(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-500063
(P2004-500063A)
(43)公表日　平成16年1月8日(2004.1.8)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A01K 67/027	A01K 67/027		4B024
A61K 31/7088	A61K 31/7088		4B063
A61K 35/55	A61K 35/55		4B065
A61K 35/76	A61K 35/76		4C076

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 304 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-545549(P2001-545549)
(86)(22)出願日　平成12年12月14日(2000.12.14)
(85)翻訳文提出日　平成14年6月17日(2002.6.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2000/033858
(87)国際公開番号　WO2001/044472
(87)国際公開日　平成13年6月21日(2001.6.21)
(31)優先権主張番号　60/172,306
(32)優先日　平成11年12月16日(1999.12.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500203709
アムジェン　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９１３２０，　サウザンド　オークス，　ワン　アムジェン　センター　ドライブ
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100105131
弁理士　井上　満
(74)代理人　100113332
弁理士　一入　章夫
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真
(74)代理人　100117053
弁理士　相馬　貴昌

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＴＮＦＲ／ＯＰＧ様分子およびその使用

(57)【要約】
本発明は、新規な腫瘍壊死因子レセプター／オステオプロテジェリン様（ｏｓｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ－ｌｉｋｅ）（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様）ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを産生するための、ベクター、宿主細胞、選択的結合因子（例えば、抗体）および方法に関する。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと関連する疾患の診断および処置のための方法もまた提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：
（ａ）配列番号１または３に示されるヌクレオチド配列；
（ｂ）配列番号２または４に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
（ｃ）（ａ）または（ｂ）の相補体に中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および
（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれかに相補的なヌクレオチド配列
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、
核酸分子。
【請求項２】
単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：
（ａ）配列番号２または４に示されるポリペプチドに少なくとも約７０％同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｂ）配列番号１または３に示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｃ）少なくとも約２５アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号１または３あるいは（ａ）または（ｂ）のヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｄ）少なくとも約１６ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号１または３あるいは（ａ）～（ｃ）のヌクレオチド配列；
（ｅ）（ａ）～（ｄ）のいずれかの相補体に中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および
（ｆ）（ａ）～（ｃ）のいずれかに相補的なヌクレオチド配列
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、
核酸分子。
【請求項３】
単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：
（ａ）少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号２または４に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｂ）少なくとも１つのアミノ酸挿入を有する配列番号２または４に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｃ）少なくとも１つのアミノ酸欠失を有する配列番号２または４に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｄ）Ｃ末端切断および／またはＮ末端切断を有する配列番号２または４に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｅ）アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、Ｃ末端切断およびＮ末端切断からなる群より選択される少なくとも１つの改変を有する配列番号２または４に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｆ）少なくとも１６ヌクレオチドのフラグメントを含む（ａ）～（ｅ）のヌクレオチド配列；

（ｇ）（ａ）～（ｆ）のいずれかの相補体に中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および
（ｈ）（ａ）～（ｅ）のいずれかに相補的なヌクレオチド配列
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、
核酸分子。
【請求項４】
請求項１、２または３に記載の核酸分子を含む、ベクター。
【請求項５】
請求項４に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項６】
真核生物細胞である、請求項５に記載の宿主細胞。
【請求項７】
原核生物細胞である、請求項５に記載の宿主細胞。
【請求項８】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを産生するプロセスであって、請求項６に記載の宿主細胞を該ポリペプチドを発現するのに適切な条件下で培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。
【請求項９】
請求項８に記載のプロセスによって産生された、ポリペプチド。
【請求項１０】
請求項１１に記載のプロセスであって、前記核酸分子は、ネイティブＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドについてのプロモーターＤＮＡ以外のプロモーターＤＮＡを含み、該プロモーターは、該ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードするＤＮＡに作動可能に連結されている、プロセス。
【請求項１１】
請求項２に記載の単離された核酸分子であって、ここで、前記同一性パーセントが、ＧＡＰ、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴＸ、ＢｅｓｔＦｉｔおよびＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される、核酸分子。
【請求項１２】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの活性または産生の候補インヒビターを同定するためのプロセスであって、該プロセスは、請求項６、７または８に記載の細胞を該候補インヒビターに曝露する工程、該細胞におけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの活性または産生を測定する工程、および該候補インヒビターに曝露された細胞におけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様活性を該候補インヒビターに曝露されなかった細胞における活性と比較する工程を包含する、プロセス。
【請求項１３】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの活性または産生の候補刺激因子を同定するためのプロセスであって、該プロセスは、請求項６、７または８に記載の細胞を該候補刺激因子に曝露する工程、該細胞におけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの活性または産生を測定する工程、および該候補刺激因子に曝露された細胞におけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様活性を該刺激因子に曝露されなかった細胞における活性と比較する工程を包含する、プロセス。
【請求項１４】
配列番号２または４に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。
【請求項１５】
単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：
（ａ）配列番号２または４に示される成熟アミノ酸配列であって、残基１で成熟アミノ末端を含み、必要に応じてさらに、アミノ末端メチオニンを含む、アミノ酸配列；
（ｂ）配列番号２または４のオルソログのアミノ酸配列であって、そのコードされるポリ

ペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｃ）配列番号２または４に示されるアミノ酸配列に少なくとも約７０％同一であるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｄ）少なくとも約２５アミノ酸残基を含む配列番号２または４に示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、フラグメント；
（ｅ）配列番号２または４あるいは（ａ）～（ｃ）の少なくとも１つに示されるいずれかのアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、
ポリペプチド。
【請求項１６】
単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：
（ａ）少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号２または４に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｂ）少なくとも１つのアミノ酸挿入を有する配列番号２または４に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｃ）少なくとも１つのアミノ酸欠失を有する配列番号２または４に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｄ）Ｃ末端切断および／またはＮ末端切断を有する配列番号２または４に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｅ）アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、Ｃ末端切断およびＮ末端切断からなる群より選択される少なくとも１つの改変を有する配列番号２または４に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号２または４に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、
ポリペプチド。
【請求項１７】
前記ポリペプチドが、配列番号６に示されるポリヌクレオチドによってコードされる、請求項１５または１６に記載のオルソログ。
【請求項１８】
配列番号２の第４２位のアミノ酸が、グリシンまたはプロリンからなる群より選択される、請求項１５または１６に記載のポリペプチド。
【請求項１９】
配列番号２の第５１位のアミノ酸が、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミンおよびシステインからなる群より選択される、請求項１５または１６に記載のポリペプチド。
【請求項２０】
配列番号２の第５６位のアミノ酸が、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンからなる群より選択される、請求項１５または１６に記載のポリペプチド。
【請求項２１】
配列番号２の第６８位のアミノ酸が、リジン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群より選択される、請求項１５または１６に記載のポリペプチド。

【請求項２２】
配列番号２の第７１位のアミノ酸が、システイン、セリン、スレオニン、アスパラギンおよびグルタミンからなる群より選択される、請求項１５または１６に記載のポリペプチド。
【請求項２３】
配列番号２の第８４位のアミノ酸が、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、アラニン、ノルロイシンまたはフェニルアラニンからなる群より選択される、請求項１５または１６に記載のポリペプチド。
【請求項２４】
配列番号２の第８７位のアミノ酸が、アスパラギン酸またはグルタミン酸からなる群より選択される、請求項１５または１６に記載のポリペプチド。
【請求項２５】
請求項１、２または３に記載の核酸分子によってコードされる、単離されたポリペプチド。
【請求項２６】
請求項１５または１６に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、前記同一性パーセントが、ＧＡＰ、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴＸ、ＢｅｓｔＦｉｔおよびＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される、ポリペプチド。
【請求項２７】
配列番号２または４のアミノ酸配列を含むペプチドで動物を免疫することによって産生された、抗体。
【請求項２８】
請求項１３、１４または１５に記載のポリペプチドを特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。
【請求項２９】
モノクローナル抗体である、請求項２７に記載の抗体。
【請求項３０】
配列番号２または４のアミノ酸配列を含むペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ。
【請求項３１】
サンプル中のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様の量を検出または定量する方法であって、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを含むことが疑われるサンプルに請求項２７、２８または２９に記載の抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様抗体またはそのフラグメントを接触させる工程、および該抗体またはフラグメントの結合を検出する工程を包含する、方法。
【請求項３２】
少なくとも１つのポリペプチドを特異的に結合する選択的結合因子またはそのフラグメントであって、該ポリペプチドは、以下：
（ａ）配列番号２または４に示されるアミノ酸配列；
（ｂ）配列番号２または４の少なくとも１つに示されるアミノ酸配列のフラグメント；および
（ｃ）（ａ）または（ｂ）の天然に存在する改変体
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、
選択的結合因子。
【請求項３３】
抗体またはそのフラグメントである、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項３４】
ヒト化抗体である、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項３５】
ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項３２に記載の選択的結合因子。

【請求項３６】
ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項３７】
モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項３８】
キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項３９】
ＣＤＲグラフト化抗体またはそのフラグメントである、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項４０】
抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項４１】
可変領域フラグメントである、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項４２】
ＦａｂまたはＦａｂ’フラグメントである、請求項３２に記載の可変領域フラグメント。
【請求項４３】
選択的結合因子またはそのフラグメントであって、配列番号２または４のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する特異性を有する、少なくとも１つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子。
【請求項４４】
検出可能な標識が結合されている、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項４５】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの生物学的活性をアンタゴナイズする、請求項３２に記載の選択的結合因子。
【請求項４６】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのレベルの変化に関連する疾患、状態または障害を、処置、予防または改善するための方法であって、請求項３２に記載の選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。
【請求項４７】
配列番号２または４に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって産生された、選択的結合因子。
【請求項４８】
請求項１４、１５または１６に記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。
【請求項４９】
請求項１４、１５または１６に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。
【請求項５０】
前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、可溶化剤、安定剤、抗酸化剤またはそれらの組み合わせである、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５１】
前記ポリペプチドが、配列番号２または４に示される成熟アミノ酸配列を含む、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５２】
請求項１４、１５または１６に記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。
【請求項５３】
水溶性ポリマーで共有結合的に改変されている、請求項５２に記載のポリペプチド。

【請求項５４】
請求項５３に記載のポリペプチドであって、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシ－ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ－（Ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。
【請求項５５】
請求項１、２または３に記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。
【請求項５６】
前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項５５に記載の組成物。
【請求項５７】
請求項１、２または３に記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。
【請求項５８】
異種アミノ酸配列に融合された請求項１４、１５または１６に記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。
【請求項５９】
前記異種アミノ酸配列が、ＩｇＧ定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項５８に記載の融合ポリペプチド。
【請求項６０】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドレベルの減少から生じる哺乳動物における医学的状態を、処置、予防または改善するための方法であって、請求項１４、１５または１６に記載のポリペプチドあるいは請求項１、２または３に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを、該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。
【請求項６１】
異常なレベルのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドによって引き起こされるかまたはそれから生じる、被験体における病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：
（ａ）サンプル中の請求項１４、１５または１６に記載のポリペプチドあるいは請求項１、２または３に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現の存在または量を決定する工程；および
（ｂ）正常な被験体または早期の被験体由来の生物学的サンプル、組織サンプルまたは細胞サンプルにおけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのレベルと比較する工程であって、ここで、病理学的状態に対する感受性は、該ポリペプチドの発現の存在または量に基づく、工程
を包含する、方法。
【請求項６２】
デバイスであって、以下：
（ａ）移植に適合性の膜；および
（ｂ）該膜内にカプセル化された細胞、
含み、ここで、該細胞は、請求項１４、１５または１６に記載のポリペプチドを分泌し、そして該膜は、該タンパク質に対して透過性でありかつ該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。
【請求項６３】
デバイスであって、以下：
（ａ）移植に適合性の膜；および
（ｂ）該膜内にカプセル化されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド
を含み、ここで、該膜は、該ポリペプチドに対して透過性である、デバイス。
【請求項６４】
ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

（ａ）請求項１４、１５または１６に記載のポリペプチドに化合物を接触させる工程；および
（ｂ）該化合物に対する該ポリペプチドの結合の程度を決定する工程、
を包含する、方法。
【請求項６５】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様生物学的活性のアンタゴニストを同定する方法であって、以下：
（ａ）低分子化合物にＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを接触させる工程；
（ｂ）該低分子化合物の存在下でのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様の生物学的活性を検出する工程；および
（ｃ）該低分子化合物の存在下および非存在下でのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様生物学的活性のレベルを比較する工程、
を包含する、方法。
【請求項６６】
前記低分子化合物が、天然に存在する化学ライブラリーのメンバーである、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記低分子化合物が、天然に存在する薬化学ライブラリーのメンバーである、請求項６５に記載の方法。
【請求項６８】
前記低分子化合物が、コンビナトリアル化学ライブラリーのメンバーである、請求項６５に記載の方法。
【請求項６９】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合するポリペプチドを同定する方法であって、該方法は、酵母ツーハイブリッドアプローチを利用し、以下：
（ａ）ベイト構築物を調製する工程であって、該ベイト構築物は、請求項１、２または３に記載のヌクレオチド配列に融合されたＧＡＬ４　ＤＮＡ結合ドメインを含む、工程；
（ｂ）該ベイト構築物でｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングする工程であって、該ライブラリーは、ＧＡＬ４活性化ドメインに融合されたヌクレオチド配列からなる、工程；および
（ｃ）ＧＡｌ４の制御下にあるレポーター遺伝子の転写活性化を検出することによって、該構築物に結合するポリペプチドを同定する工程、
を包含する、方法。
【請求項７０】
請求項７１に記載の方法によって同定された、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド結合パートナー。
【請求項７１】
動物におけるポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項１、２または３に記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。
【請求項７２】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド活性のアンタゴニストであって、該アンタゴニストは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに対する特異性を有する、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様選択的結合因子、低分子、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびペプチドまたはそれらの誘導体からなる群より選択される、アンタゴニスト。
【請求項７３】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様の細胞産生を減少させる方法であって、請求項７２に記載のアンタゴニストで細胞を形質転換またはトランスフェクトする工程を包含する、方法。
【請求項７４】
請求項７３に記載の方法であって、前記アンタゴニストは、アンチセンス試薬であり、該試薬は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様のｍＲＮＡに結合し得る一本鎖核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを含む、方法。

【請求項７５】
請求項１、２または３に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。
【請求項７６】
請求項１、２または３に記載の核酸分子の破壊を含み、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現が減少されている、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。
【請求項７７】
診断試薬であって、配列番号２または４に示されるアミノ酸配列、あるいはそれらの対立遺伝子改変体およびスプライス改変体を含む、それらのフラグメント、改変体またはホモログをコードする、検出可能に標識されたポリヌクレオチドを含む、診断試薬。
【請求項７８】
前記標識されたポリヌクレオチドが、一本鎖ｃＤＮＡである、請求項７７に記載の診断試薬。
【請求項７９】
生物学的サンプル中のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸の存在を決定するための方法であって、以下の工程：
（ａ）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸を含むことが疑われる生物学的サンプルを提供する工程；
（ｂ）該生物学的サンプルに請求項８４に記載の診断試薬を接触させる工程であって、該工程は、該診断試薬が、該生物学的サンプル中に含まれるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸とハイブリダイズする条件下で行う、工程；
（ｃ）該生物学的サンプル中の核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションを検出する工程；および
（ｄ）該生物学的サンプルと該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルを、既知の濃度のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルと比較する工程、
を包含する、方法。
【請求項８０】
組織サンプルまたは細胞サンプル中のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸の存在を決定するための方法であって、以下の工程：
（ａ）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸を含むことが疑われる組織サンプルまたは細胞サンプルを提供する工程；
（ｂ）該組織サンプルまたは細胞サンプルに請求項７７に記載の診断試薬を接触させる工程であって、該工程は、該診断試薬が、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸とハイブリダイズする条件下で行う、工程；
（ｃ）該組織サンプルまたは細胞サンプル中のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションを検出する工程；および
（ｄ）該組織サンプルまたは細胞サンプルと該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルを、既知の濃度のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルと比較する工程、
を包含する、方法。
【請求項８１】
前記ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリヌクレオチド分子が、ＤＮＡである、請求項７９または８０に記載の方法。
【請求項８２】
前記ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリヌクレオチド分子が、ＲＮＡである、請求項７９または８０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（関連出願）
本願は、米国特許法第１１９条のもとで、１９９９年１２月１６日付けで出願された仮特許出願番号第６０／１７２，３０６号に対する優先権を主張する。

【０００２】
（発明の分野）
本発明は、新規な腫瘍壊死因子レセプター／オステオプロテジェリン様（ｏｓｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ－ｌｉｋｅ）（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様）ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを産生するための、ベクター、宿主細胞、選択的結合因子（例えば、抗体）および方法に関する。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと関連する疾患の診断および処置のための方法もまた提供される。
【０００３】
（発明の背景）
核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術的進歩は、ヒトゲノムの解読に基づいた新規の治療剤の発見を大きく加速した。現在では、高速の核酸配列決定技術により、前例のない速度で配列情報が作製され得、そしてコンピュータ分析と結合されて、ゲノム全体へと重複する配列をアセンブルすることが可能であり、そしてポリペプチドコード領域の同定が可能である。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および／または構造の目印に対する相同性の程度を決定することを可能にし得る。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。改変体およびその誘導体を作製するための核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤として使用するために有利な特性を産物に付与し得る。
【０００４】
過去１０年間にわたるゲノム研究における著しい技術的進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づいた新規の治療剤の開発に対する可能性は、未だ広範には実現されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド（これらは、治療的分子に対して「標的」として機能し得る）は、依然として同定されていない。さらに、多くのヒト遺伝子由来のポリペプチド産物の構造分析および機能分析が、未だ行われていない。
【０００５】
従って、診断的または治療的な利点を有する、新規なポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。
【０００６】
（発明の要旨）
本発明は、新規のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子およびコードされるポリペプチド、ならびにそれらの使用に関する。
【０００７】
本発明は、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：
（ａ）配列番号（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：）１または３に記載のヌクレオチド配列；
（ｂ）配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
（ｃ）中程度または高度にストリンジェントな条件下で、（ａ）または（ｂ）の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに
（ｄ）（ａ）～（ｃ）のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。
【０００８】
本発明はまた、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：
（ａ）配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドに対して、少なくとも約７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８または９９％同一であるポリペプチド

をコードするヌクレオチド配列であって、ここでこのポリペプチドは、ＧＡＰ，ＢＬＡＳＴＰ，ＢＬＡＳＴＮ，ＦＡＳＴＡ，ＢＬＡＳＴＡ，ＢＬＡＳＴＸ，ＢｅｓｔＦｉｔ，およびＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムからなる群から選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される場合に、配列番号２または配列番号４に記載のコードされるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

（ｂ）配列番号１または３に記載のヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

（ｃ）少なくとも約２５アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号１もしくは配列番号３、（ａ）または（ｂ）のヌクレオチド配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

（ｄ）配列番号１に記載の１～４３０アミノ酸残基または配列番号３に記載の１～４３６アミノ酸残基の置換および／または欠失を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

（ｅ）少なくとも約１６ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号１もしくは配列番号３、または（ａ）～（ｄ）のヌクレオチド配列；

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

（ｇ）（ａ）～（ｅ）のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。

【０００９】

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

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

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

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

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

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

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

（ｇ）中程度または高度にストリンジェントな条件下で、（ａ）～（ｆ）のいずれかの相

補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに
（ｈ）（ａ）～（ｅ）のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。
【００１０】
本発明はまた、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する：
（ａ）残基１に成熟アミノ末端を含み、そして必要に応じてさらにアミノ末端メチオニンを含む、配列番号２または配列番号４に記載の成熟アミノ酸配列；
（ｂ）配列番号２または配列番号４のオルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）についてのアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｃ）配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列に対して、少なくとも約７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８または９９％同一であるアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、ＧＡＰ，ＢＬＡＳＴＰ，ＢＬＡＳＴＮ，ＦＡＳＴＡ，ＢＬＡＳＴＡ，ＢＬＡＳＴＸ，ＢｅｓｔＦｉｔ，およびＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムからなる群から選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される場合に、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｄ）少なくとも約２５アミノ酸残基を含む、配列番号２または配列番号４に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、ここでこのポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列のフラグメント；
（ｅ）配列番号２もしくは配列番号４に記載のアミノ酸配列、または（ａ）～（ｃ）のうちの少なくとも１つのいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体についてのアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。
【００１１】
本発明はさらに、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する：
（ａ）少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号２または配列番号４に記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｂ）少なくとも１つのアミノ酸挿入を有する、配列番号２または配列番号４に記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｃ）少なくとも１つのアミノ酸欠失を有する、配列番号２または配列番号４に記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｄ）Ｃ末端および／またはＮ末端の短縮を有する、配列番号２または配列番号４に記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに
（ｅ）アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、Ｃ末端短縮およびＮ末端短縮からなる群から選択される少なくとも１つの改変を有する、配列番号２または配列番号４に記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号２または配列番号４に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。
【００１２】
また、前述の段落の上記（ａ）～（ｅ）のポリペプチド配列を含む融合ポリペプチドも提供される。
【００１３】
本発明はまた、本明細書中に記載の単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に記載の組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、およびこの宿主細胞を培養する工程、お

よび必要に応じてそのようにして産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを産生する方法を提供する。これらの発現ベクターは、発現のために昆虫細胞を利用するバキュロウイルス発現ベクターを含む。

【００１４】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた、本発明によって包含される。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現およびレベルの増加（これは、循環レベルの増加を含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。トランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物である。また、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする核酸分子の破壊を含むトランスジェニック非ヒト動物が提供され、この破壊は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをノックアウトするか、またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現を有意に減少させる。

【００１５】

また、本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの誘導体が提供される。

【００１６】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様のアナログが、本発明において提供され、これは、配列番号２または配列番号４のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの保存的および非保存的なアミノ酸置換から得られる。このようなアナログは、配列番号２の４２位のアミノ酸がプロリンおよびグリシンからなる群から選択されるか、配列番号２の５１位のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミンからなる群から選択されるか、配列番号２の５６位のアミノ酸がフェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンからなる群から選択されるか、配列番号２の６８位のアミノ酸がヒスチジン（ｈｉｓｔａｄｉｎｅ）、リジン、およびアルギニンからなる群から選択されるか、配列番号２の７１位のアミノ酸がセリン、システイン、スレオニン、アスパラギン、グルタミンからなる群から選択されるか、配列番号２の８４位のアミノ酸がアラニン、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、およびノルロイシンからなる群から選択されるか、または配列番号２の８７位のアミノ酸がアスパラギン酸もしくはグルタミン酸からなる群から選択される、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを含む。

【００１７】

さらに、本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が提供される。このような抗体、ポリペプチド、ペプチドおよび低分子は、アゴニスト性またはアンタゴニスト性であり得る。

【００１８】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチドまたは選択的結合因子、および１以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物もまた、本発明によって包含される。この薬学的組成物は、本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドの治療的有効量を提供するように使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。本発明はまた、膜にカプセル化されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを投与するためのデバイスを提供する。　本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドおよび核酸分子を使用して、本明細書中に列挙された疾患および障害を含む疾患および障害を処置、予防、改善、診断、および／または検出し得る。生物学的サンプル、細胞サンプル、または組織サンプルにおける発現分析によって、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが本明細書中に記載の病理学的状態の診断および／または処置において役割を果たし得るかが示唆される。この発現は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリヌクレオチドのような診断試薬を用いて検出され得る。

【００１９】

本発明は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの異常なレベルによってまたは異常なレベルから引き起こされる、被験体における病理学的状態または病理学的状態に対する感受性の診断を包含し、これは、サンプル中のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現の存在または量を検出する工程；および、正常な被験体またはより以前の時期の被験体のいずれかに

由来する生物学的サンプル、組織サンプル、または細胞サンプルにおけるこのポリペプチドのレベルを比較する工程を包含し、ここで病理学的状態に対する感受性は、このポリペプチドの発現の存在または量に基づく。

【００２０】

本発明はまた、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合する試験分子を同定するために試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを試験分子と接触させる工程、およびこのポリペプチドへの試験分子の結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアゴニストであるか、またはアンタゴニストであるかを決定する工程を包含する。本発明はさらに、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現に対する分子の影響、またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【００２１】

本発明は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様生物学的活性のアンタゴニストを同定する方法を提供し、この方法は、低分子化合物をＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと接触させる工程、およびこれらの低分子の存在下または非存在下におけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様生物学的活性を測定する工程を包含する。これらの低分子は、天然に存在する医用化合物であり得るか、またはコンビナトリアル化学ライブラリーから誘導され得る。さらに、本発明はまた、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナー（例えば、サイクリン）を同定する方法を包含する。これらの方法は、ＧＡＬ４　ＤＮＡ結合ドメインに融合されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリヌクレオチドからなるベイト（ｂａｉｔ）構築物を含む、酵母ツーハイブリッドアプローチを利用する。このベイト構築物を使用して、ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングする。ここでこのライブラリーは、ＧＡＬ４活性化ドメインに融合されたヌクレオチド配列からなる。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様相互作用タンパク質をコードするライブラリー配列は、ＧＡＬ４の制御下でのレポーター遺伝子の転写活性化によって同定され得る。Ｇｕａｒｅｎｔｅ、Ｔｒｅｎｄ　Ｇｅｎ．９：３４２－３４６（１９９３）；Ｂａｒｔｅｌ＆Ｆｉｅｌｄ、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．２５４：２４１－６３（１９９５）を参照のこと。

【００２２】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現を調節する方法およびレベルを調整（すなわち、増加または減少）する方法もまた、本発明によって包含される。１つの方法は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現を調節または調整するエレメントを含む核酸分子が投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるような、遺伝子治療、細胞療法、およびアンチセンス療法が挙げられる。

【００２３】

本発明の別の局面では、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、その結合パートナー（「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド結合パートナー」）を同定するために使用され得る。酵母ツーハイブリッドスクリーニングが、タンパク質についての結合パートナーおよびレセプターを同定およびクローン化するために広範に使用されてきた（Ｃｈｉｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：９５７８－９５８３、１９９１）。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド結合パートナーの単離は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド活性の新規のアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。

【００２４】

このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性ＴＮＦｒ／ＯＰＧ補因子、抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ選択的結合因子（例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様抗体およびその誘導体）、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを結合し得る低分子、ペプチドもしくはそれらの誘導体、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらのいずれも、１以上の疾患または障害（本明細書中に列挙された疾患または障害を含む）を潜在的に処置するために使用され得る。これらの病理学的状態としては、骨粗しょう症、パジェット病、骨髄炎、高カルシウム血症、骨減少症、および骨壊死が挙げられるが、これらに限定されない

。
【００２５】
特定の実施形態では、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと相互作用してその活性を調節する、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量分子であり得る。
【００２６】
（発明の詳細な説明）
本明細書中で使用される節の見出しは、構成上の目的のためのみであり、そしてそこに記載される内容を限定するように解釈されるべきではない。本願において列挙される全ての参考文献が、明確に、本明細書中に参考として援用される。
【００２７】
（定義）
用語「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子」または「ポリヌクレオチド」は、配列番号１または３のいずれかに記載のヌクレオチド配列、配列番号２または配列番号４のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１７５８中のＤＮＡ挿入物のヌクレオチド配列、および本明細書中で規定される核酸分子を含むかまたはそれらからなる核酸分子をいう。関連の核酸分子としては、以下が挙げられる：配列番号１もしくは３のいずれかに示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも約７０％同一であるヌクレオチド配列、あるいは配列番号２もしくは配列番号４のいずれかに記載のポリペプチドに対して少なくとも約７０％同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたは本質的にそのヌクレオチド配列からなるヌクレオチド配列。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１または３のいずれかに示されるヌクレオチド配列に対して、約７５％、または約８０％、または約８５％、または約９０％、または約９５、９６、９７、９８、もしくは９９％同一であるか、あるいは、配列番号２または４のいずれかに示されるポリペプチド配列に対して、約７５％、または約８０％、または約８５％、または約９０％、または約９５、９６、９７、９８、もしくは９９％同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。
【００２８】
関連の核酸分子はまた、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子のフラグメントを含み、このフラグメントは、配列番号１または３のいずれかのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子の少なくとも約１０個連続するヌクレオチド、または約１５個、または約２０個、または約２５個、または約５０個、または約７５個、または約１００個、または約１００個より多く連続したヌクレオチドを含む。関連の核酸分子はまた、上記のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子のフラグメントを含み、このフラグメントは、配列番号２または配列番号４のいずれかのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの少なくとも約２５アミノ酸残基、または約５０アミノ酸残基、または約７５アミノ酸残基、または約１００アミノ酸残基、または約１００アミノ酸残基より多いアミノ酸残基のポリペプチドをコードする。関連の核酸分子はまた、配列番号２または配列番号４のいずれかに記載のポリペプチドと比較して、１以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加、および／または欠失を含むかまたは本質的にそれらからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。さらに、関連のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子は、本明細書中に規定される中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号１または３のいずれかのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子のいずれかの完全に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む。好ましい実施形態では、関連の核酸分子は、中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号１もしくは３のいずれかに示される配列を有する分子、または配列番号２もしくは配列番号４のいずれかに示される配列を含むポリペプチドをコードする分子、または本明細書中に規定される核酸フラグメント、または本明細書中に規定されるポリペプチドをコードする核酸フラグメントの相補体とハイブリダイズする配列を含む。関連の核酸分子が、配列番号１または３のいずれかのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含み、そして上記ヌクレオチド配列のいずれかに対して相補的な配列を含むこともま

た理解される。関連のコードされるポリペプチドは、配列番号２または配列番号４のいずれかに記載のポリペプチドの少なくとも１つの活性を有する。

【００２９】

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

【００３０】

「核酸配列」または「核酸分子」は、本明細書中で使用される場合、ＤＮＡまたはＲＮＡ配列をいう。この用語は、例えば、以下であるがこれらに限定されない、ＤＮＡおよびＲＮＡの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含む：４－アセチルシトシン、８－ヒドロキシ－Ｎ６－メチルアデノシン、アジリジニル－シトシン、プソイドイソシトシン（ｐｓｅｕｄｏｉｓｏｃｙｔｏｓｉｎｅ）、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウラシル、５－カルボキシ－メチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、Ｎ６－イソ－ペンテニルアデニン、１－メチルアデニン、１－メチルプソイドウラシル、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチル－グアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－メチルアデニン、７－メチルグアニン、５－エ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、５’－メトキシカルボニル－メチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸、オキシブトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、Ｎ－ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、および２，６－ジアミノプリン。

【００３１】

用語「作動可能に連結された」は、本明細書中で、隣接配列の配置をいうために使用され、ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように構成またはアセンブルされる。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、このコード配列の複製、転写および／または翻訳を行うことを可能にし得る。例えば、コード配列は、このプロモーターがコード配列の転写を指示し得る場合に、プロモーターに作動可能に連結される。隣接配列は、これが正確に機能する限り、コード配列と連続する必要はない。したがって、例えば、介在する翻訳されないが転写される配列は、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、なおこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。

【００３２】

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

【００３３】

用語「対立遺伝子改変体」は、生物体または生物体の集団の染色体上の所定の遺伝子座に

存在する遺伝子のいくつかの可能な天然に存在する代替的形態の１つをいう。

【００３４】

用語「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様スプライス改変体」とは、配列番号２または配列番号４に示されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドアミノ酸配列のＲＮＡ転写物中のイントロン配列の選択的プロセシングによって生成される、核酸分子（通常はＲＮＡ）をいう。

【００３５】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切であり、そして挿入された異種核酸配列の発現を、指向および／または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびＲＮＡスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【００３６】

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

【００３７】

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

【００３８】

用語「宿主細胞」・・・

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいＤＮＡを含有するように改変された場合に形質転換されている。例えば、細胞は、それがそのネイティブな状態から遺伝的に改変される場合に形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、ＤＮＡの形質転換は、物理的に細胞の染色体に組み込むことにより細胞のＤＮＡと組換わり得るか、複製されることなしにエピソームエレメントとして一時的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立的に複製し得る。ＤＮＡが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたとみなされる。

【００３９】

用語「トランスフェクション」は、細胞による異種または外因性ＤＮＡの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性ＤＮＡが細胞膜内に導入された場合には「トランスフェクトされ」ている。多数のトランスフェクション技術は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Ｇｒａｈａｍら，１９７３，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　５２：４５６；Ｓａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ　（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，１９８９）；Ｄａｖｉｓら，Ｂａｓｉｃ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，１９８６）；ａｎｄ　Ｃｈｕら，１９８１，Ｇｅｎｅ　１３：１９７を参照のこと。このような技術を使用して、１つ以上の外因性ＤＮＡ部分を適切な宿主細胞に導入し得る。

【００４０】

用語「形質導入」とは、通常はファージによる１つの細菌から別の細菌への遺伝子の伝達をいう。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および伝達をいう。

【００４１】

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

【００４２】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるＤＮＡ鎖のハイ

ブリダイゼーションを許容し、かつ顕著に不一致のＤＮＡのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、６５～６８℃での０．０１５M塩化ナトリウム、０．００１５Mクエン酸ナトリウムまたは４２℃での０．０１５M塩化ナトリウム、０．００１５Mクエン酸ナトリウムおよび５０％ホルムアミドである。Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈおよびｍａｎｉａｔｉｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８９）；Ａｎｄｅｒｓｏｎら，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｓａｔｉｏｎ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ第４章（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ Ｌｉｍｉｔｅｄ）（Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌａｎｄ）を参照のこと。

【００４３】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度が影響される。他の薬剤は、非特異的および／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、０．１％ウシ血清アルブミン、０．１％ポリビニルピロリドン、０．１％ピロリン酸ナトリウム、０．１％ドデシル硫酸ナトリウム、$NaDodSO_4$、（ＳＤＳ）、ｆｉｃｏｌｌ、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（または別の非相補的ＤＮＡ）およびデキストラン硫酸であるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、ｐＨ６．８～７．４で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、ｐＨからほぼ独立する。Ａｎｄｅｒｓｏｎら，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｓａｔｉｏｎ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ第４章（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ Ｌｉｍｉｔｅｄ）を参照のこと。

【００４４】

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

T_m（℃）＝８１．５＋１６．６（ｌｏｇ［Ｎａ＋］）＋０．４１（％Ｇ＋Ｃ）－６００／Ｎ－０．７２（％ホルムアミド）

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

【００４５】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するＤＮＡ二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、５０～６５℃での０．０１５M塩化ナトリウム、０．００１５Mクエン酸ナトリウムまたは３７～５０℃での０．０１５M塩化ナトリウム、０．００１５Mクエン酸ナトリウムおよび２０％ホルムアミドである。例示として、０．０１５Mナトリウムイオン中での５０℃という「中程度にストリンジェントな条件」は、約２１％の不一致を可能にする。

【００４６】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって認識される。例えば、０．０１５Mナトリウ

ムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長さのＤＮＡの融解温度は、約７１℃である。６５℃で（同じイオン強度で）の洗浄を用いると、このことは、約６％の不一致を可能にする。より遠く関連した配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。

【００４７】

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

Ｔｍ＝Ａ－Ｔ塩基対あたり２℃　＋　Ｇ－Ｃ塩基対あたり４℃

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

【００４８】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェンシー洗浄条件は通常、６×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳ中でのそのオリゴヌクレオチドのＴｍよりも０℃～５℃低い温度においてである。

【００４９】

用語「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド」は、配列番号２もしくは配列番号４のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および天然の配列もしくは変異配列を有する関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、対立遺伝子改変体；スプライス改変体；フラグメント；誘導体；置換改変体、欠失改変体および挿入改変体；融合ポリペプチド；および配列番号２もしくは配列番号４のいずれかのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのオルソログであって、配列番号２もしくは配列番号４のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも１つの活性を有するものが、挙げられる。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、本明細書中で規定されるような、成熟ポリペプチドであり得、そして調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有していなくてもよい。

【００５０】

用語「単離されたポリペプチド」とは、（１）供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるポリペプチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約５０％から単離された本発明のポリペプチド、（２）「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に連結しない（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）、本発明のポリペプチド、（３）天然には連結しないポリペプチドに作動可能に連結（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）する、本発明のポリペプチド、または（４）天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、任意の他の混入ポリペプチドまたは天然の環境において見出される他の混入物（これは、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用に干渉する）を実質的に含まない。

【００５１】

用語「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号２または配列番号４のいずれかに示されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドポリペプチドの全長未満のアミノ酸を含むポリペプチドをいう。このようなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、６アミノ酸以上の長さであり得、そして例えば、このアミノ酸配列からの１つ以上の残基の、アミノ酸末端での短縮（リーダー配列を含むかまたは含まない）、カルボキシ末端欠失および／もしくは内部欠失での短縮をしょうじうる。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドフラグメントは、選択的ＲＮＡスプライシング、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮化および／または欠失は、約１０アミノ酸、または約２０アミノ酸、または約５０アミノ酸、または約７５アミノ酸、または約１００アミノ酸、または約１００より多くのアミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約２５個連続したアミノ酸、または約５０アミノ酸、または約７５アミノ酸、または約１００アミノ酸、または約１２５アミノ酸を含む。このようなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポ

リペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに対する抗体を生成するために使用され得ることが理解される。

【００５２】

用語「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド改変体」は、配列番号２または配列番号４のいずれかに示されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドアミノ酸配列と比較して、１つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失、および／または付加を有するアミノ酸配列を含むＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在し得るか、または、人工的に構築され得る。このようなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド改変体は、配列番号１または配列番号３のいずれかに示されるＤＮＡ配列から変化するＤＮＡ配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、１～３、または１～５、または１～１０、または１～１５、または１～２０、または１～２５、または１～５０、または１～７５、または１～１００、または１００より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および／または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

【００５３】

当業者は、ネイティブのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して決定し得る。例えば、生物学的活性を破壊することなく変化され得るこの分子の適切な領域を予測し得る。また、当業者は、生物学的活性を破壊することなくかまたはそのポリペプチド構造に不利に影響することなく保存的アミノ酸置換に供され得る、生物学的活性もしくは構造に重要であり得る領域さえ認識する。

【００５４】

例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの領域における変化が、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの生物学的活性および／または構造にさほど不利に影響を与えるようではないことが、理解される。当業者にはまた、比較的保存された領域においてさえ、化学的に類似のアミノ酸を、活性を維持ながら天然に存在する残基と置換し得ることが公知である（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に不利に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【００５５】

活性を破壊することなく変化され得るその分子の適切な領域を予測するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を行った後、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの領域における変化が、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの生物学的活性および／または構造にさほど不利に影響を与えるようではないことが、理解される。当業者にはまた、比較的保存された領域においてさえ、化学的に類似のアミノ酸を、活性を維持ながら天然に存在する残基と置換し得ることが公知である（保存的アミノ酸残基置換）。

【００５６】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造－機能研究を再調査し得る。このような比較の観点において、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、ＴＮＦ

ｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に対する化学的に類似のアミノ酸置換を、選択し得る。

【００５７】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造に関して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。このような情報の観点において、当業者は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面に存在すると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。

【００５８】

本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドアナログは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列を関連ファミリーメンバーと比較することによって決定され得る。例示的ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド関連メンバーとしては、オステオプロテジェリン（Ｏｓｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ（ＯＰＧ））およびＴＮＦレセプターが挙げられるが、これらに限定されない。この比較は、保存領域および非保存領域内での、複数のファミリーメンバーとの、Ｐｉｌｅｕｐアラインメント（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ ＧＣＧ Ｐｒｏｇｒａｍ Ｐａｃｋａｇｅ）または等価な（オーバーラップ）比較を使用することによって達成され得る。

【００５９】

図８に示されるように、ヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号７（配列番号２のアミノ酸４１～９６を示す））が、ヒトＯＰＧ（配列番号８）と整列される。他のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドアナログは、これらの方法または当業者に公知の他の方法を使用して決定され得る。これらのオーバーラップ配列は、さらなるＴＮＦｒ／ＯＰＧアナログを生じる、保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換に関する指針を提供する。これらのアミノ酸置換が、天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸置換からなり得ることが、理解される。例えば、図８に示されるように、関連ファミリーメンバーの配列のアラインメントは、可能なＴＮＦｒ／ＯＰＧアナログを示し、これは、Ｇｌｙ残基で置換される配列番号２の４２位（図８の３７位）のＰｒｏ残基、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＡｓｎもしくはＧｌｕ残基で置換される配列番号２の５１位（図８の４６位）のＣｙｓ残基、ならびに／あるいはＴｒｐもしくはＴｙｒ残基で置換される配列番号２の５６位（図８の５１位）のＰｈｅ残基を有し得る。さらに、可能なＴＮＦｒ／ＯＰＧアナログは、ＬｙｓもしくはＡｒｇ残基で置換される配列番号２の６８位（図８の６３位）のＨｉｓ残基、Ｃｙｓ、Ｔｈｒ、ＡｓｎもしくはＧｌｎ残基で置換される配列番号２の７１位（図８の６７位）のＭｅｔ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅもしくはノルロイシン残基、Ｇｌｙ残基で置換される配列番号２の８４位（図８の７９位）のＡｌａ残基、ならびに／あるいはＧｌｕ残基で置換される配列番号２の８７位（図８の８３位）のＡｓｐ残基を有し得る。

【００６０】

さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を各アミノ酸残基に含む、試験改変体を生成し得る。これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が破壊を生じるか、所望でなく減少するか、または所望でない活性であることを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独でかまたは他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【００６１】

このような変化を行う際に、アミノ酸のヒドロパシー指数が考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて、ヒドロパシー指数を割り当てられている。ヒドロパシー指数は、以下である：イソロイシン（＋４．５）；バリン（＋４．２）；ロイシ

ン（＋３．８）；フェニルアラニン（＋２．８）；システイン／シスチン（＋２．５）；メチオニン（＋１．９）；アラニン（＋１．８）；グリシン（－０．４）；スレオニン（－０．７）；セリン（－０．８）；トリプトファン（－０．９）；チロシン（－１．３）；プロリン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタミン酸（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；およびアルギニン（－４．５）。

【００６２】

タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能を確認する際の、ヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該分野において一般的に理解されている（Ｋｙｔｅら、１９８２，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５－３１）。特定のアミノ酸が類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに使用され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ヒドロパシー指数に基づいて変化を起こす際に、ヒドロパシー指数が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±１以内であるものが特に好ましく、そして±０．５以内であるものが、なおより特に好ましい。

【００６３】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る（特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合においてと同様に、免疫学的実施形態における使用に関して考慮される場合）こともまた、当該分野において理解されている。

【００６４】

米国特許第４，５５４，１０１号は、タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される場合に、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に相関すると記載する。米国特許第４，５５４，１０１号に詳説されるように、以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパラギン酸（＋３．０±１）；グルタミン酸（＋３．０±１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（＋０．２）；グリシン（０）；スレオニン（－０．４）；プロリン（－０．５±１）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）；およびトリプトファン（－３．４）。

【００６５】

類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±１以内であるものが特に好ましく、そして±０．５以内であるものが、なおより特に好ましい。一次アミノ酸配列から、エピトープをまた、親水性に基づいて同定し得る。米国特許第４，５５４，１０１号はまた、親水性に基づく、一次アミノ酸配列からのエピトープの同定および調製を教示する。米国特許第４，５５４，１０１号に開示される方法を介して、当業者は、所定のアミノ酸配列内からエピトープを同定することが可能である。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」と呼ばれる。

【００６６】

所望のアミノ酸置換（保存的であれ非保存的であれ）は、当業者によって、このような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。

【００６７】

多数の科学刊行物が、アミノ酸配列の分析からの、二次構造の推定、およびエピトープの同定に充てられてきた。Ｃｈｏｕら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １３（２）：２２２－４５（１９７４）；Ｃｈｏｕら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １１３（２）：２１１－２２（１９７４）；Ｃｈｏｕら、Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．Ｒｅｌａｔ．Ａｒｅａｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４７：４５－４８（１９７８）；Ｃｈｏｕら、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃ

ｈｅｍ．４７：２５１－２７６；およびＣｈｏｕら、Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．２６：３６７－８４（１９７９）を参照のこと。さらに、タンパク質の抗原性部分およびエピトープコア領域を推定するのを補助するために、コンピュータープログラムが現在利用可能である。例としては、Ｊａｍｅｓｏｎ－Ｗｏｌｆ分析に基づくプログラム（Ｊａｍｅｓｏｎら、Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．４（１）：１８１～１８６（１９９８）ならびにＷｏｌｆら、Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．４（１）：１８７～１９１（１９９８）、プログラムＰｅｐＰｌｏｔ（登録商標）（Ｂｒｕｔｌａｇら、ＣＡＢＳ　６：２３７～２４５（１９９０）およびＷｅｉｓｂｅｒｇｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２８：７４０～７４２（１９８５））、ならびにタンパク質四次構造予測のための他の新規なプログラム（Ｆｅｔｒｏｗら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１１：４７９～４８３（１９９３）が、挙げられる。

【００６８】

さらに、コンピュータプログラムが、二次構造の推定を補助するために、現在利用可能である。二次構造を推定する１つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、３０％より大きな配列同一性または４０％より大きな類似性を有する２つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース（ＰＤＢ）の近年の成長は、二次構造（ポリペプチドまたはタンパク質の構造における可能な折り畳みの数を含む）の増強された推定性を提供してきた。Ｈｏｌｍら、１９９９，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２７：２４４－４７を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質において制限された数の折り畳みが存在すること、および一旦、重要な数の構造が解析されると、構造推定は劇的により正確となることが、示唆されてきた（Ｂｒｅｎｎｅｒら、１９９７，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．７：３６９－７６）。

【００６９】

二次構造を推定するさらなる方法は、「スレッディング（ｔｈｒｅａｄｉｎｇ）」（Ｊｏｎｅｓ，１９９７，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．７：３７７－８７；Ｓｉｐｐｌら、１９９６，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　４：１５－１９）、「プロフィール分析」（Ｂｏｗｉｅら、１９９１，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５３：１６４－７０；Ｇｒｉｂｓｋｏｖら、１９９０，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８３：１４６－５９；Ｇｒｉｂｓｋｏｖら、１９８７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８４：４３５５－５８）、および「ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ　ｌｉｎｋａｇｅ」（Ｈｏｌｍら、前出、およびＢｒｅｎｎｅｒら、前出を参照のこと）を包含する。

【００７０】

好ましい実施形態において、その改変体は、１～３、または１～５、または１～１０、または１～１５、または１～２０、または１～２５、または１～５０、または１～７５、または１～１００、または１００より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および／または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。さらに、この改変体は、カルボキシ末端またはアミノ酸末端（リーダー配列を含むかまたは含まない）のいずれかでの、アミノ酸残基の付加を有し得る。

【００７１】

好ましいＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および／または型がネイティブＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。１つの実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド改変体は、より多いかまたはより少ない数のＮ結合グリコシル化部位を含む。Ｎ結合グリコシル化部位は、配列Ａｓｎ－Ｘ－ＳｅｒまたはＡｓｎ－Ｘ－Ｔｈｒによって特徴付けられ、ここで、Ｘと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、Ｎ結合炭水化物鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するＮ結合炭水化物鎖を除去する。１つ以上のＮ結合グリコシル化部位（代表的に、天然に存在するグリコシル化部位）が排除され、そして１つ以上の新たなＮ結合部位が作製される、Ｎ

結合炭水化物鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいＴＮＦｒ／ＯＰＧ様改変体としては、１つ以上のシステイン残基が、欠失しているか、または別のアミノ酸（例えば、セリン）で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な配置にリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には同数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【００７２】

用語「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様融合ポリペプチド」は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、そのフラグメント、および／または改変体と、異種ペプチドまたはポリペプチドとの融合物をいう。異種ペプチドおよびポリペプチドとしては、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様融合ポリペプチドの検出および／または単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質もしくはその一部（例えば、細胞外ドメイン、または膜貫通および細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドもしくはその一部；触媒活性である酵素またはその一部；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加するポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）、ならびにＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと異なる治療活性を有するポリペプチドが、挙げられるが、これらに限定されない。

【００７３】

さらに、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、それ自体にか、そのフラグメント、改変体、もしくは誘導体に、融合され得る。融合は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、なされ得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いずに直接であっても、リンカーもしくはアダプター分子を介してであってもよい。リンカーまたはアダプター分子は、１つ以上のアミノ酸残基であり得、代表的に、約２０～約５０アミノ酸残基である。リンカーまたはアダプター分子はまた、ＤＮＡ制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼに対する切断部位を有して設計されて、融合した部分の分離を可能にし得る。一旦構築されると、誘導ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

【００７４】

本発明のさらなる実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド（フラグメント、改変体、および／または誘導体を含む）は、ヒトＩｇＧのＦｃ領域の１つ以上のドメインに融合される。抗体は、以下の２つの機能的に独立した部分を含む；抗原を結合する「Ｆａｂ」として公知の可変ドメイン、ならびに相補的活性化および食作用細胞による攻撃のようなエフェクター機能に関与する、「Ｆｃ」として公知の定常ドメイン。Ｆｃは、長い血清半減期を有し、一方でＦａｂは、短寿命である。Ｃａｐｏｎら、１９８９，Ｎａｔｕｒｅ　３３７：５２５－３１。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Ｆｃドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはＦｃレセプター結合、プロテインＡ結合、補体結合、および恐らく、胎盤移入さえものような機能を組み込み得る（同書）。表ＩＩは、当該分野において公知の特定のＦｃ融合物（融合したＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの生成に適用可能な材料および方法を含む）の使用を要約する。

【００７５】

【表１】

表1
治療タンパク質とのFc融合物

Fcの形態	融合パートナー	治療関係	参考文献
IgG1	CD30-LのN末端	ホジキン病；未分化リンパ腫；T細胞白血病	米国特許第5,480,981号
マウスFcγ2a	IL-10	抗炎症性；移植片拒絶	Zheng et al. (1995), J. Immunol., 154: 5590-600
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisher et al. (1996), N. Engl. J. Med., 334: 1697-1702; Van Zee et al., (1996), J. Immunol., 156: 2221-30
IgG, IgA, IgM, またはIgE（第1ドメインを除く）	TNFレセプター	炎症，自己免疫障害	米国特許第5,808,029号（1998年9月15日発行）
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Capon et al. (1989), Nature 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2のN末端	抗ガン性，抗ウイルス性	Harvill et al. (1995), Immunotech., 1: 95-105
IgG1	OPGのC末端	変形性関節症；骨密度	WO 97/23614,（1997年7月3日公開）
IgG1	レプチンのN末端	抗肥満	PCT/US 97/23183,（1997年12月11日出願）
ヒトIgCγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley (1991), J. Exp. Med., 174:561-9

一例において、ヒトＩｇＧのヒンジ領域、ＣＨ２領域、およびＣＨ３領域の全てまたは一部は、当業者に公知の方法を使用して、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端のいずれかに融合され得る。別の例において、ヒトＩｇＧのヒンジ領域、ＣＨ２領域、およびＣＨ３領域の一部が、融合され得る。得られるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃ融合ポリペプチドは、プロテインＡアフィニティーカラムの使用によって、精製され得る。Ｆｃ領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物より実質的に長いインビボでの半減期を示すことが見出された。また、Ｆｃ領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化／多量体化を可能にする。Ｆｃ領域は、天然に存在するＦｃ領域であり得るか、または治療品質、循環時間、もしくは減少した凝集のような特定の品質を改善するよう変更され得る。

【００７６】
用語「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド誘導体」は、化学的に改変された、本明細書中に規定されるようなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、フラグメント、または改変体をいう。この誘導体は、ポリペプチドに結合する分子の型または位置のいずれかが、天然に存在するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと異なる様式で改変される。誘導体はさらに、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに天然に結合する１つ以上の化学基の欠失によって形成される分子を含み得る。

【００７７】
例えば、このポリペプチドは、１つ以上のポリマー（水溶性ポリマー、Ｎ－連結またはＯ－連結炭水化物、糖、ホスフェート、および／または他のこのような分子を含むが、これらに限定されない）の共有結合によって改変され得る。例えば、選択されるポリマーは、代表的に、水溶性であり、その結果、このポリマーが結合されるタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的環境）中で沈澱しない。ポリマーは、任意の分子量であり得、そして分枝であっても非分枝であってもよい。適切なポリマーの範囲内に含まれるのは、ポリマーの混合物である。好ましくは、最終生成調製物の治療用途のために、ポリマーは、薬学的に受容可能である。

【００７８】
適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、モノポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約６ｋＤ）のデキストラン）、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ－（Ｎ－ビニルピロリジン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシ／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびビニルアルコール。共有結合したＴＮＦｒ／ＯＰＧ様マルチマーを調製するために使用され得る、二官能性ＰＥＧ架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【００７９】
アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。例えば、反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであり、これは、水溶性、またはモノC_1－C_{10}アルコキシもしくはそのアリールオキシ誘導体である（米国特許第５，２５２，７１４号を参照のこと）。

【００８０】
ポリペプチドのペグ化（ｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ）は、当該分野で公知の任意のペグ化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Ｆｒａｎｃｉｓら，１９９２，Ｆｏｃｕｓ ｏｎ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ ３：４－１０；ＥＰ ０１５４３１６；ＥＰ ０４０１３８４ならびに米国特許第４，１７９，３３７号。例えば、ペグ化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。

【００８１】
ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）は、本明細書中における使用に適した水溶性ポリマーである。本明細書中に使用される場合、用語「ポリエチレングリコール」および「ＰＥＧ」は、タンパク質を誘導体化するために使用される任意の形態のＰＥＧ（モノ－（C_1－C_{10}）アルコキシポリエチレングリコールまたはアリールオキシポリエチレングリコールを含む）を含むことを意味する。

【００８２】
一般に、化学的誘導は、生物学的に活性な物質を活性化したポリマー分子反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ペグ化ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを調製するための方法は、一般的に、以下の工程を包含する：（ａ）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが１以上のＰＥＧ基に結合する条件下で、ポリペプチドをポリエチレン

グリコール（例えば、ＰＥＧの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）を反応させる工程、ならびに（ｂ）反応生成物を得る工程。一般的に、アシル化反応の最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ＰＥＧ：タンパク質の比が大きくなるほど、ポリペグ化生成物の割合も大きくなる。１つの実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一ＰＥＧ部分を有し得る。例えば、米国特許第５，２３４，７８４号を参照のこと。

【００８３】

一般に、本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る条件は、本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強もしくは減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加または減少した半減期）を有し得る。

【００８４】

用語「生物学的に活性なＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド」、「生物学的に活性なＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドフラグメント」、「生物学的に活性なＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド改変体」、および「生物学的に活性なＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド誘導体」は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの少なくとも１つの活性特徴（例えば、配列番号２または配列番号４のいずれかに示されるポリペプチドの活性）を有するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをいう。一般的に、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、そのフラグメント、改変体、および誘導体は、配列番号２または配列番号４のいずれかに示されるようなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの少なくとも１つの活性特徴を有する。さらに、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、免疫原として活性であり得、すなわち、このポリペプチドは、抗体が惹起される少なくとも１つのエピトープを含む。

【００８５】

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

【００８６】

用語「単離されたポリペプチド」とは、その天然環境において見出される少なくとも１つの夾雑ポリペプチドがない、本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、任意の他の夾雑哺乳動物ポリペプチド（これは、その治療的用途、予防的用途、または研究的用途を妨害する）を実質的に含まない。

【００８７】

用語「オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）」は、配列番号２または４に示されるようなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドアミノ酸配列に対応する別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドおよびヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、互いのオルソログと考えられる。

【００８８】

用語「成熟ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したポリペプチドをいう。成熟ポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および／またはカルボキシ末端のタンパク質分解性プロセシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、Ｎ連結および／またはＯ連結グリコシル化など）を含み得る。例示的な成熟ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様融合ポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸残基＿＿～アミノ酸残基　　または配列番号４のアミノ酸残基　　～アミノ酸残基　　によって示される。（空欄を埋める）。

【００８９】

用語「有効量」および「治療有効量」は、本明細書中に示されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの１つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用される、Ｔ

ＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子の量をいう。
【００９０】
用語「選択的結合因子」は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）、キメラ抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、可溶性形態もしくは結合形態で標識され得る抗体にする抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体）、ならびに公知の技術（酵素学的切断、ペプチド合成、または組換え技術を含むが、これらに限定されない）によって提供されるそのフラグメント、領域、または誘導体を含む。本発明の抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様選択的結合因子は、例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の一部を結合し得、これは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプターへの結合を阻害する。
【００９１】
本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子の、ヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合し、かつヒト非ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのオルソログ（すなわち、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの種間バージョン（例えば、マウスＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドおよびラットＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。好ましい実施形態は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに対して高度に特異的である抗体は、非ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに対して特異的に交差反応しない（すなわち、これらは結合しない）ことに関する。
【００９２】
用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得、そしてさらに動物において使用されて、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し得る分子または分子の一部をいう。抗原は、１つ以上のエピトープを有し得る。上記に参照される特異的な結合反応は、抗原が、高い選択的な様式でこの対応する抗体と反応し、他の抗原によって惹起され得る多数の他の抗体とは反応しないことを示すことを意味する。
【００９３】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、フラグメント、改変体、および誘導体は、当該分野で公知の方法を用いてＴＮＦｒ／ＯＰＧ様選択的結合因子を調整するために使用され得る。従って、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合する抗体および抗体フラグメントは、本発明の範囲内である。抗体フラグメントとしては、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのエピトープに結合する抗体の一部を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって生成されるＦａｂフラグメントおよびＦ（ａｂ’）フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えＤＮＡ技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現）によって生成されるフラグメントが挙げられる。これらの抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、ポリクローナル一重特異的なポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、単鎖抗体、および二重特異的抗体であり得る。
【００９４】
（核酸分子および／またはポリペプチドの関連性）
関連核酸分子が、配列番号１または配列番号３の核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含み、そして、上記ヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を含むことが、理解される。関連核酸分子はまた、配列番号２または配列番号４のポリペプチドと比較して、１つ以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および／または欠失を実質的に含むか、あるいは実質的にこれらからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。
【００９５】
フラグメントは、配列番号２または配列番号４のポリペプチドのアミノ酸残基の、少なくとも約２５アミノ酸残基、または約５０、または約７５、または約１００、または約１００よりも多くのポリペプチドをコードする分子を含む。
【００９６】

さらに、関連したＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子はまた、本明細書中で規定されるような中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号１または配列番号３の核酸分子、またはポリペプチド（このポリペプチドは、配列番号３または配列番号４に示されるようなアミノ酸配列を含む）をコードする分子、または本明細書中に規定されるような核酸フラグメント、または本明細書中に規定されるようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの十分に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子を含む。ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に提供されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様配列を用いて、関連配列に関してｃＤＮＡライブラリー、ゲノムライブラリーまたは合成ＤＮＡライブラリースクリーニングして調製され得る。既知配列に対して顕著な同一性を示すＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのＤＮＡ配列および／またはアミノ酸配列の領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブが設計され得る。

【００９７】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、２つ以上のポリペプチド分子または２つ以上の核酸分子の、配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、一列の２つ以上のヌクレオチド配列間または２つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定されるように、核酸分子またはポリペプチド配列間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、２つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によってアドレス指定されるギャップ整列（存在する場合）との間の一致の同一パーセントを評価する。

【００９８】

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

【００９９】

別の実施形態において、関連する核酸分子は、配列番号１もしくは３に示されるヌクレオチド配列に約７０パーセント（７０％）同一であるヌクレオチド配列を含むか、もしくはこれらからなるか、または配列番号２もしくは配列番号４に示されるポリペプチドに約７０パーセント（７０％）同一なポリペプチドであるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を本質的に含むか、もしくはこれらからなる。好ましい実施形態において、ヌクレオチド配列は、配列番号１もしくは３に示されるヌクレオチド配列に約７５％、もしくは約８０％、もしくは約８５％、もしくは約９０％、もしくは約９５、９６、９７、９８、または９９％同一であるか、あるいは、このヌクレオチド配列は、配列番号２もしくは配列番号４に示されるポリペプチドに約７５％、もしくは約８０％、もしくは約８５％、もしくは約９０％、もしくは約９５、９６、９７、９８、または９９％同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。

【０１００】

核酸配列中の差異は、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列の保存的改変および／または非保存的改変をもたらし得る。

【０１０１】

用語「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんどまたは全く影響がないような、非ネイティブ残基によるネイティブアミノ酸残基の置換をいう。例えば、保存的置換は、ポリペプチド中の非極性残基の任意の他の非極性残基での置換から生じる。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニン

スキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンによって置換され得る。アミノ酸置換を作製するための一般的な規則は、表ＩＩに示される。

【０１０２】

（表ＩＩ）

（アミノ酸置換）

【０１０３】

【表２】

本来の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン、Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

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

れる。本明細書中に記載される核酸分子およびポリペプチド分子が、化学合成され得、そして組換え手段によっても産生され得ることは、当業者によって認識される。

【０１０４】

アミノ酸配列に対する保存的改変（およびヌクレオチドをコードする対応する改変）は、天然に存在するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに類似した機能的な特徴および化学的な特徴を有する、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを産生する。対照的に、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの機能特徴および／または化学特徴における実質的な改変は、以下：（ａ）例えば、シートもしくはヘリックスコンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、（ｂ）標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または（ｃ）側鎖のかさの維持に対する影響を有意に変化する置換を選択することによって達成され得る。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、複数のクラスに分割され得る：

１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；

２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；

３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；

５）鎖の配向に影響を与える残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；および

６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【０１０５】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーに対する交換を含み得る。このような置換された残基は、非ヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと相同なヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの領域またはこの分子の非相同領域に導入され得る。

【０１０６】

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

【０１０７】

同一性および／または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の一致を与えるために、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公共に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。２つの配列間の同一性および類似性を決定するための、好ましいコンピュータプログラム方法としては、ＧＣＧプログラムパッケージ（ＧＡＰ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘら、１９８４，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ．Ｒｅｓ．１２：３８７；Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、およびＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０）を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。ＢＬＡＳＴＸプログラムは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）および他の供給源（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、ＢＬ

ＡＳＴ Ｍａｎｕａｌ（ＮＣＢ／ＮＬＭ／ＮＩＨ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ ２０８９４）；Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０、前出）から公に利用可能である。周知のＳｍｉｔｈ Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【０１０８】

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

【０１０９】

例えば、コンピュータアルゴリズムＧＡＰ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を使用して、配列同一性の百分率が決定される２つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合（アルゴリズムによって決定される「適合したスパン」）のために、整列される。ギャップオープニングペナルティー（ｇａｐ ｏｐｅｎｉｎｇ ｐｅｎａｌｔｙ）（これは、平均対角の３倍として計算される：「平均対角」とは、使用される比較行列（ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｍａｔｒｉｘ）の対角の平均である；「対角」とは、特定の比較行列によって各完全なアミノ酸適合に対して割り当てられたスコアまたは数である）およびギャップエクステンションペナルティー（ｇａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ｐｅｎａｌｔｙ）（これは通常、キャップオープニングペナルティーの０．１倍である）、ならびにＰＡＭ ２５０またはＢＬＯＳＵＭ ６２のような比較行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もまた、このアルゴリズムによって使用される（Ｄａｙｈｏｆｆら、Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｖｏｌ．５，補遺３（１９７８）（ＰＡＭ２５０比較行列）；Ｈｅｎｉｋｏｆｆら、１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８９：１０９１５－１９（ＢＬＯＳＵＭ ６２比較行列）を参照のこと）。

【０１１０】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Ａｌｇｏｒｉｔｈｍ：Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３（１９７０）；

Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｍａｔｒｉｘ：ＢＬＯＳＵＭ ６２（Ｈｅｎｉｋｏｆｆら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：１０９１５－１０９１９（１９９２））；

Ｇａｐ Ｐｅｎａｌｔｙ：１２

Ｇａｐ Ｌｅｎｇｔｈ Ｐｅｎａｌｔｙ：４

Ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ ｏｆ Ｓｉｍｉｌａｒｉｔｙ：０

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

【０１１１】

核酸分子配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Ａｌｇｏｒｉｔｈｍ：Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３（１９７０）；

Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｍａｔｒｉｘ：ｍａｔｃｈｅｓ＝＋１０，ｍｉｓｍａｔｃｈ＝０

Ｇａｐ Ｐｅｎａｌｔｙ：５０

Ｇａｐ Ｌｅｎｇｔｈ Ｐｅｎａｌｔｙ：３

このＧＡＰプログラムはまた、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【０１１２】

Ｐｒｏｇｒａｍ Ｍａｎｕａｌ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ

９，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ，１９９７に記載されるものを含む、他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較行列、および類似性の閾値が当業者によって使用され得る。なされるべき特定の選択は、当業者に明らかであり、そしてなされるべき特定の比較（例えば、ＤＮＡ対ＤＮＡ、タンパク質対タンパク質、タンパク質対ＤＮＡ）；ならびにさらに、その比較が所定の対の配列間（この場合には、ＧＡＰまたはＢｅｓｔＦｉｔが一般的に好ましい）であるか、１つの配列と大きなデータベースの配列との間（この場合には、ＦＡＳＴＡまたはＢＬＡＳＴＡが好ましい）であるかに依存する。

【０１１３】

（合成）

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

【０１１４】

（核酸分子）

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の様式（化学合成、ｃＤＮＡもしくはゲノムのライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および／またはｃＤＮＡのＰＣＲ増幅が挙げられるが、これらに限定されない）で容易に得られ得る。

【０１１５】

本明細書中において使用される組換えＤＮＡ法は、一般に、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ、１９８９、および／またはＡｕｓｕｂｅｌら編、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｉｎｃ．およびＷｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ ＮＹ、１９９４に記載されている。本発明は、本明細書中に記載され得るような核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。

【０１１６】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする遺伝子またはｃＤＮＡは、ゲノムライブラリーもしくはｃＤＮＡライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニング、またはＰＣＲ増幅によって得られ得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が１つの種から同定された場合、この遺伝子の全てまたは一部は、他の種由来の対応する遺伝子（オルソログ）または同じ種由来の関連する遺伝子（ホモログ）を同定するためのプローブとして使用され得る。このプローブまたはプライマーを使用して、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングし得る。さらに、配列番号１または配列番号３に記載されるような配列を有する核酸分子の部分または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的に、中程度または高いストリンジェンシーの条件が、スクリーニングに使用されて、このスクリーニングから得られる偽陽性の数を最小にする。

