 反応に使用した。次いで、PCR 生成物を、High Pure PCR 生成物精製キットを使用して精製し、そして濃縮した。PCR フラグメントをサブクローン化するために、フラグメントの末端をリン酸化し、そ

20

30

40

50

してSure Clone連結キット (Amersham Pharmacia Biotech) を推奨されるように使用して平滑末端にした。得られた生成物を、pBluescript II (Stratagene) のEcoRV部位にクローン化し、そしてE. coli中に形質転換した。個々のコロニーを増殖させ、プラスミドDNAをミニプレップした。6個の異なる単離物を配列決定した。

【0249】

(結果)

GENSCANプログラムによって予想したJST576の成熟ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図2A(配列番号3)に示す。BJABおよびIM-9反応による、予想したイントロンにまたがるPCR産物を図2Bに示し、そしてJST576 cDNAクローン中のイントロンの存在を確認した。JST576 cDNA由来のPCR産物の予想した大きさは、BAF-225/BAF-191については約788bpであり、そしてBAF-226/BAF-191については767bpであった。JST576鋳型から得たPCR生成物は、ほぼこの大きさ(レーン10および11)であった。オリゴdTでプライムしたBJABまたはIM-9の第1鎖cDNAのいずれかに対するBAF-225/BAF-191を使用して得たPCR生成物(レーン2およびレーン6)は同じ大きさであり、そしてJST576 cDNA由来の生成物よりも有意に短かった。予想されたイントロンを有さないこのフラグメントの予想された大きさは、484bpであった。PCR生成物の大きさはこの大きさと一致した。同じ結果が、BJABまたはIM-9 RNAをランダムヘキサマーでプライムした場合に得られた(レーン4およびレーン8)。BAF-226/BAF-191を使用した反応は、第1鎖cDNAの鋳型に対してはうまくいかなかった。従って、GENSCANプログラムによって推定したイントロンがJST576 cDNA中に存在するようである。BJABおよびIM-9 RNA由来のスプライシングされた生成物の配列を、PCR生成物の集団を配列決定することによって確認し、そして図2C(配列番号4)に示す配列中に反映させた。配列は、ヌクレオチド149のアラニンコドン(GCA)(小文字で示す)が存在しないことを除いて、図2A(配列番号3)に示す配列と同一であった。休止B細胞のcDNAについてのRT-PCR反応による6個の異なるクローンの配列決定の結果は、両方のスプライシングアクセプター部位が利用されることを示した。好ましいアクセプター部位は、1つのアラニン残基を生じる生成物であるようであった(6個のクローンのうちの5個)。しかし、GENSCANによって予想した配列(配列番号3)(これは、2個のアラニンを含む)を、6個のクローンのうちの1個において観察した。従って、ヒトJST576のオープンリーディングフレームが確立され、そして単一のアミノ酸スプライシング変異体が決定されている。オープンリーディングフレームは、図2D(配列番号5)に示した184個のアミノ酸のタンパク質を推定した。太字のアラニン(A)残基は、スプライシング変異体を示す。このタンパク質を、BAFF-Rと呼ぶ。BAFF-Rの推定のアミノ酸配列は、残基72~100による疎水性領域(Hopp-Woodsアルゴリズム)、およびTMPredアルゴリズムによって分析した場合には、残基84から102による膜貫通セグメントの可能性を含む。この領域には、停止導入シグナルとして作用する場合がある、アミノ酸の高度に荷電したストレッチが続く。BAFF-RはN末端のシグナル配列を欠失しており、そして他のBAFF結合タンパク質であるBCMA(Laabira(1992)EMBO J. 11:3897-3904)およびTACI(von BulowおよびBram、(1997)Science 278:138-141)と同様のIII型膜タンパク質である。N末端は、BAFF-Rの細胞外ドメインと推定され、そしてTNFレセプターファミリーの全ての他のメンバーとは異なり、残基19~3

10

20

30

40

50

5 に 4 システインモチーフを含む。B A F F - R の C 末端は、細胞内ドメインと推定される。

【 0 2 5 0 】

(実施例 3)

ここで、本発明者らは、インフレイムの停止コドンを含むヒト B A F F - R についての提案されている開始メチオニンの上流の D N A 配列を決定する。

【 0 2 5 1 】

(方法)

プライマー B A F - 2 5 4 (5 ' - G G G C G C C T A C A A T C T C A G C T A - 3 ') (配列番号 3 6) を、提案されている A T G の上流の、B A C H S 2 5 0 d 1 0 (G e n b a n k 登録番号 Z 9 9 7 1 6) 中に存在するゲノム配列について作製し、そしてオリゴ B A F - 2 3 6 (5 ' - G G C G G A C C A G C A G G T C G A A G C A C T C - 3 ') (配列番号 3 7) を用いる P C R 反応に使用した。反応の鑄型は、製造業者 (L i f e T e c h n o l o g i e s) によって記載されているように P C R 予備増幅キットを使用して、ヒト脾臓 R N A (C l o n t e c h) から作製した第 1 鎖 c D N A であった。P C R 反応には、3 μ g の第 1 鎖反応物、1 $\times$ P f u 緩衝液 (S t r a t a g e n e) 、1 0 % の D M S O 、0 . 2 m M の d N T P 、1 5 0 n g の各プライマー、および 1 . 2 5 単位の P f u T u r b o ポリメラーゼ (S t r a t a g e n e) を含んだ。P C R 生成物を、H i g h P u r e P C R 生成物精製キットを使用して製造業者の説明書 (R o c h e M o l e c u l a r B i o c h e m i c a l s) に従って精製した。P C R 生成物の末端を、S u r e C l o n e 連結キット (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を使用して平滑末端にしそしてリン酸化し、p B S K 2 (S t r a t a g e n e) の E c o R V 部位にクローン化し、そして D H 5 細胞中に形質転換した。連結によって生じたコロニーを、W i z a r d システム (P r o m e g a) を使用してミニプレップし、次いで A B I 機器を使用して配列決定した。

10

20

【 0 2 5 2 】

(結果)

P C R 生成物の配列について、m R N A がゲノム配列中に含まれる A T G のすぐ上流の配列を含むことを確認した。この配列に、図 3 に示す配列中で下線を付ける。インフレイムの上流の停止コドンの存在、および別のメチオニンが存在しないことは、J S T 5 7 6 c D N A 中で見られるメチオニンが正確な開始メチオニンであることを示した。

30

【 0 2 5 3 】

(実施例 4)

本実施例は、マウスの B A F F - R c D N A のクローニングを記載する。

【 0 2 5 4 】

(方法)

約 1 0 0 万個のファージブラークを、製造業者によって詳細に記載されているように、S t r a t a g e n e (L a J o l l a , C A) から購入したマウス A 2 0 細胞株の c D N A ライブラリーからスクリーニングした。J S T 5 7 6 ヒト B A F F - R c D N A を E c o N I で消化し、1 % の低融点ゲル上で泳動した。含有している 4 2 5 b p のフラグメントをゲルから切り出し、そして秤量した。3 倍容量の水を添加し、そしてゲルフラグメントを 5 分間沸騰させた。フラグメントを、5 0 μ C i の 32 P - d C T P (A m e r s h a m) を用いて、5 0 m M の T r i s (p H 8) 、5 m M の M g C l ₂ 、1 0 μ M の β - メルカプトエタノール、2 0 0 m M の H E P E S (p H 6 . 5) 、2 0 M の d N T P (d C T P を除く) 、0 . 2 7 単位の p d (N) 6 ヘキサヌクレオチド (A m e r s h

40

50

am Pharmacia Biotech)、および1単位のクレノウ酵素(USB)を含有している反応において、室温で一晩標識した。1mlのプローブあたり約100万個を、ブラスクリーニング緩衝液(50mMのTris、1%のSDS、1MのNaCl、0.1%のピロリン酸ナトリウム、0.2%のPVP、0.2%のFicoll、0.2%のBSA)中でフィルターとともに、65で一晩インキュベートした。フィルターを、2×SSCおよび0.1%のSDS中で50にて1.5時間(3×2リットル)で洗浄し、次いで2日間、x線フィルムに露光させた。約36個のポジティブなブラスを同定した。これらのうちの6個をブラス精製した。プラスミドを、Stratageneによって詳細に記載されているインビボでの切り出しプロトコルを使用して遊離させた。得られたコロニーを増殖させ、次いで、DNAをミニプレップした(Qiagen)。cDNAクローンを配列決定した。

【0255】

(結果)

マウスのBAFF-Rのコンセンサスヌクレオチド配列を、図4A(配列番号8)に示し、そしてアミノ酸配列を図4B(配列番号9)に示す。3個のクローンが、マウスBAFF-Rの細胞内ドメイン中のアミノ酸119から129までの10個のアミノ酸の欠失を含んだ。ヒトおよびマウスのBAFF-R配列のアラインメントは、細胞外ドメインの4個のシステイン残基が保存されていること、開始メチオニンの位置が類似していること、およびタンパク質のC末端領域が高度に保存されており(図4)、最後の24個の残基が同一であることを示す。配列は、全体で約56%同一であった。

【0256】

(実施例5)

本実施例においては、ヒトの組換え可溶性BAFFの、pJST576およびGFPレポータープラスミドで同時トランスフェクトされた細胞に結合する能力を記載する。

【0257】

(材料および方法)

レポータープラスミドは膜に固定されたGFP分子をコードし、そしてトランスフェクトされていない細胞からのトランスフェクトされた細胞の同定を可能にする。293EBNA細胞を、レポータープラスミドおよびpJST576を用いて、Lipofectamine 2000(Life Technologies)を使用して同時トランスフェクトした。トランスフェクションの18~20時間後、細胞を、PBS中の5mMのEDTAを用いてプレートから外し、そして計数した。細胞をFACS緩衝液(10%のウシ胎児血清、0.1%のNaN₃を含有しているPBS)で2回洗浄し、そして 2.5×10^5 個の細胞を、FACS緩衝液中に希釈したビオチン化myc-huBAFFとともに氷上で1時間、8ng/mlから5μg/mlの範囲の濃度にわたってインキュベートした。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、そして、ストックから1:100希釈で、フィコエリトリンと結合させたストレプトアビジン(SAV-PE)(Jackson ImmunoResearch)とともに30分間インキュベートした。細胞を再びFACS緩衝液で洗浄し、そしてFACS緩衝液中の1%のバラホルムアルデヒド中に再懸濁した。細胞を、GFPおよびPE蛍光についてFACSによって分析し、そしてデータを四分象限(quadrant)ドットプロットにフォーマットした。2つの右側の四分象限中の点は、トランスフェクションレポーターGFPを発現する細胞を示す。2つの上部の四分象限中の点は、結合したビオチン化myc-huBAFFを有している細胞を示す(この結合は、SAV-PEによって明らかである)。上部の右側の四分象限中の細胞は、ビオチン化myc-huBAFFに結合するトランスフェクトされた細胞である。

10

20

30

40

50

【0258】

(結果)

染色されなかった細胞およびS A V - P Eでのみ染色された細胞は、約50%がG F Pポジティブであり、そしてレポータープラスミドで同時トランスフェクトされていることを示す(図5)。G F Pレポーターおよびp J S T 5 7 6で同時トランスフェクトされた細胞が、1 μ g / m l のビオチン化m y c - h u B A F Fを用いて染色された場合には、ほぼ全ての細胞が下部の四分象限に移動した。これは、B A F Fの結合を示している。同様の結果が、h u T A C Iを発現するプラスミドがp J S T 5 7 6の代わりに同時トランスフェクトされた場合に見られた。T A C IはB A F Fに結合することが既知である。細胞は、5 μ g / m l から8 n g / m l までのビオチン化m y c - h u B A F Fの5倍希釈で染色され、そしてビオチン化m y c - h u B A F Fの濃度の減少に伴って、移動の強度が減少した。

10

【0259】

(実施例6)

本実施例においては、ヒトの組換え可溶性B A F Fまたはマウスの組換え可溶性B A F Fの、p J S T 5 7 6およびG F Pレポータープラスミドで同時トランスフェクトされた細胞に結合する能力を記載する。

【0260】

(材料および方法)

293 E B N Aへの同時トランスフェクションは、実施例5に記載したとおりであった。トランスフェクションの18~20時間後、細胞を外し、計数し、そして以下の改変を用いて実施例5と同様にF A C S分析のために染色した。細胞を、5 μ g / m l のマウスまたはヒトの組換え可溶性f l a g - B A F Fのいずれかとともに氷上で1時間インキュベートし、続いて、洗浄後に、5 μ g / m l の抗f l a gモノクローナル抗体M2(S i g m a A l d r i c h)とともに30分間インキュベーションし、次いで、洗浄した細胞を、ストックからの1:100希釈で、P Eに結合させたロバ抗マウスI g G(J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h)とともに、30分間インキュベートすることによって、明らかにした。細胞を再び洗浄し、そしてパラホルムアルデヒドで固定し、そしてG F PおよびP Eポジティブ細胞についてF A C Sによって分析した。

20

30

【0261】

(結果)

約50%の細胞がG F Pポジティブであり、従って、レポータープラスミドで同時トランスフェクトされた(図6)。G F Pレポーターとp J S T 5 7 6とで同時トランスフェクトされた細胞が5 μ g / m l のヒトまたはマウスのいずれかの組換え可溶性f l a g - B A F Fで染色された場合は、ほぼ全ての細胞が下部の右側の四分象限に移動した。これはマウスおよびヒトの両方のB A F Fがp J S T 5 7 6でトランスフェクトされた細胞に結合することを示す。

【0262】

(実施例7)

本実施例においては、マウスの組換え可溶性A P R I Lが、p J S T 5 7 6およびG F Pレポータープラスミドで同時トランスフェクトされた細胞に結合することができないことを記載する。

40

【0263】

(材料および方法)

293 E B N Aへの同時トランスフェクションは、実施例5に記載したとおりであった。トランスフェクションの18~20時間後、細胞を外し、計数し、そして以下の改変を用いて実施例5と同様にF A C S分析のために染色した。細胞を、1 μ g / m l のマウスの組換え可溶性m y c - A P R I Lとともに氷上で1

50

時間インキュベートし、その後の洗浄後、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗マウスA P R I Lモノクローナル抗体とともに30分間インキュベーションし、続いて、洗浄した細胞を $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン化抗ラットI g G 2 b (P h a r m i n g e n) とともに30分間インキュベーションし、そして最後に、洗浄した細胞をS A V - P E とともに30分間インキュベートすることによって明らかにした。細胞を再び洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定し、そしてG F P およびP E ポジティブ細胞についてF A C S によって分析した。

【0264】

(結果)

約50%の細胞がG F P ポジティブであり、従って、レポータープラスミドで同時トランスフェクトされた(図7)。G F P レポーターとp J S T 5 7 6 とで同時トランスフェクトされた細胞が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のマウスm y c - A P R I L I で染色される場合は、下部の右側の四分象限に移動した細胞はなかった。これは、p J S T 5 7 6 の代わりにヒトT A C I を発現するプラスミドで同時トランスフェクトされた細胞とは対照的であった。これらのトランスフェクトされた細胞は、ほぼ全てが、マウスのm y c - A P R I L 結合についてポジティブであった。B A F F およびA P R I L の両方が、T A C I およびB C M A の両方に結合することは以前に示されている。従って、A P R I L が、p J S T 5 7 6 でトランスフェクトされた細胞上で発現された場合にはB A F F - R に結合しないという事実は、B A F F に対するB A F F - R の特異性を示す。

【0265】

(実施例8)

本実施例は、組換えの可溶性ヒトf l a g - B A F F によって同時免疫沈降される、p J S T 5 7 6 から発現されるB A F F - R の能力を記載する。

【0266】

(材料および方法)

293EBNA細胞を、p J S T 5 7 6、ベクターのみのコントロール、またはB A F F 結合についてのポジティブコントロールとしてのh u T A C I を発現するプラスミドを用いて、L i p o f e c t a m i n e 2000によってトランスフェクトした。インキュベーションの20時間後、トランスフェクション培地を吸引し、細胞をP B S で洗浄し、そして培地を、 ^{35}S 標識培地(10%の透析したウシ胎児血清、4 mMのグルタミン、および $100\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^{35}S メチオニンおよびシステイン(Translabel、ICN Radiochemicals)を補充した、1部の完全なD M E M に対する9部のメチオニンおよびシステインを含まないD M E M)と置き換えた。細胞を6時間この培地中でインキュベートし、その後、培地を除去した。細胞をP B S で洗浄し、次いで $250\mu\text{l}$ の抽出緩衝液(1%のB r i j 98、150 mMのN a C l、50 mMのT r i s pH 7.5)で可溶化させた。同時免疫沈降を、 $75\mu\text{l}$ の ^{35}S 標識した細胞抽出物を、 $5\mu\text{g}$ の組換えの可溶性ヒトf l a g - B A F F とともに、1 mlのD M E M - 10%のウシ胎児血清 - 0.1%のN a N ₃ 中で、一晚、4 でインキュベーションすることによって行った。 $10\mu\text{g}$ の抗f l a g モノクローナル抗体M2、およびプロテインA - セファロースを添加し、そしてインキュベーションを2時間続けた。セファロースビーズを遠心分離によって回収し、F A C S 緩衝液で洗浄し、そして還元剤として β -メルカプトエタノールを有するS D S 充填緩衝液中に再懸濁した。サンプルを5分間沸騰させ、セファロースビーズをペレット化させるために短時間遠心分離し、そしてアリコートにS D S - P A G E 上で泳動した。ゲルを、E n l i g h t n i n g (New England Nuclear)とともにインキュベートし、乾燥させ、そして-80 でフィルムに露光させた。

【0267】

10

20

30

40

50

(結果)

この同時免疫沈降物は、抗 f l a g 抗体 M 2 を通じてプロテイン A セファロースビーズに f l a g - B A F F を結合する。これはまた、f l a g - B A F F に結合する細胞抽出物中の任意のタンパク質をもまた提示し、そしてこれらの放射標識されたタンパク質は、オートラジオグラフィーによって検出される。293 E B N A 細胞は B A F F には結合しないので、空のベクターコントロールは、この手順に固有のバックグラウンドを示す(図8)。T A C I についてトランスフェクトされた細胞由来の抽出物が f l a g - B A F F で同時免疫沈降された場合には、約 34 k D a の見かけの分子量を有するバンドが観察された。これは、B A F F に結合することが既知のタンパク質である、全長のヒト T A C I についてのおおよその推定される分子量(31.2 k D a)である。p J S T 576 でトランスフェクトされた細胞由来の抽出物が f l a g - B A F F で同時免疫沈降される場合には、約 12 k D a の見かけの分子量を有するバンドが観察される。p J S T 576 から発現される B A F F - R についての推定される分子量は、18.9 k D a である。推定される分子量と観察された分子量との間での不一致は、B A F F - R の電荷または立体構造に起因する異常な電気泳動の移動度に起因し得る。別の可能性は、12 k D a が B A F F - R のタンパク質溶解性フラグメントであることである。

10

【0268】

(実施例9)

20

本実施例は、可溶性形態の B A F F - R の作製を記載する。p J S T 576 に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーは、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインが存在しない場合に B A F F - R の細胞外ドメインを P C R 増幅するために設計され得る。典型的には、これは、リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインとの間のほとんどのスタークまたはアミノ酸領域を含む。得られる可溶性レセプターの効力を最適化するために、含まれるスターク領域の量を変更することができる。この増幅されたフラグメントは、フラグメントの 5' 末端上の種々の異種リーダー配列へ、および 3' 末端での種々の I g 融合キメラ融合ベクターへのクローニングを可能にするために、適切な制限部位を用いて操作される。あるいは、B A F F - R の細胞外ドメインの 3' 末端に停止シグナルを挿入し、そして I g 融合キメラのアプローチの使用の代わりに使用に頼ることなく、レセプターの可溶性形態を作製するかまたは別の C 末端融合パートナーを使用することが、可能である。また、シグナル配列、それに続く B A F F - R の N 末端の細胞外ドメインを含有している融合パートナーから構成される N 末端の融合タンパク質を作製することも可能であった。得られたベクターは、酵母、昆虫細胞、細菌、および哺乳動物細胞を含む、バイオテクノロジーにおいて使用されるほとんどのシステムにおいて発現され得、そして複数の例が全てのタイプの発現について存在する。種々のヒト F c ドメインを、所望される場合には、F c R および相補性相互作用を最適化するかまたは排除するために付着させることができる。あるいは、これらの F c ドメインの変異形態を、F c R、または相補性相互作用、または特定の利点を有する F c ドメインに対する N 結合型の糖の結合を選択的に除去するために使用することができる。B A F F - R : F c 融合分子の例を、図9に示す。この分子は、B A F F - R 細胞外ドメイン(図2Dに示すアミノ酸残基2~71)に対して、A a t 2 制限部位によって連結されたマウス I g - k 遺伝子由来の I 型リーダー配列を含む。次いで、これを、ヒト I g G 1 の F c ドメインに対して、S a l I 制限部位によって連結する。

30

40

【0269】

(実施例10)

本実施例において、本発明者らは、ヒト組織および細胞株中での B A F F - R の発現プロファイルを、ノーザンブロット分析によって示す。

50

【0270】

(材料および方法)

種々のB細胞株およびB細胞以外の細胞株を、適切な条件下で増殖させた。RNAを、RNeasyキット(Qiagen)を使用して、約 10^7 個の細胞から調製した。RNAを定量し、そして $20\mu\text{g}$ の各サンプルを、Sambrookら、Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL、1989に記載されているように、1.2%のホルムアルデヒドゲル上で泳動した。ゲルをナイロンメンブレン(BMB)上にプロットし、次いで紫外線(UV)で架橋した。いくつかのヒトのノーザンプロット(12レーンの複数の組織、ヒトIIおよび免疫システムII)を、Clontechから購入した。フィルターを、ExpressHyb(Clontech)緩衝液中で65で30分間、予備ハイブリダイズさせた。次いで、JST576の3'末端由来のランダムプライムした³²Pで標識したEcoNIフラグメントとともに、約3時間ハイブリダイズさせた。フィルターを、 $2\times\text{SSC}/0.05\%$ のSDS中で45分間、室温で洗浄し、次いで、 $0.1\times\text{SSC}/0.1\%$ のSDS中で50で45分間洗浄した。フィルターを、2枚の増感スクリーンを使用して4日間、X線フィルムに露光させた。さらに、いくつかのヒトのノーザンプロット(12レーンの複数の組織、ヒトIIおよび免疫システムII)を、Clontechから購入し、JST576プローブにハイブリダイズさせ、そして上記のように処理した。

10

20

【0271】

(結果)

B A F F - RのmRNAは、この検出レベルで免疫システムの器官において優先的に発現されるようである。最も高いレベルは、脾臓およびリンパ節中であったが、mRNAはまた、PBL、胸腺、小腸、および結腸中にも見られた(図10A、B、およびC)。メッセージのおおよその大きさは4.5kbであった; サンプル中に2つのmRNAの集団が存在するようであり、ここでは、遺伝子は高度には発現されない。2つのmRNAは、なおもまた、脾臓およびリンパ節中に存在し得る。このことは、B A F F - Rが別のポリA付加部位を有するか、またはRNAが別のスプライシングを受けることを示し得る。多数の細胞株を、B A F F - R mRNAの存在について試験した場合には、同じ4.5kbのmRNAが検出される。B細胞株のみが、B A F F - R mRNAを発現する(図11)。U266、RPMI8226、およびDaudi細胞株中、または試験したB細胞以外の細胞株中では、mRNAは検出されなかった。

30

【0272】

(実施例11)

本実施例において、本発明者らは、JST576の発現が、B A F Fに結合する細胞株に制限されることを示す。

【0273】

(材料および方法)

細胞株をATCCから購入し、そして示した条件下で増殖させた。種々のB細胞株およびB細胞以外の細胞株を適切な条件下で増殖させた。RNAを、RNeasyキット(Qiagen)を使用して、約 10^7 個の細胞から調製した。RNAを定量し、そして $20\mu\text{g}$ の各サンプルを、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、1989に記載されているように、1.2%のホルムアルデヒドゲル上で泳動した。ゲルをナイロンメンブレン(BMB)上にプロットし、次いでUV架橋した。フィルターを、JST576標識フラグメントとハイブリダイズさせ、次いで実施例10のように洗浄した。細胞を、B A F Fに結合するそれらの能力について、FACS分析を使用してチェックした。約 $2.5\sim 5\times 10^5$ 個の細胞を回収し

40

50

、そして洗浄した。PBS + 5 % の FCS および 0 . 0 5 % のアジ化ナトリウム (FACS 緩衝液) 中に希釈した FLAG タグ化 B A F F を、30 分間の間、濃度範囲 (8 ~ 0 . 1 2 5 μ g / ml) にわたって細胞とともに、氷上でインキュベートした。細胞を FACS 緩衝液で洗浄し、そして 30 分間氷上で、5 μ g / ml の抗 FLAG モノクローナル抗体 M 2 (Sigma) とともにインキュベートした。再び、細胞を FACS 緩衝液で洗浄し、次いで、ヤギ抗マウス IgG P E 結合抗体 (Jackson Immuno Research) の 1 : 5 0 0 0 希釈とともに、氷上で 30 分間インキュベートした。細胞を上記のように洗浄し、次いで、Cell Quest ソフトウェアを使用して、FACS Calibur フローソーター (Beckton - Dickinson) 上で分析した。

10

【0274】

(結果)

B A F F 結合実験の結果を、表 1 に示す。B A F F に結合した細胞株は、Ramos、Namalwa、IM - 9、NC - 37、Raji、BJAB、および SKW 6 . 4 であった。結合レベルを、+ の記号の数によって示す。B A F F に結合しなかった細胞株は、U 2 6 6、RPMI 8 2 2 6、Daudi、U 9 3 7、Jurkat、HT 2 9、A 5 4 9、SW 4 8 0、および ME 2 6 0 であった。B A F F に結合する細胞株の能力は、図 1 1 に示す B A F F - R m R N A の存在と相関している。

20

【0275】

【表 1】

表1

細胞株	型	BAFF結合
BJAB	Burkittリンパ腫	+++
IM-9	リンパ芽球 IgG	+++
NC-37	リンパ芽球 EBV+	++
Ramos	Burkittリンパ腫 EBV-	++
Raji	Burkittリンパ腫	++
SKW6.4	リンパ芽球 IgM	++
Namalwa	Burkittリンパ腫	+
Daudi	Burkittリンパ腫 EBV+	-
U266	プラズマ細胞腫	-
RPMI 8226	プラズマ細胞腫	-
U937	単球	-
Jurkat	T細胞リンパ腫	-
HT29	結腸直腸腺癌	-
A549	肺癌腫	-
SW480	結腸直腸腺癌	-
ME260	黒色腫	-

30

40

(実施例 12)

本実施例は、一過的にトランスフェクトさせた 293EBNA 細胞中で発現されそしてその細胞により馴化培地中に分泌される、hu B A F F - R : hu IgG 1 融合タンパク質が、組換えの可溶性ビオチン化 myc - hu B A F F を同時免疫沈降させる能力を記載する。

【0276】

(材料および方法)

293EBNA 細胞を、Lipofectamine 2000 (Life

50

Technologies) によって、huBAFF-R(aa2-71):Fcを発現するpJST618、BAFF結合についてのポジティブコントロールとしての、huBCMA:huIgG1を発現するプラスミド、またはBAFF結合についてのネガティブコントロールとしての、huFN14:huIgG1を発現するプラスミドのいずれかで、トランスフェクトした。24時間のインキュベーション後、馴化培地を回収した。

【0277】

SDS-PAGEを、還元剤を含有しているかまたは還元剤を含まない等量の2×SDS泳動緩衝液を馴化培地と混合すること、そして5分間沸騰させることによって行った。次いで、サンプルを、4～20%のSDSポリアクリルアミドゲル上で泳動した。既知の量の精製したhBCMA:Fcを、馴化培地中のIgG1融合タンパク質の量を概算するために、隣接するレーン中で泳動した。サンプルを、0.01MのCAPS pH11～10%のMeOH緩衝液中でのウェスタンブロットによって膜(Immobilion P, Millipore)に移した。膜を、TBS-T中の5%の脱脂粉乳(NFDM)でブロックし、1:3000希釈のヤギ抗ヒトIgG-HRP(Jackson Immuno Research)で1時間ブロープし、TBS-T中で洗浄し、そしてフィルムに露光させた。同時免疫沈降を、200μlの馴化培地を、1mlのDMEM-10%のウシ胎仔血清-0.1%のNaN3中の200ngの可溶性のヒト組換えFLAG-BAFFとともに、4で一晩インキュベートすることによって行った。プロテインA-セファロースを添加し、そしてインキュベーションを2時間継続した。セファロースビーズを遠心分離によって回収し、FACS-TBS-T緩衝液で洗浄し、そして還元剤としてβ-メルカプトエタノールを有するSDSローディング緩衝液中に再懸濁した。サンプルを5分間沸騰させ、セファロースビーズをペレット化させるために軽く遠心分離し、そしてアリコートにSDS-PAGE上で泳動した。50ngのFLAG-huBAFFを、ポジティブコントロールとして泳動した。サンプルを、PVDF膜(Immobilion P, Millipore)に、0.01MのCAPS pH11/10%のMeOH緩衝液中でのウェスタンブロットによって移した。膜を、5%のNFDM-TBS-Tでブロックし、1μg/mlの抗FLAG M2-HRPで1時間ブロープし、TBS-T中で洗浄し、そしてフィルムを露光させた。