【０１１７】

ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子もまた、発現されたタンパク質の特性に基づいて陽性クローンの検出を使用する発現クローニングによって、同定され得る。代表的に、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）を、宿主細胞表面において発現および提示されたクローンタンパク質に結合させることによって、スクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

【０１１８】

以下に記載される説明に従って実施される組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレ

オチドを産生し得、そしてコードされたポリペプチドを発現し得る。例えば、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望のヌクレオチド配列を容易に生成し得る。次いで、これらの配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを生成し得る。あるいは、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされたＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドが、多量に生成され得る。

【０１１９】

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

【０１２０】

ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Ｅｎｇｅｌｓら、１９８９，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．２８：７１６－３４によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル、ホスホルアミダイト、およびＨ－ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするＤＮＡは、数百ヌクレオチド長である。約１００ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントが一緒に連結されて、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするＤＮＡフラグメントは、ＡＴＧを有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されるか否かに依存して、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。

【０１２１】

いくつかの場合において、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望であり得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点変異を有する部位特異的変異誘発、ＰＣＲ増幅、または他の適切な方法を使用して生成し得る（変異誘発技術の記載に関しては、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、前出、およびＡｕｓｕｂｅｌら、前出を参照のこと）。Ｅｎｇｅｌｓら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【０１２２】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択される宿主細胞およびＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドに依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先性のための「Ｅｃｏ＿ｈｉｇｈ．Ｃｏｄ」のようなコドン度数表を組み込むコンピュータアルゴリズムが使用され得、そしてＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ ９．０（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）によって提供される。他の有用なコドン度数表としては、「Ｃｅｌｅｇａｎｓ＿ｈｉｇｈ．ｃｏｄ」、「Ｃｅｌｅｇａｎｓ＿ｌｏｗ．ｃｏｄ」、「Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ＿ｈｉｇｈ．ｃｏｄ」

、「Ｈｕｍａｎ＿ｈｉｇｈ．ｃｏｄ」、「Ｍａｉｚｅ＿ｈｉｇｈ．ｃｏｄ」、および「Ｙｅａｓｔ＿ｈｉｇｈ．ｃｏｄ．」が挙げられる。

【０１２３】

タンパク質の実施形態において、核酸分子は、本明細書に記載されるような保存的アミノ酸置換を有するＴＮＦｒ－ＯＰＧ様改変体、Ｎ－連結またはＯ－連結グリコシル化部位の付加および／または欠失を含むＴＮＦｒ－ＯＰＧ様改変体、１つ以上のシステイン残基の欠失および／または置換を有するＴＮＦｒ－ＯＰＧ様改変体、または本明細書中に記載されるＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドフラグメントをコードする。さらに、核酸分子は、本明細書中に記載ノＴＮＦｒ－ＯＰＧ様改変体、フラグメント、および融合ポリペプチドの組み合わせの任意の組合せをコードし得る。

【０１２４】

（ベクターおよび宿主細胞）

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

【０１２５】

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

【０１２６】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドコード配列の５’末端または３’末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；オリゴヌクレオチド配列は、ｐｏｌｙＨｉｓ（例えば、ｈｅｘａＨｉｓ）、別の「タグ」（例えば、ＦＬＡＧ、ＨＡ（赤血球凝集素インフルエンザウイルス））または市販の抗体が存在するｍｙｃをコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとしてタグに対して抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドから除去される。

【０１２７】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および／または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、１つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチド発現を調節する

ために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【０１２８】

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

【０１２９】

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

【０１３０】

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

【０１３１】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の３’側に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、Ｇ－Ｃリッチフラグメント、続いてポリ－Ｔ配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化され得るか、またはベクターの一部として市販で購入され、これは、本明細書中上記のような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【０１３２】

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

【０１３３】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生により大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の連続的な生成の染色体内でタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように独特に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子とＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドをコードするＤＮＡとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量のＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドが、増幅されたＤＮＡから合成される。

【０１３４】

リボソーム結合部位は、通常、ｍＲＮＡの翻訳開始に必要であり、そしてＳｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ配列（原核性物）またはＫｏｚａｋ配列（真核生物）によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現されるＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドのプロモーターの３’側およびコード配列の５’側に配置される。Ｓｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン（すなわち、高いＡ－Ｇ含有量）である。多くのＳｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して、原核生物ベクターを使用して容易に合成され得る。

【０１３５】

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

【０１３６】

ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列またはＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が本発明の範囲内である。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドシグナル配列を認識せず、プロセスしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシンＩＩリーダーのグループから選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌について、ネイティブなＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、α因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列が満足であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【０１３７】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましい、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のシグナルペプチド（ｐｒｅｓｅｑｕｅｎｃｅ）が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列（ｐｒｏ－ｓｅｑｕｅｎｃｅ）を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最後のタンパク質産物は、１位に（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に

対して）、発現に付随して１つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に除去されないかもしれない。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される１つまたは２つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断される場合、所望のＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

【０１３８】

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

【０１３９】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子（一般的に、約１００～１０００ｂｐ）の開始コドンに対して上流（すなわち、５’側）に配置される非転写配列である。プロモーターは、通常、２つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）の１つにグループ化される。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくらかの変化（例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答してそれらの制御下で、ＤＮＡからの転写の増加したレベルを開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対して遺伝子をほとんど制御しないかまたは制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源のＤＮＡからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドをコードするＤＮＡに作動可能に連結される。ネイティブなＴＮＦｒ－ＯＰＧ様プロモーター配列は、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様核酸分子の増幅および／または発現に指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能であり、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

【０１４０】

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

【０１４１】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターとの使用に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用

に適切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ２）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよび最も好ましいシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【０１４２】

ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様遺伝子発現を制御する際に関心があり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：ＳＶ４０初期プロモータ領域（Ｂｅｒｎｏｉｓｔ ａｎｄ Ｃｈａｍｂｏｎ，１９８１，Ｎａｔｕｒｅ ２９０：３０４－１０）；ＣＭＶプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの３’側の長い終末反復に含まれるプロモーター（Ｙａｍａｍｏｔｏ，ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｃｅｌｌ ２２ ：７８７－９７）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Ｗａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７８：１４４４－４５）；メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Ｂｒｉｎｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８２，Ｎａｔｕｒｅ ２９６：３９－４２）；β－ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Ｖｉｌｌａ－Ｋａｍａｒｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，１９７８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，７５：３７２７－３１）；またはｔａｃプロモーター（ＤｅＢｏｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８０：２１－２５）。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている以下の動物転写制御領域もまた関心がある：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼＩ遺伝子制御領域（Ｓｗｉｆｔ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｃｅｌｌ ３８：６３９－４６；Ｏｒｎｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．５０：３９９－４０９（１９８６）；ＭａｃＤｏｎａｌｄ，１９８７，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ ７：４２５－５１５）；膵臓β細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域（Ｈａｎａｈａｎ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：１１５－２２）；リンパ球において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Ｇｒｏｓｓｃｈｅｄｌ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｃｅｌｌ ３８：６４７－５８；Ａｄａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１８：５３３－３８；Ａｌｅｘａｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，７：１４３６－４４）；精巣、乳房、リンパ球、および肥満細胞において活性なマウス哺乳動物腫瘍ウイルス制御領域（Ｌｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｅｌｌ ４５：４８５－９５）；肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Ｐｉｎｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：２６８－７６）；肝臓において活性なα－フェトプロテイン遺伝子制御領域（Ｋｒｕｍｌａｕｆ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，５：１６３９－４８；Ｈａｍｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３５：５３－５８）；肝臓において活性なα１－抗トリプシン遺伝子制御領域（Ｋｅｌｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：１６１－７１）；骨髄性細胞において活性なβ－グロビン遺伝子制御領域（Ｍｏｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：３３８－４０；Ｋｏｌｌｉａｓ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｅｌｌ ４６：８９－９４）；脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリンベースのタンパク質遺伝子制御領域（Ｒｅａｄｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｃｅｌｌ ４８：７０３－１２）；骨格筋において活性なミオシン軽鎖－２遺伝子制御領域（Ｓａｎｉ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：２８３－８６）；ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域（Ｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３４：１３７２－７８）。

【０１４３】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明のＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドをコードするＤＮＡの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約１０～３００ｂｐの長さ

のＤＮＡのシスに作用するエレメントである。エンハンサーは、相対的な方向および位置に独立する。これらは、転写ユニットに対して５’側および３’側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である（例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトプロテインおよびインシュリン）。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。ＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化について例示的に増強するエレメントである。エンハンサーは、ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様核酸分子に対して５’位または３’位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから５’位側に配置される。

【０１４４】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。本明細書中に記載される隣接配列の１つ以上がすでにベクター内にない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【０１４５】

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

【０１４６】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、Ｂｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（登録商標）プラスミド誘導体（高コピー数ＣｏｌＥｌ－ベースのファージミド、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ ＣＡ）、Ｔａｑ増幅ＰＣＲ産物をクローニングするために設計されたＰＣＲクローニングプラスミド（例えば、ＴＯＰＯ^{TM} ＴＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ（登録商標）Ｋｉｔ、ＰＣＲ２．１（登録商標）プラスミド誘導体、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）、ならびにバキュロウイルス発現系のような哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター（ｐＢａｃＰＡＫプラスミド誘導体、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ）が挙げられる。

【０１４７】

ベクターが構築され、そしてＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅発現および／またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドに対する発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクチン、ＤＥＡＥ－デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、一部、使用される宿主細胞の種類の機能である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、上記に記載される。

【０１４８】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙ

ｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ），Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡから入手可能である。例としては、限定しないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ６１）、ＣＨＯ ＤＨＦＲ（－）細胞（Ｕｒｌａｕｂ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳ．Ａ．９７：４２１６－２０）、ヒト胚性腎臓（ＨＥＫ）２９３または２９３Ｔ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ１５７３）、あるいは３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ９２）のような哺乳動物細胞が挙げられる。適切な哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルＣＯＳ－１（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ１６５０）およびＣＯＳ－７細胞株（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ１５７３）、およびＣＶ－１細胞株（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ７０）である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびゲッ歯類動物細胞株（形質転換細胞株を含む）が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞菌株、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠き得るか、または優先的に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、限定しないが、マウス神経芽細胞腫Ｎ２Ａ細胞、ＨｅＬａ、マウスＬ－９２９細胞、Ｓｗｉｓｓから誘導された３Ｔ３株、Ｂａｌｂ－ｃまたはＮＩＨマウス、ＢＨＫまたはＨａｋハムスター細胞株が挙げられる（これらは、ＡＴＣＣから入手可能である）。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現の当業者によって公知であり入手可能である。

【０１４９】

同様に、細菌細胞が、本発明に適切な宿主細胞として有用である。例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ（例えば、ＨＢ１０１、ＤＨ５α、ＤＨ１０、およびＭＣ１０６１）の種々の菌株は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐｐ．，他のＢａｃｉｌｌｕｓ ｓｐｐ．、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐｐ．などの種々の菌株がまた本方法において使用され得る。

【０１５０】

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

【０１５１】

さらに、望ましい場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Ｋｉｔｔｓ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，１４：８１０－１７；Ｌｕｃｋｌｏｗ，１９９３，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４：５６４－７２；およびＬｕｃｋｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６７：４５６６－７９に記載される。好ましい昆虫細胞は、Ｓｆ－９およびＨｉ５（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌａｎｄ、ＣＡ）である。

【０１５２】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドについての発現ベクターを宿主細胞中に形質転換することは、周知の方法（塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法またはＤＥＡＥ－デキストラン法を含む）により達成され得る。選択された方法は、使用される宿主細胞の型の機能の一部で有り得る。これらの方法および他の適切な方法が、当業者に周知であり、そして例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）に示される。

【０１５３】

グリコシル化ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳産生動物（例えば、雌ウシまたはヤギ）を使用し、本発明のグルコシル化ポリペプチドを動物の乳に得ることができる。ＴＮＦｒ－ＯＰＧ様ポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、しかし、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【０１５４】
（ポリペプチド産生）
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養分を含む。Ｅ．ｃｏｌｉ細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Ｌｕｒｉａ Ｂｒｏｔｈ（ＬＢ）および／またはＴｅｒｒｉｆｉｃ Ｂｒｏｔｈ（ＴＢ）が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｍｅｄｉｕｍ １６４０（ＲＰＭＩ １６４０）、Ｍｉｎｉｍａｌ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（ＭＥＭ）および／またはＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ）が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要な血清および／または増殖因子を補充され得る。昆虫細胞についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート（ｙｅａｔｏｌａｔｅ）、ラクトアルブミン加水分解産物、および／または胎仔ウシ血清を補充したグレース培地である。
【０１５５】
代表的に、トランスフェクトされた細胞または形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物質として加えられる。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカーエレメントによって検出可能である。例えば、選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養倍地に加えられる化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。
【０１５６】
宿主細胞によって産生されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）分離、免疫沈降、および／またはＤＮＡ結合ゲル移動アッセイのような活性アッセイが挙げられる。
【０１５７】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計される場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中で見出され得る。しかし、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および／または核（真核宿主細胞について）に、あるいは、細胞質ゾル（グラム陽性細菌宿主細胞について）に存在する。
【０１５８】
宿主細胞細胞質および／または核（真核生物宿主細胞について）に位置するかまたは細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に位置するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドについて、細胞内物質（グラム陽性細菌についての封入体を含む）は、当業者に公知の任意の標準的な技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、均質化、および／または超音波処理、続く遠心分離によって、ペリプラズム／細胞質の含有量を放出するように溶解され得る。
【０１５９】
溶液からのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。そのポリペプチドがそのカルボキシル末端もしくはアミノ末端のいずれかに、ヘキサヒスチジンのようなタグを含む（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド／ヘキサＨｉｓ）かまたはＦＬＡＧ（Ｅａｓｔｍａｎ Ｋｏｄａｋ Ｃｏ．、Ｎｅｗ Ｈａｖｅｎ、ＣＴ）もしくはｍｙｃ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のような他の小さいペプチドを含むように合成されている場合、そのポリペプチドは、カラムマトリックスがそのタグにまたはそのポリペプチドに直接高い親和性を有する（すなわち、ＴＮＦＲ／ＯＰＧ様ポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体）アフィニティーカラムにその溶液を通すことによって、本質的に１工程のプロセスで精製され得る。例えば、ポリヒスチジンはニッケルに大きな親和性および特異性で結合し、従ってニッケルのアフィニティーカラム（例えば、Ｑｉａｇ

ｅｎ（登録商標）ニッケルカラム）が、ＴＮＦＲ／ＯＰＧ様ポリペプチド／ポリＨｉｓの精製に使用され得る。例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、１０．１１．８節（Ａｕｓｕｂｅｌら編、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ １９９３）を参照のこと。

【０１６０】

さらに、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを特異的に認識し得そして結合し得るモノクローナル抗体の使用を介して、精製され得る。

【０１６１】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドはタグに結合させなることなく調製され、かつ抗体が利用可能ではない場合、精製についての他の公知の手順が使用され得る。このような手順としては、限定はしないが、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）と続くゲル溶出、ならびに調製的等電収束法（「Ｉｓｏｐｒｉｍｅ」マシーン／技術、Ｈｏｅｆｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）が挙げられる。いくつかの場合、２つ以上の精製技術が、純度の増加を達成するために組み合わされ得る。

【０１６２】

細胞内物質（グラム陰性細菌について封入体を含む）が、当業者に公知の任意の標準的技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および／または超音波処理、それに続く遠心分離によって、ペリプラズム／細胞質の中身を放出するように溶解され得る。

【０１６３】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、内部および／または外部細胞膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後にペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、ｐＨ極限値で処理され得るか、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性のｐＨで、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性のｐＨで、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理して、封入体を放出させ、分断させ、そして溶解させ得る。次いで、溶解されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中およびＭａｒｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．，１８２：２６４－７５に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

【０１６４】

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

【０１６５】
封入体がＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

【０１６６】
従って、精製に適切な手順としては、限定はしないが、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）と続くゲル溶出、ならびに調製的等電収束法（「Ｉｓｏｐｒｉｍｅ」マシーン／技術、Ｈｏｅｆｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）が挙げられる。いくつかの場合、２つ以上の精製技術が、純度の増加を達成するために組み合わされ得る。

【０１６７】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、そのフラグメント、および／または誘導体もまた、当該分野で公知の技術を使用して化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）により調製され得、その公知技術は、たとえば、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄら（Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９、１９６３）、Ｈｏｕｇｈｔｏｎら（Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２：５１３２、１９８５）、ならびにＳｔｅｗａｒｔおよびＹｏｕｎｇ（Ｓｏｌｉｄ　Ｐｈａｓｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ、１９８４）に示される技術である。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含んで合成され得るし、または含まずに合成され得る。化学合成されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドもしくはフラグメントは、これらの参考文献に示される方法を使用して、ジスルフィド架橋を形成するように酸化され得る。化学合成されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、フラグメントもしくは誘導体は、組換え産生されるかもしくは天然の供給源から精製された対応するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、フラグメントもしくは誘導体に匹敵する生物学的活性を有すると予測され、従って、組換えＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドもしくは天然のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと互換可能に使用され得る。

【０１６８】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを得る別の手段は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および／または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体を使用してモニターされ得る。

【０１６９】
核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Ｒｏｂｅｒｔｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９４：１２２９７－３０３を参照のこと。これは、ｍＲＮＡとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Ｒｏｂｅｒｔｓ，１９９９，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｚ．ｂｏｌ　３：２６８－７３もまた参照のこと。さらに、米国特許第５，８２４，４６９号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、それぞれが、５’無作為化配列、中心予備選択配列、および３’ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的活性を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。米国特許第５，７６３，１９２号；

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

【０１７０】

ペプチドまたはポリペプチドの産生するための別の方法は、Ａｔｈｅｒｓｙｓ，Ｉｎｃ．によって出願されたＰＣＴ／ＵＳ９８／２００９４（ＷＯ９９／１５６５０）（「Ｒａｎｄｏｍ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｆｏｒ Ｇｅｎｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ」（ＲＡＧＥ－ＧＤ）として知られている）に記載されており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同性組換えまたは異常な組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的ＤＮＡは、まず、放射線に供せられ、そして遺伝子プロモーターに挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方に最終的に配置され、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現より生じる。

【０１７１】

これらの方法は、包括的なＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ（例えば、生化学的アッセイ、細胞アセイおよび全生物アッセイ（例えば、植物、マウスなど））において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得る。

【０１７２】

（化学的誘導体）

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、この開示が、本明細書中に記載された場合、当業者によって調製され得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然で結合した分子の型または位置のいずれかで、異なる様式で改変される。誘導体は、１以上の天然で結合した化学的な基の除去によって形成される分子を含み得る。配列番号２もしくは配列番号４、またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド改変体のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、１以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、結合するタンパク質は、水環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、目的産物の調製の治療学的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約２ｋＤａと約１００ｋＤａとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、上記の分子量より多い、いくらか少ない重量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約５ｋＤａと約５０ｋＤａの間、より好ましくは、約１２ｋＤａと約４０ｋＤａとの間、そして最も好ましくは、約２０ｋＤａと約３５Ｄａとの間である。

【０１７３】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Ｎ－連結またはＯ－連結炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレン、グリコール（ＰＥＧ）（これは、モノ－（C_1－C_{10}）、アルコキシ－、またはアリールオキシ－ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導するために使用されたＰＥＧの形態を含む）、モノメトキシ－ポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約６ｋＤのデキストラン））、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ－（Ｎ－ビニルピロリジン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシ／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオ

ール（例えば、グリセロール）、およびビニルアルコール。配列番号２もしくは４、またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド改変体のいずれかのアミノ酸配列を含む共有結合したＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【０１７４】

一般に、化学的誘導は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、以下の工程を包含する：（ａ）配列番号２もしくは４、またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド改変体のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドが、１以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）とポリペプチドを反応させる工程、ならびに（ｂ）反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子のタンパク質に対する比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。１実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド誘導体は、アミノ末端の単一ポリマー分子部分を有する。例えば、米国特許第５，２３４，７８４号を参照のこと。

【０１７５】

ポリペプチドのペギル化（ｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ）は、当該分野で公知の任意のペギル化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Ｆｒａｎｃｉｓら，１９９２，Ｆｏｃｕｓ ｏｎ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ ３：４－１０；欧州特許第０１５４３１６号および０４０１３８４号；ならびに米国特許第４，１７９，３３７号。例えば、ペギル化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有する。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有する。例えば、反応性アルデヒド、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであり、これは、水溶性、またはモノC_1－C_{10}アルコキシもしくはそのアリールオキシ誘導体である（米国特許第５，２５２，７１４号を参照のこと）。

【０１７６】

別の実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、ビオチンに化学的に連結され得る。次いで、このビオチン／ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、その結果、４価のアビジン／ビオチン／ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド分子が得られる。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドはまた、ジニトロフェノール（ＤＮＰ）またはチリニトロフェノール（ＴＮＰ）に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗－ＤＮＰまたは抗－ＴＮＰ－ＩｇＭと共に沈殿し、１０価の十量体の結合体を形成する。

【０１７７】

一般に、本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る条件は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドについて本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強または減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加または減少した半減期）を有し得る。

【０１７８】

（マイクロアレイ）

ＤＮＡマイクロアレイ技術が、本発明に従って利用され得ることは明らかである。ＤＮＡマイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置された、核酸の微小の高密度アレイである。このアレイ内の各セルまたはエレメントは、単一種のＤＮＡの多くのコピーを有し、このＤＮＡは、その同族のｍＲＮＡに対するハイブリダイゼーションのための標的として作用する。ＤＮＡマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、最初に、ｍＲＮＡが、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識され

たｃＤＮＡに酵素的に変換される。この材料を、マイクロアレイにハイブリダイズさせ、そして未結合ｃＤＮＡを洗浄により除去する。次いで、アレイ上に提示される別々の遺伝子の発現を、各標的ＤＮＡに特異的に結合された標識ｃＤＮＡの量を定量することによって可視化する。このようにして、数千の遺伝子の発現を、生物学的材料の単一のサンプルから、高スループットの並行様式で定量し得る。

【０１７９】

この高スループット発現プロファイリングは、本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子に関する広範な適用を有する。これらの適用としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：治療用標的としてのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様疾患関連遺伝子の同定および確証；ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子およびそのインヒビターの分子毒性研究；集団の層別化および臨床試験用の代理マーカーの作製；ならびに高スループットスクリーニング（ＨＴＳ）における選択的な化合物の同定を補助することによるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様関連小分子薬物発見の増大。

【０１８０】

（選択的結合アッセイ）

本明細書中で用いられる場合、用語「選択的結合因子」は、１以上のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに対して特異性を有する分子を言及する。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに小分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なＴＮＦＲ／ＯＰＧ様ポリペプチド選択的結合因子は、ＴＮＦＲ／ＯＰＧ様ポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、ポリペプチドのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプターへの結合を阻害する。

【０１８１】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異的なポリクローナルを含むポリクローナル；モノクローナル（ＭＡｂ）；組換え；キメラ；ヒト化（例えば、ＣＤＲグラフト化）；ヒト；単鎖；および／または二特異的；ならびにフラグメント；改変体；またはそれらの誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、ＴＮＦＲ／ＯＰＧ様ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体のこれらの一部を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって産生されたＦａｂおよびＦ（ａｂ’）フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えＤＮＡ技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現）によって産生されたフラグメントが挙げられる。

【０１８２】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、一般に、ＴＮＦＲ／ＯＰＧ様ポリペプチドおよびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物（例えば、ウサギまたはマウス）において産生される。ＴＮＦＲ／ＯＰＧ様ポリペプチドをキャリアタンパク質に結合させることは、有用であり得、このタンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターのように、免疫化される種において免疫原性である。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、この動物は採血され、そして血清を、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド抗体タイターについてアッセイする。

【０１８３】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、培地中の連続的細胞株によって抗体分子を産生するために提供される、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するために適切な方法の例は、Ｋｏｈｌｅｒら、１９７５、Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５－９７のハイブリドーマ法、およびヒトＢ細胞ハイブリドーマ法（Ｋｏｚｂｏｒ、１９８４、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３３：３００１；Ｂｒｏｄｅｕｒら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ

，Ｉｎｃ．，１９８７））が挙げられる。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと反応する、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株がまた、本発明によって提供される。

【０１８４】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。１実施形態は、「キメラ」抗体であり、この重鎖（Ｈ）および／または軽鎖（Ｌ）の一部が、特定の種から誘導されるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスの属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である一方で、この鎖の残りは、別の種から誘導されるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である。抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、これらの抗体のフラグメントも含まれる。米国特許第４，８１６，５６７号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、１９８５、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１：６８５１－５５を参照のこと。

【０１８５】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第５，５８５，０８９号および５，６９３，７６２号を参照のこと。一般に、ヒト化した抗体は、非ヒトである供給源から導入された１以上のアミノ酸残基有する。ヒト化は、例えば、当該分野（Ｊｏｎｅｓら、１９８６、Ｎａｔｕｒｅ３２１：５２２－２５；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－２７；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ２３９：１５３４－３６）で記載される方法を使用して、鋸状相補的決定領域（ＣＤＲ）の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域と置換することによって、実施される。

【０１８６】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと結合するヒト抗体がまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリンの産物の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物（例えば、マウス）を使用して、このような抗体は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド抗原（すなわち、少なくとも６個の連続アミノ酸を有する）を用いて免疫化することによって産生され、必要に応じて、キャリアに結合される。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら，１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ　Ｓｃｉ．９０：２５５１－５５；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら，１９９３，Ｎａｔｕｒｅ　３６２：２５５－５８；Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎら，１９９３，Ｙｅａｒ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏ．７：３３を参照のこと。１つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、本明細書中の重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重鎖および軽鎖タンパク質をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物（この動物は、改変体の完全相補体未満を有する）は、所望の免疫系の改変体の全てを得るためにクロスブレッドされる。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト（例えば、マウスではない）アミノ酸配列（このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である改変領域を含む）を有する抗体を産生する。例えば、ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９６／０５９２８およびＰＣＴ／ＵＳ９３／０６９２６を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第５，５４５，８０７、ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９１／２４５およびＰＣＴ／ＧＢ８９／０１２０７、ならびに欧州特許第５４６０７３Ｂ１および同第５４６０７３Ａ１に記載される。

【０１８７】

ヒト抗体はまた、宿主細胞中の組換えＤＮＡの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【０１８８】

代替の実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリから産生され得る（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら，１９９１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．２２７：３８１；Ｍａｒｋｓら，１９９１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１）。これらにより、糸状

のバクテリオファージの表面上の抗体レパートリーのディスプレイを介した模倣免疫選択、および選択した抗原への結合によるファージの続く選択を処理する。１つのこのような技術は、ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９８／１７３６４に記載されており、これには、このようなアプローチを使用して、ＭＰＬ－およびｍｓｋ－レポーターについて、高い親和性および機能的なアンタゴニスト抗体の単離が記載される。

【０１８９】

キメラ、ＣＤＲグラフト化抗体、およびヒト化抗体は、代表的に組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載される物質および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、ＣＨＯ細胞）中で処理される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えＤＮＡの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【０１９０】

本発明の抗－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド抗体は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの検出および定量のために、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイ）において使用され得る（Ｓｏｌａ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １４７－１５８（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８７））。この抗体は、使用されるアッセイ方法に対して、適切である親和性でＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと結合する。

【０１９１】

診断適用のために、特定の実施形態において、抗－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{125}Ｉ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、または^{67}Ｇａ）；蛍光化合物または化学的蛍光化合物（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）、または酵素（アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、もしくはホースラディシュペルオキシダーゼ）であり得る（Ｂａｙｅｒら，１９９０，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．１８４：１３８－６３）。

【０１９２】

競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、またはその免疫学的に活性な部分）の能力に依存し、限定された量の抗－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド抗体との結合に関して、試験サンプル検体（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドペプチド）と競合する。試験サンプル中のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの量は、抗体と結合する標準の量と反比例する。結合する標準の量を決定するのを容易にするために、この抗体は、競合前または後に、代表的に免疫化され、この抗体と結合する標準および検体は、結合しないままの標準および検体から好都合に分離され得る。

【０１９３】

サンドイッチアッセイは、２つの抗体の使用に代表的に関連し、各々は、決定および／または定量されるべきタンパク質の異なる免疫部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル検体は、固体支持体上に免疫化される第１抗体によって代表的に結合され、その後、第２抗体が、この検体に結合され、可溶の３部の複合体を形成する。例えば、米国特許第４，３７６，１１０を参照のこと。第２抗体自体は、検出可能な部分で標識されるか（直接的なサンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識される抗－免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る。例えば、サンドイッチアセイの１つの型は、酵素結合イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ）（この場合、検出可能な部分は、酵素である）である。

【０１９４】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらは、少な

くとも１つのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの生物学的活性を、それぞれ増強または減少させるかのいずれかである。１実施形態中で、本発明のアンタゴニスト抗体は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと特異的に結合し得る抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約５０％、および好ましくは、少なくとも約８０％によって、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合アッセイは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得る抗－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドであり、これにより、インビトロまたはインビボにおいてＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド活性を阻害または排除する。アゴニストおよびアンタゴニスト抗体－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

【０１９５】

本発明の抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様抗体はまた、インビボでの画像化に有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物、好ましくは血流に投与され得、そして祝手中の標識された抗体の存在および位置は、アッセイされる。抗体は、核磁気共鳴、放射線医学、または当該分野において公知の他の検出手段によってか否かで動物中において検出可能な部分のいずれかで標識され得る。

【０１９６】

本発明はまた、生物学的サンプル中のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様選択可能な結合因子（例えば、抗体）およびＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのレベルを検出するために有用な他の試薬を含むキットに関する。このような試薬は、二次的活性、検出可能な標識、ブロッキング血清、ポジティブコントロールサンプルおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬を含み得る。

【０１９７】

代表的には、本明細書中に列挙されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプターは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様シグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストは、可溶性ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプター、抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプター抗体、小分子、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み得、そしてこれらはまた、本明細書中に記載される１つ以上の疾患／障害を処置するために有用であり得る。

【０１９８】

（さらなるアゴニスト分子およびアンタゴニスト分子）

本明細書中に規定されるように、アゴニスト分子またはアンタゴニスト分子は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの少なくとも１つの生物学的活性をそれぞれ増強するかまたは減少するかのいずれかである。アンタゴニストは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプター自身および／またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナー（例えば、リガンドまたはレセプター）と相互作用し得、これにより、インビトロまたはインビボでＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド活性を阻害または除去する。アゴニストは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子に特異的に結合し得、かつレセプターを活性化するそのネイティブなリガンドのように機能し得る分子である。アゴニストはまた、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナー（例えば、リガンド）と相互作用して、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに対するその結合を増強し得、それにより、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の生物学的活性を増強し得る。本明細書中に記載されるアゴニストおよびアンタゴニストが選択可能な結合因子に限定されないことは、明白である。選択可能な結合因子に加えて、他の適切なアゴニスト分子およびアンタゴニスト分子としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：可溶性ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、小分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド。これらのいずれもが、本明細書中に記載されるものを含む１つ以上の疾患または障害を処置するために有用であり得る。

【０１９９】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、「発現クローニング」戦略に使用するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様リガンドをクローニングするために使用され得る。放射性標識された（１２５－ヨウ素）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたは「アフィニティ／活性タグ化」ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド（例えば、Ｆｃ融合またはアルカリホスファターゼ融合）は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様リガンドを発現する細胞型、細胞株または組織を同定するための結合アッセイにおいて使用され得る。次いで、このような細胞または組織から単離されたＲＮＡは、ｃＤＮＡに変換され得、哺乳動物発現ベクターにクローニングされ得、そして哺乳動物細胞（例えば、ＣＯＳまたは２９３）にトランスフェクトされて発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射標識されたかまたはタグ化されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを、アフィニティ試薬に使用してＴＮＦｒ／ＯＰＧ様リガンドを発現するこのライブラリーにおいて細胞のサブセットを同定および単離し得る。次いで、ＤＮＡは、これらの細胞から単離され得、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトされて二次的発現ライブラリーを作製され、このライブラリーにおけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様リガンドを発現する細胞の画分はもともとのライブラリーにおけるものよりも数倍高い。この濃縮プロセスは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様リガンドを含む単一の組換えクローンが単離されるまで、反復され得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様リガンドの単離は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様シグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストを同定および開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様リガンド、抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様リガンド抗体、小分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【０２００】

（遺伝子操作された非ヒト動物）

非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、もしくは他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、またはヒツジ、あるいは、他の家畜動物）は、本明細書の範囲にさらに含まれる。これらの動物において、ネイティブなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする遺伝子は、破壊されている（「ノックアウトされている」）ので、これらの遺伝子の発現レベルは、顕著に減少しているかまたは完全に除外されている。このような動物は、例えば、米国特許第５，５５７，０３２号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

【０２０１】

本発明はさらに、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、もしくは他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、またはヒツジ、あるいは、他の家畜動物）を含み、これらの動物において、これらの動物に対してネイティブな形態のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド遺伝子または異種性ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド遺伝子は、これらの動物によって過剰発現され、これにより、「トランスジェニック」動物が作製される。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第５，４８９，７４３号およびＰＣＴ出願番号ＷＯ９４／２８１２２に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

【０２０２】

本発明はさらに、非ヒト動物を含み、これらの動物において、本発明の１つ以上のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドについてのプロモーターは、活性化されるかまたは不活性化されるかのいずれか（例えば、異種性組換え法を使用することによって）であり、１つ以上のネイティブなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現レベルを変更する。

【０２０３】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングに有用であり得る。このようなスクリーニングにおいて、動物における薬物候補の影響は、測定され得る。例えば、薬物候補は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、またはそのフラグメントの量は、動物をその薬物候補に暴露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補の実際に影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患または病理学的状態を生じ得るかまたは疾患または病理学的状態に関し得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少するための薬物候補の能力、または病理学的状態を予防または阻害するための能力を試験し得る。

【０２０４】
（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド活性の他の調節因子についてのアッセイ）　いくつかの状況において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの活性の調節因子（すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト）である分子を同定することが所望され得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを調節する天然の分子または合成分子は、本明細書中に記載されるもののような１つ以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、エキソビボ様式でか、またはインビボ様式でか、あるいは経口投与、移植デバイスなどによってのいずれかで投与され得る。
「試験分子」は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの活性を調節（すなわち、増加または減少）する能力についての評価下である分子をいう。最も一般的には、試験分子は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド活性を例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子発現を影響することによってかまたはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって、間接的に調節し得ることが意図される。１つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約10^{-6}Ｍ、好ましくは約10^{-8}Ｍ、もっとも好ましくは約10^{-9}Ｍ、そしてさらにもっとも好ましくは約10^{-10}Ｍの親和性定数でＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合する。
【０２０５】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、試験分子のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、試験分子とインキュベートされ、そして相互作用の量は測定され得る。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製混合物においてスクリーニングされ得る。試験分子は、核酸分子、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量有機体化合物もしくは無機体化合物であり得る。一旦、試験化合物のセットがＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと相互作用するとして同定されると、この分子はさらに、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド活性を増加または減少するその能力について評価され得る。
【０２０６】
試験分子のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの型（細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、溶液相アッセイおよび免疫アッセイを含む）において実施され得る。一般には、試験分子は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと特定の時間にわたってインキュベートされ、そして、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド活性は、生物学的活性を測定するための本明細書中に記載される１つ以上のアッセイによって決定される。
【０２０７】
試験分子のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるエピトープタグを含有するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの改変形態は、溶液中および免疫アッセイにおいて使用され得る。
【０２０８】
特定の実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと相互作用してその活性を調節するタンパク質、ポリペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量分子であり得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの潜在的タンパク質アンタゴニストは、このポリペプチドの活性領域と相互作用しそしてＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の少なくとも１つの活性を阻害または除外する抗体を含む。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド発現を調節する分子は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする核酸に相補的な核酸、またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現を指向するかもしくは制御する核酸配列に相補的な核酸、そして発現のアンチセンス調節因子として作用する核酸を含む。
【０２０９】

結合パートナー（例えば、リガンド）との相互作用を介してＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが生物学的活性を示す事象において、種々のインビトロアッセイは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのその対応する結合パートナー（例えば、選択可能な結合因子またはリガンド）との結合を測定するために使用され得る。このようなアッセイは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのその結合パートナーとの結合の割合および／または程度を増加または減少するこれらの能力について試験分子をスクリーニングするために使用され得る。１つのアッセイにおいて、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェルにおいて固定化される。次いで、放射標識されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナー（例えば、ヨード化されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナー）、および試験分子は、ウェルに一度にか連続的にかのいずれかで添加され得る。インキュベート後ウェルを、洗浄し、そして、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合した結合パートナーの量を放射活性について決定するためにシンチレーションカウンターを使用して計数し得る。典型的には、これらの分子は、濃度の範囲を超えて試験され、そして、試験アッセイの１つ以上の要素を欠く一連のコントロールウェルは、これらの結果の評価における正確さについて使用され得る。本方法の代替は、ポリペプチドの「位置」を変換する工程（すなわち、マイクロタイタープレートにＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーを固定化する工程）、試験分子を放射標識されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドとインキュベートする工程、ならびにＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド結合の程度を決定する工程を包含する。例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｕｓｕｂｅｂｅｌら編、第１８章、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ（１９９５）を参照のこと。

【０２１０】

放射標識の代替として、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、次いで、ビオチン化タンパク質の存在は、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）またはアルカリホスファターゼ（ＡＰ））に連結されたストレプトアビジンを使用して検出され得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーに対する抗体、およびビオチンに結合体化された抗体はまた使用され得、そしてＡＰまたはＨＲＰと連結された酵素連結ストレプトアビジンとのインキュベート後に検出され得る。

【０２１１】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドおよびＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーはまた、亜画ロースビーズ、アクリルビーズまたはこのような不活性な固相基質の他の型への接着によって固定化され得る。基質－タンパク質複合体は、相補的タンパク質および試験化合物を含む溶液に置き換えられ得る。インキュベート後、ビーズは、遠心分離によって沈殿され得、そしてＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量は、本明細書中に記載される方法によって評価され得る。あるいは、基質－タンパク質複合体は、カラムに固定化され得、そして試験分子および相補的タンパク質は、このカラムを通過される。次いで、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドとその結合パートナーとの複合体の形成は、本明細書中に記載の技術のいずれか（すなわち、放射性標識、抗体結合など）を使用して評価され得る。

【０２１２】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドとその結合パートナーとの複合体の形成を増加または減少する試験分子を同定するために有用な、別のインビトロアッセイは、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅアッセイシステム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）のような表面プラズモン共鳴検出器システムである。ＢＩＡｃｏｒｅシステムは、製造業者のプロトコールを使用して実施され得る。このアッセイは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーのいずれかの、検出器に位置するデキストランコートされたセンサーチップとの共有結合を実質的に含む。結合する相補的タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコートされた側に物理的に結合する分子量における変化に基づいて評価され得、そして分子量における変化は、検出器システムによって測定さ

れ得る。

【０２１３】

いくつかの場合において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様タンパク質とＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少する能力について、２つ以上の試験化合物を一緒に評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載されるアッセイは、このようなさらなる試験化合物の添加（第一の試験化合物と同時にか、または第一の試験化合物に引き続いてかのいずれか）によって容易に改変され得る。このアッセイにおけるこの工程の残りは、本明細書中に記載される。

【０２１４】

本明細書中に記載されるもののようなインビトロアッセイは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様タンパク質およびＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーによる複合体形成に対する影響について、多数の化合物を有利にスクリーニングするために使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイライブラリー、合成ペプチドライブラリー、および化学合成ライブラリーにおいて作製される化合物をスクリーニングするために自動化され得る。

【０２１５】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様タンパク質とＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少する化合物はまた、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーのいずれかを発言する細胞および細胞株を使用する細胞培養においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物よ取得され得るが、好ましくは、ヒトもしくは他の霊長類、イヌ、またはげっ歯類の供給源由来である。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーを発現する細胞への結合は、例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイはさらに、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいてポジティブにスコアリングされる化合物を評価するために有利に使用され得る。

【０２１６】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたは産生されるフラグメントの量は、細胞培養物を薬物候補に暴露した後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合において、この遺伝子の発現を増加または減少する薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害する薬物候補の能力を試験し得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の産生は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、あるいは疾患または病理学的状態に関し得る。このような場合において、細胞培養物におけるこのような代謝産物の産生を減少する薬物候補の能力を試験し得る。

【０２１７】

酵母２ハイブリッド系（Ｃｈｉｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８８：９５７８－９５８３，１９９１）は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合する新規ポリペプチド、またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと相互作用する新規ポリペプチドを同定するために使用され得る。例のように、酵母ツーハイブリッドベイト構築物は、ベクター（例えば、ＣｌｏｎｔｅｃｈからのｐＡＳ２－１のような）中に作製され得る。このベクターは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに融合された酵母ＧＡＬ４－ＤＮＡ結合ドメインをコードする。このベイト構築物は、ヒトｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするために使用され得、ここで、このｃＤＮＡライブラリー配列は、ＧＡＬ４活性化ドメインに融合される。ポジティブ相互作用は、　－Ｇａｌのようなレポーター遺伝子の活性化を生じる。このスクリーニングから出現するポジティブクローンは、相互作用タンパク質を同定するためにさらに特徴付けられ得る。

【０２１８】

（Ｐ３８インヒビター）
細胞外刺激と細胞からのＩＬ－１およびＴＮＦの分泌との間の介在に対する新たな手段は、シグナル伝達経路に存在するキナーゼの阻害を介するシグナル伝達のブロッキングを含む。１つの例は、公知のセリン／スレオニンキナーゼ（Ｈａｎら、Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ，１２６５：２２４－２２７（１９９５）において報告されるクローン）であるＰ－３８（「ＲＫ」または「ＳＡＰＫ－２」とも呼ばれる、Ｌｅｅら、Ｎａｔｕｒｅ，３７２：７３９（１９９４））の阻害を介する。Ｐ－３８に対する競合結合アッセイにおける有効性について、直線的関係が示されている。そして同一のインヒビターは、ＬＰＳ刺激に伴う単球からのＩＬ－１分泌のレベルを減少する。単球のＬＰＳ刺激に伴って、ＴＮＦ－ａについてのメッセンジャーＲＮＡのレベルは、１００倍増加することが示されているが、ＴＮＦ－ａのタンパク質レベルは、１０，０００倍増加した。従って、ＴＮＦシグナル伝達のかなりの増幅は、翻訳レベルで生じる。Ｐ－３８インヒビターの存在下での単球のＬＰＳ刺激に伴って、ｍＲＮＡのレベルは、影響されないが、最終的なＴＮＦタンパク質のレベルは、劇的に（Ｐ－３８インヒビターの有効性に依存して８０～９０％まで）減少される。従って、上記の実験は、Ｐ－３８の阻害が減少された翻訳的有効性を導くという結論に対して強力な支持を与える。ＴＮＦが翻訳制御下であるというさらなる証拠は、Ｂｅｕｔｌｅｒら、およびＬｅｅの検出実験において見出される。ここで、３’非翻訳ｍＲＮＡ（３’ＵＴＲ）のセグメントが除去されＴＮＦについての高度な翻訳有効性を生じること。より重要なことに、ＴＮＦ ｍＲＮＡの適切なセグメントが欠失される場合、Ｐ－３８インヒビターは、ＴＮＥのレベルに対して影響を与えない（すなわち、翻訳有効性）。従って、Ｐ－３８に対するインヒビター、およびＰ－３８インヒビターのＴＮＦとＩＬ－１との両方の翻訳有効性に対する効果に関する上記の生物学的証拠とのＬＰＳ刺激に伴う、Ｐ－３８に対するインヒビターの結合レベルと減少されたＩＬ－１およびＴＮＦのレベルとの間の相関的データは、強力な原因を起こし、そして関係をもたらす。Ｐ－３８の細胞における役割は、なお叙述されている；従って、炎症性疾患またはその阻害から得られた他の疾患状態に関する他の有利な効果は、やがて現れるかもしれない。

【０２１９】
高められたレベルのＴＮＦおよび／またはＩＬ－１は、徴候、因果関係、または多くの疾患状態（以下が挙げられるがこれらに限定されない）の悪化に貢献し得る：リウマチ様動脈炎；変形性関節症；リウマチ様脊椎炎；痛風性関節炎；炎症性腸疾患；成人性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）；乾癬；クローン病；アレルギー性鼻炎；潰瘍性大腸炎；アナフィラキシー；接触皮膚炎；喘息；ＴＮＦ阻害に感受性のウイルス（ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＨＩＶ－３、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、インフルエンザ、アデノウイルス、およびＨＳＶ－１、ＨＳＶ－２を含むヘルペスウイルス、ならびに帯状ヘルペス）を含む抗ウイルス性治療；悪液質；ライター症候群；ＩＩ型糖尿病；骨吸収疾患；移植片対宿主反応；虚血再灌流障害；粥状硬化症；脳外傷；アルツハイマー症；複数の硬化症；大脳マラリア；敗血症；敗血症性ショック；毒性ショック症候群；感染に起因する高熱およびマラリア（ｍｙｌａｇｉａｓ）。

【０２２０】
置換イミダゾール、ピロール、ピリジン、ピリミジンなどの化合物は、プロ炎症性サイトカイン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－６、ＩＬ－８およびＴＮＦ）の阻害によってサイトカイン媒介疾患を処置する際の使用について記載されている。サイトカイン媒介疾患の処置における使用のための置換イミダゾールは、米国特許第５，５９３，９９２号；ＷＯ９３／１４０８１；ＷＯ９７／１８６２６；ＷＯ９６／２１４５２；ＷＯ９６／２１６５４；ＷＯ９６／４０１４３；ＷＯ９７／０５８７８；ＷＯ９７／０５８７８（これらの各々は、その全体が本明細書中に参考として援用される）に記載されている。炎症の処置における使用についての置換イミダゾールは、米国特許第３，９２９，８０７号（その全体が本明細書中に参考として援用される）に記載されている。サイトカイン媒介性疾患の処置における使用についての置換ピロール化合物は、ＷＯ９７／０５８７７；ＷＯ９７／０５８

７８；ＷＯ９７／１６４２６；ＷＯ９７／１６４４１；およびＷＯ９７／１６４４２（これらの各々は、その全体が本明細書中に参考として援用される）に記載されている。サイトカイン媒介性疾患の処置における使用についてのピロールに融合された置換アリールおよびヘテロアリールの化合物は、ＷＯ９８／２２４５７（その全体が本明細書中に参考として援用される）に記載されている。サイトカイン媒介性疾患の処置における使用についての置換ピリジン、ピリミジン、ピリミジノンおよびピリダジンの化合物は、ＷＯ９８／２４７８０；ＷＯ９８／２４７８２；ＷＯ９９／２４４０４；およびＷＯ９９／３２４４８（これらの各々は、その全体が本明細書中に参考として援用される）に記載されている。

【０２２１】

（内部移行（ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚｅ）タンパク質）

ｔａｔタンパク質配列（ＨＩＶ由来）は、細胞にタンパク質を内部移行するために使用され得る。例えば、Ｆａｌｗｅｌｌら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９１：６６４－６６８（１９９４）を参照のこと。例えば、ＨＩＶ　ｔａｔタンパク質の１１アミノ酸配列（ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ：配列番号２１）（「タンパク質伝達ドメイン」、またはＴＡＴ　ＰＤＴを呼ばれる）は、細胞の細胞膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Ｓｃｈｗａｒｚｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２８５：１５６９－１５７２（１９９９）；およびＮａｇａｈａｒａら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１４４９－１４５２（１９９８）を参照のこと。これらの手順において、蛍光－蛍光－活性化細胞ソーティング（ＦＡＣＳ）分析によって観察されるような細胞に結合するＦＩＴＣ－構築物（ＦＩＴＣ－ＧＧＧＧＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ；配列番号２２）は、調製され、そしてこれらの構築物は、静脈投与後に組織を貫く。次に、ｔａｔ－ｂｇａｌ融合タンパク質が構築される。この構築物で処理された細胞は、ｂ－ｇａｌ活性を示した。注入に続いて、多くの組織（肝臓、腎臓、肺、心臓、および脳組織を含む）は、これらの手順を使用して発現を示すことが見出された。これらの構築は、細胞への侵入のためにある程度のアンフォールディングを受け；細胞への侵入後にリフォールディングが必要とされ得ることが信じられている。

【０２２２】

従って、ｔａｔタンパク質配列が所望のタンパク質またはポリペプチドの細胞内へ内部移行するために使用され得ることは明白である。例えば、ｔａｔタンパク質配列を使用して、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様アンタゴニスト（例えば、抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様選択可能な結合因子、小分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、細胞内へ投与されてＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の活性を阻害し得る。本明細書中で使用される場合、用語「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子」は、本明細書中で規定されるようなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子およびＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの両方をいう。所望の場合、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様タンパク質自身はまた、これらの手順を使用して細胞内部に投与され得る。Ｓｔｒａｕｓｓ，Ｅ．、「Ｉｎｔｒｏｄｕｃｉｎｇ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　Ｉｎｔｏ　ｔｈｅ　Ｂｏｄｙ‘ｓ　Ｃｅｌｌｓ」、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２８５：１４６６－１４６７（１９９９）をまた参照のこと。

【０２２３】

（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを使用する細胞供給源同定）

本発明の特定の実施形態に従って、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合する特定の細胞型の供給源を決定し得ることは有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する目的として疾患または病理学的状態の期限を決定することは、有用であり得る。他の実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに対して特異的である抗体を作製するために、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを使用し得る。

【０２２４】

（治療的使用）

骨組織は、身体の支持を提供し、そして鉱物（主にカルシウムおよびリン）、コラーゲンマトリックスおよび非コラーゲンタンパク質、ならびに細胞からなる。骨に見出される３

つの型の細胞（骨細胞、骨芽細胞、および破骨細胞）は、骨が断続的に形成されかつ吸収されることによる劇的なプロセスに関する。骨芽細胞は、骨組織の形成を誘導する一方、破骨細胞は、吸収に関する。骨マトリックスおよび鉱物の吸収、または分解は、骨形成に比べて速くかつ効率的なプロセスであり、そして多量の鉱物を骨から放出する。破骨細胞は、骨格組織の正常な再モデル化の調節、およびホルモンによって誘導される吸収に関する。例えば、吸収は、細胞外液におけるカルシウムイオンの濃度の減少に応じた副甲状腺ホルモンの分泌によって刺激される。対照的に、吸収の阻害は、カルシトニンの主要な機能である。さらに、ビタミンＤの代謝物は、副甲状腺ホルモンおよびカルシトニンに対する骨の応答性を変更する。

【０２２５】

骨格の成熟に伴って、骨格における骨量は、骨形成および骨吸収のバランス（またはアンバランス）を反映する。ピーク骨量は、４０歳になる前の骨格成熟後に生じる。４０歳と５０歳との間に、この均衡はシフトし、そして骨吸収は、優位になる。年齢とともに進行する骨量の誘因可能な減少は、男性よりも女性において早く開始し、そしていくつかの女性において（主に、ＣａｕｃａｓｉａｎおよびＡｓｉａｎの家系）、閉経後に顕著に加速される。

【０２２６】

骨減少症は、骨量の平均レベル以下への任意の減少に一般に関する状態である。このような状態は、骨合成の割合における減少、または骨崩壊の割合における増加、あるいはこれらの両方より生じ得る。最も一般的な形態の骨減少症は、主に骨粗しょう症である。これは、閉経後の骨粗しょう症および老衰性骨粗しょう症の場合にもいう。この形態の骨粗しょう症は、年齢に伴う一連の骨の一般的な消失であり、そして通常は骨形成の正常な割合を有する骨吸収における増加の結果である。米国における全ての白人女性の約２５～３０％は、徴候的骨粗しょう症を発達する。直接の関係は、骨粗しょう症と、４５歳以上の女性における尻、大腿部、頸部、および転子間骨折（ｉｎｔｅｒ－ｔｒｏｃｈａｎｔｅｒｉｃ　ｆｒａｃｔｕｒｅ）の発生率との間に存在する。老齢の男性は、５０歳と７０歳との間の年齢で徴候的骨粗しょう症を発達するが、この疾患は主に女性に影響する。

【０２２７】

閉経後の骨粗しょう症および老衰性骨粗しょう症の原因は、未知である。この状態に寄与し得るいくつかの因子が同定されている。これらは、年齢に伴うホルモンレベルの変更、ならびにカルシウムおよび他の鉱物の減少した腸内吸収に寄与する不十分なカルシウム消費を含む。処置は、通常、このプロセスを妨害するように試みるホルモン治療または飲食物補充剤を含んだ。しかし、現在では、骨消失についての効果的な処置は、存在しない。

【０２２８】

本発明は、治療有効量のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを用いて本明細書中に記載される疾患および障害を処置、予防または診断する方法を提供する。例として、この疾患または障害は、正味の骨損失（例えば、骨減少症または骨溶解）によって特徴付けられる任意の疾患または障害であり得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを用いて、例えば、骨吸収速度を抑制し得る。従って、正常レベルよりも低い骨形成を補償するために、処置を行って骨吸収速度を低減し得る（ここで、吸収速度は、正常よりも上である）かまたは骨吸収を正常レベル未満まで低減し得る。

【０２２９】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドで処置し得る状態としては、以下が挙げられる：

・骨粗鬆症（例えば、原発性骨粗鬆症、内分泌性骨粗鬆症（甲状腺機能亢進、上皮小体機能亢進（ｈｙｐｅｒｐａｒａｔｈｒｙｏｉｄｉｓｍ）、クッシング症候群および末端肥大症）、遺伝性および先天性の形態の骨粗鬆症（骨形成不全、ホモシスチン尿症、メンク症候群（Ｍｅｎｋｅｓ’　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）およびライリー－デイ症候群）ならびに四肢の固定に起因する骨粗鬆症）。

【０２３０】

・成人および若年における骨のパジェット病（変形性骨炎）；

・骨の損失をもたらす、骨髄炎、すなわち骨における感染性損傷；
・固形腫瘍（胸部、肺および腎臓）および血液の悪性疾患（多発性骨髄腫、リンパ腫および白血病）から生じる高カルシウム血症、特発性高カルシウム血症ならびに甲状腺機能亢進および腎臓機能障害に関連した高カルシウム血症；
・ステロイド投与によって誘発され、そして小腸および大腸の障害ならびに慢性の肝臓疾患および腎臓疾患と関連する、手術後の骨減少症；
・ゴシェ病、鎌状赤血球貧血、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、歯周疾患、骨溶解性転移および他の状態に関連した外傷性の損傷または非外傷性壊死に関連した骨壊死（すなわち、骨細胞死）。

【０２３１】

望ましくないレベルの１以上のＴＮＦ、ＯＰＧ、ＩＬ－１および／または本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド自体に関連した他の疾患は、本発明の範囲に包含される。望ましくないレベルとしては、過剰および／または正常未満のレベルのＴＮＦ、ＯＰＧ、ＩＬ－１および／または本明細書中に記載される本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが挙げられる。

【０２３２】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが単独でまたは骨障害の処置のための他の因子と共に用いられ得ることが理解される。１つの実施形態では、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、骨形成を刺激するかまたは骨破壊を減少させる１以上の治療有効量の因子と共に用いられる。このような因子としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ＢＭＰ－１～ＢＭＰ－１２と命名されている骨形態形成因子（ｂｏｎｅ　ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｉｃ　ｆａｃｔｏｒ：ＢＭＰ）；トランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β）およびＴＧＦ－βファミリーのメンバー；インターロイキン－１（ＩＬ－１）インヒビター；ＴＮＦ－αインヒビター；副甲状腺ホルモンおよびそれらのアナログ、上皮小体関連タンパク質およびそれらのアナログ；Ｅシリーズのプロスタグランジン；ビスホスホネート（例えば、アレンドロネート（ａｌｅｎｄｒｏｎａｔｅ）など）；骨強化ミネラル（例えば、フッ化物およびカルシウム）；非ステロイド抗炎症薬物（ＮＳＡＩＤ）（ＣＯＸ－２インヒビター（例えば、Ｃｅｌｅｂｒｅｘ™およびＶｉｏｘｘ™）を含む）；免疫抑制剤（例えば、メトトレキサートまたはレフルノミド）；セリンプロテアーゼインヒビター（例えば、分泌型白血球プロテアーゼインヒビター（ＳＬＰＩ）；ＩＬ－６インヒビター（例えば、ＩＬ－６に対する抗体）、ＩＬ－８インヒビター（例えば、ＩＬ－８に対する抗体）；ＩＬ－１８インヒビター（例えば、ＩＬ－１８結合タンパク質またはＩＬ－１８抗体）；インターロイキン－１変換酵素（ＩＣＥ）調節因子；線維芽細胞増殖因子ＦＧＦ－１～ＦＧＦ－１０およびＦＧＦ調節因子；ＰＡＦアンタゴニスト；ケラチノサイト増殖因子（ＫＧＦ）、ＫＧＦ関連分子またはＫＧＦ調節因子；マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）調節因子；一酸化窒素シンターゼ（ＮＯＳ）調節因子（誘導性ＮＯＳの調節因子を含む）；グルココルチコイドレセプターの調節因子；グルタミン酸レセプターの調節因子；リポ多糖（ＬＰＳ）レベルの調節因子；ならびにノルアドレナリンならびにその調節因子および模倣物。

【０２３３】

本発明に従って処置され得る急性および慢性の疾患の非限定的列挙は、以下を包含するがこれらに限定されない：悪液質／食欲不振；癌（例えば、白血病）；慢性疲労症候群；冠状動脈の状態および適応症（鬱血性心不全、冠状動脈再狭窄、心筋梗塞および冠状動脈バイパス移植片を含む）；鬱病；糖尿病（例えば、若年発症１型糖尿病および真性糖尿病）；子宮内膜症、子宮内膜炎および関連した状態；線維筋痛または痛覚脱失；対宿主性移植片病；痛覚過敏；炎症性腸疾患（クローン病およびＣｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ関連下痢を含む）；虚血（大脳虚血（外傷、癲癇、出血または発作（これらの各々は、神経変性をもたらし得る）の結果としての脳損傷を含む）；肺の疾患（例えば、成人呼吸窮迫症候群、喘息および肺線維症）；多発性硬化症；神経炎症疾患；眼の疾患および状態（角膜移植、眼の変性およびブドウ膜炎を含む）；疼痛（癌関連疼痛を含む）；膵

炎；歯周病；前立腺炎（細菌性または非細菌性）および関連した状態；乾癬および関連した状態；肺線維症；再灌流障害；リウマチ病（例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、若年性（リウマチ様）関節炎、血清陰性多発性関節炎、剛直性脊椎炎、ライター症候群および反応性関節炎、スティル病、乾癬性関節炎、腸疾患に基づく関節炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、強皮症、全身性硬化症、弁膜炎（例えば、川崎病）、脳脈管炎、ライム病、ブドウ球菌誘発性（「敗血症性」）関節炎、シェーグレン症候群、リウマチ熱、多発性軟骨炎およびリウマチ性多発性筋痛および巨細胞性動脈炎）；敗血症性ショック；放射線治療からの副作用；全身性エリテマトーデス；一時性顎関節疾患；甲状腺炎；組織移植または挫傷、捻挫、軟骨損傷、外傷、整形外科手術、感染（例えば、ＨＩＶ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｄｉｆｆｉｃｉｌｅおよび関連種）もしくは他の疾患プロセスから生じる炎症状態。

【０２３４】

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

【０２３５】

特定の実施形態では、本発明は、ＴＮＦ応答性疾患の処置のための１以上のインターロイキン－１インヒビターのうちのいずれかと組合わせた（前処置、後処置または同時処置）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの使用に関する。インターロイキン－１インヒビターのクラスとしては、以下が挙げられる：本明細書中に記載されるような、インターロイキン－１レセプターアンタゴニスト（ＩＬ－１に対する細胞レセプターの活性化を特異的に妨げ得る任意の化合物）（例えば、ＩＬ－１ｒａ）；抗ＩＬ－１レセプターモノクローナル抗体（例えば、ＥＰ　６２３６７４（その開示は本明細書中に参考として援用される））；ＩＬ－１結合タンパク質（例えば、可溶性ＩＬ－１レセプター（例えば、米国特許第５，４９２，８８８号、同第５，４８８，０３２号、同第５，４６４，９３７号、同第５，３１９，０７１号および同第５，１８０，８１２号（これらの開示は本明細書中に参考として援用される））；抗ＩＬ－１モノクローナル抗体（例えば、ＷＯ　９５／０１９９７、ＷＯ　９４／０２６２７、ＷＯ　９０／０６３７１、米国特許第４，９３５，３４３号、ＥＰ　３６４７７８、ＥＰ　２６７６１１およびＥＰ　２２００６３（これらの開示は、本明細書中に参考として援用される））；ＩＬ－１レセプター補助タンパク質（例えば、ＷＯ　９６／２３０６７）ならびにＩＬ－１のインビボでの合成または細胞外放出をブロックする、他の化合物およびタンパク質。

【０２３６】

インターロイキン－１レセプターアンタゴニスト（ＩＬ－１ｒａ）は、インターロイキン－１の天然のインヒビターとして作用するヒトタンパク質である。インターロイキン－１レセプターアンタゴニスト、ならびにそれらの作製方法および使用方法は、米国特許第５，０７５，２２２号；ＷＯ　９１／０８２８５；ＷＯ　９１／１７１８４；ＡＵ　９１７３６３６；ＷＯ　９２／１６２２１；ＷＯ　９３／２１９４６；ＷＯ　９４／０６４５７；ＷＯ　９４／２１２７５；ＦＲ　２７０６７７２；ＷＯ　９４／２１２３５；ＤＥ　４２１９６２６；ＷＯ　９４／２０５１７；ＷＯ　９６／２２７９３およびＷＯ　９７／２８８２８（これらの開示は、本明細書中で参考として援用される）に記載される。このタンパク質は、グリコシル化および非グリコシル化ＩＬ－１レセプターアンタゴニストを包含する。

【０２３７】

特に、３つの例示的な形態のＩＬ－１ｒａ（ＩＬ－１ｒａα、ＩＬ－１ｒａβおよびＩＬ－１ｒａｘ）が、米国特許第５，０７５，２２２号に開示および記載される。ＩＬ－１インヒビター（特に、ＩＬ－１ｒａｓ）を産生するための方法もまた、５，０７５，２２２号特許に開示される。

【０２３８】

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

【０２３９】

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

【０２４０】

特定の実施形態において、本発明は、分泌または可溶性のヒトｆａｓ抗原またはその組換えバージョン（ＷＯ９６／２０２０６およびＭｏｕｎｔｚら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ．、１５５：４８２９－４８３７；およびＥＰ５１０６９１）と組合わせた（前処置、後処置または同時処置）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの使用に関する。ＷＯ９６／２０２０６は、分泌ヒトｆａｓ抗原（ネイティブおよび組換え体（Ｉｇ融合タンパク質を含む））、可溶性組換えヒトｆａｓ抗原のコードの原因である遺伝子を単離するための方法、適切なベクターおよび細胞型にこの遺伝子をクローン化するための方法、およびこの遺伝子を発現させてインヒビターを産生するための方法を開示する。ＥＰ５１０６９１は、ヒトｆａｓ抗原（可溶性ｆａｓ抗原を含む）をコードするＤＮＡ、このＤＮＡを発現するためのベクター、およびこのベクターでトランスフェクトされた形質転換体を教示する。非経口的に投与される場合、分泌または可溶性のｆａｓ抗原融合タンパク質の用量は、それぞれ一般的に、約１μｇ／ｋｇ～約１００μｇ／ｋｇである。

【０２４１】

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

【０２４２】

特定の実施形態において、本発明は、本明細書中に列挙される疾患および障害（リウマチ病のような急性および慢性の炎症；ならびに対宿主性移植片病を含む）の処置のためのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドおよび１以上のＮＳＡＩＤのうちのいずれかの使用に関する。ＮＳＡＩＤは、その抗炎症性作用が少なくとも部分的に、プロスタグランジン合成の阻害による（ＧｏｏｄｍａｎおよびＧｉｌｍａｎ、「Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ」、ＭａｃＭｉｌｌａｎ第７版（１９８５））。ＮＳＡＩＤは、以下の９つのグループに特徴付けられ得る：（１）サリチル酸誘導体、（２）プロピオン酸誘導体、（３）酢酸誘導体、（４）フェナム酸誘導体、（５）カルボン酸誘導体、（６）酪酸誘導体、（７）オキシカム（ｏｘｉｃａｍ）、（８）ピラゾール、および（９）ピラゾロン。

【０２４３】

別の実施形態において、本発明は、１つ以上のサリチル酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組合わせた（前処置、後処置または同時処置）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの使用に関する。このようなサリチル酸誘導体、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩としては、以下が挙げられる：アセトアミノザロール、アロキシプリン、アスピリン、ベノリラート、ブロモサリゲニン、アセチルサリチル酸カルシウム、トリサリチル酸マグネシウムコリン、サリチル酸マグネシ

ウム、サリチル酸コリン、ジフルシナル（ｄｉｆｌｕｓｉｎａｌ）、エテルサラート、フェンドサール、ゲンチジン酸、サリチル酸グリコール、サリチル酸イミダゾール、アセチルサリチル酸リジン、メサラミン、サリチル酸モルホリン、１－ナフチルサリチレート、オルサラジン、パルサルミド、アセチルサリチル酸フェニル、サリチル酸フェニル、サラセタミド、サリチルアミドＯ－酢酸、サルサラート、サリチル酸ナトリウムおよびスルファサラジン。同様の鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したサリチル酸誘導体もまた、このグループに含まれることが意図される。

【０２４４】

さらなる特定の実施形態において、本発明は、１つ以上のプロピオン酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの使用に関する。プロピオン酸誘導体、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩としては、以下が挙げられる：アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロクス酸、カルプロフェン、デキスインドプロフェン、フェノプロフェン、フルノキサプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、フルクロプロフェン、イブプロフェン、イブプロフェンアルミニウム、イブプロキサム、インドプロフェン、イソプロフェン、ケトプロフェン、ロキソプロフェン（ｌｏｘｏｐｒｏｆｅｎ）、ミロプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、オキサプロジン、ピケトプロフェン、ピメプロフェン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、プロチジン酸、ピリドキシプロフェン（ｐｙｒｉｄｏｘｉｐｒｏｆｅｎ）、スプロフェン、チアプロフェン酸およびチオキサプロフェン。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したプロピオン酸誘導体もまた、このグループに含まれることが意図される。