10

20

30

【0278】

(結果)

同時免疫沈降は、プロテインAセファロースとの融合パートナーの相互作用を通じて、種々のレセプター:Fc融合体を沈殿させた。これはまた、FLAG-BAFFのような、R:IgG1融合体と相互作用するあらゆるタンパク質をもまた沈殿させた。hBCMA:Fcを発現する細胞による馴化培地は、予期されたように、FLAG-BAFFとの同時移動がウェスタンブロット上で観察されるバンド(図12)としてFLAG-BAFFを同時免疫沈降させることができた。huFN14:Fcを発現する細胞による馴化培地は、FLAG-BAFFを同時免疫沈降させなかった。BAFF-R:Fcを発現する細胞による馴化培地は、FLAG-BAFFを同時免疫沈降させることができた。FLAG-BAFFと同時に移動するバンドがウェスタンブロット上で観察され、そしてこれは、huBCMA:huIgG1によって同時免疫沈降するものと同様の強度であった。

40

【0279】

(実施例13)

本実施例は、BAFF-R:Fc融合タンパク質(本実施例の場合には、huBAFF-R(aa2-71):huIgG1)が、huBAFFのBJAB細胞への結合をブロックする能力を示す。

50

【0280】

(材料および方法)

実施例9で議論したhuBAFF-R(2-71)-huIgG1融合体を作製し、そしてこれをpJST618と呼ぶ。この構築物を293EBNA細胞中に一過的にトランスフェクトし、そしてその馴化培地を回収した。融合タンパク質を、プロテインAセファロースからの酸溶出、それに続くゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。200ng/mlのビオチン化myc-huBAFFを、50μlのFACS緩衝液または精製したhuBAFF-R:Fcの5倍の段階希釈液(5μg/mlから200ng/mlの範囲)のいずれかで、氷上で30分間予備インキュベーションした。次いで、BJAB細胞(2.5×10^5 個の細胞)を、これらの溶液とともに氷上で1時間、インキュベートした。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、そしてSAV-PEで染色した。細胞を、FACSによってPE蛍光について分析し、そしてデータを、重ね合わせたヒストグラムとしてフォーマットした。あるいは、200ng/mlのビオチン化-BAFFを、huBAFF-R:Fc、hTACI:Fc、またはhLTBR:Fcのいずれかの2倍の段階希釈液とともに予備インキュベートした。細胞を、上記のようにビオチン化BAFFの結合について染色した。

10

【0281】

(結果)

図13Aは、種々の濃度のhuBAFF-R:Fcの存在下での、BJABに対するhuBAFFの結合についてプロットしたヒストグラムの重ね合わせを示す。黒線で標識した「A」は、SAV-PEのバックグラウンドの結合を示し、そして赤線で印をつけた「E」は、BAFF-R:Fcとの予備インキュベーションを行わなかった、ビオチン化myc-huBAFFで染色された細胞を示す。ビオチン化myc-huBAFFの5μg/mlのhuBAFF-R:Fcとの予備インキュベーションは、バックグラウンドのレベルに近いヒストグラムの移動を生じた(曲線B)。1μg/ml(曲線C)または200ng/ml(曲線D)のいずれかのhuBAFF-R-huIgG1との予備インキュベーションは、ビオチン化myc-huBAFFの結合において約1/4倍の減少を生じた。

20

30

【0282】

図13Bは、BAFF-R:FcおよびTACI:Fcの両方が、BJAB細胞へのBAFFの結合をブロックできることを示す。LTBR:Fcとの予備インキュベーションは、BAFFをブロックする作用を有さなかった。

【0283】

(実施例14)

本実施例は、BAFFによって誘導されるB細胞の増殖をブロックする、BAFF-R:IgG1融合タンパク質の能力を記載する。

【0284】

(材料および方法)

インビトロでの増殖アッセイのために、マウスB細胞を、C57B16マウス(8週齢)の脾臓から、B細胞回収カラム(カラム(CelllectTM Mouse B Cell Recovery Column: Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada.))を使用して単離した。精製したB細胞をFACSによって分析し、そして90%より多くがB220染色についてポジティブであることを見出した。B細胞を、2mg/mlのヤギ抗ヒトm鎖抗体(Sigma Chemical Co.);コントロールのhIgG(10mg/ml)huBAFF-R:Fc(10mg/ml)の存在下または非存在下で、96ウェルプレート(10%のFBSを補充した50mlのRPMI中で 10^5 個の細胞/ウェル)中で72時間

40

50

、インキュベートした。サンプルを、3連で、そして示した濃度のmyc-hBAFFのとともにプレートした。細胞を、 $[^3\text{H}]$ チミジン($1\mu\text{Ci}$ /ウェル)でさらに18時間パルスし、そして回収した。 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを、液体シンチレーションカウンティングによってモニターした。実施例13のように産生したヒトBAFF-R:Fc融合タンパク質をこのアッセイで使用し、実施例9で議論したように、pJST618でトランスフェクトした293EBNA細胞の上清から作製した。上清を回収し、プロテインAカラム上に充填し、酸で溶出し、中和し、次いで凝集しないhuBAFF-R:Fcタンパク質を得るためにゲル濾過クロマトグラフィーに供した。アッセイで使用したBAFFを*Pichia pastoris*中で発現させ、そして陰イオン交換クロマトグラフィー、続くゲル濾過によって精製した。

10

【0285】

(結果)

図14は、BAFFが抗m抗体(四角)およびhIgG(三角)の存在下でB細胞の増殖を同時刺激することができることを示す。BAFFのみ(ひし形)は、B細胞の増殖を誘導することはできなかった。 10mg/ml のhuBAFF-R:Fc(星型)とのインキュベーションは、BAFFによって誘導されるB細胞の増殖の完全な阻害を生じた。

【0286】

(実施例15)

20

(材料および方法)

(マウス)

6週齢の雌性BALB/cマウスを、The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)から入手し、そしてBiogen Animal Facility中でバリア(barrier)条件下で維持した。

【0287】

(試薬および処置レジメン)

レセプター融合タンパク質は、ヒトIgG1 Fc領域を含む。マウス(5匹/1グループ)に、 $200\mu\text{g}$ の融合タンパク質(マウスBAFF-R:FcまたはヒトBAFF-R:Fc)を、2回/週で4週間の間、ip(腹腔内)で与えた。コントロールマウスには、 $200\mu\text{g}$ のポリクローナルヒトIgG(Pan globulinTM)(hIgG)を、2回/週で4週間にわたり与えた。最後の投薬の3日後、血液を眼窩空洞から回収し、次いでマウスを安楽死させ、そして脾臓、リンパ節、および骨髄を分析のために回収した。

30

【0288】

(フローサイトメトリー分析)

屠殺時に、脾臓の重量を記録した。単細胞懸濁物を、低張の溶液中で赤血球を溶解させた後に脾臓および血液から調製した。単細胞懸濁物もまた、単径部のリンパ節および骨髄から調製した。フローサイトメトリーを、B220、IgM、IgD、およびCD21に対して指向させたmAbを使用して行った。脾臓のB細胞のサブ集団を、濾胞(B220^+ 、 IgM^{low} 、 CD21^{low})、辺縁帯(B220^+ 、 IgM^{hi} 、 CD21^{hi})、および新しく形成された(B220^+ 、 IgM^{hi} 、 CD21^-)と定義した。簡潔には、約 1.5×10^6 個の細胞を、Fcレセプターをブロックするために、 $10\mu\text{g/ml}$ のFc Block(Pharmingen)とともに氷上で10分間インキュベートし、続いて、蛍光タグ化mAbを添加し、そして氷上で30分間インキュベートした。細胞を、1回洗浄し、そして0.5%のパラホルムアルデヒド中に再懸濁した。細胞の蛍光データを、FACSCaliburフローサイトメーター(Beckton Dickinson, San Jose, CA)上で獲得し、そしてCell Questソフトウェア(Beckton Dickinson)を使用し

40

50

て分析した。

【0289】

(結果)

マウスまたはヒトBAFF-R:Fcでの4週間の処置経過後に、コントロールのヒトIgGで処置したマウスと比較した、マウスおよびヒトBAFF-R:Fcで処置したマウス由来の脾臓の重量における著しい減少が存在した(図15)。脾臓の細胞の明らかな減少が、多数の脾臓B細胞中での減少による結果であることが見出された。マウスおよびヒトBAFF-R:Fcで処置したマウス中の全B220+脾臓B細胞の平均の数は、それぞれ、 1.8×10^6 細胞および 2.6×10^6 細胞であり、これらは、コントロールのヒトIgGで処置した動物中のB細胞の数(これは、 19.8×10^6 細胞の平均を有した)と比較して明らかに減少していた(図16)。脾臓B細胞の種々のサブ集団(濾胞、辺縁帯、および新しく形成された領域)の試験は、それぞれのサブセット中のB細胞の数が、BAFF-R:Fcで処置されたマウスにおいて減少した(表2)が、濾胞および辺縁帯のB細胞が、最も大きく減少したことを示した。

10

【0290】

【表2】

表2. BAFF-R:Fcでの処置は、脾臓B細胞のサブ集団の減少を生じる

	脾臓B細胞のサブ集団 (10^6 細胞 $\pm$ SD)		
	濾胞	辺縁帯	新しく形成された領域
ヒトIgG	14.5 ± 2.4	1.1 ± 0.3	1.5 ± 0.2
mBAFF-R:Fc	0.7 ± 0.1	0.06 ± 0.02	0.4 ± 0.1
hBAFF-R:Fc	1.4 ± 0.5	0.05 ± 0.02	0.5 ± 0.2

20

1,4,8,11,15,18,22および25日目に、200 μ gのヒトIgG、mBAFF-R:FcまたはhBAFF-R:Fcをマウスに与えた。28日目にマウスを安楽死させ、そして脾臓をB細胞のサブセットの分析のために回収した。

30

単径部のリンパ節(LN)に含まれるB220+のB細胞の割合の試験は、平均のB細胞の集団が、 $30.8\% \pm 4.1$ のB細胞の平均を有したコントロールのヒトIgGで処置したマウスと比較した場合に、マウスおよびヒトBAFF-R:Fcで処置したマウスにおいて顕著に減少した(それぞれ、 $12.3\% \pm 1.4$ および $18.6\% \pm 1.3$)ことを示した(図17)。同様の結果を、末梢血B細胞を試験した場合に得た。ヒトIgGで処置したマウス由来のリンパ球の $42.5\% \pm 2.9$ がB細胞であり、一方、リンパ球の $21.2\% \pm 6.1$ および $8.3\% \pm 4.5$ のみが、それぞれ、マウスおよびヒトのBAFF-R:Fcで処置されたマウス由来のB細胞であった(図18)。

40

【0291】

新しく形成された(未成熟の)B細胞および成熟B細胞の集団は、BAFF-R:Fcで処置したマウスにおいては減少したが、骨髄中のB細胞前駆体は、影響されないままであった(データは示さない)。

【0292】

(考察)

これらの結果は、可溶性のBAFF-Rレセプター融合タンパク質でのBAFFのインビボでの遮断が、B細胞の生存性および/または成熟の障害を導くことを示唆する。

【0293】

これらの結果はまた、B細胞によって媒介される疾患における臨床的な適用で

50

の治療薬としてのBAFF-R融合タンパク質の使用の可能性をも示唆する。疾患には、自己免疫性の性質の疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑症、抗リン脂質症候群、シャーガス病、グレーブズ病、ヴェーゲナー肉芽腫症、結節性多発動脈炎、および急性進行性糸球体腎炎）が含まれる。この治療薬はまた、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、H鎖病、原発性アミロイド症または免疫細胞関連アミロイド症、および意義不明単クローン性高ガンマグロブリン血症（monoclonal gammopathy of undetermined significance）（MGUS）のような、プラズマ細胞の障害における適用を有する。腫瘍学の標的には、B細胞癌腫、白血病、およびリンパ腫が含まれる。

10

【0294】

（実施例16）

本実施例においては、BAFF-Rの細胞外ドメインに対して惹起されたマウスモノクローナル抗体の最初のパネルの特徴付けを記載する。全ての抗体がBAFF-Rの細胞外ドメインを認識し、そしてこれらの抗体のサブセットは、続くBAFF-RへのBAFFの結合を妨げるというアンタゴニスト特性を有する。

【0295】

（材料および方法：）

RBfマウスを、huBAFF-R：Fcで免疫し、そして追加免疫した。免疫マウス由来の脾臓細胞を、標準的な技術によるハイブリドーマの作製のために、株P3-X63-Ag8.653の誘導体であるマウスの黒色腫株FL653と融合させた。

20

【0296】

huBAFF-Rの細胞外ドメインに対する抗体を分泌するハイブリドーマクローンによる馴化培地を、FACSによってアッセイした。FACS結合アッセイを、実施例5のように、全長のhuBAFF-RまたはmuBAFF-RおよびGFPを発現するプラスミドで同時トランスフェクトした293EBNA細胞について行った。ハイブリドーマの馴化培地を、FACS緩衝液中で1：10で希釈し、そしてトランスフェクトした細胞とともに氷上で30分間インキュベートした。細胞を、FACS緩衝液で洗浄し、そして、結合を、1：100希釈の抗マウスIgG（H+L）（Jackson ImmunoResearch）とともに氷上で30分間インキュベーションすることによって明らかにした。細胞を、再びFACS緩衝液で洗浄し、そしてFACS緩衝液中の1%のパラホルムアルデヒド中に再懸濁した。細胞を、GFPおよびPE蛍光についてFACSによって分析し、そして実施例5に記載したように、データを、四分円ドットプロットにフォーマットした。BAFFブロッキングアッセイを、10μg/mlのプロテインAで精製した抗BAFF-R mAbまたはコントロール抗体（MOPC21）をBJAB細胞とともに氷上で30分間インキュベートすることによって行った。洗浄後、細胞を、250ng/mlのビオチン化huBAFFとともに氷上で30分間インキュベートした。再び、細胞を洗浄し、そしてBAFFの結合を、SAV-PEとともにインキュベーションすることによって明らかにした。細胞を、PE蛍光についてFACSによって分析し、そしてデータを、重ね合わせヒストグラムとしてプロットした。