【０２４５】

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

【０２４６】

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

【０２４７】

さらに別のより特定の実施形態において、本発明は、１つ以上のカルボン酸誘導体、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの使用に関する。使用され得る

カルボン酸誘導体、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩としては以下が挙げられる：クリダナク、ジフルニサル、フルフェニサール、イノリジン（ｉｎｏｒｉｄｉｎｅ）、ケトロラクおよびチノリジン。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したカルボン酸誘導体もまた、このグループに含まれることが意図される。

【０２４８】

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

【０２４９】

さらなる特定の実施形態において、本発明は、１つ以上のオキシカム、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの使用に関する。オキシカム、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：ドロキシカム、エノリカム、イソキシカム、ピロキシカム、スドキシカム、テノキシカムおよび４－ヒドロキシ－１，２－ベンゾチアジン１，１－ジオキシド４－（Ｎ－フェニル）－カルボキサミド。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したオキシカムもまた、このグループに含まれることが意図される。

【０２５０】

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

【０２５１】

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

【０２５２】

別の特定の実施形態において、本発明は、以下の１つ以上のＮＳＡＩＤのいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの使用に関する：ε－アセトアミドカプロン酸、Ｓ－アデノシルメチオニン、３－アミノ－４－ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン、アニトラザフェン、アントラフェニン、ベンダザック、ベンダザックリジネート（ｂｅｎｄａｚａｃ　ｌｙｓｉｎａｔｅ）、ベンジダミン、ベプロジン（ｂｅｐｒｏｚｉｎ）、ブロペラモール、ブコローム、ブフェゾラク、シプロカゾン、クロキシマート、ダジダミン、デボキサメト、デトミジン、ジフェンピラミド、ジフェンピラミド、ジフィサラミン（ｄｉｆｉｓａｌａｍｉｎｅ）、ジタゾール、エモルファゾン、ファネチゾールメシレート、フェンフルミゾール、フロクタフェニン、フルミゾール、フルニキシン、フルプロカゾン、フォピルトリン（ｆｏｐｉｒｔｏｌｉｎｅ）、フォスフォサル、グアイメサール、グアイアゾレン（ｇｕａｉａｚｏｌｅｎｅ）、イソニキシン（ｉｓｏｎｉｘｉｒｎ）、レフェタミンＨＣｌ、レフルノミド、ロフェミゾール、ロチフ

ァゾール、リジンクロニキシネート（ｌｙｓｉｎ　ｃｌｏｎｉｘｉｎａｔｅ）、メセクラゾン、ナブメトン、ニクチンドール、ニメスリド、オルゴテイン、オルパノキシン、オキサセプロール、オキサパドール、パラニリン（ｐａｒａｎｙｌｉｎｅ）、ペリソキサール、クエン酸ペリソキサール、ピフォキシム、ピプロキセン（ｐｉｐｒｏｘｅｎ）、ピラゾラク、ピルフェニドン、プロカゾン、プロキサゾール、チエラビンＢ（ｔｈｉｅｌａｖｉｎ　Ｂ）、チフラミゾール、チメガジン、トレクチン、トルパドール、トリプトアミド（ｔｒｙｐｔａｍｉｄ）ならびに４８０１５６Ｓ、ＡＡ８６１、ＡＤ１５９０、ＡＦＰ８０２、ＡＦＰ８６０、ＡＩ７７Ｂ、ＡＰ５０４、ＡＵ８００１、ＢＰＰＣ、ＢＷ５４０Ｃ、ＣＨＩＮＯＩＮ　１２７、ＣＮ１００、ＥＢ３８２、ＥＬ５０８、Ｆ１０４４、ＦＫ－５０６、ＧＶ３６５８、ＩＴＦ１８２、ＫＣＮＴＥＩ６０９０、ＫＭＥ４、ＬＡ２８５１、ＭＲ７１４、ＭＲ８９７、ＭＹ３０９、ＯＮＯ３１４４、ＰＲ８２３、ＰＶ１０２、ＰＶ１０８、Ｒ８３０、ＲＳ２１３１、ＳＣＲ１５２、ＳＨ４４０、ＳＩＲ１３３、ＳＰＡＳ５１０、ＳＱ２７２３９、ＳＴ２８１、ＳＹ６００１、ＴＡ６０、ＴＡＩ－９０１（４－ベンゾイル－１－インダンカルボン酸）、ＴＶＸ２７０６、Ｕ６０２５７、ＵＲ２３０１およびＷＹ４１７７０のような会社コード番号によって命名されるようなＮＳＡＩＤ。ＮＳＡＩＤに類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したＮＳＡＩＤもまた、このグループに含まれることが意図される。

【０２５３】

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

【０２５４】

別の特定の実施形態において、本発明は、リウマチ病、対宿主性移植片病、および多発性硬化症のような急性および慢性の炎症を含む、ＴＮＦ応答性疾患の処置のための、１つ以上の遅効性抗リウマチ薬（ＳＡＡＲＤ）または疾患改善抗リウマチ薬（ＤＭＡＲＤＳ）、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの使用に関する。ＳＡＡＲＤまたはＤＭＡＲＤ、そのプロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：アロクプレイドナトリウム、オーラノフィン、金チオグルコース、金チオグリカニド、アザチオプリン、ブレキナルナトリウム、ブシラミン、カルシウム３－金チオ－２－プロパノール－１－スルホネート、クロラムブシル、クロロキン、クロブザリト、クプロキソリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、ダプソン、１５－デオキシスペルグアリン（１５－ｄｅｏｘｙｓｐｅｒｇｕａｌｉｎ）、ジアセレイン、グルコサミン、金塩（例えば、シクロキン金塩、金ナトリウムチオマレート、金ナトリウムチオスルフェート）、ヒドロキシクロロキン、ヒドロキシクロロキンスルフェート、ヒドロキシ尿素、ケブゾン、レバミゾール、ロベンザリット、メリチン、６－メルカプトプリン、メトトレキセート、ミゾリビン、ミコフェノレートモフェチル（ｍｏｆｅｔｉｌ）、ミオラル（ｍｙｏｒａｌ）、ナイトロジェンマスタード、Ｄ－ペニシラミン、ピリジノール、イミダゾール（例えば、ＳＫＮＦ８６００２およびＳＢ２０３５８０）、ラパマイシン、チオール、サイモポエチンおよびビンクリスチン。類似した鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したＳＡＡＲＤまたはＤＭＡＲＤもまた、このグループに含まれることが意図される。

【０２５５】

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

【０２５６】

さらに別の特定の実施形態において、本発明は、急性および慢性の炎症を含む、ＴＮＦ応答性疾患の処置のための、１つ以上の抗菌剤、そのプロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの使用に関する。抗菌剤としては、例えば、ペニシリン、セファロスポリンおよび他のβ－ラクタム、アミノ配糖体、アゾール、キロノン、マクロライド、リファマイシン、テトラサイクリン、スルホンアミド、リンコサミド（ｌｉｎｃｏｓａｍｉｄｅ）およびポリミキシンの広範なクラスが挙げられる。ペニシリンは、以下を含むがこれらに限定されない：ペニシリンＧ、ペニシリンＶ、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フロキサシリン、アンピシリン、アンピシリン／スルバクタム、アモキシリン、アモキシリン／クラブラン酸、ヘタシリン、シクラシリン（ｃｙｃｌａｃｉｌｌｉｎ）、バカンピシリン、カルベニシリン、カルベニシリンインダニル（ｃａｒｂｅｎｉｃｉｌｌｉｎ　ｉｎｄａｎｙｌ）、チカルシリン、チカルシリン／クラブラン酸、アズロシリン、メズロシリン、ピペラシリン（ｐｅｐｅｒａｃｉｌｌｉｎ）、およびメシリナム。セファロスポリンおよび他のβ－ラクタムは、以下を含むがこれらに限定されない：セファロチン、セファピリン、セファレキシン、セフラジン、セファゾリン、セファドロキシル、セファクロール、セファマンドール、セフォテタン、セフォキシチン、セルロキシム（ｃｅｒｕｒｏｘｉｍｅ）、セフォニシド、セフォラジン（ｃｅｆｏｒａｄｉｎｅ）、セフィキシム、セフォタキシム、モキサラクタム、セフチゾキシム、セトリアキソン（ｃｅｔｒｉａｘｏｎｅ）、セフォペラゾン（ｃｅｐｈｏｐｅｒａｚｏｎｅ）、セフタジジム、イミペネムおよびアズトレオナム。アミノ配糖体は、以下を含むがこれらに限定されない：ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、

アミカシン、ネチルマイシン、カナマイシンおよびネオマイシン。アゾールは、フルコナゾールを含むがこれに限定されない。キノロンは、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、エノキサシン、シプロフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシンおよびテマフロキサシンを含むがこれらに限定されない。マクロライドは、エリスロマイシン（ｅｒｙｔｈｏｍｙｃｉｎ）、スピラマイシンおよびアジスロマイシンを含むがこれらに限定されない。リファマイシンは、リファンピンを含むがこれに限定されない。テトラサイクリンは、スピサイクリン（ｓｐｉｃｙｃｌｉｎｅ）、クロルテトラサイクリン、クロモサイクリン、デメクロサイクリン、デオキシサイクリン（ｄｅｏｘｙｃｙｃｌｉｎｅ）、グアメサイクリン（ｇｕａｍｅｃｙｃｌｉｎｅ）、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、ペニメピサイクリン、ピパサイクリン、ロリテトラサイクリン、サンサイクリン、セノサイクリン（ｓｅｎｏｃｉｃｌｉｎ）およびテトラサイクリンを含むがこれらに限定されない。スルホンアミドは、スルファニルアミド、スルファメトキサゾール、スルファセタミド、スルファジアジン、スルフイソキサゾールおよびコトリモキサゾール（トリメトプリム／スルファメトキサゾール）を含むがこれらに限定されない。リンコサミドは、クリンダマイシンおよびリンコマイシンを含むがこれらに限定されない。ポリミキシン（ポリペプチド）は、ポリミキシンＢおよびコリスチンを含むがこれらに限定されない。

【０２５７】

特定の好ましい実施形態では、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを含むポリペプチドが、種々の炎症状態、自己免疫状態および骨の損失をもたらす他の状態を処置するために特定の治療分子と共に用いられる。状態および所望の処置レベルに依存して、２、３またはそれより多くの因子が、別々に、同時にまたは連続して投与され得る。これらの因子は、同じ処方物中に含めることによってもしくは処置キットに含めることによって一緒に提供され得るか、またはこれらは別々に提供され得る。遺伝子治療によって投与される場合、このタンパク質因子をコードする遺伝子は、必要に応じて同じプロモーター領域の制御下で同じベクター中に、または別々のベクター中に含まれ得る。上記のクラスの特に好ましい分子は、以下の通りである。

【０２５８】

・ＩＬ－１インヒビター：ＩＬ－１ｒａタンパク質および可溶性ＩＬ－１レセプター。最も好ましいＩＬ－１インヒビターは、アナキンラ（ａｎａｋｉｎｒａ）である。

【０２５９】

・ＴＮＦ－αインヒビター：可溶性腫瘍壊死因子レセプターＩ型（ｓＴＮＦ－ＲＩ；－ＲＩはまた、ｐ５５レセプターと呼ばれる）；可溶性腫瘍壊死因子レセプターＩＩ型（ｐ７５レセプターとも呼ばれる）；およびＴＮＦレセプターを結合するモノクローナル抗体。最も好ましいのは、ＷＯ　９８／２４４６３に記載される通りのｓＴＮＦ－ＲＩ、エタネルセプト（ｅｔａｎｅｒｃｅｐｔ）（Ｅｎｂｒｅｌ（登録商標））およびＡｖａｋｉｎｅ（登録商標）である。例示的なＴＮＦ－αインヒビターは、ＥＰ　４２２　３３９、ＥＰ　３０８　３７８、ＥＰ　３９３　４３８、ＥＰ　３９８　３２７およびＥＰ　４１８　０１４に記載される。

【０２６０】

・セリンプロテアーゼインヒビター：例えば、ＳＬＰＩ。これらのインヒビターもまた、ＳＬＰＩがＬＰＳ応答を阻害することが示されたように、例示的なＬＰＳ調節因子として考察され得る。Ｊｉｎら（１９９７），Ｃｅｌｌ，８８（３）：４１７－２６。

【０２６１】

特に、好ましい処置方法は、ＴＮＦ－αインヒビターおよびＩＬ－１インヒビターをＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドと組み合わせた使用に関する。そのようなポリペプチドは、ＴＮＦ－αインヒビターおよびＩＬ－１インヒビターのいずれかまたは両方とともに、慢性関節リウマチおよび多発性硬化症のような状態の処置のために使用され得る。

【０２６２】

ＴＮＦ、ＯＰＧおよび／または本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド自体の１つ以上

の所望されないレベルに関連する他の疾患は、本発明の範囲内に包含されることが認識される。所望されないレベルとしては、過剰および／または正常未満のレベルのＴＮＦ、ＯＰＧおよび／または本明細書において記載されるＴＮＦ／ＯＰＧ様ポリペプチドが挙げられる。

【０２６３】

ＴＮＦ－αインヒビターは、ＴＮＦ産生の下方制御もしくは阻害、遊離のＴＮＦ結合、ＴＮＦのそのレセプターへの結合の阻害、またはそのレセプターへの結合後のＴＮＦシグナル伝達の調節の介入により作用し得る。用語「ＴＮＦ－αインヒビター」はしたがって、可溶化されたＴＮＦレセプター、ＴＮＦに対する抗体、ＴＮＦレセプターに対する抗体、ＴＮＦ－α変換酵素（ＴＡＣＥ）のインヒビター、およびＴＮＦ活性に影響を与える他の分子が挙げられる。

【０２６４】

種々の種類のＴＮＦ－αインヒビターが当該分野において開示されており、それらには以下の参考文献が包含される：

以下の番号の欧州特許出願：３０８　３７８；４２２　３３９；３９３　４３８；３９８　３２７；４１２　４８６；４１８　０１４；４１７　５６３；４３３　９００；４６４　５３３；５１２　５２８；５２６　９０５；５６８　９２８；６６３　２１０；５４２　７９５；８１８　４３９；６６４　１２８；５４２　７９５；７４１　７０７；８７４　８１９；８８２　７１４；８８０　９７０；６４８　７８３；７３１　７９１；８９５　９８８；５５０　３７６；８８２　７１４；８５３　０８３；５５０　３７６；９４３　６１６；

以下の番号の米国特許：５，１３６，０２１；５，９２９，１１７；５，９４８，６３８；５，８０７，８６２；５，６９５，９５３；５，８３４，４３５；５，８１７，８２２；５，８３０，７４２；５，８３４，４３５；５，８５１，５５６；５，８５３，９７７；５，３５９，０３７；５，５１２，５４４；５，６９５，９５３；５，８１１，２６１；５，６３３，１４５；５，８６３，９２６；５，８６６，６１６；５，６４１，６７３；５，８６９，６７７；５，８６９，５１１；５，８７２，１４６；５，８５４，００３；５，８５６，１６１；５，８７７，２２２；５，８７７，２００；５，８７７，１５１；５，８８６，０１０；５，８６９，６６０；５，８５９，２０７；５，８９１，８８３；５，８７７，１８０；５，９５５，４８０；５，９５５，４７６；５，９５５，４３５；

以下の番号の国際（ＷＯ）特許出願：９０／１３５７５、９１／０３５５３、９２／０１００２、９２／１３０９５、９２／１６２２１、９３／０７８６３、９３／２１９４６、９３／１９７７７、９５／３４３２６、９６／２８５４６、９８／２７２９８、９８／３０５４１、９６／３８１５０、９６／３８１５０、９７／１８２０７、９７／１５５６１、９７／１２９０２、９６／２５８６１、９６／１２７３５、９６／１１２０９、９８／３９３２６、９８／３９３１６、９８／３８８５９、９８／３９３１５、９８／４２６５９、９８／３９３２９、９８／４３９５９、９８／４５２６８、９８／４７８６３、９６／３３１７２、９６／２０９２６、９７／３７９７４、９７／３７９７３、９６／３５７１１、９８／５１６６５、９８／４３９４６、９５／０４０４５、９８／５６３７７、９７／１２２４４、９９／００３６４、９９／００３６３、９８／５７９３６、９９／０１４４９、９９／０１１３９、９８／５６７８８、９８／５６７５６、９８／５３８４２、９８／５２９４８、９８／５２９３７、９９／０２５１０、９７／４３２５０、９９／０６４１０、９９／０６０４２、９９／０９０２２、９９／０８６８８、９９／０７６７９、９９／０９９６５、９９／０７７０４、９９／０６０４１、９９／３７８１８、９９／３７６２５、９７／１１６６８；

以下の番号の日本国（ＪＰ）特許出願：１０１４７５３１、１０２３１２８５、１０２５９１４０、ａｎｄ　１０１３０１４９、１０３１６５７０、１１００１４８１および１２７，８００／１９９１；以下の番号の独国（ＤＥ）出願１９７３１５２１；以下の番号の英国（ＧＢ）出願：２　２１８　１０１、２　３２６　８８１、２　２４６　５６９。

【０２６５】
本発明の目的のために、これらの参考文献において開示されるｓＴＮＦＲならびにｓＴＮＦＲの改変体および誘導体を含む、これらの参考文献において開示される分子は（以下を参照のこと）、「ＴＮＦ－αインヒビター」と総称される。
【０２６６】
例えば、ＥＰ　３９３　４３８およびＥＰ　４２２　３３９は、可溶性ＴＮＦレセプターＩ型（ｓＴＮＦＲ－Ｉまたは３０ｋＤａ　ＴＮＦインヒビターとしても知られる）および可溶性ＴＮＦレセプターＩＩ型（ｓＴＮＦＲ－ＩＩまたは４０ｋＤａインヒビターとしても知られる）（これらは、総称して「ｓＴＮＦＲ」と呼ばれる）のアミノ酸配列および核酸配列を教示し、これらには、その改変形態（例えば、フラグメント、機能的誘導体および改変体）が含まれる。ＥＰ　３９３　４３８およびＥＰ　４２２　３３９はまた、そのインヒビターをコードすることを担う遺伝子を単離するため、適切なベクターおよび細胞型中にその遺伝子をクローニングするため、およびその遺伝子を発現してそのインヒビターを生産するための方法を開示する。
【０２６７】
ｓＴＮＦＲ－ＩおよびｓＴＮＦＲ－ＩＩは、神経成長因子／ＴＮＦレセプタースーパーファミリーのレセプターのメンバーであり、これには、神経成長因子レセプター（ＮＧＦ）、Ｂ細胞抗原ＣＤ４０、４－１ＢＢ、ラットＴ細胞抗原ＭＲＣ　ＯＸ４０、ｆａｓ抗原ならびにＣＤ２７およびＣＤ３０の抗原（Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０），Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４８：１０１９－１０２３）が包含される。細胞表面レセプターのこの群のうちで最も保存されている特徴は、システインリッチ細胞外リガンド結合ドメインであり、これは、約４０アミノ酸の４つの反復モチーフに分割され得、そして４－６システイン残基を、十分に保存される位置で含む（Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）、前出）。
【０２６８】
ＥＰ　３９３　４３８は、４０ｋＤａ　ＴＮＦインヒビターΔ５１および４０ｋＤａ　ＴＮＦインヒビターΔ５３を教示する。これらは、全長組換え４０ｋＤａ　ＴＮＦインヒビタータンパク質の短縮型であり、ここで、成熟タンパク質のカルボキシ末端における５１または５３のアミノ酸残基がそれぞれ除去されている。
【０２６９】
ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ９７／１２２４４号は、ｓＴＮＦＲ－ＩおよびｓＴＮＦＲ－ＩＩの短縮型を教示する。これらは、４番目のドメイン（ｓＴＮＦＲ－Ｉのアミノ酸残基Ｔｈｒ^{127}－Ａｓｎ^{161}、およびｓＴＮＦＲ－ＩＩのアミノ酸残基Ｐｒｏ^{141}－Ｔｈｒ^{179}）を含まず；３番目のドメインの一部（ｓＴＮＦＲ－Ｉのアミノ酸残基Ａｓｎ^{111}－Ｃｙｓ^{126}およびｓＴＮＦＲ－ＩＩのアミノ酸残基Ｐｒｏ^{123}－Ｌｙｓ^{140}）を含まず；および必要に応じて、第一のドメインの一部（ｓＴＮＦＲ－Ｉのアミノ酸残基Ａｓｐ^{1}－Ｃｙｓ^{19}およびｓＴＮＦＲ－ＩＩのアミノ酸残基Ｌｅｕ^{1}－Ｃｙｓ^{32}）を含まない。
【０２７０】
ＩＬ－１インヒビターは、多数の機構から生じ得る、ＩＬ－１に対する細胞レセプターの活性化を、特異的に妨害し得る任意のタンパク質を含む。そのような機構としては、ＩＬ－１産生の下方制御、遊離ＩＬ－１の結合、ＩＬ－１のそのレセプターへの結合の妨害、ＩＬ－１レセプター複合体の形成（すなわち、ＩＬ－１レセプターアクセサリタンパク質とＩＬ－１レセプターとの会合）の阻害；またはそのレセプターへの結合後ＩＬ－１シグナル伝達の調節への介入が挙げられる。インターロイキン－１インヒビターのクラスとしては以下が挙げられる：　＊本明細書に開示されるような、ＩＬ－１ｒａのようなインターロイキン－１レセプターアンタゴニスト；
＊抗ＩＬ－１レセプターモノクローナル抗体（例えば、ＥＰ６２３６７４）；
＊ＩＬ－１結合タンパク質（例えば、可溶性ＩＬ－１レセプター（例えば、米国特許第５，４９２，８８８号、米国特許第５，４８８，０３２号、米国特許第５，４６４，９３７

号、米国特許第５，３１９，０７１号、および米国特許第５，１８０，８１２号））；
＊抗ＩＬ－１モノクローナル抗体（例えば、ＷＯ　９５０１９９７，ＷＯ９４０２６２７，ＷＯ　９００６３７１、米国特許第４，９３５，３４３号、ＥＰ３６４７７８、ＥＰ２６７６１．１およびＥＰ　２２００６３）；
＊ＩＬ－１レセプターアクセサリタンパク質およびそれに対する抗体（例えば、ＷＯ　９６／２３０６７）；
＊インターロイキン１β変換酵素（ＩＣＥ）またはカスパーゼＩのインヒビター（これらは、ＩＬ－１β産生および分泌を阻害するに使用され得る）；
＊インターロイキン１βプロテアーゼインヒビター；
＊ＩＬ－１のインビボ合成または細胞外放出をブロックする、他の化合物およびタンパク質。

【０２７１】
例示的なＩＬ－１インヒビターは、以下の参考文献に開示されている：
以下の番号の米国特許：５７４７４４４；５３５９０３２；５６０８０３５；５８４３９０５；５３５９０３２；５８６６５７６；５８６９６６０；５８６９３１５；５８７２０９５；５９５５４８０；
以下の番号の国際（ＷＯ）特許出願：９８／２１９５７，９６／０９３２３，９１／１７１８４，９６／４０９０７，９０／３２７３３，９８／４２３２５，９８／４４９４０，９８／４７８９２，９８／５６３７７，９９／０３８３７，９９／０６４２６，９９／０６０４２，９１／１７２４９，９８／３２７３３，９８／１７６６１，９７／０８１７４，９５／３４３２６，９９／３６４２６，および９９／３６４１５；
以下の番号の欧州（ＥＰ）特許出願：５３４９７８および８９４７９５；ならびに仏国特許出願ＦＲ　２７６２５１４。

【０２７２】
（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様組成物および投与）
治療化合物は、本発明の範囲内にある。そのような組成物は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド（フラグメント、改変体、誘導体を含む）または１つ以上の選択的結合因子の治療有効量を、薬学的に受容可能な処方剤のような薬学的に受容可能な薬剤と混合されて含み得る。

【０２７３】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の薬学的組成物は、代表的に、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、核酸分子または１つ以上の選択的結合因子の治療有効量または予防有効量を、投与形態での適合性のために選択される薬学的または生理学的に受容可能な処方剤とともに、含む。適切な処方物質または薬学的に受容可能な薬剤としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存料、着色料、香料、希釈剤、乳化剤、懸濁剤、溶媒、フィラー、バルク剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦型剤および／または薬学的アジュバント。例えば、適切なビヒクルまたはキャリアは、注射用水、生理食塩水、または人工の脳脊髄液であり得、これらには、非経口投与のための組成物中で一般的な他の材料が補充され得る。中性緩衝化された生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらに、例示的なビヒクルである。

【０２７４】
本明細書において使用される用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理的に受容可能なキャリア」とは、薬学的組成物としてのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、核酸分子または選択結合因子の送達を達成または増強するために適切な、１つ以上の処方物材料をいう。

【０２７５】
受容可能な処方材料は、好ましくは、レシピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度で不活性である。これらの材料としては、以下が挙げられ得る：緩衝剤（例えば、リン酸塩、クエン酸塩または他の有機酸）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）；低分子ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼ

ラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の糖（グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ））；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性界面活性剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ、Ｐｌｕｒｏｎｉｃｓまたはポリエチレングリコール（ＰＥＧ））。

【０２７６】

代表的に、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の薬学的組成物は、以下を含む組成物の形態で投与される：１つ以上の生理的に受容可能な薬剤と組み合わされた精製されたポリペプチド。本明細書において使用される場合、用語「ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の薬学的組成物」はまた、本発明の核酸分子または選択結合因子を含む組成物を包含する。

【０２７７】

中性緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、例示的な適切なキャリアである。他の標準的な薬学的に受容可能な薬剤（例えば、希釈剤および賦型剤）は、所望に応じ含まれ得る。例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦型剤を用いた凍結乾燥物として処方され得る。他の例示的な薬学的組成物は、約ｐＨ７．０－８．５のＴｒｉｓ緩衝剤、または約ｐＨ４．０－５．５の酢酸緩衝剤を含む。これは、ソルビトールまたは適切なその代替物をさらに含み得る。

【０２７８】

薬学的組成物中の主なビヒクルまたはキャリアはその性質が水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、適切なビヒクルまたはキャリアは、注射用水、生理的食塩水、溶液または人工の脳脊髄液であり得、これらには、非経口投与のための組成物中に一般的な他の材料が補充されていてもよい。中性緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約ｐＨ７．０－８．５のＴｒｉｓ緩衝剤、または約ｐＨ４．０－５．５の酢酸緩衝剤を含む。これは、ソルビトールまたは適切なその代替物をさらに含み得る。本発明の１つの実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド組成物は、凍結乾燥ケーキまたは水性溶液の形態で、任意の処方剤（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、前出）で所望の程度の純度を有する選択された組成物と混合することによって、保存用に調製され得る。さらに、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様のポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦型剤を用いた凍結乾燥物として処方され得る。

【０２７９】

さらに、その組成物は、以下を改変、維持または保存のために他の処方物材料を含み得る：例えば、ｐＨ、浸透圧、粘度、明澄度、色調、滅菌性、安定性、溶解速度または放出速度、その組成物の吸収または浸透、あるいはその処方物の臭い。同様に、その組成物は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド、核酸分子または選択結合因子の放出速度を改変または維持するために、あるいはそのようなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の吸収もしくは浸透を促進するためにさらなる処方材料を含み得る。

【０２８０】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の薬学的組成物は、非経口的に投与され得る。あるいは、その組成物は、消化管を通じて投与され得る（例えば、経口または吸入による）。非経口的に投与される場合、本発明において使用するための治療組成物は、発熱物質のない、非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。ｐＨ、等張性、安定性などへの正当な注意を払ったそのような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当業者に技術常識の範囲にある。

【０２８１】

非経口注射のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水である。この中に、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが、滅菌等張性溶液として、処方され、適切に保存される。さらに別の調製物は、その産物の制御されたまたは維持された放出を提供し、次いで貯蔵注射として送達され得る薬剤（例えば、注射可能なミクロスフェア、生体分解性粒子またはビーズ

、またはリポソーム）を用いた所望の分子の処方物を包含し得る。所望される分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを包含する。

【０２８２】

本発明の薬学的組成物は、他の成分（例えば、非経口的に受容可能な保存料、張性剤、共溶媒、湿潤剤、複合剤、緩衝化剤、抗微生物剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム）、および界面活性剤）を、当該分野において周知のごとく含み得る。例えば、適切な張性増強剤としては、アルカリ金属ハライド（好ましくは、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、マンニトール、ソルビトール等が挙げられる。適切な保存料としては、塩化ベンザルコニウム、チメロサール、フェネチル（ｐｈｅｎｅｔｈｙｌ）アルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸などが挙げられるがそれらに限定されない。過酸化水素もまた、保存料として使用され得る。適切な共溶媒は、例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールである。適切な複合化剤は、例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、βシクロデキストリンまたはヒドロキシプロピルβシクロデキストリンである。適切な界面活性剤または湿潤剤としては、ソルビタンエステル、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート８０）、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパールなどが挙げられる。緩衝化剤は、ホウ酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、重炭酸塩またはＴｒｉｓ－ＨＣｌのような従来の緩衝剤であり得る。

【０２８３】

この処方物成分は、投与部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝剤は、生理的ｐＨまたはわずかにより低いｐＨ（代表的には約５と約８との間のｐＨ範囲内）でその組成物を維持する。

【０２８４】

本発明の１つの実施形態において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物と、任意の生理的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８th Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ，ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ［１９９０］）とを、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で混合することによって貯蔵用に調製され得る。最適な薬学的処方物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、以下を参照のこと：Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ｐｐ．１４３５－１７１２。このような組成物は、本発明のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの物理的状態、安定性、インビボ放出速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【０２８５】

治療に使用される、有効量のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド組成物は、例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが使用される適応、投与経路、および患者の状態のような治療的観察事項に依存する。従って、臨床医は、投薬量を力価測定し、そして投与経路を変更して、最適な治療効果を得ることができる。代表的な投薬量は、上述の因子に依存して、約０．１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇまたは死れを超える範囲におよび得る。他の実施形態において、投薬量は、１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇまでの範囲であり得るか；または５μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇの範囲であり得るか；あるいは０，１μｇ／ｋｇから約１００μｇ／ｋｇの範囲であり得るか；あるいは１μｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇの範囲であり得る。

【０２８６】

投与の頻度は、使用される処方物における、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の薬物動態的パラメータに依存する。代表的には、臨床医は、投薬量が所望の効果を達成するに達するまで、その組成物を投与する。従って、その組成物は、単回用量として、または２もしくはそれを超える用量（これは、所望の分子の同じ量を含んでいても含んでいなくてもよい）として、あるいは移植可能なデバイスまたはカテーテルを介した連続注入として投与され得る

。
【０２８７】
従って、当業者は、処置のために適切な投薬量レベルは、部分的に、送達される分子、治療状況、処置される障害の型、レシピエントの年齢および全身の健康状態に依存して変動する。
【０２８８】
インビボ投与のために使用されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の薬学的組成物は、無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通じた濾過によって達成され得る。その組成物が凍結乾燥されている場合、これらの方法を用いた滅菌は、凍結乾燥および再構築の前またはその後のいずれかで行われ得る。非経口的投与のための組成物は、凍結乾燥形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口的組成物は、概して、滅菌アクセス口を有する容器（例えば、静脈内溶液バッグ）または皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有するバイアルに配置される。
【０２８９】
一旦薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体または脱水粉末もしくは凍結乾燥粉末として保存され得る。そのような処方物は、直ぐ使用可能な（ｒｅａｄｙ－ｔｏ－ｕｓｅ）形態または投与前に再構成を必要とする形態（例えば、凍結乾燥）のいずれかで保存され得る。
【０２９０】
特定の実施形態において、本発明は、単回用量投与単位を産生するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を備え得る。本発明の範囲内に含まれるのはまた、単回および複数のチャンバつきの予備充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよびリオシジンジ（ｌｙｏｓｙｒｉｎｇｅ））を備えるキットである。
【０２９１】
（１）徐放処方物、（２）吸入剤ミスト、または（３）経口活性処方物のような薬学的組成物もまた企図される。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子薬学的組成物は概して、非経口的投与のために処方される。そのような非経口的に投与される治療組成物は、代表的に、発熱物質のない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり、これは、所望のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子を、薬学的に受容可能なビヒクル中に含む。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子薬学的組成物はまた、ポリ乳酸、ポリグリコール酸などのようなポリマー化合物の粒子調製物、またはその分子のリポソーム中への導入を包含し得る。ヒアルロン酸もまた、使用され得、そしてこれは、血液循環の間維持される促進効果を有し得る。
【０２９２】
１つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアゾール送達のためのプロペラントを用いて、液化されたプロペラントを用いるかもしくは用いないで処方され得る。さらに別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与は、ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９４／００１８７５にさらに記載され、これは、化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。
【０２９３】
特定の処方物は、消化管を通じて（例えば、経口）投与され得ることもまた企図される。本発明の一つに実施形態において、この様式で投与されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、錠剤およびカプセルのような固体投薬形態の処方において慣例的に使用されるそれらのキャリアとともにまたはそれを含まずに処方され得る。例えば、カプセルは、胃腸管において、バイオアベイラビリティーが最大化され、そして全身前分解が最小化される時点で処方物の活性部分が放出されるように設計され得る。さらなる薬剤が、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの吸収を容易にするように含まれ得る。希釈剤、香料、低融点ろう、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合因子もまた使用され得る。

【０２９４】
別の薬学的組成物は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子の有効量を、錠剤の製造のために適切な非毒性賦型剤と混合して含み得る。滅菌水または他の適切なビヒクル中にその錠剤を溶解することによって、溶液が単位用量形態で調製され得る。適切な賦型剤としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：不活性希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、ラクトース、またはリン酸カルシウム；あるいは結合因子（例えば、デンプン、ゼラチン、アラビアゴム）；あるいは滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。
【０２９５】
さらなるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様薬学的組成物は、当業者に明らかであり、これには、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子を、１つ以上の他の治療剤と組み合わせて含む処方物、および徐放処方物または制御された送達処方物中のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが包含される。種々の他の徐放手段または制御された送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体分解性微粒子または多孔性ビーズおよびデポ（ｄｅｐｏｔ）注射）を処方するための技術もまた、当業者に公知である。例えば、以下を参照のこと：ＰＣＴ／ＵＳ９３／００８２９。これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー微粒子の制御された放出を記載する。
【０２９６】
徐放調製物のさらなる例としては、成型された物品の形態（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリクスを包含する。徐放マトリクスとしては以下が挙げられ得る：ポリエステル、ヒドロゲル、ポリ乳酸（米国特許第３，７７３，９１９号、ＥＰ　５８，４８１）、Ｌ－グルタミン酸およびγエチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー（Ｓｉｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，２２：５４７－５５６［１９８３］）、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）（Ｌａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．，１５：１６７－２７７［１９８１］およびＬａｎｇｅｒ，Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．，１２：９８－１０５（１９８２））、エチレンビニルアセテート（Ｌａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，前出）またはポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸（ＥＰ　１３３，９８８）。徐放組成物はまた、リポソームを含み得る。このリポソームは、当該分野において公知のいくつかの方法のいずれかにより調製され得る。例えば、以下を参照のこと：Ｅｐｐｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２：３６８８－３６９２（１９８５）；ＥＰ　３６，６７６；ＥＰ　８８，０４６；ＥＰ　１４３，９４９。
【０２９７】
投与の様式に拘わらず、特定の用量は、体重、体表面積または器官の大きさに従って算出され得る。適切な投薬量のさらなる調整は、当業者によって慣用的になされ、そして当業者によって慣用的になされる業務の範囲内にある。適切な投薬量は、適切な用量応答データの使用により確認され得る。
【０２９８】
薬学的組成物の投与経路は、公知の方法に従って行われる（例えば、経口、吸入、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内または創傷内経路への注射または注入、あるいは徐放系または移植デバイスによる）。所望の場合、その組成物は、注入により、ボーラス注射または移植デバイスにより連続的に投与され得る。
【０２９９】
あるいはまたは加えて、その組成物は、所望の分子が吸収またはカプセル化された、膜、スポンジまたは他の適切な材料の罹患領域へ移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用されるとき、そのデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時間放出ボーラスによって、そのデバイスを通じて直接、または連続投与、あるいは連続注入を用いてカテーテルを介してであり得る。
【０３００】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド（フラグメント、改変体および誘導体を含む）は、単独で、他のポリペプチドおよび薬学的組成物とともにまたは組み合わせて使用され得ること

がさらに理解される。例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、処置される適応症に適切である場合サイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤、および／または化学療法剤とともに、使用され得る。

【０３０１】

いくつかの症例では、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様薬学的組成物をエキソビボ様式で使用することも好ましくあり得る。そのような場合、細胞、組織または器官であって、患者から取り出されたものは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様薬学的組成物に暴露され、その後、その細胞、組織および／または器官は、続いてその患者に移植して戻される。

【０３０２】

他の症例において、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、本明細書において記載されるもののような方法を用いて遺伝子操作された特定の細胞を移植してそのポリペプチドを発現および分泌させることによって送達され得る。そのような細胞は、動物またはヒトの細胞であり得、そして自己、異種（ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ）または異種（ｘｅｎｏｇｅｎｅｉｃ）であり得る。必要に応じて、その細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、その細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。カプセル化された材料は、代表的に、生体適合性で、半透過性のポリマー封入物または膜であり、これは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系によるかまたは周囲組織からの他の悪性因子による細胞の破壊を予防することを可能にする。

【０３０３】

本発明のさらなる実施形態は、相同組換えの手段によって治療的ポリペプチドのインビトロ産生のため、および遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および相殺のための両方のための細胞および方法（例えば、相同組換えおよび／または他の組換え産生方法）に関する。

【０３０４】

さらに、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードするＤＮＡをすでに含む細胞に導入された制御エレメントを利用して、インビトロまたはインビボで、相同組換えにより、または組換え産生方法を用いて産生され得ることが企図される。例えば、相同組換え方法を使用して、通常は転写的にサイレントなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子または下方に発現する遺伝子を含む細胞を改変し得、それによりＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの治療有効量を発現する細胞を産生させ得る。相同組み換えは、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または矯正するために遺伝子を標的化するためにもともと開発された技術である。Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉ，Ｐｒｏｇ．ｉｎ Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．＆Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，３６：３０１，１９８９。基本的な技術は、哺乳動物ゲノムの特定の領域に特定の変異を導入するための方法として開発された（Ｔｈｏｍａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，４４：４１９－４２８，１９８６；Ｔｈｏｍａｓ ａｎｄ Ｃａｐｅｃｃｈｉ，Ｃｅｌｌ，５１：５０３－５１２，１９８７；Ｄｏｅｔｓｃｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８５：８５８３－８５８７，１９８８）か、または欠損遺伝子内の特定の変異を矯正するための方法として開発された（Ｄｏｅｔｓｃｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３３０：５７６－５７８，１９８７）。例示的な相同組換え技術は、米国特許第５，２７２，０７１（ＥＰ ９１９３０５１，ＥＰ公開Ｎｏ．５０５５００；ＰＣＴ／ＵＳ９０／０７６４２、国際公開ＷＯ９１／０９９５５）に記載されている。

【０３０５】

相同組換えにより、ゲノムに挿入されるべきＤＮＡ配列は、目的の遺伝子を標的化ＤＮＡに付着させることによって目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。標的化ＤＮＡは、ゲノムＤＮＡの領域に相補的（相同）であるヌクレオチド配列である。標的化ＤＮＡの小片であって、ゲノムの特定の領域に相補的であるものは、ＤＮＡ複製プロセスの間に親の鎖と接触するようにおかれる。これは、ハイブリダイズしてそれゆえ共通の相同領域を通じて内的ＤＮＡの他の片と組換えるように細胞中に挿入されたＤＮＡの一般的特性である。この相補的鎖が、変位あるいは異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌ

クレオチドに付着される場合、この相補的鎖もまた、組み換えの結果として、新たに合成される鎖へと組み込まれる。プルーフリーディング機能の結果として、ＤＮＡの新たな配列が鋳型として機能することが可能となる。従って、移入されたＤＮＡがゲノムに組み込まれる。

【０３０６】

標的化ＤＮＡのこれらの片に付着されるのは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現と相互作用し得るかまたは制御し得るＤＮＡの領域である（例えば、隣接（フランキング）配列））。例えば、プロモーター／エンハンサーのエレメント、サプレッサー、または外因性の転写調節エレメントは、意図される宿主細胞のゲノムに、所望のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードするＤＮＡの転写に影響するに十分近位および方向において挿入される。制御エレメントは、宿主細胞ゲノムに存在するＤＮＡの一部を制御する。従って、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子自身をコードするＤＮＡのトランスフェクションによってではなく、むしろＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの転写のために認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するＤＮＡ調節セグメントと組み合わされた標的化ＤＮＡ（目的の内的遺伝子と相同性の領域を含む）の使用によって達成され得る。

【０３０７】

例示方法において、細胞における所望される標的化遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、少なくとも制御配列、エキソンおよびスプライスドナー部位を含むＤＮＡの、導入によって予備選択された部位において細胞ゲノム中への相同組換えを介して変更される。これらの成分は、染色体（ゲノム）ＤＮＡに、実際これが新たな転写単位の生産を生じるような様式で導入される（ここで、そのＤＮＡ構築物に存在する調節配列、エキソンおよびスプライスドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結されている）。これらの成分の染色体ＤＮＡにこれらの成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変更される。

【０３０８】

本明細書において記載される変更された遺伝子発現は、得られた細胞において通常サイレント（発現されていない）な遺伝子を活性化すること（または発現されるように生じさせること）、ならびに得られる細胞において生理学的に有意なレベルで発現されない遺伝子の発現を増強することを包含する。この実施形態は、さらに、得られる細胞において生じる調節または導入のパターンとは異なるような調節または導入のパターンを変化させること、ならびに得られる細胞において発現される遺伝子の発現を減少させる（消去することを含む）ことを包含する。

【０３０９】

相同組み換えを使用して、細胞の内因性ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子から、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド生産を増強または生じさせ得る１つの方法は、第一に、相同組み換えを用いて部位特異的組換え系からの組換え配列（例えば、Ｃｒｅ／ｌｏｘＰ，ＦＬＰ／ＦＲＴ）（Ｓａｕｅｒ，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，５：５２１－５２７，１９９４；Ｓａｕｅｒ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２２５：８９０－９００，１９９３）を、細胞の内因性ゲノムＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドコード領域の上流（すなわち５’側）に配置することを包含する。ゲノムＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位と相同な組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素とともに改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼは、細胞株においてゲノムＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置される組換え部位に、プラスミドの組換え部位を介して、プラスミドが組み込まれるようにさせる（Ｂａｕｂｏｎｉｓ　ａｎｄ　Ｓａｕｅｒ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２１：２０２５－２０２９，１９９３；Ｏ’Ｇｏｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５１：１３５１－１３５５，１９９１）。転写を増強することが知られる任意の隣接配列（例えば、エンハンサー／プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミドに適切に配置されるとき、細胞の内因性

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子から、デノボでまたは増強されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で組み込まれる。

【０３１０】

部位特異的組換え配列がゲノムＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドコード領域の直ぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株ゲノムにおいてその他の場所で第二の組換え部位に導入するように相同組み換えを用いることである。次いで、適切なリコンビナーゼ酵素は、２つの組換え部位の細胞株へと導入され、組換え事象が生じ（欠失、反転、トランスロケーション）（Ｓａｕｅｒ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，５：５２１－５２７，１９９４；Ｓａｕｅｒ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２２５：８９０－９００，１９９３）、これは、細胞の内因性のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子からデノボのまたは増強されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写単位を生じる。

【０３１１】

細胞の内因性のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子からのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現を増強させるためまたは生じるためのさらなるアプローチは、細胞の内因性ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子からデノボまたは増強されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド産生を生じるような様式で、遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増強または生じさせることおよび／または遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサー）の発現を減少させることを包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合された部位特異的ＤＮＡ結合ドメインを含むポリペプチド）を、細胞に導入し、その結果、内因性のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子からデノボまたは増強されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの産生が、生じることを包含する。

【０３１２】

本発明は、標的遺伝子の発現を変更する方法において有用なＤＮＡ構築物にさらに関する。特定の実施形態において、例示のＤＮＡ構築物は、（ａ）１つ以上の標的化配列；（ｂ）調節配列；（ｃ）エキソン；および（ｄ）対でないスプライスドナー部位を含む。ＤＮＡ構築物における標的化配列は、エレメント（ａ）－（ｄ）を細胞内の標的遺伝子に組み込み、その結果、エレメント（ｂ）－（ｄ）が内因性標的配列の配列に作動可能に連結されるようになることを指向する。別の実施形態において、このＤＮＡ構築物は、（ａ）１つ以上の標的化配列、（ｂ）調節配列、（ｃ）エキソン、（ｄ）スプライス－ドナー部位、（ｅ）イントロン、および（ｆ）スプライスアクセプター部位を含む。ここで、標的配列は、エレメント（ａ）－（ｆ）を組み込んで、その結果、（ｂ）（ｆ）のエレメントが内因性遺伝子に作動可能に連結されるようになる。標的化配列は、相同組換え生じる細胞の染色体ＤＮＡにおいて予備選択される部位と相同である。この構築物において、そのエキソンは、概して調節配列の３’側にあり、そしてスプライスドナー部位は、エキソン３’側にある。

【０３１３】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書において提示されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする核酸配列）が知られている場合、その遺伝子の選択された領域に相補的なＤＮＡの片を合成または他の方法で入手し得る（例えば、目的の領域に結合する特定の認識部位で、ネイティブＤＮＡの適切な制限による）。この片は、その細胞への挿入の際に標的化配列として作用し、そしてそのゲノム内のその相同領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションがＤＮＡ複製の間に生じる場合、このＤＮＡの片およびそれに付随する任意の他のさらなる配列は、Ｏｋａｚａｋｉフラグメントとして作用し、そしてＤＮＡの新たに合成された娘鎖中に取り込まれる。従って本発明は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

【０３１４】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド細胞治療（例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを

産生する細胞の移植）もまた、企図される。この実施形態は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの生物学的に活性な形態を合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。そのようなＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド産生細胞は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの天然のプロデューサーである細胞であり得るか、あるいはそれがＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを産生する能力が、所望のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする遺伝子またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現を増強する遺伝子で形質転換されることによって増強された、組換え細胞であり得る。このような改変は、その遺伝子の送達のために、ならびにその遺伝子の発現および分泌を促進するために適切なベクターの手段により達成され得る。外来種のポリペプチドの投与とともに生じ得るような、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドが投与される患者において可能な免疫学的反応を最小化するために、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを産生する天然の細胞がヒト起源のものであって、そしてヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを産生する組換え細胞は、ヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【０３１５】

移植された細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するためにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物の細胞は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの放出を可能にするが患者の免疫系または周囲組織からの他の悪性因子による細胞の破壊を予防する生体適合性の半透過性ポリマー封入物または膜中で、患者に移植され得る。あるいは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞は、そのようなカプセルなしで患者に直接移植され得る。

【０３１６】

生存細胞のカプセル化のための技術は、当該分野において公知であり、そして患者におけるカプセル化された細胞の調製およびその移植は、慣用的に行われ得る。例えば、Ｂａｅｔｇｅ　ｅｔ　ａｌ．（ＷＯ９５／０５４５２；ＰＣＴ／ＵＳ９４／０９２９９）は、生物学的に活性な分子の有効な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。カプセルは、生体適合性であり、そして容易に取り出し可能である。カプセルは、組換えＤＮＡ分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。この分子は、哺乳動物宿主中に移植される際にインビボで下方制御に供されないプロモーターに作動可能に連結された、生物学的に活性な分子をコードするＤＮＡ配列を含む。このデバイスは、レシピエント内の特定の部位に生存する細胞からの分子の送達を提供する。さらに、以下を参照のこと：米国特許第４，８９２，５３８号、同第５，０１１，４７２号および同第５，１０６，６２７。生存する細胞をカプセル化するための系は、以下に記載される：ＰＣＴ出願ＷＯ９１／１０４２５（Ａｅｂｉｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）。以下もまた参照のこと：ＰＣＴ出願ＷＯ９１／１０４７０（Ａｅｂｉｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、Ｗｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐｅｒ．Ｎｅｕｒｏ．，１１３：３２２－３２９（１９９１）、Ａｅｂｉｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐｅｒ．Ｎｅｕｒｏ．，１１１：２６９２７５（１９９１）；およびＴｒｅｓｃｏ　ｅｔ　ａｌ．，ＡＳＡＩＯ，３８：１７－２３（１９９２）。

【０３１７】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのインビボおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた、企図される。インビボ遺伝子治療は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする遺伝子を、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子の局所注入または他の適切なウイルスもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞中に導入することによって行われ得る。Ｈｅｆｔｉ，Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，２５：１４１８－１４３５（１９９４）。例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的化された細胞に送達するためにアデノ随伴ウイルスベクター中に含まれ得る（例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ，国際出願ＷＯ９５／３４６７０；国際出願ＰＣＴ／ＵＳ９５／０７１７８）。組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ゲノムは代表的に、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結された、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードするＤＮＡ配列に隣接するＡＡＶ反

転末端反復を含む。

【０３１８】

代替の適切なウイルスベクターは、以下が挙げられるがそれらに限定されない：レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルスおよびパピローマウイルスのベクター。米国特許第５，６７２，３４４号は、組換え神経栄養性ＨＳＶ－１ベクターを含むインビボウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第５，３９９，３４６号は、インビトロで治療タンパク質をコードするＤＮＡセグメントが挿入されるように処理されたヒト細胞の送達によって治療タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療の実施のためのさらなる方法および材料は、以下に記載されている：米国特許第５，６３１，２３６号（これは、アデノウイルスベクターを含む）；米国特許第５，６７２，５１０号（これは、レトロウイルスを含む）；および米国特許第５，６３５，３９９号（これは、サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む）。

【０３１９】

非ウイルス送達方法としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：リポソーム媒介性移入、裸のＤＮＡ送達（直接注射）、レセプター媒介性移入（リガンド－ＤＮＡ複合体）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃）。遺伝子治療材料および方はまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサー－プロモーター、部位特異的組み込みのために設計されたＤＮＡ配列、親の細胞よりも選択的利点を提供し得るＤＮＡ配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全手段）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子の使用ならびにベクター製造の方法をも包含し得る。遺伝子治療技術の実施のためのそのようなさらなる方法および材料は、以下に記載されている：米国特許第４，９７０，１５４号（これは、エレクトロポレーション技術を含む）；ＷＯ９６／４０９５８（これは、核リガンドを含む）；米国特許第５，６７９，５５９号（これは、遺伝子治療のためのリポタンパク質含有系を記載する）；米国特許第５，６７６，９５４号（これは、リポソームキャリアを含む）；米国特許第５，５９３，８７５号（これは、リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を含む）；ならびに米国特許第４，９４５，０５０号（ここでは、生物学的に活性な粒子は、その粒子が細胞の表面に浸透し、そしてその細胞の内部へと取り込まれるようになる速度で細胞に噴霧される）。

【０３２０】

さらに他の実施形態において、調節エレメントは、標的細胞中にＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子の制御された発現のために包含され得る。そのようなエレメントは、適切なエフェクターに対する応答においてスイッチオンされる。このようにして、治療ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。１つの慣用される制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、ＤＮＡ結合タンパク質または転写活性化タンパク質）をダイマー化するために使用される低分子ダイマー化剤またはラパログ（ｒａｐａｌｏｇ）（ＷＯ９６４１８６５（ＰＣＴ／ＵＳ９６／０９９４８６）；ＷＯ９７３１８９８（ＰＣＴ／ＵＳ９７／０３１３７）およびＷＯ９７３１８９９（ＰＣＴ／ＵＳ９５／０３１５７）に記載される）の使用を包含する。そのタンパク質のダイマー化を使用して、導入遺伝子のための転写を開始し得る。

【０３２１】

代替調節技術は、凝集物またはクラスターとして細胞内に目的の遺伝子から発現されるタンパク質を格納する方法を使用する。目的の遺伝子は、従来の凝集ドメインを含む誘導タンパク質として発現され、これは、液胞内での凝集タンパク質の保持を生じる。格納されたタンパク質は、細胞内で安定かつ不活性である。しかし、そのタンパク質は、条件つき凝集ドメインを除き、それにより凝集物またはクラスターから離れて特異的に破壊する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することにより、その結果そのタンパク質がその細

胞から分泌され得ることによって放出され得る。以下を参照のこと：Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８７：８１６－８１７、同８２６－８３０（２０００）。

【０３２２】

他の適切な制御手段おまたは遺伝子スイッチとしては、以下の系が挙げられるがそれらに限定されない：ミフェプリストン（ＲＵ４８６）は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合が、２つの転写因子のダイマーを形成し、次いでこれが核に入りＤＮＡに結合することによって、転写を活性化する。このリガンド結合ドメインは、天然のリガンドへそのレセプターが結合する能力を除去するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系は、さらに以下に記載される：米国特許第５，３６４，７９１号；ＷＯ９６４０９１１およびＷＯ９７１０３３７。

【０３２３】

さらに別の制御系は、エクジソン（ショウジョウバエ（ｆｒｕｉｔ ｆｌｙ）ステロイドホルモン）を使用する。これは、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、活性化する。次いで、このレセプターは、核に移行し、特定のＤＮＡ応答エレメント（エクジソン応答遺伝子からのプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するためのトランス活性化ドメイン／ＤＮＡ結合ドメイン／リガンド結合ドメインを含む。エクジソン系は、さらに、以下に記載される：米国特許第５，５１４，５７８号；ＷＯ９７３８１１７；ＷＯ９６３７６０９；およびＷＯ９３０３１６２。

【０３２４】

別の制御手段は、陽性のテトラサイクリン制御可能なトランスアクチベーターを使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された、変異されたｔｅｔリプレッサータンパク質ＤＮＡ結合ドメイン（変異されたｔｅｔＲ４アミノ酸変異を含み、これは、反転テトラサイクリン制御されたトランスアクチベータータンパク質を生じる。すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でｔｅｔオペレーターに結合する）を含む。そのような系は、以下に記載されている：米国特許第５，４６４，７５８号；同第５，６５０，２９８号および同第５，６５４，１６８号。

【０３２５】

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

【０３２６】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様分子遺伝子治療または細胞治療は、第二のポリペプチドの送達をさらに含む。例えば、宿主細胞は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドおよび少なくとも以下の一つの両方の発現および放出をするように改変され得る：ＩＬ－１ｒａ、ｓＴＮＦｒ Ｉ型、ｓＴＮＦｒ ＩＩ型、およびそれらの誘導体；セリン白血球プロテアーゼインヒビター（ＳＬＰＩ）、オステオプロテジェリン（ＯＰＧ）；および抗ＴＮＦ抗体、抗ＩＬ－１抗体、ならびにそれらの誘導体。あるいは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドおよび上述のポリペプチドの１つ以上は、別個の細胞中で発現され得、そしてそれらから放出され得る。そのような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはその細胞は、単一の移植可能なデバイス（例えば、上述のカプセル化膜）中に含まれ得るか、またはその細胞はウイルスベクター手段によって別個に改変され得る。

【０３２７】

遺伝子治療技術の一つの例は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡおよび／または合成ＤＮＡのいずれか）を使用することである。この遺伝子は、構成的または誘導性のプロモーターと作動可能に連結されて、「遺伝子治療ＤＮＡ構築物」を形成し得る。このプロモーターは、構築物が挿入される細胞または組織の型においてそれが活性である限り、内因性ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子に対して同種であってもよく、異種であってもよい。遺伝子治療ＤＮＡ構築物の他の成分は、必要に応じて、以下を含み得る：部位特異的組み込みのために設計されたＤＮＡ

分子（例えば、相同組換えのために有用な内因性配列）、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親の細胞よりも選択的利点を提供し得るＤＮＡ分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なＤＮＡ分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化について）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによって発現を増強する転写因子、ならびにベクター製造を可能にする因子。

【０３２８】

次いで、この遺伝子治療ＤＮＡ構築物は、細胞に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）導入され得る。遺伝子治療ＤＮＡ構築物を導入するための一つの手段は、本明細書において記載されるウイルスベクターの手段による。特定のベクター（例えば、レトロウイルスベクター）は、細胞の染色体ＤＮＡに対して遺伝子治療ＤＮＡ構築物を送達し、そしてその遺伝子治療ＤＮＡ構築物は、染色体ＤＮＡ中に組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療ＤＮＡ構築物は、細胞質に残存する。

【０３２９】

遺伝子治療を介した、細胞における内因性ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド発現を増強するための別の手段は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドプロモーター中に１つ以上のエンハンサーエレメントを挿入することである。ここで、このエンハンサーエレメントは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子の転写活性を増強するように働き得る。このエンハンサーエレメントは、その遺伝子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される。その組織中でのプロモーター活性化を付与することが知られるエンハンサーエレメントが選択される。例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードする遺伝子がＴ細胞において「スイッチ宇オン」されるべき場合、ｌｃｋプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、加えられるべき転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を用いてＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドプロモーターを含むＤＮＡフラグメント中に挿入され得る（そして、必要に応じて、ベクターならびに／または５’および／もしくは３’隣接配列など中に挿入される）。次いで、「相同組換え構築物」として知られるこの構築物は、エキソビボまたはインビボでのいずれかで所望の細胞中に導入され得る。

【０３３０】

遺伝子治療は、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによってＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド発現を減少するために使用され得る。そのような改変は、代表的に、相同組換え法を介して行われる。例えば、不活化することについて選択されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子のプロモーターのすべてまたは一部を含むＤＮＡ分子は、操作されて、転写を調節するプロモーターの片を除去および／または置き換えることができる。例えば、ＴＡＴＡボックスおよび／またはプロモーターの転写アクチベーターの結合部位は、標準的な分子生物学的技術を用いて欠失され得る。そのような欠失は、プロモーター活性を阻害し、それにより対応するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子の転写を抑制することができる。プロモーターにおけるＴＡＴＡボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドプロモーター（制御されるべきＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子と同じまたは関連する種からの）のすべてまたは関連する部分を含むＤＮＡ構築物を作製することによって達成され得る。ここでは、ＴＡＴＡボックスおよび／または転写アクチベーター結合部位のヌクレオチドの１つ以上が、１つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および／または挿入によって変異されている。結果として、ＴＡＴＡボックスおよび／またはアクチベーター結合部位は、活性が減少しているか、または完全に不活化されている。この構築物はまた、代表的に、改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブの（内因性の）５’および３’のＤＮＡ配列に対応するＤＮＡの少なくとも約５００塩基を含み、この構築物は、直接または本明細書に記載されるウイルスベクターを介してのいずれかで、適切な細胞中に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）導入され得る。代表的に、その構築物のその細胞のゲノムＤＮＡへの組み込みは、相同組み換えを介する。ここで、プロモーター構築物における５’および３’のＤＮＡ配列は、内因性染色体ＤＮＡに対するハイブリダイゼーションを介して改変されたプロモーター領域への組み込み

を補助するように働き得る。
【０３３１】
他の遺伝子治療方法はまた、１つ以上のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に使用され得る。例えば、アンチセンスＤＮＡまたはＲＮＡの分子であって、選択されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子の少なくとも一部に相補的な配列を含むものは、その細胞内に導入され得る。代表的に、各々のそのようなアンチセンス分子は、各々の選択されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子の開始部位（５’末端）に対して相補的である。次いで、アンチセンス分子が対応するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ｍＲＮＡにハイブリダイズする場合、このｍＲＮＡの翻訳は、妨害されまたは減少する。当業者はまた、アンチセンスおよびリボザイム分子はまた、直接投与され得ることを理解する。
【０３３２】
あるいは、遺伝子治療を使用して、１つ以上のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターを作製することができる。この状況に置いて、各々の選択されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの変異体全長または短縮型ポリペプチドは、本明細書において記載されるように、調製され得そしてウイルスまたは非ウイルス性のいずれかの方法を用いて患者の細胞中に導入され得る。各々のそのような変異体は、代表的に、その生物学的役割における内因性ポリペプチドと競合するように設計される。
【０３３３】
（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸およびポリペプチドのさらなる使用）
本発明の核酸分子は、染色体上のＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子および関連遺伝子の位置をマッピングするために使用され得る。マッピングは、当該分野において公知の技術（例えば、ＰＣＲ増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション）によって行われる。
【０３３４】
核酸分子はまた、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド発現のアンチセンスインヒビターとして使用される。そのような阻害は、発現制御配列（三重螺旋形成）またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ｍＲＮＡに対して相補的でありそしてハイブリダイズする核酸分子によって実施され得る。アンチセンスプローブは、本明細書において開示されたＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子の配列を用いた利用可能な技術によって設計され得る。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物におけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを減少または非存在に関連する情報を提供する。
【０３３５】
ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書において提供されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸配列を用いて調製されて、関連する配列についてｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡまたは合成ＤＮＡのライブラリーをスクリーニングし得る。公知の配列に対して有意な同一性を示す、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのＤＮＡおよび／またはアミノ酸の配列の領域は、本明細書において記載されるような配列整列アルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてそれらの領域は、スクリーニングのためのプローブを設計するために使用され得る。
【０３３６】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子、ならびにそれら自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしないフラグメント、改変体および／または誘導体は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ＤＮＡまたは哺乳動物組織または体液のサンプルにおける対応するＲＮＡの存在について、定性的または定量的のいずれかで試験するために診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。
【０３３７】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドは、処置されるべき適応症について適切である場合、１つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤、および／または化学療法剤と組み合わせて（同時または連続的に）使用され得る。
【０３３８】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのフラグメント、改変体、および／または誘導体はまた、生物学的に活性であるかどうかに拘わらず、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合す

る抗体を調製するために有用である。抗体は、インビボおよびインビトロの診断目的のために使用され得、それらには以下が挙げられるがそれらに限定されない：体液または細胞のサンプルにおけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの存在を検出する標識された形態における使用。この抗体はまた、本明細書において記載される疾患および障害を予防または処置するために使用され得る。抗体は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに結合され得、その結果、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの少なくとも１つの活性特性を減少または遮断し得るか、またはポリペプチドに結合して活性を増加させ得る。

【０３３９】

以下の実施例は、本発明の性質をさらに代表化するよう働くが、本発明の範囲を制限するとみなされるべきではない。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ拘束される。

【０３４０】

（実施例１：ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ｃＤＮＡのクローニング）

ヒトゲノムデータベースの相同性ベースのＢＬＡＳＴ検索は、公知のヒトＯＰＧポリペプチド配列に対する相同性を翻訳の際に提示する、５４３ヌクレオチドゲノムＤＮＡフラグメント（配列番号５）を同定した。この配列情報に基づいて、ヌクレオチドプライマー２３７４－５１（５’－ＣＣＣ　ＣＡＧ　ＧＣＡ　ＣＣＴ　ＴＣＴ　ＣＡＧ　ＣＴＧ　Ｃ－３’配列番号９）および２３７４－５２（５’－ＧＴＧ　ＴＡＴ　ＣＴＣ　ＧＡＧ　ＴＴＧ　ＣＣＡ　ＴＧＣ　ＣＣ－３’；配列番号１０）を合成し、そしてこれらを用いて種々のヒトｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングした。ＰＣＲビーズ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）、２５μｌの最終反応容量および各々オリゴヌクレオチドの１０μｍｏｌを用いて、１１１ヌクレオチド（ｎｔ）の予想されたサイズのバンドが、胎児頭皮（ランダムおよびオリゴｄＴプライミングの両方）および胎児脾臓（ランダムおよびオリゴｄＴプライミングの両方）を含む多数のライブラリーにおいて同定された。サイクル条件は、９４℃で１分間（９４℃で３０秒間、６８℃で４５秒間）の３５回の反復、次いで７２℃で１０分間であった。

【０３４１】

これに基づいて、ｃＤＮＡの５’領域を単離するために、ＰＣＲを、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲ　Ｍｉｘ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ　ａｌｔｏ，ＣＡ）を用いて、ｐＳＰＯＲＴ（ＬＴＩ）ベクタープライマー８７０－０２（５－ＡＧＣ　ＧＧＡ　ＴＡＡ　ＣＡＡ　ＴＴＴ　ＣＡＣ　ＡＣＡ　ＧＧ－３’；配列番号１１）および１９１６－８３（５’－ＧＧＣ　ＴＣＧ　ＴＡＴ　ＧＴＴ　ＧＴＧ　ＴＧＧ　ＡＡＴ　ＴＧＴ　ＧＡＧ　ＣＧ－３’；配列番号１２）、ならびに遺伝子特異的プライマー２３７４－５３（５’－ＣＣＣ　ＡＧＧ　ＣＣＡ　ＧＣＡ　ＧＴＣ　ＴＣＣ　ＡＣＡ　Ｇ－３’；配列番号１３）を用いて胎児脾臓および胎児頭皮のｃＤＮＡライブラリーに対して行った。サイクル条件は以下のとおりであった：９４℃で１分間；９４℃で５秒間；７２℃で３分間（反復５回）；続いて９４℃で５秒間；７０℃で３分間（反復５回）；続いて９４℃で５秒間；６８℃で３分間；反復２５回；７２℃で１０分間。ＰＣＲ産物は、これらのｃＤＮＡライブラリーから得られた。

【０３４２】

これらの反応物において得られたＰＣＲ産物を、１：１００に希釈し、そしてネスティドベクタープライマー１０１９－０６（５’－ＧＣＴ　ＣＴＡ　ＡＴＡ　ＣＧＡ　ＣＴＣ　ＡＣＴ　ＡＴＡ　ＧＧＧ－３’；配列番号１４）および１９１６－８２（５’－ＣＡＴ　ＧＡＴ　ＴＡＣ　ＧＣＣ　ＡＡＧ　ＣＴＣ　ＴＡＡ　ＴＡＣ　ＧＡＣ　ＴＣ－３’；配列番号１５）、ならびにネスティド遺伝子特異的プライマー２３７４－５２（５’－ＧＴＧ　ＴＡＴ　ＣＴＣ　ＧＡＧ　ＴＴＧ　ＣＣＡ　ＴＧＣ　ＣＣ－３’；配列番号１０）を用いてＰＣＲ増幅した。特異的なＰＣＲ産物を、製造業者の指示に従って、ＴＡクローニングプロトコルを用いてｐＧＥＭ－Ｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）中にサブクローニングした。３’領域を、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲ　Ｍｉｘ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ　ａｌｔｏ，ＣＡ）を用い、以下のベクターを用いて胎