30

40

【0297】

（結果）

10個のクローンに由来する上清が、huBAFF-Rでトランスフェクトした細胞に結合することを観察した。10個の抗BAFF-R上清のうちの4個のFACSデータのドットプロットを、図19Aに示す。トランスフェクション効率は約50%であり、ほぼ全てのトランスフェクトされた細胞が、上清での染色

50

後に右上側の四分円に移動した。これらの10個の上清の全てが、m u B A F F Rでトランスフェクトされた293EBNA細胞に結合しなかった(データは示さない)。B A F F - Rへの結合についてポジティブであったクローンによる馴化培地を、B J A B細胞の表面上で発現されるB A F F - RとのB A F Fの相互作用をブロックするそれらの能力について試験した。B J A B細胞はそれらの表面上にB A F F Rを発現し、そして検出可能な量のB C M AまたはT A C Iは発現しなかった(Thompsonら(2001) Science、8月16日)。10個のハイブリドーマのうちの2個(クローン2および9)がm A bを産生し、このm A bはB A F FとのB A F F - Rの相互作用をブロックすることができた。(クローン2を、「抗 - B A F F - Rクローン# 2 . 1」(I g G 1 - κイソ型)として、2001年9月6日にA T C Cに寄託し、これは、A T C C No . _____を割り当てられた;クローン9を、「抗 - B A F F - Rクローン# 9 . 1」(I g G 1 - κイソ型)として、2001年9月6日にA T C Cに寄託し、これは、A T C C No . _____を割り当てられた)。図19Bのヒストグラムの重ね合わせは、10 μ g / m lのm A bクローン2(曲線(b))または9(曲線(c))のいずれかの予備インキュベーションが、左側よりも10倍大きく、B A F Fコントロールを含まないシグナル(曲線(a))の近くにまで、B A F F結合曲線をシフトさせたことを示す。最も右側のヒストグラム(曲線(d))は、コントロールのm A b M O P C 2 1、抗B A F F - R非ブロッキングm A b、またはタンパク質なしを、B A F Fの結合の前に細胞とインキュベートした場合の移動を示す。

10

20

【0298】

(実施例17)

本実施例は、組換え発現された分子の可溶性の増大を生じる、h B A F F - R 2 - 7 1) - F c中のアミノ酸置換の構築、配列、およびタンパク質の特徴付けを記載する。

【0299】

(材料および方法:)

粘着末端を有する2本鎖のオリゴヌクレオチドカセットを、h B A F F - R (2 - 7 1): I g G 1遺伝子中の同じ部位への連結によって、標的化した残基に置換を導入するために使用した。

30

【0300】

発現プラスミドを、L i p o f e c t a m i n e 2000を使用して実施例5のように293EBNA細胞中にトランスフェクトした。凝集を、実施例12のように、トランスフェクションの20時間後の馴化培地の非還元性S D S - P A G Eの実行、それに続くウェスタン転写、およびH R P結合抗ヒトI g G (1:100、J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h)での検出およびE C L検出によって決定した。

【0301】

免疫沈降実験を、200 n gのf l a g - h u B A F Fを有する1 m lのD M E M / 10 % F B S / 0 . 2 %のN a A 3中の、100 μ lのトランスフェクション20時間後の馴化培地を利用して行った。サンプルを、30分間4で振盪させ、1つのチューブあたり30 μ lのプロテインA - セファロースを添加し、そしてさらに30分間振盪を続けた。セファロースビーズをスピンドウンさせ、そして1 m lの冷P B Sで3回洗浄した。ビーズを、2 × S D S還元緩衝液中に再懸濁し、そして4 ~ 20 %のアクリルアミドゲル上にローディングした。先に記載したようなウェスタン転写後、f l a g - B A F Fを免疫沈降させる能力を、1 μ g / m lのH R P結合抗f l a g M 2 (S i g m a)とともにフィルターをインキュベーションし、続いてE C L検出することによって明らかにした。

40

【0302】

50

(結果)

ヒト B A F F - R : F c は高度に凝集したが、マウス B A F F - R : F c は、ごくわずかに (1 0 % 未満) に凝集するのみであった。検出分析は、凝集の形成を減少させることなく、B A F F - R の C 末端部分全体を、A 7 1 から V 3 6 まで欠失させることができることを示した (システインリッチドメイン (C R D) の最後の C y s は C 3 5 である) 。このことは、h B A F F R の N 末端および C R D 領域が、凝集の形成に必要であることを示した。

【 0 3 0 3 】

最初に、ヒト B A F F - R の N 末端配列の種々の量が、相同なマウス配列と置きかえられておりかつタンパク質凝集に対する影響について分析される、いくつかのマウス - ヒト B A F F - R : F c キメラを作製した。これらおよび続く h B A F F - R : F c への置換についてのアミノ酸配列を、図 2 0 に示す。この図は、「野生型」ヒト (図 9) およびマウス B A F F - R : F c の両方の B A F F - R 部分を示し、番号は、全長のヒト (図 2 d) (配列番号 5) またはマウス B A F F - R (図 4 b) (配列番号 9) に由来するアミノ酸残基に対応している。図 2 0 はまた、太字、赤、下線のタイプで示された置換された残基を有する、置換を有する h B A F F R - R : F c クローンを示す。ヒトへのスイッチングの前のマウスの残基の最初の 2 1 個 (Q 2 1) 未満を含有しているキメラは、野生型 h B A F F - R : F c と同様に凝集するようである ; しかし、少なくとも最初の 3 9 個のマウスの残基を含むものは、m B A F F - R と同様に、明らかに減少した様式で凝集した。これらの 2 つのキメラ B A F F - R : F c 構築物間のさらなる 9 個の残基の差異のうち、4 個は、マウスとヒトとの間で異なった。このことは、C 1 9 と L 2 7 との間 (C R D に対して内部である領域) でのヒト残基の少なくとも 1 つが、凝集に必要であることを示した。

【 0 3 0 4 】

これらの 4 個の部位のみまたはこれらのサブセットにおいて、ヒト残基がマウスに対応しているもので置換されている構築物を、標準的な技術を使用して作製した。4 個の残基 (V 2 0 N、P 2 1 Q、A 2 2 T、L 2 7 P) のみが、ヒト B A F F R 部分に置換された場合には、この改変された B A F F - R : F c は凝集しなかった。h B A F F - R (V 2 0 N、P 2 1 Q、A 2 2 T、L 2 7 P) : F c はなお、免疫沈降によって分析した場合には、B A F F と相互作用できた。V 2 0 N L 2 7 P 置換もまた、約 9 0 % から約 1 0 % に、h B A F - R : F c の凝集を減少させた。中程度のレベルの凝集が、P 2 1 Q L 2 7 P (4 0 %)、L 2 7 P (6 0 %)、V 2 0 N L 2 7 A (6 0 %)、および V 2 0 N L 2 7 S (6 0 %) を用いて観察された。以下の置換の全ては、タンパク質の凝集を減少させなかった : V 2 0 N P 2 1 Q A 2 2 T ; V 2 0 N A 2 2 T ; V 2 0 N P 2 1 Q ; V 2 0 N ; および P 2 1 Q。

【 0 3 0 5 】

(実施例 1 8)

本実施例は、p 2 1 - A r c が、B A F F - R に関係しているタンパク質であることを記載する。このような相互作用を決定するために使用した方法は、免疫沈降であった。

【 0 3 0 6 】

(方法)

N 末端に m y c タグを融合された B A F F - R (B A F F - R - i . c . d .) の細胞内ドメインをコードする c D N A を含有している構築物を作製し、そして C H 2 6 9 プラスミドの N h e I (5 ') および X h o I (3 ') 部位にサブクローン化した。2 9 3 E 細胞をこの構築物でトランスフェクトし、そして 1 5 0 m M の N a C l、5 0 m M の T r i s - H C l (p H 7 . 5)、1 m M の N a 3 V O 4、5 0 m M の N a F、および 1 % の B r i j 9 7 を含有している溶解

緩衝液で72時間後に溶解させた。細胞溶解物を、10,000gで5分間の卓上型遠心分離器を用いて明澄化させ、そして抗mycモノクローナル抗体9E10で免疫沈降させた。免疫沈降物を、還元条件下での10~20%のSDS-PAGEによって分離し、そしてPVDF膜上にトランスブロットした。ブロットしたタンパク質を、0.2%のPonceau S溶液を用いて可視化し、そしてBAFF-Rに特異的に結合しているタンパク質に対応している領域を切り出し、そしてN末端アミノ酸の配列分析に供した。PATTERN SEARCHアルゴリズムを使用する非重複タンパク質データベースの曖昧検索を、得られたN末端配列のデータについて行った。

【0307】

10

(結果)

mycタグ化BAFFR細胞質ドメインと特異的に結合したタンパク質の1つは、21kDaの見かけの分子量を有した。このタンパク質を、p21-Arc(アクチン関連タンパク質複合体)として明確に同定した。p21-Arcは、アクチンの重合に関係していることが示されている、Arp2/3複合体と呼ばれる7個のサブユニットのタンパク質の成分である(Welchら(1997)J. Cell Biol. 138:357)。最近、アクチン結合タンパク質であるフィラミン(filamin)が、腫瘍壊死因子レセプター関連因子2(TRAF2)と結合することが報告された(Leonardiら(2000)J. Biol. Chem. 275:271)。従って、BAFFR細胞質ドメインの同時免疫沈降物中でのp21-Arcの同定は、p21-Arcが、BAFFRに直接結合するか、またはTRAF2および/もしくは他のTRAFタンパク質とのその結合を通じてBAFFRと間接的に結合し、次いでBAFFRと結合するかのいずれかであることを示唆した。

20

【0308】

本発明の特定の実施形態の上記の詳細な説明から、特有のものが記載されていることが明らかである。特定の実施形態が本明細書中で詳細に開示されているが、これは説明の目的だけのための例に過ぎず、そして以下の添付の特許請求の範囲に関しての限定は意図されない。詳細には、種々の置換、変更、および改変が、特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲を逸脱することなく、本発明に対して行われ得ることが、発明者により意図される。

30

【化 1】

SEQUENCE LISTING

<110> Biogen, Inc.
Thompson, Jeffrey S
Ambrose, Christine M

<120> Receptor Nucleic Acids and Polypeptides

<130> BIOG-0086

<150> 60/233,152

<151> 2000-09-18

10

<150> 60/234,140

<151> 2000-09-21

<150> 60/268,499

<151> 2001-02-13

<150> 60/312,185

<151> 2001-08-14

<160> 37

<170> PatentIn version 3.1

20

<210> 1

<211> 1201

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
gcaccatgag gcgagggccc cggagcctgc ggggcagggc cgcgccagcc cccacgccct 60
ggtgcccgcc cgagtgtctc gacctgtctg tccgccactg cgtggcctgc gggctcctgc 120
gcacgcccgcc gccgaaaccg ggtaaggggg acccacgggg cgcgcggcgc cggcagctgc 180
ggggagaacg gggcccccgat cgccagggcg caggcagagc cccgaccccc gggggcgccg 240
agggctgaaa ggacctgtg ggcagggcct ggagggggcc gcgatcaccc cgtggccctc 300
accgcgcct ctctccctcc ccttgtccac cgcgcccgcc ctgtccctcc cctcccgcc 360
cagcctcgcc cccctccgcc cctcccgctc ccgcctctc cctccctctg gcccctggc 420
ctccctccct gtccctccc gaagcagccg gggccagcag ccctgcgccc aggcagggcg 480
tgcagccgca ggagtcggcg ggcgcggggg ccggcgaggc ggcgctgccc ctgcccgggc 540
tgctcttttg cgcccccgcc ctgtctgggc tggcactggt cctggcgctg gtccctggcg 600
gtctgtgtag ctggaggcgg cgacagcgcc ggcttcgcgg cgcgtcctcc gcagaggccc 660
ccgacggaga caaggacgcc ccagagcccc tggacaaggc catcattctg tctccgggaa 720
tctctgatgc cacagctcct gcctggcctc ctctgggga agacccagga accacccccc 780
ctggccacag tgtccctgtg ccagccacag agctgggctc cactgaactg gtgaccacca 840
agacggccgg ccctgagcaa caatagcagg gagccggcag gaggtggccc ctgccctccc 900
tctggacccc cagccagggg cttggaaatc aaattcagct cttcactcca gcattgcacat 960

30

40

【化 2】

```

gccctctttc tgggaccagg ctaaccctgc agaagcacag acactacaga ccacagcatt 1020
cagcccccat ggagtttggg gtgcttgccct ttggcttcag acctcaccat ctttgacagc 1080
ccttgaaggt ggtagcccag ctctgttcc tgtgccttca aaaggctggg gcactatgag 1140
taaaagaccg cttttaaaat ggggaaggca ccattaagcc aaaatgaatc tgaaaaaaga 1200
c 1201

```

```

<210> 2
<211> 992
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

10

```

<400> 2
gtcgaccac gcgtccgccc acggtccgg tgcggggcg tcggcaccat gaggcgagg 60
ccccggagcc tgcggggcag ggacgcgcca gcccacgc cctgcgtccc ggccgagtgc 120
ttcgacctgc tgggtccgcca ctgcgtggcc tgcgggctcc tgcgcacgcc gcggccgaaa 180
ccgggtaagg gggacccacg gggcgcgcg cgccggcagc tgcggggaga acggggcccc 240
gatcgccagg gcgcaggcag agccccgacc cccggggcg ccgagggctg aaaggacctt 300
gtgggcaggg cctggagggg cccgcgatca ccggtggcc ctcccgccg cctctctccc 360
tccccttgtc caccgcccc cggtgtccc tcccctccc gccagccct gcccccctcc 420
gcccctccc gtcccgcctc ctccctccc tcggccccct ggctccctc cctgtccct 480
cccgaagcag cgggggccag cagccctgcg ccaggacgg cgctgcagcc gcaggagtgc 540
gtgggcgcg gggccggcga ggcgcgctg cccctgccc ggtgtctct tggcgcccc 600
gcgtgtctgg gcctggcact ggtcctggcg ctggctctgg tgggtctggt gagctggagg 660
cggcgacagc ggcggcttcg cggcgctcc tccgcagagg ccccgacgg agacaaggac 720
gccccagagc ccctggacaa ggtcatcatt ctgtctccg gaatctctga tgccacagct 780
cctgcctggc ctctcctgg ggaagaccca ggaaccacc cacctggcca cagtgtccct 840
gtgccagcca cagagctggg ctccactgaa ctggtgacca ccaagacggc cggccctgag 900
caacaatagc agggagccgg caggaggtgg cccctgccct ccctctggac cccagccag 960
gggcttgga atcaaattca gctcttact cc 992

```

20

30