児頭皮ｃＤＮＡライブラリーのＰＣＲ増幅によって単離した：ベクタープライマー１３４０－３５（５’－ＣＣＣ　ＡＧＴ　ＣＡＣ　ＧＡＣ　ＧＴＴ　ＧＴＡ　ＡＡＡ　ＣＧ－３’：配列番号１６）および遺伝子特異的プライマー２３７４－５１（５’－ＣＣＣ　ＣＡＧ　ＧＣＡ　ＣＣＴ　ＴＣＴ　ＣＡＧ　ＣＴＧ　Ｃ－３’；配列番号９）。サイクル条件は、９４℃で２分間、（９４℃で１５秒間、６６℃で１５秒間、および７２℃で３分間）を３５回の反復、７２℃で２分間。次いで、４℃で分析するまで維持した。この反応において得られたＰＣＲ産物を、１：１００に希釈し、そしてＣｌｏｎｔｅｃｈ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲ　Ｍｉｘ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ　ａｌｔｏ，ＣＡ）を用い、以下のプライマーを用いてＰＣＲ増幅した：ネスティドベクタープライマー１０１９－０５（５’－ＴＧＡ　ＡＴＴ　ＴＡＧ　ＧＴＧ　ＡＣＡ　ＣＴＡ　ＴＡＧ　ＡＡＧ　ＡＧ－３’：配列番号１７）およびネスティド遺伝子特異的プライマー２３７４－７８（５’－ＧＣＣ　ＣＧＴ　ＴＧＣ　ＡＧＣ　ＣＴＴ　ＴＧＧ　ＡＧ－３’：配列番号１８）。サイクル条件は上述のものと同じであった。最終のＰＣＲ産物を、ＴＡクローニングプロトコルを用いて、ｐＧＥＭ－Ｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）中にサブクローニングした。５’ＲＡＣＥおよび３’領域の配列を、当業者に公知の標準的な方法を用いてＤＮＡ配列決定することによって決定した。配列をアセンブルし、そして４３０アミノ酸長をコードすることが見出された。

【０３４３】

このＴＮＦｒ／ＯＰＧ様遺伝子を単離するために利用されるｃＤＮＡライブラリーは、以下のとおり作製した。総ＲＮＡを、ヒト組織から、標準的なＲＮＡ抽出手順を用いて抽出し、そしてポリＡ　ＲＮＡを、この総ＲＮＡから、当業者に公知の標準的な手順を用いて選択した。ランダムプライムしたかまたはオリゴ（ｄＴ）プライム刺激したｃＤＮＡを、このポリＡ　ＲＮＡから、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ａｎｄ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　ｋｉｔ（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ，Ｉｎｃ．，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）のマニュアルにおける手順を用いるかまたは当業者に公知の他の適切な手順を用いて合成した。得られたｃＤＮＡを、適切な制限酵素（ＳａｌＩおよびＮｏｔＩ）で消化して粘着末端を作製して、クローニングベクターへの連結を補助した。次いで、この消化したｃＤＮＡをｐＳＰＯＲＴ－１クローニングベクター中または適切な制限酵素を用いて予備消化した、当業者に公知の別の適切なクローニングベクター中に連結した。この連結産物を、当該分野において標準的な技術を用いてＥ．ｃｏｌｉ中に形質転換し、そして形質転換体をアンピシリンを含む細菌培地プレート上で選択した。ｃＤＮＡライブラリーは、これらの形質転換体のすべてまたはサブセットからなった。

【０３４４】

（実施例２：ＴＮＦｒ／ＯＰＧ組織発現の評価）

ＲＴ－ＰＣＲによるｍＲＮＡ発現分析の方法は、次のようなものである。

【０３４５】

（逆転写（ＲＴ）反応）

２μｇの各ヒト胎児組織由来の総ＲＮＡ（総ＲＮＡを、Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．、Ｃａｔ．＃１５５９３－０３１のＴｏｔａｌ　ＲＮＡ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔによって精製した）。２μｇの総ＲＮＡおよび１μｌ（１μｇ）のランダムプライマーを含む反応混合物。容量を、水で１２μｌに調整し、７０℃で１０分間熱し、すぐに氷で冷やした。次いで４μｌの５×Ｆｉｒｓｔ　Ｓｔａｎｄ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＲＬ）、２μｌの０．１Ｍ　ＤＴＴ（ＢＲＬ）、および１μｌの１０ｍＭ　ｄＮＴＰ　Ｍｉｘ（ＢＲＬ）を加え、そしてこの溶液を十分混合し、そして２分間暖めて３７℃にした。１μｌのＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＲＴ（ＢＲＬ）を加え、そしてこの溶液を、３７℃で１時間インキュベートした。

【０３４６】

次いで、反応チューブを氷上に置いて反応を停止させた。このようにして産生されたｃＤＮＡを、ＰＣＲ分析においてテンプレートとして用いた。

【０３４７】
（相対的な発現レベルの評価）
ＲＮＡ濃度およびｃＤＮＡ転換効率における相違を規格化するために、コントロールＰＣＲを、グリセルアルデヒド－３－ホスフェートデヒドロゲナーゼ（Ｇ３ＰＤＨ）（この遺伝子は、全ての組織でほぼ同レベルで発現されると考えられている）に対するプライマーを用いて各ｃＤＮＡに対して行った。この反応産物を、４％アガロースゲルで分析し、そしてコントロールバンドの相対的な強度を評価した。次いでｃＤＮＡサンプルを、コントロールバンドの強度に基いて希釈し、すべてのサンプルを、等しい強度のＧ３ＰＤＨコントロールバンドを生成するような濃度に調整した。ＯＰＧ様転写についての発現分析を、これらの濃度規格化サンプルを用いて行った。

【０３４８】
（Ｇ３ＰＤＨコントロールＰＣＲ）
テンプレート：１μｌのｃＤＮＡ（濃度調整前）
プライマー：
５’プライマー：５’－ＴＣＣＡＣＣＡＣＣＣＴＧＴＴＧＣＴＧＴＡＧ－３’（配列番号１９）
３’プライマー：５’－ＧＡＣＣＡＣＡＧＴＣＣＡＴＧＣＣＡＴＣＡＣＴ－３’（配列番号２０）
緩衝液／酵素：Ｒｅａｄｙ－Ｔｏ－Ｇｏ　ＰＣＲ　Ｂｅａｄｓ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．、Ｃａｔ．＃２７－９５５３０）
サイクルプロトコル：
９５℃　６０秒；
９２℃　３０秒、５５℃　４５秒、７２℃　６０秒、２５サイクル；
７２℃　５分。

【０３４９】
（ＯＰＧ様転写の相対的な発現レベル）
テンプレート：１μｌのｃＤＮＡ（上記のように濃度調節した）
プライマー：
（２３７４－５１）　５’－ＣＣＣＣＡＧＧＣＡＣＣＴＴＣＴＣＡＧＣＴＧＣ－３’（配列番号９）
（２３７４－５３）　５’－ＣＣＣＡＧＧＣＣＡＧＣＡＧＴＣＴＣＣＡＣＡＧ－３’（配列番号１３）
緩衝液／酵素：Ｒｅａｄｙ－Ｔｏ－Ｇｏ　ＰＣＲ　Ｂｅａｄｓ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．、Ｃａｔ．＃２７－９５５３０）
サイクルプロトコル：
９５℃　３０秒；
９４℃　５秒、７２℃　４分、５サイクル；
９４℃　５秒、７０℃　４分、５サイクル；
９４℃　５秒、６８℃　２分、２５サイクル；
７２℃　３分。

【０３５０】
生成物は、４％アガロース／ＴＢＥゲル電気泳動により泳動した。次いで、ベースラインとして最も薄いバンドを用い（１×）、増幅されたＯＰＧ様転写物に対応するバンドの相対的な強度を評価した。評価された各バンドの相対的な強度は以下に示される。最も高い強度は、胎児組織、胎児子宮、および胎児皮膚で見出される。

【０３５１】
【表３】

#	組織	発現レベル
1	胎児胃	××××
2	胎児膵臓	××××
3	胎児膀胱	××××
4	胎児脳	××××
5	リンパ腫細胞株	××
6	胎児精巣	×××××
7	胎児胸腺	××××
8	胎児胎盤	××
9	胎児脊髄	××××
10	胎児心臓	×
11	胎児子宮	×××××
12	胎児腎臓	××××
13	胎児皮膚	×××××
14	胎児肝臓	××××
15	胎児肺	××××
16	胎児腸間膜	××
17	胎児骨	××

（実施例３：ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの産生）

（Ａ．細菌における発現）

ＰＣＲを用いて、ポリペプチドをコードするテンプレートＤＮＡ配列を増幅する。このＰＣＲには、この配列の５’および３’末端に対応するプライマーを用いる。増幅したＤＮＡ産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。ＰＣＲ産物をゲル精製し、そして標準的組み換えＤＮＡ方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。ｌｕｘプロモーターおよびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含むｐＡＭＧ２１（ＡＴＣＣ番号９８１１３）のような代表的ベクターを、挿入したＤＮＡの方向性クローニングのために、ＢａｍＨＩおよびＮｄｅＩを用いて消化する。連結した混合物を、エレクトロポレーションによってＥ．ｃｏｌｉ宿主株中に形質転換し、そして形質転換体をカナマイシン耐性について選択する。選択したコロニー由来のプラスミドＤＮＡを、単離し、そしてＤＮＡ配列決定に供してインサート（挿入物）の存在を確認する。

【０３５２】

形質転換した宿主細胞を、誘導前に、３０ｇ／ｍＬカナマイシンを含有する２×ＹＴ培地中で３０℃でインキュベートする。Ｎ－（３－オキソヘキサノイル）－ｄｌ－ホモセリンラクトンの最終濃度の３０ｎｇ／ｍＬまでの添加、それに続く３０℃かまたは３７℃での６時間のインキュベーションによって、遺伝子発現を誘導する。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの発現を、細菌ペレットの培養物、再懸濁物および溶解物の遠心分離、ならびに、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価する。

【０３５３】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを含有する封入体を、以下の通り精製する。細菌細胞を遠心分離によってペレットにし、そして水に再懸濁する。この細胞懸濁液を超音波処理によって溶解し、そして１９５，０００×ｇでの５～１０分間の遠心分離によってペレット化する。上清を廃棄し、そしてペレットを洗浄してホモジナイザーに移す。このペレットを、均一に懸濁されるまで、５ｍＬのＰｅｒｃｏｌｌ溶液（７５％液体Ｐｅｒｃｏｌｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ）中でホモジナイズし、次いで希釈して２１，６００×ｇで３０分間遠心分離する。封入体を含む勾配画分を回収してプールする。単離した封入体をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析する。

【０３５４】
Ｅ．ｃｏｌｉが産生したＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに相当する、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル上の単一のバンドを、ゲルから切り出し、そしてＮ末端アミノ酸配列を、本質的にＭａｔｓｕｄａｉｒａら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：１０～３５（１９８７）に記載のように決定する。
【０３５５】
（Ｂ．哺乳動物細胞における発現）
ＰＣＲを用いて、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドをコードするテンプレートＤＮＡ配列を増幅する。このＰＣＲには、この配列の５’および３’末端に対応するプライマーを用いる。５‘および３’末端に対応するプライマー配列は上述される。増幅したＤＮＡ産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。ＰＣＲ産物をゲル精製し、そして標準的組み換えＤＮＡ方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス複製起点を含む代表的な発現ベクターであるｐＣＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を、２９３－ＥＢＮＡ－１（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス核抗原）細胞におけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様の発現のために用い得る。増幅およびゲル精製したＰＣＲ産物を、ｐＣＥＰ４ベクターに連結し、そしてリポフェクチンによって２９３－ＥＢＮＡ細胞中に導入する。トランスフェクトした細胞を、１００ｇ／ｍＬのハイグロマイシン中で選択し、そして得られた薬物耐性培養物をコンフルエンスになるまで増殖する。次いで、この細胞を無血清培地中で７２時間培養する。馴化培地を取り出し、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド発現をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析する。
【０３５６】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド発現は、銀染色によって検出し得る。あるいは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを、タグペプチドに対する抗体を用いるウエスタンブロット分析によって検出可能である、エピトープタグ（例えば、ＩｇＧ定常ドメインまたはＦＬＡＧエピトープ）を有する融合タンパク質として生成する。
【０３５７】
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドを、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルから切り出し得る、またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様融合タンパク質を、エピトープタグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして本明細書に記載のようなＮ末端アミノ酸配列分析に供する。
【０３５８】
（実施例４：抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド抗体の生成）
ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドに対する抗体を、生物学的合成または化学的合成によって生成した、精製タンパク質またはＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ペプチドを用いて免疫することによって獲得し得る。抗体を生成するための適切な手順は、ＨｕｄｓｏｎおよびＢａｙ、Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（第二版、Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｉｌｉｃａｔｉｏｎ（１９８０））に記載の手順を含む。
【０３５９】
抗体生成のための１つの手順において、動物（代表的には、マウスまたはウサギ）に、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様抗原（例えば、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド）を注射し、そして、ハイブリドーマ産生のため、ＥＬＩＳＡによって決定した十分な血清力価を有する動物を、選択する。免疫した動物の脾臓を回収し、そして単一細胞懸濁液として調製し、これから脾臓細胞を回収する。脾臓細胞をマウスミエローマ細胞（例えば、Ｓｐ２／０－Ａｇ１４細胞；ＡＴＣＣ ｎｏ．ＣＲＬ－１５８１）に融合し、ＤＭＥＭ（２００Ｕ／ｍＬペニシリン、２００ｇ／ｍＬ硫酸ストレプトマイシン、および４ｍＭグルタミン含有）中でまずインキュベートし、次いで、ＨＡＴ選択培地（ヒポキサンチン；アミノプテリン；チミジン）中でインキュベートする。選択後、組織培養上清をハイブリドーマを含む各融合ウェルから取り出し、そしてＥＬＩＳＡによって、抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様抗体産生について試験する。

【０３６０】
抗ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様を得るための別の手順もまた、使用し得る。この手順は例えば、ヒト抗体の生成のためのヒトＩｇ遺伝子座を保有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリー（例えば、抗体可変ドメインの変異誘発によって生成されるライブラリーなど）のスクリーニングである。
【０３６１】
（実施例５：哺乳動物細胞におけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様タンパク質の産生）
哺乳動物細胞において可溶性ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様タンパク質を産生するために、ヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの細胞外ドメイン（アミノ酸１～１６２）をコードするｃＤＮＡを、以下のオリゴプライマー対のセットを用いてＰＣＲ増幅した。
５’－ＣＣＡ　ＴＣＧ　ＡＴＧ　ＧＣＴ　ＧＡＧ　ＣＡＧ　ＣＡＧ　ＧＴＧ　ＴＧＧ　ＡＣＡ－３’（配列番号２１）
５’－ＴＧＧ　ＣＧＡ　ＴＧＡ　ＣＧＧ　ＴＧＡ　ＣＣＴ　ＧＧＧ　ＣＧＧ－３’　（配列番号２２）
ＰＣＲ反応を、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．８）、１０ｍＭ　ＫＣｌ、１０μＭ　$(NH_4)_2SO_4$、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００、１０μＭの各ｄＮＴＰ、１μＭの各プライマー、および１０ｎｇのＴＮＦｒ／ＯＰＧ　ｃＤＮＡテンプレート中に１ユニットのベントＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を含む５０μｌの容量で実行した。ＰＣＲ反応を、９８℃で３０秒、５５℃で３０秒、および７２℃で１分を合計５サイクル、９８℃で３０秒、６５℃で３０秒、および７２℃で１分を合計２５サイクルで行った。得られたＰＣＲフラグメントを、１％アガロースゲルを通す電気泳動で単離し、ＧｅｎｅＣｌｅａｎ手順（Ｂｉｏ　１０１、Ｉｎｃ．）により精製した。ＰＣＲフラグメントは、５’末端にＣｌａＩ制限部位、そして３’末端にＢｓｔＥＩＩ制限部位を作成している。次いで、ＣｌａＩ＋ＢｓｔＥＩＩで消化されたＰＣＲフラグメントを、改変されたｐＣＭＶｉ－ＦｃベクターのヒトｌｇＧ－γ１重鎖配列（Ｖａｓｓｅｒら（Ｓｃｉｅｃｅ　２８６、７３５～７４１頁、１９９９）により以前に記載された）の前に、インフレームにサブクローンした。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様細胞外ドメインとＩｇＧ　Ｆｃ領域との間の接点を橋渡しする、２つの無関係なアミノ酸（Ｖａｌ－Ｔｈｒ）をコードするリンカーを導入した。
【０３６２】
この構築物を、Ａｕｓｕｂｅｌら（Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１、９．１．１－９．１．３、１９９４）により記載されるようなリン酸カルシウム法により、２９３－Ｔ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトの２４時間後に、この細胞をＰＢＳで一度洗浄し、次いで無血清培地で７２時間培養した。この培養上清を回収した。培地に分泌されるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様－Ｆｃ融合タンパク質を、抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ｃａｔ　ｎｏ．３０９－０３５－００８）を用いたウェスタンブロット分析により検出し（図９）、そしてそれぞれ５６．６ｋＤ、４４．３ｋＤ、および４０．６ｋＤの分子量を有する３つの顕著なバンドが観察された。
【０３６３】
Ｆｃ融合タンパク質を、プロテインＡカラムクロマトグラフィー（Ｐｉｅｒｃｅ）を用い、製造者の推奨する手順にしたがって精製した。次いで、５０ｐｍｏｌの精製されたタンパク質を、本質的にはＭａｔｓｕｄａｉｒａら（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２、１０－３５、１９８７）に記載されるような自動エドマン分解により、Ｎ末端配列分析に供した。
【０３６４】
１０サイクルのアミノ酸配列決定の後、５６．６ｋＤバンドは、配列が、NH_2－ＳＴ（Ｔ）ＬＷＱＣＰＰＧＥＥ－CO_2H（１．４ｐｍｏｌ）（配列番号２３）であった。３回目のサイクルで、Ｔｈｒは、タンパク質の一次構造から予想されるように検出されず、Ｏ連鎖糖の可能性を示した。結果は、このタンパク質が、Ｔｈｒ２５で切断されていること

を示す。４４．３ｋＤのバンド（１４．６ｐｍｏｌ）および４０．６ｋＤのバンド（２４．７ｐｍｏｌ）は、両方とも配列が、NH_2－ＧＶＥＶＡＡＧＡＳＳＧＧＥＴ－CO_2H（配列番号２４）であった；このタンパク質は、Ａｒｇ１３０で切断されていることを示す。これらの２つのバンド間のサイズにおける差異は、おそらくＡｒｇ１４９の異なったＮ連鎖グリコシル化に起因している。４０．６ｋＤバンドおよび４４．３ｋＤのバンドは、回収された物質の約９７％を示す。Ａｒｇ１３０における切断部位のより詳しい調査は、Ａｒｇ１２６（ＲＲＡＲＲ－ＧＶＥＶ．．．）（配列番号２５）で始まるコンセンサスフリン（ｆｕｒｉｎ）切断部位を開示する。

【０３６５】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプター細胞外ドメインの切断におけるフリンの役割を検索するために、２９３－Ｔ細胞を、Ｐｏｒｔｌａｎｄ変異（α１－ＰＤＸ）を含む強力なフリンインヒビターα１－アンチトリプシンの同時トランスフェクションを用いてかまたは用いずに、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃで、一過的にトランスフェクトした（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．；２４８８７－９１．１９９３）。手短にいうと、7×10^6　２９３－Ｔ細胞を、上記のトランスフェクションの$CaOPO_4$方法を使用して、２０μｇのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃ単独または１５μｇのＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃおよび５μｇのα１－ＰＤＸで一過的にトランスフェクトした。馴化培地を回収し、そして、上記のようにウエスタンブロット分析に供した。α１－ＰＤＸとの同時トランスフェクションは、フリン切断を完全に排除し、図９（左のパネル）に示されるようにＳｅｒ２６で始まる１００％の回収された物質を得た。

【０３６６】

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプターの可溶性細胞外ドメインの遊離におけるフリン切断の役割をさらに確かめるために、ＯＰＧ由来のシグナルペプチドおよびインフレームのNH_2末端ＦＬＡＧエピトープタグを含むＴＮＦｒ／ＯＰＧ様セレプターの変形型を設計した（ＳＯ．ＦＬＡＧ－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプター）。ＳＯ．ＦＬＡＧ－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプター構築物は、ＯＰＧシグナルペプチド（アミノ酸１－２１）－リンカー（ＫＬＨ）－ＦＬＡＧエピトープ（ＭＤＹＫＤＤＤＤＫ；配列番号２６）－リンカー（ＫＬ）－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプター（アミノ酸２６－４３０）を含むタンパク質をコードする。再び、7×10^6 ２９３－Ｔ細胞をＳＯ．ＦＬＡＧ－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプター単独でトランスフェクトするかまたはα１－ＰＤＸで同時トランスフェクトした。トランスフェクションの２４時間後、細胞を７２時間無血清培地でインキュベートした。馴化培地を回収し、そして、抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体Ｍ２を使用して、免疫沈降／ウエスタンブロッティングによって分析した（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ　ＭＯ）。図９（左のパネル）に示されるようなＯＰＧ様レセプターの切断された可溶性細胞外ドメインに対応する、１７ＫＤａおよび１８ＫＤａの２つの別個のバンドを馴化培地で検出した。同様に、α１－ＰＤＸとの同時トランスフェクションは、馴化培地から回収されたＦＬＡＧ－ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様細胞外ドメインの量を劇的に減少する。

【０３６７】

（実施例６）

（ＷＥＨＩ－３細胞に対するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃ結合の検出）

ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃと種々の細胞株との結合活性を以前に記載されるようにＦＡＣＳ分析によって試験した（Ｇｏｏｄｗｉｎら、Ｃｅｌｌ，７３，４４７－４５６，１９９３）。手短に言うと、ＷＥＨＩ－３細胞をブロッキング目的のために２％ウサギ血清および５％ヤギ血清で充填したＰＢＳ中で、４℃で３０分間インキュベートした。引き続き、細胞を１μｇ／ｍｌ　ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃ融合タンパク質またはヒトＩｇＧと共にインキュベートした。次いで、細胞を１：２００の希釈度で、ヒトＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）のＦｃドメインに特異的なビオチン化抗体と共に４℃で３０分間染色し、その後、１：５０の希釈度でストレプトアビジンフィコエリトリン（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）と３０分間インキュベートした。次いで、細胞をＢｅｃｔｏｎ　Ｄ

ｉｃｋｅｎｓｏｎ ＦＡＣＳ Ｓｃａｎを使用するＦＡＣＳ分析に供した。ＴＡＪ．ＦＣおよびＥ１２７．ＦＣをコントロールとして使用された非特異的融合タンパク質であり、任意の特異的結合を生じなかった。この分析は、ＷＥＨＩ－３細胞、骨髄－単球細胞株がＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃ融合タンパク質に特異的に結合し、ＯＰＧ様レセプターについての推定リガンドの膜結合形態の存在を示した（図１０を参照のこと）。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃ融合タンパク質の結合は、Ｎ末端ＦＬＡＧ標識ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様細胞外ドメインを含む馴化培地とのプレインキュベーションによって部分的にブロックされた。

【０３６８】

（実施例７）

（ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプターｍＲＮＡ組織発現のノーザンブロット分析）

ノーザンブロット分析を行なって、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプター転写物が発現される組織を同定した。ヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプターｃＤＮＡをＥｃｏＲＶおよびＸｈｏＩを用いて３７℃で３時間消化することによって、ノーザンブロット分析における使用のためのプローブを作製し、０．８％アガロースゲル上で制限消化物を電気泳動して、フラグメントを分離する。およそ４３４塩基対のＥＣＯＲＶ－ＸｈｏＩフラグメント（ｃＤＮＡのヌクレオチド－１８０からヌクレオチド＋２５４まで伸長する）を単離して、そして、ＱｉａＱｕｉｃｋ（登録商標）ゲル精製系（Ｑｉａｇｅｎ，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ）を使用してゲル精製した。単離されたゲル精製フラグメントを１％アガロースゲル上の推定によって定量した。このフラグメントの約２５ｎｇを５分間煮沸することによって変成し、次いで、２分間氷上で急冷した。次いで、フラグメントを、製造業者のプロトコルに従って、Ｈｉｇｈ Ｐｒｉｍｅ ＤＮＡ ｌａｂｅｌｉｎｇ ｋｉｔ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｈｅｉｍ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を使用して、α－^{32}Ｐ－ｄＣＴＰを用いて放射線標識した。ヒト複数組織のノーザンブロットを購入し（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）、そして、約６５℃で約１時間、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｅｘｐｒｅｓｓ^{TM}ハイブリダイゼーション緩衝液中で、まずプレハイブリダイズした。プレハイブリダイゼーション後、標識されたプローブを約５分間煮沸することによって変成し、次いで氷上で２分間急冷し、そして、ノーザンブロットを含むハイブリダイゼーション緩衝液に添加した。ブロットを、約６５℃で約２時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、ブロットを室温で３０分間、２×ＳＳＣ中で洗浄し、その後、約６０℃で３０分間、０．１％ＳＤＳを含む０．２×ＳＳＣ中で３回連続して洗浄した。ブロットを簡単に乾燥し、そして、６日間イメージアナライザースクリーンに露光した。結果を図１１に示す。ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプターｍＲＮＡは、主に、末梢血液白血球、脾臓、精巣および骨格筋において検出された。

【図面の簡単な説明】

【図１】

図１は、配列番号１であり、そしてヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子のｃＤＮＡ配列を示す。

【図２】

図２は、配列番号３であり、そしてマウスＴＮＦｒ／ＯＰＧ様核酸分子のｃＤＮＡ配列を示す。

【図３】

図３は、配列番号２であり、そしてヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。この図では、推定リーダー配列をボールド体で示し、そして推定膜貫通領域に下線を付す。

【図４】

図４は、配列番号４であり、そしてマウスＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。この図では、推定リーダー配列をボールド体で示し、そして推定膜貫通領域に下線を付す。

【図５】

図５は、ｃＤＮＡの重複（配列番号１のＣＤＲ）およびヒトＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプ

チドの推定アミノ酸配列（配列番号２）を示す。
【図６】
図６は、ｃＤＮＡの重複（配列番号３のＣＤＲ）およびマウスＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号４）を示す。
【図７】
図７は、ヒトゲノムデータベースの相同性に基づくＢＬＡＳＴ検索を通して得られた５４３ヌクレオチドのＤＮＡ配列（配列番号５）を示す。この図では、推定スプライシングドナー（ＧＴａ）およびアクセプター（ｃＡＧ）配列に下線を付す。このフラグメントの推定アミノ酸配列（配列番号６）もまた示す。
【図８】
図８は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ポリペプチド（配列番号７）とヒトオステオプロテジェリン（ｏｓｔｅｏｐｒｏｔｏｇｅｒｉｎ）（ＯＰＧ；配列番号８）のアミノ酸配列比較を示す。配列番号７は、配列番号２のアミノ酸４１～９６を表す。
【図９】
図９は、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃ融合タンパク質のウェスタンブロット分析を示し、これにより、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様融合タンパク質が、フリン（ｆｕｒｉｎ）によって切断されることが決定された（左側パネル）。右側パネルは、ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様Ｆｃ融合タンパク質を過剰発現する２９３－Ｔ細胞の馴化培地由来のＮ末端Ｆｌａｇタグを含む、全長ＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプターの免疫沈降を示す。
【図１０】
図１０は、２０個の細胞株において実施されたフローサイトメトリー研究を示す。この分析によって、Ｗｅｈｉ－３細胞に結合するＴＮＦｒ／ＯＰＧ様レセプターの細胞外ドメインが決定された。
【図１１】
図１１は、種々の組織におけるＴＮＦｒ／ＯＰＧ様ｍＲＮＡの発現を検出する、ノーザンブロット分析を示す。

【図１】

Figure 1

ヒトTNFr/OPG様核酸分子のcDNA配列

(SEQ ID NO. 1)

```
   1  CGGGACCTTC AGATATCCCC TCCCAGCCGA GGGGGCTTCC ATCTAACTGT
  51  TTTTTTGGTC ACGGTTCCAG GGCCGTTTTA GACAGTGGAG GCCTTGTGGG
 101  GCAGGGTGTG AGGGGTGCTG AGCAGCAGGT GTGGACATGT GTGTGCACCA
 151  GGCCTTTCTA CCTGACCGGG CCGGCGACCA CCAGGGGCCT GAGGATGAAG
 201  CCAAGTCTGC TGTGCCGGCC CCTGTCCTGC TTCCTTATGC TGCTGCCCTG
 251  GCCTCTCGCC ACCCTGACAT CAACAACCCT TTGGCAGTGC CCACCTGGGG
 301  AGGAGCCCGA CCTGGACCCA GGGCAGGGCA CATTATGCAG GCCCTGCCCC
 351  CCAGGCACCT TCTCAGCTGC ATGGGGCTCC AGCCCATGCC AGCCCCATGC
 401  CCGTTGCAGC CTTTGGAGGA GGCTGGAGGC CCAGGTGGGC ATGGCAACTC
 451  GAGATACACT CTGTGGAGAC TGCTGGCCTG GGTGGTTTGG GCCTTGGGGG
 501  GTTCCCCGCG TTCCATGTCA ACCATGTTCC TGGGCACCTC TGGGTACTCA
 551  TGGCTGTGAT GAGTGGGGGC GGCGGCCCCG ACGTGGCGTG GAGGTGGCAG
 601  CAGGGGCCAG CAGCGGTGGT GAGACACGGC AGCCTGGGAA CGGCACCCGG
                                                  C
 651  GCAGGTGGCC CAGAGGAGAC AGCCGCCCAG TACGCGGTCA TCGCCATCGT
 701  CCCTGTCTTC TGCCTCATGG GGCTGTTGGG CATCCTGGTG TGCAACCTCC
 751  TCAAGCGGAA GGGCTACCAC TGCACGGCGC ACAAGGAGGT CGGGCCCGGC
 801  CCTGGAGGTG GAGGCAGTGG AATCAACCCT GCCTACCGGA CTGAGGATGC
 851  CAATGAGGAC ACCATTGGGG TCCTGGTGCG CTTGATCACA GAGAAGAAAG
 901  AGAATGCTGC GGCCCTGGAG GAGCTGCTGA AAGAGTACCA CAGCAAACAG
 951  CTGGTGCAGA CGAGCCACAG GCCTGTGTCC AAGCTGCCGC CAGCGCCCCC
1001  GAACGTGCCA CACATCTGCC CGCACCGCCA CCATCTCCAC ACCGTGCAGG
```

Figure 1 (続き)

```
1051  GCCTGGCCTC GCTCTCTGGC CCCTGCTGCT CCCGCTGTAG CCAGAAGAAG
1101  TGGCCCGAGG TGCTGCTGTC CCCTGAGGCT GTAGCCGCCA CTACTCCTGT
1151  TCCCAGCCTT CTGCCTAACC CGACCAGGGT TCCCAAGGCC GGGGCCAAGG
1201  CAGGGCGTCA GGGCGAGATC ACCATCTTGT CTGTGGGCAG GTTCCGCGTG
1251  GCTCGAATTC CTGAGCAGCG GACAAGTTCA ATGGTGTCTG AGGTGAAGAC
1301  CATCACGGAG GCTGGGCCCT CGTGGGGTGA TCTCCCTGAC TCCCCACAGC
1351  CTGGCCTCCC CCCTGAGCAG CAGGCCCTGC TAGGAAGTGG CGGAAGCCGT
1401  ACAAAGTGGC TGAAGCCCCC AGCAGAGAAC AAGGCCGAGG AGAACCGCTA
1451  TGTGGTCCGG CTAAGTGAGA GCAACCTGGT CATCTGAGGG GCGGTCTAGT
1501  CTAAGGACAC TGCGGCCCTG CCCTGGGAGG TTCCGAAGGC TTCCTGGAGG
1551  AGGTGGAGCT GCAGCTGGGA CTGTGAGGAC CGAGAAGCAA TGGCCCAGCA
1601  GACGAGACAG CAAAGACCAA GGCCTGGAGG TGGGAGCGTC TGCCCCAGTG
1651  AGGAGGCAGG TGGCCGGCGG GCACTGTGTA CAGGAGCAGG CTGAGCCCCG
1701  CCCCTGGCCC TGCTGCCATG TTGCTCCCCT GAAGGATGCC CCGACCCCCG
1751  TGCCTGCCCT GGCTGGATCC TAGGAGCCCA CGGGATTCTC TGTATCATCA
1801  GAGGCTGGGC TTGGCAGAGG GGAGGGGCCT GTGCCCGTCA CCCCTGGCCC
1851  CATTCCTTGG TAATTAGCCA CACCCTTGCC TCTGTACAGG GCCCTAGAGC
1901  AGATGTGCGT CCCCCTCCTC TTCCAGCAGG TCTATAAAGG GAAGGGGTAG
1951  CAGAAAGTCC TGGGCTAGGA GAGTGAGTCC CTGGGTTCTA ATCTTGGGCA
2001  CATCTGTGGC CATCGCTGGG TCCATTTTTC TGACTGTGAA GTAAGGAGAG
2051  ACGTCTCAGT ACCCAGGGCC TCTTCAGCTC TTTGTAGGTT CTGGGCTGGG
2101  TTGTGGGGGA CTGGGGAGCT GGGCTCTACC ATCCCTCCCA TTAGTAGCTT
2151  TATCCAGCCC CGTTTTTGCT GCTTCCAGGG CCTCTGCCTT CAAGGCCCCC
2201  ATGGGGCTGT CCATCCATGG CTCTGCCTAC GGAAGGGGCT TAATGCATGT
```

Figure 1 (続き)

```
2251  GCCTGCCCCT CCCCCAGCTG TTTTTAATGA AACTGAAAAA ATAGACTTGA
2301  TCCCGGCAGG ACTGTGATAC AGAGCCCTAG CCTGCCCAGC CAGCCCCAAG
2351  ATCTCAGGAG CTTTAGGGAG AAGACTTGGT GGGGCTGGAG CACACCTTGG
2401  GCCTCAGTGG TTTCTGTGTC CCTGTGGTGC CAGTGCTTCT GGGCAGTGCA
2451  GGCGGCTGCC AGGCCCAGCC CTGACTTCCA CTCTGGCTCA GCAACCTGGT
2501  TATTTATGTG GGGCCGTGCA GGCATGGGCC CACTGCCTGT CCATCCTGTT
2551  TCTCTTATTT ATTGAAACTC ACCATTGCCC TATCCTTGTC TCTCCACCCC
2601  CTTCCATGTG TTGAATAATA AAAGGTGGGA AAGTGCTG
```

【図２】

Figure 2

マウスTNFr/OPG様核酸分子のcDNA配列

(SEQ ID NO. 3)

```
   1  CAGGCTGCGC GGCCGGCCCC GAGCGCTCGC CTAGCGGGGC CCCGGCGCCG
  51  CGTCGGACGC TGAGCGAAGC TGGTGCTGCG GGCCAGGTCA ATGTCACTCC
 101  AGGGCCTGAT GATGAAGCGG ACCTTGCTGT GCTGGCCCCT GTCTTGCCTC
 151  TTTGTGCTGC TGCCCTGGCC TCTGGCCACT CCAACACCAA TAACTCCTTG
 201  GCTGTGTCCA CCTGGCAAAG AGCCTGACCC AGATCCAGGA CAGGGCACAT
 251  TATGCAGAAC TTGCCCCCCA GGAACCTTTT CAGCCTCATG GAACTCCTAT
 301  CCATGCCAGC CTCATTACCG ATGCAGCCTT CAAAAGAGGC TGGAGGCCCA
 351  GGCTGGCACA GCAACTCATG ATACAATGTG TGGAGACTGC CAGCATGGGT
 401  GGTTTGGGCC ACAGGGAGTT CCTCATGTTC CGTGTCAGCC ATGTTCCAAG
 451  GCACCTCCAA GTACTGGTGG CTGTGATGAG TCAGGGCGGC GGGGCCGGCG
 501  TGGCGTCGAA GTGGCAGCAG GTACCAGTAG CAACGGTGAA CCTCGGCAGC
 551  CCGGGAATGG CACTCGGGCA GGCGGTCCTG AGGAGACGGC TGCCCAGTAT
 601  GCAGTGATTG CCATCGTTCC TGTCTTTTGT CTCATGGGGC TTCTGGGCAT
 651  CCTGGTGTGC AACCTGCTCA AGCGGAAGGG CTACCATTGC ACAGCCCAAA
 701  AGGAAGTTGG GCCCAGCCCT GGTGGAGGAG GCAGCGGGAT TAATCCTGCC
 751  TATAGGACTG AAGATGCCAA CGAGGACACC ATTGGAGTCC TGGTGCGCCT
 801  GATCACAGAG AAGAAAGAGA ATGCAGCGGC CCTGGAGGAG CTGTTGAAAG
 851  AATATCACAG CAAACAGCTG GTACAGACAA GTCACAGGCC TGTACCCAGG
 901  CTGCTGCCGG CCTCACCCAG CATACCCCAC ATCTGCCGC ATCACCACCA
 951  CCTGCACACT GTGCAGGGCC TGGCCTCACT CTCTGGCCCC TGTTGCTCCC
1001  GTTGTAGCCA GAAGTGGCCA GAGGTGCTGC TGTCTCCTGA GGCAGCAGCT
1051  GCCACCACTC CTGCTCCCAC CCTTCTGCCT ACTGCATCCA GGGCTCCCAA
```

Figure 2 (続き)

```
1101  GGCTAGTGCC AAGCCAGGAC GTCAGGGCGA GATTACCATC TTGTCTGTGG
1151  GCAGGTTCCG TGTGGCTCGT ATTCCTGAGC AGCGGACCAG TTCATTGTTA
1201  TCTGAGGTGA AGACCATCAC GGAGGCTGGG CCTTCAGAGG GTGATCTCCC
1251  TGACTCCCCA CAGCCTGGTT TTCCCCCCGA GCAGCGGGCA CTGCTGGGAA
1301  GTGGTGGGAG CCATACTAAG TGGTTGAAGC CCCCAGCAGA GAACAAAGCT
1351  GAGGAGAACC GCTATGTGGT CCGGCTAAGT GAAAGCAACC TGGTCATCTG
1401  ATGGGCTGTC TAGAATTAGA CACTCTGCCC TGTCCTGGGA GGTTCTGAAG
1451  GCTTCCTGCA GGAGGGAGAG CTGCAGCTGG GACTGAGGAC CAAGATGCAA
1501  AGGCCAAGTC CTGGAGGTGG GACCGTCCGC CCCACTGAGG AGGCAGCCTG
1551  CGGCACAGCA CGTGAGCAGG AGATCAAGAG CCCACCCTAT CCCTGCAGTC
1601  CCGGTTACTT CCATGCAGGG TGCTGTAACC CTGTGCCTGC CCTGAACACA
1651  TCATAGGAGC CCTCTGTCCC TTAGAGGTCT GGTTTGGTGG AGGAGTGGTA
1701  TCTGTACCTG GCCCCAAGCT TGTGCCTTGG GAACTAGCCA CTCTTGCCCA
1751  TGTCCTGGAC CCTGGATGTG ACTCCCTCTC TTCTGGCAGG CCCTATAGAG
1801  GGAAGGGGTA GCAAAGAGCC CTGTACTGGT GGCAGAGTAC CTGGGTTCCA
1851  ATCCTGGGCT TATCCCTAGG TACGTAGGGG AGGAGAACTC AGTTCCCAGG
1901  ACCTCTCCAG CTCTTTGCAG ATTCTGGGCT GAGTCCTGTT GGGGGGAGCT
1951  TGACTTTGCT ACCCTCCCAT TAGTAGCTTT ATCTGGCCTG TTTTTGCTGC
2001  TTCCTGGGCC TTGGCCTTCA TGGCTCCCAT GGGACTGTCT ATTATGGTGA
2051  TGCCTTCAGA AGGGGTTTAA TGCATGTGCC TGCCCCTACC CTGCTATTTT
2101  TAATGAAACT GAAAAATGAC TTGACTTGGA CAGGGCTCTC TGGTGCAGAG
2151  CCTCAGTCCA CCCTGCTGCC CTCAAGCTCT GGAGCTGTGG GAAGAGGAGA
2201  CAGGCAGGCT AGGGAGTGCC TGTGGCCTGT GGTTTTCAAT GCCCCTGTGG
2251  TACAGTATCT GCCTGAGTTT TGGGTAGCAG GGGTGACTGC CAATCCAGCC
```

Figure 2 (続き)

```
2301  TGTCTTAGTC TCTGCTCTGG CTCAGTGCCT CGTTATTTAT GTGGGGCCGT
2351  GCAGGCGCGG GGCCCACTGC CCATCCCATT TCTTATTTAT TGAAACCTGC
2401  TGTTGCCCTG CCCCTACATC TCCAGCCCCA CACACTTGAG TAATAAAAGG
2451  TGGAAAATGT CAAAAAAAAA AAAAAAAGG
```

【図３】

Figure 3

ヒト TNFレ/OPG様ポリペプチドの推定アミノ酸配列

(SEQ ID NO: 2)

```
  1  MKPSLLCRPL SCFLMLLPWP LATLTSTTLW QCPPGEEPDL DPGQGTLCRP
 51  CPPGTFSAAW GSSPCQPHAR CSLWRRLEAQ VGMATRDTLC GDCWPGWFGP
101  WGVPRVPCQP CSWAPLGTHG CDEWGRRARR GVEVAAGASS GGETRQPGNG
151  TRAGGPEETA AQYAVIAIVP VFCLMGLLGI LVCNLLKRKG YHCTAHKEVG
201  PGPGGGGSGI NPAYRTEDAN EDTIGVLVRL ITEKKENAAA LSELLKEYHS
251  KQLVQTSHRP VSKLPPAPPN VPHICPHRHH LHTVQGLASL SGPCCSRCSQ
301  KKWPEVLLSP EAVAATTPVP SLLPNPTRVP KAGAKAGRQG EITILSVGRF
351  RVARIPEQRT SSMVSEVKTI TEAGPSWGDL PDSPQPGLPP EQQALLGSGG
401  SRTKWLKPPA ENKAEENRYV VRLSESNLVI *
```

【図４】

Figure 4

マウス TNFレ/OPG様ポリペプチドの推定アミノ酸配列

(SEQ ID NO:4)

```
  1  MSLQGLMMKR TLLCWPLSCL FVLLPWPLAT PTPITPWLCP PGKEPDPDPG
 51  QGTLCRTCPP GTFSASWNSY PCQPHYRCSL QKRLEAQAGT ATHDTMCGDC
101  QHGWFGPQGV PHVPCQPCSK APPSTGGCDE SGRRGRRGVE VAAGTSSNGE
151  PRQPGNGTRA GGPEETAAQY AVIAIVFVFC LMGLLGILVC NLLKRKGYHC
201  TAQKEVGPSP GGGGSGINPA YRTEDANEDT IGVLVRLITE KKENAAALEE
251  LLKEYHSKQL VQTSHRPVPR LLPASPSIPH ICPHHHHLHT VQGLASLSGP
301  CCSRCSQKWP EVLLSPEAAA ATTPAPTLLP TASRAPKASA KPGRQGEITI
351  LSVGRFRVAR IPEQRTSSLL SEVKTITEAG PSEGDLPDSP QPGFPPEQRA
401  LLGSGGSHTK WLKPPAENKA EENRYVVRLS ESNLVI*
```

【図５】

Figure 5

ヒト TNFγ/OPG様 cDNA と推定アミノ酸配列

(SEQ ID NO: 3 および SEQ ID NO: 2)

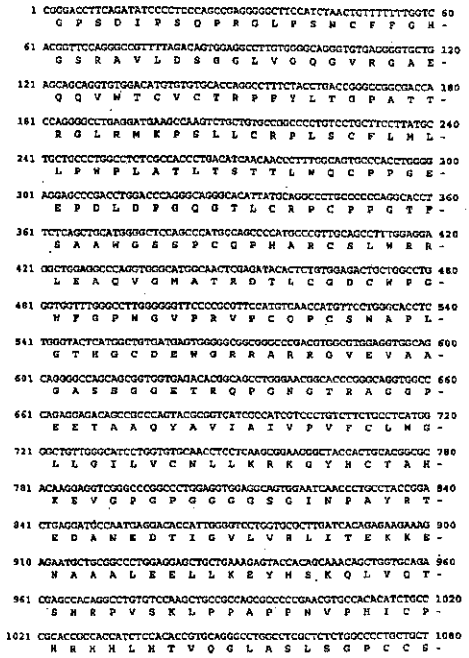


Figure 5 (続き)

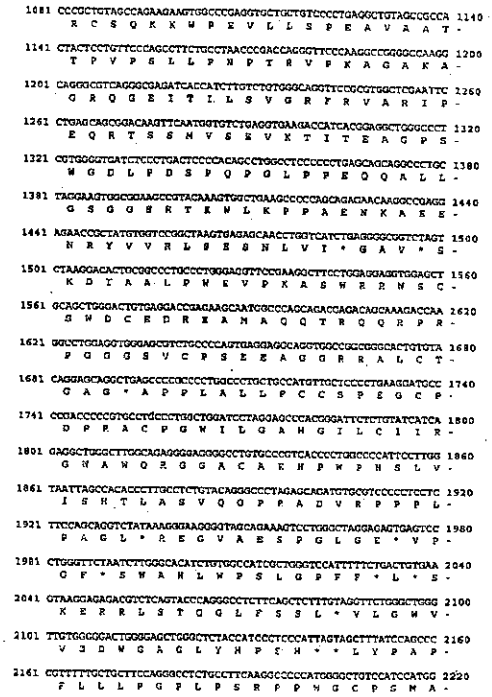
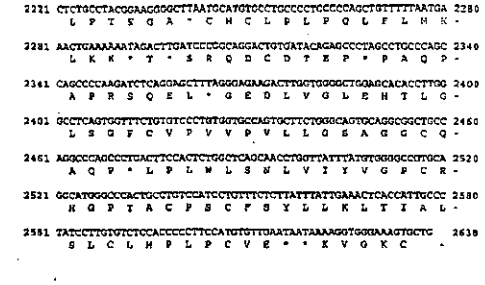


Figure 5 (続き)



【図６】

Figure 6

マウス TNFγ/OPG様 cDNA と推定アミノ酸配列

(SEQ ID NO: 3 および SEQ ID NO: 4)

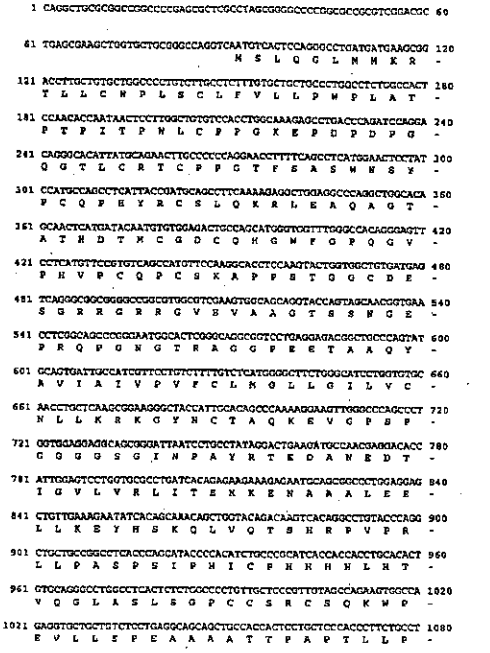


Figure 6 (続き)

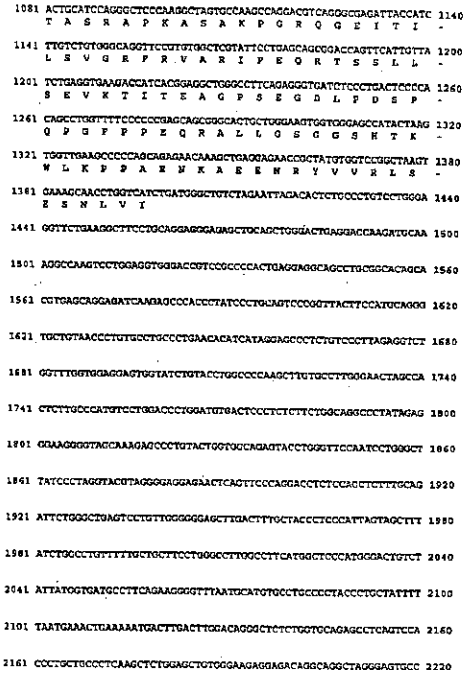
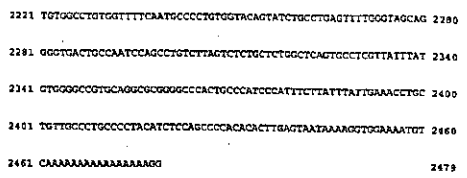
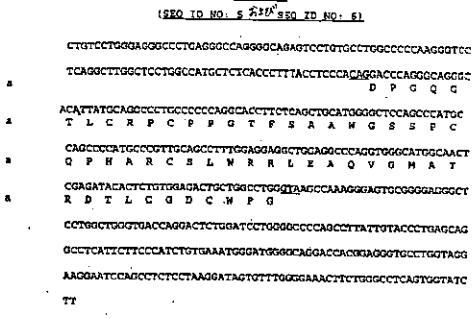


Figure 6 (続き)



【図７】

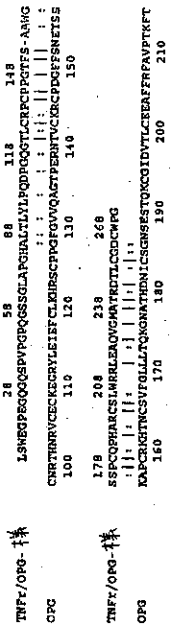
Figure 7
(SEQ ID NO: 5 および SEQ ID NO: 6)



【図８】

FIGURE 8

ヒトオステオプロテジェリン(Osteoprotegerin)(OPG)とTNFレセプターファミリーメンバーの
アミノ末端領域の比較
(SEQ ID NO: 7 および SEQ ID NO: 8)



【図９】

Figure 9

【図１０】

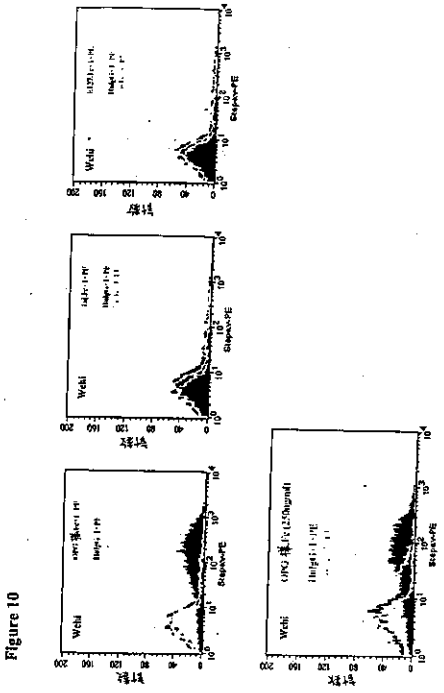


Figure 10

【図１１】

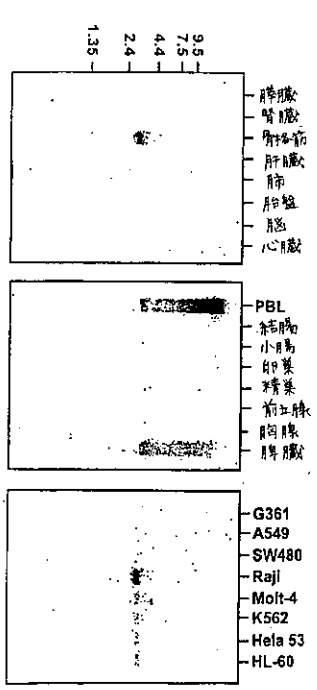


Figure 11

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
21 June 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/44472 A1

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, 15/62, 5/10, C07K 14/705, 16/28, G01N 33/50, 33/566, C12Q 1/68, A01K 67/027, A61K 31/70, 38/17, 39/395

(21) International Application Number: PCT/US00/33858

(22) International Filing Date:
14 December 2000 (14.12.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/172,306 16 December 1999 (16.12.1999) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): AMGEN, INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): JING, Shuqian [US/US]; 3254 Bordero Lane, Thousand Oaks, CA 91362 (US). WELCHER, Andrew, A. [US/US]; 1175 Church Street, Ventura, CA 93001 (US). FOX, Gary, M. [US/US]; 35 West Kelly Road, Newbury Park, CA 91320 (US). SHU, Jinyan [US/US]; 689 McCloud Avenue, Apt. 314, Thousand Oaks, CA 91360 (US). BOEDIGHEIMER, Michael, J. [US/US]; 3192 Holloway Court, Newbury Park, CA 91230 (US). BENNETT, Brian, D. [US/US]; 2706 Regina Avenue, Thousand Oaks, CA 91360 (US).

(74) Agent: CLOUGH, David, W.; Marshall, O'Toole, Gerstein, Murray & Borun, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606-6402 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
With international search report.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/44472 A1

(54) Title: TNFR/OPG-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides novel TNFr/OPG-like polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides vectors, host cells, antibodies, and methods for producing TNFr/OPG like polypeptides. Also provided are methods for the diagnosis and treatment of diseases with TNFr/OPG like polypeptides.

TNFr/OPG-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

Related Application

The present application claims priority under 35 U.S.C. §119 provisional patent application Serial No.60/172,306 filed December 16, 1999.

Field of the Invention

The present invention relates to novel tumor necrosis factor receptor/osteoprotegerin-like (TNFr/OPG-like) polypeptides, and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also relates to vectors, host cells, selective binding agents, such as antibodies, and methods for producing TNFr/OPG-like polypeptides. Also provided for are methods for the diagnosis and treatment of diseases associated with TNFr/OPG-like polypeptides.

Background of the Invention

Technical advances in the identification, cloning, expression and manipulation of nucleic acid molecules have greatly accelerated the discovery of novel therapeutics based upon deciphering of the human genome. Rapid nucleic acid sequencing techniques can now generate sequence information at unprecedented rates and, coupled with computational analyses, allow the assembly of overlapping sequences into entire genomes and the identification of polypeptide-encoding regions. A comparison of a predicted amino acid sequence against a database compilation of known amino acid sequences can allow one to determine the extent of homology to previously identified sequences and/or structural landmarks. The cloning and expression of a polypeptide-encoding region of a nucleic acid molecule provides a polypeptide product for

structural and functional analyses. The manipulation of nucleic acid molecules and encoded polypeptides to create variants and derivatives thereof may confer advantageous properties on a product for use as a therapeutic.

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

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

Summary of the Invention

The present invention relates to novel TNFr/OPG-like nucleic acid molecules and encoded polypeptides, and uses thereof.

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

(a) the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NOS: 1 or 3;

(b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(c) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of (a) or (b), wherein the encoded polypeptide has an activity of

the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4; and

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

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

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 of SEQ ID NO: 4, wherein the polypeptide has an activity of the encoded polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 as determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm;

(b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NOS: 1 or 3, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(c) a nucleotide sequence of SEQ ID NOS: 1 OR 3, (a), or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that has a substitution and/or deletion of 1 to 430 amino acid residues set forth in SEQ ID NO: 1 or 1 to 436 amino acid residues of SEQ ID NO: 3 wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(e) a nucleotide sequence of SEQ ID NOS: 1 or 3 , or (a)-(d) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

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

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

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

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

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

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

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the

polypeptide has an activity of the encoded polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

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

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

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

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

(a) the mature amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 comprising a mature amino terminus at residue 1, and optionally further comprising an amino-terminal methionine;

(b) an amino acid sequence for an ortholog of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

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

(d) a fragment of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of either the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or at least one of (a)-(c) wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

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

(a) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(b) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(c) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4;

(d) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 which has a C- and/or N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4; and

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

Also provided are fusion polypeptides comprising the polypeptide sequences of (a)-(e) above of the preceding paragraphs.

The present invention also provides for an expression vector comprising the isolated nucleic acid molecules set forth herein, recombinant host cells comprising recombinant nucleic acid molecules set forth herein, and a method of producing a TNFr/OPG-like polypeptide comprising culturing the host cells and optionally isolating the polypeptide so produced. These expression vectors include baculovirus expression vectors which utilize insect cells for expression.

A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding a TNFr/OPG-like polypeptide is also encompassed by the invention. The TNFr/OPG-like nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that allows expression and increased levels of the TNFr/OPG-like polypeptide, which may include increased circulating levels. The transgenic non-human animal is preferably a mammal. Also provided is a transgenic non-human animal comprising a disruption in the nucleic acid molecule encoding a TNFr/OPG-like polypeptide, which will knock-out or significantly decrease expression of the TNFr/OPG-like polypeptide.

Also provided are derivatives of the TNFr/OPG like polypeptides of the present invention.

Analogs of TNFr/OPG-like are provided for in the present invention which result from conservative and non-conservative amino acids substitutions of the TNFr/OPG-like polypeptide of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. Such analogs include a TNFr/OPG-like polypeptide wherein the amino acid at position 42 of SEQ ID NO: 2 is selected from the group consisting of proline and glycine, the amino acid at position 51 of SEQ ID NO: 2 is selected from the group consisting of serine, threonine, asparagine, glutamine, the amino acid at

position 56 of SEQ ID NO: 2 is selected from the group consisting of phenylalanine, tryptophan, and tyrosine, the amino acid at position 68 of SEQ ID NO: 2 is selected from the group consisting of histadine, lysine, and arginine, the amino acid at position 71 of SEQ ID NO: 2 is selected from the group consisting of serine, cysteine, theonine, asparagine, glutamine, the amino acid at position 84 of SEQ ID NO: 2 is selected from the group consisting of alanine, methionine, valine, leucine, isoleucine and norleucine or the amino acid at position 87 of SEQ ID NO: 2 is selected from the group consisting of aspartic acid or glutamic acid.

Additionally provided are selective binding agents such as antibodies and peptides capable of specifically binding the TNFr/OPG-like polypeptides of the invention. Such antibodies, polypeptides, peptides and small molecules may be agonistic or antagonistic.

Pharmaceutical compositions comprising the nucleotides, polypeptides, or selective binding agents of the present invention and one or more pharmaceutically acceptable formulation agents are also encompassed by the invention. The pharmaceutical compositions are used to provide therapeutically effective amounts of the nucleotides or polypeptides of the present invention. The invention is also directed to methods of using the polypeptides, nucleic acid molecules, and selective binding agents. The invention also provides for devices to administer a TNFr/OPG-like polypeptide encapsulated in a membrane.

The TNFr/OPG-like polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may be used to treat, prevent, ameliorate, diagnose and/or detect diseases and disorders, including those recited herein. Expression analysis in biological, cellular or tissue samples suggests

that TNFr/OPG-like polypeptide may play a role in the diagnosis and/or treatment of the pathological conditions described herein. This expression can de detected with a diagnostic agent such as a TNFr/OPG-like polynucleotide.

The invention encompasses diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject caused by or resulting from abnormal levels of TNFr/OPG-like polypeptide comprising determining the presence or amount of expression of the TNFr/OPG-like polypeptide in a sample; and comparing the level of said polypeptide in a biological, tissue or cellular sample from either normal subjects or the subject at an earlier time, wherein susceptibility to a pathological condition is based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

The present invention also provides a method of assaying test molecules to identify a test molecule which binds to a TNFr/OPG-like polypeptide. The method comprises contacting a TNFr/OPG-like polypeptide with a test molecule and to determine the extent of binding of the test molecule to the polypeptide. The method further comprises determining whether such test molecules are agonists or antagonists of a TNFr/OPG-like polypeptide. The present invention further provides a method of testing the impact of molecules on the expression of TNFr/OPG-like polypeptide or on the activity of TNFr/OPG-like polypeptide.

The present invention provides for methods of identifying antagonists of TNFr/OPG-like biological activity comprising contacting a small molecule compound with TNFr/OPG polypeptides and measuring TNFr/OPG-like biological activity in the presence and absence of these small molecules. These small molecules can be a naturally occurring medicinal compound or derived from combinational chemical libraries. In addition, the present invention also encompasses methods which identify TNFr/OPG-like binding partners, such as cyclins.

These methods utilize a yeast two-hybrid approach comprising a bait construct consisting of a TNFr/OPG-like polynucleotide fused to GAL4 DNA binding domain. The bait construct is used to screen a cDNA library, wherein the library consists of nucleotide sequences fused to a GAL4 activation domain. Library sequences encoding TNFr/OPG-like interacting proteins can be identified by the transcriptional activation of reporter genes under the control of GAL4. See Guarente, Trend Gen., 9: 342-346 (1993); Bartel & Field, Meth. Enz., 254: 241-63 (1995).

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

In another aspect of the present invention, the TNFr/OPG-like polypeptides may be used for identifying binding partners thereof ("TNFr/OPG-like polypeptide binding partners"). Yeast two-hybrid screens have been extensively used to identify and clone binding partners and receptors for proteins. (Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9583, 1991) The isolation of a TNFr/OPG-like polypeptide binding partner(s) is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the TNFr/OPG-like polypeptide activity.

Such agonists and antagonists include soluble TNFr/OPG cofactors, anti-TNFr/OPG selective binding agents (such as TNFr/OPG-like antibodies and derivatives thereof), small molecules, peptides or derivatives thereof capable of

binding TNFr/OPG like polypeptides, or antisense oligonucleotides, any of which can be used for potentially treating one or more diseases or disorders, including those recited herein. These pathological conditions include, but are not limited to, osteoporosis, Paget's disease, osteomyelitis, hypercalcemia, osteopenia and osteonecrosis.

In certain embodiments, a TNFr/OPG-like polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule which interacts with TNFr/OPG-like polypeptide to regulate its activity.

Brief Description of the Figures

Figure 1 is SEQ ID NO: 1, and sets forth the cDNA sequence of the human TNFr/OPG-like nucleic acid molecule.

Figure 2 is SEQ ID NO: 3, and sets forth the cDNA sequence of the mouse TNFr/OPG-like nucleic acid molecule.

Figure 3 is SEQ ID NO: 2, and sets forth the amino acid sequence of the human TNFr/OPG-like polypeptide. In this figure, the predicted leader sequence is set forth in boldface, and the predicted transmembrane region is underlined.

Figure 4 is SEQ ID NO: 4, and sets forth the amino acid sequence of the mouse TNFr/OPG-like polypeptide. In this figure, the predicted leader sequence is set forth in boldface, and the predicted transmembrane region is underlined.

Figure 5 sets forth an overlap of the cDNA (CDR of SEQ ID NO: 1) and predicted amino acid sequence of the human TNFr/OPG-like polypeptide (SEQ ID NO: 2).

Figure 6 sets forth an overlap of the cDNA (CDR of SEQ ID NO: 3) and predicted amino acid sequence of the mouse TNFr/OPG-like polypeptide (SEQ ID NO: 4).

Figure 7 and sets forth the 543 nucleotide DNA fragment obtained through homology-based BLAST searches of a human genomic database (SEQ ID NO: 5). In this figure, the predicted splicing donor (GTa) and acceptor (cAG) sequences are underlined. The predicted aminpo acid sequence (SEQ ID NO: 6) of this fragment is also shown.

Figure 8 sets forth an amino acid sequence comparison of human osteoprotogerin (OPG; SEQ ID NO: 8) with TNFr/OPG-like polypeptide (SEQ ID NO: 7). SEQ ID NO: 7 represents amino acids 41 to 96 of SEQ ID NO: 2.

Figure 9 shows the Western blot analysis of the TNFr/OPG-like Fc fusion protein that determined the TNFr/OPG-like fusion protein is cleaved by furin (left panel). The right panel displays the immunoprecipitation of full length TNFr/OPG-like recptor containing a N-terminal Flag tag from the conditioned media of TNFr/OPG-like-Fc fusion protein overexpressing 293-T cells.

Figure 10 shows the flow cytometry studies performed on 20 cells lines. This analysis determined TNFr/OPG-like receptor extracellular domain binds to to WeHi-3 cells.

Figure 11 shows Northern blot analysis detecting expression of TNFr/OPG-like mRNA in various tissues.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described therein. All references cited in

this application are expressly incorporated by reference herein.

Definitions

The term "TNFr/OPG-like nucleic acid molecule" or "polynucleotide" refers to a nucleic acid molecule comprising or consisiting of a nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NOS: 1 or 3, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, a nucleotide sequence of a DNA insert in ATCC deposit no. PTA-1758 and nucleic acid molecules as defined herein. Related nucleic acid molecules include a nucleotide sequence that is at least about 70 percent identical to the nucleotide sequence as shown in either SEQ ID NOS: 1 or 3, or comprise or consist essentially of a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO 4. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in either SEQ ID NOS: 1 or 3, or the nucleotide sequences encode a polypeptide that is about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the polypeptide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

Related nucleic acid molecules also include fragments of the TNFr/OPG-like nucleic acid molecules which fragments contain at least about 10 contiguous nucleotides, or about 15, or about 20, or about 25, or about 50, or about 75, or about 100, or greater than about 100 contiguous nucleotides of a TNFr/OPG-like nucleic acid molecule of either SEQ ID NOS: 1 or 3. Related nucleic acid molecules also include fragments of the above TNFr/OPG-like nucleic acid molecules which encode a

polypeptide of at least about 25 amino acid residues, or about 50, or about 75, or about 100, or greater than about 100 amino acid residues of the TNFr/OPG-like polypeptide of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a substitution, modification, addition and/or a deletion of one or more amino acid residues compared to the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. In addition, related TNFr/OPG-like nucleic acid molecules include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of any of the TNFr/OPG-like nucleic acid molecules of either SEQ ID NOS: 1 or 3. In preferred embodiments, the related nucleic acid molecules comprise sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions with a complement of a molecule having a sequence as shown in either SEQ ID NOS: 1 or 3, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the sequence as shown in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid fragment encoding a polypeptide as defined herein. It is also understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of a TNFr/OPG-like nucleic acid molecule of either SEQ ID NOS: 1 or 3, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. The related encoded polypeptides possess at least one activity of the polypeptide depicted in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

The term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule of the invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of proteins, lipids, carbohydrates or other materials with which it is naturally found when total DNA is isolated from the source cells, (2) is

not linked to all or a portion of a polynucleotide to which the "isolated nucleic acid molecule" is linked in nature, (3) is operably linked to a polynucleotide which it is not linked to in nature, or (4) does not occur in nature as part of a larger polynucleotide sequence. Preferably, the isolated nucleic acid molecule of the present invention is substantially free from any other contaminating nucleic acid molecule(s) or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its use in polypeptide production or its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

A "nucleic acid sequence" or "nucleic acid molecule"refers to as used herein refers to a DNA or RNA sequence. The term encompasses molecules formed from any of the known base analogs of DNA and RNA such as, but not limited to 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N6-methyladenosine,aziridinyl-cytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxylmethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxy-methylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N6-iso-pentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethyl-guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminome-thyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5' -methoxycarbonyl-methyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil 5-oxyacetic acid, oxybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine.

The term "operably linked" is used herein to refer to an arrangement of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Thus, a flanking sequence operably linked to a coding sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

The term "naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

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

The term "TNFr/OPG-like splice variant" refers to a nucleic acid molecule, usually RNA, which is generated by alternative processing of intron sequences in an RNA transcript of TNFr/OPG-like polypeptide amino acid sequences as set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4.

The term "expression vector" refers to a vector which is suitable for use in a host cell and contains nucleic acid sequences which direct and/or control the expression of inserted heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

The term "host cell" is used to refer to a cell which has been transformed, or is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

The term "vector" is used to refer to any molecule (e.g., nucleic acid, plasmid, or virus) used to transfer coding information to a host cell.

The term "host cell"…..

The term "transformation" as used herein refers to a change in a cell's genetic characteristics, and a cell has been transformed when it has been modified to contain a new DNA. For example, a cell is transformed where it is genetically modified from its native state. Following transfection or transduction, the transforming DNA may recombine with that of the cell by physically integrating into a chromosome of the cell, may be maintained transiently as an episomal element without being replicated, or may replicate independently as a plasmid. A cell is considered to have been stably transformed when the DNA is replicated with the division of the cell.

The term "transfection" is used to refer to the uptake of foreign or exogenous DNA by a cell, and a cell has been "transfected" when the exogenous DNA has been introduced

inside the cell membrane. A number of transfection techniques are well known in the art and are disclosed herein. See, for example, Graham *et al.*, *Virology*, 52:456 (1973); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories (New York, 1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, 1986; and Chu *et al.*, *Gene*, 13:197 (1981). Such techniques can be used to introduce one or more exogenous DNA moieties into suitable host cells.

The term "transduction" is used to refer to the transfer of genes from one bacterium to another, usually by a phage. "Transduction" also refers to the acquisition and transfer of eukaryotic cellular sequences by retroviruses.

The term "host cell" is used to refer to a cell which has been transformed, or is capable of being transformed, by a vector bearing a selected gene of interest which is then expressed by the cell. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

The term "highly stringent conditions" refers to those conditions that are designed to permit hybridization of DNA strands whose sequences are highly complementary, and to exclude hybridization of significantly mismatched DNAs. Hybridization stringency is principally determined by temperature, ionic strength, and the concentration of denaturing agents such as formamide. Examples of "highly stringent conditions" for hybridization and washing are 0.015M sodium chloride, 0.0015M sodium citrate at 65-68°C or 0.015M sodium chloride, 0.0015M sodium citrate, and 50% formamide at 42°C. See Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989); Anderson *et al.*, Nucleic Acid

Hybridisation: a practical approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England).

More stringent conditions (such as higher temperature, lower ionic strength, higher formamide, or other denaturing agent) may also be used, however, the rate of hybridization will be affected. Other agents may be included in the hybridization and washing buffers for the purpose of reducing non-specific and/or background hybridization. Examples are 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinyl-pyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate, $NaDodSO_4$ or(SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or other non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4, however, at typical ionic strength conditions, the rate of hybridization is nearly independent of pH. See Anderson *et al.*, Nucleic Acid Hybridisation: a Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England).

Factors affecting the stability of a DNA duplex include base composition, length, and degree of base pair mismatch. Hybridization conditions can be adjusted by one skilled in the art in order to accommodate these variables and allow DNAs of different sequence relatedness to form hybrids. The melting temperature of a perfectly matched DNA duplex can be estimated by the following equation:

$$T_m(^\circ C) = 81.5 + 16.6(\log[Na+]) + 0.41(\%G+C) - 600/N - 0.72(\%formamide)$$

where N is the length of the duplex formed, [Na+] is the molar concentration of the sodium ion in the hybridization or washing solution, %G+C is the percentage of (guanine+cytosine)

bases in the hybrid. For imperfectly matched hybrids, the melting temperature is reduced by approximately 1°C for each 1% mismatch.

The term "moderately stringent conditions" refers to conditions under which a DNA duplex with a greater degree of base pair mismatching than could occur under "highly stringent conditions" is able to form. Examples of typical "moderately stringent conditions" are 0.015M sodium chloride, 0.0015M sodium citrate at 50-65°C or 0.015M sodium chloride, 0.0015M sodium citrate, and 20% formamide at 37-50°C. By way of example, a "moderately stringent" condition of 50°C in 0.015 M sodium ion will allow about a 21% mismatch.

It will be appreciated by those skilled in the art that there is no absolute distinction between "highly" and "moderately" stringent conditions. For example, at 0.015M sodium ion (no formamide), the melting temperature of perfectly matched long DNA is about 71°C. With a wash at 65°C (at the same ionic strength), this would allow for approximately a 6% mismatch. To capture more distantly related sequences, one skilled in the art can simply lower the temperature or raise the ionic strength.

A good estimate of the melting temperature in 1M NaCl* for oligonucleotide probes up to about 20nt is given by:

Tm = 2°C per A-T base pair + 4°C per G-C base pair

*The sodium ion concentration in 6X salt sodium citrate (SSC) is 1M. See Suggs *et al.*, Developmental Biology Using Purified Genes, p. 683, Brown and Fox (eds.) (1981).

High stringency washing conditions for oligonucleotides are usually at a temperature of 0-5°C below the Tm of the oligonucleotide in 6X SSC, 0.1% SDS.

The term "TNFr/OPG-like polypeptide" refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, and related polypeptides having a natural sequence or mutated sequence. Related polypeptides include: allelic variants; splice variants; fragments; derivatives; substitution, deletion, and insertion variants; fusion polypeptides; and orthologs of the TNFr/OPG-like polypeptides of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, and which possess at least one activity of the polypeptide depicted in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. TNFr/OPG-like polypeptides may be mature polypeptides, as defined herein, and may or may not have an amino terminal methionine residue, depending on the method by which they are prepared.

The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of polynucleotides, lipids, carbohydrates or other materials with which it is naturally found when isolated from the source cell, (2) is not linked (by covalent or noncovalent interaction) to all or a portion of a polypeptide to which the "isolated polypeptide" is linked in nature, (3) is operably linked (by covalent or noncovalent interaction) to a polypeptide with which it is not linked in nature, or (4) does not occur in nature. Preferably, the isolated polypeptide is substantially free from any other contaminating polypeptides or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

The term "TNFr/OPG-like polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises less than the full length amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. Such TNFr/OPG-like fragments can be 6 amino acids or more in length, and may arise, for example, from a truncation at the amino terminus (with or without a leader sequence), a truncation at the

carboxy terminus, and/or an internal deletion of one or more residues from the amino acid sequence. TNFr/OPG-like fragments may result from alternative RNA splicing or from *in vivo* protease activity. Membrane-bound forms of a TNFr/OPG-like polypeptide are also contemplated by the present invention. In preferred embodiments, truncations and/or deletions comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. The polypeptide fragments so produced will comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids. Such TNFr/OPG-like polypeptide fragments may optionally comprise an amino terminal methionine residue. It will be appreciated that such fragments can also be used, for example, to generate antibodies to TNFr/OPG-like polypeptides.

The term "TNFr/OPG-like polypeptide variants" refers to TNFr/OPG-like polypeptides which contain one or more amino acid sequence substitutions, deletions, and/or additions as compared to the TNFr/OPG-like polypeptide amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. Variants may be naturally occurring or artificially constructed. Such TNFr/OPG-like polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules encoding said variants, which have a DNA sequence that varies accordingly from the DNA sequences for wild type TNFr/OPG-like polypeptides as set forth in either SEQ ID NOS: 1 or 3. In preferred embodiments, the variants have form 1 to 3, or 1 to 5, or 1 to 10, or 1 to 15, or 1 to 20, or 1 to 25, or 1 to 50, or 1 to 75, or 1 to 100, or more than 100 amino acid substations, insertions, additions and/or deletions, wherein tehh substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

One skilled in the art will be able to determine suitable variants of the native TNFr/OPG-like polypeptide using well known techniques. For example, one may predict suitable areas of the molecule that may be changed without destroying biological activity. Also, one skilled in the art will realize that even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.

For example, when similar polypeptides with similar activities from the same species or from other species are known, one skilled in the art may compare the amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide to such similar polypeptides. With such a comparison, one can identify residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be appreciated that changes in areas of a TNFr/OPG-like polypeptide that are not conserved relative to such similar polypeptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of the TNFr/OPG-like like polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.

For predicting suitable areas of the molecule that may be changed without destroying activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important for activity. For example, when similar polypeptides with similar activities from the same species or from other species are known, one

skilled in the art may compare the amino acid sequence of TNFr/OPG-like polypeptide to such similar polypeptides. After making such a comparison, one skilled in the art can determine residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. One skilled in the art would know that changes in areas of the TNFr/OPG-like molecule that are not conserved would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of a TNFr/OPG-like polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions).

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues in similar polypeptides that are important for activity or structure. In view of such a comparison, one skilled in the art can predict the importance of amino acid residues in a TNFr/OPG-like polypeptide that correspond to amino acid residues that are important for activity or structure in similar polypeptides. One skilled in the art may opt for chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of TNFr/OPG-like polypeptides.

If available, one skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of that information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of TNFr/OPG-like polypeptide with respect to its three dimensional structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules.

TNFr/OPG-like polypeptide analogs of the invention can be determined by comparing the amino acid sequence of TNFr/OPG-like polypeptide with related family members. Exemplary TNFr/OPG-like polypeptide related family members include, but are not limited to, Osteoprotegerin (OPG), and the TNF receptor. This comparison can be accomplished by using a Pileup alignment (Wisconsin GCG Program Package) or an equivalent (overlapping) comparison with multiple family members within conserved and non-conserved regions.

As shown in Figure 8, the predicted amino acid sequence of human TNFr/OPG-like polypeptide (SEQ ID NO: 7; which represent amino acid 41 to 96 of SEQ ID NO: 2) is aligned with human OPG (SEQ ID NO: 8). Other TNFr/OPG-like polypeptide analogs can be determined using these or other methods known to those of skill in the art. These overlapping sequences provide guidance for conservative and non-conservative amino acids substitutions resulting in additional TNFr/OPG-like analogs. It will be appreciated that these amino acid substitutions can consist of naturally occurring or non-naturally occurring amino acids. For example, as depicted in Figure 8, alignment of the of related family members indicates potential TNFr/OPG analogs may have the Pro residue at position 42 of SEQ ID NO: 2 (position 37 on Fig. 8) substituted with a Gly residue, the Cys residue at position 51 of SEQ ID NO: 2 (position 46 on Fig. 8) substituted with a Ser, Thr, Asn or Glu residue and/or the Phe residue at position 56 of SEQ ID NO: 2 (position 51 on Fig. 8) substituted with a Trp, or Tyr residue. In addition, potential TNFr/OPG analogs may have the His residue at position 68 of SEQ ID NO: 2 (position 63 on Fig. 8) substituted with a Lys or Arg residue, the Ser residue at position 71 of SEQ ID NO: 2 (position 67 on Fig. 8) substituted with a Cys, Thr, Asn or Gln residue, the Ala residue at position 84 of SEQ ID NO: 2 (position 79 on Fig. 8)

substituted with a Met, Val, Leu, Ile or norleucine residue, and/or the Asp residue at position 87 of SEQ ID NO: 2 (position 83 on Fig. 8) substituted with a Glu residue.

Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each amino acid residue. The variants could be screened using activity assays described herein. Such variants could be used to gather information about suitable variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination with other mutations.

In making such changes of an equivalent nature, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of their hydrophobicity and charge characteristics, these are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is understood in the art. Kyte *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 157:105-131 (1982). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score and still retain a similar biological activity.

In making changes based upon the hydropathic index, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ±2 is preferred, those which are within ±1 are particularly preferred, and those within ±0.5 are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity, particularly where the biologically functionally equivalent protein or peptide thereby created is intended for use in immunological embodiments, as in the present case.

U.S. Patent No. 4,554,101 states that the greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, *i.e.*, with a biological property of the protein. As detailed in U.S. Patent No. 4,554,101, the following hydrophilicity values have been assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 ± 1); glutamate (+3.0 ± 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 ± 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4).

In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ±2 is preferred, those which are within ±1 are particularly preferred, and those within ±0.5 are even more particularly preferred. U.S. Patent No. 4,554,101 also teaches the identification and preparation of epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. Through the methods disclosed in U.S. Patent No. 4,554,101 one of skill in the art is able to identify epitopes from within a

given amino acid sequence. These regions are also referred to as "epitopic core regions".

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the TNFr/OPG-like polypeptide, or to increase or decrease the affinity of the TNFr/OPG-like polypeptides described herein.

Numerous scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure, and to the identification of epitopes, from analyses of amino acid sequences. See Chou *et al.*, *Biochemistry*, 13(2):222-245 (1974); Chou *et al.*, *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou *et al.*, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47:45-148 (1978); Chou *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 and Chou *et al.*, *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979). Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting antigenic portions and epitopic core regions of proteins. Examples include those programs based upon the Jameson-Wolf analysis (Jameson *et al.*, *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):181-186 (1998) and Wolf *et al.*, *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):187-191 (1988), the program PepPlot® (Brutlag *et al.*, *CABS*, 6:237-245 (1990), and Weinberger *et al.*, *Science*, 228:740-742 (1985), and other new programs for protein tertiary structure prediction (Fetrow *et al.*, *Biotechnology*, 11:479-483 (1993).

Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins which have a sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40% often have similar structural topologies.

The recent growth of the protein structural data base (PDB) has provided enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within a polypeptide's or protein's structure. See Holm et al., Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999). It has been suggested (Brenner et al., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)) that there are a limited number of folds in a given polypeptide or protein and that once a critical number of structures have been resolved, structural prediction will gainbecome dramatically in accuracy.more accurate.

Additional methods of predicting secondary structure include "threading""threading" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl et al., Structure, 4(1):15-9 (1996)), "profile analysis"4(1):15-19 (1996)), "profile analysis" (Bowie et al., Science, 253:164-170 (1991); Gribskov et al., Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskov et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358 (1987)), and "evolutionary linkage" (See Home, supra,"evolutionary linkage" (See Holm, supra (1999), and Brenner, supra).

In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 50, or from 1 to 75, or from 1 to 100, or more than 100 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the substitutions may be conservative, as described herein, or non-conservative, or any combination thereof. In addition, the variants can have additions of amino acid residues either at the carboxy terminus or at the amino terminus (with or without a leader sequence).

Preferred TNFr/OPG-like polypeptide variants include glycosylation variants wherein the number and/or type of glycosylation sites has been altered compared to native TNFr/OPG-like polypeptide. In one embodiment, TNFr/OPG-like

polypeptide variants comprise a greater or a lesser number of N-linked glycosylation sites. An N-linked glycosylation site is characterized by the sequence: Asn-X-Ser or Thr, wherein the amino acid residue designated as X may be any amino acid residue except proline. The substitution(s) of amino acid residues to create this sequence provides a potential new site for the addition of an N-linked carbohydrate chain. Alternatively, substitutions which eliminate this sequence will remove an existing N-linked carbohydrate chain. Also provided is a rearrangement of N-linked carbohydrate chains wherein one or more N-linked glycosylation sites (typically those that are naturally occurring) are eliminated and one or more new N-linked sites are created. Additional preferred TNFr/OPG-like variants include cysteine variants, wherein one or more cysteine residues are deleted or substituted with another amino acid (e.g., serine). Cysteine variants are useful when TNFr/OPG-like polypeptides must be refolded into a biologically active conformation such as after the isolation of insoluble inclusion bodies. Cysteine variants generally have fewer cysteine residues than the native protein, and typically have an even number to minimize interactions resulting from unpaired cysteines.

The term "TNFr/OPG-like fusion polypeptide" refers to a fusion of TNFr/OPG-like polypeptide, fragment, and/or variant thereof, with a heterologous peptide or polypeptide. Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to: an epitope to allow for the detection and/or isolation of a TNFr/OPG-like fusion polypeptide; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain, or a transmembrane and intracellular domain; a ligand or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a

polypeptide or peptide which increases stability, such as an immunoglobulin constant region, and a polypeptide which has a therapeutic activity different from the TNFr/OPG-like polypeptide.

In addition, a TNFr/OPG-like polypeptide may be fused to itself or to a fragment, variant, or derivative thereof. Fusions can be made either at the amino terminus or at the carboxy terminus of a TNFr/OPG-like polypeptide. Fusions may be direct with no linker or adapter molecule or may be through a linker or adapter molecule, such as one or more amino acid residues up to about 20 amino acids residues, or up to about 50 amino acid residues. A linker or adapter molecule may also be designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease or for a protease to allow for the separation of the fused moieties. It will be appreciated that once constructed, the fusion polypeptides can be derivatized according to the methods described herein.

In a further embodiment of the invention, a TNFr/OPG-like polypeptide, including a fragment, variant, and/or derivative, is fused to an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab", which binds antigen, and a constant domain known as "Fc", which links to such effector functions as complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas an Fab is short-lived. Capon *et al.*, *Nature*, 337: 525-31 (1989). When constructed together with a therapeutic protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding, protein binding, complement fixation and perhaps even placental transfer. *Id.* Table I summarizes the use of certain Fc fusions known in the art, including materials and methods applicable to the production of fused TNFr/OPG-like polypeptides.

Table I
Fc fusion with therapeutic proteins

Form of Fc	Fusion partner	Therapeutic implications	Reference
IgG1	N-terminus of CD30-L	Hodgkin's disease; anaplastic lymphoma; T-cell leukemia	U.S. Patent No. 5,480,981
Murine Fcγ2a	IL-10	anti-inflammatory; transplant rejection	Zheng *et al.* (1995), *J. Immunol.*, 154: 5590-600
IgG1	TNF receptor	septic shock	Fisher *et al.* (1996), *N. Engl. J. Med.*, 334: 1697-1702; Van Zee *et al.*, (1996), *J. Immunol.*, 156: 2221-30
IgG, IgA, IgM, or IgE (excluding the first domain)	TNF receptor	inflammation, autoimmune disorders	U.S. Pat. No. 5,808,029, issued September 15, 1998
IgG1	CD4 receptor	AIDS	Capon *et al.* (1989), *Nature* 337: 525-31
IgG1, IgG3	N-terminus of IL-2	anti-cancer, antiviral	Harvill *et al.* (1995), *Immunotech.*, 1: 95-105
IgG1	C-terminus of OPG	osteoarthritis; bone density	WO 97/23614, published July 3, 1997
IgG1	N-terminus of leptin	anti-obesity	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
Human Ig Cγ1	CTLA-4	autoimmune disorders	Linsley (1991), *J. Exp. Med.*, 174:561-9

In one example, all or a portion of the human IgG hinge, CH2 and CH3 regions may be fused at either the N-terminus or C-terminus of the TNFr/OPG-like polypeptides using methods known to the skilled artisan. In another example, a portion of a hinge regions and CH2 and CH3 regions may be fused. The resulting TNFr/OPG-like Fc-fusion polypeptide may be purified by use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life *in vivo* than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the fusion polypeptide. The Fc region may be a naturally occurring Fc region, or may be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, reduction of aggregation, etc.

The term "TNFr/OPG-like polypeptide derivatives" refers to TNFr/OPG-like polypeptides, fragments, or variants, as defined herein, that have been chemically modified. The derivatives are modified in a manner that is different from naturally occurring TNFr/OPG-like polypeptides, either in the type or location of the molecules attached to the polypeptide. Derivatives may further include molecules formed by the deletion of one or more chemical groups which are naturally attached to the TNFr/OPG-like polypeptide.

For example, the polypeptides may be modified by the covalent attachment of one or more polymers, including, but not limited to, water soluble polymers, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, and/or other such molecules. For example, the polymer selected is typically water soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. The polymer may be of any molecular weight, and may be branched or unbranched. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of

polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable.

Suitable water soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, polyethylene glycol (PEG), monomethoxy-polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight dextran, of, for example about 6 kD), cellulose, or other carbohydrate based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, a polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymer, polyoxyethylated polyols (*e.g.*, glycerol) and polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional PEG crosslinking molecules which may be used to prepare covalently attached TNFr/OPG-like multimers.

For the acylation reactions, the polymer(s) selected should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, the polymer(s) selected should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono C_1-C_{10} alkoxy or aryloxy derivatives thereof (see U.S. Patent No. 5,252,714).

The pegylation of TNFr/OPG-like polypeptides may be carried out by any of the pegylation reactions known in the art, as described for example in the following references: Francis *et al.*, *Focus on Growth Factors*, 3:4-10 (1992); EP 0154316; EP 0401384 and U.S. Patent No. 4,179,337. Pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein.

Polyethylene glycol (PEG) is a water-soluble polymer suitable for use herein. As used herein, the terms "polyethylene glycol" and "PEG" are meant to encompass any of

the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C_1-C_{10}) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable conditions used to react a biologically active substance with an activated polymer molecule. Methods for preparing pegylated TNFr/OPG-like polypeptides will generally comprise the steps of (a) reacting the polypeptide with polyethylene glycol (such as a reactive ester or aldehyde derivative of PEG) under conditions whereby TNFr/OPG-like polypeptide becomes attached to one or more PEG groups, and (b) obtaining the reaction product(s). In general, the optimal reaction conditions for the acylation reactions will be determined based on known parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of PEG:protein, the greater the percentage of poly-pegylated product. In one embodiment, the TNFr/OPG-like polypeptide derivative may have a single PEG moiety at the amino terminus. See, for example, U.S. Patent No. 5,234,784.

Generally, conditions which may be alleviated or modulated by the administration of the present TNFr/OPG-like polypeptide derivative include those described herein. However, the TNFr/OPG-like polypeptide derivatives disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to the non-derivatized molecules.

The terms "biologically active TNFr/OPG-like polypeptides", "biologically active TNFr/OPG-like polypeptide fragments", "biologically active TNFr/OPG-like polypeptide variants", and "biologically active TNFr/OPG-like polypeptide derivatives" refer to TNFr/OPG-like polypeptides having at least one activity characteristic of a TNFr/OPG-like polypeptide, such as the activity of the polypeptide set forth

in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. In general, TNFr/OPG-like polypeptides, fragments, variants, and derivatives thereof, will have at least one activity characteristic of a TNFr/OPG-like polypeptide such as depicted in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. In addition, a TNFr/OPG-like polypeptide may be active as an immunogen, that is, the polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised.

"Naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that is free from at least one contaminating polypeptide that is found in its natural environment. Preferably, the isolated polypeptide is substantially free from any other contaminating mammalian polypeptides which would interfere with its therapeutic, preventative, or diagnostic use.

The term "ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to TNFr/OPG-like polypeptide amino acid sequence as set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4. For example, mouse and human TNFr/OPG-like polypeptides are considered orthologs of each other.

The term "mature TNFr/OPG-like polypeptide" refers to a polypeptide lacking a leader sequence. A mature polypeptide may also include other modifications such as proteolytic processing of the amino terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxy terminus, cleavage of a smaller

polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like. An exemplary mature TNFr/OPG-like polypeptide is depicted by amino acid residue __ thorough amino acid residue of SEQ ID NO: 2 or amino acid residue through amino acid residue of SEQ ID NO: 4. **FILL IN BLANKS**

The terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" refer to the amount of a TNFr/OPG-like polypeptide or TNFr/OPG-like nucleic acid molecule used to support an observable level of one or more biological activities of the TNFr/OPG-like polypeptides as set forth herein.

The term "selective binding agent" refers to a molecule or molecules having specificity for TNFr/OPG-like molecules. Selective binding agents include antibodies, such as polyclonal antibodies, monoclonal antibodies (mAbs), chimeric antibodies, CDR-grafted antibodies, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies to antibodies that can be labeled in soluble or bound form, as well as fragments, regions, or derivatives thereof which are provided by known techniques, including, but not limited to enzymatic cleavage, peptide synthesis, or recombinant techniques. The anti-TNFr/OPG-like selective binding agents of the present invention are capable, for example, of binding portions of TNFr/OPG-like molecules that inhibit the binding of TNF/OPG-like molecules to TNFr/OPG-like receptors.

As used herein, the terms, "specific" and "specificity" refer to the ability of the selective binding agents to bind to human TNFr/OPG-like polypeptides and not to human non-TNFr/OPG-like polypeptides. It will be appreciated, however, that the selective binding agents may also bind orthologs of TNFr/OPG-like polypeptides, that is, interspecies versions of TNFr/OPG-like polypeptides, such as mouse and rat TNFr/OPG-

like polypeptides. A preferred embodiment relates to antibodies that are highly specific to TNFr/OPG-like polypeptides yet do not cross-react (that is, they fail to bind) with specificity to non-TNFr/OPG-like polypeptides.

The term "antigen" refers to a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by a selective binding agent, such as an antibody, which is additionally capable of inducing an animal to produce antibodies capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen can have one or more epitopes. The specific binding reaction referred to above is meant to indicate that the antigen will react, in a highly selective manner, with its corresponding antibody and not with the multitude of other antibodies which can be evoked by other antigens.

TNFr/OPG-like polypeptides, fragments, variants, and derivatives may be used to prepare TNFr/OPG-like selective binding agents using methods known in the art. Thus, antibodies and antibody fragments that bind TNFr/OPG-like polypeptides are within the scope of the present invention. Antibody fragments include those portions of the antibody which bind to an epitope on the TNFr/OPG-like polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions. These antibodies may be, for example, polyclonal monospecific polyclonal, monoclonal, recombinant, chimeric, humanized, human, single chain, and/or bispecific.

Relatedness of Nucleic Acid Molecules and/or Polypeptides

It is understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of the nucleic acid molecule of SEQ ID NOS: 1 or 3, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a substitution, modification, addition and/or a deletion of one or more amino acid residues compared to the polypeptide in SEQ ID NOS: 2 or 4.

Fragments include molecules which encode a polypeptide of at least about 25 amino acid residues, or about 50, or about 75, or about 100, or greater than about 100, amino acid residues of the polypeptide of SEQ ID NOS: 2 or 4.

In addition, related TNFr/OPG-like nucleic acid molecules include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of the nucleic acid molecule of SEQ ID NOS: 1 or 3, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the amino acid sequence as shown in SEQ ID NOS: 3 or 4, or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid fragment encoding a polypeptide as defined herein. Hybridization probes may be prepared using the TNFr/OPG-like sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of TNFr/OPG-like polypeptide that exhibit significant identity to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein, and those regions may be used to design probes for screening.

The term "identity" as known in the art, refers to a relationship between the sequences of two or more polypeptide molecules or two or more nucleic acid molecules, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between nucleic acid molecule or polypeptide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of two or more nucleotide or two or more amino acid sequences. "Identity" measures the percent of identical matches between the smaller of two or more sequences with gap alignments (if any) addressed by a particular mathematical model or computer programs (*i.e.*, "algorithms").

The term "similarity" is a related concept, but in contrast to "identity", refers to a measure of similarity which includes both identical matches and conservative substitution matches. If two polypeptide sequences have, for example, 10/20 identical amino acids, and the remainder are all non-conservative substitutions, then the percent identity and similarity would both be 50%. If in the same example, there are 5 more positions where there are conservative substitutions, then the percent identity remains 50%, but the per cent similarity would be 75% (15/20). Therefore, in cases where there are conservative substitutions, the degree of similarity between two polypeptide sequences will be higher than the percent identity between those two polypeptides.

In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is about 70 percent (70%) identical to the nucleotide sequence as shown in SEQ ID NOS: 1 or 3, or comprise or consist essentially of a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is about 70 percent (70%) identical to the polypeptide as set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about

85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in SEQ ID NOS: 1 or 3, or the nucleotide sequences encode a polypeptide that is about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the polypeptide sequence as set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4.

Differences in the nucleic acid sequence may result in conservative and/or non-conservative modifications of the amino acid sequence relative to the amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 or 4.

The term "conservative amino acid substitution" refers to a substitution of a native amino acid residue with a nonnative residue such that there is little or no effect on the polarity or charge of the amino acid residue at that position. For example, a conservative substitution results from the replacement of a non-polar residue in a polypeptide with any other non-polar residue. Furthermore, any native residue in the polypeptide may also be substituted with alanine, as has been previously described for "alanine scanning mutagenesis." General rules for making amino acid substitutions are set forth in Table II.

Table II

Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino-butyric Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

Conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues which are typically

incorporated by chemical peptide synthesis rather than by synthesis in biological systems. These include peptidomimetics, and other reversed or inverted forms of amino acid moieties. It will be appreciated by those skilled in the art the nucleic acid and polypeptide molecules described herein may be chemically synthesized as well as produced by recombinant means.

Conservative modifications to the amino acid sequence (and the corresponding modifications to the encoding nucleotides) will produce TNFr/OPG-like polypeptides having functional and chemical characteristics similar to those of naturally occurring TNFr/OPG-like polypeptides. In contrast, substantial modifications in the functional and/or chemical characteristics of TNFr/OPG-like polypeptides may be accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the molecular backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues may be divided into classes based on common side chain properties:

1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
3) acidic: Asp, Glu;
4) basic: His, Lys, Arg;
5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

Non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human TNFr/OPG-like polypeptide that are

homologous with non-human TNFr/OPG-like polypeptides, or into the non-homologous regions of the molecule.

Identity and similarity of related nucleic acid molecules and polypeptides can be readily calculated by known methods. Such methods include, but are not limited to, those described in Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et *al.*, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988).

Preferred methods to determine identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are described in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 12: 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990)). The BLASTX program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (*BLAST Manual*, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, *supra*). The well known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Certain alignment schemes for aligning two amino acid sequences may result in the matching of only a short region of

the two sequences, and this small aligned region may have very high sequence identity even though there is no significant relationship between the two full length sequences. Accordingly, in a preferred embodiment, the selected alignment method (GAP program) will result in an alignment that spans at least 50 contiguous amino acids of the target polypeptide.

For example, using the computer algorithm GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), two polypeptides for which the percent sequence identity is to be determined are aligned for optimal matching of their respective amino acids (the "matched span", as determined by the algorithm). A gap opening penalty (which is calculated as 3X the average diagonal; the "average diagonal" is the average of the diagonal of the comparison matrix being used; the "diagonal" is the score or number assigned to each perfect amino acid match by the particular comparison matrix) and a gap extension penalty (which is usually 1/10 times the gap opening penalty), as well as a comparison matrix such as PAM 250 or BLOSUM 62 are used in conjunction with the algorithm. A standard comparison matrix (see Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp.3 (1978) for the PAM 250 comparison matrix; Henikoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci* USA, 89: 10915-10919 (1992) for the BLOSUM 62 comparison matrix) is also used by the algorithm.

Preferred parameters for a polypeptide sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 48, 443-453 (1970);
Comparison matrix: BLOSUM 62 from Henikoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 89: 10915-10919 (1992);
Gap Penalty: 12
Gap Length Penalty: 4
Threshold of Similarity: 0

The GAP program is useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for polypeptide comparisons (along with no penalty for end gaps) using the GAP algorithm.

Preferred parameters for nucleic acid molecule sequence comparisons include the following:

Algorithm: Needleman *et al.*, *J. Mol Biol.*, 48: 443-453 (1970);
Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0
Gap Penalty: 50
Gap Length Penalty: 3

The GAP program is also useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for nucleic acid molecule comparisons.

Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices, thresholds of similarity, etc. may be used by those of skill in the art, including those set forth in the Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997. The particular choices to be made will be apparent to those of skill in the art and will depend on the specific comparison to be made, such as DNA to DNA, protein to protein, protein to DNA; and additionally, whether the comparison is between given pairs of sequences (in

which case GAP or BestFit are generally preferred) or between one sequence and a large database of sequences (in which case FASTA or BLASTA are preferred).

Synthesis

It will appreciated by those skilled in the art the nucleic acid and polypeptide molecules described herein may be produced by recombinant and other means.

Nucleic Acid Molecules

The nucleic acid molecules encode a polypeptide comparing the amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, cDNA or genomic library screening, expression library screening and/or PCR amplification of cDNA.

Recombinant DNA methods used herein are generally those set forth in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), and/or Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, NY (1994). The present invention provides for nucleic acid molecules as described herein and methods for obtaining the molecules.

A gene or cDNA encoding a TNFr/OPG-like polypeptide or fragment thereof may be obtained by hybridization screening of a genomic or cDNA library, or by PCR amplification. Where a gene encoding the amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide has been identified from one species, all or a portion of that gene may be used as a probe to identify corresponding genes from other species (orthologs) or related genes from the same species (homologs). The probes or primers

may be used to screen cDNA libraries from various tissue sources believed to express the TNFr/OPG-like polypeptide. In addition, part or all of a nucleic acid molecule having the sequence as set forth in either SEQ ID NOS: 1 or 3 may be used to screen a genomic library to identify and isolate a gene encoding the amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide. Typically, conditions of moderate or high stringency will be employed for screening to minimize the number of false positives obtained from the screen.

Nucleic acid molecules encoding the amino acid sequence of TNFr/OPG-like polypeptides may also be identified by expression cloning which employs the detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding of an antibody or other binding partner (e.g., receptor or ligand) to cloned proteins which are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce these polynucleotides and to express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence which encodes the amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide into an appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid sequence of an TNFr/OPG-like polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded TNFr/OPG-like polypeptide may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from poly(A)+RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two primers, typically complementary to two separate regions of cDNA (oligonucleotides) encoding the amino acid sequence of an TNFr/OPG-like polypeptide, are then added to the cDNA along with a polymerase such as Taq polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region between the two primers.

Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide, including a fragment or variant, is chemical synthesis using methods well known to the skilled artisan such as those described by Engels *et al.*, *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28: 716-734 (1989). These methods include, *inter alia*, the phosphotriester, phosphoramidite, and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide will be several hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several fragments using these methods. The fragments can then be ligated together to form the full length nucleotide sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide. Usually, the DNA fragment encoding the amino terminus of the polypeptide will have an ATG, which encodes a methionine residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the TNFr/OPG-like polypeptide, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is designed to be secreted from that cell.

In some cases, it may be desirable to prepare nucleic acid molecules encoding TNFr/OPG-like polypeptide variants. Nucleic acid molecules encoding variants may be produced using

site directed mutagenesis, PCR amplification, or other appropriate methods, where the primer(s) have the desired point mutations (see Sambrook *et al.*, *supra*, and Ausubel *et al.*, *supra*, for descriptions of mutagenesis techniques). Chemical synthesis using methods described by Engels *et al.*, *supra*, may also be used to prepare such variants. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for the optimal expression of a TNFr/OPG-like polypeptide in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the TNFr/OPG-like polypeptide(s) and host cell(s) selected for expression. Such "codon optimization" can be carried out by a variety of methods, for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Ecohigh.cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the University of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WI. Other useful codon frequency tables include "Celegans_high.cod", "Celegans_low.cod", "Drosophila_high.cod", "Human_high.cod", "Maize_high.cod", and "Yeast_high.cod".

In other embodiments, nucleic acid molecules encode TNFr/OPG-like variants with conservative amino acid substitutions as described herein, TNFr/OPG-like variants comprising an addition and/or a deletion of one or more N-linked or O-linked glycosylation sites, TNFr/OPG-like variants having deletions and/or substitutions of one or more cysteine residues, or TNFr/OPG-like polypeptide fragments as described herein. In addition, nucleic acid molecules may encode any combination of TNFr/OPG-like variants, fragments, and fusion polypeptides described herein.

Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide is inserted into an appropriate expression vector using standard ligation techniques. The vector is typically selected to be functional in the particular host cell employed (*i.e.*, the vector is compatible with the host cell machinery such that amplification of the gene and/or expression of the gene can occur). A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a TNFr/OPG-like polypeptide may be amplified/expressed in prokaryotic, yeast, insect (baculovirus systems), and/or eukaryotic host cells. Selection of the host cell will depend in part on whether a TNFr/OPG-like polypeptide is to be post-translationally modified (*e.g.*, glycosylated and/or phosphorylated). If so, yeast, insect, or mammalian host cells are preferable. For a review of expression vectors, see *Meth. Enz.*, v.185, D.V. Goeddel, ed. Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

Typically, expression vectors used in any of the host cells will contain sequences for plasmid maintenance and for cloning and expression of exogenous nucleotide sequences. Such sequences, collectively referred to as "flanking sequences" in certain embodiments will typically include one or more of the following nucleotide sequences: a promoter, one or more enhancer sequences, an origin of replication, a transcriptional termination sequence, a complete intron sequence containing a donor and acceptor splice site,a sequence encoding a leader sequence for polypeptide secretion, a ribosome binding site, a polyadenylation sequence, a polylinker region for inserting the nucleic acid encoding the polypeptide to be expressed, and a selectable marker element. Each of these sequences is discussed below.

Optionally, the vector may contain a "tag" encoding sequence, i.e., an oligonucleotide molecule located at the 5'

or 3' end of the TNFr/OPG-like polypeptide coding sequence; the oligonucleotide sequence encodes polyHis (such as hexaHis), or other "tag" such as FLAG, HA (hemaglutinin Influenza virus) or *myc* for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the TNFr/OPG-like polypeptide from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently be removed from the purified TNFr/OPG-like polypeptide by various means such as using certain peptidases for cleavage.

Flanking sequences may be homologous (*i.e.*, from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (*i.e.*, from a species other than the host cell species or strain), hybrid (*i.e.*, a combination of flanking sequences from more than one source), or synthetic, or the flanking sequences may be native sequences which normally function to regulate TNFr/OPG-like polypeptide expression. As such, the source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic organism, any vertebrate or invertebrate organism, or any plant, provided that the flanking sequences is functional in, and can be activated by, the host cell machinery.

The flanking sequences useful in the vectors of this invention may be obtained by any of several methods well known in the art. Typically, flanking sequences useful herein other than endogenous TNFr/OPG-like gene flanking sequences will have been previously identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the

flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid synthesis or cloning.

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragments from the same or another species. Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by isolation using agarose gel purification, Qiagen® column chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be important for the optimal expression of the TNFr/OPG-like polypeptide. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example, the origin of replication from the plasmid pBR322 (Product No. 303-3s, New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most Gram-negative bacteria and various origins (*e.g.*, SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitus virus (VSV) or papillomaviruses such as HPV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (for example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment followed by a poly T sequence. While the sequence is easily cloned from a library or even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

A selectable marker gene element encodes a protein necessary for the survival and growth of a host cell grown in a selective culture medium. Typical selection marker genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, tetracycline, or kanamycin for prokaryotic host cells, (b) complement auxotrophic deficiencies of the cell; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. Preferred selectable markers are the kanamycin resistance gene, the ampicillin resistance gene, and the tetracycline resistance gene. A neomycin resistance gene may also be used for selection in prokaryotic and eukaryotic host cells.

Other selection genes may be used to amplify the gene which will be expressed. Amplification is the process wherein genes which are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidine kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection pressure which only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the selection

gene and the DNA that encodes TNFr/OPG-like polypeptides. As a result, increased quantities of TNFr/OPG-like polypeptides are synthesized from the amplified DNA.

A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to the coding sequence of the TNFr/OPG-like polypeptide to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (i.e., having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

A leader, or signal, sequence may be used to direct a TNFr/OPG-like polypeptide out of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of the TNFr/OPG-like nucleic acid molecule, or directly at the 5' end of the TNFr/OPG-like polypeptide coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be used in conjunction with the TNFr/OPG-like nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may be homologous (naturally occurring) or heterologous to the TNFr/OPG-like gene or cDNA. Additionally, a signal sequence may be chemically synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of a TNFr/OPG-like polypeptide from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted TNFr/OPG-like polypeptide. The signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of TNFr/OPG-like nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

Included within the scope of this invention is the use of either nucleotide sequence encoding a native TNFr/OPG-like

signal sequence joined to a TNFr/OPG-like polypeptide coding region or a nucleotide sequence encoding a a heterologous signal sequence joined to a TNFr/OPG-like polypeptide coding region. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, i.e., cleaved by a signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native TNFr/OPG-like polypeptide signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion, the native TNFr/OPG-like polypeptide signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell expression the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be suitable.

In some cases, such as where glycosylation is desired in a eukaryotic host cell expression system, one may manipulate the various presequences to improve glycosylation or yield. For example, one may alter the peptidase cleavage site of a particular signal peptide, or add presequences, which also may affect glycosylation. The final protein product may have, in the -1 position (relative to the first amino acid of the mature protein) one or more additional amino acids incident to expression, which may not have been totally removed. For example, the final protein product may have one or two amino acid residues found in the peptidase cleavage site, attached to the N-terminus. Alternatively, use of some enzyme cleavage sites may result in a slightly truncated form of the desired TNFr/OPG-like polypeptide, if the enzyme cuts at such area within the mature polypeptide.

In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or more introns in the vector; this is particularly true where a polypeptide is

produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells. The introns used may be naturally occurring within the TNFr/OPG-like gene, especially where the gene used is a full length genomic sequence or a fragment thereof. Where the intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron(s) may be obtained from another source. The position of the intron with respect to flanking sequences and the TNFr/OPG-like gene is generally important, as the intron must be transcribed to be effective. Thus, when a TNFr/OPG-like cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site, and 5' to the polyA transcription termination sequence. Preferably, the intron or introns will be located on one side or the other (i.e., 5' or 3') of the cDNA such that it does not interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including any viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used to practice this invention, provided that it is compatible with the host cell(s) into which it is inserted. Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one intron may be used in the vector.

The expression and cloning vectors of the present invention will each typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding a TNFr/OPG-like polypeptide. Promoters are untranscribed sequences located upstream (5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription and translation of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes, inducible promoters and constitutive promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive

promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding a TNFr/OPG-like polypeptide by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the desired promoter sequence into the vector. The native TNFr/OPG-like gene promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of TNFr/OPG-like nucleic acid molecule. A heterologous promoter is preferred, however, if it permits greater transcription and higher yields of the expressed protein as compared to the native promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for use.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems; alkaline phosphatase, a tryptophan (trp) promoter system; and hybrid promoters such as the tac promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Their sequences have been published, thereby enabling one skilled in the art to ligate them to the desired DNA sequence(s), using linkers or adapters as needed to supply any useful restriction sites.

Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are not limited to, those obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus (CMV), a retrovirus, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40 (SV40). Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, e.g., heat-shock promoters and the actin promoter.

Additional promoters which may be of interest in controlling TNFr/OPG-like gene transcription include, but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, *Nature*, 290:304-310, 1981); the CMV promoter; the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto *et al.*, *Cell*, 22: 787-797, 1980); the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 144-1445, 1981); the regulatory sequences of the metallothionine gene (Brinster *et al.*, *Nature*, 296: 39-42, 1982); prokaryotic expression vectors such as the beta-lactamase promoter (Villa-Kamaroff, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3727-3731, 1978); or the tac promoter (DeBoer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25, 1983). Also of interest are the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift *et al.*, *Cell*, 38: 639-646, 1984; Ornitz *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology*, 7:425-515, 1987); the insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, *Nature*, 315:115-122, 1985); the immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl *et al.*, *Cell*, 38:647-658 (1984); Adames *et al.*, *Nature*, 318:533-538 (1985); Alexander *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-1444, 1987); the mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder *et al.*, *Cell*, 45:485-495, 1986); the albumin gene control region which is active in liver (Pinkert *et al.*, *Genes and Devel.*, 1:268-276, 1987); the alphafetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-1648, 1985; Hammer *et al.*, *Science*, 235:53-58, 1987); the alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey *et al.*, *Genes and Devel.*, 1:161-171, 1987); the

beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram *et al.*, *Nature*, 315:338-340, 1985; Kollias *et al.*, *Cell*, 46:89-94, 1986); the myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead *et al.*, *Cell*, 48:703-712, 1987); the myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, *Nature*, 314:283-286, 1985); and the gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason *et al.*, Science, 234:1372-1378, 1986).

An enhancer sequence may be inserted into the vector to increase the transcription of a DNA encoding a TNFr/OPG-like polypeptide of the present invention by higher eukaryotes. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10-300 bp in length, that act on the promoter to increase transcription. Enhancers are relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (*e.g.*, globin, elastase, albumin, alpha-feto-protein and insulin). Typically, however, an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to TNFr/OPG-like nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors of the invention may be constructed from a starting vector such as a commercially available vector. Such vectors may or may not contain all of the desired flanking sequences. Where one or more of the desired flanking sequences are not already present in the vector, they may be individually obtained and ligated into the vector. Methods used for obtaining each of the flanking sequences are well known to one skilled in the art.

Preferred vectors for practicing this invention are those which are compatible with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, *inter alia*, pCRII, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen Company, Carlsbad, CA), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Publication No. WO90/14363) and pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY).

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such vectors include, but are not limited to plasmids such as Bluescript® plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA), PCR cloning plasmids designed for cloning Taq-amplified PCR products (*e.g.*, TOPO™ TA Cloning® Kit, PCR2.1® plasmid derivatives, Invitrogen, Carlsbad, CA), and mammalian, yeast, or virus vectors such as a baculovirus expression system (pBacPAK plasmid derivatives, Clontech, Palo Alto, CA). The recombinant molecules can be introduced into host cells via transformation, transfection, infection, electroporation, or other known techniques.

After the vector has been constructed and a nucleic acid molecule encoding a TNFr/OPG-like polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the completed vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide expression. Host cells may be prokaryotic host cells (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as a yeast cell, an insect cell, or a vertebrate cell). The host cell, when cultured under appropriate conditions, synthesizes a TNFr/OPG-like polypeptide which can subsequently be collected from the culture medium (if the host

cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or necessary for activity, such as glycosylation or phosphorylation, and ease of folding into a biologically active molecule.

A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110-2209. Examples include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells (CHO) (ATCC No. CCL61) CHO DHFR-cells (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:4216-4220 (1980)), human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells (ATCC No. CRL1573), or 3T3 cells (ATCC No. CCL92). The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening and product production and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines, are the monkey COS-1 (ATCC No. CRL1650) and COS-7 cell lines (ATCC No. CRL1651), and the CV-1 cell line (ATCC No. CCL70). Further exemplary mammalian host cells include primate cell lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominantly acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines include but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A cells, HeLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell lines, which are available from the ATCC). Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

Similarly useful as host cells suitable for the present invention are bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* (*e.g.*, HB101, (ATCC No. 33694) DH5α, DH10, and MC1061 (ATCC No. 53338)) are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, other *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, and the like may also be employed in this method.

Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for the expression of the polypeptides of the present invention. Preferred yeast cells include, for example, *Saccharomyces cerivisae* and *Pichia pastoris*.

Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized in the methods of the present invention. Such systems are described for example in Kitts *et al.*, *Biotechniques*, 14:810-817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4:564-572 (1993); and Lucklow *et al.* (*J. Virol.*, 67:4566-4579 (1993). Preferred insect cells are Sf-9 and Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

The transformation of an expression vector for a TNFr/OPG-like polypeptide into a selected host cell may be accomplished by well known methods including methods such as calcium chloride, electroporation, microinjection, lipofection or the DEAE-dextran method. The method selected will in part be a function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan, and are set forth, for example, in Sambrook *et al.*, *supra*.

One may also use transgenic animals to express glycosylated TNFr/OPG-like polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow or goat, for example) and obtain the present glycosylated polypeptide in the animal milk. One may also use plants to produce TNFr/OPG-

like polypeptides, however, in general, the glycosylation occurring in plants is different from that produced in mammalian cells, and may result in a glycosylated product which is not suitable for human therapeutic use.

Polypeptide Production

Host cells comprising a TNFr/OPG-like polypeptide expression vector may be cultured using standard media well known to the skilled artisan. The media will usually contain all nutrients necessary for the to allow growth and survival of the cells. Suitable media for culturing *E. coli* cells include for example, Luria Broth (LB) and/or Terrific Broth (TB). Suitable media for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as indicated by the particular cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate, and/or fetal calf serum, as necessary.

Typically, an antibiotic or other compound useful for selective growth of transformed cells is added as a supplement to the media. The compound to be used will be dictated by the selectable marker element present on the plasmid with which the host cell was transformed. For example, where the selectable marker element is kanamycin resistance, the compound added to the culture medium will be kanamycin. Other compounds for selective growth include ampicillin, tetracycline, and neomycin.

The amount of a TNFr/OPG-like polypeptide produced by a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot

analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing gel electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation, immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

If a TNFr/OPG-like polypeptide has been designed to be secreted from the host cells, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If however, the TNFr/OPG-like polypeptide is not secreted from the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells).

For a TNFr/OPG-like polypeptide situated in the host cell cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), the host cells are typically first disrupted mechanically or with a detergent to release the intra-cellular contents into a buffered solution. TNFr/OPG-like polypeptide can then be isolated from this solution.

The purification of a TNFr/OPG-like polypeptide from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine (TNFr/OPG-like polypeptide/hexaHis) or other small peptide such as FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or *myc* (Invitrogen, Carlsbad, CA) at either its carboxyl or amino terminus, it may essentially be purified in a one-step process by passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for the tag. For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel, thus an affinity column of nickel (such as the Qiagen® nickel columns) can be used for purification of TNFr/OPG-like polypeptide/polyHis. See for example, Ausubel *et al.*, eds.,

Current Protocols in Molecular Biology, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993).

Additionally, the TNFr/OPG-like polypeptide may be purified through the use of a monoclonal antibody whih is capable of specifically recognizing and binding to the TNFr/OPG-like polypeptide.

Where a TNFr/OPG-like polypeptide is prepared without a tag attached, and no antibodies are available, other well known procedures for purification can be used. Such procedures include, without limitation, ion exchange chromatography, molecular sieve chromatography, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), native gel electrophoresis in combination with gel elution, and preparative isoelectric focusing ("Isoprime" machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or more of these techniques may be combined to achieve increased purity.

If a TNFr/OPG-like polypeptide is produced intracellularly, the intracellular material (including inclusion bodies for gram-negative bacteria) can be extracted from the host cell using any standard technique known to the skilled artisan. For example, the host cells can be lysed to release the contents of the periplasm/cytoplasm by French press, homogenization, and/or sonication followed by centrifugation.

If a TNFr/OPG-like polypeptide has formed inclusion bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such as a detergent, guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris

carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. This solubilized TNFr/OPG-like polypeptide in its now soluable form can then be analyzed using gel electrophoresis, immunoprecipitation or the like. If it is desired to isolate the TNFr/OPG-like polypeptide, isolation may be accomplished using standard methods such as those described herein and in Marston *et al.*, *Meth. Enz.*, 182:264-275 (1990).

In some cases, a TNFr/OPG-like polypeptide may not be biologically active upon isolation. Various methods for "refolding" or converting the polypeptide to its tertiary structure and generating disulfide linkages, can be used to restore biological activity. Such methods include exposing the solubilized polypeptide to a pH usually above 7 and in the presence of a particular concentration of a chaotrope. The selection of chaotrope is very similar to the choices used for inclusion body solubilization, but usually the chaotrope is used at a lower concentration and is not necessarily the same as chaotropes used for the solubilization. In most cases the refolding/oxidation solution will also contain a reducing agent or the reducing agent plus its oxidized form in a specific ratio to generate a particular redox potential allowing for disulfide shuffling to occur in the formation of the protein's cysteine bridge(s). Some of the commonly used redox couples include cysteine/cystamine, glutathione (GSH)/dithiobis GSH, cupric chloride, dithiothreitol(DTT)/ dithiane DTT, and 2-2mercaptoethanol(bME)/dithio-b(ME). A cosolvent may be used to increase the efficiency of the refolding, and the more common reagents used for this purpose include glycerol, polyethylene glycol of various molecular weights, arginine and the like.

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of a TNFr/OPG-like polypeptide, then the polypeptide will be found primarily in the supernatant

after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein.

Suitable procedures for purification thus include, without limitation, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography, ion exchange chromatography, molecular sieve chromatography, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), electrophoresis (including native gel electrophoresis) followed by gel elution, and preparative isoelectric focusing ("Isoprime" machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or more purification techniques may be combined to achieve increased purity.

TNFr/OPG-like polypeptides, including fragments, variants, and/or derivatives thereof may also be prepared by chemical synthesis methods (such as solid phase peptide synthesis) using techniques known in the art, such as those set forth by Merrifield *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149 (1963), Houghten *et al.*, *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 82:5132 (1985), and Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984). Such polypeptides may be synthesized with or without a methionine on the amino terminus. Chemically synthesized TNFr/OPG-like polypeptides may be oxidized using methods set forth in these references to form disulfide bridges. Chemically synthesized TNFr/OPG-like polypeptides are expected to have comparable biological activity to the corresponding TNFr/OPG-like polypeptides produced recombinantly or purified from natural sources, and thus may be used interchangeably with a recombinant or natural TNFr/OPG-like polypeptide.

Another means of obtaining a TNFr/OPG-like polypeptide is via purification from biological samples such as source tissues and/or fluids in which the TNFr/OPG-like polypeptide is naturally found. Such purification can be conducted using methods for protein purification as described herein. The

presence of the TNFr/OPG-like polypeptide during purification may be monitored using, for example, an antibody prepared against recombinantly produced TNFr/OPG-like polypeptide or peptide fragments thereof.

A number of additional methods for producing nucleic acids and polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce polypeptides having specificity for TNFr/OPG-like. See for example, Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12297-12303 (1997), which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. See also Roberts, R., Curr. Opin. Chem. Biol., 3:268-273 (1999). Additionally, U.S. patentPatent No. 5,824,469 describes methods of obtaining oligonucleotides capable of carrying out a specific biological function. The procedure involves generating a heterogeneous pool of oligonucleotides, each having a 5' randomized sequence, a central preselected sequence, and a 3' randomized sequence. The resulting heterogeneous pool is introduced into a population of cells that do not exhibit the desired biological function. Subpopulations of the cells are then screened for those which exhibit a predetermined biological function. From that subpopulation, oligonucleotides capable of carrying out the desired biological function are isolated.

U.S. Patent Nos. 5,763,192, 5,814,476, 5,723,323, and 5,817,483 describe processes for producing peptides or polypeptides. This is done by producing stochastic genes or fragments thereof, and then introducing these genes into host cells which produce one or more proteins encoded by the stochastic genes. The host cells are then screened to identify those clones producing peptides or polypeptides having the desired activity.

Another method for producing peptides or polypeptides is described in PCT/US98/20094 (WO99/15650) filed by Athersys, Inc. Known as "Random Activation of Gene Expression for Gene

Discovery" (RAGE-GD), the process involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by in situ recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell which is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a break at the front of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

It will be appreciated that these methods can also be used to create comprehensive IL-17 like protein expression libraries, which can subsequently be used for high throughput phenotypic screening in a variety of assays, such as biochemical assays, cellular assays, and whole organism assays (e.g., plant, mouse, etc.).

Chemical Derivatives

Chemically modified derivatives of the TNFr/OPG-like polypeptides may be prepared by one skilled in the art, given the disclosures set forth hereinbelow. TNFr/OPG-like polypeptide derivatives are modified in a manner that is different, either in the type or location of the molecules naturally attached to the polypeptide. Derivatives may include molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups. The polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 or 4, or an TNFr/OPG-like polypeptide variant, may be modified by the covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is typically water soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of

polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable. The polymers each may be of any molecular weight and may be branched or unbranched. The polymers each typically have an average molecular weight of between about 2kDa to about 100kDa (the term "about""about" indicating that in preparations of a water soluble polymer, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferablyis between about 5kDa and5kDa, about 50kDa, more preferably between about 12kDa andto about 40kDa and most preferably between about 20kDa andto about 35kDa.

Suitable water soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates,carbohydrates; sugars; phosphates; polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C1-C10) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol),glycol); monomethoxy-polyethylene glycol,glycol; dextran (such as low molecular weight dextran, of, for example about 6 kD), cellulose, or otherdextran of, for example, about 6 kDa);, cellulose; or carbohydrate basedother carbohydrate-based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, a polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymer, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol) and polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional crosslinking molecules which may be used to prepare covalently attached multimers of the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 or 4 or an TNFr/OPG-like polypeptide variant.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for preparing chemical derivatives of polypeptides will generally comprise the steps

of (a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 or 4, or an TNFr/OPG-like polypeptide variant becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction product(s). The optimal reaction conditions will be determined based on known parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of polymer molecules:protein, the greater the percentage of attached polymer molecule. In one embodiment, the TNFr/OPG-like polypeptide derivative may have a single polymer molecule moiety at the amino terminus. See,terminus (see, for example, U.S. Patent No. 5,234,784).

The pegylation of the polypeptide may be specificallymay be carried out by any of the pegylation reactions known in the art, as described for example in the following references: Francis et al., Focus on Growth Factors, 3:4-10 (1992); EP 0154316; EP 0401384 and U.S. Patent No. 4,179,337. For example, pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein. For the acylation reactions, the polymer(s) selected should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, the polymer(s) selected should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono C1-C10 alkoxy or aryloxy derivatives thereof (see U.S. Patent No. 5,252,714).

In another embodiment, TNFr/OPG-like polypeptides may be chemically coupled to biotin, and the biotin/TNFr/OPG-like polypeptide molecules which are conjugated are then allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent

avidin/biotin/TNFr/OPG-like polypeptide molecules. TNFr/OPG-like polypeptides may also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or anti-TNP-IgM to form decameric conjugates with a valency of 10.

Generally, conditions which may be alleviated or modulated by the administration of the present TNFr/OPG-like polypeptide derivatives include those described herein for TNFr/OPG-like polypeptides. However, the AGP-TNFr/OPG-like polypeptide derivatives disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to the non-derivatized molecules.

Microarray

It will be appreciated that DNA microarray technology can be utilized in accordance with the present invention. DNA microarrays are miniature, high density arrays of nucleic acids positioned on a solid support, such as glass. Each cell or element within the array has numerous copies of a single species of DNA which acts as a target for hybridization for its cognate mRNA. In expression profiling using DNA microarray technology, mRNA is first extracted from a cell or tissue sample and then converted enzymatically to fluorescently labeled cDNA. This material is hybridized to the microarray and unbound cDNA is removed by washing. The expression of discrete genes represented on the array is then visualized by quantitating the amount of labeled cDNA which is specifically bound to each target DNA. In this way, the expression of thousands of genes can be quantitated in a high throughput, parallel manner from a single sample of biological material.

This high throughput expression profiling has a broad range of applications with respect to the TNFr/OGP-like molecules of the invention, including, but not limited to: the

identification and validation of TNFr/OGP-like disease-related genes as targets for therapeutics; molecular toxicology of TNFr/OGP-like molecules and inhibitors thereof; stratification of populations and generation of surrogate markers for clinical trials; and the enhancement of TNFr/OGP-like related small molecule drug discovery by aiding in the identification of selective compounds in high throughput screens (HTS).

Selective Binding Agents

As used herein, the term "selective binding agent" reffers to a molecule which has specificity for one or more TNFr/OGP-like polypeptides. Suitable selective binding agents include antibodies and dervatives thereof, polypeptides, and samll molecules. Suitable selective binding agents may be prepared using methods known in the art. An exemplary TNFr/OGP-like polypeptide selective binding agent of the present invention is capable of binding a certain portion of the TNFr/OGP-like polypeptide thereby inhibiting the binding of the polypeptide to the TNFr/OGP-like receptor(s).

Selective binding agents such as antibodies and antibody fragemtns that bind TNFr/OGP-like are within the scope of the present invention. The antibodies may be may be polyclonal including monospecific polyclonal, monoclonal (mAbs), recombinant, chimeric, humanized (such as CDR-grafted), human, single chain, and/or bispecific, as well as fragements, variants, or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody which bind to an epitope on the TNFr/OPG-like polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions.

Polyclonal antibodies directed toward a TNFr/OPG-like polypeptide generally are produced in animals (*e.g.*, rabbits or mice) by means of multiple subcutaneous or intraperitoneal injections of TNFr/OPG-like polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate a TNFr/OPG-like polypeptide, or a variant, fragment, or derivative thereof to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet heocyanin, serum, albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-TNFr/OPG-like antibody titer.

Monoclonal antibodies directed toward TNFr/OPG-like polypeptides are produced using any method which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing monoclonal antibodies include the hybridoma methods of Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495-497 (1975) and the human B-cell hybridoma method, Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987). Also provided by the invention are hybridoma cell lines which produce monoclonal antibodies reactive with TNFr/OPG-like polypeptides.

Monoclonal antibodies of the invention may be modified for use as therapeutics. One embodiment is a "chimeric" antibody in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass.

Also included are fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. See, U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851-6855 (1985).

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. See U.S. patent Nos. 5,585,089 and 5,693,762. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. Humanization can be performed, for example, using methods known in the art (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988)), by substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region (CDR) for the corresponding regions of a human antibody.

Also encompassed by the invention are human antibodies which bind TNFr/OPG-like polypeptides. Using transgentic animals (e.g.) mice that are capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobin production such antibodies are produced by immunization with a TNFr/OPG-like antigen (*i.e.*, having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a carrier. *See* for example, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993). In one method, such transgenic animals are produced by incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin chains therein, and inserting loci encoding human heavy and light chain proteins into the genome thereof. Partially modified animals, that is those having less than the full complement of modifications, are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system

modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human variable regions, including human (rather than e.g., murine) amino acid sequences, including variable regions which are immunospecific for these antigens. See PCT application nos. PCT/US96/05928 and PCT/US93/06926. Additional methods are described in U.S. Patent No. 5,545,807, PCT application nos. PCT/US91/245, PCT/GB89/01207, and in EP 546073B1 and EP 546073A1.

Human antibodies may also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

In an alternate embodiment, human antibdoies can be produced from phage-display libraries (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581 (1991). These processes mimic immune selection through the display of antibody repertoires on the surface of filamentous bacteriophage, and subsequent selection of phage by their binding to an antigen of choice. One such technique is described in PCT Application no. PCT/US98/17364, which describes the isolation of high affinity and functional agonistic antibodies for MPL- and msk- receptors using such an approach.

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein. In a preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO cells. Monoclonal (e.g. human) antibodies may be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-TNFr/OGP-like antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of TNFr/OPG-like polypeptides. The antibodies will bind TNFr/OGP-like polypeptides with an affinity which is appropriate for the assay method being employed.

For diagnostic applications, in certain embodiments, anti-TNFr/OPG-like antibodies typically will be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one which is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, or ^{125}I, a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; or an enzyme, such as alkaline phosphatase, β-galactosidase, or horseradish peroxidase. Bayer *et al.*, *Meth. Enz.*, 184: 138-163 (1990

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard (e.g., a TNFr/OPG-like polypeptide, or an immunologically reactive portion thereof) to compete with the test sample analyte (a TNFr/OPG-like polypeptide) for binding with a limited amount of anti TNFr/OPG-like antibody. The amount of a TNFr/OPG-like polypeptide in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies typically are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte which remain unbound.

Sandwich assays typically involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected and/or quantitated. In a sandwich assay, the test sample analyte is typically bound by a first antibody which is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three part complex. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assays). For example, one type of sandwich assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which case the detectable moiety is an enzyme.

The selective binding agents of the invention, including TNFr/OGP-like antibodies, may be used as therapeutics. These therapeutic agents are generally agonists or antagonists, in that they either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of a TNFr/OPG-like polypeptide. In one embodiment, antagonist antibodies of the invention are antibodies or binding fragments thereof which are capable of specifically binding to a TNFr/OPG-like polypeptide and which are capable of inhibiting or eliminating the functional activity of a TNFr/OPG-like polypeptide *in vivo* or *in vitro*. In preferred embodiments, the selctive binidng agent *e.g.*, an antagonist antibody will inhibit the functional activity of a TNFr/OPG-like polypeptide by at least about 50%, and preferably by at least about 80%. In another embodiment, the selective binding agent may be an antibody that is capable of interacting with a TNFr/OPG-like binding partner (a ligand or receptor) thereby inhibiting or eliminating TNFr/OPG-like activity *in vitro* or *in vivo*. Selective binding agents, including agonist and antagonist anti-TNFr/OPG-like antibodies

are identified by screening assays which are well known in the art.

The anti-TNFr/OPG-like antibodies of the invention also are useful for *in vivo* imaging. An antibody labeled with a detectable moiety may be administered to an animal, preferably into the bloodstream, and the presence and location of the labeled antibody in the host is assayed. The antibody may be labeled with any moiety that is detectable in an animal, whether by nuclear magnetic resonance, radiology, or other detection means known in the art.

The invention also relates to a kit comprising TNFr/OPG-like selective binding agents (such as antibodies) and other reagents useful for detecting TNFr/OPG-like polypeptide levels in biological samples. Such reagents may include a secondary activity, a detectable label, blocking serum, positive and negative control samples, and detection reagents.

As noted, the TNFr/OPG-like receptor(s) recited herein are useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the TNFr/OPG-like signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble TNFr/OPG-like receptor(s), anti-TNFr/OPG-like receptor antibodies, small molecules, or antisense oligonucleotides, and they may also be used for treating one or more of the diseases/disorders described herein.

Additional Agonist and Antagonist Molecules

As defined herein, agonist or antagonist molecules either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of a TNFr/OPG-like polypeptide. Antagonists are capable of interacting with the TNFr/OPG-like receptor itself and/or with a TNFr/OPG-like binding partner (such as a ligand or receptor), thereby inhibiting or

eliminating TNFr/OPG-like polypeptide activity *in vitro* or *in vivo*. Agonists are those molecules that can specifically bind to the TNFr/OPG-like molecule and function like their native ligands to activate the receptor. Agonists can also interact with a TNFr/OPG-like binding partner (such as a ligand) to enhance its binding to the TNFr/OPG-like polypeptides, thereby enhancing the biological activity of the TNFr/OPG-like molecule. It will be appreciated that the agonists and antagonists described herein are not limited to selective binding agents. In addition to selective binding agents, other suitable agonist and antagonist molecules include, but are not limited to, soluble TNFr/OPG-like polypeptides, small molecules, and antisense oligonucleotides, any of which can be used for treating one or more disease or disorder, including those described herein.