```

<210> 3
<211> 906
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

40

```

<400> 3
ggcgccgc accatgaggc gaggggccc gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc 60
cacgcctgc gtcccgccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgc tggcctgcgg 120
gctcctgcgc acgcccggc cgaaaccggc agccggggcc agcagccctg cgccagggac 180

```

【化 3】

ggcgctgcag ccgcaggagt cgggtggcgc gggggccggc gaggcggcgc tgccctgcc 240
 cgggctgctc tttggcgccc ccgcgctgct gggcctggca ctggctcctg cgctggctct 300
 ggtgggtctg gtgagctgga ggcgccgaca gggcgggctt cgcggcgctt cctccgcaga 360
 ggcccccgac ggagacaagg acgccccaga gccctggac aaggctcatca ttctgtctcc 420
 ggggaatctct gatgccacag ctcttgctg gccctcctct ggggaagacc caggaaccac 480
 cccacctggc cacagtgtcc ctgtgccagc cacagagctg ggctccactg aactggtgac 540
 caccaagacg gccggccctg agcaacaata gcaggagacc ggcaggaggt ggccccctgcc 600
 ctccctctgg accccagcc aggggcttgg aaatcaaatt cagctcttca ctccagcatg 660
 cacatgccct ctttctggga ccaggctaac cctgcagaag cacagacact acagaccaca 720
 gcattcagcc cccatggagt ttgggtgtgtc tgcccttggc ttcagacctc accatctttg 780
 acagcccttg aaggtagtag ccagctcct gtctctgtgc cttcaaaagg ctggggcact 840
 atgagtaaaa gaccgctttt aaaatgggga aggcaccatt aagccaaaat gaatctgaaa 900
 aaagac 906

10

<210> 4
 <211> 903
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 4
 ggcgccccgc accatgaggg gagggccccc gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc 60
 cagccctgc gtcccgccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg 120
 gctcctgcgc acgcccggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc 180
 gctgcagccg caggagtgcg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcgctgc cctgccccg 240
 gctgtctctt ggcccccgc cgctgctggg cctggcactg gtccctggcgc tggctcctgg 300
 ggggtctggt agctggaggg ggccagacgc gcggcttcgc ggccgctcct ccgcagaggg 360
 ccccgacgga gacaaggacg cccagagacc cctggacaag gtcattcatc tgtctccggg 420
 aatctctgat gccacagctc ctgctggcc tctcctggg gaagaccag gaaccacccc 480
 acctggccac agtgtccctg tgccagccac agagctgggc tccactgaac tggtagaccac 540
 caagacggcc ggccctgagc aacaatagca gggagccggc aggaggtggc ccctgccctc 600
 cctctggacc ccagccagg ggcttgaaa tcaaatcag ctcttcactc cagcatgcac 660
 atgccctctt tctgggacca ggctaaccct gcagaagcac agacactaca gaccacagca 720
 ttcagccccc atggagtctt gtgtgcttgc ctttggttc agacctcacc atctttgaca 780
 gcccttgaag gtggtagccc agctcctgtt cctgtgcctt caaaaggctg gggcactatg 840
 agtaaaagac cgcttttaaa atggggaagg caccattaag ccaaaatgaa tctgaaaaaa 900
 gac 903

30

40

【化 4】

<210> 5
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
 20 25 30

10

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
 35 40 45

Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val
 50 55 60

Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe
 65 70 75 80

Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu
 85 90 95

20

Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala
 100 105 110

Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu
 115 120 125

Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro
 130 135 140

30

Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His
 145 150 155 160

Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr
 165 170 175

Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 180 185

<210> 6
 <211> 1187
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

40

<400> 6
 gggcgccctac aatctcagct actcgggagg ctgaggcaga gaattgtttg aaccggggag 60

【化 5】

gcagagcttg cagttagccg agatagcgcc attgcactcc agcctgggcg acagagcgag 120
 actccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaaaga aagggggggc ccaggcgagc tcgggtcccac 180
 ccagcaggcg gggggcggggc agggcagagt gctccccccg ccccccgctt cctccccgag 240
 ggccccggag ccagctcag cctcagtcce cgcagcttgt gcggcgcgct cggcaccatg 300
 aggcgagggc cccggagcct gcggggcagg gacgcgccag cccccacgcc ctgcgtcccg 360
 gccgagtget tcgacctget ggtccgccac tgcgtggcct gcgggctcct gcgcacgcgc 420
 cggccgaaac cggccggggc cagcagccct gcgcccagga cggcgctgca gccgcaggag 480
 tcgggtggcg cggggggcgg cgaggcgggc ctgccctgc ccgggctget ctttggcgcc 540
 cccgcgtgc tgggcctggc actggctctg gcgctggtcc tgggtgggtct ggtgagctgg 600
 aggcggcgac agcggcggt tcgcggcgcg tctccgcag agggcccccga cggagacaag 660
 gacgccccag agcccttga caaggtcatc attctgtctc cgggaatctc tgatgccaca 720
 gctctgcct ggcctctcc tggggaagac ccaggaacca cccacctgg ccacagtgtc 780
 cctgtgccag ccacagagct gggctccact gaactggtga ccaccaagac ggccggccct 840
 gagcaacaat agcagggagc cggcaggagg tggccctgc cctccctctg gacccccagc 900
 caggggcttg gaaatcaaat tcagctcttc actccagcat gcacatgcc tctttctggg 960
 accaggctaa ccctgcagaa gcacagacac tacagaccac agcattcagc ccccatggag 1020
 tttggtgtgc ttgcctttgg cttcagacct caccatcttt gacagccctt gaaggtggta 1080
 gccagctcc tgttctgtg ccttcaaaag gctggggcac tatgagtaaa agaccgcttt 1140
 taaaatgggg aaggcaccat taagccaaaa tgaatctgaa aaaagac 1187

<210> 7
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Thr Arg Glu Ala Glu Leu Ala Val Ser Arg Asp Ser Ala Ile Ala Leu
 1 5 10 15

Gln Pro Gly Arg Gln Ser Glu Thr Pro Ser Gln Lys Lys Lys Lys Lys
 20 25 30

Arg Lys Gly Gly Pro Arg Arg Ala Arg Ser His Pro Ala Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Ala Gly Gln Ser Ala Pro Pro Ala Pro Arg Phe Leu Pro Glu Gly
 50 55 60

Pro Gly Ala Gln Leu Ser Leu Ser Pro Arg Ser Leu Cys Gly Gly Val

【化 6】

65	70	75	80	
Gly Thr Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro	85	90	95	
Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg	100	105	110	
His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala	115	120	125	10
Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser	130	135	140	
Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu	145	150	155	160
Phe Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val	165	170	175	
Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly	180	185	190	20
Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro	195	200	205	
Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala	210	215	220	
Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly	225	230	235	240
His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val	245	250	255	
Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln	260	265		
<210> 8				
<211> 1943				
<212> DNA				
<213> Mus musculus				40
<400> 8				
gaattcggca cgagcccaga ctcggaactg tcccagctgc atgaggcggc gacatgggcg				60
ccaggagact ccgggtccga agccagagga gccgggacag ctcggtgcc acccagtgc				120
atcagaccga gtgcttcgac cctctggtga gaaactgcgt gtctgtgag ctcttcaca				180
cgccggacac tggacataca agcagcctgg agcctgggac agctctgcag cctcaggagg				240

【化 7】

gctccgcgct gagacccgac gtggcgctgc tgcgcggtgc ccccgactc ctgggactga	300	
tactggcgct gaccctgggt ggtctagtga gtctgggtgag ctggagggtgg cgtcaacagc	360	
tcaggacggc ctccccagac acttcagaag gagtccagca agagtccctg gaaaatgtct	420	
ttgtaccctc ctcaaaaacc cctcatgcct cagctcctac ctggcctcog ctcaaagaag	480	
atgcagacag cgccttgcca cgcacacagc tcccggtgcc cgcacagaa ctggggtcca	540	
ccgagctggt gaccaccaag acagctggcc cagagcaata gcagcagtgg aggctggaac	600	10
ccagggatct ctactgggct tgtggacttc acccaacagc ttgggaaaga acttggccct	660	
tcagtgcagg agtcctttgc ctggggggcg aaccggcag aaccagacac tacaggccac	720	
atgagattgc ttttgtgtta gctcttgact tgagaacggt ccatttctga gatgggtttt	780	
aagcctgtgt gccttcagat ggttgatag acttgagggt tgcataatta atctctgtag	840	
tgagtcggag actggaaact taatctcggt ctaaaaattt tggattactg ggctggagggt	900	
atggctcagc agttcggttt gtgtgctggt ctagccgagg actccagttg ttcagcttcc	960	
cggaaactcag atctggcagc ttaagaccac ctgtcactcc agcccctgga acatccttgc	1020	
ctccaaaggc accagcactc atttgcctta gagcacacac acacacacac acacacacac	1080	20
acacacacac acacacacat atgcatgcat gcacacttaa aaatgtcaaa attagcggct	1140	
ggagaaattc atgggtcaaca gcgcttactg tgattccaga ggatgagagt ttgattccca	1200	
gaatgcactg cgggtggctc attactgagc ataacttttg cttcagggga cctgatgcct	1260	
ctggacttca tgggcatctg tattcacgtg cacatcctac acacacacac acacacacac	1320	
acagacatac acacacacac actcttttac aaatgataaa atataagata ggcatgggtg	1380	
tacacacctt taatcccaac attggggaag caaaggcagg caggtaactg agttggaggc	1440	
catcctggtc tacatagcaa gttccaggct aaccagagct aaatggtgag accaagtctc	1500	30
aaaataatac tccccccca aaaaaaaaaa acttttaaat tttgattttt ttcttttatt	1560	
attatttttt atattaattt catggtgttt agaagtggta tacttagatg gtgactaaga	1620	
ggaggtaaag ccacaggac tgagcccta acatacaagg agaaagcaga gacaatgaac	1680	
acgcccctct cctgctgtgt gccagctctg gaccaccagc cagagggcaa tcatcagatg	1740	
tgggccctag aaccttcaga gccgaaagct aaatcaatct catttctttg taaagctatt	1800	
tagccttagg tgttttgta cggatgata aaatggacta acacaggcac tatgagtaag	1860	
aagcttttct ttgagctggg aaagggtactg ttaaaccaaa attaatctga ataaaaaag	1920	40
gctaagggga agacacttaa aaa	1943	

<210> 9
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

【化 8】

<400> 9

Met Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val
20 25 30

Arg Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His
35 40 45

10

Thr Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser
50 55 60

Ala Leu Arg Pro Asp Val Ala Leu Leu Val Gly Ala Pro Ala Leu Leu
65 70 75 80

Gly Leu Ile Leu Ala Leu Thr Leu Val Gly Leu Val Ser Leu Val Ser
85 90 95

Trp Arg Trp Arg Gln Gln Leu Arg Thr Ala Ser Pro Asp Thr Ser Glu
100 105 110

20

Gly Val Gln Gln Glu Ser Leu Glu Asn Val Phe Val Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Thr Pro His Ala Ser Ala Pro Thr Trp Pro Pro Leu Lys Glu Asp Ala
130 135 140

Asp Ser Ala Leu Pro Arg His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu
145 150 155 160

Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln
165 170 175

30

<210> 10

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
20 25 30

40

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
35 40 45

【化 9】

Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
50 55 60

Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly
65 70 75 80

Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val
85 90 95

Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
100 105 110

Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
115 120 125

Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
130 135 140

Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
145 150 155 160

Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr
165 170 175

Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
180

<210> 11
<211> 963
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(63)
<223> encodes signal peptide

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(66)
<223> introduces restriction site

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(276)
<223> encodes BAFF-R extracellular region

<220>
<221> misc_feature
<222> (277)..(279)

【化 1 0】

<223> introduces restriction site

<220>

<221> misc_feature

<222> (280)..(960)

<223> encodes human IgG1 Fc

<400> 11

atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60	
gacgtcaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggaag cgccagcccc caccgctgac	120	10
gtcccgcccg agtgcttcga cctgctgggc cgccactgag tggcctgcgg gctcctgcgc	180	
acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc gctgcagccg	240	
caggagtcgg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcggtcg acaaaactca cacatgcccc	300	
ccgtgcccag cactgaact cctgggggga ccgtcagctt tctcttccc cccaaaaccc	360	
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc	420	
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc	480	
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc	540	20
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc	600	
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	660	
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	720	
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	780	
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ttggactccg acggctcctt cttcctctac	840	
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	900	
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa	960	30
tga	963	

<210> 12

<211> 320

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(21)

<223> signal sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> encoded by region introducing restriction site

<220>

<221> PEPTIDE

【化 1 1】

<222> (23)..(92)
 <223> BAFF-R extracellular domain

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> encoded by region introducing restriction site

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (94)..(320)
 <223> Human IgG1 Fc

10

<400> 12

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

Gly Ser Thr Gly Asp Val Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg
 20 25 30

Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu
 35 40 45

20

Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro
 50 55 60

Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Val Asp Lys Thr
 85 90 95

30

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 100 105 110

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 115 120 125

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 130 135 140

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 145 150 155 160

40

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 165 170 175

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 180 185 190

【化 1 2】

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 195 200 205

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 210 215 220

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 225 230 235 240

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 245 250 255

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 260 265 270

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 275 280 285

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 290 295 300

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 305 310 315 320

<210> 13
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 14
 <211> 65
 <212> PRT

【化 1 3】

<213> Mus musculus

<400> 14

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
 1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg
 20 25 30

Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His Thr
 35 40 45

10

Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser Ala
 50 55 60

Leu
 65

<210> 15
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> substitution

30

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> substitution

40

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> substitution

【化 1 4】

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (12)..(12)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (15)..(15)
 <223> substitution

<400> 15

10

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
 20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
 35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
 50 55 60

20

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 16
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> substitution

30

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> substitution

40

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (12)..(12)
 <223> substitution

【化 1 5】

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (15)..(15)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> substitution

10

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (17)..(17)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (20)..(20)
 <223> substitution

<400> 16

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
 1 5 10 15

20

Val Pro Thr Gln Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
 20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
 35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
 50 55 60

30

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 17
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> substitution

40

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> substitution

<220>

【化 1 6】

<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> substitution

10

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> substitution

20

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (16)..(16)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> substitution

30

<220>
<221> VARIANT
<222> (20)..(20)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

40

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

【化 1 7】

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> substitution

<400> 17

10

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
 1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg
 20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
 35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
 50 55 60

20

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 18
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> substitution

30

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> substitution

40

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> substitution

【化 1 8】

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (12)..(12)
 <223> substitution

10

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (15)..(15)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> substitution

20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (17)..(17)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (20)..(20)
 <223> substitution

30

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (22)..(22)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (23)..(23)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> substitution

40

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> substitution

【化 1 9】

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (33)..(33)
 <223> substitution

<400> 18

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
 1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg
 20 25 30

10

Asn Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
 35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
 50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

20

<210> 19
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (22)..(22)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (23)..(23)
 <223> substitution

30

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> substitution

40

<400> 19

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

【化 2 0】

Pro Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

10

<210> 20
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (22)..(22)
 <223> substitution

20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> substitution

<400> 20

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

30

Pro Cys Asn Pro Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

40

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 21
 <211> 70

【化 2 1】

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

10

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 21

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

20

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

30

<210> 22
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

40

<400> 22

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

【化 2 2】

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

10

<210> 23
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (23)..(23)
 <223> substitution

20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> substitution

<400> 23

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

30

Pro Cys Val Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

40

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 24

【化 2 3】

<211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (23)..(23)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> substitution

10

<400> 24

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

20

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 25
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> substitution

<400> 25

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

40

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala

【化 2 4】

50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 26
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 26

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Ser Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 27
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 27

【化 2 5】

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Ala Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 28
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (22)..(22)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (23)..(23)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> substitution

<400> 28

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

【化 2 6】

<210> 29
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (22)..(22)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> substitution

10

<400> 29

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Thr Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

20

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 30
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (22)..(22)
 <223> substitution

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (23)..(23)
 <223> substitution

40

<400> 30

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

【化 2 7】

Pro Cys Asn Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

10

<210> 31
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (23)..(23)
 <223> substitution

20

<400> 31

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

30

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

<210> 32
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (22)..(22)
 <223> substitution

40

<400> 32

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
 1 5 10 15

【化 2 8】

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
 20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
 35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
 65 70

10

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer

<400> 33
 ggccgagtg c ttcgacctgc t

21

20

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer

<400> 34
 ggtccgccac tgcgtggcct g

21

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Oligonucleotide primer

<400> 35
 caccaagacg gccggccctg a

21

<210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40

<220>
 <223> Oligonucleotide primer

<400> 36
 gggcgccctac aatctcagct a

21

【化 2 9】

<210> 37
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 37
ggcggaccag caggtcgaag cactc

25

10

20

30

40

【 図 1 A 】

Figure 1A
JST576 cDNAクローンの配列

```

1      GCACCATGAG GCGAGGGCCC CGGAGCCTGC GGGGAGGGGA CGCGCCAGCC
51     CCCACGCCCT GCGTCCCGGC CGAGTGCTTC GACCTGCTGG TCCGCCACTG
101    CGTGGCCTGC GGGCTCCTGC GCACGCGCGG GCCGAAACCG GGTAGGGGGG
151    ACCCACGGGG CGCGCGGCGC CGGCAGCTGC GGGGAGAACG GGGCCCGGAT
201    CGCCAGGGCG CAGGCAGAGC CCCGACCCCC GGGGGCGCGG AGGGCTGAAA
251    GGACCTGTG GGCAGGGCCT GGAGGGGCCC GCGATCACCG CGTGGCCCTC
301    ACCGCCGCCT CTCTCCCTCC CTTGTCCAC CGCCCCCGG CTGTCCCTCC
351    CTCTCCCGGC CAGCCTCGGC ACCCTCCGCG CTTCCCGCTC CCGCTCCTC
401    CTTCCCTCG GCCCCTTGGC CTCCCTCCCT GTCCCTCCG GAAGCAGCCG
451    GGGCCAGCAG CCTGCGGCC AGGACGGGCG TGACAGCGCA GGAGTCGGTG
501    GGGCGGGGG CGGCGAGGGC GGGCGTGCCC CTGCCGGGC TGCTCTTTGG
551    CGCCCCCGCG CTGCTGGGCC TGGACTGGT CTTGGCGCTG GTCTGGTGG
601    GTCTGGTGAG CTGGAGGCGG CGACAGCGGC GGCTTCGCG CGCTCCTCC
651    GCAGAGGCCC CGACGGAGA CAAGGACGCC CCAGAGCCCC TGGACAAGGT
701    CATCATCTG TCTCCGGAA TCTGTGATC CACAGCTCCT GCCTGGCCTC
751    CTCTTGSGGA AGACCCAGGA ACCACCCAC CTGGCCACAG TGTCCCTGTG
801    CCAGCCACAG AGCTGGGCTC CACTGAACTG GTGACCACA AGACGGCCGG
851    CCTTGAGCAA CAATAGCAGG GAGCCGGCAG GAGGTGGCCC CTGCCCTCCC
901    TCTGGACCCC CAGCCAGGGG CTTGAAATC AAATTCAGCT CTTCACTCCA
951    GCATGACATAT GCCCTCTTTC TGGGACGAGG CTAACCTGCG AGAAGCACAG
1001   ACACTACAGA CCACAGCATT CAGCCCCCAT GGAGTTTGGT GTGCTTGCTT
1051   TTGGCTTCAG ACCTCACCAT CTTTGACAGC CTTTGAAGGT GSTAGCCAG
1101   CTCCTGTCTC TGTGCTTCA AAAGGCTGGG GCACATAGAG TAAAGACCG
1151   CTTTAAAAAT GGGGAAGGCA CCAATTAGCC AAAATGAATC TGAATAAAGA
1201   C

```

【 図 1 B 】

Figure 1B
EST AI250289 の配列

```

1      GTCGACCCAC GCGTCCGCCC ACGCGTCCGG TCGGGCGGCG TCGGCACCAT
51     GAGGCGAGGG CCCCGAGGCC TGCGGGGCAG GGAAGCGCCA GCCCCACGCG
101    CTTGCGTCCC GSCCGAATGC TTCSACCTGC TGGTCCGCGA CTGGGTGGCC
151    TCGGGGCTCC TGCGCACGCG CGGCGCGAAA CCGGGTAAGG GGGACCCACG
201    GGGCGCGCGG CGCCGCGAGC TGCGGGGAGA ACGGGGCCCG GATCGCCAGG
251    GCGCAGGCG AGCCCCGACC CCCGGGGGCG CGAGGGGCTG AAAGGACCCT
301    GTGGGCAAGG CCTGGAAGGG CCGCGATCA CCGGTGGCC CTCACCCCGG
351    CCTCTCTCCC TCCCTTTGTC CACCGCCCC CGGTGTCCC TCCCTCCTCC
401    GGCAGCTTC GCCCCTCTCC GCCCTCCCG GTCCCGGCTC CTCCTCCCC
451    TCGGCCCTCT GGCTCTCCCT CTTGTCCCT CCGGAAGCAG CCGGGGCCAG
501    CAGCCTTGGG CCCAGGACGG CGCTGCAGCG GCAGGAGTCG GTGGGCGGGG
551    GGGCCGCGA GCGCGCGCTG CCGCTGCGCG GGTGTCTT TGGGCGCCCC
601    GCGCTGTGG GCTTGGACT GTCTCTGGG CTGGTCTGG TGGGTCTGGT
651    GAGCTGGAG GCGCGACAGC GCGCGCTTC CGGCGCTTC TCCGCAAGG
701    CCCCCGACG AGACAAGGAC GCCCAGAGC CCTGGAACA GGTATCATTT
751    CTGTCTCGG GAATCTCTGA TGCCACAGCT CCGCTGCTG CTCCTCTGG
801    GGAAGACCA GGAACCAACC CACTGGCCA CAGTGTCCCT GTGCGAGCCA
851    CAGAGCTGG CTCCTCTGAA CTGTGACCA CCAAGACGGC CGGCCCTGAG
901    CAACAATAGC AGGGAGCGG CAGGAGGTGG CCGCTGCCCT CCTCTGGAC
951    CCCAGCCAG GGGCTTGGAA ATCAAAATCA GCTCTTCACT CC

```

【 図 2 A 】

Figure 2A
GENSCANにより推測した JST576 の配列

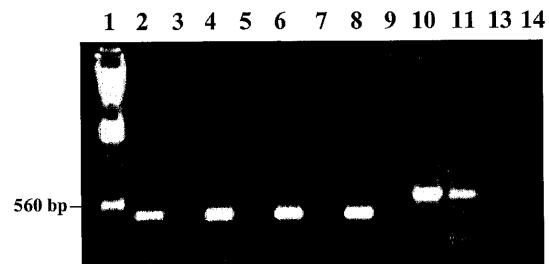
```

1      GCGCGCCCC ACCATGAGGC GAGGGCCCC GAGCCTGCGG GGCAGGAGC
51     CGCCAGCCCC CAGGCCCTGC GTCCCGGCGG AGTGCTTGA CCTGTGGTC
101    CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GCTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151    AGCCGGGGCC AGCAGCCCTG CGCCGAGGAC GCGCTGCGAG CCGCAGSAGT
201    CGGTGGGCGC GGGGGCCGCG GAGGCGGCGC TGCCCTGCC CGGGCTGCTC
251    TTTGGCCCC CCGCGCTGCT GGGCCTGGCA CTGCTCCTGG CGCTGGTCTC
301    GGTGGGTCTG GTGAGCTGGA GCGGGGACA GCGCGGCTT CGCGCGCGT
351    CTTCCGAGA GCGCCCCGAC GAGAGCAAGG ACGCCACAGA GCCCTGGAC
401    AAGTTCATCA TTTGTCTCC GGAATCTCT GATGCCACAG CTCTGCTCTG
451    GCCTCCTCCT GGGGAAGACC CAGGAACCA CCCACCTGGC CACAGTGTCC
501    CTGTGCCAGC CACAGAGCTG GGCTCCACTG AACTGGTGAC CACCAAGACG
551    GCGGGCCCTG AGCAACAATA GCAGGGAGCC GGCAGGAGGT GSCCCCTGCC
601    CTCCTCTGG ACCCCAGGCC AGGGGCTTGG AAATCAAATC CAGCTCTTCA
651    CTCAGCATG CACATGCCCT CTTTCTGGGA CCAGGCTAAC CCTGCAGAA
701    CACAGACACT ACAGACCACA GCATTGACG CCCATGGAGT TTGGTGTGCT
751    TGCCCTTGGC TTCAGACCTC ACCATCTTG ACAGCCCTTG AAGGTGGTAG
801    CCCAGCTCCT GTTCTGTGCG CTTCAAAAGG CTGGGGCACT ATGAGTAAAA
851    GACCGCTTTT AAAATGGGGA AGGCACCATT AAGCCAAAAT GAATCTGAAA
901    AAAGAC

```

【 図 2 B 】

Figure 2B



【図 2 C】

Figure 2C

Intron を除く JST576 の配列

```

1   GCGCGCGCGC ACCATGAGGC GAGGGCCCCG GAGCCTGCGG GGCAGGGACG
51  CGCCAGCCCC CACGCCCTGC GTCCCGGCCG AGTGCTTGA CTTGCTGGTC
101 CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151 CGGGGCCAGC AGCCCTGCGC CCAGGACGCG GCTGCAGCG CAGGAGTCGG
201 TGGCGCGCGG GCGCGCGGAG GCGGCGCTGC CCTGCCCGG GCTGCTCTTT
251 GCGGCCCGCG CGCTGCTGGG CTTGGCACTG GTCTGCGCG TGGTCTCTGT
301 GGGTCTGGTG AGCTGGAGGC GCGGACAGCG GCGGCTTGC GCGCGCTCCT
351 CGCGAGAGGC CCGGACGCGA GACAAGGACG CCGCAGAGCC CTTGGACAAG
401 GTCATCATTC TGCTCCGGG AATCTCTGAT GCCAGACGTC CTGCTTGGCC
451 TCCTCTCTGG GAAGACCCAG GAACCCGCC ACCTGGCCAC AGTGTCTCTG
501 TGCCAGCCAC AGAGCTGGGC TCCACTGAAC TGGTGACCAC CAAGACGGCG
551 GCGCCTGAGC AACCAATAGCA GGGAGCGCGC AGGAGGTGGC CCTGCGCTTC
601 CCTCTGGACC CCGAGCCAGG GGGTTGGAAA TCAAATTCAG CTCTTCACTC
651 CAGCATGCAC ATGCCCTCTT TCTGGACCA GGTAAACCT GCAGAAGCAC
701 AGACACTACA GACCACAGCA TTCAGCCCCC ATGGAGTTTG GTGTGTTTGC
751 CTTTGGCTTC AGACCTCACC ATCTTTGACA GCCCTTGAAG GTGGTAGCCC
801 AGCTCCTGTT CTTGTGCTTT CAAAAGGCTG GGGCACTATG AGTAAAGAC
851 CGCTTTTAAA ATGGGGAAGC CACCATTAA GCAAAATGAA TCTGAAAAAA
901 GAC

```

【図 2 D】

FIGURE 2D

ヒト BAFF-R ヲミノ配列

```

M R R G G P R S L R G R D A P A P T P
C V P A E C F D L L V R H C V A C G
L L R T P R P K P A A G A S S P A P
R T A L Q P Q E S V G A G A G E A A
L P L P G L L F G A P A L L G L A L
V L A L V L V G L V S W R R Q K R
L R G A S S A E A P D G D K D A P E
P L D K V I I L S P G I S D A T A P
A W P P P G E D P G T T P P G H S V
P V P A T E L G S T E L V T T K T A
G P E Q Q