TNFr/OPG-like polypeptides can be used to clone TNFr/OPG-like ligand(s) using an "expression cloning" strategy. Radiolabeled (125-Iodine) TNFr/OPG-like polypeptide or "affinity/activity-tagged" TNFr/OPG-like polypeptide (such as an Fc fusion or an alkaline phosphatase fusion) can be used in binding assays to identify a cell type or a cell line or tissue that expresses TNFr/OPG-like ligand(s). RNA isolated from such cells or tissues can then be converted to cDNA, cloned into a mammalian expression vector, and transfected into mammalian cells (for example, COS, or 293) to create an expression library. Radiolabeled or tagged TNFr/OPG-like polypeptide can then be used as an affinity reagent to identify and isolate the subset of cells in this library expressing TNFr/OPG-like ligand(s). DNA is then isolated from these cells and transfected into mammalian cells to create a secondary expression library in which the fraction of cells expressing TNFr/OPG-like ligand(s) would be many-fold higher than in the original library. This enrichment process can be repeated iteratively until a single recombinant clone

containing a TNFr/OPG-like ligand is isolated. Isolation of TNFr/OPG-like ligand(s) is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the TNFr/OPG-like signaling pathway. Such agonists and antagonists include TNFr/OPG-like ligand(s), anti-TNFr/OPG-like ligand antibodies, small molecules or antisense oligonucleotides.

Genetically Engineered Non-Human Animals

Additionally included within the scope of the present invention are non-human animals such as mice, rats, or other rodents, rabbits, goats, or sheep, or other farm animals, in which the gene (or genes) encoding a native TNFr/OPG-like polypeptide has (have) been disrupted ("knocked out") such that the level of expression of this gene or genes is (are) significantly decreased or completely abolished. Such animals may be prepared using techniques and methods such as those described in U.S. Patent No. 5,557,032.

The present invention further includes non-human animals such as mice, rats, or other rodents, rabbits, goats, or sheep, or other farm animals, in which either the native form of the TNFr/OPG-like polypeptide gene(s) for that animal or a heterologous TNFr/OPG-like polypeptide gene(s) is (are) over expressed by the animal, thereby creating a "transgenic" animal. Such transgenic animals may be prepared using well known methods such as those described in U.S. Patent No 5,489,743 and PCT application No. WO94/28122.

The present invention further includes non-human animals in which the promoter for one or more of the TNFr/OPG-like polypeptides of the present invention is either activated or inactivated (e.g., by using homologous recombination methods) to alter the level of expression of one or more of the native TNFr/OPG-like polypeptides.

These non-human animals may be used for drug candidate screening. In such screening, the impact of a drug candidate on the animal may be measured. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the TNFr/OPG-like polypeptide gene. In certain embodiments, the amount of TNFr/OPG-like polypeptide, or a fragment(s), that is produced may be measured after the exposure of the animal to the drug candidate. Additionally, in certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the animal. For example, the overexpression of a particular gene may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a pathological condition. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product or its ability to prevent or inhibit a pathological condition.

Assaying for Other Modulators of TNFr/OPG-Like Polypeptide Activity

In some situations, it may be desirable to identify molecules that are modulators, *i.e.*, agonists or antagonists, of the activity of TNFr/OPG-like polypeptide. Natural or synthetic molecules that modulate TNFr/OPG-like polypeptides may be identified using one or more screening assays, such as those described herein. Such molecules may be administered either in an *ex vivo* manner, or in an *in vivo* manner by injection, or by oral delivery, implantation device, or the like.

"Test molecule(s)" refers to the molecule(s) that is/are under evaluation for the ability to modulate (*i.e.*, increase or decrease) the activity of a TNFr/OPG-like polypeptide. Most commonly, a test molecule will interact directly with a TNFr/OPG-like polypeptide. However, it is also contemplated that a test molecule may also modulate TNFr/OPG-like polypeptide activity indirectly, such as by affecting TNFr/OPG-like gene expression, or by binding to a TNFr/OPG-like binding partner (*e.g.*, receptor or ligand). In one embodiment, a test molecule will bind to a TNFr/OPG-like polypeptide with an affinity constant of at least about 10^{-6} M, preferably about 10^{-8} M, more preferably about 10^{-9} M, and even more preferably about 10^{-10} M.

Methods for identifying compounds which interact with TNFr/OPG-like polypeptides are encompassed by the present invention. In certain embodiments, a TNFr/OPG-like polypeptide is incubated with a test molecule under conditions which permit the interaction of the test molecule with a TNFr/OPG-like polypeptide, and the extent of the interaction can be measured. The test molecule(s) can be screened in a substantially purified form or in a crude mixture. Test molecule(s) can be nucleic acid molecules, proteins, peptides, carbohydrates, lipids, or small molecular weight organic or inorganic compounds. Once a set of test molecules has been identified as interacting with a TNFr/OPG-like polypeptide, the molecules may be further evaluated for their ability to increase or decrease TNFr/OPG-like polypeptide activity.

The measurement of the interaction of test molecules with TNFr/OPG-like polypeptides may be carried out in several formats, including cell-based binding assays, membrane binding assays, solution-phase assays and immunoassays. In general, test molecules are incubated with a TNFr/OPG-like polypeptide for a specified period of time, and TNFr/OPG-like polypeptide

activity is determined by one or more assays described herein for measuring biological activity.

The interaction of test molecules with TNFr/OPG-like polypeptides may also be assayed directly using polyclonal or monoclonal antibodies in an immunoassay. Alternatively, modified forms of TNFr/OPG-like polypeptides containing epitope tags as described herein may be used in solution and immunoassays.

In certain embodiments, a TNFr/OPG-like polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule which interacts with TNFr/OPG-like polypeptide to regulate its activity. Potential protein antagonists of TNFr/OPG-like polypeptide include antibodies which interact with active regions of the polypeptide and inhibit or eliminate at least one activity of TNFr/OPG-like molecules. Molecules which regulate TNFr/OPG-like polypeptide expression include nucleic acids which are complementary to nucleic acids encoding a TNFr/OPG-like polypeptide, or are complementary to nucleic acids sequences which direct or control the expression of TNFr/OPG-like polypeptide, and which act as anti-sense regulators of expression.

In the event that TNFr/OPG-like polypeptides display biological activity through an interaction with a binding partner (e.g., a ligand), a variety of *in vitro* assays may be used to measure the binding of a TNFr/OPG-like polypeptide to the corresponding binding partner (such as a selective binding agent or ligand). These assays may be used to screen test molecules for their ability to increase or decrease the rate and/or the extent of binding of a TNFr/OPG-like polypeptide to its binding partner. In one assay, a TNFr/OPG-like polypeptide is immobilized in the wells of a microtiter plate. Radiolabeled TNFr/OPG-like binding partner (for example,

iodinated TNFr/OPG-like binding partner) and the test molecule(s) can then be added either one at a time (in either order) or simultaneously to the wells. After incubation, the wells can be washed and counted, using a scintillation counter, for radioactivity to determine the extent to which the binding partner bound to TNFr/OPG-like polypeptide. Typically, the molecules will be tested over a range of concentrations, and a series of control wells lacking one or more elements of the test assays can be used for accuracy in the evaluation of the results. An alternative to this method involves reversing the "positions" of the polypeptides, i.e., immobilizing TNFr/OPG-like binding partner to the microtiter plate wells, incubating with the test molecule and radiolabeled TNFr/OPG-like polypeptide, and determining the extent of TNFr/OPG-like polypeptide binding. See, for example, chapter 18, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, New York, NY (1995).

As an alternative to radiolabelling, a TNFr/OPG-like polypeptide or its binding partner may be conjugated to biotin and the presence of biotinylated protein can then be detected using streptavidin linked to an enzyme, such as horseradish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP), that can be detected colorometrically, or by fluorescent tagging of streptavidin. An antibody directed to a TNFr/OPG-like polypeptide or to a TNFr/OPG-like binding partner and conjugated to biotin may also be used and can be detected after incubation with enzyme-linked streptavidin linked to AP or HRP.

A TNFr/OPG-like polypeptide and a TNFr/OPG-like binding partner can also be immobilized by attachment to agarose beads, acrylic beads or other types of such inert solid phase substrates. The substrate-protein complex can be placed in a solution containing the complementary protein and the test

compound. After incubation, the beads can be precipitated by centrifugation, and the amount of binding between a TNFr/OPG-like polypeptide and its binding partner can be assessed using the methods described herein. Alternatively, the substrate-protein complex can be immobilized in a column, and the test molecule and complementary protein are passed through the column. The formation of a complex between a TNFr/OPG-like polypeptide and its binding partner can then be assessed using any of the techniques set forth herein, *i.e.*, radiolabelling, antibody binding, or the like.

Another *in vitro* assay that is useful for identifying a test molecule which increases or decreases the formation of a complex between a TNFr/OPG-like binding polypeptide and a TNFr/OPG-like binding partner is a surface plasmon resonance detector system such as the BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway, NJ). The BIAcore system may be carried out using the manufacturer's protocol. This assay essentially involves the covalent binding of either TNFr/OPG-like polypeptide or a TNFr/OPG-like binding partner to a dextran-coated sensor chip which is located in a detector. The test compound and the other complementary protein can then be injected, either simultaneously or sequentially, into the chamber containing the sensor chip. The amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass which is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip; the change in molecular mass can be measured by the detector system.

In some cases, it may be desirable to evaluate two or more test compounds together for their ability to increase or decrease the formation of a complex between a TNFr/OPG-like polypeptide and a TNFr/OPG-like binding partner. In these cases, the assays set forth herein can be readily modified by adding such additional test compound(s) either simultaneous

with, or subsequent to, the first test compound. The remainder of the steps in the assay are as set forth herein.

In vitro assays such as those described herein may be used advantageously to screen large numbers of compounds for effects on complex formation by TNFr/OPG-like polypeptide and TNFr/OPG-like binding partner. The assays may be automated to screen compounds generated in phage display, synthetic peptide, and chemical synthesis libraries.

Compounds which increase or decrease the formation of a complex between a TNFr/OPG-like polypeptide and a TNFr/OPG-like binding partner may also be screened in cell culture using cells and cell lines expressing either TNFr/OPG-like polypeptide or TNFr/OPG-like binding partner. Cells and cell lines may be obtained from any mammal, but preferably will be from human or other primate, canine, or rodent sources. The binding of a TNFr/OPG-like polypeptide to cells expressing TNFr/OPG-like binding partner at the surface is evaluated in the presence or absence of test molecules, and the extent of binding may be determined by, for example, flow cytometry using a biotinylated antibody to a TNFr/OPG-like binding partner. Cell culture assays can be used advantageously to further evaluate compounds that score positive in protein binding assays described herein.

Cell cultures can also be used to screen the impact of a drug candidate. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the TNFr/OPG-like polypeptide gene. In certain embodiments, the amount of TNFr/OPG-like polypeptide or a fragment(s) that is produced may be measured after exposure of the cell culture to the drug candidate. In certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the cell culture. For example, the overexpression of a particular gene may have a particular impact on the cell culture. In such cases, one may test a

drug candidate's ability to increase or decrease the expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a particular impact on the cell culture. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product in a cell culture.

A yeast two-hybrid system (Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9583, 1991) can be used to identify novel polypeptides that bind to, or interact with, TNFr/OPG-like polypeptides. As an example, a yeast-two hybrid bait construct can be generated in a vector (such as the pAS2-1 from Clontech) which encodes a yeast GAL4-DNA binding domain fused to the TNFr/OPG-like polynucleotide. This bait construct may be used to screen human cDNA libraries wherein the cDNA library sequences are fused to GAL4 activation domains. Positive interactions will result in the activation of a reporter gene such as -Gal. Positive clones emerging from the screening may be characterized further to identify interacting proteins.

P38 Inhibitors

A new approach to intervention between the extracellular stimulus and the secretion of IL-1 and TNF from the cell involves blocking signal transduction through inhibition of a kinase which lies on the signal pathway. One example is through inhibition of P-38 (also called "RK" or "SAPK-2", Lee et al., Nature, 372:739 (1994)), a known ser/thr kinase (clone reported in Han et al., Biochimica Biophysica Acta, 1265:224-227 (1995)). A linear relationship has been shown for effectiveness in a competitive binding assay to P-38, and the same inhibitor diminishing the levels of IL-1 secretion from

monocytes following LPS stimulation. Following LPS stimulation of monocytes, the levels of messenger RNA for TNF-a have been shown to increase 100 fold, but the protein levels of TNF-a are increased 10,000 fold. Thus, a considerable amplification of the TNF signaling occurs at the translational level. Following LPS stimulation of monocytes in the presence of a P-38 inhibitor, the levels of mRNA are not affected, but the levels of final TNF protein are dramatically reduced (up to 80-90% depending on the effectiveness of the P-38 inhibitor). Thus, the above experiments lend strong support to the conclusion that inhibition of P-38 leads to diminished translational efficiency. Further evidence that TNF is under translational control is found in the deletion experiments of Beutler et al. and Lee, wherein segments of 3' untranslated mRNA (3' UTR) are removed resulting in high translational efficiency for TNF. More importantly, the P-38 inhibitors did not have an effect on the level of TNF (i.e., translational efficiency) when the appropriate segments of TNF mRNA are deleted. Thus, the correlative data between the level of binding of inhibitors to P-38 and the diminished IL-1 and TNF levels following LPS stimulation with the same inhibitors, plus the above biochemical evidence regarding the effect of P-38 inhibitors on translational efficiency of both TNF and IL-1 make a strong cause and effect relationship. The role of P-38 in the cell is still being delineated; so therefore, other beneficial effects regarding inflammatory diseases or other disease states obtained from its inhibition maybe forthcoming.

Elevated levels of TNF and/or IL-1 may contribute to the onset, etiology, or exacerbate a number of disease states, including, but not limited to: rheumatoid arthritis; osteoarthritis; rheumatoid spondylitis; gouty arthritis; inflammatory bowel disease; adult respiratory distress syndrome (ARDS); psoriasis; Crohn's disease; allergic rhinitis; ulcerative colitis; anaphylaxis; contact dermatitis;

asthma; antiviral therapy including those viruses sensitive to TNF inhibition - HIV-1, HIV-2, HIV-3, cytomegalovirus (CMV), influenza, adenovirus, and the herpes viruses including HSV-1, HSV-2, and herpes zoster; muscle degeneration; cachexia; Reiter's syndrome; type II diabetes; bone resorption diseases; graft vs. host reaction; ischemia reperfusion injury; atherosclerosis; brain trauma; Alzheimer's disease; multiple sclerosis; cerebral malaria; sepsis; septic shock; toxic shock syndrome; fever and mylagias due to infection.

Substituted imidazole, pyrrole, pyridine, pyrimidine and the like compounds have been described for use in the treatment of cytokine mediated diseases by inhibition of proinflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6, IL-8 and TNF. Substituted imidazoles for use in the treatment of cytokine mediated diseases have been described in U.S. Patent No. 5,593,992; WO 93/14081; WO 97/18626; WO 96/21452; WO 96/21654; WO 96/40143; WO 97/05878; WO 97/05878; (each of which is incorporated herein by reference in its entirety). Substituted imidazoles for use in the treatment of inflammation has been described in US Pat. 3,929,807 (which is incorporated herein by reference in its entirety). Substituted pyrrole compounds for use in the treatment of cytokine mediated diseases have been described in WO 97/05877; WO 97/05878; WO 97/16426; WO 97/16441; and WO 97/16442 (each of which is incorporated herein by reference in its entirety). Substituted aryl and heteroaryl fused pyrrole compounds for use in the treatment of cytokine mediated diseases have been described in WO 98/22457 (which is incorporated herein by reference in its entirety). Substituted pyridine, pyrimidine, pyrimidinone and pyridazine compounds for use in the treatment of cytokine mediated diseases have been described in WO 98/24780; WO 98/24782; WO 99/24404; and WO 99/32448 (each of which is incorporated herein by reference in its entirety).

Internalizing Proteins

The tat protein sequence (from HIV) can be used to internalize proteins into a cell. See e.g., Falwell et al., Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 91:664-668 (1994). For example, an 11 amino acid sequence (YGRKKRRQRRR: SEQ ID NO: 21) of the HIV tat protein (termed the "protein"protein transduction domain",domain", or TAT PDT) has been described as mediating delivery across the cytoplasmic membrane and the nuclear membrane of a cell. See Schwarze et al., Science,285:1569-285:1569-1572 (1999); and Nagahara et al., Nature Medicine, 4:1449-1452 (1998). In these procedures, FITC-constructs (FITC-GGGGYGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 22) are prepared which bind to cells as observed by fluorescence-fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, and these constructs penetrate tissues after i.p. adminstration. Next, tat-bgal fusion proteins are constructed. Cells treated with this construct demonstrated b-gal activity. Following injection, a number of tissues, including liver, kidney, lung, heart, and brain tissue, have been found to demonstrate expression using these procedures. It is believed that these constructions underwent some degree of unfolding in order to enter the cell; as such, refolding may be required after entering the cell.

It will thus be appreciated that the tat protein sequence may be used to internalize a desired protein or polypeptide into a cell. For example, using the tat protein sequence, an TNFr/OPG-like antagonist (such as an anti-TNFr/OPG-like selective binding agent, small molecule, soluble receptor, or antisense oligonucleotide) can be administered intracellularly to inhibit the activity of an TNFr/OPG-like molecule. As used herein, the term "TNFr/OPG-like molecule" refers to both TNFr/OPG-like nucleic acid molecules and TNFr/OPG-like polypeptides as defined herein. Where desired, the TNFr/OPG-like protein itself may also be internally administered to a

cell using these procedures. See also, Strauss, E., "Introducing Proteins Into the Body's Cells", Science, 285:1466-1467 (1999).

Cell Source Identification Using TNFr/OPG-Like Polypeptides

In accordance with certain embodiments of the invention, it may be useful to be able to determine the source of a certain cell type associated with a TNFr/OPG-like polypeptide. For example, it may be useful to determine the origin of a disease or pathological condition as an aid in selecting an appropriate therapy. In other embodiments, one may use the TNFr/OPG-like polypeptide to make antibodies that are specific for TNFr/OPG-like polypeptide.

Therapeutic Uses

Bone tissue provides support for the body and consists of mineral (largely calcium and phosphorous), a matrix of collagenous and noncollagenous proteins, and cells. Three types of cells found in bone, osteocytes, osteoblasts, and osteoclasts, are involved in the dynamic process by which bone is continually formed and resorbed. Osteoblasts promote formation of bone tissue whereas osteoclasts are associated with resorption. Resorption, or the dissolution of bone matrix and mineral, is a fast and efficient process compared to bone formation and can release large amounts of mineral from bone. Osteoclasts are involved in the regulation of the normal remodeling of skeletal tissue and in resorption induced by hormones. For instance, resorption is stimulated by the secretion of parathyroid hormone in response to decreasing concentrations of calcium ion in extracellular fluids. In contrast, inhibition of resorption is the principal function of calcitonin. In addition, metabolites of vitamin D alter the responsiveness of bone to parathyroid hormone and calcitonin.

Following skeletal maturity, the amount of bone in the skeleton reflects the balance (or imbalance) of bone formation and bone resorption. Peak bone mass occurs after skeletal maturity prior to the fourth decade. Between the fourth and fifth decades, the equilibrium shifts and bone resorption dominates. The inevitable decrease in bone mass with advancing years starts earlier in females than males and is distinctly accelerated after menopause in some females (principally those of Caucasian and Asian descent).

Osteopenia is a condition relating generally to any decrease in bone mass to below normal levels. Such a condition may arise from a decrease in the rate of bone synthesis or an increase in the rate of bone destruction or both. The most common form of osteopenia is primary osteoporosis, also referred to as postmenopausal and senile osteoporosis. This form of osteoporosis is a consequence of the universal loss of bone with age and is usually a result of increase in bone resorption with a normal rate of bone formation. About 25 to 30 percent of all white females in the United States develop symptomatic osteoporosis. A direct relationship exists between osteoporosis and the incidence of hip, femoral, neck, and inter-trochanteric fracture in women 45 years and older. Elderly males develop symptomatic osteoporosis between the ages of 50 and 70, but the disease primarily affects females.

The cause of postmenopausal and senile osteoporosis is unknown. Several factors have been identified which may contribute to the condition. They include alteration in hormone levels accompanying aging, and inadequate calcium consumption attributed to decreased intestinal absorption of calcium and other minerals. Treatments have usually included hormone therapy or dietary supplements in an attempt to retard the process. To date, however, an effective treatment for bone loss does not exist.

The invention provides for a method of treating, preventing, or diagnosing the diseases and disorders recited herein using a therapeutically effective amount of TNFr/OPG-like polypeptide. By way of example, the disease or disorder may be any disease or disorder characterized by a net bone loss (such as osteopenia or osteolysis). TNFr/OPG-like polypeptides may be used for example to suppress the rate of bone resorption. Thus, treatment may be done to reduce the rate of bone resorption where the resorption rate is above normal, or to reduce bone resorption to below normal levels in order to compensate for below normal levels of bone formation.

Conditions which are treatable with TNFr/OPG-like polypeptides include the following:

- Osteoporosis, such as primary osteoporosis, endocrine osteoporosis (hyperthyroidism, hyperparathryoidism, Cushing's syndrome, and acromegaly), hereditary and congenital forms of osteoporosis (osteogenesis imperfecta, homocystinuria, Menkes' syndrome, and Riley-Day syndrome), and osteoporosis due to immobilization of extremities.
- Paget's disease of bone (osteitis deformans) in adults and juveniles;
- Osteomyelitis, or an infectious lesion in bone, leading to bone loss;
- Hypercalcemia resulting from solid tumors (breast, lung, and kidney) and hematologic malignacies (multiple myeloma, lymphoma, and leukemia), idiopathic hypercalcemia, and hypercalcemia associated with hyperthryoidism and renal function disorders;
- Osteopenia following surgery, induced by steroid administration, and associated with disorders of the

small and large intestine and with chronic hepatic and renal diseases;

- Osteonecrosis, or bone cell death, associated with traumatic injury or nontraumatic necrosis associated with Gaucher's disease, sickle cell anemia, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, periodontal disease, osteolytic metastasis, and other conditions.

Other diseases associated with undesirable levels of one or more of TNF, OPG, IL-1, and/or the present TNFr/OPG-like polypeptide itself are encompassed within the scope of the invention. Undesirable levels include excessive and/or sub-normal levels of TNF, OPG, IL-1, and/or the present TNFr/OPG-like polypeptides described herein.

It is understood that the TNFr/OPG-like polypeptides may be used alone or in conjunction with other factors for the treatment of bone disorders. In one embodiment, TNFr/OPG-like polypeptides are used in conjunction with a therapeutically effective amount of one or more agents which stimulate bone formation or decrease bone destruction. Such agents include, but are not limited to, the bone morphogenic factors (BMP's) designated BMP-1 through BMP-12; transforming growth factor-β (TGF-β) and TGF-β family members; interleukin-1 (IL-1) inhibitors; TNF-α inhibitors; parathyroid hormone and analogs thereof, parathyroid related protein and analogs thereof; E series prostaglandins; bisphosphonates (such as alendronate and others); bone-enhancing minerals such as fluoride and calcium; non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including COX-2 inhibitors, such as Celebrex™ and Vioxx™; immunosuppressants, such as methotrexate or leflunomide; serine protease inhibitors such as secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI); IL-6 inhibitors (*e.g.*, antibodies to IL-6), IL-8 inhibitors (*e.g.*, antibodies to IL-8); IL-18

inhibitors (*e.g.*, IL-18 binding protein or IL-18 antibodies); interleukin-1 converting enzyme (ICE) modulators; fibroblast growth factors FGF-1 to FGF-10 and FGF modulators; PAF antagonists; keratinocyte growth factor (KGF), KGF-related molecules, or KGF modulators; matrix metalloproteinase (MMP) modulators; Nitric oxide synthase (NOS) modulators, including modulators of inducible NOS; modulators of glucocorticoid receptor; modulators of glutamate receptor; modulators of lipopolysaccharide (LPS) levels; and noradrenaline and modulators and mimetics thereof.

A non-exclusive list of acute and chronic diseases treatable in accordance with the invention include, but is not limited to, the following: cachexia/anorexia; cancer (*e.g.*, leukemias); chronic fatigue syndrome; coronary conditions and indications, including congestive heart failure, coronary restenosis, myocardial infarction, and coronary artery bypass graft; depression; diabetes (*e.g.*, juvenile onset Type 1 and diabetes mellitus); endometriosis, endometritis, and related conditions; fibromyalgia or analgesia; graft versus host rejection; hyperalgesia; inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and *Clostridium difficile*-associated diarrhea; ischemic, including cerebral ischemia (brain injury as a result of trauma, epilepsy, hemorrhage or stroke, each of which may lead to neurodegeneration); lung diseases (*e.g.*, adult respiratory distress syndrome, asthma, and pulmonary fibrosis); multiple sclerosis; neuroinflammatory diseases; ocular diseases and conditions, including corneal transplant, ocular degeneration and uveitis; pain, including cancer-related pain; pancreatitis; periodontal diseases; prostatitis (bacterial or non-bacterial) and related conditions; psoriasis and related conditions; pulmonary fibrosis; reperfusion injury; rheumatic diseases (*e.g.*, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, juvenile (rheumatoid) arthritis, seronegative polyarthritis, ankylosing spondylitis, Reiter's syndrome and

reactive arthritis, Still's disease, psoriatic arthritis, enteropathic arthritis, polymyositis, dermatomyositis, scleroderma, systemic sclerosis, vasculitis (*e.g.*, Kawasaki's disease), cerebral vasculitis, Lyme disease, staphylococcal-induced ("septic") arthritis, Sjögren's syndrome, rheumatic fever, polychondritis and polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis); septic shock; side effects from radiation therapy; systemic lupus erythematosus; temporal mandibular joint disease; thyroiditis; tissue transplantation or an inflammatory condition resulting from strain, sprain, cartilage damage, trauma, orthopedic surgery, infection (*e.g.*, HIV, *Clostridium difficile* and related species) or other disease process.

As contemplated by the present invention, a TNFr/OPG-like polypeptide may be administered as an adjunct to other therapy and also with other pharmaceutical agents suitable for the indication being treated. A TNFr/OPG-like polypeptide and any of one or more additional therapies or pharmaceutical agents may be administered separately, sequentially, or simultaneously.

In a specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more interleukin 1 inhibitors for the treatment of TNF-responsive disease. Classes of interleukin-1 inhibitors include interleukin-1 receptor antagonists (any compound capable of specifically preventing activation of cellular receptors to IL-1) such as IL-1ra, as described herein; anti-IL-1 receptor monoclonal antibodies (*e.g.*, EP 623674, the disclosure of which is hereby incorporated by reference); IL-1 binding proteins such as soluble IL-1 receptors (*e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,492,888, 5,488,032, 5,464,937, 5,319,071 and 5,180,812, the disclosures of which are hereby incorporated by reference); anti-IL-1

monoclonal antibodies (*e.g.*, WO 95/01997, WO 94/02627, WO 90/06371, U.S. Patent No. 4,935,343, EP 364778, EP 267611 and EP 220063, the disclosures of which are hereby incorporated by reference); IL-1 receptor accessory proteins (*e.g.*, WO 96/23067), and other compounds and proteins which block *in vivo* synthesis or extracellular release of IL-1.

Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is a human protein that acts as a natural inhibitor of interleukin-1. Interleukin-1 receptor antagonists, as well as the methods of making and methods of using thereof, are described in U.S. Patent No. 5,075,222; WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221; WO 93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626; WO 94/20517; WO 96/22793 and WO 97/28828, the disclosures of which are incorporated herein by reference. The proteins include glycosylated as well as non-glycosylated IL-1 receptor antagonists.

Specifically, three exemplary forms of IL-1ra (IL-1raα, IL-1raβ and IL-1rax), are disclosed and described in U.S. Patent No. 5,075,222. Methods for producing IL-1 inhibitors, particularly IL-1ras, are also disclosed in the 5,075,222 patent.

An additional class of interleukin-1 inhibitors includes compounds capable of specifically preventing activation of cellular receptors to IL-1. Such compounds include IL-1 binding proteins, such as soluble receptors and monoclonal antibodies. Such compounds also include monoclonal antibodies to the receptors.

A further class of interleukin-1 inhibitors includes compounds and proteins which block *in vivo* synthesis and/or extracellular release of IL-1. Such compounds include agents which affect transcription of IL-1 genes or processing of IL-1 preproteins.

In a specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with secreted or soluble human fas antigen or recombinant versions thereof (WO 96/20206 and Mountz et al., *J. Immunology*, 155:4829-4837; and EP 510 691). WO 96/20206 discloses secreted human fas antigen (native and recombinant, including an Ig fusion protein), methods for isolating the genes responsible for coding the soluble recombinant human fas antigen, methods for cloning the gene in suitable vectors and cell types, and methods for expressing the gene to produce the inhibitors. EP 510 691 teaches DNAs coding for human fas antigen, including soluble fas antigen, vectors expressing for said DNAs and transformants transfected with the vector. When administered parenterally, doses of a secreted or soluble fas antigen fusion protein each are generally from about 1 microgram/kg to about 100 micrograms/kg.

Present treatment of diseases associated with TNF, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases, commonly involves the use of first line drugs for control of pain and inflammation; these drugs are classified as non-steroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Secondary treatments include corticosteroids, slow acting antirheumatic drugs (SAARDs) or disease modifying (DM) drugs. Information regarding the following compounds can be found in The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Sixteenth Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, NJ (1992) and in Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.

In a specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide and any of one or more NSAIDs for the treatment of the diseases and disorder recited herein, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases; and graft versus host disease. NSAIDs owe their anti-inflammatory action, at least

in part, to the inhibition of prostaglandin synthesis (Goodman and Gilman in "The Pharmacological Basis of Therapeutics," MacMillan 7th Edition (1985)). NSAIDs can be characterized into at least nine groups: (1) salicylic acid derivatives; (2) propionic acid derivatives; (3) acetic acid derivatives; (4) fenamic acid derivatives; (5) carboxylic acid derivatives; (6) butyric acid derivatives; (7) oxicams; (8) pyrazoles and (9) pyrazolones.

In another embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more salicylic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. Such salicylic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: acetaminosalol, aloxiprin, aspirin, benorylate, bromosaligenin, calcium acetylsalicylate, choline magnesium trisalicylate, magnesium salicylate, choline salicylate, diflusinal, etersalate, fendosal, gentisic acid, glycol salicylate, imidazole salicylate, lysine acetylsalicylate, mesalamine, morpholine salicylate, 1-naphthyl salicylate, olsalazine, parsalmide, phenyl acetylsalicylate, phenyl salicylate, salacetamide, salicylamide O-acetic acid, salsalate, sodium_salicylate and sulfasalazine. Structurally related salicylic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In an additional specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more propionic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The propionic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: alminoprofen, benoxaprofen, bucloxic acid, carprofen,

dexindoprofen, fenoprofen, flunoxaprofen, fluprofen, flurbiprofen, furcloprofen, ibuprofen, ibuprofen aluminum, ibuproxam, indoprofen, isoprofen, ketoprofen, loxoprofen, miroprofen, naproxen, naproxen sodium, oxaprozin, piketoprofen, pimeprofen, pirprofen, pranoprofen, protizinic acid, pyridoxiprofen, suprofen, tiaprofenic acid and tioxaprofen. Structurally related propionic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more acetic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The acetic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: acemetacin, alclofenac, amfenac, bufexamac, cinmetacin, clopirac, delmetacin, diclofenac potassium, diclofenac sodium, etodolac, felbinac, fenclofenac, fenclorac, fenclozic acid, fentiazac, furofenac, glucametacin, ibufenac, indomethacin, isofezolac, isoxepac, lonazolac, metiazinic acid, oxametacin, oxpinac, pimetacin, proglumetacin, sulindac, talmetacin, tiaramide, tiopinac, tolmetin, tolmetin sodium, zidometacin and zomepirac. Structurally related acetic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In yet another more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more fenamic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The fenamic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: enfenamic acid, etofenamate, flufenamic acid, isonixin,

meclofenamic acid, meclofenamate sodium, medofenamic acid, mefenamic acid, niflumic acid, talniflumate, terofenamate, tolfenamic acid and ufenamate. Structurally related fenamic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In still another more specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more carboxylic acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The carboxylic acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof which can be used comprise: clidanac, diflunisal, flufenisal, inoridine, ketorolac and tinoridine. Structurally related carboxylic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more butyric acid derivatives, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The butyric acid derivatives, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: bumadizon, butibufen, fenbufen and xenbucin. Structurally related butyric acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In a further specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more oxicams, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The oxicams,

prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam and 4-hydroxyl-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide 4-(N-phenyl]-carboxamide. Structurally related oxicams having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In still another specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more pyrazoles, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The pyrazoles, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof which may be used comprise: difenamizole and epirizole. Structurally related pyrazoles having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In an additional specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more pyrazolones, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof. The pyrazolones, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof which may be used comprise: apazone, azapropazone, benzpiperylon, feprazone, mofebutazone, morazone, oxyphenbutazone, phenylbutazone, pipebuzone, propylphenazone, ramifenazone, suxibuzone and thiazolinobutazone. Structurally related pyrazalones having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more of the following NSAIDs:

ε-acetamidocaproic acid, S-adenosylmethionine, 3-amino-4-hydroxybutyric acid, amixetrine, anitrazafen, antrafenine, bendazac, bendazac lysinate, benzydamine, beprozin, broperamole, buccolome, bufezolac, ciproquazone, cloximate, dazidamine, deboxamet, detomidine, difenpiramide, difenpyramide, difisalamine, ditazol, emorfazone, fanetizole mesylate, fenflumizole, floctafenine, flumizole, flunixin, fluproquazone, fopirtoline, fosfosal, guaimesal, guaiazolene, isonixirn, lefetamine HCl, leflunomide, lofemizole, lotifazole, lysin clonixinate, meseclazone, nabumetone, nictindole, nimesulide, orgotein, orpanoxin, oxaceprol, oxapadol, paranyline, perisoxal, perisoxal citrate, pifoxime, piproxen, pirazolac, pirfenidone, proquazone, proxazole, thielavin B, tiflamizole, timegadine, tolectin, tolpadol, tryptamid and those designated by company code number such as 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SR440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (4-benzoyl-1-indancarboxylic acid), TVX2706, U60257, UR2301 and WY41770. Structurally related NSAIDs having similar analgesic and anti-inflammatory properties to the NSAIDs are also intended to be encompassed by this group.

In still another specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more corticosteroids, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of TNF-responsive diseases, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases, graft versus host disease and multiple sclerosis. Corticosteroids, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof include hydrocortisone and compounds which are derived from

hydrocortisone, such as 21-acetoxypregnenolone, alclomerasone, algestone, amcinonide, beclomethasone, betamethasone, betamethasone valerate, budesonide, chloroprednisone, clobetasol, clobetasol propionate, clobetasone, clobetasone butyrate, clocortolone, cloprednol, corticosterone, cortisone, cortivazol, deflazacon, desonide, desoximerasone, dexamethasone, diflorasone, diflucortolone, difluprednate, enoxolone, fluazacort, flucloronide, flumethasone, flumethasone pivalate, flucinolone acetonide, flunisolide, fluocinonide, fluorocinolone acetonide, fluocortin butyl, fluocortolone, fluocortolone hexanoate, diflucortolone valerate, fluorometholone, fluperolone acetate, fluprednidene acetate, fluprednisolone, flurandenolide, formocortal, halcinonide, halometasone, halopredone acetate, hydrocortamate, hydrocortisone, hydrocortisone acetate, hydrocortisone butyrate, hydrocortisone phosphate, hydrocortisone 21-sodium succinate, hydrocortisone tebutate, mazipredone, medrysone, meprednisone, methylprednisolone, mometasone furoate, parametasone, prednicarbate, prednisolone, prednisolone 21-diedryaminoacetate, prednisolone sodium phosphate, prednisolone sodium succinate, prednisolone sodium 21-*m*-sulfobenzoate, prednisolone sodium 21-stearoglycolate, prednisolone tebutate, prednisolone 21-trimethylacetate, prednisone, prednival, prednylidene, prednylidene 21-diethylaminoacetate, tixocortol, triamcinolone, triamcinolone acetonide, triamcinolone benetonide and triamcinolone hexacetonide. Structurally related corticosteroids having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more slow-acting antirheumatic

drugs (SAARDs) or disease modifying antirheumatic drugs (DMARDS), prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of TNF-responsive diseases, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases, graft versus host disease and multiple sclerosis. SAARDs or DMARDS, prodrug esters and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: allocupreide sodium, auranofin, aurothioglucose, aurothioglycanide, azathioprine, brequinar sodium, bucillamine, calcium 3-aurothio-2-propanol-1-sulfonate, chlorambucil, chloroquine, clobuzarit, cuproxoline, cyclophosphamide, cyclosporin, dapsone, 15-deoxyspergualin, diacerein, glucosamine, gold salts (*e.g.*, cycloquine gold salt, gold sodium thiomalate, gold sodium thiosulfate), hydroxychloroquine, hydroxychloroquine sulfate, hydroxyurea, kebuzone, levamisole, lobenzarit, melittin, 6-mercaptopurine, methotrexate, mizoribine, mycophenolate mofetil, myoral, nitrogen mustard, D-penicillamine, pyridinol imidazoles such as SKNF86002 and SB203580, rapamycin, thiols, thymopoietin and vincristine. Structurally related SAARDs or DMARDs having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In a further specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more COX2 inhibitors, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of TNF-responsive diseases, including acute and chronic inflammation. Examples of COX2 inhibitors, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof include, for example, celecoxib. Structurally related COX2 inhibitors having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In yet another specific embodiment, the present invention is directed to the use of a TNFr/OPG-like polypeptide in

combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more antimicrobials, prodrug esters or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of TNF-responsive diseases, including acute and chronic inflammation. Antimicrobials include, for example, the broad classes of penicillins, cephalosporins and other beta-lactams, aminoglycosides, azoles, quinolones, macrolides, rifamycins, tetracyclines, sulfonamides, lincosamides and polymyxins. The penicillins include, but are not limited to penicillin G, penicillin V, methicillin, nafcillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, floxacillin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, hetacillin, cyclacillin, bacampicillin, carbenicillin, carbenicillin indanyl, ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, azlocillin, mezlocillin, peperacillin, and mecillinam. The cephalosporins and other beta-lactams include, but are not limited to cephalothin, cephapirin, cephalexin, cephradine, cefazolin, cefadroxil, cefaclor, cefamandole, cefotetan, cefoxitin, ceruroxime, cefonicid, ceforadine, cefixime, cefotaxime, moxalactam, ceftizoxime, cetriaxone, cephoperazone, ceftazidime, imipenem and aztreonam. The aminoglycosides include, but are not limited to streptomycin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin, kanamycin and neomycin. The azoles include, but are not limited to fluconszole. The quinolones include, but are not limited to nalidixic acid, norfloxacin, enoxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin and temafloxacin. The macrolides include, but are not limited to erythomycin, spiramycin and azithromycin. The rifamycins include, but are not limited to rifampin. The tetracyclines include, but are not limited to spicycline, chlortetracycline, clomocycline, demeclocycline, deoxycycline, guamecycline, lymecycline, meclocycline, methacycline, minocycline, oxytetracycline, penimepicycline, pipacycline, rolitetracycline, sancycline, senociclin and

tetracycline. The sulfonamides include, but are not limited to sulfanilamide, sulfamethoxazole, sulfacetamide, sulfadiazine, sulfisoxazole and co-trimoxazole (trimethoprim/sulfamethoxazole). The lincosamides include, but are not limited to clindamycin and lincomycin. The polymyxins (polypeptides) include, but are not limited to polymyxin B and colistin.

In certain preferred embodiments, a polypeptide comprising TNFr/OPG-like polypeptides is used in conjunction with particular therapeutic molecules to treat various inflammatory conditions, autoimmune conditions, and other conditions leading to bone loss. Depending on the condition and the desired level of treatment, two, three, or more agents may be administered, separately, simultaneously, or sequentially. These agents may be provided together by inclusion in the same formulation or inclusion in a treatment kit, or they may be provided separately. When administered by gene therapy, the genes encoding the protein agents may be included in the same vector, optionally under the control of the same promoter region, or in separate vectors. Particularly preferred molecules in the aforementioned classes are as follows.

- IL-1 inhibitors: IL-1ra proteins, and soluble IL-1 receptors. The most preferred IL-1 inhibitor is anakinra.

- TNF-α inhibitors: soluble tumor necrosis factor receptor type I (sTNF-RI; -RI is also called the p55 receptor); soluble tumor necrosis factor receptor type II (also called the p75 receptor); and monoclonal antibodies that bind the TNF receptor. Most preferred is sTNF-RI as described in WO 98/24463, etanercept (Enbrel®), and Avakine®. Exemplary TNF-α inhibitors are described in EP 422 339, EP 308 378, EP 393 438, EP 398 327, and EP 418 014.

- Serine protease inhibitors: Such as SLPI. These

inhibitors also may be viewed as exemplary LPS modulators, as SLPI has been shown to inhibit LPS responses. Jin *et al.* (1997), *Cell*, 88(3):417-26.

Particularly preferred methods of treatment concern use of TNF-α inhibitors and IL-1 inhibitors in conjunction with polypeptides comprising TNFr/OPG-like polypeptides. Such polypeptides may be used with either or both TNF-α inhibitors and IL-1 inhibitors for treatment of conditions such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis.

It will be appreciated that other diseases associated with undesirable levels of one or more of TNF, OPG, and/or the present TNFr/OPG-like polypeptides themselves are encompassed within the scope of the invention. Undesirable levels include excessive and/or sub-normal levels of TNF, OPG, and/or the TNFr/OPG-like polypeptides described herein.

TNF-α inhibitors may act by downregulating or inhibiting TNF production, binding free TNF, interfering with TNF binding to its receptor, or interfering with modulation of TNF signaling after binding to its receptor. The term "TNF-α inhibitor" thus includes solubilized TNF receptors, antibodies to TNF, antibodies to TNF receptor, inhibitors of TNF-α converting enzyme (TACE), and other molecules that affect TNF activity.

TNF-α inhibitors of various kinds are disclosed in the art, including the following references:

European patent applications 308 378; 422 339; 393 438; 398 327; 412 486; 418 014, 417 563, 433 900; 464 533;512 528; 526 905;568 928; 663 210; 542 795; 818 439; 664 128; 542 795; 741 707; 874 819 ; 882 714; 880 970; 648 783; 731 791; 895 988; 550 376; 882 714; 853 083; 550 376; 943 616;

U.S. Patent Nos. 5,136,021; 5,929,117; 5,948,638; 5,807,862; 5,695,953; 5,834,435; 5,817,822; 5,830,742;

5,834,435; 5,851,556; 5,853,977; 5,359,037; 5,512,544; 5,695,953; 5,811,261; 5,633,145; 5,863,926; 5,866,616; 5,641,673; 5,869,677; 5,869,511; 5,872,146; 5,854,003; 5,856,161; 5,877,222; 5,877,200; 5,877,151; 5,886,010; 5,869,660; 5,859,207; 5,891,883; 5,877,180; 5,955,480; 5,955,476; 5,955,435;

International (WO) patent applications 90/13575, 91/03553, 92/01002, 92/13095, 92/16221, 93/07863, 93/21946, 93/19777, 95/34326, 96/28546, 98/27298, 98/30541, 96/38150, 96/38150, 97/18207, 97/15561, 97/12902, 96/25861, 96/12735, 96/11209, 98/39326, 98/39316, 98/38859, 98/39315, 98/42659, 98/39329, 98/43959, 98/45268, 98/47863, 96/33172, 96/20926, 97/37974, 97/37973, 96/35711, 98/51665, 98/43946, 95/04045, 98/56377, 97/12244, 99/00364, 99/00363, 98/57936, 99/01449, 99/01139, 98/56788, 98/56756, 98/53842, 98/52948, 98/52937, 99/02510, 97/43250, 99/06410, 99/06042, 99/09022, 99/08688, 99/07679, 99/09965, 99/07704, 99/06041, 99/37818, 99/37625, 97/11668;

Japanese (JP) patent applications 10147531, 10231285, 10259140, and 10130149, 10316570, 11001481, and 127,800/1991; German (DE) application 19731521; British (GB) applications 2 218 101, 2 326 881, 2 246 569.

For purposes of this invention, the molecules disclosed in these references including the sTNFRs and variants and derivatives of the sTNFRs disclosed in the references, (see below) are collectively termed "TNF-α inhibitors."

For example, EP 393 438 and EP 422 339 teach the amino acid and nucleic acid sequences of a soluble TNF receptor type I (also known as sTNFR-I or 30kDa TNF inhibitor) and a soluble TNF receptor type II (also known as sTNFR-II or 40kDa TNF inhibitor), collectively termed "sTNFRs", including modified forms thereof (e.g., fragments, functional derivatives and variants). EP 393 438 and EP 422 339 also disclose methods

for isolating the genes responsible for coding the inhibitors, cloning the gene in suitable vectors and cell types, and expressing the gene to produce the inhibitors.

sTNFR-I and sTNFR-II are members of the nerve growth factor/TNF receptor superfamily of receptors which includes the nerve growth factor receptor (NGF), the B cell antigen CD40, 4-1BB, the rat T-cell antigen MRC OX40, the fas antigen, and the CD27 and CD30 antigens (Smith *et al.* (1990), *Science*, 248:1019-1023). The most conserved feature among this group of cell surface receptors is the cysteine-rich extracellular ligand binding domain, which can be divided into four repeating motifs of about forty amino acids and which contains 4-6 cysteine residues at positions which are well conserved (Smith *et al.* (1990), *supra*).

EP 393 438 teaches a 40kDa TNF inhibitor Δ51 and a 40kDa TNF inhibitor Δ53. These are truncated versions of the full-length recombinant 40kDa TNF inhibitor protein wherein 51 or 53 amino acid residues, respectively, at the carboxyl terminus of the mature protein are removed.

PCT Application No. PCT/US97/12244 teaches truncated forms of sTNFR-I and sTNFR-II which do not contain the fourth domain (amino acid residues Thr^{127}-Asn^{161} of sTNFR-I and amino acid residues Pro^{141}-Thr^{179} of sTNFR-II); a portion of the third domain (amino acid residues Asn^{111}-Cys^{126} of sTNFR-I and amino acid residues Pro^{123}-Lys^{140} of sTNFR-II); and, optionally, which do not contain a portion of the first domain (amino acid residues Asp^{1}-Cys^{19} of sTNFR-I and amino acid residues Leu^{1}-Cys^{32} of sTNFR-II).

IL-1 inhibitors include any protein capable of specifically preventing activation of cellular receptors to IL-1, which may result from any number of mechanisms. Such mechanisms include downregulating IL-1 production, binding

free IL-1, interfering with IL-1 binding to its receptor, interfering with formation of the IL-1 receptor complex (i.e., association of IL-1 receptor with IL-1 receptor accessory protein), or interfering with modulation of IL-1 signaling after binding to its receptor. Classes of interleukin-1 inhibitors include:

- Interleukin-1 receptor antagonists such as IL-1ra, as described herein;
- Anti-IL-1 receptor monoclonal antibodies (*e.g.*, EP 623674);
- IL-1 binding proteins such as soluble IL-1 receptors (*e.g.*, U.S. Pat. No. 5,492,888, U.S. Pat. No. 5,488,032, and U.S. Pat. No. 5,464,937, U.S. Pat. No. 5,319,071, and U.S. Pat. No. 5,180,812;
- Anti-IL-1 monoclonal antibodies (*e.g.*, WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, U.S. Pat. No. 4,935,343, EP 364778, EP 267611 and EP 220063;
- IL-1 receptor accessory proteins and antibodies thereto (*e.g.*, WO 96/23067);
- Inhibitors of interleukin-1β converting enzyme (ICE) or caspase I, which can be used to inhibit IL-1 beta production and secretion;
- Interleukin-1β protease inhibitors;
- Other compounds and proteins which block *in vivo* synthesis or extracellular release of IL-1.

Exemplary IL-1 inhibitors are disclosed in the following references:

US Pat. Nos. 5747444; 5359032; 5608035; 5843905; 5359032; 5866576; 5869660; 5869315; 5872095; 5955480;

International (WO) patent applications 98/21957,

96/09323, 91/17184, 96/40907, 98/32733, 98/42325, 98/44940, 98/47892, 98/56377, 99/03837, 99/06426, 99/06042, 91/17249, 98/32733, 98/17661, 97/08174, 95/34326, 99/36426, and 99/36415;

European (EP) patent applications 534978 and 894795; and French patent application FR 2762514.

TNFr/OPG-Like Compositions and Administration

Therapeutic compositions are within the scope of the present invention. Such compositions may comprise a therapeutically effective amount of a TNFr/OPG-like polypeptide, including a fragment, variant, derivative, or one or more selective binding agents in admixture with a pharmaceutically acceptable agent such as a pharmaceutically acceptable formulation agent.

TNFr/OPG-like molecule pharmaceutical compositions typically include a therapeutically or prophylactically effective amount of TNFr/OPG-like polypeptide, nucleic acid molecule, or selective binding agent in admixture with one or more pharmaceutically and physiologically acceptable formulation agents selected for suitability with the mode of administration. Suitable formulation materials or pharmaceutically acceptable agents include, but are not limited to, antioxidants, preservatives, coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents, suspending agents, solvents, fillers, bulking agents, buffers, delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants. For example, a suitable vehicle or carrier may be water for injection, physiological saline solution, or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles.

The term "pharmaceutically acceptable carrier" or "physiologically acceptable carrier" as used herein refers to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of the TNFr/OPG-like polypeptide, nucleic acid molecule or selective binding agent as a pharmaceutical composition.

Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients and are preferably inert at the dosages and concentrations employed. The materials may include buffers such as phosphate, citrate, or other organic acids; antioxidants such as ascorbic acid; low molecular weight polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine); monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA); sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as tween, pluronics, or polyethylene glycol (PEG).

Typically, a TNFr/OPG-like molecule pharmaceutical composition will be administered in the form of a composition comprising a purified polypeptide, in conjunction with one or more physiologically acceptable agents. It will be appreciated that when used herein, the term "TNFr/OPG-like molecule pharmaceutical composition" also encompasses compositions containing a nucleic acid molecule or selective binding agent of the present invention.

Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are exemplary appropriate carriers. Other standard pharmaceutically acceptable agents such as diluents and excipients may be included as desired. For example, the

TNFr/OPG-like polypeptide product may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may further include sorbitol or a suitable substitute therefor.

The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition may be either aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier may be water for injection, physiological saline solution, solution or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may further include sorbitol or a suitable substitute therefor. In one embodiment of the present invention, TNFr/OPG-like polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional formulation agents (Remington's Pharmaceutical Sciences, supra) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the TNFr/OPG-like polypeptide product may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

In addition, the composition may contain other formulation materials for modifying, maintainingor preserving, for example, the pH, osmolarity, viscosity, clarity, color, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption or pentration of the composition, or odor of the formulation. Similarly, the composition may contain additional formulation materials for modifying or maintaining the rate of release of TNFr/OPG-like polypeptide, nucleic acid molecule or selective binding agent, or for promoting the

absorption or penetration of such TNFr/OPG-like molecules.

The TNFr/OPG-like molecule pharmaceutical compositions can be administered parenterally. Alternatively, the compositions may be administered through the digestive tract, such as orally, or by inhalation. When parenterally administered, the therapeutic compositions for use in this invention may be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such pharmaceutically acceptable compositions, with due regard to pH, isotonicity, stability and the like, is within the skill of the art.

A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile distilled water in which a TNFr/OPG-like polypeptide is formulated as a sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another preparation can involve the formulation of the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles or beads, or liposomes, that provides for the controlled or sustained release of the product which may then be delivered as a depot injection. Other suitable means for the introduction of the desired molecule include implantable drug delivery devices.

The pharmaceutical compositions of the present invention may include other components, for example parenterally acceptable preservatives, tonicity agents, cosolvents, wetting agents, complexing agents, buffering agents, antimicrobials, antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite or sodium hydrogen-sulfite) and surfactants, as are well known in the art. For example, suitable tonicity enhancing agents include alkali metal halides (preferably sodium or potassium chloride), mannitol, sorbitol, and the like. Suitable preservatives include, but are not limited to, benzalkonium chloride, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid, and the like. Hydrogen peroxide may also be used as preservative. Suitable

cosolvents are for example glycerin, propylene glycol and polyethylene glycol. Suitable complexing agents are for example caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin or hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. Suitable surfactants or wetting agents include sorbitan esters, polysorbates such as polysorbate 80, tromethamine, lecithin, cholesterol, tyloxapal, and the like. The buffers can be conventional buffers such as borate, citrate, phosphate, bicarbonate, or Tris-HCl.

The formulation components are present in concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at slightly lower pH, typically within a pH range of from about 5 to about 8.

In one embodiment of the present invention, TNFr/OPG-like polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients, or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company [1990]) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. The optimal pharmaceutical formulation will be determined by one skilled in the art depending upon, for example, the intended route of administration, delivery format, and desired dosage. See for example, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, pp. 1435-1712. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the present TNFr/OPG-like polypeptides.

An effective amount of a TNFr/OPG-like polypeptide composition to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic objectives such as the indication for which the TNFr/OPG-like polypeptide is being used, the route of administration, and the condition of the patient. Accordingly, the clinician may titer the dosage and

modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage may range from about 0.1 µg/kg to up to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage may range from 1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 5 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 0.1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 1 µg/kg up to about 100 mg/kg.

The frequency of dosing will depend upon the pharmokinetic parameters of the TNFr/OPG-like molecule in the formulation used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition may therefore be administered as a single dose, or as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via implantation device or catheter.

One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the therapeutic context, type of disorder under treatment, the age, and general health of the recipient.

The TNFr/OPG-like molecule pharmaceutical composition to be used for *in vivo* administration typically must be sterile. This may be accomplished by filtration through sterile filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using these methods may be conducted either prior to, or following, lyophilization and reconstitution. The composition for parenteral administration may be stored in lyophilized form or in solution. In addition, parenteral compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Once the pharmaceutical composition has been formulated, it may be stored in sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or lyophilized powder. Such formulations may be stored either in a ready-to-use form or in a form (e.g., lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits may each contain both a first container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation. Also included within the scope of this invention are kits containing single and multi-chambered pre-filled syringes (e.g., liquid syringes and lyosyringes).

Pharmaceutical compositions such as (1) slow-release formulations, (2) inhalant mists, or (3) orally active formulations are also envisioned. The TNFr/OPG-like molecule pharmaceutical composition generally is formulated for parenteral administration. Such parenterally administered therapeutic compositions are typically in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution comprising the desired TNFr/OPG-like molecule in a pharmaceutically acceptable vehicle. The TNFr/OPG-like molecule pharmaceutical compositions also may include particulate preparations of polymeric compounds such as polylactic acid, polyglycolic acid, etc. or the introduction of the molecule into liposomes. Hyaluronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting sustained duration in the circulation.

In one embodiment, a pharmaceutical composition may be formulated for inhalation. For example, TNFr/OPG-like polypeptide may be formulated as a dry powder for inhalation. TNFr/OPG-like polypeptide or nucleic acid molecule inhalation solutions may also be formulated with a propellant for aerosol delivery, with or without a liquefied propellant. In yet

another embodiment, solutions may be nebulized. Pulmonary administration is further described in PCT application no. PCT/US94/001875, which describes pulmonary delivery of chemically modified proteins.

It is also contemplated that certain formulations may be administered through the digestive tract, such as orally. In one embodiment of the present invention, TNFr/OPG-like polypeptides which are administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily used in the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule may be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is maximized and pre-systemic degradation is minimized. Additional agents can be included to facilitate absorption of the TNFr/OPG-like polypeptide. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders may also be employed.

Another pharmaceutical composition may involve an effective quantity of TNFr/OPG-like molecules in a mixture with non-toxic excipients which are suitable for the manufacture of tablets. By dissolving the tablets in sterile water, or other appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, or talc.

Additional TNFr/OPG-like pharmaceutical compositions will be evident to those skilled in the art, including formulations involving TNFr/OPG-like molecules in combination with one or more other therapeutic agents and TNFr/OPG-like polypeptide in sustained release or controlled-delivery formulations.

Techniques for formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, bio-erodible microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those skilled in the art. See for example, PCT/US93/00829 which describes controlled release of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions.

Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Sustained release matrices may include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. 3,773,919, EP 58,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22:547-556 [1983]), poly (2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 [1981] and Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 [1982]), ethylene vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*) or poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988). Sustained-release compositions also may include liposomes, which can be prepared by any of several methods known in the art. See *e.g.*, Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985); EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949.

Regardless of the manner of administration, the specific dose may be calculated according to body weight, body surface area or organ size. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages may be ascertained through use of appropriate dose-response data.

The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, e.g. oral, inhalation, injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular,

intraarterial, intraportal, or intralesional routes, or by sustained release systems or implantation device. Where desired, the compositions may be administered continuously by infusion, by bolus injection or by implantation device.

Alternatively or additionally, the composition may be administered locally via implantation into the affected area of a membrane, sponge, or other appropriate material on to which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device may be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the desired molecule may be directly through the device via diffusion, time release bolus, or via continuous administration, or via catheter using continuous infusion.

It will further be appreciated that the TNFr/OPG-like polypeptides, including fragments, variants, and derivatives, may be employed alone, together, or in combination with other polypeptides and pharmaceutical compositions. For example, the TNFr/OPG-like polypeptides may be used in combination with cytokines, growth factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the indication being treated.

In some cases, it may be desirable to use TNFr/OPG-like pharmaceutical compositions in an *ex vivo* manner. In such instances, cells, tissues, or organs that have been removed from the patient are exposed to TNFr/OPG-like pharmaceutical compositions after which the cells, tissues and/or organs are subsequently implanted back into the patient.

In other cases, a TNFr/OPG-like polypeptide can be delivered by implanting certain cells that have been genetically engineered, using methods such as those described herein, to express and secrete the polypeptides. Such cells may be animal or human cells, and may be autologous,

heterologous, or xenogeneic. Optionally, the cells may be immortalized. In order to decrease the chance of an immunological response, the cells may be encapsulated to avoid infiltration of surrounding tissues. The encapsulation materials are typically biocompatible, semi-permeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of the protein product(s) but prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissues.

Additional embodiments of the present invention relate to cells and methods (*e.g.*, homologous recombination and/or other recombinant production methods) for both the *in vitro* production of therapeutic polypeptides by means of homologous recombination and for the production and delivery of therapeutic polypeptides by gene therapy or cell therapy.

It is further envisioned that TNFr/OPG-like polypeptides can be produced *in vitro* or *in vivo* by homologous recombination, or with recombinant production methods utilizing control elements introduced into cells already containing DNA encoding TNFr/OPG-like polypeptides. For example, homologous recombination methods may be used to modify a cell that contains a normally transcriptionally silent TNFr/OPG-like gene, or an under expressed gene, and thereby produce a cell which expresses therapeutically efficacious amounts of TNFr/OPG-like polypeptides. Homologous recombination is a technique originally developed for targeting genes to induce or correct mutations in transcriptionally active genes. Kucherlapati, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.*, 36:301, 1989. The basic technique was developed as a method for introducing specific mutations into specific regions of the mammalian genome (Thomas *et al.*, *Cell*, 44:419-428, 1986; Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503-512, 1987; Doetschman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:8583-8587, 1988)

or to correct specific mutations within defective genes (Doetschman *et al.*, *Nature*, 330:576-578, 1987). Exemplary homologous recombination techniques are described in U.S. Patent No. 5,272,071 (EP 9193051, EP Publication No. 505500; PCT/US90/07642, International Publication No. WO 91/09955).

Through homologous recombination, the DNA sequence to be inserted into the genome can be directed to a specific region of the gene of interest by attaching it to targeting DNA. The targeting DNA is a nucleotide sequence that is complementary (homologous) to a region of the genomic DNA. Small pieces of targeting DNA that are complementary to a specific region of the genome are put in contact with the parental strand during the DNA replication process. It is a general property of DNA that has been inserted into a cell to hybridize, and therefore, recombine with other pieces of endogenous DNA through shared homologous regions. If this complementary strand is attached to an oligonucleotide that contains a mutation or a different sequence or an additional nucleotide, it too is incorporated into the newly synthesized strand as a result of the recombination. As a result of the proofreading function, it is possible for the new sequence of DNA to serve as the template. Thus, the transferred DNA is incorporated into the genome.

Attached to these pieces of targeting DNA are regions of DNA which may interact with or control the expression of a TNFr/OPG-like polypeptide, e.g., flanking sequences. For example, a promoter/enhancer element, a suppresser, or an exogenous transcription modulatory element is inserted in the genome of the intended host cell in proximity and orientation sufficient to influence the transcription of DNA encoding the desired TNFr/OPG-like polypeptide. The control element controls a portion of the DNA present in the host cell genome. Thus, the expression of TNFr/OPG-like polypeptide may be

achieved not by transfection of DNA that encodes the TNFr/OPG-like gene itself, but rather by the use of targeting DNA (containing regions of homology with the endogenous gene of interest) coupled with DNA regulatory segments that provide the endogenous gene sequence with recognizable signals for transcription of a TNFr/OPG-like polypeptide.

In an exemplary method, the expression of a desired targeted gene in a cell (i.e., a desired endogenous cellular gene) is altered via homologous recombination into the cellular genome at a preselected site by the introduction, of DNA which includes at least a regulatory sequence, an exon and a splice donor site. These components are introduced into the chromosomal (genomic) DNA in such a manner that this, in effect, results in the production of a new transcription unit (in which the regulatory sequence, the exon and the splice donor site present in the DNA construct are operatively linked to the endogenous gene). As a result of the introduction of these components into the chromosomal DNA, the expression of the desired endogenous gene is altered.

Altered gene expression, as described herein, encompasses activating (or causing to be expressed) a gene which is normally silent (unexpressed) in the cell as obtained, as well as increasing the expression of a gene which is not expressed at physiologically significant levels in the cell as obtained. The embodiments further encompass changing the pattern of regulation or induction such that it is different from the pattern of regualtion or induction that occurs in the cell as obtained, and reducing (including eliminating) the expression of a gene which is expressed in the cell as obtained.

One method by which homologous recombination can be used to increase, or cause, TNFr/OPG-like polypeptide production from a cell's endogenous TNFr/OPG-like gene involves first using homologous recombination to place a recombination

sequence from a site-specific recombination system (*e.g.*, Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, *Current Opinion In Biotechnology*, 5:521-527, 1994; Sauer, *Methods In Enzymology*, 225:890-900, 1993) upstream (that is, 5' to) of the cell's endogenous genomic TNFr/OPG-like polypeptide coding region. A plasmid containing a recombination site homologous to the site that was placed just upstream of the genomic TNFr/OPG-like polypeptide coding region is introduced into the modified cell line along with the appropriate recombinase enzyme. This recombinase causes the plasmid to integrate, via the plasmid's recombination site, into the recombination site located just upstream of the genomic TNFr/OPG-like polypeptide coding region in the cell line (Baubonis and Sauer, *Nucleic Acids Res.*, 21:2025-2029, 1993; O'Gorman *et al.*, *Science*, 251:1351-1355, 1991). Any flanking sequences known to increase transcription (*e.g.*, enhancer/promoter, intron, translational enhancer), if properly positioned in this plasmid, would integrate in such a manner as to create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased TNFr/OPG-like polypeptide production from the cell's endogenous TNFr/OPG-like gene.

A further method to use the cell line in which the site specific recombination sequence had been placed just upstream of the cell's endogenous genomic TNFr/OPG-like polypeptide coding region is to use homologous recombination to introduce a second recombination site elsewhere in the cell line's genome. The appropriate recombinase enzyme is then introduced into the two-recombination-site cell line, causing a recombination event (deletion, inversion, translocation) (Sauer, *Current Opinion In Biotechnology*, 5:521-527, 1994; Sauer, *Methods In Enzymology*, 225:890-900, 1993) that would create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased TNFr/OPG-like polypeptide production from the cell's endogenous TNFr/OPG-like gene.

An additional approach for increasing, or causing, the expression of TNFr/OPG-like polypeptide from a cell's endogenous TNFr/OPG-like gene involves increasing, or causing, the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcription factors) and/or decreasing the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcriptional repressors) in a manner which results in *de novo* or increased TNFr/OPG-like polypeptide production from the cell's endogenous TNFr/OPG-like gene. This method includes the introduction of a non-naturally occurring polypeptide (*e.g.*, a polypeptide comprising a site specific DNA binding domain fused to a transcriptional factor domain) into the cell such that *de novo* or increased TNFr/OPG-like polypeptide production from the cell's endogenous TNFr/OPG-like gene results.

The present invention further relates to DNA constructs useful in the method of altering expression of a target gene. In certain embodiments, the exemplary DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences; (b) a regulatory sequence; (c) an exon; and (d) an unpaired splice-donor site. The targeting sequence in the DNA construct directs the integration of elements (a)-(d) into a target gene in a cell such that the elements (b)-(d) are operatively linked to sequences of the endogenous target gene. In another embodiment, the DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, (d) a splice-donor site, (e) an intron, and (f) a splice-acceptor site, wherein the targeting sequence directs the integration of elements (a)-(f) such that the elements of (b)-(f) are operatively linked to the endogenous gene. The targeting sequence is homologous to the preselected site in the cellular chromosomal DNA with which homologous recombination is to occur. In the construct, the exon is generally 3' of the regulatory sequence and the splice-donor site is 3' of the exon.

If the sequence of a particular gene is known, such as the nucleic acid sequence encoding a TNFr/OPG-like polypeptide presented herein, a piece of DNA that is complementary to a selected region of the gene can be synthesized or otherwise obtained, such as by appropriate restriction of the native DNA at specific recognition sites bounding the region of interest. This piece serves as a targeting sequence upon insertion into the cell and will hybridize to its homologous region within the genome. If this hybridization occurs during DNA replication, this piece of DNA, and any additional sequence attached thereto, will act as an Okazaki fragment and will be incorporated into the newly synthesized daughter strand of DNA. The present invention, therefore, includes nucleotides encoding a TNFr/OPG-like polypeptide, which nucleotides may be used as targeting sequences.

TNFr/OPG-like polypeptide cell therapy, *e.g.*, the implantation of cells producing TNFr/OPG-like polypeptides, is also contemplated. This embodiment involves implanting cells capable of synthesizing and secreting a biologically active form of TNFr/OPG-like polypeptide. Such TNFr/OPG-like polypeptide-producing cells can be cells that are natural producers of TNFr/OPG-like polypeptides or may be recombinant cells whose ability to produce TNFr/OPG-like polypeptides has been augmented by transformation with a gene encoding the desired TNFr/OPG-like polypeptide or with a gene augmenting the expression of TNFr/OPG-like polypeptide. Such a modification may be accomplished by means of a vector suitable for delivering the gene as well as promoting its expression and secretion. In order to minimize a potential immunological reaction in patients being administered a TNFr/OPG-like polypeptide, as may occur with the administration of a polypeptide of a foreign species, it is preferred that the natural cells producing TNFr/OPG-like polypeptide be of human origin and produce human TNFr/OPG-like polypeptide. Likewise,

it is preferred that the recombinant cells producing TNFr/OPG-like polypeptide be transformed with an expression vector containing a gene encoding a human TNFr/OPG-like polypeptide.

Implanted cells may be encapsulated to avoid the infiltration of surrounding tissue. Human or non-human animal cells may be implanted in patients in biocompatible, semipermeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of TNFr/OPG-like polypeptide, but that prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissue. Alternatively, the patient's own cells, transformed to produce TNFr/OPG-like polypeptides *ex vivo*, may be implanted directly into the patient without such encapsulation.

Techniques for the encapsulation of living cells are known in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be routinely accomplished. For example, Baetge *et al.* (WO95/05452; PCT/US94/09299) describe membrane capsules containing genetically engineered cells for the effective delivery of biologically active molecules. The capsules are biocompatible and are easily retrievable. The capsules encapsulate cells transfected with recombinant DNA molecules comprising DNA sequences coding for biologically active molecules operatively linked to promoters that are not subject to down regulation *in vivo* upon implantation into a mammalian host. The devices provide for the delivery of the molecules from living cells to specific sites within a recipient. In addition, see U.S. Patent Nos. 4,892,538, 5,011,472, and 5,106,627. A system for encapsulating living cells is described in PCT Application WO91/10425 of Aebischer *et al.* See also, PCT Application WO91/10470 of Aebischer *et al.*, Winn *et al.*, *Exper. Neurol.*, 113:322-329 (1991), Aebischer *et al.*, *Exper. Neurol.*, 111:269-275 (1991); and Tresco *et al.*, ASAIO, 38:17-23 (1992).

In vivo and *in vitro* gene therapy delivery of TNFr/OPG-like polypeptides is also envisioned. *In vivo* gene therapy may be accomplished by introducing the gene encoding TNFr/OPG-like polypeptide into cells via local injection of a TNFr/OPG-like nucleic acid molecule or by other appropriate viral or non-viral delivery vectors. Hefti, *Neurobiology*, 25:1418-1435 (1994). For example, a nucleic acid molecule encoding a TNFr/OPG-like polypeptide may be contained in an adeno-associated virus vector for delivery to the targeted cells (*e.g.*, Johnson, International Publication No. WO95/34670; International Application No. PCT/US95/07178). The recombinant adeno-associated virus (AAV) genome typically contains AAV inverted terminal repeats flanking a DNA sequence encoding a TNFr/OPG-like polypeptide operably linked to functional promoter and polyadenylation sequences.

Alternative suitable viral vectors include, but are not limited to, retrovirus, adenovirus, herpes simplex virus, lentivirus, hepatitis virus, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alphavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramyxovirus, and papilloma virus vectors. U.S. Patent No. 5,672,344 describes an *in vivo* viral-mediated gene transfer system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic protein by the delivery of human cells which have been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent No. 5,631,236 involving adenoviral vectors; U.S. Patent No. 5,672,510 involving retroviral vectors; and U.S. 5,635,399 involving retroviral vectors expressing cytokines.

Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated transfer, naked DNA delivery (direct

injection), receptor-mediated transfer (ligand-DNA complex), electroporation, calcium phosphate precipitation, and microparticle bombardment (e.g., gene gun). Gene therapy materials and methods may also include the use of inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for site-specific integration, DNA sequences capable of providing a selective advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems (safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance expression by a vector as well as methods of vector manufacture. Such additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent No. 4,970,154 involving electroporation techniques; WO96/40958 involving nuclear ligands; U.S. Patent No. 5,679,559 describing a lipoprotein-containing system for gene delivery; U.S. Patent No. 5,676,954 involving liposome carriers; U.S. Patent No. 5,593,875 concerning methods for calcium phosphate transfection; and U.S. Patent No. 4,945,050 wherein biologically active particles are propelled at cells at a speed whereby the particles penetrate the surface of the cells and become incorporated into the interior of the cells.

In yet other embodiments, regulatory elements can be included for the controlled expression of the TNFr/OPG-like gene in the target cell. Such elements are turned on in response to an appropriate effector. In this way, a therapeutic polypeptide can be expressed when desired. One conventional control means involves the use of small molecule dimerizers or rapalogs (as described in WO9641865 (PCT/US96/099486); WO9731898 (PCT/US97/03137) and WO9731899 (PCT/US95/03157)) used to dimerize chimeric proteins which contain a small molecule-binding domain and a domain capable of initiating biological process, such as a DNA-binding

protein or transcriptional activation protein. The dimerization of the proteins can be used to initiate transcription of the transgene.

An alternative regulation technology uses a method of storing proteins expressed from the gene of interest inside the cell as an aggregate or cluster. The gene of interest is expressed as a fusion protein that includes a conditional aggregation domain which results in the retention of the aggregated protein in the endoplasmic reticulum. The stored proteins are stable and inactive inside the cell. The proteins can be released, however, by administering a drug (e.g., small molecule ligand) that removes the conditional aggregation domain and thereby specifically breaks apart the aggregates or clusters so that the proteins may be secreted from the cell. See, Science 287:816-817, and 826-830 (2000).

Other suitable control means or gene switches include, but are not limited to, the following systems. Mifepristone (RU486) is used as a progesterone antagonist. The binding of a modified progesterone receptor ligand-binding domain to the progesterone antagonist activates transcription by forming a dimer of two transcription factors which then pass into the nucleus to bind DNA. The ligand binding domain is modified to eliminate the ability of the receptor to bind to the natural ligand. The modified steroid hormone receptor system is further described in U.S. 5,364,791; WO9640911, and WO9710337.

Yet another control system uses ecdysone (a fruit fly steroid hormone) which binds to and activates an ecdysone receptor (cytoplasmic receptor). The receptor then translocates to the nucleus to bind a specific DNA response element (promoter from ecdysone-responsive gene). The ecdysone receptor includes a transactivation domain/DNA-binding domain/ligand-binding domain to initiate transcription. The ecdysone system is further described in U.S. 5,514,578; WO9738117; WO9637609; and WO9303162.

Another control means uses a positive tetracycline-controllable transactivator. This system involves a mutated tet repressor protein DNA-binding domain (mutated tet R-4 amino acid changes which resulted in a reverse tetracycline-regulated transactivator protein, i.e., it binds to a tet operator in the presence of tetracycline) linked to a polypeptide which activates transcription. Such systems are described in U.S. Patent Nos. 5,464,758; 5,650,298 and 5,654,168.

Additional expression control systems and nucleic acid constructs are described in U.S. Patent Nos. 5,741,679 and 5,834,186 to Innovir Laboratories Inc.

It is also contemplated that TNFr/OPG-like molecule gene therapy or cell therapy can further include the delivery of a second polypeptide. For example, the host cell may be modified to express and release both TNFr/OPG-like polypeptide and at least one of the following: IL-1ra, sTNFr Type I, sTNFr Type II, and derivatives thereof; Serine Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI), Osteoprotogerin (OPG); and anti-TNF antibodies, anti-IL-1 antibodies, and derivatives thereof. Alternatively, the TNFr/OPG-like polypeptide and one or more of the above polypeptides may be expressed in and released from separate cells. Such cells may be separately introduced into the patient, or the cells may be contained in a single implantable device, such as the encapsulating membrane described above, or the cells may be separately modified by means of viral vectors.

One example of a gene therapy technique is to use the TNFr/OPG-like gene (either genomic DNA, cDNA, and/or synthetic DNA encoding a TNFr/OPG-like polypeptide which may be operably linked to a constitutive or inducible promoter to form a "gene therapy DNA construct". The promoter may be homologous or heterologous to the endogenous TNFr/OPG-like gene, provided that it is active in the cell or tissue type into which the

construct will be inserted. Other components of the gene therapy DNA construct may optionally include, DNA molecules designed for site-specific integration (e.g., endogenous sequences useful for homologous recombination), tissue-specific promoter, enhancer(s) or silencer(s), DNA molecules capable of providing a selective advantage over the parent cell, DNA molecules useful as labels to identify transformed cells, negative selection systems, cell specific binding agents (as, for example, for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance expression by a vector as well as factors to enable vector manufacture.

This gene therapy DNA construct can then be introduced into cells (either *ex vivo* or *in vivo*). One means for introducing the gene therapy DNA construct is by means of viral vectors as described herein. Certain vectors, such as retroviral vectors, will deliver the gene therapy DNA construct to the chromosomal DNA of the cells, and the gene therapy DNA construct can integrate into the chromosomal DNA. Other vectors will function as episomes, and the gene therapy DNA construct will remain in the cytoplasm.

Another means to increase endogenous TNFr/OPG-like polypeptide expression in a cell via gene therapy is to insert one or more enhancer elements into the TNFr/OPG-like polypeptide promoter, where the enhancer element(s) can serve to increase transcriptional activity of the TNFr/OPG-like gene. The enhancer element(s) used will be selected based on the tissue in which one desires to activate the gene(s); enhancer elements known to confer promoter activation in that tissue will be selected. For example, if a gene encoding a TNFr/OPG-like polypeptide is to be "turned on" in T-cells, the *lck* promoter enhancer element may be used. Here, the functional portion of the transcriptional element to be added may be inserted into a fragment of DNA containing the

TNFr/OPG-like polypeptide promoter (and optionally, inserted into a vector and/or 5' and/or 3' flanking sequence(s), etc.) using standard cloning techniques. This construct, known as a "homologous recombination construct", can then be introduced into the desired cells either *ex vivo* or *in vivo*.

Gene therapy can be used to decrease TNFr/OPG-like polypeptide expression by modifying the nucleotide sequence of the endogenous promoter(s). Such modification is typically accomplished via homologous recombination methods. For example, a DNA molecule containing all or a portion of the promoter of the TNFr/OPG-like gene(s) selected for inactivation can be engineered to remove and/or replace pieces of the promoter that regulate transcription. For example the TATA box and/or the binding site of a transcriptional activator of the promoter may be deleted using standard molecular biology techniques; such deletion can inhibit promoter activity thereby repressing the transcription of the corresponding TNFr/OPG-like gene. The deletion of the TATA box or the transcription activator binding site in the promoter may be accomplished by generating a DNA construct comprising all or the relevant portion of the TNFr/OPG-like polypeptide promoter(s) (from the same or a related species as the TNFr/OPG-like gene(s) to be regulated) in which one or more of the TATA box and/or transcriptional activator binding site nucleotides are mutated via substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides. As a result, the TATA box and/or activator binding site has decreased activity or is rendered completely inactive. This construct, which also will typically contain at least about 500 bases of DNA that correspond to the native (endogenous) 5' and 3' DNA sequences adjacent to the promoter segment that has been modified, may be introduced into the appropriate cells (either *ex vivo* or *in vivo*) either directly or via a viral vector as described herein. Typically, the integration of the construct into the

genomic DNA of the cells will be via homologous recombination, where the 5' and 3' DNA sequences in the promoter construct can serve to help integrate the modified promoter region via hybridization to the endogenous chromosomal DNA.

Other gene therapy methods may also be employed where it is desirable to inhibit the activity of one or more TNFr/OPG-like polypeptides. For example, antisense DNA or RNA molecules, which have a sequence that is complementary to at least a portion of the selected TNFr/OPG-like gene(s) can be introduced into the cell. Typically, each such antisense molecule will be complementary to the start site (5' end) of each selected TNFr/OPG-like gene. When the antisense molecule then hybridizes to the corresponding TNFr/OPG-like mRNA, translation of this mRNA is prevented or reduced. It will also be appreciated by those skilled in the art that antisense and ribozyme molecules may also be administered directly.

Alternatively, gene therapy may be employed to create a dominant-negative inhibitor of one or more TNFr/OPG-like polypeptides. In this situation, the DNA encoding a mutant full length or truncated polypeptide of each selected TNFr/OPG-like polypeptide can be prepared and introduced into the cells of a patient using either viral or non-viral methods as described herein. Each such mutant is typically designed to compete with endogenous polypeptide in its biological role.

Additional Uses of TNFr/OPG-Like Nucleic Acids and Polypeptides

Nucleic acid molecules of the present invention may be used to map the locations of the TNFr/OPG-like gene and related genes on chromosomes. Mapping may be done by techniques known in the art, such as PCR amplification and *in situ* hybridization.

The nucleic acid molecules are also used as anti-sense inhibitors of TNFr/OPG-like polypeptide expression. Such

inhibition may be effected by nucleic acid molecules which are complementary to and hybridize to expression control sequences (triple helix formation) or to TNFr/OPG-like mRNA. Anti-sense probes may be designed by available techniques using the sequence of TNFr/OPG-like nucleic acid molecules disclosed herein. Anti-sense inhibitors provide information relating to the decrease or absence of a TNFr/OPG-like polypeptide in a cell or organism.

Hybridization probes may be prepared using the TNFr/OPG-like nucleic acid sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of TNFr/OPG-like polypeptide that exhibit significant identity to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein and those regions may be used to design probes for screening.

TNFr/OPG-like nucleic acid molecules, as well as fragments, variants, and/or derivatives that do not themselves encode biologically active polypeptides, may be useful as hybridization probes in diagnostic assays to test, either qualitatively or quantitatively, for the presence of TNFr/OPG-like DNA or corresponding RNA in mammalian tissue or bodily fluid samples.

The TNFr/OPG-like polypeptides may be used (simultaneously or sequentially) in combination with one or more cytokines, growth factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the indication being treated.

TNFr/OPG-like polypeptide fragments, variants, and/or derivatives, whether biologically active or not, are also useful for preparing antibodies that bind to a TNFr/OPG-like polypeptide. The antibodies may be used for *in vivo* and *in vitro* diagnostic purposes, including, but not limited to, use in labeled form to detect the presence of TNFr/OPG-like

polypeptide in a body fluid or cell sample. The antibodies may also be used to prevent or treat the diseases and disorders recited herein. The antibodies may bind to a TNFr/OPG-like polypeptide so as to diminish or block at least one activity characteristic of a TNFr/OPG-like polypeptide, or may bind to a polypeptide to increase an activity.

The following example will serve to further typify the nature of the invention but should not be construed as a limitation on the scope thereof which is defined solely by the appended claims.

EXAMPLE 1

Cloning of TNFr/OPG-like cDNA

Homology-based BLAST searches of a human genomic database identified a 543 nucleotide genomic DNA fragment (SEQ ID NO: 5) which upon translation displayed homology to the known human OPG polypeptide sequence. Based upon this sequence information, nucleotide primers 2374-51 (5'- CCC CAG GCA CCT TCT CAG CTG C - 3' SEQ ID NO: 9) and 2374-52 (5' - GTG TAT CTC GAG TTG CCA TGC CC -3'; SEQ ID NO: 10) were synthesized and used to screen a variety of human cDNA libraries. Using PCR beads (Pharmacia, Piscataway, NJ), a final reaction volume of 25µl, and 10 pmol of each oligonucleotide, the expected size band of 111 nucleotides (nt) was identified in a number of libraries including fetal scalp (both random and oligo dT primed) and fetal spleen (both random and oligo dT primed. The cycling conditions were 94°C for 1 min, (94°C for 30 sec, 68°C for 45 sec) repeat 35 times, then 72°C for 10 minutes.

Based upon this, to isolate the 5' region of the cDNA, PCR was performed on the fetal spleen and fetal scalp cDNA libraries using pSPORT (LTI) vector primers 870-02 (5 - AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG - 3'; SEQ ID NO: 11) and 1916-83 (5 - GGC TCG TAT GTT GTG TGG AAT TGT GAG CG - 3'; SEQ ID NO: 12),

and a gene specific primer 2374-53 (5' -CCC AGG CCA GCA GTC TCC ACA G -3'; SEQ ID NO: 13) using Clontech Advantage PCR Mix (Clontech, Palo alto, CA). The cycling conditions were as follows: 94°C for 1 min; 94°C for 5 sec; 72°C for 3 min; (Repeated 5 times); followed by: 94°C for 5 sec; 70°C for 3 min; (Repeated 5 times; followed by: 94°C for 5 sec; 68°C for 3 min; Repeated 25 times; 72°C for 10 min. PCR products were obtained from these cDNA libraries.

The PCR products obtained in these reactions were diluted 1:100 and PCR amplified with nested vector primers 1019-06 (5'- GCT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG -3'; SEQ ID NO: 14) and 1916-82 (5' - CAT GAT TAC GCC AAG CTC TAA TAC GAC TC - 3'; SEQ ID NO: 15), and a nested gene specific primer 2374-52 (5' - GTG TAT CTC GAG TTG CCA TGC CC - 3'; SEQ ID NO: 10). The specific PCR products were subcloned into pGEM-T (Promega, Madison, WI) using the TA cloning protocol according to the manufacturer's instructions. The 3' region was isolated by PCR amplification of fetal scalp cDNA library using a vector primers 1340-35 (5' - CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG - 3': SEQ ID NO: 16) and a gene specific primer 2374-51 (5' - CCC CAG GCA CCT TCT CAG CTG C - 3'; SEQ ID NO: 9) using Clontech Advantage PCR Mix (Clontech, Palo alto, CA). The cycling conditions were 94°C for 2 min, (94°C for 15 sec, 66°C for 15 sec, and 72°C for 3 min) repeated 35 times, 72°C for 2 min and then kept at 4°C until being analyzed. The PCR products obtained in the reaction were diluted 1:100 and PCR amplified with a nested vector primer 1019-05 (5' - TGA ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG AG - 3': SEQ ID NO: 17) and a nested gene specific primer 2374-78 (5' - GCC CGT TGC AGC CTT TGG AG - 3': SEQ ID NO: 18) using Clontech Advantage PCR Mix (Clontech, Palo alto, CA). The cycling conditions were the same as mentioned above. The final PCR products were subcloned into pGEM-T (Promega, Madison, WI) using the TA cloning protocol. The sequence of

the 5' RACE clones and 3' region was determined by DNA sequencing using standard methods known to those skilled in the art. The sequence was assembled and found to encode a protein of 430 amino acids in length.

The cDNA libraries utilized to isolate this TNFr/OPG-like gene were made as follows. Total RNA was extracted from human tissue using standard RNA extraction procedures and poly-A^+ RNA was selected from this total RNA using standard procedures known to those skilled in the art. Random primed or oligo(dT) primed cDNA was synthesized from this poly-A^+ RNA using the procedure in the manual of the Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning kit (Gibco-BRL, Inc., Rockville, MD) or using other suitable procedures known to those skilled in the art. The resulting cDNA was digested with appropriate restriction enzymes (SalI and NotI) to create sticky ends to assist in ligation to a cloning vector. This digested cDNA was then ligated into the pSPORT-1 cloning vector, or another suitable cloning vector known to those skilled in the art, that had been pre-digested with appropriate restriction enzymes. The ligation products were transformed into *E. coli* using standard techniques known in the art, and transformants were selected on bacterial media plates containing ampicillin. The cDNA library consisted of all, or a subset, of these transformants.

EXAMPLE 2

Evaluation of TNFr/OPG Tissue Expression

Methods for mRNA expression analysis by RT-PCR were as follows.

Reverse transcription (RT) reactions. 2ug of total RNA from each human fetal tissue (total RNAs were purified by Total RNA Isolation Kit from Amersham Pharmacia Biotech Inc.,

Cat.# 15593-031). The reaction Mixture contained 2 ug total RNA, and 1 ul (1 ug) Random Primer. The volume was adjusted to 12 ul with water, heated to 70°C for 10 min, and quick-chilled on ice. 4 ul 5xFirst Stand Buffer (BRL), 2 ul 0.1 M DTT (BRL), and 1 ul 10 mM dNTP Mix(BRL) were then added, and the solution was mixed well and warmed to 37°C for 2 min. 1 ul Superscript II RT (BRL) was added, and the solution was incubated at 37°C for 1 hr.

The reaction tube was then placed in ice to terminate the reaction. cDNAs produced in this way were used as the template in the PCR analysis.

Estimate of relative expression levels

In order to normalize for differences in RNA concentration and cDNA conversion efficiency, control PCRs were performed on each cDNA using primers to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), a gene expected to be expressed at about the same level in all tissues. The products of this reaction were analyzed on 4% agarose gels and the relative intensity of the control bands were estimated. cDNA samples were then diluted according to the intensity of the control bands so that all samples were adjusted to a concentration that would produce G3PDH control bands of equal intensity. Expression analysis for the OPG-like transcript was done using these concentration-normalized samples.

G3PDH control PCRs

Template: 1μl of cDNA (prior to concentration adjustment)

Primers:5' primer:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3' SEQ ID NO: 19
3' primer:5'-GACCACAGTCCATGCCATCACT-3'SEQ ID NO: 20

Buffer/enzyme: Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cat. # 27-95530)

Cycling protocol:

95°C 60 sec;
92°C 30 sec, 55°C 45 sec, 72°C 60 sec, 25 cycles;
72°C 5 min.

Relative expression levels of OPG-like transcript

Template: 1µl of cDNA (concentration adjusted as described above).

Primers: (2374-51) 5'-CCCCAGGCACCTTCTCAGCTGC-3' SEQ ID NO: 9
(2374-53) 5'-CCCAGGCCAGCAGTCTCCACAG-3' SEQ ID NO: 13

Buffer/enzyme: Ready-To-GO PCR Beads from Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Cat. # 27-95530).

Cycling protocol:

95°C 30 sec;

94°C 5 sec, 72°C 4 min, 5 cycles;

94°C 5 sec, 70°C 4 min, 5 cycles;

94°C 5 sec, 68°C 2 min, 25 cycles;

72°C 3 min.

Products were run on 4% agarose/TBE gel electrophoresis. Using the faintest band as a baseline (1X), the relative intensity of the band corresponding to the amplified OPG-like transcript was then estimated. The estimated relative intensity of each band is set forth below, with highest intensities being found in fetal tissue, fetal uterus and fetal skin.

#	Tissue	Expression Level
1	Fetal Stomach	xxx
2	Fetal Pancreas	xxx
3	Fetal Bladder	xxx
4	Fetal Brain	xxx
5	Lymphoma Cell Lines	xx
6	Fetal Testis	xxxxx
7	Fetal Thymus	xxxx
8	Fetal Placenta	xx
9	Fetal Spinal Cord	xxx
10	Fetal Heart	x
11	Fetal Uterus	xxxxx
12	Fetal Kidney	xxxx
13	Fetal Skin	xxxxx
14	Fetal Liver	xxx
15	Fetal Lung	xxx
16	Fetal Mesentery	xx
17	Fetal Bone	xx

EXAMPLE 3

Production of TNFr/OPG-like polypeptides

A. Bacterial Expression

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary vector, such as pAMG21 (ATCC No. 98113) containing the lux promoter and a gene encoding kanamycin resistance is digested with BamHI and NdeI for directional cloning of inserted DNA. The ligated mixture is transformed into an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for kanamycin resistance.

Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of the insert.

Transformed host cells are incubated in 2xYT medium containing 30 g/ml kanamycin at 30oC prior to induction. Gene expression is induced by the addition of N-(3-oxohexanoyl)-dl-homoserine lactone to a final concentration of 30 ng/ml followed by incubation at either 30oC or 37oC for six hours. The expression of TNFr/OPG-like polypeptide is evaluated by centrifugation of the culture, resuspension and lysis of the bacterial pellets, and analysis of host cell proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Inclusion bodies containing TNFr/OPG-like polypeptide are purified as follows. Bacterial cells are pelleted by centrifugation and resuspended in water. The cell suspension is lysed by sonication and pelleted by centrifugation at 195,000xg for 5 to 10 minutes. The supernatant is discarded, and the pellet is washed and transferred to a homogenizer. The pellet is homogenized in 5 ml of a Percoll solution (75% liquid Percoll, 0.15M NaCl) until uniformly suspended and then diluted and centrifuged at 21,600xg for 30 minutes. Gradient fractions containing the inclusion bodies are recovered and pooled. The isolated inclusion bodies are analyzed by SDS-PAGE.

A single band on an SDS polyacrylamide gel corresponding to E. coli produced TNFr/OPG-like polypeptide is excised from the gel, and the N-terminal amino acid sequence is determined essentially as described by Matsudaira et al., J. Biol. Chem., 262:10-35 (1987).

B. Mammalian Cell Production

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a TNFr/OPG-like polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The primer sequences corresponding to the 5' and 3' ends are

described above. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary expression vector, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), which contains an Epstein-Barr virus origin of replication, may be used for the expression of TNFr/OPG-like in 293-EBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen) cells. Amplified and gel purified PCR products are ligated into pCEP4 vector and lipofected into 293-EBNA cells. The transfected cells are selected in 100 g/ml hygromycin and the resulting drug-resistant cultures are grown to confluence. The cells are then cultured in serum-free media for 72 hours. The conditioned media is removed and, TNFr/OPG-like polypeptide expression is analyzed by SDS-PAGE.

TNFr/OPG-like polypeptide expression may be detected by silver staining. Alternatively, TNFr/OPG-like polypeptide is produced as a fusion protein with an epitope tag, such as an IgG constant domain or a FLAG epitope, which may be detected by Western blot analysis using antibodies to the tag peptide.

TNFr/OPG-like polypeptides may be excised from an SDS-polyacrylamide gel, or TNFr/OPG-like fusion proteins are purified by affinity chromatography to the epitope tag, and subjected to N-terminal amino acid sequence analysis as described herein.

EXAMPLE 4

Production of Anti-TNFr/OPG-like Polypeptide Antibodies

Antibodies to TNFr/OPG-like polypeptides may be obtained by immunization with purified protein or with TNFr/OPG-like peptides produced by biological or chemical synthesis. Suitable procedures for generating antibodies include those described in Hudson and Hay, Practical

Immunology, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications (1980).

In one procedure for the production of antibodies, animals (typically mice or rabbits) are injected with a TNFr/OPG-like antigen (such as a TNFr/OPG-like polypeptide), and those with sufficient serum titer levels as determined by ELISA are selected for hybridoma production. Spleens of immunized animals are collected and prepared as single cell suspensions from which splenocytes are recovered. The splenocytes are fused to mouse myeloma cells (such as Sp2/0-Ag14 cells; ATCC no. CRL-1581), allowed to incubate in DMEM with 200 U/ml penicillin, 200 g/ml streptomycin sulfate, and 4 mM glutamine, then incubated in HAT selection medium (Hypoxanthine; Aminopterin; Thymidine). After selection, the tissue culture supernatants are taken from each well containing a hybridoma and tested for anti-TNFr/OPG-like antibody production by ELISA.

Alternative procedures for obtaining anti-TNFr/OPG-like antibodies may also be employed, such as the immunization of transgenic mice harboring human Ig loci for the production of human antibodies, and the screening of synthetic antibody libraries, such as those generated by mutagenesis of an antibody variable domain.

EXAMPLE 5

Production of TNFr/OPG-like Protein in Mammalian Cells

To generate soluble TNFr/OPG-like protein in mammalian cells, the cDNA encoding the extracellular domain of human TNFr/OPG-like polypeptide (amino acid 1-162) was PCR amplified with the following set of oligo primer pair:

5' -CCA TCG ATG GCT GAG CAG CAG GTG TGG ACA-3' (SEQ ID NO: 21)

5' -TGG CGA TGA CGG TGA CCT GGG CGG-3' (SEQ ID NO: 22).

The PCR reaction was carried out in a 50 µl volume which consisted of 1 unit of vent DNA polymerase (New England

Biolabs) in 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 10 μM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton-X100, 10 μM of each dNTP, 1μM of each primer and 10 ng of TNFr/OPG-like cDNA template. PCR Reactions were performed at 98°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute, for a total of 5 cycles and 98° for 30 seconds, 65° for 30 seconds, 72° for 1 minute for a total of 25 cycles. The resulting PCR fragment was isolated by electrophoresis through 1% agarose gel and purification by the Geneclean procedure (Bio 101, Inc.). The PCR fragment creates a Cla I restriction site at its 5' end and a BstEII restriction site at its 3' end. The ClaI+BstEII digested PCR fragment was then subcloned in-frame into a modified pCMVi-Fc vector in front of the human IgG-γ1 heavy chain sequence as described previously by Vasser et al. (Science 286, pp. 735-741, 1999). A linker was introduced which encodes two irrelevant amino acids (Val-Thr) spanning the junction between the TNFr/OPG-like extracellular domain and the IgG Fc region.

The construct was transfected into 293-T cells by the calcium phosphate method as described by Ausubel et al. (Curr. Prot. Mol. Biol. 1, 9.1.1-9.1.3, 1994). Twenty-four hours post-transfection, the cells were washed in PBS once and then cultured in serum-free media for 72 hr. The conditioned media was collected. The TNFr/OPG-like-Fc fusion protein that was secreted into the media was detected by Western blot analysis with anti-human IgG Fc antibody (Jackson Immuno Reasearch cat no. 309-035-008) (Figure 9) and three distinct bands were observed having molecular weights, 56.6 kD, 44.3kD, and 40.6 kD respectively.

The Fc fusion protein was purified by protein-A column chromatography (Pierce) according to the manufacturer's recommended procedures. Fifty pmoles of the purified protein was then subjected to N-terminal sequence analysis by

automated Edman degradation as essentially described by Matsudaira et al. (J. Biol. Chem. 262, 10-35, 1987).

Following 10 cycles of amino acid sequencing, the 56.6 kD band gave the sequence NH_2- ST(T)LWQCPPGEE-CO_2H (1.4 pmol)(SEQ ID NO: 23). At the third cycle, Thr was not detected as expected from the primary structure of the protein, indicating the possibility of O-linked sugars. The results show that the protein was cleaved at Thr25. The 44.3 kD band (14.6 pmol) and the 40.6 kD band (24.7 pmol) both gave the sequence NH_2-GVEVAAGASSGGET-CO_2H (SEQ ID NO: 24); indicating the protein was cleaved at Arg130. The difference in size between these two bands is presumably due to differential N-linked glycosylation at Arg149. The 40.6 kD band and the 44.3 kD band represent approximately 97 % of the recovered material. Closer examination of the cleavage site at Arg 130 reveals a consensus furin cleavage site beginning with Arg126 (RRARR-GVEV...) (SEQ ID NO: 25).

To explore the role of furin in the cleavage of TNFr/OPG-like receptor extracellular domain, we transiently transfected 293-T cells with TNFr/OPG-like-Fc with or without co-transfection of the potent furin inhibitor α1-antitrypsin containing the Portland mutation (α1-PDX) (J. Biol. Chem.: 24887-91. 1993). In short, $7x10^6$ 293-T cells were transiently transfected with 20 µgs of TNFr/OPG-like-Fc alone or with 15 µgs of TNFr/OPG-like-Fc and 5 µgs of α1-PDX, using the $CaOPO_4$ method of transfection described above. The conditioned medium was collected and subjected to Western blot analysis as described above. Co-transfection with α1-PDX completely abrogated furin cleavage resulting in 100% of the recovered material beginning with Ser26 as shown in Fiure 9 (left panel).

To further confirm the role of furin cleavage in liberation of a soluble extracellular domain of TNFr/OPG-like

receptor, we engineered a version of the TNFr/OPG-like receptor containing the signal peptide from OPG and an in frame, NH2 terminal FLAG epitope tag (SO.FLAG-TNFr/OPG-like receptor). The SO.FLAG-TNFr/OPG-like receptor construct encodes a protein containing OPG signal peptide (amino acid 1-21)-linker(KLH)-FLAG epitope (MDYKDDDDK; SEQ ID NO: 26)-linker(KL)-TNFr/OPG-like receptor (amino acid 26-430). Again, $7x10^6$ 293-T cells were transfected with SO.FLAG-TNFr/OPG-like receptor alone or co-transfected with α1-PDX. Twnet-four hours after the transfection, cells were incubated in serum free media for 72 hours. The conditioned media was collected and analyzed by immunoprecipitation/Western blotting using the anti-FLAG monoclonal antibody M2 (Sigma, St.Louis MO). Two distinct bands of 17 KDa and 18 Kda were detected in the conditioned medium, corresponding to the cleaved soluble extracellular domain of OPG-like receptor as shown in Figure 9 (left panel). Similarly co-transfection with α1-PDX dramatically reduces the amount of shed FLAG-TNFr/OPG-like extracellular domain recovered from the conditioned media.

EXAMPLE 6

Detection of TNFr/OPG-like-Fc Binding to WEHI-3 Cells

The binding activity of TNFr/OPG-like-Fc with various cell lines was tested by FACS analysis as previously described (Goodwin *et al.* Cell, 73, 447-456, 1993). Briefly, WEHI-3 cells were incubated for 30 minutes at 4° C in PBS supplemented with 2% rabbit serum and 5% goat serum for blocking purposes. Subsequently, the cells were incubated with 1 µg/ml TNFr/OPG-like-Fc fusion protein or human IgG. The cells were then stained for 30 minutes at 4° C with biotinylated antibody specific for the Fc domain of human IgG (Jackson Immunoresearch,West Grove, PA) at a dilution of 1:200, followed by a 30 minute incubation with streptavidin-phycoerythrin (Jackson Immunoresearch,West Grove, PA) at a

dilution of 1:50. The cells were then subjected to FACS analysis using a Becton Dickenson FACS Scan. TAJ.FC and E127.FC were non-specific fusion proteins used for controls and did not result in any specific binding. This analysis revealed that WEHI-3 cells, a myelo-monocytic cell line, specifically bound the TNFr/OPG-like-Fc fusion protein indicating the presence of a membrane bound form of a putative ligand for the OPGlike receptor. (See Figure 10) The binding of TNFr/OPG-like-Fc fusion protein was partially blocked by pre-incubation with conditioned media containing the N-terminal FLAG tagged TNFr/OPG-like extracellular domain.

EXAMPLE 7

Northern Blot Analysis of TNFr/OPG-like receptor mRNA Tissue Expression

Northern blot analysis was performed to identify those tissues in which the TNFr/OPG-like receptor transcript is expressed. A probe for use in Northern blot analysis was generated by digesting the human TNFr/OPG-like receptor cDNA with *EcoRV and XhoI* for about three hours at 37° C and running the restriction digest on an 0.8% agarose gel to separate the fragments. An approximately 434 base pair *ECORV-XhoI* fragment, extending from nucleotide -180 to nucleotide +254 of the cDNA, was isolated and gel purified using the QiaQuick® gel purification system (Qiagen, Chatsworth, CA). The isolated, gel purified fragment was quantitated by estimation on a one percent agarose gel. About 25 ng of this fragment was denatured by boiling for 5 minutes, and then quenching on ice for 2 minutes. The fragment was then

radioactively labeled with α-^{32}P-dCTP using the High Prime DNA labeling kit (Boehringer Manheim, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's protocol. Human multiple tissue northern blots were purchased (Clonetech, Palo Alto, CA) and first prehybridized in Clontech Express™ hybridization buffer for about one hour at about 65°C. Following prehbridization, the labeled probe was denatured by boiling for about five minutes then quenched on ice for 2 minutes, and added to the hybridization buffer containing the Northern blots. The blots were allowed to hybridize for about two hours at about 65°C. After hybridization the blots were washed in 2xSSC for 30 minutes at room temperature, followed by 3 successive washes in 0.2xSSC containing 0.1 percent SDS at about 60°C for 30 minutes. The blots were dried briefly and exposed to an image analyzer screen for 6 days. The results are shown in Figure 11. TNFr/OPG-like receptor mRNA was mainly detected in peripheral blood leukocytes, spleen, testis and skeletal muscle.

WHAT IS CLAIMED

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NOS: 1 or 3;

(b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(c) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of (a) or (b), wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4; and

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

2. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NOS: 1 or 3, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(c) a nucleotide sequence of SEQ ID NOS: 1 or 3; (a); or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(d) a nucleotide sequence of SEQ ID NOS: 1 or 3, or (a)-(c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(e) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a)-(d), wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4; and

(f) a nucleotide sequence complementary to any of (a)-(c).

3. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4 which has a C- and/or N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(f) a nucleotide sequence of (a)-(e) comprising a fragment of at least 15 nucleotides;

(g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a)-(f), wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4; and

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

4. A vector comprising the nucleic acid molecule of claims 1, 2, or 3.

5. A host cell comprising the vector of claim 4.

6. The host cell of claim 5 that is a eukaryotic cell.

7. The host cell of claim 5 that is a prokaryotic cell.

8. A process of producing a TNFr/OPG-like polypeptide comprising culturing the host cell of claim 6 under suitable conditions to express the polypeptide, and optionally isolating the polypeptide from the culture.

9 A polypeptide produced by the process of claim 8.

10. The process of claim 11, wherein the nucleic acid molecule comprises promoter DNA other than the promoter DNA for the native TNFr/OPG-like polypeptide operatively linked to the DNA encoding the TNFr/OPG-like polypeptide.

11. The isolated nucleic acid molecule according to claim 2 wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

12. A process for identifying candidate inhibitors of TNFr/OPG-like polypeptide activity or production comprising exposing a cell according to claims 6, 7, or 8 to the candidate inhibitors, and measuring TNFr/OPG-like polypeptide activity or production in said cell, comparing activity of TNFr/OPG-like in cells exposed to the candidate inhibitor with activity in cells not exposed to the candidate inhibitor.

13. A process for identifying candidate stimulators of TNFr/OPG-like polypeptide activity or production comprising exposing a cell according to claims 6, 7, or 8 to the candidate stimulators, and measuring TNFr/OPG-like polypeptide activity or production in said cell, comparing activity of TNFr/OPG-like in cells exposed to the candidate stimulator with activity in cells not exposed to the candidate stimulator.

14. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4.

15. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the mature amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4, comprising a mature amino terminus at residue 1, optionally further comprising an amino-terminal methionine;

(b) an amino acid sequence for an ortholog of SEQ ID NOS: 2 or 4, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(c) an amino acid sequence that is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 or 4, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(d) a fragment of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of either the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4, or at least one of (a)-(c) wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4.

16. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(b) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 3 OR 4 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(c) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(d) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 3 OR 4 which has a C- and/or N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4; and

(e) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4, with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4.

17. An ortholog of claim 15 or 16 wherein the polypeptide is encoded by the polynucleotide set forth in SEQ ID NO: 6.

18. A polypeptide according to claim 15 or 16 wherein the amino acid at position 42 of SEQ ID NOS: 2 is selected from the group consisting of glycine or proline.

19. A polypeptide according to claim 15 or 16 wherein the amino acid at position 51 of SEQ ID NOS: 2 is selected from the group consisting of serine, threonine, aspargine, glutamine and cysteine.

20. A polypeptide according to claim 15 or 16 wherein the amino acid at position 56 of SEQ ID NOS: 2 is selected from the group consisting of phenylalanine, tryptophan and tyrosine.

21. A polypeptide according to claim 15 or 16 wherein the amino acid at position 68 of SEQ ID NOS: 2 is selected from the group consisting of lysine, arginine and histadine.

22. A polypeptide according to claim 15 or 16 wherein the amino acid at position 71 of SEQ ID NOS: 2 is selected from the group consisting of cysteine, serine, threonine, asparagine and glutamine.

23. A polypeptide according to claim 15 or 16 wherein the amino acid at position 84 of SEQ ID NOS: 2 is selected from the group consisting of leucine, norleucine, isoleucine, valine, methionine, alanine, norleucine or phenylalanine.

24. A polypeptide according to claim 15 or 16 wherein the amino acid at position 87 of SEQ ID NOS: 2 is selected from the group consisting of aspartic acid or glutamic acid.

25. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of claims 1, 2, or 3.

26. The isolated polypeptide according to claim 15 or 16 wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

27. An antibody produced by immunizing an animal with a peptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 or 4.

28. An antibody or fragment thereof that specifically binds the polypeptide of claims 13, 14 or 15.

29. The antibody of claim 27 that is a monoclonal antibody.

30. A hybridoma that produces a monoclonal antibody that binds to a peptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 or 4.

31. A method of detecting or quantitating the amount of TNFr/OPG-like in a sample comprising contacting a sample suspected of containing TNFr/OPG-like polypeptide with the anti-TNFr/OPG-like antibody or fragment of claims 27, 28 or 29 and detecting the binding of said antibody or fragment.

32. A selective binding agent or fragment thereof that specifically binds at least one polypeptide wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4;

(b) a fragment of the amino acid sequence set forth in at least one of SEQ ID NOS: 2 or 4; and

(c) a naturally occurring variant of (a) or (b).

33. The selective binding agent of claim 32 that is an antibody or fragment thereof.

34. The selective binding agent of claim 32 that is a humanized antibody.

35. The selective binding agent of claim 32 that is a human antibody or fragment thereof.

36. The selective binding agent of claim 32 that is a polyclonal antibody or fragment thereof.

37. The selective binding agent claim 32 that is a monoclonal antibody or fragment thereof.

38. The selective binding agent of claim 32 that is a chimeric antibody or fragment thereof.

39. The selective binding agent of claim 32 that is a CDR-grafted antibody or fragment thereof.

40. The selective binding agent of claim 32 that is an antiidiotypic antibody or fragment thereof.

41. The selective binding agent of claim 32 which is a variable region fragment.

42. The variable region fragment of claim 32 which is a Fab or a Fab' fragment.

43. A selective binding agent or fragment thereof comprising at least one complementarity determining region with specificity for a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 or 4.

44. The selective binding agent of claim 32 which is bound to a detectable label.

45. The selective binding agent of claim 32 which antagonizes TNFr/OPG-like polypeptide biological activity.

46. A method for treating, preventing, or ameliorating a disease, condition, or disorder associated with altered levels of TNFr/OPG-like polypeptide comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent according to claim 32.

47. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 or 4.

48. A hybridoma that produces a selective binding agent capable of binding a polypeptide according to claims 14, 15 or 16.

49. A composition comprising the polypeptide of claims 14, 15 or 16 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

50. The composition of claim 49 wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer, anti-oxidant or combination thereof.

51. The composition of claim 49 wherein the polypeptide comprises the mature amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 2 or 4.

52. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of claims 14, 15 or 16.

53. The polypeptide of claim 52 which is covalently modified with a water-soluble polymer.

54. The polypeptide of claim 53 wherein the water-soluble polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols, and polyvinyl alcohol.

55. A composition comprising a nucleic acid molecule of claims 1, 2, or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

56. A composition of claim 55 wherein said nucleic acid molecule is contained in a viral vector.

57. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of claims 1, 2, or 3.

58. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of claims 14, 15 or 16 fused to a heterologous amino acid sequence.

59. The fusion polypeptide of claim 58 wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.

60. A method for treating, preventing or ameliorating a medical condition in a mammal resulting from decreased levels of TNFr/OPG-like polypeptide comprising administering to a patient the polypeptide of claims 14, 15 or 16 or the polypeptide encoded by the nucleic acid of claims 1, 2, or 3 to said mammal.

61. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject caused by or resulting from abnormal levels of TNFr/OPG-like polypeptide comprising:

(a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of claims 14, 15 or 16 or the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of claims 1, 2, or 3 in a sample; and

(b) comparing the level of TNFr/OPG-like polypeptide in a biological, tissue or cellular sample from normal subjects or the subject at an earlier time, wherein susceptibility to a pathological condition is based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

62. A device, comprising:

(a) a membrane suitable for implantation; and

(b) cells encapsulated within said membrane, wherein said cells secrete a polypeptide of claims 14, 15 or 16, and wherein said membrane is permeable to said protein and impermeable to materials detrimental to said cells.

63. A device, comprising:

(a) a membrane suitable for implantation; and

(b) the TNFr/OPG-like polypeptide encapsulated within said membrane, wherein said membrane is permeable to the polypepetide.

64. A method of identifying a compound which binds to a polypeptide comprising:

(a) contacting the polypeptide of claims 14, 15 or 16 with a compound; and

(b) determining the extent of binding of the polypeptide to the compound.

65. A method of identifying antagonists of TNFr/OPG-like biological activity comprising:

(a) contacting a small molecule compound with a TNFr/OPG-like polypeptide;

(b) detecting the biological activity of TNFr/OPG-like in the presence of said small molecule compound; and

(c) comparing the level of TNFr/OPG-like biological activity in the presence and absence of said small molecule compound.

66. The method of claim 65 wherein the small molecule compound is a member of a naturally occurring chemical library.

67. The method of claim 65 wherein the small molecule compound is a member of a naturally occurring medicinal chemical library.

68. The method of claim 65 wherein the small molecule compound is a member of a combinational chemical library.

69. A method of identifying a polypeptide which binds to a TNFr/OPG-like polypeptide, wherein the method utilizes a yeast two-hybrid approach comprising:

(a) preparing a bait construct comprising a GAL4 DNA binding domain fused to the nucleotide sequence of claim 1, 2 or 3;

(b) screening a cDNA library with the bait construct, wherein said library consists of nucleotide sequences fused to a GAL4 activation domain, and

(c) identifying polypeptides that bind to said construct by detecting transcriptional activation of a reporter gene under control of GAL4.

70. A TNFr/OPG-like polypeptide binding partner identified by the method of claim 71.

71. A method of modulating levels of a polypeptide in an animal comprising administering to the animal the nucleic acid molecule of claims 1, 2, or 3.

72. An antagonist of TNFr/OPG-like polypeptide activity selected from the group consisting of TNFr/OPG-like selective binding agents, small molecules, antisense oligonucleotides, and peptides or derivatives thereof having specificity for TNFr/OPG-like polypeptide.

73. A method of reducing cellular production of TNFr/OPG-like, comprising transforming or transfecting cells with an antagonist according to claim 72.

74. A method according to claim 73, wherein the antagonist is an antisense reagent, said reagent comprising an oligonucleotide comprising a single stranded nucleic acid sequence capable of binding to TNFr/OPG-like mRNA.

75. A transgenic non-human mammal comprising the nucleic acid molecule of claims 1, 2, or 3.

76. A transgenic non-human mammal conprising a disruption of the nucleic acid molecule of claim 1, 2 or 3 wherein the expression of TNFr/OPG-like polypeptide is decreased.

77. A diagnostic reagent comprising a detectably labeled polynucleotide encoding the amino acid sequence set out in SEQ ID NOS: 2 or 4, or a fragment, variant or homolog thereof including allelic variants and spliced variants thereof.

78. The diagnostic reagent of claim 77, wherein said labeled polynucleotide is a first-strand cDNA.

79. A method for determine the presence of TNFr/OPG-like nucleic acids in a biological sample comprising the steps of:

(a) providing a biological sample suspected of containing TNFr/OPG-like nucleic acids;

(b) contacting the biological sample with a diagnostic reagent according to claim 84 under conditions wherein the diagnostic reagent will hybridize with TNFr/OPG-like nucleic acids contained in said biological sample;

(c) detecting hybridization between nucleic acid in the biological sample and the diagnostic reagent; and

(d) comparing the level of hybridization between the biological sample and diagnostic reagent with the level of hybridization between a known concentration of TNFr/OPG-like nucleic acid and the diagnostic reagent.

80. A method for detecting the presence of TNFr/OPG-like nucleic acids in a tissue or cellular sample comprising the steps of:

(a) providing a tissue or cellular sample suspected of containing TNFr/OPG-like nucleic acids;

(b) contacting the tissue or cellular sample with a diagnostic reagent according to claim 77 under conditions wherein the diagnostic reagent will hybridize with TNFr/OPG-like nucleic acids;

(c) detecting hybridization between TNFr/OPG-like nucleic acid in the tissue or cellular sample and the diagnostic reagent; and

(d) comparing the level of hybridization between the tissue or cellular sample and diagnostic reagent with the level of hybridization between a known concentration of TNFr/OPG-like nucleic acid and the diagnostic reagent.

81. The method of claim 86 or 87 wherein said polynucleotide molecule is DNA.

82. The method of claim 86 or 87 wherein said polynucleotide molecule is RNA.

Figure 1

cDNA Sequence of Human TNFr/OPG-Like Nucleic Acid Molecule

(SEQ ID NO. 1)

```
   1  CGGGACCTTC AGATATCCCC TCCCAGCCGA GGGGGCTTCC ATCTAACTGT
  51  TTTTTTGGTC ACGGTTCCAG GGCCGTTTTA GACAGTGGAG GCCTTGTGGG
 101  GCAGGGTGTG AGGGGTGCTG AGCAGCAGGT GTGGACATGT GTGTGCACCA
 151  GGCCTTTCTA CCTGACCGGG CCGGCGACCA CCAGGGGCCT GAGGATGAAG
 201  CCAAGTCTGC TGTGCCGGCC CCTGTCCTGC TTCCTTATGC TGCTGCCCTG
 251  GCCTCTCGCC ACCCTGACAT CAACAACCCT TTGGCAGTGC CCACCTGGGG
 301  AGGAGCCCCA CCTGGACCCA GGGCAGGGCA CATTATGCAG GCCCTGCCCC
 351  CCAGGCACCT TCTCAGCTGC ATGGGGCTCC AGCCCATGCC AGCCCCATGC
 401  CCGTTGCAGC CTTTGGAGGA GGCTGGAGGC CCAGGTGGGC ATGGCAACTC
 451  GAGATACACT CTGTGGAGAC TGCTGGCCTG GGTGGTTTGG GCCTTGGGGG
 501  GTTCCCCGCG TTCCATGTCA ACCATGTTCC TGGGCACCTC TGGGTACTCA
 551  TGGCTGTGAT GAGTGGGGGC GCCGGGCCCG ACGTGGCGTG GAGGTGGCAG
 601  CAGGGGCCAG CAGCGGTGGT GAGACACGGC AGCCTGGGAA CGGCACCCGG
 651  GCAGGTGGCC CAGAGGAGAC AGCCGCCCAG TACGCGGTGA TCGCCATCGT
 701  CCCTGTCTTC TGCCTCATGG GGCTGTTGGG CATCCTGGTG TGCAACCTCC
 751  TCAAGCGGAA GGGCTACCAC TGCACGGCGC ACAAGGAGGT CGGGCCCGGC
 801  CCTGGAGGTG GAGGCAGTGG AATCAACCCT GCCTACCGGA CTGAGGATGC
 851  CAATGAGGAC ACCATTGGGG TCCTGGTGCG CTTGATCACA GAGAAGAAAG
 901  AGAATGCTGC GGCCCTGGAG GAGCTGCTGA AAGAGTACCA CAGCAAACAG
 951  CTGGTGCAGA CGAGCCACAG GCCTGTGTCC AAGCTGCCGC CAGCGCCCCC
1001  GAACGTGCCA CACATCTGCC CGCACCGCCA CCATCTCCAC ACCGTGCAGG
```

Figure 1 (cont.)

```
1051  GCCTGGCCTC GCTCTCTGGC CCCTGCTGCT CCCGCTGTAG CCAGAAGAAG
1101  TGGCCCGAGG TGCTGCTGTC CCCTGAGGCT GTAGCCGCCA CTACTCCTGT
1151  TCCCAGCCTT CTGCCTAACC CGACCAGGGT TCCCAAGGCC GGGGCCAAGG
1201  CAGGGCGTCA GGGCGAGATC ACCATCTTGT CTGTGGGCAG GTTCCGCGTG
1251  GCTCGAATTC CTGAGCAGCG GACAAGTTCA ATGGTGTCTG AGGTGAAGAC
1301  CATCACGGAG GCTGGGCCCT CGTGGGGTGA TCTCCCTGAC TCCCCACAGC
1351  CTGGCCTCCC CCCTGAGCAG CAGGCCCTGC TAGGAAGTGG CGGAAGCCGT
1401  ACAAAGTGGC TGAAGCCCCC AGCAGAGAAC AAGGCCGAGG AGAACCGCTA
1451  TGTGGTCCGG CTAAGTGAGA GCAACCTGGT CATCTGAGGG GCGGTCTAGT
1501  CTAAGGACAC TGCGGCCCTG CCCTGGGAGG TTCCGAAGGC TTCCTGGAGG
1551  AGGTGGAGCT GCAGCTGGGA CTGTGAGGAC CGAGAAGCAA TGGCCCAGCA
1601  GACGAGACAG CAAAGACCAA GGCCTGGAGG TGGGAGCGTC TGCCCCAGTG
1651  AGGAGGCAGG TGGCCGGCGG GCACTGTGTA CAGGAGCAGG CTGAGCCCCG
1701  CCCCTGGCCC TGCTGCCATG TTGCTCCCCT GAAGGATGCC CCGACCCCCG
1751  TGCCTGCCCT GGCTGGATCC TAGGAGCCCA CGGGATTCTC TGTATCATCA
1801  GAGGCTGGGC TTGGCAGAGG GGAGGGGCCT GTGCCCGTCA CCCCTGGCCC
1851  CATTCCTTGG TAATTAGCCA CACCCTTGCC TCTGTACAGG GCCCTAGAGC
1901  AGATGTGCGT CCCCCTCCTC TTCCAGCAGG TCTATAAAGG GAAGGGGTAG
1951  CAGAAAGTCC TGGGCTAGCA GAGTGAGTCC CTGGGTTCTA ATCTTGGGCA
2001  CATCTGTGGC CATCGCTGGG TCCATTTTTC TGACTGTGAA GTAAGGAGAG
2051  ACGTCTCAGT ACCCAGGGCC TCTTCAGCTC TTTGTAGGTT CTGGGCTGGG
2101  TTGTGGGGGA CTGGGGAGCT GGGCTCTACC ATCCCTCCCA TTAGTAGCTT
2151  TATCCAGCCC CGTTTTTGCT GCTTCCAGGG CCTCTGCCTT CAAGGCCCCC
2201  ATGGGGCTGT CCATCCATGG CTCTGCCTAC GGAAGGGGCT TAATGCATGT
```

Figure 1 (cont)

2251 GCCTGCCCCT CCCCCAGCTG TTTTTAATGA AACTGAAAAA ATAGACTTGA

2301 TCCCGGCAGG ACTGTGATAC AGAGCCCTAG CCTGCCCAGC CAGCCCCAAG

2351 ATCTCAGGAG CTTTACGGAG AAGACTTGGT GGGGCTGGAG CACACCTTGG

2401 GCCTCAGTGG TTTCTGTGTC CCTGTGGTGC CAGTGCTTCT GGGCAGTGCA

2451 GGCGGCTGCC AGGCCCAGCC CTGACTTCCA CTCTGGCTCA GCAACCTGGT

2501 TATTTATGTG GGGCCGTGCA GGCATGGGCC CACTGCCTGT CCATCCTGTT

2551 TCTCTTATTT ATTGAAACTC ACCATTGCCC TATCCTTGTG TCTCCACCCC

2601 CTTCCATGTG TTGAATAATA AAAGGTGGGA AAGTGCTG

Figure 2
cDNA Sequence of Mouse TNFr/OPG-Like Nucleic Acid Molecule
(SEQ ID NO. 3)

```
   1  CAGGCTGCGC GGCCGGCCCC GAGCGCTCGC CTAGCGGGGC CCCGGCGCCG
  51  CGTCGGACGC TGAGCGAAGC TGGTGCTGCG GGCCAGGTCA ATGTCACTCC
 101  AGGGCCTGAT GATGAAGCGG ACCTTGCTGT GCTGGCCCCT GTCTTGCCTC
 151  TTTGTGCTGC TGCCCTGGCC TCTGGCCACT CCAACACCAA TAACTCCTTG
 201  GCTGTGTCCA CCTGGCAAAG AGCCTGACCC AGATCCAGGA CAGGGCACAT
 251  TATGCAGAAC TTGCCCCCCA GGAACCTTTT CAGCCTCATG GAACTCCTAT
 301  CCATGCCAGC CTCATTACCG ATGCAGCCTT CAAAAGAGGC TGGAGGCCCA
 351  GGCTGGCACA GCAACTCATG ATACAATGTG TGGAGACTGC CAGCATGGGT
 401  GGTTTGGGCC ACAGGGAGTT CCTCATGTTC CGTGTCAGCC ATGTTCCAAG
 451  GCACCTCCAA GTACTGGTGC CTGTGATGAG TCAGGGCGGC GGGGCCGGCG
 501  TGGCGTCGAA GTGGCAGCAG GTACCAGTAG CAACGGTGAA CCTCGGCAGC
 551  CCGGGAATGG CACTCGGGCA GGCGGTCCTG AGGAGACGGC TGCCCAGTAT
 601  GCAGTGATTG CCATCGTTCC TGTCTTTTGT CTCATGGGGC TTCTGGGCAT
 651  CCTGGTGTGC AACCTGCTCA AGCGGAAGGG CTACCATTGC ACAGCCCAAA
 701  AGGAAGTTGG GCCCAGCCCT GGTGGAGGAG GCAGCGGGAT TAATCCTGCC
 751  TATAGGACTG AAGATGCCAA CGAGGACACC ATTGGAGTCC TGGTGCGCCT
 801  GATCACAGAG AAGAAAGAGA ATGCAGCGGC CCTGGAGGAG CTGTTGAAAG
 851  AATATCACAG CAAACAGCTG GTACAGACAA GTCACAGGCC TGTACCCAGG
 901  CTGCTGCCGG CCTCACCCAG CATACCCCAC ATCTCCCCGC ATCACCACCA
 951  CCTGCACACT GTGCAGGGCC TGGCCTCACT CTCTGGCCCC TGTTGCTCCC
1001  GTTGTAGCCA GAAGTGGCCA GAGGTGCTGC TGTCTCCTGA GGCAGCAGCT
1051  GCCACCACTC CTGCTCCCAC CCTTCTGCCT ACTGCATCCA GGGCTCCCAA
```

Figure 2 (cont)

```
1101  GGCTAGTGCC AAGCCAGGAC GTCAGGGCGA GATTACCATC TTGTCTGTGG
1151  GCAGGTTCCG TGTGGCTCGT ATTCCTGAGC AGCGGACCAG TTCATTGTTA
1201  TCTGAGGTGA AGACCATCAC GGAGGCTGGG CCTTCAGAGG GTGATCTCCC
1251  TGACTCCCCA CAGCCTGGTT TTCCCCCCGA GCAGCGGGCA CTGCTGGGAA
1301  GTGGTGGGAG CCATACTAAG TGGTTGAAGC CCCCAGCAGA GAACAAAGCT
1351  GAGGAGAACC GCTATGTGGT CCGGCTAAGT GAAAGCAACC TGGTCATCTG
1401  ATGGGCTGTC TAGAATTAGA CACTCTGCCC TGTCCTGGGA GGTTCTGAAG
1451  GCTTCCTGCA GGAGGGAGAG CTGCAGCTGG GACTGAGGAC CAAGATGCAA
1501  AGGCCAAGTC CTGGAGGTGG GACCGTCCGC CCCACTGAGG AGGCAGCCTG
1551  CGGCACAGCA CGTGAGCAGG AGATCAAGAG CCCACCCTAT CCCTGCAGTC
1601  CCGGTTACTT CCATGCAGGG TGCTGTAACC CTGTGCCTGC CCTGAACACA
1651  TCATAGGAGC CCTCTGTCCC TTAGAGGTCT GGTTTGGTGG AGGAGTGGTA
1701  TCTGTACCTG GCCCCAAGCT TGTGCCTTGG GAACTAGCCA CTCTTGCCCA
1751  TGTCCTGGAC CCTGGATGTG ACTCCCTCTC TTCTGGCAGG CCCTATAGAG
1801  GGAAGGGGTA GCAAAGAGCC CTGTACTGGT GGCAGAGTAC CTGGGTTCCA
1851  ATCCTGGGCT TATCCCTAGG TACGTAGGGG AGGAGAACTC AGTTCCCAGG
1901  ACCTCTCCAG CTCTTTGCAG ATTCTGGGCT GAGTCCTGTT GGGGGGAGCT
1951  TGACTTTGCT ACCCTCCCAT TAGTAGCTTT ATCTGGCCTG TTTTTGCTGC
2001  TTCCTGGGCC TTGGCCTTCA TGGCTCCCAT GGGACTGTCT ATTATGGTGA
2051  TGCCTTCAGA AGGGGTTTAA TGCATGTGCC TGCCCCTACC CTGCTATTTT
2101  TAATGAAACT GAAAAATGAC TTGACTTGGA CAGGGCTCTC TGGTGCAGAG
2151  CCTCAGTCCA CCCTGCTGCC CTCAAGCTCT GGAGCTGTGG GAAGAGGAGA
2201  CAGGCAGGCT AGGGAGTGCC CGTGGCCTGT GGTTTTCAAT GCCCCTGTGG
2251  TACAGTATCT GCCTGAGTTT TGGGTAGCAG GGCTGACTGC CAATCCAGCC
```

Figure 2 (cont)

2301 TGTCTTAGTC TCTGCTCTGG CTCAGTGCCT CGTTATTTAT GTGGGGCCGT

2351 GCAGGCGCGG GGCCCACTGC CCATCCCATT TCTTATTTAT TGAAACCTGC

2401 TGTTGCCCTG CCCCTACATC TCCAGCCCCA CACACTTGAG TAATAAAAGG

2451 TGGAAAATGT CAAAAAAAAA AAAAAAAGG

Figure 2

Predicted Amino acid sequence of Human TNFr/OPG-Like Polypeptide

(SEQ ID NO. 2)

```
  1  MKPSLLCRPL SCFLMLLPWP LATLTSTTLW QCPPGEEPDL DPGQGTLCRP
 51  CPPGTFSAAW GSSPCQPHAR CSLWRRLEAQ VGMATRDTLC GDCWPGWFGP
101  WGVPRVPCQP CSWAPLGTHG CDEWGRRARR GVEVAAGASS GGETRQPGNG
151  TRAGGPEETA AQYAVIAIVP VFCLMGLLGI LVCNLLKRKG YHCTAHKEVG
201  PGPGGGGSGI NPAYRTEDAN EDTIGVLVRL ITEKKENAAA LEELLKEYHS
251  KQLVQTSHRP VSKLPPAPPN VPHICPHRHH LHTVQGLASL SGPCCSRCSQ
301  KKWPEVLLSP EAVAAITPVP SLLPNPTRVP KAGAKAGRQG EITILSVGRF
351  RVARIPEQRT SSMVSEVKTI TEAGPSWGDL PDSPQPGLPP EQQALLGSGG
401  SRTKWLKPPA ENKAEENRYV VRLSESNLVI *
```

Figure 4

Predicted Amino acid sequence of Mouse TNFr/OPG-Like Polypeptide

(SEQ ID NO:4)

```
   1  MSLQGLMMKR TLLCWPLSCL FVLLPWPLAT PTPITPWLCP PGKEPDPDPG
  51  QGTLCRTCPP GTFSASWNSY PCQPHYRCSL QKRLEAQAGT ATHDTMCGDC
 101  QHGWFGPQGV PHVPCQPCSK APPSTGGCDE SGRRGRRGVE VAAGTSSNGE
 151  PRQPGNGTRA GGPEETAAQY AVIAIVPVFC LMGLLGILVC NLLKRKGYHC
 201  TAQKEVGPSP GGGGSGINPA YRTEDANEDT IGVLVRLITE KKENAAALEE
 251  LLKEYHSKQL VQTSHRPVPR LLPASPSIPH ICPEHHHLHT VQGLASLSGP
 301  CCSRCSQKWP EVLLSPEAAA ATTPAPTLLP TASRAPKASA KPGRQGEITI
 351  LSVGRFRVAR IPEQRTSSLL SEVKTITEAG PSEGDLPDSP QPGFPPEQRA
 401  LLGSGGSHTK WLKPPAENKA EENRYVVRLS ESNLVI*
```

Figure 5

Human TNF/OPG-Like cDNA with Predicted Amino Acid Sequence

(SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2)

```
   1 CGGGACCTTCAGATATCCCCTCCCAGCCGAGGGGGCTTCCATCTAACTGTTTTTTTGGTC  60
     G  P  S  D  I  P  S  Q  P  R  G  L  P  S  N  C  F  F  G  H  -

  61 ACGGTTCCAGGGCCGTTTTAGACAGTGGAGGCCTTGTGGCGGCAGGGTGTGACGGGTGCTG 120
     G  S  R  A  V  L  D  S  G  G  L  V  G  Q  G  V  R  C  A  E  -

 121 AGCAGCAGGTCTGGACATGTGTGTCCACCAGGCCTTTCTACCTGACCGGCCGGCGACCA 180
     Q  Q  V  W  T  C  V  C  T  R  P  F  Y  L  T  G  P  A  T  T  -

 181 CCAGGGGCCTGAGGATGAAGCCAAGTCTGCTGTGCCGGCCCCTGTCCTGCTTCCTTATGC 240
     R  G  L  R  M  K  P  S  L  L  C  R  P  L  S  C  F  L  M  L  -

 241 TGCTGCCCTGGCCTCTCGCCACCCTGACATCAACAACCCTTTGGCAGTGCCCACCTGGGG 300
     L  P  W  P  L  A  T  L  T  S  T  T  L  W  Q  C  P  P  G  E  -

 301 AGGAGCCCGACCTGGACCCAGGGCAGGGCACATTATGCAGGCCCTGCCCCCCAGGCACCT 360
     E  P  D  L  D  P  G  Q  G  T  L  C  R  P  C  P  P  G  T  F  -

 361 TCTCAGCTGCATGGGGCTCCAGCCCATGCCAGCCCCATGCCCGTTGCAGCCTTTGGAGGA 420
     S  A  A  W  G  S  S  P  C  Q  P  H  A  R  C  S  L  W  R  R  -

 421 GGCTGGAGGCCCAGGTGGGCATGGCAACTCGAGATACACTCTGTGGAGACTGCTGGCCTG 480
     L  E  A  Q  V  G  M  A  T  R  D  T  L  C  G  D  C  W  P  G  -

 481 GGTGGTTTGGGCCTTGGGGGGTTCCCCGCGTTCCATGTCAACCATGTTCCTGGGCACCTC 540
     W  F  C  P  W  G  V  P  R  V  P  C  Q  P  C  S  W  A  P  L  -

 541 TGGGTACTCATGGCTGTGATGAGTGGGGGCGGCGGGCCCGACGTGGCGTGGAGGTGGCAG 600
     G  T  H  G  C  D  E  W  G  R  R  A  R  R  G  V  E  V  A  A  -

 601 CAGGGGCCAGCAGCGGTGGTGACACACGCCAGCCTGGGAACGGCACCCGGGCAGGTGGCC 660
     G  A  S  S  G  G  E  T  R  Q  P  G  N  G  T  R  A  C  C  P  -

 661 CAGAGGAGACAGCCGCCCAGTACGCGGTCATCGCCATCGTCCCTGTCTTCTGCCTCATGG 720
     E  E  T  A  A  Q  Y  A  V  I  A  I  V  P  V  F  C  L  M  G  -

 721 GGCTGTTGGGCATCCTGGTGTGCAACCTCCTCAAGCGGAAGGGCTACCACTGCACGGCCC 780
     L  L  G  I  L  V  C  N  L  L  K  R  K  G  Y  H  C  T  A  R  -

 781 ACAAGGAGGTCGGGCCCGGCCCTGGAGGTGGAGGCAGTGGAATCAACCCTGCCTACCGGA 840
     K  E  V  G  P  G  P  G  G  G  G  S  G  I  N  P  A  Y  R  T  -

 841 CTGAGGATGCCAATGAGGACACCATTGGGGTCGTGGTGCGCTTGATCACAGAGAAGAAAG 900
     E  D  A  N  E  D  T  I  G  V  L  V  R  L  I  T  E  K  K  E  -

 901 AGAATGCTGCGGCCCTGGAGGAGCTGCTGAAACAGTACCACAGCAAACAGCTGGTGCAGA 960
     N  A  A  A  L  E  E  L  L  K  E  Y  H  S  K  Q  L  V  Q  T  -

 961 CGAGCCACAGGCCTGTGTCCAAGCTGCCGCCAGCGCCCCCGAACGTGCCACACATCTGCC 1020
     S  H  R  P  V  S  K  L  P  P  A  P  P  N  V  P  H  I  C  P  -

1021 CGCACCGCCACCATCTCCACACCGTGCAGGGCCTGGCCTCGCTCTCTGGCCCCTGCTGCT 1080
     H  R  H  H  L  H  T  V  Q  G  L  A  S  L  S  G  P  C  C  S  -
```

Figure 5 (cont.)

```
1081 CCCGCTGTAGCCAGAAGAAGTGGCCCGAGGTGCTGCTGTCCCCTGAGGCTGTAGCCGCCA 1140
       R  C  S  Q  K  K  W  P  E  V  L  L  S  P  E  A  V  A  A  T  -

1141 CTACTCCTGTTCCCAGCCTTCTGCCTAACCCGACCAGGGTTCCCAAGGCCGGGGCCCAAGC 1200
       T  P  V  P  S  L  L  P  N  P  T  R  V  P  K  A  G  A  K  A  -

1201 CAGGGCGTCAGGGCGAGATCACCATCTTGTCTGTGGGCACGTTCCGCGTGGCTCGAATTC 1260
       G  R  Q  G  E  I  T  I  L  S  V  G  R  F  R  V  A  R  I  P  -

1261 CTGAGCAGCGGACAAGTTCAATGGTGTCTGAGGTGAAGACCATCACGGAGGCTGGGCCCT 1320
       E  Q  R  T  S  S  M  V  S  E  V  K  T  I  T  E  A  C  P  S  -

1321 CGTGGGGTGATCTCCCTGACTCCCCACAGCCTGGCCTCCCCCCTGAGCAGCAGGCCCTGC 1380
       N  G  D  L  P  D  S  P  Q  P  G  L  P  P  E  Q  Q  A  L  L  -

1381 TAGGAAGTGGCGGAAGCCGTACAAAGTGGCTGAAGCCCCCAGCAGAGAACAAGGCCCAGC 1440
       C  S  C  G  S  R  T  K  W  L  K  P  P  A  E  N  K  A  E  E  -

1441 AGAACCGCTATGTGGTCCGGCTAAGTGAGAGCAACCTGGTCATCTGAGGGGCGGTCTAGT 1500
       N  R  Y  V  V  R  L  S  E  S  N  L  V  I  *  G  A  V  *  S  -

1501 CTAAGGACACTGCGGCCCCTGCCCTGGGAGGTTCCGAAGGCTTCCTGGAGGAGGTGGAGCT 1560
       K  D  T  A  A  L  P  W  E  V  P  K  A  S  W  R  R  W  S  C  -

1561 GCAGCTGGGACTGTGAGCACCGAGAAGCAATGGCCCAGCAGACGAGACAGCAAAGACCAA 1620
       S  W  D  C  E  D  R  E  A  M  A  Q  Q  T  R  Q  Q  R  P  R

1621 GGCCTGGAGGTGGGAGCGTCTGCCCCAGTGAGGAGGCAGGTGGCCGGCGGGCACTGTGTA 1680
       P  G  G  G  S  V  C  P  S  E  E  A  G  C  R  R  A  L  C  T  -

1681 CAGGAGCAGGCTGAGCCCCGCCCCTGGCCCTGCTGCCATGTTGCTCCCCTGAAGGATGCC 1740
       G  A  G  *  A  P  P  L  A  L  L  P  C  C  S  P  E  G  C  P  -

1741 CCGACCCCCGTGCCTGCCCTGGCTGGATCCTAGGAGCCCACGGGATTCTCTGTATCATCA 1800
       D  P  R  A  C  P  G  W  I  L  G  A  H  G  I  L  C  I  I  R  -

1801 GAGGCTGGGCTTGGCAGAGGGGAGGGGCCTGTGCCCGTCACCCCTCCCCCCATTCCTTGG 1860
       G  W  A  W  Q  R  G  G  A  C  A  R  H  P  W  P  H  S  L  V  -

1861 TAATTAGCCACACCCTTGCCTCTGTACAGGGCCCTAGACCACATGTGCGTCCCCCTCCTC 1920
       I  S  H  T  L  A  S  V  Q  G  P  P  A  D  V  R  P  P  P  L  -

1921 TTCCAGCAGGTCTATAAAGGGAAGGGGTAGCAGAAAGTCCTGGGCTAGCAGAGTGAGTCC 1980
       P  A  G  L  *  R  E  G  V  A  E  S  P  G  L  G  E  *  V  P  -

1981 CTGGGTTCTAATCTTGGGCACATCTGTGGCCATCGCTGGGTCCATTTTTCTGACTGTGAA 2040
       G  F  *  S  W  A  H  L  W  P  S  L  G  P  F  F  *  L  *  S  -

2041 GTAAGGAGAGACGTCTCAGTACCCAGGGCCTCTTCAGCTCTTTGTAGGTTCTGGGCTGGG 2100
       K  E  R  R  L  S  T  Q  G  L  F  S  S  L  *  V  L  G  W  V  -

2101 TTGTGGGGGACTGGGGAGCTGGGCTCTACCATCCCTCCCATTAGTAGCTTTATCCAGCCC 2160
       V  G  D  W  G  A  G  L  Y  H  P  S  H  *  *  S  Y  P  A  P  -

2161 CGTTTTTGCTGCTTCCAGGGCCTCTGCCTTCAAGGCCCCCATGGGGCTGTCCATCCATGG 2220
       F  L  L  L  P  G  P  L  P  S  R  P  P  W  G  C  P  S  M  A  -
```

Figure 5 (cont.)

```
2221 CTCTGCCTACGGAAGGGGCTTAATGCATGTGCCTGCCCCTCCCCCAGCTGTTTTTAATGA 2280
       L  P  T  E  G  *  C  M  C  L  P  L  P  Q  L  F  L  M  K

2281 AACTGAAAAAATAGACTTCATCCCGGCAGGACTGTGATACAGAGCCCTAGCCTGCCCAGC 2340
       L  K  K  *  T  *  S  R  Q  D  C  D  T  E  P  *  P  R  Q  P

2341 CAGCCCCAAGATCTCAGGAGCTTTAGGGAGAAGACTTGGTGGGGCTGGAGCACACCTTGG 2400
       A  P  R  S  Q  E  L  *  G  E  D  L  V  G  L  E  H  T  L  G

2401 GCCTCAGTGGTTTCTGTGTCCCTGTGGTGCCAGTGCTTCTGGGCAGTGCAGGCGGCTGCC 2460
       L  S  G  F  C  V  P  V  V  P  V  L  L  G  S  A  G  G  C  Q

2461 AGGCCCAGCCCTGACTTCCACTCTGGCTCAGCAACCTGGTTATTTATGTGGGGCCGTGCA 2520
       A  Q  P  *  L  P  L  W  L  S  N  L  V  I  Y  V  G  P  C  R

2521 GGCATGGGCCCACTGCCTGTCCATCCTGTTTCTCTTATTTATTGAAACTCACCATTGCCC 2580
       H  G  P  T  A  C  P  S  C  F  S  Y  L  L  K  L  T  I  A  L

2581 TATCCTTGTGTCTCCACCCCCTTCCATGTGTTGAATAATAAAAGGTGGGAAAGTGCTG   2638
       S  L  C  L  H  P  L  P  C  V  E  *  *  K  V  G  K  C
```

Figure 5

Mouse TNFr/OPG-Like cDNA with Predicted Amino Acid Sequence

(SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4)

```
   1 CAGGCTGCGCGGCCGGCCCCGAGCGCTCGCCTAGCGGGGCCCCGGCGCCGCGTCGGACGC 60

  61 TGAGCGAAGCTGGTGCTGCGGGCCAGGTCAATGTCACTCCAGGGCCTGATGATGAAGCGG 120
                                 M  S  L  Q  G  L  M  M  K  R   -

 121 ACCTTGCTGTGCTGGCCCCCTGTCTTGCCTCTTTGTGCTGCCCCTGGCCTCTGGCCACT 180
   T  L  L  C  W  P  L  S  C  L  F  V  L  L  P  W  P  L  A  T   -

 181 CCAACACCAATAACTCCTTGGCTGTGTCCACCTGGCAAAGAGCCTGACCCACATCCAGGA 240
   P  T  P  I  T  P  W  L  C  P  P  G  K  E  P  D  P  D  P  G   -

 241 CAGGGCACATTATGCAGAACTTGCCCCCCAGGAACCTTTTCAGCCTCATGGAACTCCTAT 300
   Q  G  T  L  C  R  T  C  P  P  G  T  F  S  A  S  W  N  S  Y   -

 301 CCATGCCAGCCTCATTACCGATGCAGCCTTCAAAAGAGGCTGGAGGCCCAGGCTGGCACA 360
   P  C  Q  P  H  Y  R  C  S  L  Q  K  R  L  E  A  Q  A  G  T   -

 361 GCAACTCATGATACAATGTGTGGAGACTGCCAGCATGGGTGGTTTGGGCCACACGGAGTT 420
   A  T  H  D  T  M  C  G  D  C  Q  H  G  W  F  G  P  Q  G  V   -

 421 CCTCATGTTCCGTGTCAGCCATGTTCCAAGCCACCTCCAAGTACTGGTGGCTGTCATGAG 480
   P  H  V  P  C  Q  P  C  S  K  A  P  P  S  T  G  G  C  D  E   -

 481 TCAGGGCGGCGGGGCCGGCGTGGCGTCGAAGTGGCAGCAGGTACCAGTAGCAACGGTGAA 540
   S  G  R  R  G  R  R  G  V  E  V  A  A  G  T  S  S  N  G  E   -

 541 CCTCGGCAGCCCCGGGAATGGCACTCGGGCAGCCGGTCCTCAGGAGACGGCTGCCCAGTAT 600
   P  R  Q  P  G  N  G  T  R  A  G  G  P  E  S  T  A  A  Q  Y   -

 601 GCAGTGATTGCCATCGTTCCTGTCTTTGTCTCAIGGGGCTTCTGGGCATCCTGGTGTGC 660
   A  V  I  A  I  V  P  V  F  C  L  N  G  L  L  G  I  L  V  C   -

 661 AACCTGCTCAAGCGGAAGGGCTACCATTGCACAGCCCAAAAGGAAGTTGGGCCCAGCCCT 720
   N  L  L  K  R  K  G  Y  H  C  T  A  Q  K  E  V  G  P  S  P   -

 721 GGTGGAGGAGGCAGCGGGATTAATCCTGCCTATAGGACTGAAGATGCCAACGAGGACACC 780
   G  G  G  G  S  G  I  N  P  A  Y  R  T  E  D  A  N  E  D  T   -

 781 ATTGGAGTCCTGGTGCCCTGATCACAGAGAAGAAAGAGAATGCAGCGGCCCTGGAGGAG 840
   I  G  V  L  V  R  L  I  T  E  K  K  E  N  A  A  A  L  E  E   -

 841 CTGTTGAAAGAATATCACAGCAAACAGCTGGTACAGACAAGTCACAGGCCTGTACCCAGG 900
   L  L  K  E  Y  H  S  K  Q  L  V  Q  T  S  H  R  P  V  P  R   -

 901 CTGCTGCCGGCCTCACCCAGCATACCCCACATCTGCCCGCATCACCACCACCTGCACACT 960
   L  L  P  A  S  P  S  I  P  H  I  C  P  H  H  H  H  L  H  T   -

 961 GTGCAGGGCCTGGCCTCACTCTCTGGCCCCTGTTGCTCCCGTTGTAGCCAGAAGTGGCCA 1020
   V  Q  G  L  A  S  L  S  G  P  C  C  S  R  C  S  Q  K  W  P   -

1021 GAGGTGCTGCTGTCTCCTGAGGCAGCAGCTGCCACCACTCCTGCTGCCACCCTTCTGCCT 1080
   E  V  L  L  S  P  E  A  A  A  A  T  T  P  A  P  T  L  L  P   -
```

Figure 6 (cont.)

```
1081 ACTGCATCCAGGGCTCCCAAGGCTAGTGCCAAGCCAGGACGTCAGGGCGAGATTACCATC 1140
     T  A  S  R  A  P  K  A  S  A  K  P  G  R  Q  G  E  I  T  I   -

1141 TTGTCTGTGGGCAGGTTCCGTGTGGCTCGTATTCCTGAGCAGCGGACCAGTTCATTGTTA 1200
     L  S  V  G  R  F  R  V  A  R  I  P  E  Q  R  T  S  S  L  L   -

1201 TCTGAGGTGAAGACCATCACGGAGGCTGGGCCTTCAGAGGGTGATCTCCCTGACTCCCCA 1260
     S  E  V  K  T  I  T  E  A  G  P  S  E  G  D  L  P  D  S  P   -

1261 CAGCCTGGTTTTCCCCCCGAGCAGCGGGCACTGCTGGGAAGTGGTGGGAGCCATACTAAG 1320
     Q  P  G  F  P  P  E  Q  R  A  L  L  G  S  G  G  S  H  T  K   -

1321 TGGTTGAAGCCCCCAGCAGAGAACAAAGCTGAGGAGAACCGCTATGTGGTCCGGCTAAGT 1380
     W  L  K  P  P  A  E  N  K  A  E  E  N  R  Y  V  V  R  L  S   -

1381 GAAAGCAACCTGGTCATCTGATGGGCTGTCTAGAATTAGACACTCTGCCCTGTCCTGGGA 1440
     E  S  N  L  V  I

1441 GGTTCTGAAGGCTTCCTGCAGGAGGCAGAGCTGCAGCCTGGGACTGAGGACCAAGATGCAA 1500

1501 AGGCCAAGTCCTGGAGGTGGGACCGTCCGCCCCACTGAGGAGGCAGCCTGCCGCACAGCA 1560

1561 CGTGAGCAGGAGATCAAGAGCCCACCCTATCCCTGCAGTCCCGGTTACTTCCATGCAGGG 1620

1621 TGCTGTAACCCTCTGCCTGCCCTGAACACATCATAGGAGCCCTCTGTCCCTTAGAGGTCT 1680

1681 GGTTTGGTGGAGGAGTGGTATCTGTACCTGCCCCCAAGCTTGTGCCTTGGGAACTAGCCA 1740

1741 CTCTTGCCCATGTCCTGGACCCTGGATGTGACTCCCTCTCTTCTGGCAGGCCCTATACAG 1800

1801 GGAAGGGGTAGCAAAGAGCCCTGTACTGGTGGCAGAGTACCTGGCTTCCAATCCTGGCCT 1860

1861 TATCCCTAGGTACGTAGGGGAGGAGAACTCAGTTCCCAGGACCTCTCCAGCTCTTTGCAG 1920

1921 ATTCTGGGCTGAGTCCTGTTGGGGGGAGCTTGACTTTGCTACCCTCCCATTAGTAGCTTT 1980

1981 ATCTGGCCTGTTTTTGCTGCTTCCTGGGCCTTGGCCTTCATGGCTCCCATGGGACTGTCT 2040

2041 ATTATGGTGATGCCTTCAGAAGCGGTTTAATGCATGTGCCTGCCCCTACCCTGCTATTTT 2100

2101 TAATGAAACTGAAAAATGACTTGACTTGGACAGGGCTCTCTGGTGCAGAGCCTCAGTCCA 2160

2161 CCCTGCTGCCCTCAAGCTCTGGAGCTGTGGGAAGAGGAGACAGGCAGGCTAGGGAGTGCC 2220
```

Figure 6 (cont.)

2221 TGTGGCCTGTGGTTTTCAATGCCCCTGTGGTACAGTATCTGCCTGAGTTTTCGGTAGCAG 2280

2281 GGGTGACTGCCAATCCAGCCTGTCTTAGTCTCTGCTCTGGCTCAGTGCCTCCTTATTTAT 2340

2341 GTGGGGCCGTGCAGGCGCGGGGCCCACTGCCCATCCCATTTCTTATTTATTGAAACCTGC 2400

2401 TGTTGCCCTGCCCCTACATCTGCAGCCCCACACACTTGAGTAATAAAAGGTGGAAAATGT 2460

2461 CAAAAAAAAAAAAAAAAGG 2479

Figure 7

(SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO: 6)

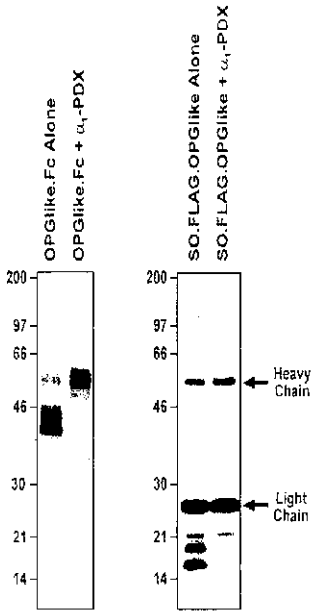
```
          CTGTCCTGGGAGGGCCCTGAGGGCCAGGGGCAGAGTCCTGTGCCTGGCCCCCAAGGGTCC
5
          TCAGGCTTGGCTCCTGGCCATGCTCTCACCCTTTACCTCCCACAGGACCCAGGGCAGGGC
      a                                                   D  P  G  Q  G
          ACATTATGCAGGCCCTGCCCCCCAGGGACCTTCTCAGCTGCATGGGGCTCCAGCCCATGC
10    a   T  L  C  R  P  C  P  P  G  T  F  S  A  A  W  G  S  S  P  C
          CAGCCCCATGCCCGTTGCAGCCTTTGGAGGAGGCTGGAGGCCCAGGTGGGCATGGCAACT
      a   Q  P  H  A  R  C  S  L  W  R  R  L  E  A  Q  V  G  M  A  T
15        CGAGATACACTCTGTGGAGACTGCTGGCCTGGGTAAGCCAAAGGCAGTGCGGGGAGCGCT
      a   R  D  T  L  C  G  D  C  W  P  G
          CCTGGCTGGGTGACCAGGACTCTGGATCCTGGGGCCCCAGCCTTATTGTACCCTGAGCAG
20        GCCTCATTCTTCCCATCTGTGAAATGGGATGGGGCAGGACCACGGAGGGTGCCTGGTAGG
          AAGGAATCCAGCCTCTCCTAAGGATAGTGTTTGGGGAAACTTCTGGGCCTCAGTGGTATC
          TT
25
```

FIGURE 8
Peptide Sequence Comparison of Human Osteoprotegerin (OPG) with TNFr/OPG-Like Polypeptide
(SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO:8)

```
                          28        58        88        118       148
TNFr/OPG-Like      LSWEGPEGQGQSPVPGPQGSSGLAPGMALTLYLPQDPQGTLCPPGTTS-AAWG
                                                    :: :  :  : : |:|: : | |,  : :
OPG              CNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLKHRSCPPGFGVVQAGTPERNTVCKRCPDGFFSNETSS
                  100       110       120       130       140       150

                  170       208       236       260
TNFr/OPG-Like    SSPCQPHARCSWRRLSAQVGMATRDTLCGDCNPG
                   :||: | : ||:   | :| | ::: :|:: :|::
OPG              KAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNATHDNICSGNSESTQKCGIDVTLCEEAFFRFAVPTKFT
                    160       170       180       190       200       210
```

Figure 9


OPGlike.Fc Alone
OPGlike.Fc + α1-PDX
SO.FLAG.OPGlike Alone
SO.FLAG.OPGlike + α1-PDX
200
97
66
46
30
21
14
Heavy Chain
Light Chain

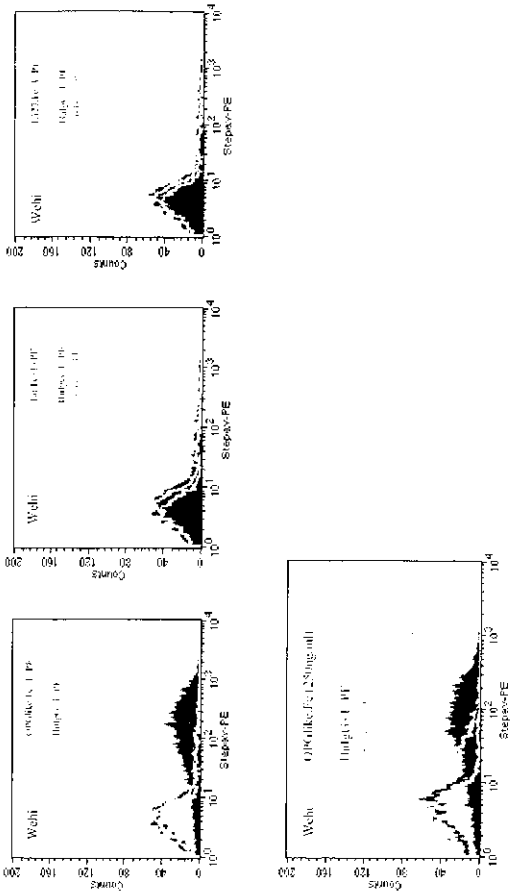


Figure 10

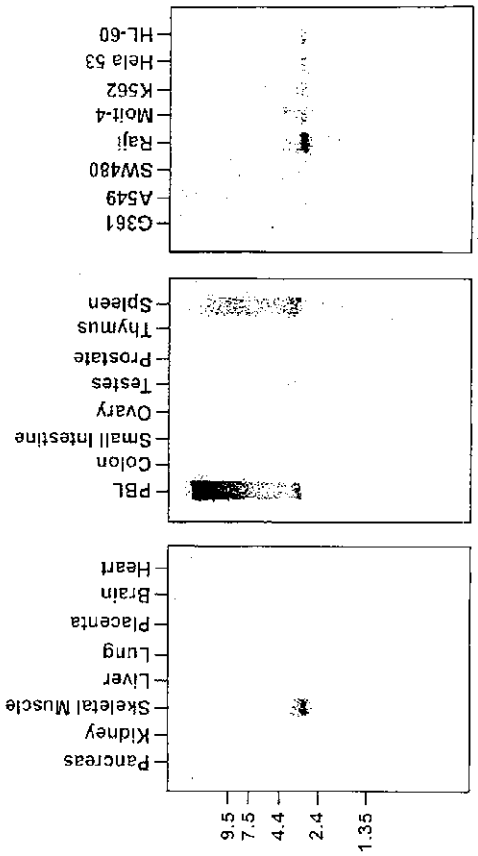

HL-60
Hela S3
K562
Molt-4
Raji
SW480
A549
G361
Spleen
Thymus
Prostate
Testes
Ovary
Small Intestine
Colon
PBL
Heart
Brain
Placenta
Lung
Liver
Skeletal Muscle
Kidney
Pancreas
9.5
7.5
4.4
2.4
1.35

Figure 11

SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN, INC.
Jing, Shuqian (US only)
Welcher, Andrew A (US only)
Boedigheimer, Michael J (US only)
Shu, Junyan (US only)
Gary M. Fox (US only)

<120> TNFr/OPG-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

<130> 01017/36854

<140>
<141>

<150> 60/172,306
<151> 1999-12-16

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 2638
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (195)..(1484)

<400> 1
cgggaccttc agatatcccc tcccagccga gggggcttcc atctaactgt ttttttggtc 60

acggttccag ggccgtttta gacagtggag gccttgtggg gcagggtgtg aggggtgctg 120

agcagcaggt gtggacatgt gtgtgcacca ggcctttcta cctgaccggg ccggcgacca 180

ccaggggcct gagg atg aag cca agt ctg ctg tgc cgg ccc ctg tcc tgc 230
Met Lys Pro Ser Leu Leu Cys Arg Pro Leu Ser Cys
1 5 10

ttc ctt atg ctg ctg ccc tgg cct ctc gcc acc ctg aca tca aca acc 278
Phe Leu Met Leu Leu Pro Trp Pro Leu Ala Thr Leu Thr Ser Thr Thr
15 20 25

ctt tgg cag tgc cca cct ggg gag gag ccc gac ctg gac cca ggg cag 326
Leu Trp Gln Cys Pro Pro Gly Glu Glu Pro Asp Leu Asp Pro Gly Gln
30 35 40

ggc aca tta tgc agg ccc tgc ccc cca ggc acc ttc tca gct gca tgg 374
Gly Thr Leu Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser Ala Ala Trp
45 50 55 60

```
ggc tcc agc cca tgc cag ccc cat gcc cgt tgc agc ctt tgg agg agg   422
Gly Ser Ser Pro Cys Gln Pro His Ala Arg Cys Ser Leu Trp Arg Arg
                 65                  70                  75

ctg gag gcc cag gtg ggc atg gca act cga gat aca ctc tgt gga gac   470
Leu Glu Ala Gln Val Gly Met Ala Thr Arg Asp Thr Leu Cys Gly Asp
            80                  85                  90


tgc tgg cct ggg tgg ttt ggg cct tgg ggg gtt ccc cgc gtt cca tgt   518
Cys Trp Pro Gly Trp Phe Gly Pro Trp Gly Val Pro Arg Val Pro Cys
        95                  100                 105

caa cca tgt tcc tgg gca cct ctg ggt act cat ggc tgt gat gag tgg   566
Gln Pro Cys Ser Trp Ala Pro Leu Gly Thr His Gly Cys Asp Glu Trp
    110                 115                 120

ggg cgg cgg gcc cga cgt ggc gtg gag gtg gca gca ggg gcc agc agc   614
Gly Arg Arg Ala Arg Arg Gly Val Glu Val Ala Ala Gly Ala Ser Ser
125                 130                 135                 140

ggt ggt gag aca cgg cag cct ggg aac ggc acc cgg gca ggt ggc cca   662
Gly Gly Glu Thr Arg Gln Pro Gly Asn Gly Thr Arg Ala Gly Gly Pro
                145                 150                 155

gag gag aca gcc gcc cag tac gcg gtc atc gcc atc gtc cct gtc ttc   710
Glu Glu Thr Ala Ala Gln Tyr Ala Val Ile Ala Ile Val Pro Val Phe
            160                 165                 170

tgc ctc atg ggg ctg ttg ggc atc ctg gtg tgc aac ctc ctc aag cgg   758
Cys Leu Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Val Cys Asn Leu Leu Lys Arg
        175                 180                 185

aag ggc tac cac tgc acg gcg cac aag gag gtc ggg ccc ggc cct gga   806
Lys Gly Tyr His Cys Thr Ala His Lys Glu Val Gly Pro Gly Pro Gly
    190                 195                 200

ggt gga ggc agt gga atc aac cct gcc tac cgg act gag gat gcc aat   854
Gly Gly Gly Ser Gly Ile Asn Pro Ala Tyr Arg Thr Glu Asp Ala Asn
205                 210                 215                 220

gag gac acc att ggg gtc ctg gtg cgc ttg atc aca gag aag aaa gag   902
Glu Asp Thr Ile Gly Val Leu Val Arg Leu Ile Thr Glu Lys Lys Glu
                225                 230                 235

aat gct gcg gcc ctg gag gag ctg ctg aaa gag tac cac agc aaa cag   950
Asn Ala Ala Ala Leu Glu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr His Ser Lys Gln
            240                 245                 250

ctg gtg cag acg agc cac agg cct gtg tcc aag ctg ccg cca gcg ccc   998
Leu Val Gln Thr Ser His Arg Pro Val Ser Lys Leu Pro Pro Ala Pro
        255                 260                 265
```

```
ccg aac gtg cca cac atc tgc ccg cac cgc cac cat ctc cac acc gtg   1046
Pro Asn Val Pro His Ile Cys Pro His Arg His His Leu His Thr Val
    270                 275                 280

cag ggc ctg gcc tcg ctc tct ggc ccc tgc tgc tcc cgc tgt agc cag   1094
Gln Gly Leu Ala Ser Leu Ser Gly Pro Cys Cys Ser Arg Cys Ser Gln
285                 290                 295                 300

aag aag tgg ccc gag gtg ctg ctg tcc cct gag gct gta gcc gcc act   1142
Lys Lys Trp Pro Glu Val Leu Leu Ser Pro Glu Ala Val Ala Ala Thr
                305                 310                 315

act cct gtt ccc agc ctt ctg cct aac ccg acc agg gtt ccc aag gcc   1190
Thr Pro Val Pro Ser Leu Leu Pro Asn Pro Thr Arg Val Pro Lys Ala
            320                 325                 330

ggg gcc aag gca ggg cgt cag ggc gag atc acc atc ttg tct gtg ggc   1238
Gly Ala Lys Ala Gly Arg Gln Gly Glu Ile Thr Ile Leu Ser Val Gly
        335                 340                 345

agg ttc cgc gtg gct cga att cct gag cag cgg aca agt tca atg gtg   1286
Arg Phe Arg Val Ala Arg Ile Pro Glu Gln Arg Thr Ser Ser Met Val
    350                 355                 360

tct gag gtg aag acc atc acg gag gct ggg ccc tcg tgg ggt gat ctc   1334
Ser Glu Val Lys Thr Ile Thr Glu Ala Gly Pro Ser Trp Gly Asp Leu
365                 370                 375                 380

cct gac tcc cca cag cct ggc ctc ccc cct gag cag cag gcc ctg cta   1382
Pro Asp Ser Pro Gln Pro Gly Leu Pro Pro Glu Gln Gln Ala Leu Leu
                385                 390                 395

gga agt ggc gga agc cgt aca aag tgg ctg aag ccc cca gca gag aac   1430
Gly Ser Gly Gly Ser Arg Thr Lys Trp Leu Lys Pro Pro Ala Glu Asn
            400                 405                 410

aag gcc gag gag aac cgc tat gtg gtc cgg cta agt gag agc aac ctg   1478
Lys Ala Glu Glu Asn Arg Tyr Val Val Arg Leu Ser Glu Ser Asn Leu
        415                 420                 425

gtc atc tgagggcgg tctagtctaa ggacactgcg gccctgccct gggaggttcc    1534
Val Ile
    430

gaaggcttcc tggaggaggt ggagctgcag ctgggactgt gaggaccgag aagcaatggc 1594

ccagcagacg agacagcaaa gaccaaggcc tggaggtggg agcgtctgcc ccagtgagga 1654

ggcaggtggc cggcgggcac tgtgtacagg agcaggctga gccccgcccc tggccctgct 1714

gccatgttgc tcccctgaag gatgccccga ccccgtgcc tgccctggct ggatcctagg 1774

agcccacggg attctctgta tcatcagagg ctgggcttgg cagaggggag gggcctgtgc 1834

ccgtcacccc tggccccatt ccttggtaat tagccacacc cttgcctctg tacagggccc 1894
```

tagagcagat gtgcgtcccc ctcctcttcc agcaggtcta taaagggaag gggtagcaga 1954

aagtcctggg ctaggagagt gagtccctgg gttctaatct tgggcacatc tgtggccatc 2014

gctgggtcca tttttctgac tgtgaagtaa ggagagacgt ctcagtaccc agggcctctt 2074

cagctctttg taggttctgg gctgggttgt gggggactgg ggagctgggc tctaccatcc 2134

ctcccattag tagctttatc cagccccgtt tttgctgctt ccagggcctc tgccttcaag 2194

gcccccatgg ggctgtccat ccatggctct gcctacggaa ggggcttaat gcatgtgcct 2254

gcccctcccc cagctgtttt taatgaaact gaaaaaatag acttgatccc ggcaggactg 2314

tgatacagag ccctagcctg cccagccagc cccaagatct caggagcttt agggagaaga 2374

cttggtgggg ctggagcaca ccttgggcct cagtggtttc tgtgtcccctg tggtgccagt 2434

gcttctgggc agtgcaggcg gctgccaggc ccagccctga cttccactct ggctcagcaa 2494

cctggttatt tatgtggggc cgtgcaggca tgggcccact gcctgtccat cctgtttctc 2554

ttatttattg aaactcacca ttgccctatc cttgtgtctc caccccctte catgtgttga 2614

ataataaaag gtgggaaagt gctg 2638

<210> 2
<211> 430
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Lys Pro Ser Leu Leu Cys Arg Pro Leu Ser Cys Phe Leu Met Leu
1 5 10 15

Leu Pro Trp Pro Leu Ala Thr Leu Thr Ser Thr Thr Leu Trp Gln Cys
20 25 30

Pro Pro Gly Glu Glu Pro Asp Leu Asp Pro Gly Gln Gly Thr Leu Cys
35 40 45

Arg Pro Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser Ala Ala Trp Gly Ser Ser Pro
50 55 60

Cys Gln Pro His Ala Arg Cys Ser Leu Trp Arg Arg Leu Glu Ala Gln
65 70 75 80

Val Gly Met Ala Thr Arg Asp Thr Leu Cys Gly Asp Cys Trp Pro Gly
85 90 95

Trp Phe Gly Pro Trp Gly Val Pro Arg Val Pro Cys Gln Pro Cys Ser
100 105 110

```
Trp Ala Pro Leu Gly Thr His Gly Cys Asp Glu Trp Gly Arg Arg Ala
        115                 120                 125

Arg Arg Gly Val Glu Val Ala Ala Gly Ala Ser Ser Gly Gly Glu Thr
    130                 135                 140

Arg Gln Pro Gly Asn Gly Thr Arg Ala Gly Gly Pro Glu Glu Thr Ala
145                 150                 155                 160

Ala Gln Tyr Ala Val Ile Ala Ile Val Pro Val Phe Cys Leu Met Gly
                165                 170                 175

Leu Leu Gly Ile Leu Val Cys Asn Leu Leu Lys Arg Lys Gly Tyr His
            180                 185                 190

Cys Thr Ala His Lys Glu Val Gly Pro Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser
        195                 200                 205

Gly Ile Asn Pro Ala Tyr Arg Thr Glu Asp Ala Asn Glu Asp Thr Ile
    210                 215                 220

Gly Val Leu Val Arg Leu Ile Thr Glu Lys Lys Glu Asn Ala Ala Ala
225                 230                 235                 240

Leu Glu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr His Ser Lys Gln Leu Val Gln Thr
                245                 250                 255

Ser His Arg Pro Val Ser Lys Leu Pro Pro Ala Pro Pro Asn Val Pro
            260                 265                 270

His Ile Cys Pro His Arg His His Leu His Thr Val Gln Gly Leu Ala
        275                 280                 285

Ser Leu Ser Gly Pro Cys Cys Ser Arg Cys Ser Gln Lys Lys Trp Pro
    290                 295                 300

Glu Val Leu Leu Ser Pro Glu Ala Val Ala Ala Thr Thr Pro Val Pro
305                 310                 315                 320

Ser Leu Leu Pro Asn Pro Thr Arg Val Pro Lys Ala Gly Ala Lys Ala
                325                 330                 335

Gly Arg Gln Gly Glu Ile Thr Ile Leu Ser Val Gly Arg Phe Arg Val
            340                 345                 350

Ala Arg Ile Pro Glu Gln Arg Thr Ser Ser Met Val Ser Glu Val Lys
        355                 360                 365

Thr Ile Thr Glu Ala Gly Pro Ser Trp Gly Asp Leu Pro Asp Ser Pro
    370                 375                 380

Gln Pro Gly Leu Pro Pro Glu Gln Gln Ala Leu Leu Gly Ser Gly Gly
385                 390                 395                 400
```

```
Ser Arg Thr Lys Trp Leu Lys Pro Pro Ala Glu Asn Lys Ala Glu Glu
                405                 410                 415

Asn Arg Tyr Val Val Arg Leu Ser Glu Ser Asn Leu Val Ile
            420                 425                 430


<210> 3
<211> 2479
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (91)..(1398)

<400> 3
caggctgcgc ggccggcccc gagcgctcgc ctagcggggc ccccgcgccg cgtcggacgc 60

tgagcgaagc tggtgctgcg ggccaggtca atg tca ctc cag ggc ctg atg atg  114
                                Met Ser Leu Gln Gly Leu Met Met
                                  1               5

aag cgg acc ttg ctg tgc tgg ccc ctg tct tgc ctc ttt gtg ctg ctg  162
Lys Arg Thr Leu Leu Cys Trp Pro Leu Ser Cys Leu Phe Val Leu Leu
     10                  15                  20

ccc tgg cct ctg gcc act cca aca cca ata act cct tgg ctg tgt cca  210
Pro Trp Pro Leu Ala Thr Pro Thr Pro Ile Thr Pro Trp Leu Cys Pro
 25                  30                  35                  40

cct ggc aaa gag cct gac cca gat cca gga cag ggc aca tta tgc aga  258
Pro Gly Lys Glu Pro Asp Pro Asp Pro Gly Gln Gly Thr Leu Cys Arg
                 45                  50                  55

act tgc ccc cca gga acc ttt tca gcc tca tgg aac tcc tat cca tgc  306
Thr Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser Ala Ser Trp Asn Ser Tyr Pro Cys
             60                  65                  70

cag cct cat tac cga tgc agc ctt caa aag agg ctg gag gcc cag gct  354
Gln Pro His Tyr Arg Cys Ser Leu Gln Lys Arg Leu Glu Ala Gln Ala
         75                  80                  85
ggc aca gca act cat gat aca atg tgt gga gac tgc cag cat ggg tgg  402
Gly Thr Ala Thr His Asp Thr Met Cys Gly Asp Cys Gln His Gly Trp
     90                  95                  100

ttt ggg cca cag gga gtt cct cat gtt ccg tgt cag cca tgt tcc aag  450
Phe Gly Pro Gln Gly Val Pro His Val Pro Cys Gln Pro Cys Ser Lys
105                 110                 115                 120

gca cct cca agt act ggt ggc tgt gat gag tca ggg cgg cgg ggc cgg  498
Ala Pro Pro Ser Thr Gly Gly Cys Asp Glu Ser Gly Arg Arg Gly Arg
                125                 130                 135
```

```
cgt ggc gtc gaa gtg gca gca ggt acc agt agc aac ggt gaa cct cgg   546
Arg Gly Val Glu Val Ala Ala Gly Thr Ser Ser Asn Gly Glu Pro Arg
            140                 145                 150

cag ccc ggg aat ggc act cgg gca ggc ggt cct gag gag acg gct gcc   594
Gln Pro Gly Asn Gly Thr Arg Ala Gly Gly Pro Glu Glu Thr Ala Ala
        155                 160                 165

cag tat gca gtg att gcc atc gtt cct gtc ttt tgt ctc atg ggg ctt   642
Gln Tyr Ala Val Ile Ala Ile Val Pro Val Phe Cys Leu Met Gly Leu
    170                 175                 180

ctg ggc atc ctg gtg tgc aac ctg ctc aag cgg aag ggc tac cat tgc   690
Leu Gly Ile Leu Val Cys Asn Leu Leu Lys Arg Lys Gly Tyr His Cys
185                 190                 195                 200

aca gcc caa aag gaa gtt ggg ccc agc cct ggt gga gga ggc agc ggg   738
Thr Ala Gln Lys Glu Val Gly Pro Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly
                205                 210                 215

att aat cct gcc tat agg act gaa gat gcc aac gag gac acc att gga   786
Ile Asn Pro Ala Tyr Arg Thr Glu Asp Ala Asn Glu Asp Thr Ile Gly
            220                 225                 230

gtc ctg gtg cgc ctg atc aca gag aag aaa gag aat gca gcg gcc ctg   834
Val Leu Val Arg Leu Ile Thr Glu Lys Lys Glu Asn Ala Ala Ala Leu
        235                 240                 245

gag gag ctg ttg aaa gaa tat cac agc aaa cag ctg gta cag aca agt   882
Glu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr His Ser Lys Gln Leu Val Gln Thr Ser
    250                 255                 260

cac agg cct gta ccc agg ctg ctg ccg gcc tca ccc agc ata ccc cac   930
His Arg Pro Val Pro Arg Leu Leu Pro Ala Ser Pro Ser Ile Pro His
265                 270                 275                 280

atc tgc ccg cat cac cac cac ctg cac act gtg cag ggc ctg gcc tca   978
Ile Cys Pro His His His His Leu His Thr Val Gln Gly Leu Ala Ser
                285                 290                 295

ctc tct ggc ccc tgt tgc tcc cgt tgt agc cag aag tgg cca gag gtg   1026
Leu Ser Gly Pro Cys Cys Ser Arg Cys Ser Gln Lys Trp Pro Glu Val
            300                 305                 310

ctg ctg tct cct gag gca gca gct gcc acc act cct gcc ccc acc ctt   1074
Leu Leu Ser Pro Glu Ala Ala Ala Ala Thr Thr Pro Ala Pro Thr Leu
        315                 320                 325

ctg cct act gca tcc agg gct ccc aag gct agt gcc aag cca gga cgt   1122
Leu Pro Thr Ala Ser Arg Ala Pro Lys Ala Ser Ala Lys Pro Gly Arg
    330                 335                 340

cag ggc gag att acc atc ttg tct gtg ggc agg ttc cgt gtg gct cgt   1170
Gln Gly Glu Ile Thr Ile Leu Ser Val Gly Arg Phe Arg Val Ala Arg
345                 350                 355                 360
```

```
att cct gag cag cgg acc agt tca ttg tta tct gag gtg aag acc atc   1218
Ile Pro Glu Gln Arg Thr Ser Ser Leu Leu Ser Glu Val Lys Thr Ile
                365                 370                 375

acg gag gct ggg cct tca gag ggt gat ctc cct gac tcc cca cag cct   1266
Thr Glu Ala Gly Pro Ser Glu Gly Asp Leu Pro Asp Ser Pro Gln Pro
            380                 385                 390

ggt ttt ccc ccc gag cag cgg gca ctg ctg gga agt ggt ggg agc cat   1314
Gly Phe Pro Pro Glu Gln Arg Ala Leu Leu Gly Ser Gly Gly Ser His
        395                 400                 405

act aag tgg ttg aag ccc cca gca gag aac aaa gct gag gag aac cgc   1362
Thr Lys Trp Leu Lys Pro Pro Ala Glu Asn Lys Ala Glu Glu Asn Arg
    410                 415                 420

tat gtg gtc cgg cta agt gaa agc aac ctg gtc atc tgatgggctg        1408
Tyr Val Val Arg Leu Ser Glu Ser Asn Leu Val Ile
425                 430                 435

tctagaatta gacactctgc cctgtcctgg gaggttctga aggcttcctg caggagggag 1468

agctgcagct gggactgagg accaagatgc aaaggccaag tcctggaggt gggaccgtcc 1528

gccccactga ggaggcagcc tgcggcacag cacgtgagca ggagatcaag agcccaccct 1588

atccctgcag tccoggttac ttccatgcag ggtgctgtaa ccctgtgcct gccctgaaca 1648

catcatagga gccctctgtc ccttagaggt ctggtttggt ggaggagtgg tatctgtacc 1708

tggccccaag cttgtgcctt gggaactagc cactcttgcc catgtcctgg accctggatg 1768

tgactccctc tcttctggca ggccctatag agggaagggg tagcaaagag ccctgtactg 1828

gtggcagagt acctgggttc caatcctggg cttatcccta ggtacgtagg ggaggagaac 1888

tcagttccca ggacctctcc agctctttgc agattctggg ctgagtcctg ttggggggag 1948

cttgactttg ctaccctccc attagtagct ttatctggcc tgtttttgct gcttcctggg 2008

ccttggcctt catggctccc atgggactgt ctattatggt gatgccttca gaaggggttt 2068

aatgcatgtg cctgccccta ccctgctatt tttaatgaaa ctgaaaaatg acttgacttg 2128

gacagggctc tctggtgcag agcctcagtc caccctgctg ccctcaagct ctggagctgt 2188

gggaagagga gacaggcagg ctagggagtg cctgtggcct gtggttttca atgcccctgt 2248

ggtacagtat ctgcctgagt tttgggtagc aggggtgact gccaatccag cctgtcttag 2308

tctctgctct ggctcagtgc ctcgttattt atgtggggcc gtgcaggcgc ggggcccact 2368

gcccatccca tttcttattt attgaaacct gctgttgccc tgcccctaca tctccagccc 2428

cacacacttg agtaataaaa ggtggaaaat gtcaaaaaaa aaaaaaaaag g          2479
```

<210> 4
<211> 436
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Met Ser Leu Gln Gly Leu Met Met Lys Arg Thr Leu Leu Cys Trp Pro
1 5 10 15

Leu Ser Cys Leu Phe Val Leu Leu Pro Trp Pro Leu Ala Thr Pro Thr
20 25 30

Pro Ile Thr Pro Trp Leu Cys Pro Pro Gly Lys Glu Pro Asp Pro Asp
35 40 45

Pro Gly Gln Gly Thr Leu Cys Arg Thr Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser
50 55 60

Ala Ser Trp Asn Ser Tyr Pro Cys Gln Pro His Tyr Arg Cys Ser Leu
65 70 75 80

Gln Lys Arg Leu Glu Ala Gln Ala Gly Thr Ala Thr His Asp Thr Met
85 90 95

Cys Gly Asp Cys Gln His Gly Trp Phe Gly Pro Gln Gly Val Pro His
100 105 110

Val Pro Cys Gln Pro Cys Ser Lys Ala Pro Pro Ser Thr Gly Gly Cys
115 120 125

Asp Glu Ser Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Val Glu Val Ala Ala Gly
130 135 140

Thr Ser Ser Asn Gly Glu Pro Arg Gln Pro Gly Asn Gly Thr Arg Ala
145 150 155 160

Gly Gly Pro Glu Glu Thr Ala Ala Gln Tyr Ala Val Ile Ala Ile Val
165 170 175

Pro Val Phe Cys Leu Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Val Cys Asn Leu
180 185 190

Leu Lys Arg Lys Gly Tyr His Cys Thr Ala Gln Lys Glu Val Gly Pro
195 200 205

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ile Asn Pro Ala Tyr Arg Thr Glu
210 215 220

Asp Ala Asn Glu Asp Thr Ile Gly Val Leu Val Arg Leu Ile Thr Glu
225 230 235 240

```
Lys Lys Glu Asn Ala Ala Ala Leu Glu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr His
                245                 250                 255

Ser Lys Gln Leu Val Gln Thr Ser His Arg Pro Val Pro Arg Leu Leu
            260                 265                 270

Pro Ala Ser Pro Ser Ile Pro His Ile Cys Pro His His His His Leu
        275                 280                 285

His Thr Val Gln Gly Leu Ala Ser Leu Ser Gly Pro Cys Cys Ser Arg
    290                 295                 300

Cys Ser Gln Lys Trp Pro Glu Val Leu Leu Ser Pro Glu Ala Ala Ala
305                 310                 315                 320

Ala Thr Thr Pro Ala Pro Thr Leu Leu Pro Thr Ala Ser Arg Ala Pro
                325                 330                 335

Lys Ala Ser Ala Lys Pro Gly Arg Gln Gly Glu Ile Thr Ile Leu Ser
            340                 345                 350

Val Gly Arg Phe Arg Val Ala Arg Ile Pro Glu Gln Arg Thr Ser Ser
        355                 360                 365

Leu Leu Ser Glu Val Lys Thr Ile Thr Glu Ala Gly Pro Ser Glu Gly
    370                 375                 380

Asp Leu Pro Asp Ser Pro Gln Pro Gly Phe Pro Pro Glu Gln Arg Ala
385                 390                 395                 400

Leu Leu Gly Ser Gly Gly Ser His Thr Lys Trp Leu Lys Pro Pro Ala
                405                 410                 415

Glu Asn Lys Ala Glu Glu Asn Arg Tyr Val Val Arg Leu Ser Glu Ser
            420                 425                 430

Asn Leu Val Ile
        435


<210> 5
<211> 482
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
ctgtcctggg agggccctga gggccagggg cagagtcctg tgcctggccc ccaagggtcc 60

tcaggcttgg ctcctggcca tgctctcacc ctttacctcc cacaggaccc agggcagggc 120

acattatgca ggccctgccc cccaggcacc ttctcagctg catgggggtc cagcccatgc 180

cagccccatg cccgttgcag cctttggagg aggctggagg cccaggtggg catggcaact 240

cgagatacac tctgtggaga ctgctggcct gggtaagcca aagggagtgc ggggagggct 300
```

cctggctggg tgaccaggac tctggatcct ggggccccag ccttattgta ccctgagcag 360

gcctcattct tcccatctgt gaaatgggat ggggcaggac cacggagggt gcctggtagg 420

aaggaatcca gcctctccta aggatagtgt ttggggaaac ttctgggcct cagtggtatc 480

tt 482

<210> 6
<211> 56
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Asp Pro Gly Gln Gly Thr Leu Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Thr Phe
1 5 10 15

Ser Ala Ala Trp Gly Ser Ser Pro Cys Gln Pro His Ala Arg Cys Ser
20 25 30

Leu Trp Arg Arg Leu Glu Ala Gln Val Gly Met Ala Thr Arg Asp Thr
35 40 45

Leu Cys Gly Asp Cys Trp Pro Gly
50 55

<210> 7
<211> 91
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Leu Ser Trp Glu Gly Pro Glu Gly Gln Gly Gln Ser Pro Val Pro Gly
1 5 10 15

Pro Gln Gly Ser Ser Gly Leu Ala Pro Gly His Ala Leu Thr Leu Tyr
20 25 30

Leu Pro Gln Asp Pro Gly Gln Gly Thr Leu Cys Arg Pro Cys Pro Pro
35 40 45

Gly Thr Phe Ser Ala Ala Trp Gly Ser Ser Pro Cys Gln Pro His Ala
50 55 60

Arg Cys Ser Leu Trp Arg Arg Leu Glu Ala Gln Val Gly Met Ala Thr
65 70 75 80

Arg Asp Thr Leu Cys Gly Asp Cys Trp Pro Gly
85 90

<210> 8

<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
1 5 10 15

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
20 25 30

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

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
50 55 60

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys
65 70 75 80

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
85 90 95

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
100 105 110

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr
115 120

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
2374-51

<400> 9
ccccaggcac cttctcagct gc 22

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR PRimer
2374-52

<400> 10
gtgtatctcg agttgccatg ccc 23

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
870-02

<400> 11
agcggataac aatttcacac agg 23

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
1916-83

<400> 12
ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcg 29

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
2374-53

<400> 13
cccaggccag cagtctccac ag 22

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
1019-06

<400> 14
gctctaatac gactcactat aggg 24

<210> 15
<211> 29
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
1916-82

<400> 15
catgattacg ccaagctcta atacgactc 29

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
1340-35

<400> 16
ccagtcacg acgttgtaaa acg 23

<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
1019-05

<400> 17
tgaatttagg tgacactata gaagag 26

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer
1019-05

<400> 18
gcccgttgca gcctttggag 20

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 19
tccaccaccc tgttgctgta g 21

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 20
gaccacacag tccatgccat cact 24

<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 21
ccatcgatgg ctgagcagca ggtgtggaca 30

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 22
tggcgatgac ggtgacctgg gcgg 24

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Peptide

<400> 23
Ser Thr Thr Leu Trp Gln Cys Pro Pro Gly Glu Glu
1 5 10

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Peptide

<400> 24
Gly Val Glu Val Ala Ala Gly Ala Ser Ser Gly Gly Glu Thr
1 5 10

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Furin cleavage site

<400> 25
Arg Arg Ala Arg Arg Gly Val Glu Val
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: FLAG epitope sequence

<400> 26
Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Peptide

<400> 27
Gly Arg Lys Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 28

<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Peptide

<400> 28
Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10 15

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatl application No
PCT/US 00/33858

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N5/10 C07K14/705 C07K16/28
G01N33/50 G01N33/566 C12Q1/68 A01K67/027 A61K31/70
A61K38/17 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C07K G01N C12Q A01K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL SEQUENCES 'Online! Accession No. AI223336, 28 October 1998 (1998-10-28) STRAUSBERG R.: "EST; H. sapiens cDNA clone IMAGE:1840621" XP002162732 nt 16-421 are complementary to nt 2233-2638 of seq. ID 1. ---	1-13, 15-26,57
P,X	DATABASE EMBL SEQUENCES 'Online! Accession No. Q9N092, 1 October 2000 (2000-10-01) OSADA N.: "Unnamed protein product from Macaca fascicularis" XP002162733 compare with seq. ID 2. --- -/--	1-69, 71-82

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
'E' earlier document but published on or after the international filing date
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 March 2001	26/03/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Galli, I

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US 00/33858

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 02568 A (CHIRON CORP ;HYSEQ INC (US)) 11 January 2001 (2001-01-11) compare nt 1969-2336 of seq. ID 1 with nt 10-369 of seq. 442 of WO0102568 ---	1-13, 15-26,57
A	WO 97 23614 A (AMGEN INC ;LACEY DAVID L (US); BOYLE WILLIAM J (US); CALZONE FRANK) 3 July 1997 (1997-07-03) the whole document ---	1-69, 71-82
A	SMITH C A ET AL: "THE TNF RECEPTOR SUPERFAMILY OF CELLULAR AND VIRAL PROTEINS: ACTIVATION, COSTIMULATION, AND DEATH" CELL, US, CELL PRESS,, vol. 76, 25 March 1994 (1994-03-25), pages 959-962, XP002029050 ISSN: 0092-8674 the whole document ---	1-69, 71-82
A	ADAMS M D ET AL: "COMPEMENTARY DNA SEQUENCING: EXPRESSED SEQUENCE TAGS AND HUMAN GENOME PROJECT" SCIENCE, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 252, no. 5013, 21 June 1991 (1991-06-21), pages 1651-1656, XP000645049 ISSN: 0036-8075 the whole document -----	11,26

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/US 00 33858

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 70

1. Claim 17 refers to the orthologue encoded by the polynucleotide of seq. 6. This sequence is a fragment of the human protein decribed, which is inconsistent with the claim. Claim 70 is assumed to be dependent on claim 69, not 70. Claim 79 is dependent on the (inexistent) claim 84. It is assumed to depend on claim 77. Claims 81-82 are dependent on (inexistent) claims 86-87. It is assumed that they are dependent on claims 79-80.

2. Claim 70 relates to a binding partner of the TGFR/OPG identified by the two-hybrid screening system. Claims 32, 41, 43-46, 72-73 relate, at least in part, to selective binding agents and/or antagonists of the polypeptide claimed, but without providing a satisfactory technical characterization or being limited to elements based on clearly identifiable properties of the TNFR/OPG polypeptide or of the corresponding polynucleotides, such as, e.g., antibodies or antisense oligonucleotides. In consequence, said claims are ambiguous and vague. Moreover, no such compounds are described in the application, so that the claims lack the support required by Art. 5 and 6 PCT. No meaningful search can be carried out for such purely speculative claims, the wording of which is, in fact, a mere list of the results to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US 00/33858

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0102568 A	11-01-2001	NONE	
WO 9723614 A	03-07-1997	AU 710587 B	23-09-1999
		AU 1468697 A	17-07-1997
		BG 101813 A	30-09-1998
		CA 2210467 A	03-07-1997
		CN 1182452 A	20-05-1998
		CZ 9702538 A	17-03-1999
		DE 19654610 A	26-06-1997
		EP 0784093 A	16-07-1997
		EP 0870023 A	14-10-1998
		FR 2742767 A	27-06-1997
		GB 2312899 A,B	12-11-1997
		HU 9801122 A	28-08-1998
		JP 11503616 T	30-03-1999
		NO 973699 A	21-10-1997
		NZ 326579 A	28-01-1999
		PL 321938 A	05-01-1998
		SK 110797 A	12-07-1999
		TR 970550 A	21-07-1997
		US 6015938 A	18-01-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 38/00	Ａ６１Ｋ 39/395	Ｄ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ 39/395	Ａ６１Ｋ 39/395	Ｎ	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ 45/00	Ａ６１Ｋ 45/00		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ 47/48	Ａ６１Ｋ 47/48		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｋ 48/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 1/02	Ａ６１Ｐ 1/02		
Ａ６１Ｐ 1/04	Ａ６１Ｐ 1/04		
Ａ６１Ｐ 1/18	Ａ６１Ｐ 1/18		
Ａ６１Ｐ 3/14	Ａ６１Ｐ 3/14		
Ａ６１Ｐ 9/00	Ａ６１Ｐ 9/00		
Ａ６１Ｐ 9/04	Ａ６１Ｐ 9/04		
Ａ６１Ｐ 9/10	Ａ６１Ｐ 9/10		
Ａ６１Ｐ 11/00	Ａ６１Ｐ 11/00		
Ａ６１Ｐ 11/06	Ａ６１Ｐ 11/06		
Ａ６１Ｐ 13/08	Ａ６１Ｐ 13/08		
Ａ６１Ｐ 15/00	Ａ６１Ｐ 15/00		
Ａ６１Ｐ 17/00	Ａ６１Ｐ 17/00		
Ａ６１Ｐ 17/02	Ａ６１Ｐ 17/02		
Ａ６１Ｐ 17/06	Ａ６１Ｐ 17/06		
Ａ６１Ｐ 19/00	Ａ６１Ｐ 19/00		
Ａ６１Ｐ 19/02	Ａ６１Ｐ 19/02		
Ａ６１Ｐ 19/08	Ａ６１Ｐ 19/08		
Ａ６１Ｐ 19/10	Ａ６１Ｐ 19/10		
Ａ６１Ｐ 21/00	Ａ６１Ｐ 21/00		
Ａ６１Ｐ 25/00	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 25/04	Ａ６１Ｐ 25/04		
Ａ６１Ｐ 27/02	Ａ６１Ｐ 27/02		
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 29/02	Ａ６１Ｐ 29/02		
Ａ６１Ｐ 31/04	Ａ６１Ｐ 31/04		
Ａ６１Ｐ 31/18	Ａ６１Ｐ 31/18		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 35/02	Ａ６１Ｐ 35/02		
Ａ６１Ｐ 37/02	Ａ６１Ｐ 37/02		
Ａ６１Ｐ 37/06	Ａ６１Ｐ 37/06		
Ｃ０７Ｋ 14/715	Ｃ０７Ｋ 14/715		
Ｃ０７Ｋ 16/28	Ｃ０７Ｋ 16/28		
Ｃ０７Ｋ 16/42	Ｃ０７Ｋ 16/42		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/15	ＺＣＣ	
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	

Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/566
	Ｃ１２Ｎ 5/00 A
	Ｃ１２Ｎ 5/00 B
	Ａ６１Ｋ 37/02

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 チン, スーチアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１３６２, サウザンド オークス, ボーデロ レーン ３２５４
(72)発明者 ウェルチャー, アンドリュー エイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９３００１, ベンチュラ, チャーチ ストリート １１７５
(72)発明者 フォックス, ギャリー エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１３２０, ニューベリー パーク, ウエスト ケリー ロード ３５
(72)発明者 シュ, ジュンヤン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１３６０, サウザンド オークス, マッククラウド アベニュー ６８９, アパートメント ３１４
(72)発明者 ボーディゲイマー, マイケル ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１２３０, ニューベリー パーク, ハロウェイ コート ３１９２
(72)発明者 ベネット, ブライアン ディー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１３６０, サウザンド オークス, レジナ アベニュー ２７０６

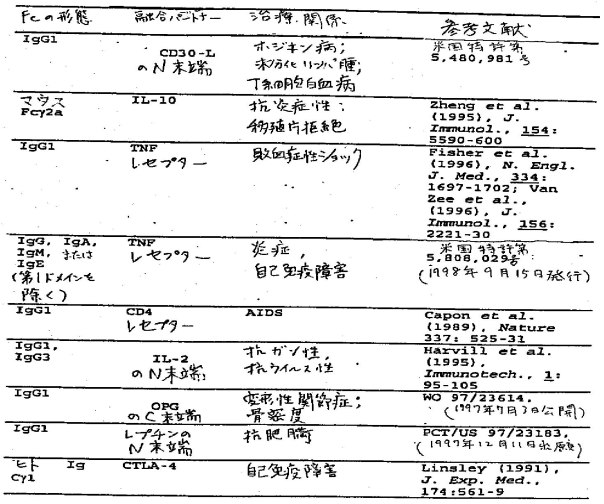
Ｆターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA61 BA63 CA04 CA12 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04 GA01 GA11 HA08
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ41 QR32
4B065 AA01X AA26X AA57X AA90X AA90Y AB01 CA24 CA25 CA44 CA46
4C076 CC21 CC26 CC42 EE06 EE23 EE25 EE31 EE38
4C084 AA02 AA13 AA17 BA02 BA08 CA18 NA14 ZA96 ZA97 ZC21
4C085 AA13 AA14 AA15 AA19 BB11 BB41 BB43 CC02 CC03 CC22 CC23
4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA02 ZA08 ZA12 ZA33 ZA36 ZA39 ZA40 ZA59 ZA66 ZA67 ZA81 ZA89 ZA96 ZA97 ZB05 ZB08 ZB26 ZB27 ZB35 ZC21 ZC35 ZC55
4C087 AA01 AA02 BB63 BC83 CA12 NA14 ZA02 ZA08 ZA12 ZA33 ZA36 ZA39 ZA40 ZA59 ZA66 ZA67 ZA81 ZA89 ZA96 ZA97 ZB05 ZB08 ZB26 ZB27 ZB35 ZC21 ZC35 ZC55
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA51 DA75 DA76 EA20 EA50

专利名称(译)	TNFR / OPG样分子及其用途		
公开(公告)号	JP2004500063A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2001545549	申请日	2000-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	チンスーチアン ウェルチャーアンドリューエイ フォックスギャリーエム シュジュンヤン ボーディゲイマーマイケルジェイ ベネットブライアンディー		
发明人	チン, スーチアン ウェルチャー, アンドリュー エイ. フォックス, ギャリー エム. シュ, ジュンヤン ボーディゲイマー, マイケル ジェイ. ベネット, ブライアン ディー.		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/55 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/14 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/08 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/02 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 C07K14/705 C07K14/715 C07K16/28 C07K16/42 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/68 C40B40/02 C40B50/06 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/08 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/02 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/70578 C07K2319/00 C12N2799/021 G01N33/6893 G01N2333/525 G01N2333/70578 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/55 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/14 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/08 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P29/02 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 C07K14/715 C07K16/28 C07K16/42 C07K19/00 C12N1/15.ZCC C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ41 4B063/QR32 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/CC21 4C076/CC26 4C076/CC42 4C076/EE06 4C076/EE23 4C076/EE25 4C076/EE31 4C076/EE38 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZA96 4C084/ZA97 4C084/ZC21 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA19 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC03 4C085/CC22 4C085/CC23 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA08 4C086		

	/ZA12 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA39 4C086/ZA40 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA67 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB05 4C086/ZB08 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB35 4C086/ZC21 4C086/ZC35 4C086/ZC55 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA08 4C087/ZA12 4C087/ZA33 4C087/ZA36 4C087/ZA39 4C087/ZA40 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA67 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZA97 4C087/ZB05 4C087/ZB08 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB35 4C087/ZC21 4C087/ZC35 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50
代理人(译)	井上充 Masarushin大崎
优先权	60/172306 1999-12-16 US
其他公开文献	JP2004500063A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了新的TNFr / OPG样多肽和编码它们的核酸分子。本发明还提供了载体，宿主细胞，抗体和产生TNFr / OPG样多肽的方法。还提供了用TNFr / OPG样多肽诊断和治疗疾病的方法。



Fcの形態	融合パートナー	治療・関係	参考文献
IgG1	CD30-L のN末端	ホジキン病；未分化リンパ腫；T細胞白血病	米国特許第5,480,981号
マウスFcγ2a	IL-10	抗炎症性；移植片拒絶	Zheng et al. (1995), J. Immunol., 154: 5590-600
IgG1	TNF レセプター	敗血症性ショック	Fisher et al. (1996), N. Engl. J. Med., 334: 1697-1702; Van Zee et al., (1996), J. Immunol., 156: 2221-30
IgG, IgA, IgM, または IgE (第1ドメインを除く)	TNF レセプター	炎症，自己免疫障害	米国特許第5,808,029号 (1998年9月15日発行)
IgG1	CD4 レセプター	AIDS	Capon et al. (1989), Nature 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2 のN末端	抗ガン性，抗ウイルス性	Harvill et al. (1995), Immunotech., 1: 95-105
IgG1	OPG のC末端	変形性関節症；骨密度	WO 97/23614. (1997年7月3日公開)
IgG1	レプチンのN末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, (1997年12月11日出願)
ヒト Ig γ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley (1991), J. Exp. Med., 174:561-9