```

【図 3】

Figure 3

```

GGGCGCTTAC AATCTCAGCT ACTCGGGAGG CTGAGGCAGA GAATTGTGTTG AAACCGGGAG
* T R E
CGAGAGCTTG CAGTGAGCG AGATAGCGCC ATTGCACTCC AGCCTGGGGC ACAGAGCGAG
A E L A V S R D S A I A L Q P G R Q S E
ACTCCGTCTC AAAAAAAA AAAGAAAGA AAGGGGGGCC CCAGGGGAGC TCGGTCCAC
T P S Q K K K K K R K G G P R A R S H
CCAGCAGGCG GGGGCGGGC AGGGCAGAGT GCTCCCGCG CCGCCGCTT CCTCCCGAG
P A G G G G A G Q S A P P A P R F L P E
GGCCCGGAG CCCAGCTCAG CTTAGTCCC CGCAGTTGT GCGGCGCGT CGGCACATG
G P G A Q L S L S P R S L C G G V G T M
AGCGAGGGC CCGGAGGCT GCGGGCGAG GAGCGCCAG CCGCCAGCC CTGGTCCCG
R R G P R S L R G R D A P A P T P C V P
GCCGAGTGCT TCGAGCTGCT GGTCCGCGC TGCTGGGCT GCGGCTCTC GCGCAAGCG
A E C F D L L V R H C V A C G L L R T P
CGGCGGAAC CGGCGGGGC CAGCAGCCT GCGCCAGGA CGGCGTGCA GCGCAGGAG
R P K P A G A S S P A P R T A L Q P Q E
TCGGTGGCG CGGGGGCGG CGAGGCGCG CTGCCCTGC CCGGCTGCT CTTGGCGCC
S V G A G A G E A A L P L P G L L P F A
CCCGGCTGC TGGGCTGGC ACTGGTCTG GCGCTGCTC TGGTGGTCT GGTGAGCTG
P A L L G L A L V L A L V L V G L V S W
AGGCGGGAC AGCGCGGCT TCGCGGCGG TCCTCCGAG AGGCCCGGA CGGAGACAAG
R R R Q R R L R G A S S A E A P D G D K
GAGCCCGAG AGCCCTTGA CAGGTCTC ATTCTGTCT CCGGAATCTC TGATGCCA
D A P E P L D K V I I L S P G I S D A T
GCTCTGCGCT GCGCTCTCTC TGGGAAGAC CCAGGAACCA CCGCAGCTG CCACAGTGT
A P A W P P P G S D P G T T P P G H S V
CCTGTGCCAG CCACAGAGT GGGTCTCAT GAATGGTGA CCACCAAGC GCGCGCGCT
P V P A T E L G S T T K T A G P
GAGCAACAAT AGCAGGAGC CGGAGGAGG TGGCCCTGC CTCTCTCTG GACCCCGAC
E Q Q
CAGGGGCTTG GAAATCAAT TCGCTCTTC ACTCCAGCAT GCACATGCC TCCTTCTGG
ACCAGGCTAA CCTGTCAGAA GCACAGCAC TACAGACCAC AGCATTCAGC CCGCATGGAG
TTTGGTGTGC TTGCTTTTG CTTAGAGCT CACATCTTT GACAGCCCTT GAAGSTGGTA
GCCAGCTCC TGTCTCTG CTTCAAAG GCTGGGCGC TATGAGTAA AGACCGCTTT
TAAATGGGG AAGGCACAT TAAGCCAAA TGAATCTGA AAAAGC

```

【図 4 A】

Figure 4A

マウス BAFF-R の配列

```

1   GAATTCGGCA CGAGCCGAGA CTGGAAGCTG TCCAGCTGC ATGAGCGGC
51  GACATGGGCG CCAGAGAGCT CCGGGTCCGA AGCCAGAGA GCGCGGACAG
101 CTGGTGGCCC ACCAGTGCA ATCAAGCGGA GTGCTTCGAC CTTCTGTGA
151 GAAATGGGCT GTCTGTGAG CTCTTCACA CCGCGACAC TGGACATACA
201 AGCAGCTGG AGCTTGGAG AGCTTGGAG CTTAGGAGG GCTCCGCGT
251 GAGACCGAG GTGGGCTGC TGTGTGTC CCGCGACTC CTGAGACTGA
301 TACTGGGCT GACCTGGTG GGTCTAGTA GTCTGTGAG CTGAGCTGG
351 GGTCAACAG TCGAGCGGC CTCCGAGAC ACTTCAGAA GAGTCCAGCA
401 AGAGTCCCTG GAAATGTCT TGTACCTTC CTGAGAAC CCCTCAGCT
451 CAGCTCTTAC CTGGCTTCC CTCAAGAGC ATGACAGAG CCGCTGCGA
501 GCGCACAGG TCCCGGTGCC GCGCACAGA CTGGGCTCCA CCGAGTGGT
551 GACCAACAG ACAGCTGGC CAGAGCATA GAGCAGTGG AGCTGGAC
601 CAGGGATCT CTACTGGCT TGTGACTTC ACCACAGC TTGGAAAGA
651 ACTTGGCCT TCAATGAGC AGTCTTTGC CTGGGGGCG AACCGCGAG
701 AACAGACAC TACAGGCGC ATGAGATTGC TTTTGTGTA GCTCTGAGT
751 TGAGAGGCT CCATTTCTGA GATGGTTT AAGCTGTGT GCTTCAGAT
801 GGTGGATAG ACTTGAGGT TCGATATTA ATCTCTGAG TGAATGGAG
851 ACTGGAACT TAATCTGTT CTAAATTT TGAATTAAG GCGTGGAGT
901 ATGGCTCAG AGTCTGTTT GTGTGTTGT CTAGCGAGG ACTCTAGTT
951 TTAGCTTCC CGGAATCAG ATCTGGGAG TTAGAGCAC CTCTGCTCC
1001 AGCCCTTGA ACATCTTTC CTCAAGAGC ACCAGACTC ATTGTCTTA
1051 GAGCACACAC ACACACAC ACACACAC ACACACAC ACACACAC
1101 ATGATGATC GCACATTA AAATGTCAA ATTAGCGCT GAGAAATTC
1151 ATGTCAACA GCGCTACTG TGAATCAA GATAGAGAT TTGATTCGA
1201 GAATGACTG CGGTGGCTC ATACTGAGC ATAACTTTT CTCAAGGGA
1251 CTTGATGCT CTGACTTCA TGGGCTCTG TATTGAGTG CACATCTAC
1301 ACACACACAC ACACACAC ACACACATC ACACACAC ACTCTTTAC
1351 AAATGATAA ATATAGATA GGCATGTGG TACACACTT TAATCCAC
1401 ATTGGGAGC CAAGGCGAG CAGTAATCT AGTTGGAGG CATCTGTCT
1451 TACATAGCA GTTCCAGCT ACACAGACT AAATGTGAG ACCAATCTC
1501 AAATTAATC TCCCGCCCA AAAAAAAA ACTTTAAT TTGATTTT
1551 TCTTTTAT ATATCTTCT ATATTAAT CATGGTCTT AGAATGATA
1601 TACTTAGAT GTGACTAGA GAGGTAAAG CCATCAGAC TGAGCCCTA
1651 ACATCAAGG AGAAGGAGA GAGATGAAC AGCGCCCTC CTGTGTGTG
1701 GCGACTCTG GACCCAGC CAGAGGCGA TCAATGAGT TGGGCGTAG
1751 AACCTTGA GCGGAAGCT AAATCAATC CATTTCTTT TAAAGTATT
1801 TAGCCTTAG TGTTTCTTA CGGTGATATA AAATGACTA ACACAGCAC
1851 TATGATGAG AGCTTTTCT CTGAGCTGG AAAGTACTG TTAACCAA
1901 ATTAATCTGA ATAAAAAG GCTAAGGGA AGACACTAA AAA

```

【 図 4 B 】

Figure 4B
マウスBAFF-R アミノ酸配列

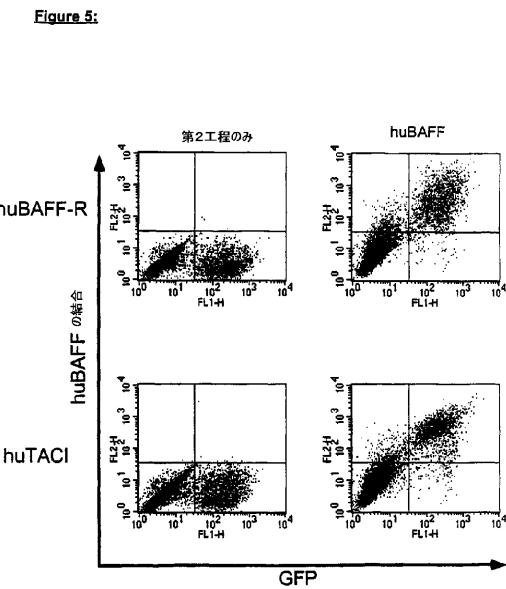
MGARRLRVRSQSRSDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSC~~EL~~
FHTPDTGHTSSLEPGTALQPQEGSALRPD VALLVGAPALLG
LILALTLVG LVSLVSWRWRQQLRTASPD~~T~~SEGVQ~~Q~~ESLEN
VFVPSSETPHASAPTWPPLKEDADSALPRHSVPVPATELGS
TELVT~~T~~TKTAGPEQ

【 図 4 C 】

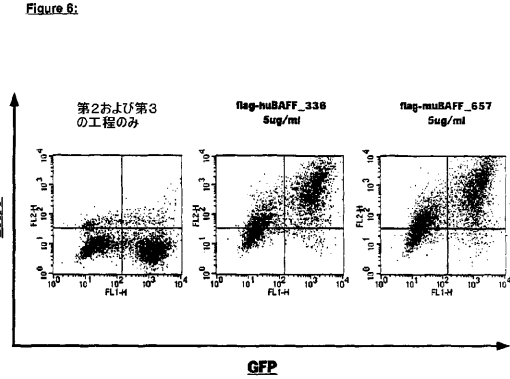
FIGURE 4C

hBAFFR	M-RR-GPRSLRGSDAPAPTPCVFAECFDLIVRHCVACGLIETPRKPKAGSSPAPRTAL	10	20	30	40	50
mBAFFR	MGARRLRVRSQSRSDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSC EL FTAL	10	20	30	40	50
hBAFFR	QPOESVAGAGEALPLPGLIFGAPALIGLALV-LVGLVSWRRQRRLRGASSAEA	60	70	80	90	100
mBAFFR	QPOE-----GSALRFDVALIVGAPALIGLILALTLVGLVSLVSWRRQQ-LRTAS----	60	70	80	90	100
hBAFFR	PDGDKDAP-RELDKVIILSGISDAPAPPPGDEGTPPGHSVVPATELGS TELVT	120	130	140	150	160
mBAFFR	PDTSEGVQ Q ESLENVFPSSETPHASAPTWPPLKEDADSALPRHSVPVPATELGS TELVT	120	130	140	150	160
hBAFFR	TKTAGPEQQ	180				
mBAFFR	TKTAGPEQ	170				

【 図 5 】

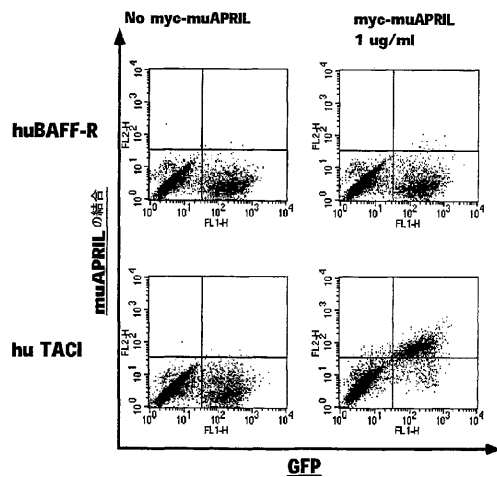


【 図 6 】



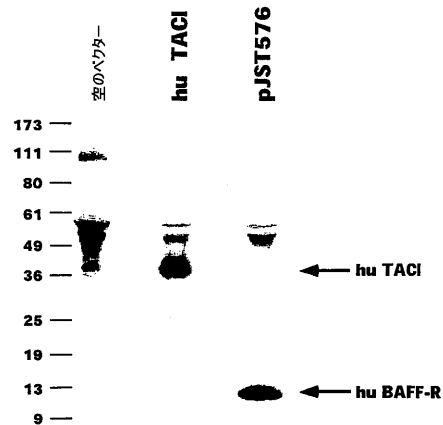
【 図 7 】

Figure 7:



【 図 8 】

Figure 8:



【 図 9 】

FIGURE 9

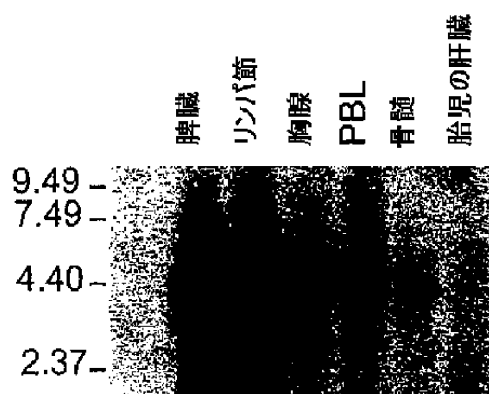
```

1  ATGGAGACAGACACTCTCTGTTATGGGTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT
   M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
61  GACGTCAGGCGAGGGCCCGGAGCCTGCGGGGCAAGGACCGCCAGCCCAAGCCCTGC
   D V R R G P R S L R G R D A P A P T P C
121 GTCCCGGCGAGTCTGCTGACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
   V P A E C F D L L V R H C V A C G L L R
181 ACGCCGCGGCGGAAACCGGCGGGGCGAGGAGGCGGCTGCGGCGGCGGCTGCGGCG
   T P R P K P A G A S S P A P R T A L Q P
241 CAGGAGTCGGTGGGCGGGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCGGCGGCGGCTGCGGCGG
   Q E S V G A G A G E A A V D K T H T C P
301 CGTGCCGCGGAGCTGAACTCTGCGGGGCGGCGGCGGCGGCTGCGGCGGCGGCTGCG
   P C P A P E L L G G P S V F L P P P K P
361 AAGGACACCTCATGATCTCCCGGAGCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAG
   K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
421 CAAGAAGACCTGAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCA
   H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
481 AAGACAAAGCGCGGGAGGAGCAGTCAACAGCAGCAGTACCGTGGTGGTGGTGGTGGT
   K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T
541 GTCCTGCAACGAGGAGTGGTGAATGGCAAGGAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG
   V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A
601 CTCCGAGCCCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
   L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q
661 GTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGTGACCAAGAACAGGTGAGCTGAGCTGAG
   V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C
721 CTGGTCAAGGCTTCTATCCAGGACATGCGCGGTGAGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
   L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P
781 GAGAACTACAGACACAGCCTCCCGTGTGAGTCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
   E N N Y K T T P P V L D S D G S F P L Y
841 AGCAAGCTCACCGTGGACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
   S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V
901 ATGCATGAGGCTCTGACACCACTACAGCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
   M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
961 TGA

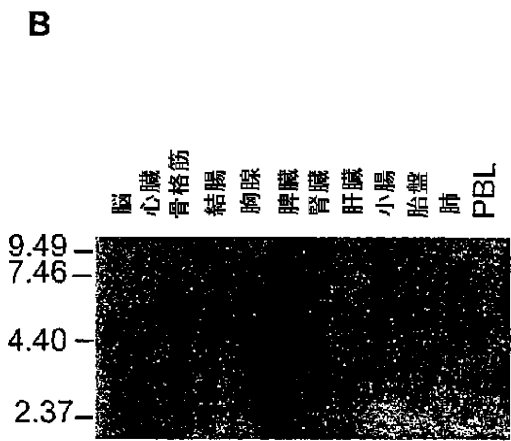
```

【 図 10 A 】

A

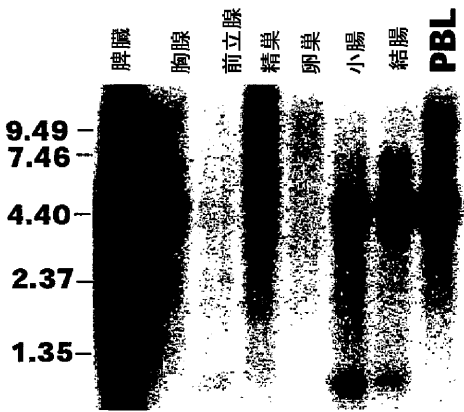


【 図 1 0 B 】



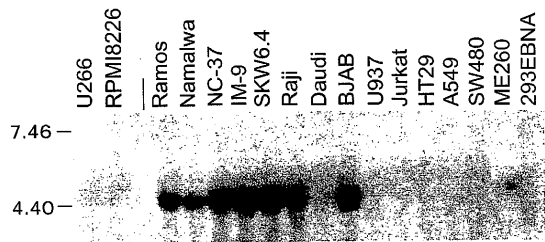
【 図 1 0 C 】

Figure 10C



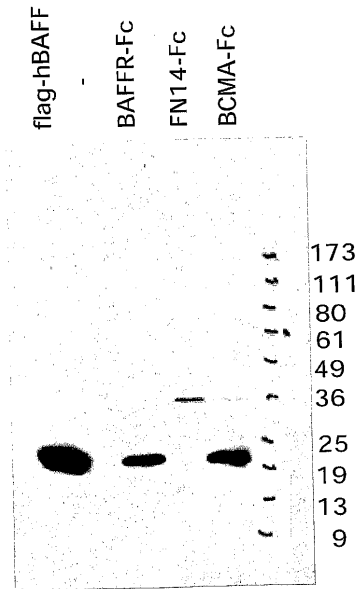
【 図 1 1 】

Figure 11:



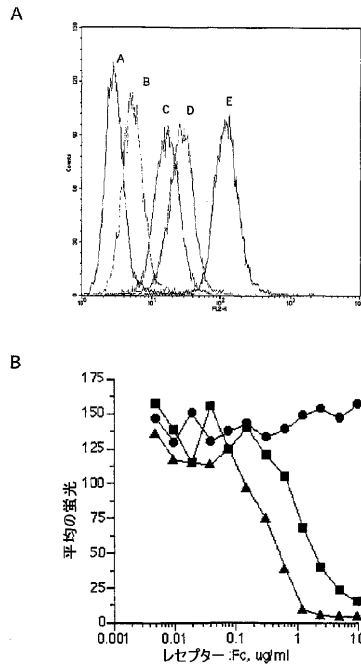
【 図 1 2 】

Figure 12:



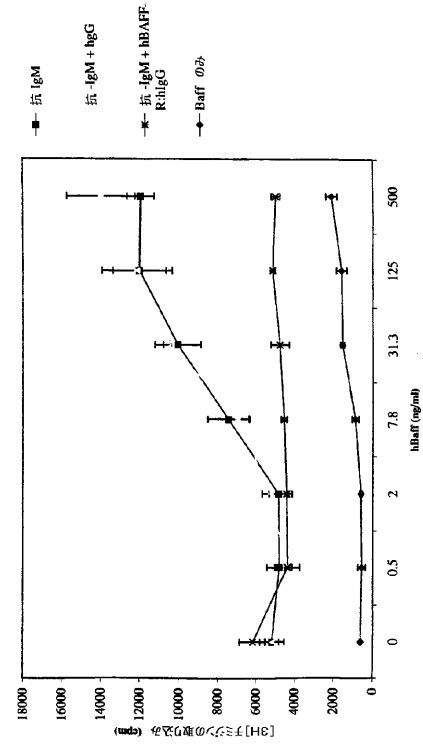
【 図 1 3 】

Figure 13:



【 図 1 4 】

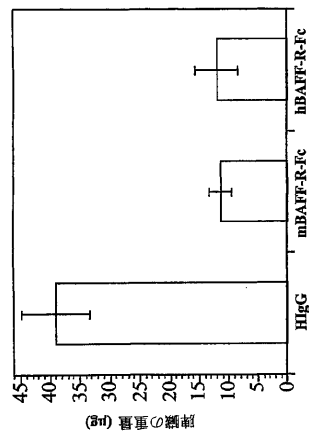
Figure 14



【 図 1 5 】

Figure 15.

BAFF-R-R-Fcでの処置は、脾臓の重量の減少を生じる

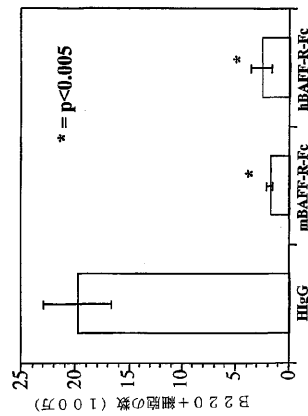


1, 4, 8, 11, 15, 18, 22および25日目にマウスに200mgのHlgG, mBAFF-R-FcまたはhBAFF-R-Fcを投与させた。マウスを28日目に安楽死させ、脾臓を回収し、そして重量を記録した。

【 図 1 6 】

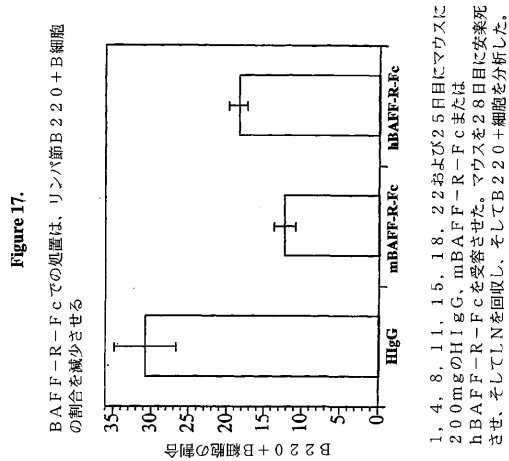
Figure 16.

ヒトおよびマウスのBAFF-R-R-Fc処置は、脾臓B220+B細胞の数を減少させる

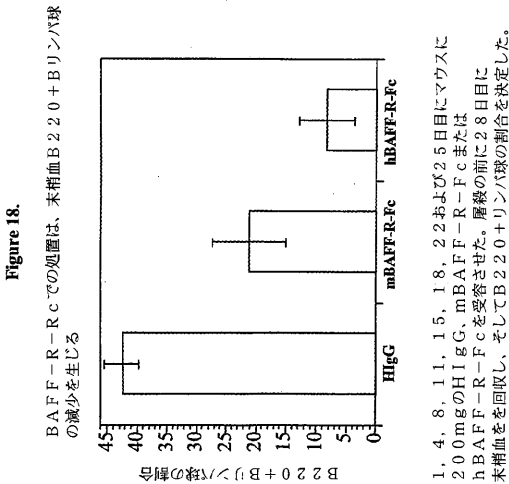


1, 4, 8, 11, 15, 18, 22および25日目にマウスに200mgのHlgG, mBAFF-R-FcまたはhBAFF-R-Fcを投与させた。マウスを28日目に安楽死させ、脾臓を回収し、そして重量を記録した。

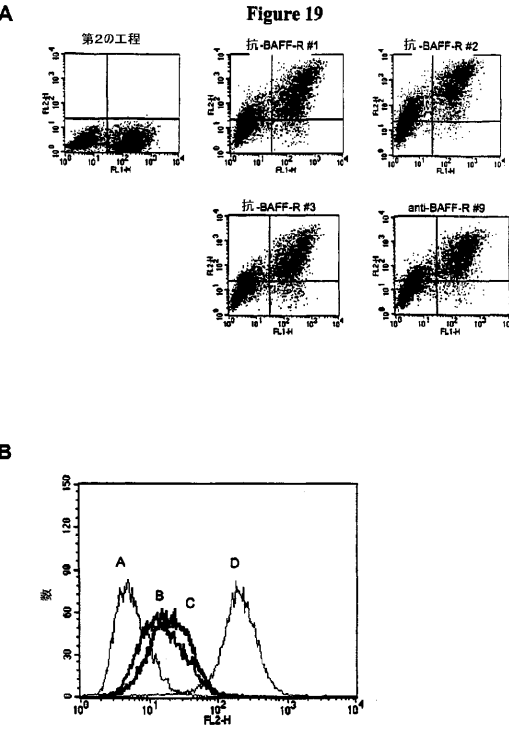
【 図 1 7 】



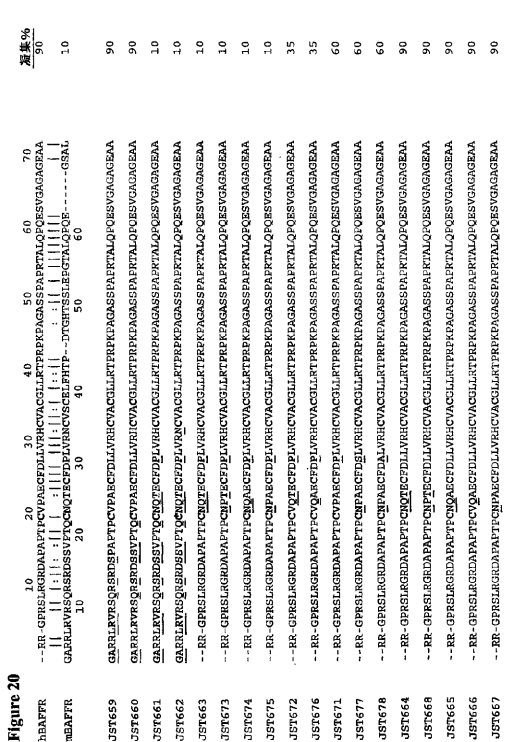
【 図 1 8 】



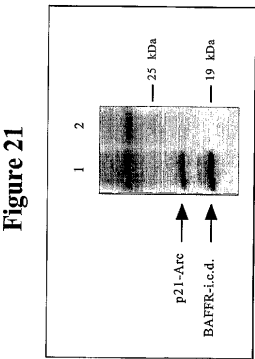
【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 配 列 表 】

2014064585000001.app

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1	4 C 0 8 4	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C	4 C 0 8 5	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A	4 H 0 4 5	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00			
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02			
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N		
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00			
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 P 37/02			
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z		
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z		
	C 0 7 K 19/00			

(31)優先権主張番号 60/312,185

(32)優先日 平成13年8月14日(2001.8.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ジェフェリー エス. トンプソン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 8 0 , ストーンハム, ニューコウム ロード 6
0

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA61 BA63 CA04 CA20 DA02 EA04 FA10 GA13
HA14
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ43 QQ53 QR32 QR55 QR62 QS25
QS34
4B064 AG20 CA10 CA19 CC15 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93X AB01 AC14 BA02 BA05 BB11
BB12 BB25 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 BA01 BA02 BA20 BA22 BA23
CA03 CA56 NA14 ZB072 ZB262
4C085 AA13 AA14 BB11 CC23
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA51 DA75 EA20
FA74 GA26

【外国語明細書】

2014064585000001.pdf

专利名称(译)	新型受体核酸和多肽		
公开(公告)号	JP2014064585A	公开(公告)日	2014-04-17
申请号	JP2013253098	申请日	2013-12-06
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司 , Emuei公司		
[标]发明人	クリスティーヌエムアンブローズ ジェフェリーエストンプソン		
发明人	クリスティーヌ エム. アンブローズ ジェフェリー エス. トンプソン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/715 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/68 A61K48/00 A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 G01N33/15 G01N33/50 C07K19/00 A61K A61K38/17 A61P7/06 A61P13/12 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/02 C07H C07H21/04 C07K C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C12N C12N15/10 C12N15/12 C12N15/62 C12Q G01N G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/70578 C07K2319/02 C07K2319/30 G01N33/68 G01N2333/70578 A61K48/00 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/12 A61P9/14 A61P13/12 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07H21/04 C07K14/7151 C07K16/2866 C07K16/2878 C07K2319/00 Y02A50/414 C07K14/715 C07K16/28 C12N15/1138 C12N15/63 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/715 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C C12Q1/68.A A61K48/00 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P37/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z C07K19/00 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/12 C12N15/13 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N5/10 C12Q1/6869.Z C12Q1/6876.Z C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG20 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BB11 4B065/BB12 4B065/BB25 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA20 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA03 4C084/CA56 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC23 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/233152 2000-09-18 US 60/234140 2000-09-21 US 60/268499 2001-02-13 US 60/312185 2001-08-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为B细胞活化因子 (BAFF) 提供新颖的受体核酸和多肽。一种核酸，其包含编码与含有特定氨基酸序列的多肽至少50%相同或至少90%相同的多肽的核酸序列。 编码BAFF-R多肽的核酸和针对该BAFF-R多肽的抗体，以及包含该抗体的药物组合物。使用核酸，多肽，抗体和药物组合物治疗致癌和自身免疫性疾病。 [选择图]图8

Fig. 5:

