

(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2004-535185

(P2004-535185A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/16	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 137 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-500285 (P2003-500285)	(71) 出願人	591123609 イミュネックス・コーポレーション IMMUNEX CORPORATION アメリカ合衆国カリフォルニア州91320-1799, サウザンド・オークス, ワン・アムゲン・センター・ドライブ
(86) (22) 出願日	平成14年5月23日 (2002. 5. 23)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月25日 (2003. 11. 25)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/016391	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02002/097120	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成14年12月5日 (2002. 12. 5)		
(31) 優先権主張番号	60/293, 608		
(32) 優先日	平成13年5月25日 (2001. 5. 25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/324, 626		
(32) 優先日	平成13年9月24日 (2001. 9. 24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アトラクチン/マホガニー様ポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、およびそれらを使用する方法

(57) 【要約】

本開示は、アトラクチン/マホガニー様ポリペプチドおよびその断片、こうしたポリペプチドおよび断片をコードするポリヌクレオチド、こうしたポリペプチドの組換え型を産生する方法、これらのポリペプチドまたは断片に対して生成された抗体、並びにこれらのポリペプチド、抗体、およびポリヌクレオチドを使用するアッセイおよび方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H A M ポリペプチドを含んでなる実質的に精製されたポリペプチドであって、H A M ポリペプチドが、配列番号 2 または 1 9 に示す配列に、少なくとも 8 0 % 同一である、前記ポリペプチド。

【請求項 2】

H A M ポリペプチドが、配列番号 2 または 1 9 に示す配列に、少なくとも 9 0 % 同一である、請求項 1 の実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 3】

H A M ポリペプチドが、配列番号 2 または 1 9 に示す配列を有する、請求項 1 の実質的に精製されたポリペプチド。 10

【請求項 4】

配列が、配列番号 2 のほぼアミノ酸 6 1 ~ 1 3 7 9 または配列番号 1 9 のほぼアミノ酸 6 0 ~ 1 3 7 6 を含んでなる、請求項 1 の実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 5】

配列が、配列番号 2 のほぼアミノ酸 6 1 ~ 1 2 3 0 もしくはその断片、または配列番号 1 9 のほぼアミノ酸 6 0 ~ 1 2 2 7 もしくはその断片を含んでなる、請求項 1 の実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 6】

H A M ポリペプチドを含んでなる実質的に精製されたポリペプチドであって、H A M ポリペプチドが、配列番号 2 のほぼアミノ酸 6 1 ~ 1 2 3 0 もしくはその断片、または配列番号 1 9 のほぼアミノ酸 6 0 ~ 1 2 2 7 もしくはその断片に示す配列に、少なくとも 8 0 % 同一であり、そして該 H A M ポリペプチドが H A M ポリペプチド活性を有する、前記ポリペプチド。 20

【請求項 7】

配列が、配列番号 2 のほぼアミノ酸 6 1 ~ 1 2 3 0 もしくはその断片、または配列番号 1 9 のほぼアミノ酸 6 0 ~ 1 2 2 7 もしくはその断片に示す配列に、少なくとも 9 0 % 同一である、請求項 6 の実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 2 のほぼアミノ酸 6 1 ~ 1 2 3 0 または配列番号 1 9 のほぼアミノ酸 6 0 ~ 1 2 2 7 に示すアミノ酸配列を含んでなる、実質的に純粋なポリペプチド。 30

【請求項 9】

第二のポリペプチドに機能可能であるように連結された第一のポリペプチドを含んでなる融合ポリペプチドであって、第一のポリペプチドが：

(i) 配列番号 2 のほぼアミノ酸 6 1 ~ 1 2 3 0 に示す配列を有するポリペプチド；
(i i) 配列番号 1 9 のほぼアミノ酸 6 0 ~ 1 2 2 7 に示す配列を有するポリペプチド；
(i i i) 配列番号 2 のほぼアミノ酸 6 1 ~ 1 3 7 9 に示す配列を有するポリペプチド；
および

(i v) 配列番号 1 9 のほぼアミノ酸 6 0 ~ 1 3 7 6 に示す配列を有するポリペプチド；
からなる群より選択される、前記融合ポリペプチド。 40

【請求項 10】

第二のポリペプチドが F c ポリペプチドである、請求項 9 の融合ポリペプチド。

【請求項 11】

第二のポリペプチドがロイシンジッパーポリペプチドである、請求項 9 の融合ポリペプチド。

【請求項 12】

第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドを分離し、そして第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドに機能可能であるように連結されているリンカーポリペプチドを含んでなる、請求項 9 の融合ポリペプチド。

【請求項 13】

請求項 1、6、または 9 のポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 14】

- a) 配列番号 1 または 18 ;
- b) T がまた U であることも可能である、配列番号 1 または 18 ;
- c) 配列番号 1 または 18 に相補的な配列 ; および
- d) 少なくとも長さ 50 塩基であり、そして中程度の (m o d e r a t e) 条件下から非常にストリンジентな条件下で、配列番号 2 または 19 に示す配列を含んでなるポリペプチドをコードする核酸分子にハイブリダイズするであろう、a)、b) または c) の断片

からなる群より選択される配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

10

【請求項 15】

- a) 配列番号 1 のほぼヌクレオチド 181 ~ 4137 ;
- b) 配列番号 1 のほぼヌクレオチド 181 ~ 3690 ;
- c) 配列番号 18 のほぼヌクレオチド 178 ~ 4128 ;
- d) 配列番号 18 のほぼヌクレオチド 178 ~ 3681 ;
- e) a)、b)、c)、および d) に相補的な配列 ; 並びに
- f) T がまた U であることも可能である、a)、b)、c)、または d) のいずれかからなる群より選択される配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 16】

請求項 14 または 15 のポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

20

【請求項 17】

ベクターがプラスミドである、請求項 16 のベクター。

【請求項 18】

ベクターがウイルスベクターである、請求項 16 のベクター。

【請求項 19】

請求項 16 のベクターを含有する宿主細胞。

【請求項 20】

異種制御配列の調節下の、請求項 14 または 15 のポリヌクレオチドを含んでなる、組換え宿主細胞。

【請求項 21】

細胞が原核である、請求項 20 の宿主細胞。

30

【請求項 22】

細胞が真核である、請求項 20 の宿主細胞。

【請求項 23】

ポリペプチドの発現を促進する条件下で、請求項 20 の宿主細胞を培養することを含んでなる、ポリペプチド産生法。

【請求項 24】

ポリペプチドの発現を促進する条件下で、請求項 20 の宿主細胞を培養することによって産生されたポリペプチド。

【請求項 25】

配列番号 2 または 18 に示す配列からなるポリペプチドに特異的に結合する、精製抗体。

40

【請求項 26】

モノクローナル抗体である、請求項 25 の抗体。

【請求項 27】

ヒトまたはヒト化 (h u m a n i z e d) 抗体である、請求項 25 の抗体。

【請求項 28】

請求項 25 の抗体または :

- (a) 配列番号 2 のアミノ酸 61 ~ 1379 ;
- (b) 配列番号 2 のアミノ酸 61 ~ 1230 ;
- (c) 配列番号 18 のアミノ酸 60 ~ 1376 ; および

50

(d) 配列番号 18 のアミノ酸 60 ~ 1227 ;

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、並びに薬学的キャリアー、賦形剤または希釈剤を含んでなる、薬剤組成物。

【請求項 29】

配列番号 1 または 18 に示す配列を含んでなるポリヌクレオチドの発現を変調する剤を同定する方法であって、該ポリヌクレオチドを含有する試料を試験剤と接触させ、そして対照に比較したポリヌクレオチドの発現を測定する、ここで対照に比較した発現の変化が、ポリヌクレオチドの発現を変調する剤の示標となることを含んでなる、前記方法。

【請求項 30】

剤がポリペプチド、ペプチド、ペプチド擬似体 (peptidomimetic)、核酸、および小分子からなる群より選択される、請求項 29 の方法。 10

【請求項 31】

試料が被験者由来の生物学的試料である、請求項 29 の方法。

【請求項 32】

試料が細胞を含んでなる、請求項 29 の方法。

【請求項 33】

発現の変化が発現の増加である、請求項 29 の方法。

【請求項 34】

測定が PCR またはノーザンブロットによる、請求項 29 の方法。

【請求項 35】

測定が、ポリヌクレオチドに発現されるポリペプチドを検出することによる、請求項 29 の方法。 20

【請求項 36】

配列番号 2 または 19 に示す配列を含んでなるポリペプチドの活性を変調する剤を同定する方法であって、該ポリペプチドを含有する試料を試験剤と接触させ、そして対照に比較したポリペプチドの活性を測定する、ここで対照に比較した活性の変化が、ポリペプチドの活性を変調する剤の示標となることを含んでなる、前記方法。

【請求項 37】

剤がポリペプチド、ペプチド、ペプチド擬似体、核酸、および小分子からなる群より選択される、請求項 36 の方法。 30

【請求項 38】

試料が被験者由来の生物学的試料である、請求項 36 の方法。

【請求項 39】

試料が細胞を含んでなる、請求項 36 の方法。

【請求項 40】

活性の変化が活性の増加である、請求項 36 の方法。

【請求項 41】

測定が、試料中のポリペプチド量を定量化することによる、請求項 36 の方法。

【請求項 42】

HAM 関連障害または疾患を治療する方法であって、HAM 関連障害または疾患を治療するのに有効な量の HAM ポリペプチド、HAM ポリヌクレオチド、または HAM ポリペプチドに特異的に結合する抗体と、被験者を接触させることを含んでなる、前記方法。 40

【請求項 43】

HAM 関連障害が、リウマチ学的障害、骨髄または固形臓器移植障害、移植片対宿主障害、炎症性障害、自己免疫障害、神経学的障害、髄鞘形成障害、細胞増殖障害、感染、心臓血管障害、血液学的障害、肝臓障害、代謝障害、体重障害、および骨障害からなる群より選択される、請求項 42 の方法。

【請求項 44】

HAM ポリペプチドが、配列番号 2 または 19 に示す配列、あるいはその生理活性断片を有する、請求項 42 の方法。

【請求項 45】

生理活性断片が、配列番号 2 のほぼアミノ酸 61 ~ 1230 に示す配列、または配列番号 19 のほぼアミノ酸 60 ~ 1227 に示す配列を有する、請求項 42 の方法。

【請求項 46】

HAM ポリヌクレオチドが、配列番号 1 または 18 に示す配列を有する、請求項 42 の方法。

【請求項 47】

被験者が哺乳動物である、請求項 42 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

(関連出願へのクロスリファレンス)

本出願は、35 U.S.C. § 119 に基づいて、米国仮出願第 60/293,608 号、2001 年 5 月 25 日提出、および米国仮出願第 60/324,626 号、2001 年 9 月 24 日提出の優先権を主張し、前記出願の開示は、本明細書に援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、新規アトラクチン/マホガニー様ポリペプチドおよびその断片、こうしたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、こうしたポリペプチドの組換え型を産生する方法、これらのポリペプチドまたは断片に対して生成された抗体、並びにこれらのポリペプチド、抗体、およびポリヌクレオチドを使用するアッセイおよび方法に関する。

20

【背景技術】

【0003】

(背景)

アトラクチン (DPP T-L) は、細胞接着およびガイダンスタンパク質の CUB ファミリーと称するタンパク質ファミリーに属する、ヒト糖タンパク質である。アトラクチンは、通常、活性化ヒト T リンパ球に分泌され、そして免疫細胞相互作用を変調する。

【0004】

アトラクチンは、他のドメインと共に、4つの EGF 様ドメインを含有する、1198 アミノ酸タンパク質である。EGF 様ドメインを持つタンパク質は、典型的には、細胞外シグナル伝達または細胞ガイダンスに役割を有する。例えば、精製血清アトラクチンおよび組換えアトラクチンは、末梢血液単核細胞 (PBMC) の増殖応答を増進して、破傷風トキソイドなどの抗原をリコールする (Duke-Cohanら, Proc. Nat. Acad. Sci., 95:11336-41, 1998)。アトラクチンは、リンパ球が付着する接着性単球の蔓延を引き起こす (Duke-Cohanら、上記)。これらの接着細胞は、T リンパ球クラスター形成の中心 (foci) となり、そしてアトラクチンは、細胞間結合、抗原提示に影響を及ぼすことによって、またはタンパク質分解的修飾によって、T 細胞およびマクロファージ間の相互作用を仲介するのに関与すると考えられる。さらに、アトラクチンはまた、色素沈着およびエネルギー代謝の調節に関連して、ネズミ・マホガニータンパク質と関連すると同定されてきている (Tangら, Proc. Nat. Acad. Sci., 97(11):6025-30, 2000)。

30

40

【0005】

マホガニーは、ヒト・アトラクチンのオルソログであるネズミタンパク質である (Gunnら, Nature, 398:152, 1999)。ネズミ・マホガニーは、1428 アミノ酸の膜貫通タンパク質であり、単一の膜貫通ドメインを含有する。ネズミ・マホガニーの細胞外ドメインは、アトラクチンに相同性を有する。ネズミ・マホガニーは、肥満抑制に関与することが示されてきている (Nagleら, Nature, 398:148-152, 1999; 本明細書に完全に援用される、米国特許第 6,274,339 号もまた参照されたい)。

50

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の概要)

本発明は、配列番号2または19に示す配列に、少なくとも80%、90%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、実質的に純粋なポリペプチドを提供する。

【0007】

さらに、本発明は、配列番号2のほぼアミノ酸61~1379に示す配列に、少なくとも80%、90%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、実質的に純粋なポリペプチドを提供する。

10

【0008】

本発明はまた、配列番号2のアミノ酸1~61、61~1230、61~1379、1231~1252、または1252~1379に示す配列を含んでなる、配列番号2の生理活性断片も提供する。

【0009】

本発明は、配列番号2のほぼアミノ酸61~1230に示す配列に、少なくとも80%、90%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、実質的に純粋なポリペプチドを提供する。

【0010】

本発明は、配列番号2のほぼアミノ酸1252~1379に示す配列に、機能可能であるように連結された、配列番号2のアミノ酸61~1230に示す配列を有する、実質的に純粋なポリペプチドを提供する。

20

【0011】

本発明はまた、第二のポリペプチドに機能可能であるように連結された、配列番号2のほぼアミノ酸61~1230に示すアミノ酸配列を含んでなる第一のポリペプチドを含んでなる、融合ポリペプチドも提供する。1つの側面において、第二のポリペプチドはFcポリペプチドである。別の側面において、第二のポリペプチドはロイシンジッパーポリペプチドである。さらに別の側面において、第二のポリペプチドは配列番号2または19に示す配列を有し、これにはその生理活性断片が含まれる。さらなる側面において、リンカーポリペプチドは、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドを分離し、そして第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドに機能可能であるように連結されている。

30

【0012】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチドを提供する。1つの態様において、単離ポリヌクレオチドは：配列番号1または18；TがまたUであることも可能である、配列番号1または18；配列番号1または18に相補的な配列；および少なくとも長さ20塩基であり、そして中程度の(moderate)条件下から非常にストリンジентな条件下で、配列番号2または19に示す配列を含んでなるポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズするであろう、a)、b)またはc)の断片からなる群より選択される配列を含んでなる。さらなる態様において、単離ポリヌクレオチドは：配列番号1のほぼヌクレオチド181~4137；配列番号1のほぼヌクレオチド181~3690；配列番号1のほぼヌクレオチド181~4137に相補的な配列；配列番号1のほぼヌクレオチド181~3690に相補的な配列；およびTがまたUであることも可能である、a)、b)、c)、またはd)のいずれかからなる群より選択される配列を含んでなる。

40

【0013】

本発明はさらに、本発明の融合ポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチドを提供する。

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含んでなるベクターを提供する。1つの態様において、ベクターはプラスミドまたはウイルスベクターである。

50

【0014】

本発明はまた、本発明のベクターを含んでなる宿主細胞も提供する。本発明はさらに、異種制御配列の調節下の、本発明のポリヌクレオチドを含んでなる、組換え宿主細胞を提供する。宿主細胞は、原核または真核であることが可能である。

【0015】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドの発現を促進する条件下で、本発明の宿主細胞または組換え宿主細胞を培養することを含んでなる、ポリペプチド産生法を提供する。本発明の別の側面において、ポリペプチドの発現を促進する条件下で、本発明の宿主細胞を培養することによって産生したポリペプチドを提供する。

【0016】

本発明はまた、本発明のポリペプチドに特異的に結合する、精製抗体も提供する。1つの側面において、抗体はモノクローナル抗体である。別の側面において、抗体はヒトまたはヒト化(humanized)抗体である。

【0017】

本発明は、本発明の抗体または：配列番号2のアミノ酸61～1379；および配列番号2のアミノ酸61～1230からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、並びに薬学的キャリアー、賦形剤または希釈剤を含んでなる、薬剤組成物を提供する。

【0018】

別の側面において、本発明は、配列番号1または18に示す配列を含んでなるポリヌクレオチドの発現を変調する剤を同定する方法であって、該ポリヌクレオチドを含有する試料を試験剤と接触させ、そして対照に比較したポリヌクレオチドの発現を測定する、ここで対照に比較した発現の変化が、ポリヌクレオチドの発現を変調する剤の示標となることを含んでなる、前記方法を提供する。剤は、ポリペプチド、ペプチド、ペプチド擬似体(peptidomimetic)、核酸、および小分子であることが可能である。

【0019】

本発明がやはり提供するの、配列番号2または19、配列番号2のほぼ61～1379、配列番号2のほぼ61～1230からなる群より選択される配列を含んでなるポリペプチドの活性を変調する剤を同定する方法であって、該ポリペプチドを含有する試料を試験剤と接触させ、そして対照に比較したポリペプチドの活性を測定する、ここで対照に比較した活性の変化が、ポリペプチドの活性を変調する剤の示標となることを含んでなる、前記方法である。

【0020】

本発明はさらに、HAM関連障害または疾患を治療する方法であって、HAM関連障害または疾患を治療するのに有効な量のHAMポリペプチド、HAMポリヌクレオチド、またはHAMポリペプチドに対する抗体と、被験者を接触させることを含んでなる、前記方法を提供する。HAM関連障害は、リウマチ学的障害、骨髄または固形臓器移植障害、移植片対宿主障害、炎症性障害、自己免疫障害、神経学的障害、髄鞘形成障害、細胞増殖障害、感染、心臓血管障害、血液学的障害、肝臓障害、代謝障害、体重障害、および骨障害からなる群より選択される。1つの側面において、HAMポリペプチドは、配列番号2または19に示す配列、あるいはその生理活性断片を有する。

【0021】

(発明の詳細な説明)

本発明は、本明細書において、アトラクチンおよびマホガニー相同体(Homologue of Attractin and Mahogany)を表す「HAM」と称される、アトラクチンおよびマホガニータンパク質に相同性を有する最初の新規ポリペプチドを提供する。やはり提供するの、新規HAMポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと共に、該ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用法である。

【0022】

アトラクチン分子は、T細胞およびマクロファージおよび単球間の相互作用を変調し、よ

10

20

30

40

50

り迅速な、そして/またはより効果的な抗原提示を可能にする。3つの細胞種の会合は、同時発生的でも、またランダムでもない。むしろ、抗原提示細胞は、まずヘルパーT細胞とクラスター形成し、そしてこのクラスターは、エフェクター細胞による認識の中心として作用する。抗原の非存在下では、単球およびT細胞の可溶性アトラクチン-1誘導クラスターにおいて、増殖はまったく生じないが、破傷風トキソイドなどのリコール抗原が存在する場合；細胞のクラスター形成は、抗原に対する潜在的な応答を最大限にする。アトラクチンは、結合および提示に影響を及ぼすことによって、またはタンパク質分解的修飾によって、いずれかで、局所サイトカイン活性を制御可能である。可溶性アトラクチン-1は、最近、N末端ジペプチドを切断することが示されてきており、これは、強力な単球化学誘引物質である全長RANTES 1~68(アミノ酸残基1~68からなる)を、単球走化性の同等に強力な阻害剤であるRANTES 3~68に変換する。可溶性アトラクチン-1はまた、マクロファージおよび単球に結合することもまた見出された。アトラクチンが、そのいずれの型においても、マクロファージおよび単球の活性を制御可能であるのは、この結合を介してである可能性がある。例えば、拡散を誘導し、そしてそれに続いてT細胞クラスター形成を増進するのに必要なシグナルを提供することによる。あるいは、該分子は、マクロファージ/単球上の受容体への別の分子の結合を補足することが可能である。さらに、該分子は、T細胞およびマクロファージ/単球間の架橋を形成可能である。膜アトラクチン-1および-2は細胞質ドメインを有するため、膜アトラクチンの細胞外領域への推定上のリガンドの結合が、T細胞へのシグナル伝達を生じる可能性がある。しかし、本発明は、作用の特定の機構に限定されないことを理解すべきである。

10

20

【0023】

アトラクチンへの相同性に基づいて、本発明のHAM分子は、アトラクチンと同様の生物学的活性を有すると予測され、そしてしたがって、炎症および炎症性反応において役割を果たすと予測される。HAM分子の他の生物学的活性には、エネルギー代謝および色素沈着が含まれ、この活性は、マホガニータンパク質へのHAMの相同性および肥満制御におけるマホガニータンの役割に基づく(Nagleら, Nature, 398:148-152, 1999)。2種類の活性(例えば炎症および肥満)の相関は、肥満小児におけるより高い白血球数によって示されてきており(Visserら、上記)、これはおそらく、炎症細胞活性化によって誘導されるサイトカインと共に、前脂肪細胞を含む、さらなる細胞種のためである。前脂肪細胞は、食作用および抗菌活性などの、マクロファージの機能的特徴を示し、前脂肪細胞が、炎症過程または免疫応答に役割を果たす可能性が示唆される(Cousinら, J. Cell Physiol., 186:380-6, 2001)。

30

【0024】

同様の機能的特性は、ob遺伝子産物、レプチンに見出すことも可能であり、該分子は、体脂肪量に比例する循環レベルを持つ、脂肪細胞由来ペプチドである。血清レプチンレベルは、体脂肪蓄積と相関し、そして肥満のヒトでは、3~4倍と同程度に高く増加する。このレベルは、絶食によって低下し、そして炎症によって増加する。レプチンは、食物摂取、代謝および内分泌機能を制御する多面的な分子であり、そして免疫、炎症、および造血を制御する役割を有する(FantuzziおよびFaggioni, J. Leukoc Biol, 68(4):437-46, 2000)。満腹シグナルとしての役割に加えて、レプチンはまた、炎症誘発性でもある：レプチン受容体は、サイトカイン受容体のクラスIファミリーに属し、そしてマクロファージおよびT細胞を含む、多様な造血細胞上に示されてきており、これらの細胞において、レプチンは炎症性サイトカインの放出を促進する。したがって、炎症および肥満間の連関が存在する(Visserら, Pediatrics, 107(1):E13, 2001)。エネルギー代謝および炎症におけるレプチンの役割は、HAMの役割を予測する。したがって、HAMは、肥満、炎症性反応、炎症、代謝、色素沈着および神経(例えば髄鞘形成関連障害)において役割を果たす可能性がある。

40

【0025】

50

本明細書において提供するHAMポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体は、炎症性疾患、肥満、エネルギー代謝、食欲の治療、および炎症性反応の変調に使用を見出す。本発明は、本明細書において「HAMポリペプチド」と称されるポリペプチドを提供する。本明細書において、本発明の「HAMポリペプチド」は、配列番号2または19に示すアミノ酸配列を含有するかまたは含んでなるポリペプチド；配列番号2または19に示す配列に実質的な相同性または実質的な同一性を有するポリペプチド；前述の配列の断片（例えば生理活性断片）；および前述のものの保存的変異体を意味する。HAMポリペプチドは、アトラクチンおよびマホガニーポリペプチドに相同性を有することが示されてきており、そしてしたがって、アトラクチンおよびマホガニーポリペプチドに類似の予測される機能および生物学的活性を有する。

10

【0026】

本明細書において、「ポリペプチド」は、長さまたは翻訳後修飾（例えばグリコシル化またはリン酸化）に関わりなく、アミノ酸（L-またはD-アミノ酸を含む）のいずれかの鎖を意味し、そして天然タンパク質、合成または組換えポリペプチドおよび断片と共に、例えばHAMポリペプチドアミノ酸配列のすべてまたは一部を有する第一の部分および目的のポリペプチドのすべてまたは部分を含んでなる第二の部分とのハイブリッドからなる組換え分子を含む。典型的には、HAMポリペプチドは、通常、天然に存在する他の構成要素に対して実質的に純粋である。用語「実質的に純粋」または「精製された」は、ポリペプチドに言及する際、天然に関連しているタンパク質および天然存在有機分子を少なくとも30%含まないポリペプチドを意味する。好ましくは、本発明の実質的に純粋なポリペプチドは、他の天然存在有機分子から、重量にして、少なくとも35~50%、好ましくは60~70%、より好ましくは75%、より好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも99%精製されている。本発明の実質的に純粋なポリペプチドは、例えば、天然供給源からの抽出によって、ポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドの発現によって、またはポリペプチドを化学的に合成することによって、得ることが可能である。純度は、適切な方法のいずれか、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC解析によって、測定可能である。

20

30

40

【0027】

一般的に、組換えポリペプチドまたは断片は、分泌されていなければ宿主細胞から、または、可溶性でそして分泌されていれば培地もしくは上清から、分離した後、1周期以上の濃縮、塩析、イオン交換、疎水性相互作用、アフィニティー精製またはサイズ排除クロマトグラフィーによって、単離することが可能である。望ましい場合、商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外ろ過装置を用いて、培地をまず、濃縮することが可能である。濃縮工程後、濃縮物をゲルろ過媒体などの精製マトリックスに適用することが可能である。あるいは、陰イオン交換樹脂、例えばペンダントジエチルアミノエチル（DEAE）基を有するマトリックスまたは支持体を使用可能である。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製に一般的に使用される他の種類であることが可能である。あるいは、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含んでなる多様な不溶性マトリックスを含む、陽イオン交換工程が使用可能である。さらに、等電点電気泳動工程、あるいは疎水性相互作用クロマトグラフィー工程が使用可能である。適切なマトリックスは、樹脂に結合したフェニルまたはオクチル部分であることが可能である。さらに、組換えタンパク質に選択的に結合するマトリックスを用いたアフィニティークロマトグラフィーが使用可能である。使用されるこうした樹脂の例は、レクチンカラム、色素カラム、および金属キレートカラムである。最後に、疎水性逆相高性能液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）媒体（例えばペンダントメチル、オクチル、オクチルデシルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルまたはポリマー樹脂）を使用する、1以上のRP-HPLC工程を使用して、ポリペプチドをさらに精製することが可能である。多様な組み合わせの前述の精製工程のいくつかまたはすべてが公知であり、そしてこれを使用して、実質的に精製された、本発明のポリペプチドを提供することが可能である。

50

【0028】

本発明のポリペプチドに対して生成したモノクローナル抗体などのポリペプチド結合タンパク質を含んでなるアフィニティーカラムを利用して、発現されたポリペプチドをアフィニティー精製することもまた可能である。これらのポリペプチドは、慣用的な技術を用いて、例えば利用するアフィニティーマトリックスに応じて、高塩溶出緩衝液中で、そしてその後、使用のためより低塩の緩衝液中に透析することによって、またはpHもしくは他の構成要素を変化させることによって、アフィニティーカラムからはずす(remove)ことが可能であるし、あるいは本発明から得られるポリペプチドなどの、アフィニティー部分の天然存在基質を用いて、競合的にはずすことが可能である。

【0029】

したがって、抗ポリペプチド抗体、または本発明のポリペプチドと相互作用可能な他のタンパク質などの、ポリペプチド結合タンパク質を、その表面上に本発明のポリペプチドを発現する細胞を同定するか、分離するかまたは精製するのに適したカラムクロマトグラフィーマトリックスなどの固相支持体または類似の支持体に結合させることが可能である。固相接触表面への本発明のポリペプチド結合タンパク質の接着は、いかなる手段によって達成してもよく、例えば、磁気微小球体を、これらのポリペプチド結合タンパク質でコーティングし、そして磁場を通じてインキュベーション容器中に保持してもよい。細胞混合物の懸濁物を、こうしたポリペプチド結合タンパク質を有する固相と接触させる。表面上に本発明のポリペプチドを有する細胞が、固定ポリペプチド結合タンパク質に結合し、そしてその後、非結合細胞を洗い流す。このアフィニティー結合法は、溶液から、こうしたポリペプチド発現細胞を精製するか、スクリーニングするか、または分離するのに有用である。細胞は、例えば、好ましくは細胞表面結合パートナーを切断する非毒性酵素を用いることによって、または緩衝液の組成を修飾することによりこうした放出を達成することによって、放出されることが可能である。

【0030】

あるいは、本発明のHAMポリペプチド発現細胞を含有すると推測される細胞混合物を、ビオチン化した、抗HAM抗体などのポリペプチド結合タンパク質とインキュベーションすることが可能である。通常、約1時間以内で十分な結合が生じ、その後、アビジンでコーティングしたビーズを充填したカラムに混合物を通過させると、該ビーズにビオチン部分が高い親和性で結合するであろう(Berensonら, J. Cell. Biochem., 10D:239, 1986を参照されたい)。慣用法にしたがって、非結合細胞をカラムから洗い流し、そして結合細胞を溶出させる。この方法を用いて、膜結合HAMポリペプチドを発現する細胞を単離することが可能である。

【0031】

ポリペプチドを精製する際、望ましい純度は、ポリペプチドの意図される使用に依存するであろう。例えば、ポリペプチドをin vivoで投与しようとするとき、比較的高い純度が望ましい。こうした場合、ポリペプチドは、典型的には、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって、他のタンパク質に相当するバンドがまったく検出不能であるように精製される。当業者は、異なるグリコシル化、異なる翻訳後プロセッシング等のため、該ポリペプチドに相当する多数のバンドがSDS-PAGEによって視覚化される可能性があることを認識するであろう。最も好ましくは、本発明のポリペプチドは、SDS-PAGEによる解析の際、単一のタンパク質バンドによって示されるように、実質的に均一に精製される。バンドは、銀染色、クーマシーブルー染色によって、または(タンパク質が放射標識されている場合は)オートラジオグラフィによって、視覚化可能である。

【0032】

本発明のヒトHAMポリペプチド内に、いくつかの異なる領域を識別することが可能である。これらのポリペプチドには、シグナルペプチドとも称されるリーダー配列が存在する。例えば、本発明の全長ポリペプチドに存在するリーダー配列は、配列番号2のアミノ酸1~60を含むと予測される。HAMのシグナルペプチド切断部位は、コンピュータアル

10

20

30

40

50

ゴリズムを用いて予測された。しかし、当業者は、シグナル配列の切断部位は、ポリペプチドを発現させる生物を含む、いくつかの要因に応じて多様である可能性があることを認識するであろう。したがって、本発明のHAMポリペプチドの成熟型のN末端は、約2～5アミノ酸異なる可能性がある。したがって、配列番号2を含んでなるHAMポリペプチドの成熟型は、そのN末端で、配列番号2のアミノ酸55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、または65を含むことが可能である。したがって、成熟型は、配列番号2のアミノ酸55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、または65からほぼアミノ酸1379まで（または可溶性ポリペプチドの場合、アミノ酸1230まで）を含むことが可能である。配列番号2のHAMポリペプチドの細胞外領域は、配列番号2のほぼアミノ酸61～1230に位置する。EGF様ドメイン、CUBドメイン、C型レクチンまたは炭水化物認識ドメイン（CLECTドメイン）、KELCHモチーフおよびラミニンEGF様ドメイン割り当てと共に、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの割り当ては、コンピュータアルゴリズムおよび先の報告（Gunnら、Nature 398:152-157, 1999）に基づく。例えば、ヒトHAMの細胞外領域は、推定上、それぞれ、配列番号2のほぼアミノ酸63～90、211～244、261～280、93～208、581～612、749～873、670～686、および1014～1055に位置する、3つのEGF様ドメイン、CUBドメイン、KELCHモチーフ、C型レクチンまたは炭水化物認識ドメイン、共通のガンマサイトカイン鎖の推定上のリガンド結合モチーフ、およびラミニンEGF様ドメインを含有する（図3を参照されたい）。HAMポリペプチドの膜貫通領域は、配列番号2のほぼアミノ酸1231～1251に位置する。細胞内領域は、配列番号2のほぼアミノ酸1252～1379に位置する。図2および3は、HAMの相対ドメインおよび保存システイン残基を示し、アトラクチンまたはマホガニーポリペプチドを示す。図4A～Bに提供する並列を利用して、ヒトHAMポリペプチド（配列番号2）の対応するドメインに基づいて、ネズミHAMポリペプチド（配列番号19）の推定上のドメインを決定可能である。ネズミHAMポリペプチド（配列番号19）の相対ドメインおよびこうしたドメインをコードする対応するポリヌクレオチド断片（例えば配列番号18の断片）が、本発明に特に含まれる。

【0033】

したがって、本発明のネズミHAMポリペプチド内に、いくつかの異なる領域を識別することが可能である。これらのポリペプチドには、シグナルペプチドとも称されるリーダー配列が存在する。例えば、本発明の全長ポリペプチドに存在するリーダー配列は、配列番号19のアミノ酸1～59を含むと予測される。ネズミHAMのシグナルペプチド切断部位は、コンピュータアルゴリズムおよびヒトHAMとの並列を用いて予測された。しかし、当業者は、シグナル配列の切断部位は、ポリペプチドを発現させる生物を含む、いくつかの要因に応じて多様である可能性があることを認識するであろう。したがって、本発明のネズミHAMポリペプチドの成熟型のN末端は、約2～5アミノ酸異なる可能性がある。したがって、配列番号19を含んでなるネズミHAMポリペプチドの成熟型は、そのN末端で、配列番号19のアミノ酸54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、または64を含むことが可能である。したがって、成熟型は、配列番号2のアミノ酸54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、または64からほぼアミノ酸1376まで（または可溶性ポリペプチドの場合、アミノ酸1230まで）を含むことが可能である。配列番号19のネズミHAMポリペプチドの細胞外領域は、配列番号19のほぼアミノ酸60～1227に位置する。EGF様ドメイン、CUBドメイン、C型レクチンまたは炭水化物認識ドメイン（CLECTドメイン）、KELCHモチーフおよびラミニンEGF様ドメイン割り当てと共に、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの割り当ては、コンピュータアルゴリズム、ヒトHAM（配列番号2）との並列および先の報告（Gunnら、Nature 398:152-157, 1999）に基づく。例えば、ネズミHAMの細胞外領域は、推定上、それぞれ、配列番号19のほぼアミノ酸62～89、210～243、260～277、92～207、578～609、746～870、667～683、および1011～1052に位置する、3つのEGF

様ドメイン、CUBドメイン、KELCHモチーフ、C型レクチンまたは炭水化物認識ドメイン、共通のガンマサイトカイン鎖の推定上のリガンド結合モチーフ、およびラミニンEGF様ドメインを含有する。ネズミHAMポリペプチドの膜貫通領域は、配列番号19のほぼアミノ酸1228~1248に位置する。細胞内領域は、配列番号19のほぼアミノ酸1249~1376に位置する。

【0034】

本発明は、HAMポリペプチドの全長および成熟型どちらも提供する。全長ポリペプチドは、最初に翻訳されるようなポリペプチドの完全一次アミノ酸配列を有するものである。全長ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、cDNA分子の完全オープンリーディングフレーム(「ORF」)の翻訳によって、得ることが可能である。単一の遺伝子座から、選択的スプライシングによって、または多数の翻訳開始部位の使用によって、多数のmRNA型が産生される場合、その遺伝子座に、いくつかの全長ポリペプチドがコードされることが可能である。本発明の全長HAMポリペプチドの例は、配列番号2のアミノ酸1~1379および配列番号19の1~1376を含んでなる。こうした全長ポリペプチドは、例えば、それぞれ、配列番号2のアミノ酸1~ほぼアミノ酸60、および配列番号19のアミノ酸1~ほぼアミノ酸59を含んでなるシグナルペプチドを含むよう意図される。

10

【0035】

ポリペプチドの「成熟型」は、あるとすれば、例えばシグナル配列の切断またはプロドメインを除去するタンパク質分解的切断などの、翻訳後プロセッシング工程を経たポリペプチドを指す。特定の全長ポリペプチドの多数の成熟型は、例えば、シグナル配列の不正確な切断によって、またはポリペプチドを切断するプロテアーゼの差別的制御によって、産生可能である。こうしたポリペプチドの成熟型(類)は、全長ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適切な哺乳動物細胞または他の宿主細胞において発現することによって、得ることが可能である。ポリペプチドの成熟型の配列はまた、シグナル配列またはプロテアーゼ切断部位の同定を通じて(例えば配列番号2の60位および61位のSer-Lys残基間に、プロテアーゼ切断部位が予測される)、全長型のアミノ酸配列から決定可能である可能性もある。本発明のHAMポリペプチドの成熟型の例は、配列番号2のほぼアミノ酸61~アミノ酸1379に示す配列を含んでなる。

20

【0036】

本発明のHAMポリペプチドはまた、一部切除されている(truncated)が、生物学的に活性であるポリペプチド、例えばポリペプチドの天然存在可溶性型を生じることが可能な選択的mRNAプロセッシングなどの転写後または翻訳後プロセッシング事象から生じるポリペプチドも含む。本発明内にやはり含まれるのは、ポリペプチドからの1以上の末端アミノ酸(一般的には1~5の末端アミノ酸)のタンパク質分解的除去による、異なる種類の宿主細胞における発現に際する、NまたはC末端の相違などのタンパク質分解に起因しうる変異である。

30

【0037】

別の態様において、本発明は、HAMポリペプチドの生理活性断片を提供する。「生理活性断片」によって、アトラクチンおよび/またはマホガニーポリペプチドと関連する生物学的活性、並びに/あるいは本発明の全長または成熟型のHAMポリペプチドと関連する生物学的活性を有する、配列番号2または19の断片を意味する。生理活性断片は、例えば単球およびマクロファージ活性化を誘導し、炎症誘発性サイトカイン(例えばIL-6)の分泌および/または発現を促進し、代謝活性を変調し、体重獲得/損失を変調し、そして食欲およびエネルギー消費を変調することを含む、1以上の生物学的活性を有することが可能である。HAMポリペプチド分子の生理活性断片の例には、ほぼアミノ酸61~1230を含んでなる配列番号2に示される配列、ほぼアミノ酸60~1227を含んでなる配列番号19に示される配列、および前述のいずれかの断片が含まれる。こうした生理活性断片は、予測される膜貫通ドメイン(例えば配列番号2のほぼアミノ酸1231で始まり、アミノ酸1251までのドメイン)を欠く潜在的な可溶性分子に相当する。HAMポリペプチドの生理活性断片は、例えばHAMポリペプチド同族体(cognate)

40

50

、あるいは配列番号2または19のHAMポリペプチドに対して発展させた抗体と相互作用することが可能である。本発明のHAMポリペプチドまたはHAMポリペプチドの生理活性断片が、望ましい活性を有するかどうか決定する方法は、以下に記載する方法いずれかによりポリペプチドをアッセイすることによって、達成可能である。

【0038】

したがって、本発明のポリペプチドは膜結合であることも可能であり、または分泌され、そしてしたがって可溶性であることも可能である。可溶性ポリペプチドは、発現される細胞から分泌されることが可能である。一般的に、可溶性ポリペプチドは、培地から、例えば遠心分離によって、望ましいポリペプチドを発現する、損なわれていない (*intact*) 細胞を分離し、そして望ましいポリペプチドの存在に関して培地 (上清) をアッセイすることによって、または培養から得られる細胞不含培地を、HAMに特異的な抗体と接触させることによって、同定可能である (そして非可溶性膜結合対応物と区別可能である)。培地中のポリペプチドの存在は、ポリペプチドが細胞から分泌され、そしてしたがって、該ポリペプチドの可溶性型であることを示す。

10

【0039】

1つの態様において、可溶性ポリペプチド (例えばHAMポリペプチドの生理活性断片) は、細胞外ドメインのすべてまたは一部を含んでなるが、細胞膜におけるポリペプチドの保持を引き起こすであろう膜貫通ドメインを欠く。いくつかの態様において、可溶性ポリペプチドは、例えばシグナル配列または細胞質ドメインを含む、1以上のさらなるドメインに加えて、膜貫通ドメインを欠く。本発明にしたがった可溶性ポリペプチドは、産生される細胞から分泌される限り、細胞質ドメイン、またはその一部を含むことも可能である。

20

【0040】

一般的に、可溶性型の使用が、特定の適用に好適である。可溶性ポリペプチドは細胞から分泌されるため、組換え宿主細胞からのポリペプチドの精製が容易である。さらに、可溶性ポリペプチドは、一般的に、静脈内投与により適している。

【0041】

本発明はまた、炎症性反応、免疫系活性、体重獲得/損失、および/またはエネルギー代謝を変調する能力を保持するポリペプチドおよび細胞外ドメインの断片も提供する。こうした断片は、上述のように、可溶性ポリペプチドであることも可能である。

30

【0042】

やはり本明細書に提供するのは、配列番号2または19に示す配列の少なくとも25、または少なくとも30の隣接するアミノ酸を含んでなるポリペプチド断片である。細胞質ドメインに由来する断片は、シグナル伝達の研究に、そして阻害性シグナルなどの生物学的シグナルの伝達に関連する細胞過程を制御するのに、そしてシグナル伝達分子との受容体相互作用の小分子模倣物 (*mimics*) または阻害剤を同定するのに使用を見出す。抗体を生成する免疫原として、配列番号2または19の少なくとも約8~11、またはより好ましくは、10~30の隣接するアミノ酸を含んでなるポリペプチド断片と共に、より大きいポリペプチドが使用可能である。

【0043】

開示するポリペプチドおよび断片の天然存在変異体およびこれらから得られる変異体を本明細書に提供する。変異体は、開示するポリペプチドおよび断片に、少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を示すことが可能である。やはり提供するのは、本明細書に開示するアミノ酸配列に、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または少なくとも99.9%同一であるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドまたは断片である。パーセント同一性は、視覚的検査および数学的計算によって決定可能である。あるいは、2つのタンパク質配列のパーセント同一性は、NeedlemanおよびWunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970) に基づき、そしてウイスコンシン大学遺伝学コンピュータグループ (UWCGC) から入手可能な、GAPプログラムなどのコンピュータプログ

40

50

ラムを用いて、配列情報を比較することによって、決定可能である。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメータには：(1) HenikoffおよびHenikoff (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1992)に記載されるようなスコアリングマトリックス、blosum62；(2) 12のギャップ加重；(3) 4のギャップ加重長；および(4) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。同様の比較パラメータは、例えばBESTFIT、FASTA、TFASTA (例えばWisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.を参照されたい)、またはPILEUP (Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987)の進行性並列法の単純化)などの他のコンピュータプログラムを用いて実行可能である。

【0044】

本発明の変異体には、例えば、選択的mRNAスプライシング事象またはタンパク質分解的切断から生じるものが含まれる。mRNAの選択的スプライシングは、例えば、タンパク質の天然存在可溶性型などの一部切除されているが生物学的に活性であるタンパク質を生じる可能性がある。タンパク質分解に起因しうる変異には、例えば、タンパク質からの1以上の末端アミノ酸(一般的には1~5の末端アミノ酸)のタンパク質分解的除去による、異なる種類の宿主細胞における発現に際する、NまたはC末端の相違が含まれる。アミノ酸配列の相違が遺伝子多型(タンパク質を産生する個体間の対立遺伝子変動)に起因しうるタンパク質もまた、本明細書に意図される。

【0045】

本発明の範囲内のさらなる変異体には、グリコシル基、脂質、ホスフェート、アセチル基等などの他の化学部分と共有結合的コンジュゲートまたは凝集コンジュゲートを形成することによって、修飾されて誘導体を生成することが可能なポリペプチドが含まれる。共有結合的誘導体は、ポリペプチドのアミノ酸側鎖上の官能基、またはN末端もしくはC末端に、化学部分を連結することによって、調製可能である。以下により詳細に論じるように、附着している診断用(検出可能)剤または療法剤を含んでなるコンジュゲートが本明細書に意図される。

【0046】

他の誘導体には、N末端またはC末端融合体としての組換え培養中での合成によるなど、他のタンパク質またはポリペプチドと該ポリペプチドの共有結合コンジュゲートまたは凝集コンジュゲートが含まれる。融合ポリペプチドの例は、オリゴマーと関連して、以下に論じる。さらに、融合ポリペプチドは、精製および同定を容易にするため付加するペプチドを含んでなることが可能である。こうしたペプチドには、例えば、ポリ-Hisまたは米国特許第5,011,912号およびHoppら, Bio/Technology 6:1204, 1988に記載される抗原性同定ペプチドが含まれる。こうしたペプチドの1つがFLAG(登録商標)ペプチド、Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys(配列番号3)であり、該ペプチドは抗原性が高く、そして特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現した組換えポリペプチドの迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。4E11と称されるネズミハイブリドーマは、本明細書に援用される米国特許第5,011,912号に記載されるように、特定の二価金属陽イオンの存在下でFLAG(登録商標)ペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する。4E11ハイブリドーマ細胞株は、寄託番号HB9259としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されている。FLAG(登録商標)ペプチドに結合するモノクローナル抗体は、Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division、コネティカット州ニューヘブーンより入手可能である。

【0047】

本明細書に提供する変異ポリペプチドの中に、配列番号2または19の成熟HAMポリペ

プチドの天然結合特性または生物学的活性を保持する、天然HAMポリペプチドの変異体またはその実質的な同等物がある。例えば、変異体には、天然型と本質的に同じ結合親和性で結合パートナーに結合する分子が含まれる。結合親和性は、例えば米国特許第5,512,457号に記載されるように、そして以下に示すように、慣用的な方法によって測定可能である。

【0048】

変異体には、天然型に実質的に相同であるが、1以上の欠失、挿入または置換のため、天然型と異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。特定の態様には、限定されるわけではないが、天然配列と比較した際、アミノ酸残基の1~10の欠失、挿入または置換を含んでなるポリペプチドが含まれる。

10

【0049】

既定のアミノ酸を、例えば類似の物理化学的特性を有する残基によって置換することが可能である。こうした保存的置換の例には、Ile、Val、Leu、またはAlaを互いに置換するなどの、1つの脂肪族残基の別のものでの置換；LysおよびArg、GluおよびAsp、またはGlnおよびAsn間といった、1つの極性残基の別のものでの置換；あるいはPhe、Trp、またはTyrを互いに置換するなどの、1つの芳香族残基の別のものでの置換が含まれる。他の保存的置換、例えば、同様の疎水性特性を有する領域全体の置換を伴うものが公知である。やはり含まれるのは、D-アミノ酸に対するL-アミノ酸の置換である。D-アミノ酸の存在は、プロテアーゼに対する抵抗性を提供し、そしてポリペプチドまたはその断片の安定性を増加させる。本発明のHAMポリペプチドに対するアミノ酸置換および他の改変（欠失、挿入等）は、これらが、図2A~Cに示す「コンセンサス」に示される保存残基への変化を生じる場合、HAMポリペプチド活性を改変するかまたは破壊する可能性がより高いと予測される。逆に、その保存される位のHAMポリペプチド残基に対して、1以上の図2のコンセンサス配列残基の置換が生じる変化をHAMポリペプチドに行う場合、こうした改変がHAMポリペプチド機能に影響を及ぼす可能性はより低い。1つの側面において、本発明は、1~10のアミノ酸置換、挿入、および/または欠失を有するHAMポリペプチドを提供する。

20

【0050】

同様に、本発明のポリヌクレオチドには、1以上の欠失、挿入または置換のため、天然HAMポリヌクレオチドと異なるが、生物学的に活性であるポリペプチドをコードする変異体が含まれる。

30

【0051】

さらに、「保存的に修飾された変異体」は、ポリペプチドおよびポリヌクレオチド両方にあてはまる。特定のポリヌクレオチドに関して、保存的に修飾された変異体は、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド中のコドンを目指す。遺伝暗号の縮重のため、多数の機能的に同一のポリヌクレオチドが、既定のタンパク質いずれかをコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、コドンによってアラニンが指定されるすべての位で、コードされるポリペプチドを改変することなく、記載した対応するコドンのいずれかに、コドンを改変することが可能である。こうした変異は「サイレント変異」であり、これは、保存的に修飾される変異の1つの種類である。ポリペプチドをコードする本明細書のすべてのポリヌクレオチド配列はまた、核酸のすべてのありうるサイレント変異も記載する。当業者は、ポリヌクレオチド中の各コドン（通常、メチオニンの唯一のコドンであるAUGを除く）を修飾して、機能的に同一の分子を生じることが可能であることを認識するであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異が、記載する配列各々に潜在する。

40

【0052】

本発明には、結合する天然パターングリコシル化を含むまたは含まない本発明のポリペプチドがさらに含まれる。酵母または哺乳動物発現系（例えばCOS-1またはCOS-7細胞）で発現したポリペプチドは、発現系の選択に応じて、分子量およびグリコシル化パ

50

ターンにおいて、天然ポリペプチドと同様である可能性も、または有意に異なる可能性もある。大腸菌 (*E. coli*) などの細菌発現系での本発明のポリペプチドいずれかの発現は、ポリペプチドの非グリコシル化型を提供する。さらに、既定の調製は、多数の異なってグリコシル化されたタンパク質種を含む可能性がある。グリコシル基は、慣用法、特にグリコペプチダーゼを利用するものを通じて、除去可能である。一般的に、本発明のグリコシル化ポリペプチドは、モル過剰のグリコペプチダーゼ (*Boehringer Mannheim*) とインキュベーションすることによって、その炭水化物部分を除去可能である。

【0053】

真核ポリペプチドにおけるNグリコシル化部位は、アミノ酸トリプレット $Asn - X - Y$ によって特徴付けられ、ここでXはProを除くアミノ酸いずれかであり、そしてYはSerまたはThrである。本発明のHAMポリペプチドは、いくつかの推定上のグリコシル化部位を有する。例えば、1以上の以下の位のAsn残基が潜在的なグリコシル化部位である：配列番号2の76N、174N、198N、214N、272N、326N、380N、542N、590N、697N、704N、763N、778N、817N、831N、842N、898N、942N、1033N、1149N、1157N、1201N、および1210N。ネズミHAMもまた、配列番号19の75N、173N、197N、213N、271N、323N、378N、539N、587N、694N、701N、760N、775N、814N、828N、839N、895N、939N、1030N、1146N、1154N、1198N、および1207Nに、推定上のグリコシル化部位を有する。ポリペプチド細胞外ドメインにおけるNグリコシル化部位を修飾し、グリコシル化を排除して、哺乳動物発現系および酵母発現系における炭水化物減少類似体 (*analog*) の発現を可能にする。したがって、これらの残基の修飾 (例えばグリコペプチダーゼでの処理) または置換または欠失は、本発明の成熟HAMポリペプチドの活性を変調することが可能である。

【0054】

これに対応して、アミノ酸残基または配列の多様な付加または置換、あるいは配列の末端または内部残基の欠失をコードする、類似のポリヌクレオチド構築物が、本発明に含まれる。これらのトリプレット (例えば $Asn - X - Y$) をコードするヌクレオチド配列に対する適切な置換、付加、または欠失は、Asn側鎖での炭水化物残基の付着の防止を生じるであろう。例えば、Asnが異なるアミノ酸によって交換されるように選択される、単一のヌクレオチドの改変は、Nグリコシル化部位を不活性化するのに十分である。あるいは、トリプレット中のSerまたはThrを、Alaなどの別のアミノ酸で交換することが可能である。タンパク質のNグリコシル化部位を不活性化するための既知の方法には、米国特許第5,071,972号およびEP 276,846に記載されるものが含まれる。当業者は、上述のようなHAMのAsn残基と共に、 $Asn - X - Y$ トリプレットのSerおよびThr残基に対応するコドンと同定可能である。

【0055】

変異体の別の例において、生物学的活性に必須でないCys残基をコードする配列を改変して、Cys残基が欠失されるかまたは他のアミノ酸で置換されるようにして、フォールディングまたは再生に際して、誤った分子内ジスルフィド架橋の形成を防止することが可能である。本発明のHAMポリペプチドの、いくつかの推定上の保存されるCys残基が、図2および図4に提供される並列に同定される。

【0056】

隣接する二塩基性アミノ酸残基の修飾によって他の変異体を調製して、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母系における発現を増進する。EP 212,914は、タンパク質におけるKEX2プロテアーゼプロセッシング部位を不活性化するための部位特異的突然変異誘発の使用を開示する。Arg-Arg、Arg-Lys、およびLys-Arg対を改変するように、残基を欠失させ、付加し、または置換することによってこれらの隣接する塩基性残基の発生を排除して、KEX2プロテアーゼプロセッシング部位を不活性化す

る。Lys - Lys 対合は、KEX2 切断に大幅により感受性でなく、そして Arg - Lys または Lys - Arg の Lys - Lys への変換は、KEX2 部位を不活性化する、保存的でそして好ましいアプローチに相当する。

【0057】

オリゴマー

本発明に含まれるのは、目的のポリペプチドに連結された HAM ポリペプチドまたはその生理活性断片を含んでなる、オリゴマーおよび融合ポリペプチドである。好ましい態様において、融合パートナーは、HAM ポリペプチドまたはその生理活性断片の C 末端に連結される。こうしたオリゴマーは、二量体、三量体、またはより高次のオリゴマーを含む、共有結合または非共有結合多量体型であることが可能である。上述のように、好ましいポリペプチドは可溶性であり、そしてしたがって、これらのオリゴマーは、典型的には、可溶性ポリペプチドを含んでなる。本発明の1つの側面において、オリゴマーはポリペプチド構成要素の結合能を維持し、そしてしたがって、二価、三価等の結合部位を提供する。

10

【0058】

本発明の1つの態様は、ポリペプチドに融合しているペプチド部分間の共有または非共有相互作用を介して連結している多数のポリペプチドを含んでなるオリゴマーに関する。こうしたペプチド部分は、ペプチドリンカー（スペーサー）であることも可能であるし、またはオリゴマー化を促進する特性を有するペプチドであることも可能である。ペプチドリンカーの例には、- - Gly - Gly - -、GGGGS（配列番号4）、(GGGGS)_n（配列番号5）、GKSSGSGSESKS（配列番号6）、GSTSGSGKSSSE 20
GKG（配列番号7）、GSTSGSGKSSSESGSGSTKG（配列番号8）、GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号9）、またはEGKSSGSGSESESEF（配列番号10）が含まれる。連結部分は、例えば Huston, J. S. ら, PNAS 85: 5879 - 5883 (1988)、Whitlow, M. ら, Protein Engineering 6: 989 - 995 (1993)、および Newton, D. L. ら, Biochemistry 35: 545 - 553 (1996) に記載される。他の適切なペプチドリンカーは、本明細書に援用される米国特許第4,751,180号および第4,935,233号に記載されるものである。望ましいペプチドリンカーをコードするポリヌクレオチドは、適切な慣用的技術いずれかを用いて、本発明のHAMポリペプチドまたは生理活性断片をコードするポリヌクレオチドの間に、そして 30
該ポリヌクレオチドと同じ読み枠で挿入可能である。特定の態様において、融合ポリペプチドは、ペプチドリンカーによって分離された、2~4のHAMポリペプチドの生理活性断片（例えば可溶性断片）を含んでなる。1つの態様において、本発明は、FcポリペプチドドメインおよびHAMポリペプチドまたはその生理活性断片（例えば配列番号2のほぼアミノ酸61~1230に示すような断片）を有する融合ポリペプチドを提供する。以下により詳細に記載するように、付着するポリペプチドのオリゴマー化を促進可能なペプチドの中に、ロイシンジッパーおよび抗体由来の特定のポリペプチドがある。

20

30

【0059】

1つの代替法として、免疫グロブリン由来のポリペプチドを用いて、オリゴマーまたは融合ポリペプチドを調製する。抗体由来ポリペプチドの多様な部分（Fcドメインを含む） 40
に融合された特定の異種ポリペプチドを含んでなる融合ポリペプチドの調製は、例えば、Ashkenazi ら (PNAS USA 88: 10535, 1991); Byrn ら (Nature 344: 677, 1990); 並びに Hollenbaugh および Aruffo (“免疫グロブリン融合タンパク質の構築”, Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, 10.19.1 - 10.19.11 ページ, 1992 中) に記載されている。

【0060】

本発明の1つの態様は、本発明のHAMポリペプチドまたは生理活性断片を抗体由来のFcポリペプチドに融合させることによって生成される2つの融合タンパク質を含んでなる二量体に関する。HAMポリペプチド/Fc融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を 50

50

適切な発現ベクターに挿入する。組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞でHAMポリペプチド/Fc融合タンパク質を発現させ、そして抗体分子によく似た形で集合させ、その結果、Fc部分間に鎖間ジスルフィド結合が形成されて、二価分子を生じるのを可能にする。

【0061】

Fcポリペプチドには、Fc領域のCHドメインのいずれかまたはすべてを含んでなる抗体のFc領域で構成される、ポリペプチドの天然型および突然変異タンパク質(mut e i n)型が含まれる。二量体化を促進するヒンジ領域を含有する、こうしたポリペプチドの一部切除型もまた含まれる。好ましいポリペプチドは、ヒトIgG1抗体由来のFcポリペプチドを含んでなる。Fcポリペプチドは、好ましくは、本発明のHAMポリペプチドまたは生理活性断片のCOOH末端に連結される。

10

【0062】

PCT出願WO 93/10151(本明細書に援用される)に記載される1つの適切なFcポリペプチドは、ヒトIgG1抗体のFc領域のN末端ヒンジ領域から天然C末端に渡る、一本鎖ポリペプチドである。別の有用なFcポリペプチドは、本明細書に援用される米国特許第5,457,035号およびBaumら(EMBO J. 13:3992-4001, 1994)に記載されるFc突然変異タンパク質である。この突然変異タンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸19がLeuからAlaに変化し、アミノ酸20がLeuからGluに変化し、そしてアミノ酸22がGlyからAlaに変化していることを除けば、WO 93/10151に示される天然Fc配列のものと同一である。該突然変異タンパク質は、Fc受容体に対し、減少した親和性を示す。

20

【0063】

Fc部分を含んでなる上述の融合タンパク質(およびそれから形成されるオリゴマー)は、プロテインAまたはプロテインGカラム上のアフィニティークロマトグラフィーによる容易な精製という利点を提供する。

【0064】

他の態様において、本発明のポリペプチドは、抗体重鎖または軽鎖の可変部に関して置換可能である。融合タンパク質が抗体の重鎖および軽鎖両方で作成されている場合、4つものHAM細胞外領域を持つオリゴマーを形成することが可能である。

【0065】

本発明のオリゴマーを調製するための別の方法は、ロイシンジッパーの使用を伴う。ロイシンジッパードメインは、該ドメインが見られるタンパク質のオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、元々、いくつかのDNA結合タンパク質で同定され(Landschulzら, Science 240:1759, 1988)、そして以来、多様な異なるタンパク質で見出されてきている。既知のロイシンジッパーの中には、二量体化または三量体化する、天然存在ペプチドおよびその誘導体がある。

30

【0066】

ジッパードメイン(本明細書において、オリゴマー化、またはオリゴマー形成ドメインとも呼ばれる)は、繰り返される7残基反復を含んでなり、しばしば4つまたは5つのロイシン残基が、他のアミノ酸中に点在する。ジッパードメインの例は、酵母転写因子GCN4に見られるものおよびラット肝臓に見られる熱安定性DNA結合タンパク質(C/EBP; Landschulzら, Science 243:1681, 1989)である。2つの核トランスフォーミングタンパク質、fosおよびjunもまたジッパードメインを示し、ネズミプロトオンコジーンc-mycの遺伝子産物も同様である(Landschulzら, Science, 240:1759, 1988)。核発癌遺伝子、fosおよびjunの産物は、ヘテロ二量体を優先して形成するジッパードメインを含んでなる(O'Sheaら, Science 245:646, 1989、TurnerおよびTijan, Science 243:1689, 1989)。

40

【0067】

パラミクソウイルス、コロナウイルス、麻疹ウイルスおよび多くのレトロウイルスを含む

50

、いくつかの異なるウイルスの融合体形成性 (fusogenic) タンパク質もまた、ジッパードメインを所有する (BucklandおよびWild, Nature 338:547, 1989; Britton, Nature 353:394, 1991; DelwartおよびMosialos, AIDS Research and Human Retroviruses 6:703, 1990)。これらの融合体形成性ウイルスタンパク質のジッパードメインは、該タンパク質の膜貫通領域の近くにあり;ジッパードメインが、該融合体形成性タンパク質のオリゴマー構造に寄与する可能性が示唆されてきている。融合体形成性ウイルスタンパク質のオリゴマー化は、融合孔 (fusion pore) 形成に関与している (Spruceら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:3523, 1991)。ジッパードメインはまた、熱ショック転写因子のオリゴマー化に役割を果たしているとも報告されてきている (Rabindranら, Science 259:230, 1993)。

10

【0068】

ジッパードメインは、短い、平行コイルドコイル (parallel coiled coil) として折りたたまれている (O'Sheaら, Science 254:539, 1991)。平行コイルドコイルの一般的構造は、Crickにより提唱されたような「ノブを穴へ (knobs-into-holes)」パッキング (Acta Crystallogr. 6:689) によって、特徴付けられている。ジッパードメインによって形成された二量体は、McLachlanおよびStewart (J. Mol. Biol. 98:293; 1975) の表記にしたがって、(a b c d e f g)_n と表される、7残基反復によって安定化され、ここでaおよびdは一般的に疎水性残基であり、dはロイシンであり、これらはらせんの同じ面に並ぶ。逆に荷電した残基は普通、gおよびe位に存在する。したがって、2つのらせん状ジッパードメインから形成される平行コイルドコイルにおいて、第一のらせんの疎水性側鎖によって形成された「ノブ」は、第二のらせんの側鎖間に形成された「穴」にパッキングされる。

20

【0069】

d位の残基 (しばしばロイシン) は、巨大な疎水性安定化エネルギーに寄与し、そしてオリゴマー形成に重要である (Krystekら, Int. J. Peptide Res. 38:229, 1991)。Lovejoyら (Science 259:1288, 1993) は、らせんが上-上-下に走る、三重鎖らせん束合成を報告した。彼らの研究によって、疎水性安定化エネルギーが、らせん単量体からのコイルドコイルの形成のための主要な原動力を提供していることが裏付けられた。これらの研究はまた、静電相互作用がコイルドコイルの化学量論および形状に寄与していることも示している。ロイシンジッパーの構造のさらなる議論は、Harburyら (Science 262:1401, 26 November 1993) に見られる。

30

【0070】

可溶性オリゴマータンパク質を産生するのに適したロイシンジッパードメインの例には、PCT出願第WO 94/10308号に記載されるロイシンジッパーおよび本明細書に援用されるHoppeら (FEBS Letters 344:191, 1994) に記載される肺界面活性物質プロテインD (SPD) 由来のロイシンジッパーが含まれる。修飾ロイシンジッパーに融合している異種タンパク質の安定した三量体化を可能にする、該修飾ロイシンジッパーの使用が、Fanslowら (Semin. Immunol. 6:267-278, 1994) に記載されている。ロイシンジッパーペプチドに融合された本発明の生理活性断片 (例えば可溶性断片) を含んでなる組換え融合タンパク質を適切な宿主細胞で発現し、そして形成される可溶性オリゴマーを培養上清から回収する。

40

【0071】

特定のロイシンジッパー部分は、三量体を形成する。1つの例は、本明細書に完全に援用されるHoppeらおよび米国特許第5,716,805号に記載されるような、肺界面活性物質プロテインD (SPD) 由来のロイシンジッパーである。この肺SPD由来ロイ

50

シンジッパーペプチドは、アミノ酸配列：Pro - Asp - Val - Ala - Ser - Leu - Arg - Gln - Gln - Val - Glu - Ala - Leu - Gln - Gly - Gln - Val - Gln - His - Leu - Gln - Ala - Ala - Phe - Ser - Gln - Tyr (配列番号11)を含んでなる。

【0072】

三量体化を促進するロイシンジッパーの別の例は、米国特許第5,716,805号に記載されるような、アミノ酸配列Arg - Met - Lys - Gln - Ile - Glu - Asp - Lys - Ile - Glu - Glu - Ile - Leu - Ser - Lys - Ile - Tyr - His - Ile - Glu - Asn - Glu - Ile - Ala - Arg - Ile - Lys - Lys - Leu - Ile - Gly - Glu - Arg (配列番号12)を含んでなるペプチドである。1つの別の態様において、N末端Asp残基が付加され；別の態様では、該ペプチドはN末端Arg残基を欠いている。

10

【0073】

オリゴマー化を促進する特性を保持する、前述のジッパーペプチドの断片もまた、使用可能である。こうした断片の例には、限定されるわけではないが、前述のアミノ酸配列に示される1つまたは2つのN末端またはC末端残基を欠くペプチドが含まれる。ロイシンジッパーは、天然存在ロイシンジッパーペプチドから、例えばオリゴマー化を促進するペプチドの能力が保持されるような、天然アミノ酸配列の保存的置換(類)を介して、得ることが可能である。特定の態様において、ロイシンジッパー部分のロイシン残基を、イソロイシン残基によって置換する。イソロイシンを含んでなるこうしたペプチドは、イソロイシンジッパーと呼ぶことも可能であるが、本明細書において使用するような用語「ロイシンジッパー」に含まれる。

20

【0074】

抗体

上述した、ポリペプチド、断片(例えば可溶性または生理活性断片)、変異体、融合タンパク質等は、これらと免疫反応性である抗体を産生する際の「免疫原」として使用可能である。より具体的には、ポリペプチド、断片、変異体、融合タンパク質等は、抗体形成を引き出す抗原決定基またはエピトープを含有する。適切な抗原決定基またはエピトープは、直鎖でもコンホメーション性(conformational)(断続的)でもどちらでもよい。直鎖エピトープは、互いに共有結合によって連結される一連の直鎖アミノ酸で構成されるが、コンホメーション性または断続的エピトープは、タンパク質フォールディングに際してごく近接するポリペプチド鎖の異なる領域由来のアミノ酸部分で構成される(C. A. Janeway, Jr. および P. Travers, *Immunology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 第2版, 1996))。フォールディングされたタンパク質は、複雑な表面を有するため、利用可能なエピトープの数は非常に多い；しかしながら、タンパク質のコンホメーションおよび立体障害のため、実際にエピトープに結合する抗体の数は、利用可能なエピトープの数より少ない(C. A. Janeway, Jr. および P. Travers, *Immunology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 第2版, 1996))。エピトープは、当該技術分野に知られるいかなる方法によって同定することも可能である。

30

40

【0075】

開示するポリペプチドに由来するエピトープは、モノクローナル抗体を含む抗体を作成するのに有用であり、そしてアッセイにおいて、そしてポリクローナル血清または培養ハイブリドーマ由来の上清などの材料から特異的に結合する抗体を精製する研究試薬として使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、ポリペプチドの化学的または酵素的切断などの、当該技術分野に周知の技術を用いて、あるいは組換えDNA技術を用いて、産生可能である。

【0076】

開示するポリペプチドによって引き出されるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗

50

体は、エピトープが単離されていてもまたはポリペプチドの一部のままであっても、慣用的技術によって調製可能である。例えば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennetら(監修), Plenum Press, ニューヨーク(1980); およびAntibodies: A Laboratory Manual, HarlowおよびLand(監修), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1988)を参照されたい。

【0077】

本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書に意図され、そしてこうした細胞株は、慣用的技術によって産生しそして同定することが可能である。こうしたハイブリドーマ細胞株を産生するための1つの方法は、動物をポリペプチドで免疫し;免疫された動物から脾臓細胞を採取し;前記脾臓細胞を骨髄腫細胞株に融合させ、それによってハイブリドーマ細胞を生成し;そして該ポリ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細胞株を同定することを含んでなる。モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。

【0078】

本発明のモノクローナル抗体には、キメラ抗体、例えば、ネズミモノクローナル抗体のヒト化型が含まれる。こうしたヒト化抗体を既知の技術によって調製し、そして療法目的などで、抗体がヒトに投与されるとき、免疫原性の減少という利点を提供することが可能である。1つの態様において、ヒト化モノクローナル抗体は、ネズミ抗体の可変部(またはその抗原結合部位のみ)およびヒト抗体由来の定常部を含んでなる。あるいは、ヒト化抗体断片は、ネズミモノクローナル抗体の抗原結合部位およびヒト抗体由来の可変部断片(抗原結合部位を欠く)を含んでなることが可能である。キメラおよび工学技術で作成されるさらなるモノクローナル抗体の産生法には、Riechmannら(Nature 332:323, 1988)、Liuら(PNAS 84:3439, 1987)、Larrickら(Bio/Technology 7:934, 1989)、およびWinterおよびHarris(TIPS 14:139, May 1993)に記載されるものが含まれる。トランスジェニック的に抗体を生成する方法は、GB 2,272,440、米国特許第5,569,825号および第5,545,806号、並びにそれらから優先権を請求する関連特許に見出すことが可能であり、該特許はすべて本明細書に援用される。トランスジェニック的に抗体を生成する方法は、GB 2,272,440、米国特許第5,569,825号および第5,545,806号、並びにそれらから優先権を請求する関連特許に見出すことが可能であり、該特許はすべて本明細書に援用される。好ましくは、ヒトで使用するため、抗体はヒトであり;こうしたヒト抗体を生成する技術もまた知られ、そしてこうした抗体を生成するのに有用なトランスジェニックマウスが、例えばMedarex Inc(ニュージャージー州プリンストン)およびAbgenix Inc.(カリフォルニア州フレモント)から商業的に入手可能である。

【0079】

慣用的技術によって産生可能な、抗体の抗原結合断片もまた、本発明に含まれる。こうした断片の例には、限定されるわけではないが、scFv、FabおよびF(ab')₂断片が含まれる。遺伝子工学技術によって産生される抗体断片および誘導体もまた提供される。

【0080】

本発明の抗体は、in vitroまたはin vivoいずれかで、本発明のポリペプチドまたは断片の存在を検出するアッセイにおいて使用可能である。抗体はまた、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって本発明のポリペプチドまたは断片を精製するのにも使用可能である。

【0081】

本発明のポリペプチドの結合パートナーへの結合を遮断する抗体を用いて、こうした結合

10

20

30

40

50

から生じる生物学的活性を阻害することが可能である。こうした遮断抗体は、HAMポリペプチドまたは生理活性断片の結合パートナーを発現している特定の細胞へのHAMポリペプチドまたは生理活性断片の結合を阻害する能力に関して、抗体を試験することによるなど、いかなる適切なアッセイ法を用いて、同定することも可能である。あるいは、遮断抗体は、標的細胞への本発明のポリペプチドの結合から生じる生物学的影響を阻害する能力に関するアッセイにおいて同定可能である。抗体は、例えば、HAMポリペプチドが仲介する細胞活性を阻害する能力に関してアッセイすることが可能である。

【0082】

こうした抗体を、*in vitro*法で使用するか、または*in vivo*で投与して、抗体が結合するポリペプチドによって仲介される生物学的活性を阻害することが可能である。このように、本発明のポリペプチドと細胞表面（結合パートナー）受容体との相互作用によって、（直接または間接的に）引き起こされるかまたは悪化される障害を治療可能である。療法は、HAMポリペプチドが仲介する生物学的活性を阻害するのに有効な量の遮断抗体を、哺乳動物に*in vivo*投与することを伴う。一般的に、こうした療法の使用には、モノクローナル抗体が好ましい。1つの態様において、抗原結合抗体断片を使用する。さらに、診断標識の療法剤を、本発明の抗体とコンジュゲート化して、それによって、HAMポリペプチドを発現している細胞に、療法剤または診断用剤をターゲティングすることが可能である。

10

【0083】

抗体は、アゴニスト性（すなわちHAM模倣性）特性に関してスクリーニング可能である。アゴニスト性抗体には、HAMに結合し、そしてHAMを活性化する（例えばHAM分子を架橋することによって）抗体が含まれる。こうした抗体は、細胞表面上のHAM同族体への結合に際して、HAMポリペプチドが細胞表面リガンドに結合する際に誘導される生物学的影響と同様の生物学的影響（例えば生物学的シグナルの伝達）を誘導する。

20

【0084】

HAMポリペプチドまたはその断片に対して向けられる抗体、および生理学的に許容しうる希釈剤、賦形剤、またはキャリアーを含んでなる組成物が、本明細書に提供される。こうした組成物の適切な構成要素は、本明細書に記載されるとおりであり、そしてHAMポリペプチドまたはその断片を含有する組成物に関して記載されるものと同様である。やはり本明細書に提供するのは、抗体に付着している検出可能な剤（例えば診断用剤）または療法剤を含んでなるコンジュゲートである。該コンジュゲートは、*in vitro*または*in vivo*法に使用を見出す。

30

【0085】

ポリヌクレオチド

本発明はまた、HAMポリペプチドおよびその生理活性断片をコードするポリヌクレオチドも提供する。用語「ポリヌクレオチド」は、長さ少なくとも10塩基のヌクレオチドのポリマー型を指す。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはいずれかの種類のヌクレオチドの修飾型であることが可能である。該用語には、DNAまたはRNAの一本鎖および二本鎖型が含まれる。DNAには、例えば、cDNA、ゲノムDNA（例えばイントロンおよびエクソンを含有する配列）、化学的に合成したDNA、PCRによって増幅したDNA、およびそれらの組み合わせが含まれる。本発明のポリヌクレオチドには、全長遺伝子およびcDNA分子と共に、その断片の組み合わせが含まれる。本発明のポリヌクレオチドは、優先的に、ヒト供給源に由来するが、本発明は、非ヒト種に由来するものもまた、含む。

40

【0086】

「単離ポリヌクレオチド」によって、由来する生物の天然存在ゲノムにおいて、すぐ隣接している（5'端にあるものおよび3'端にあるもの）コード配列のどちらとも、すぐには隣接していないポリヌクレオチドを意味する。該用語にはしたがって、例えば、ベクター、例えば発現ベクターに；自律複製プラスミドもしくはウイルスに；または原核もしくは真核生物のゲノムDNAに取り込まれた、あるいは他の配列と独立の別個の分子（例え

50

ば cDNA) として存在する、組換えポリヌクレオチド分子が含まれる。

【0087】

本発明のポリヌクレオチドは、(1) 配列番号1または18に示す配列；(2) 配列番号1または18に示す配列に相補的な配列；(3) 中程度の条件下から非常にストリンジェントな条件下で、(1)または(2)のポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズし、長さ約50~100の連続する塩基、長さ200~300の連続する塩基、または長さ500~1000またはそれ以上の連続する塩基である、配列番号1または18の断片、あるいはその相補体；および(4) TがまたUであることも可能である(例えばRNA配列)、(1)、(2)、または(3)の配列を含んでなる。本発明にやはり含まれるのは、本発明のポリヌクレオチドの相同体である。これらの相同体は、適切な供給源からのゲノムまたはcDNA分子の単離、あるいは入手可能な配列データベースのコンピュータ検索を含む、いくつかの方法で、同定可能である。本明細書に記載するアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド相同体単離のためのプローブまたはプライマーとして、あるいはデータベース検索のためのクエリー配列として、使用可能である。縮重オリゴヌクレオチド配列は、アミノ酸配列(例えば配列番号2または19の配列)から「逆翻訳(back-translation)」することによって、得ることが可能である。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を使用して、HAMポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離し、そして増幅することが可能である。本発明のポリヌクレオチドの断片は、本発明のHAMポリヌクレオチドの関連配列を同定するかもしくは増幅する、または本発明のHAMポリヌクレオチドの全長配列を得る、プローブおよびプライマーとして有用である。オリゴヌクレオチドは、発現ベクターに、DNA断片の増幅された組み合わせを挿入するのを容易にするため、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を、さらに含有することが可能である。PCR技術は、Saikiら、Science 239:487(1988)；Recombinant DNA Methodology, Wuら監修、Academic Press, Inc., サンディエゴ(1989), pp.189-196；およびPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innisら監修、Academic Press, Inc.(1990)に記載される。

【0088】

本発明にはまた、減少したストリンジェンシー条件下、より好ましくは中程度にストリンジェントな条件下、そして最も好ましくは、非常にストリンジェントな条件下で、本明細書に記載するHAMポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドも含まれる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメーターおよび適切な条件を考案するための手引きは、Sambrook, J., E.F. FritschおよびT. Maniatis(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 第9章および第11章；およびCurrent Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubelら監修, John Wiley & Sons, Inc., セクション2.10および6.3-6.4、本明細書に援用される)によって示されており、そして例えば核酸の長さおよび/または塩基組成に基づいて、一般の当業者によって容易に決定可能である。中程度にストリンジェントな条件を達成する1つの方法は、5xSSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA(pH8.0)を含有する前洗浄溶液、約50%ホルムアミド、6xSSCのハイブリダイゼーション緩衝液、および約55のハイブリダイゼーション温度(または約42のハイブリダイゼーション温度を伴う、約50%ホルムアミドを含有するものなどの他の同様のハイブリダイゼーション溶液)、並びに約60、0.5xSSC、0.1% SDS中の洗浄条件の使用を伴う。一般的に、非常にストリンジェントな条件は、上記のようなハイブリダイゼーション条件と定義されるが、およそ68、0.2xSSC、0.1% SDSでの洗浄を伴うと定

義される。ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液において、SSPE (1 x SSPEは、0.15 M NaCl、10 mM NaH₂PO₄、および1.25 mM EDTA, pH 7.4である)をSSC (1 x SSCは、0.15 M NaClおよび15 mMクエン酸ナトリウムである)に対して置換することが可能である；洗浄は、ハイブリダイゼーションが完了した後、15分間行う。当業者に知られるように、そして以下にさらに記載するように、ハイブリダイゼーション反応および二重鎖安定性を支配する基本原理を適用することによって、必要に応じて、望ましい度合いのストリンジェンシーを達成するよう、洗浄温度および洗浄塩濃度を調整可能であることを理解すべきである（例えば Sambrookら、1989を参照されたい）。核酸を未知の配列の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズさせる際、ハイブリッド長は、ハイブリダイズする核酸のものと仮定される。既知の配列の核酸をハイブリダイズさせる際、ハイブリッド長は、核酸の配列を並列し、そして最適配列相補性を持つ、単数または複数の領域を同定することによって、決定可能である。長さ50塩基対未満であると予測されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度（ T_m ）より5から10低くしなければならず、 T_m は、以下の等式にしたがって決定する。長さ18塩基対未満のハイブリッドに関しては、 $T_m(\text{ }) = 2(A + T \text{塩基数}) + 4(G + C \text{塩基数})$ である。長さ18塩基対を超えるハイブリッドに関しては、 $T_m(\text{ }) = 81.5 + 16.6(\log_{10} [Na^+]) + 0.41(\%G + C) - (600/N)$ であり、式中、Nはハイブリッド中の塩基数であり、そして $[Na^+]$ はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオン濃度である（1 x SSCの $[Na^+] = 0.165 M$ ）。好ましくは、こうしたハイブリダイズする核酸は各々、ハイブリダイズする本発明の核酸の長さの少なくとも25%（より好ましくは少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、そして最も好ましくは少なくとも80%）の長さを有し、そしてハイブリダイズする本発明のポリヌクレオチドと、少なくとも60%（より好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、または少なくとも99%、そして最も好ましくは少なくとも99.5%）の配列同一性を有する。

10

20

【0089】

本発明の他の態様には、配列番号2または19に示す配列を有するHAMポリペプチドの別個のドメインをコードする配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。コンピュータ解析は、HAMポリペプチドのシグナルペプチドが配列番号2の残基60の後で、そして配列番号19の残基59の後で切断される可能性が最も高いと予測するが、他のありうる切断部位には、アミノ酸54、55、59、172、または173の後が含まれる。これらの切断部位は、成熟HAMポリペプチドが、配列番号2のほぼアミノ酸55～1379、ほぼ56～1379、ほぼ60～1379、ほぼ61～1379、またはほぼ174～1379、および配列番号19のほぼ55～1376、ほぼ56～1376、ほぼ60～1376、ほぼ61～1376、またはほぼ173～1376を含んでなることを予測する。例えば配列番号2のほぼアミノ酸63～90、211～243、および261～280に位置するEGF様ドメインは、細胞外シグナル伝達または細胞ガイダンスに関与する可能性がある。CUBドメイン、KELCHモチーフ、C型レクチンまたは炭水化物認識ドメイン、共通のガンマサイトカイン鎖の推定上のリガンド結合モチーフ、およびラミニンEGF様ドメインは、それぞれ、配列番号2のほぼアミノ酸93～208、581～612、749～873、670～686、および1014～1055に位置する（図3を参照されたい）。膜貫通領域は、配列番号2のほぼアミノ酸1231～1251に、そして細胞質ドメインは、ほぼアミノ酸1252～1379に存在する。したがって、本発明は、これらの別々のポリペプチド断片と共に、各ドメインを別個に、または多様な組み合わせで含んでなるポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明は、配列番号2のほぼアミノ酸1～54、1～55、1～59、1～60、または1～173にあるシグナルペプチドをコードする、配列番号1のほぼヌクレオチド1～162、ほぼ1～165、ほぼ1～177、ほぼ1～180、またはほぼ1～522；配列番号2のそ

30

40

50

れぞれアミノ酸 55 ~ 1379、56 ~ 1379、60 ~ 1379、61 ~ 1379、または 174 ~ 1379 を含んでなる成熟 HAM ポリペプチドをコードする、配列番号 1 のほぼヌクレオチド 163 ~ 4137、ほぼ 166 ~ 4137、ほぼ 178 ~ 4137、ほぼ 181 ~ 4137、またはほぼ 523 ~ 4137；配列番号 2 のアミノ酸 1231 ~ 1251 を含んでなる膜貫通領域をコードする、配列番号 1 のヌクレオチド 3691 ~ 3753；配列番号 2 のそれぞれアミノ酸 55 ~ 1230、56 ~ 1230、60 ~ 1230、61 ~ 1230、または 174 ~ 1230 を含んでなる HAM ポリペプチドの細胞外ドメインをコードする、配列番号 1 のヌクレオチド 163 ~ 3690、166 ~ 3690、178 ~ 3690、181 ~ 3690、または 523 ~ 3690；および配列番号 2 のアミノ酸 1252 ~ 1379 を含んでなる細胞質ドメインをコードする、配列番号 1 のヌクレオチド 3754 ~ 4137 を提供する。

10

【0090】

さらに、本発明は、配列番号 19 のほぼアミノ酸 1 ~ 59 にあるシグナルペプチドをコードする、配列番号 18 のほぼヌクレオチド 1 ~ 177；配列番号 19 のほぼアミノ酸 60 ~ 1376 を含んでなる、成熟ネズミ HAM ポリペプチドをコードする、配列番号 18 のほぼヌクレオチド 178 ~ 4128；および配列番号 19 のアミノ酸 60 ~ 1227 を含んでなる、ネズミ HAM ポリペプチドの細胞外ドメインをコードする、配列番号 18 のほぼヌクレオチド 178 ~ 3681 を提供する。

【0091】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドに相当する遺伝子の不全または不十分な量によって（直接または間接的に）仲介されるいかなる障害に対する治療を開発するのに使用可能である。本発明のポリヌクレオチドに対応する配列の本明細書の開示によって、不全遺伝子の検出、および正常遺伝子でのその置換が可能になる。不全遺伝子は、*in vitro* 診断アッセイにおいて、そして本明細書に開示されるポリヌクレオチド配列と、該遺伝子に不全を宿すると疑われる被験者由来の遺伝子のものとを比較することによって、検出可能である。

20

【0092】

本発明のポリペプチドおよび断片の発現、単離および精製は、当該技術分野に知られるものと共に本明細書に記載するものなどの発現系の利用を含む、適切な技術いずれによって達成することも可能である。1つの態様において、本発明は、本発明の HAM ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを提供する。当該技術分野に知られる組換え技術によって、例えば商業的に入手可能な発現ベクターに、本発明のポリヌクレオチド（例えば配列番号 1 または 18 に示す配列を含んでなるポリヌクレオチド）を、機能可能であるように挿入することが可能である。典型的には、ポリヌクレオチドは、調節配列または制御配列の下流（または 3'）に、該配列に機能可能であるように連結されて挿入されるであろう。本明細書において、「調節配列」または「制御配列」は、交換可能に用いられ、プロモーター、エンハンサー - プロモーターの組み合わせ、あるいは下流ポリヌクレオチド配列の発現または転写に影響を及ぼす他の配列が含まれる。プロモーターは、転写が始まる点の前の（上流の）、典型的には 100 ヌクレオチド対以内の DNA 分子の領域で構成される、転写制御要素である。別の転写制御要素はエンハンサーであり、これは、時間、位置、および発現レベルに関して、特異性を提供する。プロモーターと異なり、エンハンサーは、プロモーターが存在していれば、転写部位から多様な距離に位置しても、機能することが可能である。エンハンサーはまた、転写開始部位の下流に位置することも可能である。他の制御配列には、転写終結配列、内部リボソーム進入部位（IRES）等が含まれる。

30

40

【0093】

典型的には、コード配列をプロモーターの調節下に置くには、プロモーターの 1 ~ 約 50 ヌクレオチド下流（3'）に、ペプチドまたはポリペプチドの翻訳読み枠の翻訳開始部位を配置する必要がある。こうした制御要素には、限定されるわけではないが、いくつかのみを挙げると、サイトメガロウイルス hCMV 極初期遺伝子、SV40 アデノウイルスの

50

初期または後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージAの主要オペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の調節領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター、酸ホスファターゼのプロモーター、および酵母-接合因子のプロモーターが含まれる。

【0094】

発現ベクターおよびその構築法は、当業者に知られる(Ausubelら、本明細書に引用)。適切なベクターには、プラスミド、並びに、とりわけヘルペスウイルス、レトロウイルス、カナリア(canary)ポックスウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスなどのウイルスベクター、並びにその誘導体が含まれる。

【0095】

ポリヌクレオチドおよび制御配列は、例えば発現ベクター内で、ポリヌクレオチドのコード配列(例えばHAMコード配列)が制御配列に結合されている際、発現を可能にするような方式で連結されている場合、「機能可能であるように連結」されている。一般的に、望ましい宿主細胞において複製する能力を与える複製起点、および形質転換体を同定する選択遺伝子(例えばkan^r、amp^r)が発現ベクターに取り込まれる。

【0096】

本発明のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを用いて、ポリヌクレオチドにコードされる本発明のポリペプチドまたは断片を調製することが可能である。ポリペプチド産生法は、ポリペプチドをコードする組換え発現ベクターで形質転換またはトランスフェクションされた宿主細胞を、ポリペプチドの発現を促進する条件下で培養し、その後、細胞から、または宿主細胞を増殖させた培地から、発現されたポリペプチドを回収することを含んでなる。発現されたポリペプチドを精製する方法は、使用する宿主細胞種、およびポリペプチドが膜結合であるか、またはポリペプチドの分泌された可溶性型であるかにしたがって、多様であろう。

【0097】

さらに、適切なシグナルペプチド(天然または異種)をコードする配列を発現ベクターに取り込むことが可能である。ポリヌクレオチドがまず転写され、そしてmRNAが翻訳され、シグナルペプチドを含んでなる融合タンパク質になるように、シグナルペプチドのDNA配列を、本発明のポリヌクレオチド配列に、インフレームで融合させることが可能である。膜貫通タンパク質を細胞表面に導くシグナルペプチドが使用可能であるし、またはタンパク質の可溶性型の分泌を促進する、異なるシグナルペプチドが使用可能である。一般的に、シグナルペプチドは、タンパク質の成熟中に切断される。シグナルペプチドが、生じる融合ポリヌクレオチド/ポリペプチドのアミノ末端に位置するように、HAMポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'末端に、局在化配列、またはシグナル配列をコードするポリヌクレオチドを連結するかまたは融合することが可能である。真核生物において、シグナルペプチドは、小胞体を横断して、融合ポリペプチドを輸送するよう機能する。その後、分泌タンパク質は、ゴルジ体を通して、分泌小胞に、そして細胞外空間または好ましくは外部環境に輸送される。本発明にしたがって利用可能なシグナルペプチドには、タンパク質分解酵素認識部位を含有するプレプロペプチドが含まれる。

【0098】

局在化配列は、核局在化配列、小胞体局在化配列、ペルオキシソーム局在化配列、ミトコンドリア局在化配列、または局在化タンパク質であることが可能である。局在化配列は、例えば、Stryer, L., Biochemistry(第4版), W.H. Freeman, 1995の“Protein Targeting”, 第35章に記載されるターゲティング配列であることが可能である。いくつかの重要な局在化配列には、核(例えばKKKRK(配列番号13))、ミトコンドリア(MLRTSSLFTRRVQPSLFRNILRLQST(配列番号14))、小胞体(KDEL(配列番号15))、ペルオキシソーム(SKF)、プレニル化または形質膜への挿入(CAAX(配列番号16))、CC、XCX、またはCCXX(配列番号17))、形質膜の細胞質側(SNAP-25への融合)、またはゴルジ体(フューリンへの融合)をターゲティングす

10

20

30

40

50

るものが含まれる。哺乳動物宿主細胞で機能する、異種シグナルペプチドの他の例には、米国特許第4,965,195号に記載されるインターロイキン-7(IL-7)のシグナル配列; Cosmanら, Nature 312:768(1984)に記載されるインターロイキン-2受容体のシグナル配列; EP 367,566に記載されるインターロイキン-4受容体シグナルペプチド; 米国特許第4,968,607号に記載されるI型インターロイキン-1受容体シグナルペプチド; およびEP 460,846に記載されるII型インターロイキン-1受容体シグナルペプチドが含まれる。

【0099】

当業者は、シグナルペプチドが切断される位(類)が、コンピュータプログラムに予測されるものと異なる可能性があり、そして組換えポリペプチドを発現するのに使用した宿主細胞の種類などの要因に応じるであろうことも認識するであろう。タンパク質調製物は、1より多い部位でのシグナルペプチドの切断から生じる、異なるN末端アミノ酸を有するタンパク質分子の混合物を含んでもよい。天然シグナル配列を有する、本明細書に提供する成熟HAMポリペプチドの特定の態様には、限定されるわけではないが、N末端アミノ酸が、配列番号2の55~61の間のいずれかのアミノ酸であるポリペプチドが含まれる。

10

【0100】

ポリペプチドの発現に適した宿主細胞には、原核(例えば大腸菌)、酵母、植物細胞、および昆虫またはより高次の真核細胞が含まれる。最も典型的には、酵母または哺乳動物細胞を用いる。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主での使用に適したクローニング用および発現ベクターは、例えば、Pouwelsら, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, エルゼビア、ニューヨーク州(1985)に記載されている。無細胞翻訳系もまた、本明細書に開示されるDNA構築物由来のRNAを用いて、ポリペプチドを産生するのに使用可能である。

20

【0101】

形質転換に適した原核宿主細胞は、グラム陰性またはグラム陽性生物であることが可能であり、そして、例えば、大腸菌、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、並びにシュードモナス属(*Pseudomonas*)、ストレプトミセス属(*Streptomyces*)、およびブドウ球菌属(*Staphylococcus*)内の多様な他の種が含まれる。大腸菌などの原核宿主細胞において、組換えポリペプチドの該原核宿主細胞における発現を容易にするため、ポリペプチドはN末端メチオニン(met)残基を含むことも可能である。N末端Metは、発現された組換えポリペプチドから切断可能である。

30

【0102】

原核宿主細胞に用いるための発現ベクターは、一般的に、1以上の表現型選択可能マーカー遺伝子を含んでなり、該マーカー遺伝子は、例えば、抗生物質耐性を与えるか、または独立栄養必要条件を供給するタンパク質をコードする遺伝子であることが可能である。有用な原核発現ベクターには、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を含む、クローニングベクターpBR322(ATCC 37017)など、商業的に入手可能なプラスミド由来のものが含まれる。他の適切なベクターには、pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals、スウェーデン・ウプサラ)およびpGEM1(Promega Biotech、米国ウィスコンシン州マディソン)が含まれる。適切なプロモーターおよび望ましいポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、ベクターに挿入することが可能である。

40

【0103】

組換え原核宿主細胞発現ベクターに通常用いられるプロモーター配列には、-ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)、ラクトースプロモーター系(Changら, Nature 275:615, 1978; およびGoeddelら, Nature 281:544, 1979)、トリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddelら, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980)およびtacプロモータ

50

ー (Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第1版, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982) が含まれる。特に有用な原核宿主細胞発現系は、ファージ PLプロモーターおよび cI857ts 熱不安定性リプレッサー配列を使用する。アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手可能な、PLプロモーターの誘導体を組み込んだプラスミドベクターには、プラスミド pHUB2 (大腸菌株 JMB9、ATCC 37092 に常住) および pPLc28 (大腸菌 RR1、ATCC 53082 に常住) が含まれる。

【0104】

あるいは、ポリペプチドは、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属 (例えば、*S. cerevisiae*) 由来などの酵母宿主細胞において発現可能である。あるいは、ピキア属 (*Pichia*)、クロイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、または酵母の他の属も使用可能である。酵母ベクターは、しばしば、2 ミュー酵母プラスミド由来の複製起点配列、自律複製配列 (ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化のための配列、転写終結のための配列、および選択可能マーカー遺伝子を含むであろう。適切なプロモーター配列には、酵母メタロチオネインまたは 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子 (Hitzemanら, *J. Biol. Chem.* 255:2073, 1980) または、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼなどの解糖酵素をコードする他の遺伝子 (Hessら, *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968; および Hollandら, *Biochem.* 17:4900, 1978) 由来のものが含まれる。酵母発現に用いるのに適した他のベクターおよびプロモーターが当該技術分野に知られる (例えば、Hitzeman, EPA-73,657; Russellら, *J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982; および Beierら, *Nature* 300:724, 1982 を参照されたい)。

【0105】

酵母 - 因子リーダー配列を使用して、ポリペプチドを分泌させることが可能であり、そして - 因子リーダー配列は、しばしば、プロモーター配列および構造遺伝子配列の間に挿入される (例えば、Kurjanら, *Cell* 30:933, 1982 および Bitterら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330, 1984)。

【0106】

酵母形質転換プロトコルが当業者に知られ、こうしたプロトコルには、酵母窒素基剤、カザミノ酸、グルコース、10 mg/ml アデニンおよび 20 mg/ml ウラシルを含む培地中での Trp^+ 形質転換体の選択を伴うプロトコルが含まれる (例えば、Hinnenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978 を参照されたい)。他のプロトコルでは、ADH2 プロモーター配列を含むベクターによって形質転換された酵母細胞は、「リッチ」培地中で増殖させることが可能である。リッチ培地の例は、80 mg/ml アデニンおよび 80 mg/ml ウラシルを補った、1% 酵母エキス、2% ペプトン、および 1% グルコースからなるものである。ADH2 プロモーターの抑制解除 (derepression) は、培地からグルコースが枯渇したとき起こる。

【0107】

哺乳動物または昆虫宿主細胞培養系もまた、組換えポリペプチドを発現するのに使用可能であり、例えば、Luckow および Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988) に概説されるバキュロウイルス系がある。哺乳動物起源の樹立細胞株もまた、使用可能である。適切な哺乳動物宿主細胞株の例には、サル腎臓細胞の CO

10

20

30

40

50

S-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzmanら, Cell 23:175, 1981)、L細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、およびBHK(ATCC CRL 10)細胞株、およびMcMahonら(EMBO J. 10:2821, 1991)に記載されるようなアフリカミドリザル(African green monkey)腎臓細胞株CV1(ATCC CCL 70)由来であるCV1/EBNA細胞株が含まれる。

【0108】

哺乳動物細胞内にポリヌクレオチドを導入するための確立された方法が記載されてきている(Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69)。Lipofectamine脂質試薬(Gibco/BRL)またはLipofectamine-Plus脂質試薬などの商業的に入手可能な試薬を用いた、さらなるプロトコルを用いて、細胞をトランスフェクションすることが可能である(Felgnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1987)。さらに、エレクトロポレーションを用い、Sambrookら、1989におけるもののような慣用法を用いて、哺乳動物細胞をトランスフェクションすることも可能である。安定形質転換体の選択は、例えば細胞毒性薬剤に対する耐性など、当該技術分野に知られる方法を用いて、実行可能である。Kaufmanら, Meth. in Enzymology 185:487-511, 1990は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)耐性などのいくつかの選択計画を記載する。DHFR選択に適した宿主株は、DHFR不全であるCHO株DX-B11である(UrlaubおよびChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980)。DHFR cDNAを発現しているプラスミドをDX-B11株に導入可能であり、そしてそのプラスミドを含有する細胞のみを適切な選択培地中で増殖させることが可能である。選択可能マーカーの他の例には、G418およびハイグロマイシンBなどの抗生物質に対する耐性を与える遺伝子が含まれ、該遺伝子は、これらの剤に対する耐性に基づいて、該ベクターを宿する細胞の選択を可能にする。

【0109】

哺乳動物宿主細胞発現ベクターのための転写および翻訳調節配列は、ウイルスゲノムより切り出されることが可能である。通常用いられるプロモーター配列およびエンハンサー配列は、ポリオマウイルス、アデノウイルス2、シミアンウイルス40(SV40)、およびヒト・サイトメガロウイルス由来である。SV40ウイルスゲノム由来のポリヌクレオチド配列、例えばSV40起点、初期および後期プロモーター、エンハンサー、スプライシング、およびポリアデニル化部位を用いて、哺乳動物宿主細胞における構造遺伝子配列の発現のための他の遺伝要素を提供可能である。ウイルス初期および後期プロモーターは、どちらもウイルス複製起点をも含有することが可能な断片として容易にウイルスゲノムから得られるため、特に有用である(Fiersら, Nature 273:113, 1978; Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990)。SV40ウイルス複製起点部位に位置するHind III部位からBgl I部位に渡るおよそ250bpの配列が含まれていれば、より小さいまたはより大きいSV40断片もまた使用可能である。

【0110】

哺乳動物発現ベクターからの異種遺伝子の発現を改善することが示されたさらなる調節配列には、CHO細胞由来の発現増大配列要素(EASE)(Morrisら, Animal Cell Technology, 1997, pp. 529-534およびPCT出願WO 97/25420)、並びにアデノウイルス2由来の三分割(tripartite)リーダー(TPL)およびVA遺伝子RNA(Gingerasら, J. Biol. Chem. 257:13475-13491, 1982)などの要素が含まれる。ウイルス起源の内部リボソーム進入部位(IRES)配列によって、ニシス

トロン性mRNAが効率的に翻訳されることが可能になる(OhおよびSarnow, Current Opinion in Genetics and Development 3:295-300, 1993; Rameshら, Nucleic Acids Research 24:2697-2700, 1996)。選択可能マーカー(例えばDHFR)遺伝子が続く、ニシストロン性mRNAの一部としての異種cDNAの発現は、宿主のトランスフェクション可能性および異種ポリヌクレオチドの発現を改善することが示されてきている(Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990)。ニシストロン性mRNAを使用する典型的な発現ベクターは、Mosserら, Biotechniques 22:150-161, 1997に記載されるpTR-DC/GFP、およびMorrisら, Animal Cell Technology, 1997, pp.529-534に記載されるp2A5Iである。

【0111】

有用な高発現ベクター、pCAVNOTがMosleyら, Cell 59:335-348, 1989に記載されてきている。哺乳動物宿主細胞において用いるための他の発現ベクターは、OkayamaおよびBerg(Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983)に開示されるように構築可能である。C127ネズミ乳腺上皮細胞における哺乳動物cDNAの安定した高レベル発現に有用な系は、実質的にCosmanら(Mol. Immunol. 23:935, 1986)に記載されるように構築可能である。Cosmanら, Nature 312:768, 1984に記載される有用な高発現ベクター、PMLSV N1/N4はATCC 39890として寄託されている。さらなる有用な哺乳動物発現ベクターは、本明細書に援用される、EP-A-0367566およびWO 91/18982に記載されている。さらに別の代替法として、ベクターは、レトロウイルス由来であることが可能である。

【0112】

さらなる有用な発現ベクター、pFLAG(登録商標)およびpDC311もまた、使用可能である。FLAG(登録商標)技術は、低分子量(1kD)親水性FLAG(登録商標)マーカーペプチドを、pFLAG(登録商標)発現ベクターによって発現される組換えタンパク質のN末端に融合させることを中心とする。pDC311は、CHO細胞でタンパク質を発現させるために用いる、別の特殊化ベクターである。pDC311は、目的の遺伝子およびジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子を、DHFR翻訳のための内部リボソーム結合部位、発現増大配列要素(EASE)、ヒトCMVプロモーター、三分割リーダー配列、およびポリアデニル化部位と共に含有する、ニシストロン性配列によって特徴付けられる。

【0113】

開示するポリヌクレオチドの他の有用な断片には、標的mRNA(センス)またはDNA(アンチセンス)配列に結合可能な一本鎖ポリヌクレオチド配列(RNAまたはDNAいずれか)を含んでなる、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、本発明にしたがって、配列番号1または18に示す配列を有するポリヌクレオチドの断片を含んでなる。こうした断片は、一般的に、少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14~約30ヌクレオチドを含んでなる。既定のタンパク質をコードする核酸配列に基づいて、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、SteinおよびCohen(Cancer Res. 48:2659, 1988)およびvan der Kroelら(Biotechniques 6:958, 1988)に記載されている。

【0114】

アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸への結合は、RNアーゼHによるmRNA分解の増進、スプライシングの阻害、転写または翻訳の未成熟な終結、あるいは他の手段によるものを含む、いくつかの手段の1つによって、タンパク質発現を遮断するかまたは阻害する二重鎖の形成を生じる。このように、アンチセンスオリゴヌクレオチ

ドを用いて、タンパク質の発現を遮断することが可能である。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドはさらに、修飾糖 - ホスホジエステル主鎖（または、WO 91 / 06629に記載されるものなど、他の糖結合）を有するオリゴヌクレオチドを含んでなり、そしてこうした糖結合は内因性ヌクレアーゼに耐性である。耐性糖結合を持つこうしたオリゴヌクレオチドは、*in vivo*で安定である（すなわち酵素分解に抵抗することが可能である）が、標的核酸に結合可能な配列特異性を保持する。

【0115】

センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例には、WO 90 / 10448に記載されるものなどの有機部分、およびポリ - (L) - リジンなどの標的核酸に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増加させる他の部分に共有結合しているオリゴヌクレオチドが含まれる。さらに、エリプチシンなどの挿入剤、およびアルキル化剤または金属錯体がセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドに付着させて、標的ヌクレオチド配列へのアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドの結合特異性を修飾することが可能である。

10

【0116】

アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、リポフェクション、CaPO₄ 仲介DNAトランスフェクション、エレクトロポレーションを含む、遺伝子トランスファー法いずれかによって、あるいはエプスタイン・バーウイルスまたはアデノウイルスなどの遺伝子トランスファーベクターを用いることによって、標的核酸を含有する細胞に導入可能である。

20

【0117】

センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、WO 91 / 04753に記載されるように、リガンド結合分子とのコンジュゲートの形成によって、標的核酸を含有する細胞に導入可能である。適切なリガンド結合分子には、限定されるわけではないが、細胞表面受容体、増殖因子、他のサイトカイン、または細胞表面受容体に結合する他のリガンドが含まれる。好ましくは、リガンド結合分子のコンジュゲート化は、リガンド結合分子がその対応する分子または受容体に結合する能力に実質的に干渉せず、あるいはセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはそのコンジュゲート型が細胞内に進入するのを遮断しない。

【0118】

あるいは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO 90 / 10448に記載されるように、オリゴヌクレオチド - 脂質複合体の形成によって、標的核酸を含有する細胞に導入可能である。センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド - 脂質複合体は、好ましくは、内因性リパーゼによって、細胞内で解離される。

30

【0119】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のHAMポリペプチド、またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター（例えば発現ベクター）の構築；該ベクターでトランスフェクションまたは形質転換した宿主細胞の構築；生物学的に活性であるポリペプチドおよびその生理活性断片を産生し、そして精製する方法の構築；関連するアトラクチンまたはマホガニーファミリータンパク質をコードする核酸を同定するプローブとしてのポリヌクレオチドまたはそのオリゴヌクレオチドの使用；本発明のHAMポリペプチドをコードする遺伝子の位置と、ヒト疾患に関連する染色体領域を相関させるための、ポリヌクレオチドまたはそのオリゴヌクレオチドの使用；腫瘍、免疫障害、症候群または他のヒト疾患と関連する遺伝子を同定するための、ポリヌクレオチドまたはそのオリゴヌクレオチドの使用；HAMポリペプチドをコードする遺伝子における突然変異によって、またはHAMポリペプチドの過剰もしくは欠乏によって特徴付けられる障害の治療のための、開示するタンパク質またはその断片の投与；およびHAMポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を阻害するための一本鎖センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を可能にする。さらに、本発明は、リガンド、同族体、または対構造（counter-structure）結合パートナーへの天然HAMポリペプチドの結合の競合

40

50

的阻害剤としての、開示するポリペプチドおよびその可溶性断片の使用；ユニークな分子量マーカーとしての、またはペプチド断片化の対照としての、HAMポリペプチドおよびその断片の使用と共に、これらの試薬を含んでなるキット；抗体を生成するための、HAMポリペプチドおよびその断片の使用；並びにHAMポリペプチドを精製するためのこうした抗体の使用；該タンパク質を発現する造血細胞の分離のためのアフィニティー試薬として、それと共にHAMポリペプチド生物学的活性の変調における抗体の使用を可能にする。ヒトの治療のため、典型的には、ヒトHAMポリペプチド、断片および該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いる。

【0120】

活性アッセイ

本発明の精製ポリペプチド（タンパク質、ポリペプチド、断片、変異体、オリゴマー、および他の型を含む）を、HAM結合パートナーに結合する能力に関して試験することが可能である。こうした活性は、慣用的な結合または酵素アッセイなど、いかなる適切なアッセイでも測定可能である。例えば、典型的な結合アッセイにおいて、ポリペプチドを検出可能試薬（例えば、放射性核種、発色団、比色または蛍光分光反応を触媒する酵素等）で標識し、そしてその後、表面上にHAM結合パートナーを発現している細胞と接触させることが可能である。細胞を洗浄して、非結合標識ポリペプチドを除去し、そして細胞に結合している標識の存在を、適切な技術によって、決定する。例えば、当該技術分野に公知の方法にしたがって、Fc領域に融合させたHAMポリペプチド（またはその生理活性断片）をコードするポリヌクレオチドを含有する、組換え発現ベクターを構築する。発現に際して、ポリヌクレオチドは、例えば、HAMポリペプチドの細胞外部分を含んでなる可溶性HAMポリペプチド、または膜貫通領域が除去され、細胞外ドメインおよび細胞質ドメインを含んでなる可溶性HAMポリペプチドをコードする。例えば、本発明のポリヌクレオチドを含んでなる組換え発現ベクターで、宿主細胞をトランスフェクションする。トランスフェクション細胞を培養した後、本発明のHAMまたは他の可溶性ポリペプチドを含有する培地をトランスフェクション細胞から収集し、そして標準法を用いて、ポリペプチドの量を定量化する。

【0121】

HAM結合パートナーを発現する細胞を培養して、そしてBM-NFDMで洗浄する。BM-NFDMは50mg/ml脱脂粉乳が添加されている結合培地（25mg/mlウシ血清アルブミン、2mg/mlアジ化ナトリウム、20mM HEPES pH7.2を含有するRPMI 1640）である。その後、該細胞を、多様な濃度の、例えば上述のように作成された可溶性ポリペプチド/Fc融合タンパク質とインキュベーションする。細胞を洗浄し、そして結合培地中で、¹²⁵Iマウス抗ヒトIgGの一定の飽和濃度で、穏やかに攪拌しながら37℃で1時間インキュベーションする。徹底した洗浄の後、トリプシン処理を介して細胞を遊離させる。

【0122】

上に使用されるマウス抗ヒトIgGは、ヒトIgGのFc領域に対して向けられ、そしてJackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.、ペンシルバニア州ウェストグローブから得ることが可能である。抗体は標準的クロラミン-T法を用いて、放射ヨウ素標識される。該抗体は、細胞に結合しているいかなるポリペプチド/Fcタンパク質のFc部分にも結合するであろう。すべてのアッセイにおいて、¹²⁵I抗体の非特異的結合をFc融合タンパク質/Fcの非存在下でアッセイすると共に、Fc融合タンパク質および200倍のモル過剰の非標識マウス抗ヒトIgG抗体の存在下でもアッセイする。

【0123】

細胞結合¹²⁵I抗体は、Packard Autogammaカウンターで定量化する。親和性計算（Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660, 1949）はMicrovaxコンピュータ上で実行されるRS/1（BBN Software、マサチューセッツ州ボストン）上で生み出される。

10

20

30

40

50

【0124】

例えば、基質を検出可能試薬（例えば放射性核種、発色団等）で標識し、そしてその後、HAMポリペプチドまたはその断片を含有する細胞または試料と接触させることが可能である。標識基質は、典型的には、マイクロタイプレート等に結合される。2つの構成要素のインキュベーション後、プレートを洗浄し、そして対照プレートと比較して、プレート上になお存在する標識の量を定量化する。プレート上の標識の減少が、酵素活性の示標となる。

【0125】

別の種類の適切な結合アッセイは、競合結合アッセイである。例えば、変異体の生物学的活性は、該変異体が、結合パートナーへの結合に関し、天然タンパク質と競合する能力をアッセイすることによって、決定可能である。

10

【0126】

競合結合アッセイは、慣用的方法論によって、実行可能である。競合結合アッセイに使用可能な試薬には、放射標識可溶性HAMポリペプチド、またはHAMポリペプチド（内因性または組換え）を細胞表面に発現している、損なわれていない細胞が含まれる。例えば、HAMポリペプチドの放射標識生理活性断片を用いて、細胞表面結合パートナーへの結合に関して、可溶性変異体と競合させることが可能である。損なわれていない細胞の代わりに、Fc部分と（固相上の）プロテインAまたはプロテインGの相互作用を通じて固相に結合しているHAMポリペプチドの生理活性断片/Fc融合タンパク質が使用可能である。プロテインAおよびプロテインGを含有するクロマトグラフィーカラムには、Pharmacia Biotech, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイより入手可能なものが含まれる。

20

【0127】

別の種類の競合結合アッセイは、HAMポリペプチドの放射標識可溶性生理活性断片、例えば可溶性生理活性断片/Fc融合タンパク質、およびHAM結合パートナーを発現する、損なわれていない細胞を利用する。定性的結果は、競合オートラジオグラフプレート結合アッセイによって得ることが可能であり、一方、定量的結果を生成するのにScatchardプロット（Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660, 1949）が利用可能である。

30

【0128】

診断アッセイ

本明細書に提供するポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、機能不全または突然変異HAM遺伝子を検出するアッセイにおいて、診断用試薬として有用である。診断のための試料は、被験者の組織、例えば喉のスワブ、血液、血清、尿、唾液、脳脊髄液、糞便、組織生検などから得ることが可能である。同様の試料を正常な個体（問題の障害または突然変異に苦しんでいない個人）から採取して、そしてこれらの正常または標準試料は、比較のための基盤を提供する。あるいは、精製試薬（例えばHAMポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体）を診断アッセイの標準として使用可能である。いくつかの態様において、本発明のポリヌクレオチドの断片を、ノーザンまたはサザンプロットのプローブとして、あるいは標的核酸にコードされるHAMポリペプチドの突然変異型を検出するためのPCRプライマーとして、使用する。

40

【0129】

診断可能な状態には、HAMポリペプチドの過剰または欠乏によって特徴付けられるもの、あるいはこうしたポリペプチドの突然変異型によって特徴付けられるものが含まれる。こうした状態には、限定されるわけではないが、その発現が必要な細胞におけるポリペプチドの欠如、改変された酵素活性、改変されたシグナル伝達能、正常な条件下でこうした活性を有する細胞における過剰発現または過少発現が含まれる。

【0130】

これらのアッセイを用いる、診断可能な特定の状態には、限定されるわけではないが：リウマチ学的疾患（例えば慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎、血清陰性脊椎関節症）、炎症

50

性異常、骨髄または固形臓器移植、移植片対宿主疾患、アレルギー（例えば喘息、アレルギー性鼻炎）、神経学的障害（例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、痴呆、脳癌、ベル麻痺、ヘルペス後神経痛）、新生物または癌を含む細胞増殖障害（例えばリンパ腫、B細胞、T細胞および骨髄細胞白血病）、感染（例えば細菌、寄生虫、原生動物およびAIDSを含むウイルス感染）、化学療法または放射線誘導毒性、悪液質、心臓血管障害（例えばうっ血性心不全、心筋梗塞、虚血/再灌流傷害、動脈炎、脳卒中）、胃腸障害（例えば炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病）、糖尿病、皮膚疾患（例えば乾癬、強皮症、皮膚筋炎）、血液学的障害（例えば骨髄異形性症候群、後天性またはファンconi再生不良性貧血）、敗血症ショック、肝疾患（例えばウイルス性肝炎またはアルコール関連肝炎）、骨障害（例えば骨粗しょう症、大理石骨病）が含まれる。

10

【0131】

本発明のいくつかの態様において、診断する状態は、血液学的障害であり、そして組織試料は、血液またはリンパ節生検である。

【0132】**HAMポリペプチドおよびポリヌクレオチドの変調因子のスクリーニング**

本明細書に開示するHAMポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、それぞれ、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現または活性を変調する剤を同定するためのスクリーニングアッセイに使用を見出す。ひとたび同定されたら、HAMポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現または活性を変調する剤を投与して、例えばHAMまたは他のアトラクチン/マホガニー関連タンパク質の過剰産生に特徴付けられる状態において、HAM発現を抑制することが可能である。同様に、状態がHAMの正常内因性活性化因子の欠乏に特徴付けられる場合、培養細胞における、または被験者におけるHAMポリペプチドの生物学的活性または発現を刺激する剤を投与して、活性または発現を刺激することが可能である。

20

【0133】

本明細書に提供する解説を用いて、HAMポリペプチドの活性または発現を変調する剤を同定する方法を行うことが可能である。例えば、HAMポリペプチド活性を変調する剤を同定するため、本発明のHAMポリペプチドを含有する試料と、試験剤を接触させる。その後、試料をアッセイして、HAM活性を測定し、そして試験剤の存在下でのHAM活性を、該剤が存在しない標準（すなわち対照）試料に存在する活性に比較する。試料は、例えば、無細胞試料、細胞含有試料（例えば細胞培養物）、または組織試料（例えば被験者から得られるかまたは被験者に由来する組織試料）であることが可能である。標準試料には、例えば、試験剤と接触させる前の試料または正常活性に相当する試料が含まれる。活性は、本明細書に同定するアッセイ法のいずれか（例えば競合結合アッセイ、酵素アッセイ等）を用いて測定することも可能である。対照または標準試料に比較した活性の変化が、活性を変調する（例えば増加させるかまたは減少させる）剤の示標となる。

30

【0134】

同様に、本発明は、HAMポリペプチドの発現を変調する剤を同定する方法を提供する。こうした方法には、例えば、本発明のポリヌクレオチドを含んでなる試料を試験剤と接触させ、そして標準または対照試料に比較した、ポリヌクレオチドの発現を測定することが含まれる。発現レベルは、（例えばウェスタンブロットによって）タンパク質を検出することによるか、または（例えばPCRによって）転写されるmRNA量を検出することによるものを含む、当該技術分野に知られる方法によって測定可能である。上述のように、試料は、細胞試料、組織試料等であることが可能である。対照または標準試料に比較した発現の変化が、発現を変調する（例えば増加させるかまたは減少させる）剤の示標となる。

40

【0135】

試験剤には、例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド擬似体、および抗体、小分子、またはポリヌクレオチド（例えばアンチセンスまたはリボザイム）が含まれることが可能である。試験剤の例は、HAMポリペプチドに特異的に結合するリガンド、またはHAMポ

50

リペプチドと共に、機能するヘテロマーを形成可能な他の分子である。

【0136】

これらのスクリーニングアッセイに使用する細胞には、例えば、天然にHAMポリペプチドを発現する細胞、例えばグリア細胞、T細胞、骨髄細胞および他の造血細胞、またはHAMポリペプチド発現を指示する異種核酸で形質転換またはトランスフェクションされている、好適な細胞種いずれかが含まれることが可能である。

【0137】

他のアッセイにおいて、HAMポリペプチドの生理活性断片（例えば可溶性型）を発現する細胞を試験分子と培養して、該分子が、細胞に産生される生理活性断片量を変調する能力を有するかどうかを決定することが可能である。酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）10、生理活性断片に結合する抗体を使用するドットプロット、または固相結合アッセイを含む、いかなる適切な方法によって、産生される生理活性断片の量を測定することも可能である。

【0138】

療法

本発明は、医学的障害、そして特にHAMが仲介する障害を患う被験者、好ましくは哺乳動物被験者、そして最も好ましくはヒト被験者を治療するための化合物、組成物、および方法を提供する。HAMが仲介するこうした障害には、HAMポリペプチドおよび結合パートナー間の結合によって（直接または間接的に）引き起こされるかまたは悪化される状態が含まれる。本開示の目的のため、用語「疾病」、「疾患」、「医学的状态」、「異常な状態」等は、用語「医学的障害」と交換可能に用いられる。用語「治療する（treat）」20、「治療すること（treating）」および「治療（treatment）」には、本明細書において、治療的、防御的（例えば予防的）および対症的または寛解的治療が含まれる。

【0139】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、HAMポリペプチドの過剰または欠乏、あるいは該ポリペプチドの有害な突然変異体型の発現を含む、機能不全HAM遺伝子またはポリペプチドを伴う障害を有する、哺乳動物被験者（例えばウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ブタ、霊長類）、好ましくはヒト被験者に療法的に投与可能である。こうした障害には、ポリペプチドのこうした型によって（直接または間接的に）引き起こされるかまたは悪化される状態が含まれる。投与がヒト被験者に行われる場合、分子は、好ましくは、ヒトHAM配列（例えば配列番号1または2に示す配列）に基づく。30

【0140】

これらの療法のため、それぞれ、HAMポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性または発現を変調する剤が使用可能である。こうした変調剤を、本明細書に開示するスクリーニング法を使用することによるなどのスクリーニングによって同定する。HAMポリペプチドまたはそのリガンドと特異的に結合する抗体は、HAMポリペプチドの生物学的活性を変調可能である。

【0141】

本発明の方法および組成物によって治療可能な障害および疾患には、限定されるわけではないが：リウマチ学的障害（例えば慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎、血清陰性脊椎関節症）、骨髄または固形臓器移植、移植片対宿主反応、炎症性異常、自己免疫疾患（例えば全身性エリテマトーデス、橋本甲状腺炎、シェーグレン症候群）、アレルギー（例えば喘息、アレルギー性鼻炎）、神経学的障害（例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、痴呆、脳癌、ベル麻痺、ヘルペス後神経痛）、癌（例えばリンパ腫、B細胞、T細胞および骨髄細胞白血病）、感染（例えば細菌、寄生虫、原生動物およびAIDSを含むウイルス感染）、化学療法または放射線誘導毒性、悪液質、心臓血管障害（例えばうっ血性心不全、心筋梗塞、虚血/再灌流傷害、動脈炎、脳卒中）、糖尿病、皮膚疾患（例えば乾癬、強皮症、皮膚筋炎）、血液学的障害（例えば骨髄異形性症候群、後天性またはファンコニ再生不良性貧血）、敗血症ショック、肝疾患（例えばウイルス性肝炎またはアルコール関連40

10

20

30

40

50

肝炎)、骨障害(例えば骨粗しょう症、大理石骨病)、および肥満を含む体重関連またはエネルギー代謝障害が含まれる。

【0142】

上述の1以上のいずれかを治療するため、治療する障害の1以上の徴候または症状を測定可能に減少させるのに有効な量で、療法剤を投与可能である。さらに、こうした障害は、機能不全が存在する細胞種に、機能不全遺伝子の非不全型を搬送するベクターまたはリポソームを、*in vivo*または*ex vivo*で投与することによって、治療可能である。

【0143】

療法組成物は、天然ポリペプチド、変異体、誘導體、オリゴマー、および生理活性断片などの、本明細書に記載する型いずれかの、実質的に精製されたHAMポリペプチドを含んでなることが可能である。組成物は、可溶性ポリペプチド、または可溶性HAMポリペプチドを含んでなるオリゴマーを含んでなることが可能である。別の態様において、組成物は、少なくとも1つのHAMポリペプチドエピトープに対して向けられる抗体を含んでなる。さらに別の態様において、療法剤を抗体に付着させ、そして該抗体を用いて、HAMポリペプチドを発現している細胞に療法剤をターゲティングする。

10

【0144】

別の薬理的に活性な剤を本発明の療法剤と同時投与する、併用療法もまた、想定される。同時投与に適した他の剤には、限定されるわけではないが、サイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、化学療法剤、抗炎症剤、DMARD類、抗血管形成剤(例えば抗VEGF抗体)、または標的疾患または障害を治療するのに有効な他の化合物いずれかが含まれる。

20

【0145】

本発明の薬剤組成物はさらに、生理学的に許容しうる希釈剤、キャリアー、または賦形剤などの他の構成要素を含んでなることが可能であり、そして既知の方法にしたがって処方する。これらは、単一の活性成分として、または既定の徴候に適した他の既知の活性成分と共に、薬学的に許容しうる希釈剤(例えば、生理食塩水、Tris-HCl、酢酸、およびリン酸緩衝溶液)、保存剤(例えば、チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン類)、乳化剤、可溶化剤、アジュバントおよび/またはキャリアーと混合して組み合わせることが可能である。薬剤組成物に適した処方には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, 1980, Mack Publishing Company, ペンシルバニア州イーストンに記載されるものが含まれる。

30

【0146】

さらに、こうした組成物は、ポリエチレングリコール(PEG)、金属イオンと複合体化しているか、またはポリ酢酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲル類、デキストラン等のポリマー化合物に取り込まれているか、またはリポソーム、微小乳剤、ミセル、単層もしくは多層小胞、赤血球ゴーストもしくはスフェロブラストに取り込まれていることが可能である。こうした組成物は、物理的状态、可溶性、安定性、*in vivo*放出速度、および*in vivo*クリアランス速度に影響を与えるであろうし、そしてしたがって意図される適用にしたがって、選択される。

40

【0147】

本発明の組成物は、例えば経口、局所、非経口、または吸入によるなど、適切な方式いずれかで、投与可能である。用語「非経口」には、例えば皮下、静脈内、あるいは筋内経路による注射が含まれ、また例えば疾患または損傷の部位での局所化投与も含まれる。移植物からの持続放出もまた、意図される。適切な投薬量は、治療しようとする障害の性質、患者の体重、年齢、および全身状態、並びに投与経路などの要因に応じて、多様であろう。予備的用量は動物試験にしたがって決定可能であり、そしてヒト投与のための投薬量の見積もりを、当該技術分野に認められる実施にしたがって行う。

【0148】

50

用量、投与経路、投与頻度および治療の有効な措置の期間は、治療しようとする特定の状態、状態の重症度、被験者の年齢、体重、および健康状態等などの要因に応じて多様であろうし、そして被験者の医師によって、相応に調整可能である。

【0149】

治療の1つの方法において、活性剤はポリペプチドであり、そして0.1~100mg/kgの範囲の用量、またはより好ましくは0.4~50mg/kgの用量で、毎週1~3回、注射によって投与される。治療は、被験者の状態に測定可能な改善が確認されるまで続け、これは大部分の場合、少なくとも2週間~8週間以上の治療を必要とするであろう。その後、維持用量を投与可能であり、そして疾患の徴候が再出現したら、治療を再開することが可能である。当該技術分野に知られる方法にしたがって、他の投与経路に適した措置を決定可能である。同様に、抗体、小分子、アンチセンスまたは遺伝子療法試薬を投与するのに適した措置を、当該技術分野に知られる方法にしたがって、決定可能である。

10

【0150】

本発明の範囲内に含まれるのは、記載する経路の各々による投与に適した組成物を含む、記載する療法剤を含んでなる、薬理的に許容しうる組成物である。こうした組成物を、標準的实施にしたがって処方する。

【0151】

本発明の特定の態様をさらに例示するために、以下の例を提供し、そしてこれは、本発明の範囲を制限すると解釈してはならない。

【実施例】

20

【0152】

実施例

(実施例1)

HAMの同定、クローニング、および配列決定

マウス樹状細胞(DC)cDNAマイクロアレイを用いて、新規DC関連遺伝子を同定した。Flt3L処理/休止およびFlt3L処理/SEB刺激マウスの脾臓から単離した、CD11c⁺マウスDCから調製したcDNAライブラリー由来の挿入物から、高密度ナイロンアレイを調製した。その後、いくつかの刺激条件下で得たマウスDCサブセット由来の標識第一鎖cDNAと、これらのアレイをハイブリダイズさせた。ディファレンシャルアレイシグナルによって、示差的に発現される遺伝子を同定した。シグナルパターンの変化を同定し、そして対応するクローンを配列決定し、そして解析した。in vivo DCで、CD8⁺/CD11b低で上方制御された配列(すぐ下の表を参照されたい)を含有する1つの同定クローンが、BLAST検索によって、アトラクチンに最も緊密に関連すると同定され、アトラクチンは、免疫制御(T細胞接着とカップリングしたマクロファージ蔓延の促進;複合可変免疫不全(combined variable immunodeficiency)における発現欠損)、髄鞘形成(ジッター(Zitter)ラットにおける突然変異遺伝子)、および代謝(マホガニーマウスにおける突然変異遺伝子)を含む、多数の生物学的機能を持つ、I型膜タンパク質である。DCクローンから得た配列を用いたBLAST検索もまた、GenBank寄託番号CAC12966を同定し、これは、マウスDC配列にオルソログスであるようであり、そしてアトラクチンのN末端に相同なようである、ヒトゲノムコンティグ(GenBank AL355530)から予測されるORFである。さらなるBLAST解析は、アトラクチンの3'端に相同性を示す、ヒト脳cDNA(GenBank AB011106)由来のESTを同定した。CAC12966およびAB011106はどちらも、本明細書に援用される。

30

40

【0153】

CD8⁺/CD11b低における上方制御配列

【0154】

【表1】

```

GGAGCCGGGGGTCCGGGCCCCGCTCGGGTGCCCCGCAGCCGCCCTCCCCGGTGTGTGGAG
E P G V R A R S G A P Q P A S P V L W R
GGCTCGGCCCGGGCGGGTGGGGGGCGCTCCTCCTGGCTGCTGCTGGACGGGAACAGCTG
A R P A G G G G A S S W L L L D G N S W
GCTGCTGTGCTATGGCTTCTCTACCTGGCGCTCTATGCTCAGGTGTCCCAGTCCAAGCC
L L C Y G F L Y L A L Y A Q V S Q S K P
CTGCGAGAGGACTGGCTCCTGCTTCTCCGGTCGCTGTGTCAACTCCACCTGCCTGTGCGA
C E R T G S C F S G R C V N S T C L C D
CCCCGGCTGGGTTGGGGACCAGTGCCAGCACTGCCAGGGCAGGTTCAAGTTAACAGAACC
P G W V G D Q C Q H C Q G R F K L T E P
TTCTGGATATTTAACAGATGGACCAATTAACATAAAATATAAAACAAAGTGACATGGCT
S G Y L T D G P I N Y K Y K T K C T W L
AATGAAGGCTATCCAAATGCAGTGCCTAAGGTTAAGATTCAATCATTTTGCTACAGAATG
I E G Y P N A V L R L R F N H F A T E C
CAGCTGGGATCATATGTATGTTTATGATGGAGATTCTATATACGCACCTTTAGTAGCTGT

```

10

```

S W D H M Y V Y D G D S I Y A P L V A V
ACTTAGTGGCTTGATCGTTCCTGAAGTGAGGGGTAAACGAGACCGTGCCTGAGGTGGTCAC
L S G L I V P E V R G N E T V P E V V T
GACGCTCGGCTACGCGCTGCTCCACTTTTTTCAGCGATGCTGCATATAACCTAACTGGCTT
T S G Y A L L H F F S D A A Y N L T G F
CAACATTTTTTATTCGATCAATTCCTGTCTAACAACCTGCTCTGGTCATGAAAGTGC
N I F Y S I N S C P N N C S G H E S

```

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

配列番号1のヌクレオチド	変化	変化の種類	結果
120	aaC>aaT	サイレント	Asn>Asn
140	gGc>gAc		Gly>Asp
400	Aga>Gga		Arg>Gly
696	taT>taC	サイレント	Tyr>Tyr
783	tgT>tgC	サイレント	Cys>Cys
1213	Cat>Tat		His>Tyr
1244	tCa>tTa		Ser>Leu
1334	cAg>cGg		Gln>Arg
1418	gTg>gCc		Val>Ala
1779	atG>atA		Met>Ile
1950	aaT>aaC	サイレント	Asn>Asn
2084	aAt>aGt		Asn>Ser
2097	agT>agC	サイレント	Ser>Ser

10

2275	Tg>Cgt		Cys>Arg
2510	cT>cCt		Leu>Pro
2809	Acc>Gcc		Thr>Ala
2843	aCc>aTc		Thr>Ile
2947	Ctt>TTT		Leu>Phe
3005	aAg>aGg		Lys>Arg
3013	Gag>Aag		Glu>Lys
3222	欠失	フレームシフト	未成熟停止
3226	Tg>Cgt		Cys>Arg
3262	Tgc>Cgc		Cys>Arg
3288	cgC>cgT	サイレント	Arg>Arg
3374	gAt>gGt		Asp>Gly
3376	Cgc>Tgc		Arg>Cys
3523	Tct>Cct		Ser>Pro
3621-3626	欠失 (インフレーム)		
3609	acG>acA	サイレント	Thr>Thr
3653	cAg>cGG		Gln>Arg
3718	Tg>Cgt		Cys>Arg
3750	gtG>gtA	サイレント	Val>Val
3877	Aca>Gca		Thr>Ala
3881	gAg>gGg		Glu>Gly
4039	Cta>Tta	サイレント	Leu>Leu
4116	tcA>tcG	サイレント	Ser>Ser

20

【 0 1 6 0 】

30

配列番号2または19に示す配列の解析は、本発明のHAMポリペプチドの別個の領域を同定した。これらのポリペプチドには、シグナルペプチドとも称されるリーダー配列が存在する。例えば、本発明の全長ヒトHAMポリペプチドに存在するリーダー配列は、配列番号2のアミノ酸1～60および配列番号19のアミノ酸1～59を含むと予測される。HAMのシグナルペプチド切断部位は、コンピュータアルゴリズムを用いて予測した。しかし、当業者は、シグナル配列の切断部位は、ポリペプチドを発現させる生物を含む、いくつかの要因に応じて多様である可能性があることを認識するであろう。したがって、本発明のHAMポリペプチドの成熟型のN末端は、約2～5アミノ酸異なる可能性がある。したがって、本発明のヒトHAMポリペプチドの成熟型は、そのN末端で、配列番号2のアミノ酸55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、または65を含むことが可能である。したがって、成熟型ヒトHAMは、配列番号2のアミノ酸55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、または65からほぼアミノ酸1379まで（または可溶性ポリペプチドの場合、アミノ酸1230まで）を含むことが可能である。ヒトHAMポリペプチドの細胞外領域は、配列番号2のほぼアミノ酸61～1230に位置する。EGF様ドメイン、CUBドメイン、C型レクチンまたは炭水化物認識ドメイン(CLECTドメイン)、KELCHモチーフおよびラミニンEGF様ドメイン割り当てと共に、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの割り当ては、コンピュータアルゴリズムおよび先の報告(Gunnら, Nature 398:152-157, 1999)に基づく。ヒトHAMの細胞外領域は、推定上、それぞれ、配列番号2のほぼアミノ酸63～90、211～243、261～280、93～208、581～61

40

50

2、749～873、670～686、および1014～1055に位置する、3つのEGF様ドメイン、CUBドメイン、KELCHモチーフ、C型レクチンまたは炭水化物認識ドメイン、共通のガンマサイトカイン鎖の推定上のリガンド結合モチーフ、およびラミニニンEGF様ドメインを含有する(図3を参照されたい)。ヒトHAMポリペプチドの膜貫通領域は、配列番号2のほぼアミノ酸1231～1251に位置する。細胞内領域は、配列番号2のほぼアミノ酸1252～1379に位置する。さらに、上記の認識される配列、配列RXXHSAVXINGXMXIFGGが、本発明のヒトHAM配列において反復していることが見出された(例えば配列番号2のアミノ酸521～540および581～600を参照されたい)。この反復配列のBLASTは、いくつかのアトラクチンおよびマホガニー配列を同定した。したがって、この反復配列は、推定上のHAM保存ドメインである。図3は、HAMの相対ドメインおよび保存残基を示し、アトラクチンまたはマホガニーポリペプチドを示す。

10

【0161】

(実施例3)

HAMの組織発現

アトラクチン相同体に関するPCRは、コード領域の予測される3'端からほぼ650bpの断片を増幅するように設計された、以下のプライマーを用いた。該プライマーは、ゲノム配列内に見出される、予測されるコード領域に基づき、そしてAB011106配列に見出される配列と同一である：

【0162】

【化1】

センス鎖 5'CAATATCTGGGGAAGAGACTTCTATAGTTTCCAAG (配列番号20)

アンチセンス 5'GGTTTCCATTCTCAGACACAAGTTCCTTGACGTGT (配列番号21)

20

【0163】

PCRは、これらの第一鎖cDNAをテンプレートとして用いて：胎盤、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、精巣、リンパ節、心臓、骨格筋、脳、卵巣、小腸、食道、胎児肝臓、胎児脳、胎児肺、胎児脾臓、胎児胸腺、胎児腎臓、および胎児骨格筋において、陽性シグナルを示した。胃、骨髄、肺、結腸、前立腺、胸腺、白血球および皮膚では、PCR産物は検出不能であった。したがって、HAMは、組織特異的マーカーとして使用可能である。

30

【0164】

(実施例4)

HAMポリペプチドに結合するモノクローナル抗体

実質的に精製されたHAMポリペプチドまたはその断片を用い、米国特許第4,411,993号に記載されるものなどの慣用的技術を用いて、それと免疫反応性であるモノクローナル抗体を生成することが可能である。簡潔には、HAMポリペプチド免疫原を完全フロイントアジュバント中で乳化し、そして10～100μgの範囲の量を皮下または腹腔内注射して、該免疫原でマウスを免疫する。10～12日後、免疫した動物に、不完全フロイントアジュバント中で乳化した、さらなるHAMポリペプチドまたはその断片を追加免疫する。その後、毎週から隔週(bi-weekly)の免疫スケジュールで、マウスに定期的に追加免疫する。後眼窩出血または尾先端切除によって、血清試料を定期的に採取し、ドットプロットアッセイ、ELISA(酵素連結免疫吸着アッセイ)、またはHAMポリペプチド結合パートナーへのHAMポリペプチドの結合阻害によって、HAM抗体に関して試験する。

40

【0165】

適切な抗体力価を検出した後、陽性動物に、生理食塩水中のHAMポリペプチドまたは断片を最後に一度、静脈内注射する。3～4日後、動物を屠殺し、脾臓細胞を採取し、そして脾臓細胞をネズミ骨髄腫細胞株、例えばNS1または好ましくはP3x63Ag8.653(ATCC CRL 1580)に融合させる。融合によってハイブリドーマ細胞が生成され、これを、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増

50

殖を阻害するHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）選択培地中、マルチマイクロタイタープレートに蒔く。

【0166】

ハイブリドーマ細胞は、Engvallら（*Immunochem.* 8:871, 1971）および米国特許第4,703,004号に開示される技術の適応によって、実質的に純粋なHAMポリペプチドに対する反応性に関して、ELISAによってスクリーニングする。好ましいスクリーニング技術は、Beckmannら（*J. Immunol.* 144:4212, 1990）に記載される抗体捕捉技術である。陽性ハイブリドーマ細胞を、同系BALB/cマウスに腹腔内注射して、高濃度の抗HAMポリペプチド・モノクローナル抗体を含有する腹水を産生することが可能である。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、多様な技術によって、フラスコまたはローラーボトル中、*in vitro*で増殖させてもよい。マウス腹水中で産生したモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿によって、続いてゲル排除クロマトグラフィーによって、精製可能である。あるいは、ポリペプチドAまたはポリペプチドGに対する抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーもまた使用可能であり、HAMポリペプチドへの結合に基づくクロマトグラフィーも使用可能である。

10

【0167】

（実施例5）

染色体マッピング

染色体マッピングは、例えば以下の2つの方法の1つで実行可能である。HAMポリペプチドに対応する遺伝子は、PCRに基づくマッピング戦略を用いてマッピングする。最初のヒト染色体割り当ては、HAM特異的PCRプライマーを用い、そして製造者の指示にしたがって、BIOS Laboratories（コネティカット州ニューヘブーン）のBIOS体細胞ハイブリッドPCR可能DNAキットを用いて作成する。より詳細なマッピングは、Genebridge 4放射ハイブリッドパネル（*Research Genetics*、アラバマ州ハンツビル；Walter, MAら, *Nature Genetics* 7:22-28, 1994に記載される）を用いて行う。その後、この解析から得たデータを、含まれる指示にしたがって、MIT Radiation Hybrid Mapper（URL：<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>）に電子的に提出する。この解析は、電子的にNCBI Genemapブラウザ（www.ncbi.nlm.nih.gov/80/cgi-bin/enter/ez/hum_srch?chr=hum_chr_ing&query）に提出した際に特定の染色体間隔を生じる、特定のマーカー名称を生じる。

20

30

【0168】

あるいは、データベース解析によって、HAMポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の位置に関する情報を得ることが可能である。Celerahitゲノムデータベースを用いたヒトゲノムコンティグの解析によって、HAM配列が、ヒト染色体10q26に位置すると同定された。

【0169】

（実施例6）

結合アッセイ

HAMポリペプチドまたはその断片を、組換えDNA技術によって発現させ、精製し、そして多様な細胞系譜の多様な細胞（例えば造血細胞）と結合する能力に関して試験する。結合アッセイはHAMポリペプチドを使用し、該ポリペプチドには、これらのポリペプチドの可溶性型、および以下に記載するように形成するオリゴマーが含まれる。

【0170】

アッセイ用のオリゴマーは以下のように調製する。HAMポリペプチドのCOOH末端に融合させたロイシンジッパーペプチドを含んでなる融合タンパク質を、上述のように構築する。該ポリペプチドは、HAMポリペプチドの細胞外領域など、HAMポリペプチドの

40

50

可溶性型を含んでなることが可能である。本質的に、Baumら(EMBO J. 13: 3992-4001, 1994)に記載されるように、発現構築物を調製する。発現ベクターpDC409中の該構築物は、ヒト・サイトメガロウイルス由来のリーダー配列、その後、可溶性HAMポリペプチドのC末端に融合させたロイシンジッパー部分をコードする。あるいは、HAMポリペプチド/Fc融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を、適切な発現ベクターに挿入する。組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞において、ポリペプチド/Fc融合タンパク質を発現させ、そしてFc部分間の鎖間ジスルフィド結合の形成によってアセンブルを可能にして、こうして二量体分子を生じる。

【0171】

発現させたFc/HAMポリペプチドまたはロイシンジッパー/HAMポリペプチド融合タンパク質を、HAMポリペプチド結合パートナーを発現していると推測される細胞と接触させる。1つの態様において、いくつかの示標因子いずれかを介する、エネルギー代謝または免疫細胞活性化の変化を検出することによって、融合タンパク質活性を測定する。別の態様において、融合タンパク質の存在下および非存在下で、天然HAMポリペプチドを発現する細胞が、HAMポリペプチド結合パートナーを発現する細胞と結合するかまたは相互作用する能力を検出することによって、融合タンパク質の活性を測定する。さらに別の態様において、例えば標識抗IgG抗体を用いて、HAMポリペプチド同族体への融合タンパク質の結合を検出することによって、融合構築物の結合活性を検出する。

【図面の簡単な説明】

【0172】

【図1-a】図1A~Dは、本発明のcDNA配列および対応するポリペプチド配列を示す。矢印は、コード配列の多様な断片を増幅するのに用いたプライマーを示す。

【図1-b】図1A~Dは、本発明のcDNA配列および対応するポリペプチド配列を示す。矢印は、コード配列の多様な断片を増幅するのに用いたプライマーを示す。

【図1-c】図1A~Dは、本発明のcDNA配列および対応するポリペプチド配列を示す。矢印は、コード配列の多様な断片を増幅するのに用いたプライマーを示す。

【図1-d】図1A~Dは、本発明のcDNA配列および対応するポリペプチド配列を示す。矢印は、コード配列の多様な断片を増幅するのに用いたプライマーを示す。

【図2-a】図2A~Cは、アトラクチン/マホガニーのヒト相同体(HAM)、ヒト・アトラクチンおよびネズミ・マホガニー配列の並列を示す。

【図2-b】図2A~Cは、アトラクチン/マホガニーのヒト相同体(HAM)、ヒト・アトラクチンおよびネズミ・マホガニー配列の並列を示す。

【図2-c】図2A~Cは、アトラクチン/マホガニーのヒト相同体(HAM)、ヒト・アトラクチンおよびネズミ・マホガニー配列の並列を示す。

【図3-a】図3A~Bは、本発明のHAMポリペプチドの推定上のドメインを示す。

【図3-b】図3A~Bは、本発明のHAMポリペプチドの推定上のドメインを示す。

【図4-a】図4A~Bは、配列番号2のヒトHAMポリペプチドと、配列番号19のネズミHAMポリペプチドの並列を示す。

【図4-b】図4A~Bは、配列番号2のヒトHAMポリペプチドと、配列番号19のネズミHAMポリペプチドの並列を示す。

【図5-a】図5A~Dは、配列番号19のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列(配列番号18)を示す。

【図5-b】図5A~Dは、配列番号19のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列(配列番号18)を示す。

【図5-c】図5A~Dは、配列番号19のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列(配列番号18)を示す。

【図5-d】図5A~Dは、配列番号19のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列(配列番号18)を示す。

【 図 2 - a 】

FIGURE 2(a)

1 50
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

51 100
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

101 150
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

151 200
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

201 250
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

251 300
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

301 350
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

351 400
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

401 450
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

451 500
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

【 図 2 - b 】

FIGURE 2(b)

501 550
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

551 600
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

601 650
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

651 700
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

701 750
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

751 800
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

801 850
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

851 900
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

901 950
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

951 1000
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

【 図 2 - c 】

FIGURE 2(c)

1001 1050
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

1051 1100
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

1101 1150
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

1151 1200
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

1201 1250
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

1251 1300
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

1301 1350
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

1351 1400
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

1401 1450
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

1451 1491
 アトラクチン
 マホガニー
 HAMタンパク質
 コンセンサス

【 図 3 - a 】

FIGURE 3(a)

下線=シグナルドメイン
 大文字=EGF様ドメイン
 斜字=UBドメイン
 点線下線=KELCHモチーフ
 反転字=C型レクチン(CTL)または炭水化物認識ドメイン
 破線下線=共通のガンサイトカイン鎖の推定上のリガンド結合モチーフ
 太線=ラニニンE/F様ドメイン
 二重下線=膜貫通ドメイン

1 MPTGRRARTG TPQAPAGVW RARPAAGGGG GASSLLDGN SMLLXCYFL LALYAOVGS

61 KPCRRTGSCF SGRVNSTCL CDPGWGQDC QHCQGRFKLT EPGSYLTDG INYKTKTKT

121 WLIEGYPNAV LRLRNFHAT ECDSDHMYVY DSDSYAPLI AVLSGLIPE IRGNETVPEV

181 VTTGVALLM FSDAAVNLG FPNIFYINS CPNCSGSK QTESVSPBQ VXCEDKYMK

241 GEACDIPYCK ANCGSPDHYG CDLTGKLVK CNDSEWQPPDC SLNVPSTESY WILPNVFKFS

301 PEGGRASHKA VLHGKPMWVI GGYTFNYSF QMVLNLYLES SIWVGTSPR GELQRYGSHL

361 ALYGENIFMY OGRISTNDGN VTDELVFNFI HSQSWTKTP TVLHGQQQYA VEGHSAHIME

421 LDRSDVNIY IFGYSAIYV TSSIQEYHIS SNTWLVFETK GAIQVGGYGH TSVYDEITKS

481 IVYHGGYKAL PKNYGLVDD LYKYEVNFKT WTILESQFA RYHSAVLIN GAMLIPGONT

541 HNDTSLNGA KCFSADEFLY DIACDMMKLT FKNLHRDWN RGHSAVXIN GSMXKRGGRS

601 SLLNDRILYV RPNKCAPRD BELCKNAGPG ICKVWNNHC ESWSFNNTN IIRAKCFPKT

661 AASDRCVRYV ADCACTANTP NGCQMDCKK CISANMCSM SVKSYTKCHV RHEQICMLT

721 SCXSCSLNLN CQMDQRQCC QALPAHLCS GHSHIGDACL RVNSRENYD NAKYGVNLS

781 GLASLIPSK RVSPVLDLQ KYAQOAVSRV VQLRKNIGY KGRSDEMSPT NPTLQGRGR

841 RIDSGRCAV ERASVAGLKA HCTESANGL VCRPVSPN QNARPKCKP SLRTSCNCT

901 SNGEHCWCS STKRCDVNSA YIISFPIYQC LEWQIATCPQ QNCGLRATQC QCLEPQCGW

961 CNDPNTGRG HCIEGSSRGP MKLIGHNHN MVLDTNLCPK EKNYSWSPIQ CPAQCGHGS

1021 TCINNVCEQ CKNLTKGKQC QDCMFGYVD PFMGGQCTAC TCSGHANHC LHTGKCPCT

1081 KGIKGDQQL CDSNRYVGN PLRGTCTYSL LDYDQTFSL LQSDRHHTA INFIANPEQS

【 図 5 - b 】

FIGURE 5(b)

TATGTTCAAGGAGCTACAAGCATTGCTGGCAGTAAGTACGGGGTGGTGGAGCCTC
 YVHEGGYKAFPGNKYGLVDDLL
 TATAAGTACGAAGTCAACACAGGACTTGGACTATTTTGAAGAAAGTGGGTTGCCAGA
 YKYEVENRTRTWTILKESGFAR
 TACCTTCACTCAGCTGTTCTTCAATGGAGCTATGCTTATTTTGGAGGAAATACCCAT
 YLHSAVVLINGAMLIFFGGNTH
 AMGATACTTCCCTGAGTAAAGCTGCAAAATGTTTTCCTGCGATTTCCTGGCATATGAC
 NDTLSLSNGAKCFFSADFLAYD
 ATAGCTTGTGACGAATGAAGACATTCCTAAACAATTCCTATAGAGCAGCTCAACCGA
 IACDEWKTLPKPFNLHRD VNR
 TTTGGGCATTCGCACTGCTCATCAATGGGTCAATATATATTGGTGGATTTCTAGT
 FGHSAVVIINGSEMYIFGGFSS
 GTACTCCTTAATGATATCCTTGTGTATAAACCCCAATTTGCAAGCTTTCGAGATGAA
 VLLNDILLVYKFPNCKAFRDE
 GAATGTGCGAAGCCTGGCTCAGGATFAAATGTTTGGAAATAGAAATCACTGTGAA
 ELCRNAGPFIKCVWNKNHCE
 TCTTGGAGTCTGGGAATACAAATATATCTCAGACCCAGTGCCTCCCAAGACAGCT
 SWESEGHNTNHLRAKCFPKRTA
 GCTACCCATGACAGATGTTACAGATATGCTGACTGTCAGCTGCACACGCAACGAAAC
 ATDDRRCYRYADCCASCTANTN
 GGGTCCAGTGGTGTGACGACAGAAATGCACTCAGCCAGCAGCAACTGACAGCAGTCT
 GCQWCDKCKCISASSNCSSTS
 GTCGAAACTACACTAAATGCTATATAAGAAATGCGCAGATTTGTAACAATACTTACAAGC
 VRNYTKCHIRNEQICNKLTS
 TGTAAAAGCTGTTCACCTGAAATGCGAGTGGATCAGCGGACAGGAAATGTCAG
 CKSCSLNHLHCQWDRQRCQECQ
 GCTTTCAGCTCACCTTTTGGAGAAGCTTGAATCATGTTGGGACCTTGTCTTGA
 ALFAHLGEGWNVGDAACLR
 ATCAATTCAGTGCAGAAAGCTATGATAATGCCAACTTTATGCTATAACTCAGTGA
 INSSRESYDINAALKYCYNLSG
 AATCTCGCCTCCCTGACCGCTCAAGAGGTTGGATTTGTTGGATGAAATACAGAAG
 NLAASLTTSTKEVEVFVWLNDEIQK
 TTCACACAGCAGAAAGTTCACCGTGGTGGGCTAGCAAGATCAATATCTACTGG
 FTQKQKVSFPWVGLRKRINISYW
 GGATGGGAGGACATGCTCTTTCACAAATACAGCCTGCGAGTGGCTTCTGTTGAGCCA
 G W E D H S P P T N T S L Q W L F G E P
 AATGACTCTGGATTCCTGCTTACTAGAAAGGCTGCGAGTGGCAGGTTTAAAGCAAAC
 N D S G F C A Y L E R A A V A G L K A N
 CCTTGCACATCCATGGCAGATGAGCTCGTTTGTGAAAGCCTGTGATGAGCCCAATCAG
 P C T S N A D G L V C E K P V V S P N Q
 AACGGAGGCGCTGCAAGAGCGCTGCTCCCTGAGGACCTCTGTCGSCCACTGCACGAGC
 N A R P C R K P C S L R T S C A N C T S
 AGCGCATGGATGCATGTTGTCAGCAGCACGAAGCGCTGTGTGACTCCAAGCCTTAC
 S G H E C H W C S S T K R C V D S N A Y
 ATCATCTCCTTCCCTACGGACAGTGCCTGGAGTGGCAGACTGCCACCTGCTCGCCTCAA
 I I S F P Y G Q C L E W Q T A T C S P Q
 AATGTTCTGGCTTAAAGAACCTTGGACAGTCTTGGAGCAGCCAGGCTGTGGTGTG
 N C S G L R T C G Q C L E Q P P G C G W C

【 図 5 - c 】

FIGURE 5(c)

AACGATCCTACTACACAGGAGAGGCTATTGCTGCAAGGCTTCCCGGGGCCAATG
 N D P S N T G R G Y C I E G S S R G P M
 AAACCTGTTGGGTTCCACACAGTACGTTGGTTTTCACACACGCTTCCGCCCCAAGG
 K L V G V H N S D V V L D T S L C P K E
 AAGAACTACGAGTGGTCTTTATCCAGTTCACAGCTTCCAGTGTAAATGGACACAGCAGC
 K N Y E W S F I Q C P A C Q C N G H S T
 TGCATCAACACACAGCTCTGTGAGCAGTGAAGATCTCACCACTGGGCGCAGTGTGAC
 C I N N N V C E Q C K N L T T G R Q C Q
 GAATGCAATGCGAGTACTATGGAGACCCACCAACGGTGGGCGAGTGCACAGCTTGCAG
 E C M F E S Y Y G D F T N S G Q C T A C T
 TCGGGCGCCATGGCACTGTCTCACCTGCACACGGGAAAGTGTTTTGCACACCAAG
 C G G H A N V C H L H T G K C F C T T K
 GGGATCAAGGTTGACCACTGCGCAGTATGTGACTCTGAAAATCGCTATGTGGTAAATCA
 G I K G D Q C Q L C D S E N R Y V G N P
 CTTAGGGGACATGCTATTACAGTCTTCTGATGACTACCAAGTACCTTACCTGAGTCTG
 L R G T C Y Y S L L I D Y Q F T F S L L
 CAGAAAGTACCGGACACAGCTGCCATCACTTCAATCGCCACCCAGAGCAGTCAAAC
 Q E D D R H H T A I N F I A N P E Q S N
 AAAAACTGGACATTTGGATTAATGCTTCCACAACTTTAATCTCAACATPAGTGGTCA
 K N L D I S I N A S N N F N L N I T W S
 GTTGGCTCAACAGTGGAAACATATCTGGGAGAGACTCCTATAGTTCTAAGACAAAT
 V G S T G G T I S G E E T P I V S K T N
 ATAAAGAAATACAGAGACAGCTTTTCTATGAAAAATTAACCTTACAGAACATCTAAT
 I K E Y R D S F S Y E K F N F R S N P N
 ATCACATTTATGCTATGTCAGCACTTCTCTGGCTTATTAATAACAGATTCGCTTT
 I T F Y V Y V S N F S W P I K I Q I A F
 TCACAACACACAGATCATGATCTCTGCAAGTCTTTGTACCTTCTTCAATGTTT
 S Q H N T I M D L V Q F P V T F F S C F
 TTAATTTACTGCTGGTGGCTGCTGTGCTGGAAGATCAACAACTTCTGGGCTT
 L S L L L V A A V V W K I K Q T C W A S
 CGTGGAGGGCACTGCTTCGAGACGACAGCAGATGGCCAGCCCTTCTTCTCT
 R R R E Q L L R E R Q Q M A S R P P A S
 GTTGATGAGCCTCGAAGTGGAGCTGACAGACAGACTTCTGGAGGGCCATTAGAG
 V D V A L E V G A E Q T D F L R G F L E
 GTCGCCCTAAGCAATAGCCATGCAACCTGCGCTGGGACAGAGCTGCTGCTGACT
 G A P K F I A I E P C A G N R A A V L T
 GTGTTTCTGCTTACGAGAGGATCTTACGGCGCCCAACCCCTGGGAGTCAAGGCTT
 V F L C L P R G S S G A P P F P G Q S G L
 GCTATGCGCAGTGCCTGATAGACATCTCACAGCAGAGGCTTCTGATATAAAGCAAG
 A I A S A L I D I S Q Q K P S D N K D K
 ACTTCTGGAGTCCGCAATCGAAGCACCTTCCACAGCTCAAGGACTGTGTC
 T S G V R N R K H L S T R Q G T C V

【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
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/097120 A1

(51) International Patent Classification: C12Q 1/00, 1/68, G01N 33/53, 1/00, 33/00, 33/48, 33/567, 33/574, A01N 61/00, A61K 31/00, 38/00, 31/07, 35/14, A01N 43/04, C07H 1/00, A61K 35/14, A01N 43/04, C07H 1/00, 19/00, 5/04, 5/06, 21/00, 21/04, C08B 37/00, C07K 2/00, 4/00, 5/00, 7/00, 14/00, 16/00, 17/00, 1/00

(74) Agent: BAKER, Joseph, R., Immunex Corporation, 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).

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

(21) International Application Number: PCT/US02/16391

(22) International Filing Date: 23 May 2002 (23.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/293,608 25 May 2001 (25.05.2001) US
60/324,626 24 September 2001 (24.09.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNEX CORPORATION [US/US]; 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): ANDERSON, Dirk, M. [US/US]; 3616 NW 64th Street, Seattle, WA 98107 (US).

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



WO 02/097120 A1

(54) Title: ATTRACTIN/MAHOGANY-LIKE POLYPEPTIDES, POLYNUCLEOTIDES, ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: The present disclosure provides attractin/mahogany-like polypeptides and fragments thereof, polynucleotides encoding such polypeptides and fragments, processes for production of recombinant forms of such polypeptides, antibodies generated against these polypeptides or fragments, and assays and methods employing these polypeptides, antibodies, and polynucleotides.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

IMMUNEX CORPORATION

5 **ATTRACTIN/MAHOGANY-LIKE POLYPEPTIDES, POLYNUCLEOTIDES, ANTIBODIES
AND METHODS OF USE THEREOF****CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

10 This application claims the benefit of priority under 35 U.S.C. §119 to United States Provisional Application Serial Number 60/293,608, filed May 25, 2001, and to United States Provisional Application Serial Number 60/324,626, filed September 24, 2001, the disclosures of which are incorporated herein by references.

FIELD OF THE INVENTION

15 The invention is directed to novel attractin/mahogany-like polypeptides and fragments thereof, polynucleotides encoding such polypeptides, processes for production of recombinant forms of such polypeptides, antibodies generated against these polypeptides or fragments, and assays and methods employing these polypeptides, antibodies, and polynucleotides.

BACKGROUND

20 Attractin (DPPT-L) is a human glycoprotein belonging to a family of proteins called the CUB family of cell adhesion and guidance proteins. Attractin is normally secreted by activated human T lymphocytes and modulates immune cell interactions.

25 Attractin is an 1198 amino acid protein containing four EGF-like domains along with other domains. Proteins with EGF-like domains typically play a role in extracellular signaling or cellular guidance. For example, purified-serum attractin and recombinant attractin enhance the proliferative response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to recall antigens such as tetanus toxoid (Duke-Cohan *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 95:11336-41, 1998). Attractin causes spreading of adherent monocytes to which lymphocytes attach (Duke-Cohan *et al.*, *supra*). These adherent cells become the foci for T-lymphocyte clustering, and it is thought that attractin is involved in mediating the interactions between T-cells and macrophages, by influencing binding between the cells, antigen presentation, or by proteolytic modification. In addition attractin has also been identified as being related to the murine mahogany protein with a connection to control of pigmentation and energy metabolism (Tang *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 97(11):6025-30, 2000).

35 Mahogany is a murine protein that is an ortholog of human attractin (Gunn *et al.*, Nature, 398:152, 1999). Murine Mahogany is a transmembrane protein of 1428 amino acids, which contains a single transmembrane domain. The extracellular domain of murine mahogany has homology to attractin. Murine mahogany has been shown to be involved in suppression of obesity (Nagle *et al.*, Nature, 398:148-152, 1999; see also U.S. Patent 6,274,339, which is incorporated herein by reference in its entirety).

40

WO 02/097120

PCT/US02/16391

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides a substantially pure polypeptide comprising an amino acid sequence that has at least 80%, 90% or 100% identity to a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19.

5 In addition, the invention provides a substantially pure polypeptide comprising an amino acid sequence that has at least 80%, 90% or 100% identity to a sequence as set forth from about amino acid 61 to 1379 of SEQ ID NO:2.

The invention also provides bioactive fragments of SEQ ID NO:2 comprising a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 from amino acid 1 to 61, 61 to 1230, 61 to 1379, 1231 to 1252, or 1252 to
10 1379.

The invention further provides a substantially pure polypeptide comprising an amino acid sequence that has at least 80%, 90% or 100% identity to a sequence as set forth from about amino acid 61 to 1230 of SEQ ID NO:2.

15 The invention provides a substantially pure polypeptide having a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 from amino acid 61 to amino acid 1230 operably linked to a sequence as set forth from about amino acid 1252 to 1379 of SEQ ID NO:2.

The invention also provides a fusion polypeptide comprising a first polypeptide comprising an amino acid sequence as set forth from about amino acid 61 to 1230 of SEQ ID NO:2 operably linked to a second polypeptide. In one aspect, the second polypeptide is an Fc polypeptide. In another aspect,
20 the second polypeptide is a leucine zipper polypeptide. In yet another aspect the second polypeptide has a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19, including bioactive fragments thereof. In yet a further aspect a linker polypeptide separates the first polypeptide and the second polypeptide and operably linked to the first and second polypeptide.

The invention further provides an isolated polynucleotide encoding the polypeptides of the
25 invention. In one embodiment, the isolated polynucleotide comprises a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1 or 18; SEQ ID NO:1 or 18, wherein T can also be U; sequences complementary to SEQ ID NO:1 or 18; and fragments of a), b), or c) that are at least 20 bases in length and that will hybridize under moderate to highly stringent conditions to a nucleic acid which encodes a polypeptide comprising a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19. In yet a further embodiment,
30 the isolated polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:1 from about nucleotide 181 to 4137; SEQ ID NO:1 from about nucleotide 181 to 3690; sequences complementary to SEQ ID NO:1 from about nucleotide 181 to 4137; sequences complementary to SEQ ID NO:1 from about nucleotide 181 to 3690; and any of a), b), c), or d) wherein T can also be U.

35 The invention further provides an isolated polynucleotide encoding a fusion polypeptide of the invention.

The invention provides a vector comprising a polynucleotide of the invention. In one embodiment, the vector is a plasmid or a viral vector.

40 The invention also provides a host cell comprising a vector of the invention. The invention further provides a recombinant host cell comprising a polynucleotide of the invention under the control of a heterologous regulatory sequence. The host cell can be prokaryotic or eukaryotic.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

The invention further provides a method of producing a polypeptide comprising culturing a host cell or recombinant host cell of the invention under condition that promote expression of a polypeptide of the invention.

5 In another aspect of the invention a polypeptide is provided wherein the polypeptide is produced by culturing a host cell of the invention under conditions that promote expression of the polypeptide.

The invention also provides a purified antibody that specifically binds to a polypeptide of the invention. In one aspect the antibody is monoclonal. In another aspect the antibody is a human or humanized antibody.

10 The invention provides a pharmaceutical composition comprising an antibody of the invention or a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:2 from amino acid 61 to 1379; and SEQ ID NO:2 from amino acid 61 to 1230, and a pharmaceutical carrier, excipient or diluent.

In another aspect, the invention provides a method for identifying an agent which modulates the expression of a polynucleotide comprising a sequence as set forth in SEQ ID NO:1 or 18, comprising contacting a sample containing the polynucleotide with a test agent and measuring the expression of the polynucleotide compared to a control, wherein a change in expression compared to the control is indicative of an agent that modulates expression of the polynucleotide. The agent can be a polypeptide, a peptide, a peptidomimetic, a nucleic acid, and a small molecule.

20 Also provided by the invention is a method for identifying an agent which modulates the activity of a polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 or 19, SEQ ID NO:2 from about 61 to 1379, SEQ ID NO:2 from about 61 to 1230, comprising contacting a sample containing the polypeptide with a test agent and measuring the activity of the polypeptide compared to a control, wherein a change in activity compared to the control is indicative of an agent that modulates activity of the polypeptide.

The invention further provides a method of treating a HAM-associated disorder or disease comprising contacting a subject with a HAM polypeptide, HAM polynucleotide, or an antibody to a HAM polypeptide in an amount effective to treat the HAM-associated disorder or disease. The HAM-associated disorder is selected from the group consisting of a rheumatologic disorder, a bone marrow or solid organ transplant disorder, a graft-versus-host disorder, an inflammatory disorder, an autoimmune disorder, a neurologic disorder, a myelination disorder, a cell proliferative disorder, an infection, a cardiovascular disorder, a hematologic disorder, liver disorder, metabolic disorders, weight disorders, and a bone disorder. In one aspect the HAM polypeptide has a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19 or a bioactive fragment thereof.

35

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1A-D shows a cDNA sequence and a corresponding polypeptide sequence of the invention. The arrows depict the primers used to amplify various fragments of the coding sequence.

40 Figure 2A-C shows an alignment of the human Homologue of Attractin/Mahogany (HAM), human attractin and murine mahogany sequences.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Figure 3A-B shows the putative domains of a HAM polypeptide of the invention.

Figure 4A-B shows an alignment of a human HAM polypeptide of SEQ ID NO:2 with that of a murine HAM polypeptide of SEQ ID NO:19.

Figure 5A-D shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:18) encoding the polypeptide sequence of SEQ ID NO:19.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides for the first time novel polypeptides having homology to attractin and mahogany proteins termed herein "HAM" for Homologue of Attractin and Mahogany. Also provided are polynucleotides encoding the novel HAM polypeptides as well as methods of use of the polynucleotides and polypeptides.

Attractin molecules modulate the interaction between T cells and macrophages and monocytes, permitting more rapid and/or more effective antigen presentation. The association of the three cell types is neither simultaneous nor random. Rather the antigen-presenting cell clusters first with the helper T cells, and this cluster acts as a focus for recognition by effector cells. In the absence of antigen, no proliferation occurs in soluble attractin-1-induced clusters of monocytes and T cells, but if a recall antigen such as tetanus toxoid is present; the clustering of cells maximizes the potential response to the antigen. Attractin may regulate local cytokine activity, either by influencing binding and presentation or by proteolytic modification. Soluble attractin-1 has recently been shown to cleave an N-terminal dipeptide which converts full-length RANTES 1-68 (consisting of amino acid residues 1-68), a potent monocyte chemoattractant, to RANTES 3-68, an equally potent inhibitor of monocyte chemotaxis. Soluble attractin-1 has also been found to bind to macrophages and monocytes. It is possible that it is via this binding that attractin, in any of its forms, may regulate the activity of macrophages and monocytes. For example, by providing requisite signals for the induction of spreading and subsequent enhanced T-cell clustering. Alternatively, the molecule could complement binding of another molecule to a receptor on macrophages/monocytes. Further, the molecule could form a bridge between T cells and macrophages/monocytes. Since membrane attractin-1 and -2 have a cytoplasmic domain it is likely that binding of a putative ligand to an extracellular region of the membrane attractin results in signaling to the T cell. It should be understood, however, that the invention is not limited by a particular mechanism of action.

Based upon their homology to attractins, the HAM molecules of the invention are predicted to have similar biological activity as the attractins and thus are predicted to play a role in inflammation and inflammatory responses. Other biological activities for the HAM molecules include energy metabolism and pigmentation, which activity is based upon HAM's homology to the mahogany protein and mahogany's role in the regulation of obesity (Nagle *et al.*, Nature, 398:148-152, 1999). A correlation of the two types of activities (*e.g.*, inflammatory and obesity) has been shown by higher white blood cell counts in obese children (Visser *et al., supra*) that are likely due to cytokines induced by inflammatory cell activation as well as additional cell types including preadipocytes. Preadipocytes exhibit functional features of macrophages, such as phagocytosis and anti-microbial activity.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

suggesting that preadipose cells could play a role in the inflammatory process or immune response (Cousin *et al.* J. Cell Physiol., 186:380-6, 2001).

Similar functional characteristics can be found in the *ob* gene product, Leptin, an adipocyte-derived peptide with circulating levels proportional to body fat mass. Serum leptin levels are correlated with adiposity and increased by as much as 3-4 fold in obese humans. The levels are lowered by fasting and increased by inflammation. Leptin, is a pleiotropic molecule that regulates food intake, metabolic and endocrine functions, and has a regulatory role in immunity, inflammation, and hematopoiesis (Fantuzzi and Faggioni, J. Leukoc Biol, 68(4):437-46, 2000). In addition to its role as a satiety signal, leptin is also pro-inflammatory: leptin receptors belong to the class I family of cytokine receptors and have been demonstrated on a variety of hematopoietic cells, including macrophages and T cells, in which leptin promotes the release of inflammatory cytokines. Thus, a link between inflammation and obesity exists (Visser *et al.*, Pediatrics, 107(1):E13, 2001). Leptin's role in energy metabolism and inflammation is predictive of the role of HAM. Accordingly, HAM can play a role in obesity, inflammatory responses, inflammation, metabolism, pigmentation and neurological (*e.g.*, myelination related disorders).

The HAM polypeptides, polynucleotides and antibodies provided herein find use in the treatment of inflammatory disease, obesity, energy metabolism, appetite, and the modulation of inflammatory responses.

The invention provides polypeptides referred to herein as "HAM polypeptides". As used herein a "HAM polypeptide" of the invention means a polypeptide which contains or comprises an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19; polypeptides having substantial homology or substantial identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:2 or 19; fragments of the foregoing sequence (*e.g.*, bioactive fragments); and conservative variants of the foregoing. The HAM polypeptides have been shown to have homology to attractin and mahogany polypeptides and thus have predicted function and biological activity similar to attractin and mahogany polypeptides.

As used herein, "polypeptide" means any chain of amino acids (including L- or D-amino acids), regardless of length or post-translational modification (*e.g.*, glycosylation or phosphorylation), and include natural proteins, synthetic or recombinant polypeptides and fragments as well as a recombinant molecule consisting of a hybrid with a first portion, for example, having all or part of a HAM polypeptide amino acid sequence and a second portion comprising all or part of a polypeptide of interest. Typically, the HAM polypeptide is substantially pure of other components from which it is normally present in nature. The term "substantially pure" or "purified" when referring to a polypeptide, means a polypeptide that is at least 30% free from the proteins and naturally-occurring organic molecules with which it is naturally associated. Preferably the substantially pure polypeptide of the invention is at least 35-50%, preferably 60-70%, more preferably 75%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 99% by weight purified from other naturally occurring organic molecules. A substantially pure polypeptide of the invention can be obtained, for example, by extraction from a natural source, by expression of a recombinant polynucleotide encoding the polypeptide, or by chemically synthesizing the polypeptide. Purity can be measured by any appropriate method, *e.g.*, column chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, or HPLC analysis.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

In general, a recombinant polypeptide or fragment can be isolated from a host cell if not secreted, or from the medium or supernatant if soluble and secreted, followed by one or more rounds of concentration, salting-out, ion exchange, hydrophobic interaction, affinity purification or size exclusion chromatography. If desired, the culture medium first can be concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. Following the concentration step, the concentrate can be applied to a purification matrix such as a gel filtration medium. Alternatively, an anion exchange resin can be employed, for example, a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) groups. The matrices can be acrylamide, agarose, dextran, cellulose or other types commonly employed in protein purification. Alternatively, a cation exchange step can be employed, including various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups. In addition, a chromatofocusing step or, alternatively, a hydrophobic interaction chromatography step can be employed. Suitable matrices can be phenyl or octyl moieties bound to resins. In addition, affinity chromatography with a matrix, which selectively binds the recombinant protein, can be employed. Examples of such resins employed are lectin columns, dye columns, and metal-chelating columns. Finally, one or more reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, (e.g., silica gel or polymer resin having pendant methyl, octyl, octyldecyl or other aliphatic groups) can be employed to further purify the polypeptides. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations, are well known and can be employed to provide a substantially purified polypeptide of the invention.

It is also possible to utilize an affinity column comprising a polypeptide-binding protein, such as a monoclonal antibody generated against a polypeptide of the invention, to affinity-purify expressed polypeptides. These polypeptides can be removed from an affinity column using conventional techniques, e.g., in a high salt elution buffer and then dialyzed into a lower salt buffer for use or by changing pH or other components depending on the affinity matrix utilized, or be competitively removed using the naturally occurring substrate of the affinity moiety, such as a polypeptide derived from the invention.

Accordingly, polypeptide-binding proteins, such as anti-polypeptide antibodies or other proteins that may interact with a polypeptide of the invention, can be bound to a solid phase support such as a column chromatography matrix or a similar substrate suitable for identifying, separating, or purifying cells that express polypeptides of the invention on their surface. Adherence of polypeptide-binding proteins of the invention to a solid phase contacting surface can be accomplished by any means, for example, magnetic microspheres can be coated with these polypeptide-binding proteins and held in the incubation vessel through a magnetic field. Suspensions of cell mixtures are contacted with the solid phase that has such polypeptide-binding proteins thereon. Cells having polypeptides of the invention on their surface bind to the fixed polypeptide-binding protein and unbound cells then are washed away. This affinity-binding method is useful for purifying, screening, or separating such polypeptide-expressing cells from solution. The cells can be released, for example, by using a preferably non-toxic enzyme that cleaves the cell-surface binding partner, or by effecting such release by modifying the composition of the buffer.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Alternatively, mixtures of cells suspected of containing HAM polypeptide-expressing cells of the invention can be incubated with a biotinylated polypeptide-binding protein, such as an anti-HAM antibody. Sufficient binding usually occurs within about one hour, after which the mixture then is passed through a column packed with avidin-coated beads, to which the biotin moiety will bind with high affinity (see Berenson, *et al.* J. Cell. Biochem., 10D:239, 1986). Unbound cells are washed free of the column, and bound cells are eluted according to conventional methods. This method can be used to isolate cells expressing membrane-bound HAM polypeptides.

When purifying polypeptides, the desired degree of purity will depend on the intended use of the polypeptide. A relatively high degree of purity is desired when the polypeptide is to be administered *in vivo*, for example. In such a case, the polypeptides typically are purified such that no bands corresponding to other proteins are detectable by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). One skilled in the art will understand that multiple bands corresponding to the polypeptide may be visualized by SDS-PAGE, due to differential glycosylation, differential post-translational processing, and the like. Most preferably, the polypeptide of the invention is purified to substantial homogeneity, as indicated by a single protein band upon analysis by SDS-PAGE. The band may be visualized by silver staining, Coomassie blue staining, or (if the protein is radiolabeled) by autoradiography.

Several distinct regions can be discerned within a human HAM polypeptide of the invention. A leader sequence, also called a signal peptide, is present in these polypeptides. For example, a leader sequence present in the full-length polypeptide of the invention is predicted to include amino acids 1-60 of SEQ ID NO:2. The signal peptide cleavage site for HAM was predicted using a computer algorithm. However, one of skill in the art will recognize that the cleavage site of the signal sequence may vary depending upon a number of factors including the organism in which the polypeptide is expressed. Accordingly, the N-terminus of a mature form of a HAM polypeptide of the invention may vary by about 2 to 5 amino acids. Thus, a mature form of the HAM polypeptide comprising SEQ ID NO:2 may include at its N-terminus amino acids 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, or 65 of SEQ ID NO:2. Accordingly, a mature form can include amino acid 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, or 65 to about amino acid 1379 (or, in the case of a soluble polypeptide, to amino acid 1230) of SEQ ID NO:2. The extracellular regions of the HAM polypeptide of SEQ ID NO:2 are located from about amino acids 61 to 1230 of SEQ ID NO:2. The EGF-like domains, CUB domain, C-type Lectin or carbohydrate-recognition domain (LECT domain), KELCH motif and Laminin EGF-like domain assignments, as well as those for the transmembrane and cytoplasmic domains are based upon computer algorithms and on previous reports (Gunn *et al.*, Nature 398:152-157, 1999). For example, the extracellular region of human HAM putatively contains three EGF-like domains, a CUB domain, a KELCH motif, a C-type Lectin or carbohydrate-recognition domain, a putative ligand binding motif of the common gamma cytokine chain, and a Laminin EGF-like domain located at about amino acids 63-90, 211-244, 261-280, 93-208, 581-612, 749-873, 670-686, and 1014-1055 of SEQ ID NO:2, respectively (see Figure 3). The transmembrane region for the HAM polypeptides are located at about amino acids 1231 to 1251 of SEQ ID NO:2. The intracellular regions are located at about amino acids 1252 to 1379 of SEQ ID NO:2. Figures 2 and 3 show the relative domains and conserved cysteine

WO 02/097120

PCT/US02/16391

residues of HAM indicative of an attractin or mahogany polypeptide. Utilizing the alignment provided in Figure 4A-B the putative domains of the murine HAM polypeptide (SEQ ID NO:19) based upon the corresponding domains in the human HAM polypeptide (SEQ ID NO:2) can be determined. The relative domains of the murine HAM polypeptide (SEQ ID NO:19) and the corresponding polynucleotide fragments encoding such domains (*e.g.*, fragments of SEQ ID NO:18) are specifically encompassed by the present invention.

Accordingly, several distinct regions can be discerned within a murine HAM polypeptide of the invention. A leader sequence, also called a signal peptide, is present in these polypeptides. For example, a leader sequence present in the full-length polypeptide of the invention is predicted to include amino acids 1-59 of SEQ ID NO:19. The signal peptide cleavage site for murine HAM was predicted using a computer algorithm and alignment with human HAM. However, one of skill in the art will recognize that the cleavage site of the signal sequence may vary depending upon a number of factors including the organism in which the polypeptide is expressed. Accordingly, the N-terminus of a mature form of a murine HAM polypeptide of the invention may vary by about 2 to 5 amino acids. Thus, a mature form of a murine HAM polypeptide comprising SEQ ID NO:19 may include at its N-terminus amino acids 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, or 64 of SEQ ID NO:19. Accordingly, a mature form can include amino acid 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, or 64 to about amino acid 1376 (or, in the case of a soluble polypeptide, to amino acid 1230) of SEQ ID NO:2. The extracellular regions of a murine HAM polypeptide of SEQ ID NO:19 are located from about amino acids 60 to 1227 of SEQ ID NO:19. The EGF-like domains, CUB domain, C-type Lectin or carbohydrate-recognition domain (CLECT domain), KELCH motif and Laminin EGF-like domain assignments, as well as those for the transmembrane and cytoplasmic domains are based upon computer algorithms, alignments with human HAM (SEQ ID NO:2) and on previous reports (Gunn *et al.*, Nature 398:152-157, 1999). For example, the extracellular region of murine HAM putatively contains three EGF-like domains, a CUB domain, a KELCH motif, a C-type Lectin or carbohydrate-recognition domain, a putative ligand binding motif of the common gamma cytokine chain, and a Laminin EGF-like domain located at about amino acids 62-89, 210-243, 260-277, 92-207, 578-609, 746-870, 667-683, and 1011-1052 of SEQ ID NO:19, respectively. The transmembrane region for a murine HAM polypeptide is located at about amino acids 1228 to 1248 of SEQ ID NO:19. The intracellular regions are located at about amino acids 1249 to 1376 of SEQ ID NO:19.

The invention provides both full-length and mature forms of HAM polypeptides. Full-length polypeptides are those having the complete primary amino acid sequence of the polypeptide as initially translated. The amino acid sequences of full-length polypeptides can be obtained, for example, by translation of the complete open reading frame ("ORF") of a cDNA molecule. Several full-length polypeptides may be encoded by a single genetic locus if multiple mRNA forms are produced from that locus by alternative splicing or by the use of multiple translation initiation sites. An example of a full length HAM polypeptide of the invention comprises amino acid 1 to amino acid 1379 of SEQ ID NO:2 and 1 to 1376 of SEQ ID NO:19. Such a full length polypeptide is contemplated to include, for example, the signal peptide comprising amino acids 1 to about amino acid 60 of SEQ ID NO:2 and amino acids 1 to about amino acid 59 of SEQ ID NO:19, respectively.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

The "mature form" of a polypeptide refers to a polypeptide that has undergone post-translational processing steps, if any, such as, for example, cleavage of the signal sequence or proteolytic cleavage to remove a prodomain. Multiple mature forms of a particular full-length polypeptide may be produced, for example, by imprecise cleavage of the signal sequence, or by differential regulation of proteases that cleave the polypeptide. The mature form(s) of such polypeptide may be obtained by expression, in a suitable mammalian cell or other host cell, of a polynucleotide that encodes the full-length polypeptide. The sequence of the mature form of the polypeptide may also be determinable from the amino acid sequence of the full-length form, through identification of signal sequences or protease cleavage sites (e.g., a protease cleavage site is predicted between the Ser-Lys residues at positions 60 and 61 of SEQ ID NO:2). An example of a mature form of a HAM polypeptide of the invention comprises a sequence as set forth from about amino acid 61 to amino acid 1379 of SEQ ID NO:2.

The HAM polypeptides of the invention also include polypeptides that result from post-transcriptional or post-translational processing events such as alternate mRNA processing which can yield a truncated but biologically active polypeptide, for example, a naturally occurring soluble form of the polypeptide. Also encompassed within the invention are variations attributable to proteolysis such as differences in the N- or C-termini upon expression in different types of host cells, due to proteolytic removal of one or more terminal amino acids from the polypeptide (generally from 1-5 terminal amino acids).

In another embodiment, the invention provides bioactive fragments of a HAM polypeptide. By "bioactive fragment" means a fragment of SEQ ID NO:2 or 19 having a biological activity associated with an attractin and/or mahogany polypeptide and/or a biological activity associated with a full-length or mature form of a HAM polypeptide of the invention. A bioactive fragment may have one or more of the following biological activities including, for example, inducing monocyte and macrophage activation, promoting the secretion and/or expression of pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-6), modulating metabolic activity, modulating weight gain/loss, and modulating appetite and energy consumption. Examples of bioactive fragments of a HAM polypeptide molecules include those having a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 comprising about amino acid 61 to 1230 or as set forth in SEQ ID NO:19 comprising about amino acid 60 to 1227 and fragments of either of the foregoing. Such bioactive fragments represent potential soluble molecules lacking the predicted transmembrane domain (e.g., the domain beginning at about amino acid 1231 to amino acid 1251 of SEQ ID NO:2). Bioactive fragments of HAM polypeptides are capable of interacting, for example, with a HAM polypeptide cognate, or with an antibody developed against a HAM polypeptide of SEQ ID NO:2 or 19. Methods of determining whether a HAM polypeptide or bioactive fragment of a HAM polypeptide of the invention has a desired activity can be accomplished by assaying the polypeptide by any of the methods described below.

Accordingly, the polypeptides of the invention may be membrane-bound or they may be secreted and thus soluble. Soluble polypeptides are capable of being secreted from the cells in which they are expressed. In general, soluble polypeptides may be identified (and distinguished from non-soluble membrane-bound counterparts) by separating intact cells which express the desired polypeptide

WO 02/097120

PCT/US02/16391

from the culture medium, e.g., by centrifugation, and assaying the medium (supernatant) for the presence of the desired polypeptide or by contacting cell-free media obtained from the culture with an antibody specific for HAM. The presence of polypeptide in the medium indicates that the polypeptide was secreted from the cells and thus is a soluble form of the polypeptide.

5 In one embodiment, the soluble polypeptides (e.g., a bioactive fragment of a HAM polypeptide) comprise all or part of the extracellular domain, but lack the transmembrane domain that would cause retention of the polypeptide in a cell membrane. In some embodiments the soluble polypeptide lacks a transmembrane domain in addition to one or more additional domains including, for example, the signal sequence or cytoplasmic domain. A soluble polypeptide according to the
10 invention may include the cytoplasmic domain, or a portion thereof, so long as the polypeptide is secreted from the cell in which it is produced.

In general, the use of soluble forms is advantageous for certain applications. Purification of the polypeptides from recombinant host cells is facilitated, since the soluble polypeptides are secreted from the cells. Further, soluble polypeptides are generally more suitable for intravenous administration.

15 The invention also provides polypeptides and fragments of the extracellular domain that retain the capacity to modulate inflammatory responses, immune system activity weight gain/loss, and/or energy metabolism. Such a fragment may be a soluble polypeptide, as described above.

Also provided herein are polypeptide fragments comprising at least 25, or at least 30 contiguous amino acids of a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19. Fragments derived from the
20 cytoplasmic domain find use in studies of signal transduction, and in regulating cellular processes associated with transduction of biological signals, such as inhibitory signals, and in identifying small molecule mimics or inhibitors of receptor interaction with signaling molecules. Polypeptide fragments comprising at least about 8 to 11, or more preferably 10 to 30, contiguous amino acids of SEQ ID NO:2 or 19 also may be employed as immunogens for generating antibodies, as well as larger polypeptides.

25 Naturally occurring variants and derived variants of the disclosed polypeptides and fragments are provided herein. Variants may exhibit amino acid sequences that are at least 80% identical to the disclosed polypeptides and fragments. Also provided are polypeptides or fragments comprising an amino acid sequence that is at least 85% identical, at least 90% identical, at least 95% identical, at least 98% identical, at least 99% identical, or at least 99.9% identical to the amino acid sequences disclosed
30 herein. Percent identity may be determined by visual inspection and mathematical calculation. Alternatively, the percent identity of two protein sequences can be determined by comparing sequence information using a computer program, such as the GAP program, based on the algorithm of Needleman and Wunsch (J. Mol. Bio. 48:443, 1970) and available from the University of Wisconsin
35 Genetics Computer Group (UWGCG). The preferred default parameters for the GAP program include: (1) a scoring matrix, blosum62, as described by Henkoff and Henikoff (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1992); (2) a gap weight of 12; (3) a gap length weight of 4; and (4) no penalty for end gaps. Similar comparison parameters can be implemented using other computer programs such as, for example, BESTFIT, FASTA, TFASTA (see, e.g., Wisconsin Genetics Software Package, Genetics
40 Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), or PILEUP (a simplification of the progressive alignment method of Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987)).

WO 02/097120

PCT/US02/16391

The variants of the invention include, for example, those that result from alternate mRNA splicing events or from proteolytic cleavage. Alternate splicing of mRNA may, for example, yield a truncated but biologically active protein, such as a naturally occurring soluble form of the protein. Variations attributable to proteolysis include, for example, differences in the N- or C-termini upon
5 expression in different types of host cells, due to proteolytic removal of one or more terminal amino acids from the protein (generally from 1-5 terminal amino acids). Proteins in which differences in amino acid sequence are attributable to genetic polymorphism (allelic variation among individuals producing the protein) are also contemplated herein.

Additional variants within the scope of the invention include polypeptides that may be
10 modified to create derivatives thereof by forming covalent or aggregate conjugates with other chemical moieties, such as glycosyl groups, lipids, phosphate, acetyl groups and the like. Covalent derivatives may be prepared by linking the chemical moieties to functional groups on amino acid side chains or at the N-terminus or C-terminus of a polypeptide. Conjugates comprising diagnostic (detectable) or therapeutic agents attached thereto are contemplated herein, as discussed in more detail below.

15 Other derivatives include covalently bonded or aggregate conjugates of the polypeptides with other proteins or polypeptides, such as by synthesis in recombinant culture as N-terminal or C-terminal fusions. Examples of fusion polypeptides are discussed below in connection with oligomers. Further, fusion polypeptides can comprise peptides added to facilitate purification and identification. Such peptides include, for example, poly-His or the antigenic identification peptides described in U.S. Patent
20 No. 5,011,912 and in Hopp *et al.*, *BioTechnology* 6:1204, 1988. One such peptide is the FLAG[®] peptide, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO:3), which is highly antigenic and provides an epitope reversibly bound by a specific monoclonal antibody, enabling rapid assay and facile purification of expressed recombinant protein. A murine hybridoma designated 4E11 produces a monoclonal antibody that binds the FLAG[®] peptide in the presence of certain divalent metal cations, as
25 described in U.S. Patent 5,011,912, hereby incorporated by reference. The 4E11 hybridoma cell line has been deposited with the American Type Culture Collection under accession no. HB 9259. Monoclonal antibodies that bind the FLAG[®] peptide are available from Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut.

Among the variant polypeptides provided herein are variants of native HAM polypeptides that
30 retain the native binding properties or biological activity of a mature HAM polypeptide of SEQ ID NO:2 or 19 or the substantial equivalent thereof. For example a variant includes a molecule that binds its binding partner with essentially the same binding affinity as does the native form. Binding affinity can be measured by conventional procedures, *e.g.*, as described in U.S. Patent No. 5,512,457 and as set forth below.

35 Variants include polypeptides that are substantially homologous to the native form, but which have an amino acid sequence different from that of the native form because of one or more deletions, insertions or substitutions. Particular embodiments include, but are not limited to, polypeptides that comprise from one to ten deletions, insertions or substitutions of amino acid residues, when compared to a native sequence.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

A given amino acid may be replaced, for example, by a residue having similar physicochemical characteristics. Examples of such conservative substitutions include substitution of one aliphatic residue for another, such as Ile, Val, Leu, or Ala for one another; substitutions of one polar residue for another, such as between Lys and Arg, Glu and Asp, or Gln and Asn; or substitutions of one aromatic residue for another, such as Phe, Trp, or Tyr for one another. Other conservative substitutions, *e.g.*, involving substitutions of entire regions having similar hydrophobicity characteristics, are well known. Also included are the substitution of L-amino acids for D-amino acids. The presence of D-amino acids provides resistance to proteases and increases the stability of a polypeptide or fragment thereof. Amino acid substitutions and other alterations (deletions, insertions, and the like) to a HAM polypeptide of the invention is predicted to be more likely to alter or disrupt HAM polypeptide activities if they result in changes to the conserved residues indicated by the "consensus," indicated in Figure 2A-C. Conversely, if a change is made to a HAM polypeptide resulting in substitution of one or more Figure 2 consensus sequence residues for the HAM polypeptide residue at that conserved position, it is less likely that such an alteration will affect HAM polypeptide function. In one aspect, the invention provides HAM polypeptides that have from 1-10 amino acid substitutions, insertions, and/or deletions.

Similarly, the polynucleotides of the invention include variants that differ from a native HAM polynucleotide because of one or more deletions, insertions or substitutions, but that encode a biologically active polypeptide.

In addition, "conservatively modified variants" applies to both polypeptides and polynucleotides. With respect to a particular polynucleotide, conservatively modified variants refer to codons in the polynucleotide which encode identical or essentially identical amino acids. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical polynucleotides encode any given protein. For instance, the codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such variations are "silent variations," which are one species of conservatively modified variations. Every polynucleotide sequence herein that encodes a polypeptide also describes every possible silent variation of the nucleic acid. One of skill will recognize that each codon in a polynucleotide (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, each silent variation of a nucleic acid that encodes a polypeptide is implicit in each described sequence.

The invention further includes polypeptides of the invention with or without associated native-pattern glycosylation. Polypeptides expressed in yeast or mammalian expression systems (*e.g.*, COS-1 or COS-7 cells) can be similar to or significantly different from a native polypeptide in molecular weight and glycosylation pattern, depending upon the choice of expression system. Expression of any of the polypeptides of the invention in bacterial expression systems, such as *E. coli*, provides non-glycosylated forms of the polypeptides. Further, a given preparation may include multiple differentially glycosylated species of the protein. Glycosyl groups can be removed through conventional methods, in particular those utilizing glycopeptidase. In general, glycosylated polypeptides of the invention can

WO 02/097120

PCT/US02/16391

have their carbohydrate moieties removed by being incubated with a molar excess of glycopeptidase (Boehringer Mannheim).

N-glycosylation sites in eukaryotic polypeptides are characterized by an amino acid triplet Asn-X-Y, wherein X is any amino acid except Pro and Y is Ser or Thr. The HAM polypeptides of the invention have a number of putative glycosylation sites. For example, the Asn residue at one or more of the following positions is a potential glycosylation site: 76N, 174N, 198N, 214N, 272N, 326N, 380N, 542N, 590N, 697N, 704N, 763N, 778N, 817N, 831N, 842N, 898N, 942N, 1033N, 1149N, 1157N, 1201N, and 1210N of SEQ ID NO:2. Murine HAM also has putative glycosylation sites at 75N, 173N, 197N, 213N, 271N, 323N, 378N, 539N, 587N, 694N, 701N, 760N, 775N, 814N, 828N, 839N, 895N, 939N, 1030N, 1146N, 1154N, 1198N, and 1207N of SEQ ID NO:19. N-glycosylation sites in the polypeptide extracellular domain can be modified to preclude glycosylation, allowing expression of a reduced carbohydrate analog in mammalian and yeast expression systems. Accordingly, modifications (e.g., treatment with a glycopeptidase) or substitutions or deletions of these residues can modulate the activity of a mature HAM polypeptide of the invention.

Correspondingly, similar polynucleotide constructs that encode various additions or substitutions of amino acid residues or sequences, or deletions of terminal or internal residues or sequences are encompassed by the invention. Appropriate substitutions, additions, or deletions to the nucleotide sequence encoding these triplets (e.g., Asn-X-Y) will result in prevention of attachment of carbohydrate residues at the Asn side chain. Alteration of a single nucleotide, chosen so that Asn is replaced by a different amino acid, for example, is sufficient to inactivate an N-glycosylation site. Alternatively, a Ser or Thr in the triplet can be replaced with another amino acid, such as Ala. Known procedures for inactivating N-glycosylation sites in proteins include those described in U.S. Patent 5,071,972 and EP 276,846. One of skill in the art can identify the codons corresponding to the Asn residues for HAM as described above, as well as the Ser and Thr residues of the Asn-X-Y triplet.

In another example of variants, sequences encoding Cys residues that are not essential for biological activity can be altered to cause the Cys residues to be deleted or replaced with other amino acids, preventing formation of incorrect intramolecular disulfide bridges upon folding or renaturation. A number of putative conserved Cys residues of a HAM polypeptide of the invention are identified in the alignment provided in Figure 2 and Figure 4.

Other variants are prepared by modification of adjacent dibasic amino acid residues, to enhance expression in yeast systems in which KEX2 protease activity is present. EP 212,914 discloses the use of site-specific mutagenesis to inactivate KEX2 protease processing sites in a protein. KEX2 protease processing sites are inactivated by deleting, adding or substituting residues to alter Arg-Arg, Arg-Lys, and Lys-Arg pairs to eliminate the occurrence of these adjacent basic residues. Lys-Lys pairings are considerably less susceptible to KEX2 cleavage, and conversion of Arg-Lys or Lys-Arg to Lys-Lys represents a conservative and preferred approach to inactivating KEX2 sites.

Oligomers

Encompassed by the invention are oligomers and fusion polypeptides, that comprises a HAM polypeptide or a bioactive fragment thereof linked to a polypeptide of interest. In a preferred

WO 02/097120

PCT/US02/16391

embodiment, the fusion partner is linked to the C-terminus of the HAM polypeptide or a bioactive fragment thereof. Such oligomers may be in the form of covalently-linked or non-covalently-linked multimers, including dimers, trimers, or higher oligomers. As noted above, preferred polypeptides are soluble and thus these oligomers typically comprise soluble polypeptides. In one aspect of the invention, the oligomers maintain the binding ability of the polypeptide components and provide therefor, bivalent, trivalent, and the like, binding sites.

One embodiment of the invention is directed to oligomers comprising multiple polypeptides joined *via* covalent or non-covalent interactions between peptide moieties fused to the polypeptides. Such peptide moieties may be peptide linkers (spacers), or peptides that have the property of promoting oligomerization. Examples of peptide linkers include --Gly-Gly--, GGGGS (SEQ ID NO:4) (GGGGS)_n (SEQ ID NO:5), GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:6), GSTSGSGKSSEGKKG (SEQ ID NO:7), GSTSGSGKSSEGSSTKG (SEQ ID NO:8), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:9), or EGKSSGSGSEKKEF (SEQ ID NO:10). Linking moieties are described, for example, in Huston, J. S., *et al.*, PNAS 85:5879-5883 (1988), Whitlow, M., *et al.*, Protein Engineering 6:989-995 (1993), and Newton, D. L., *et al.*, Biochemistry 35:545-553 (1996). Other suitable peptide linkers are those described in U.S. Patents 4,751,180 and 4,935,233, which are hereby incorporated by reference. A polynucleotide encoding a desired peptide linker can be inserted between, and in the same reading frame as, a polynucleotide encoding a HAM polypeptide or bioactive fragment of the invention, using any suitable conventional technique. In particular embodiments, a fusion polypeptide comprises from two to four bioactive fragments of a HAM polypeptide (*e.g.*, a soluble fragment), separated by peptide linkers. In one embodiment, the invention provides a fusion polypeptide having an Fc polypeptide domain and a HAM polypeptide or bioactive fragment (*e.g.*, a fragment as set forth in SEQ ID NO:2 from about amino acid 61 to 1230). Leucine zippers and certain polypeptides derived from antibodies are among the peptides that can promote oligomerization of the polypeptides attached thereto, as described in more detail below.

As one alternative, an oligomer or fusion polypeptide is prepared using polypeptides derived from immunoglobulins. Preparation of fusion polypeptides comprising certain heterologous polypeptides fused to various portions of antibody-derived polypeptides (including the Fc domain) has been described, *e.g.*, by Ashkenazi *et al.* (PNAS USA 88:10535, 1991); Byrn *et al.* (Nature 344:677, 1990); and Hollenbaugh and Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1 - 10.19.11, 1992).

One embodiment of the present invention is directed to a dimer comprising two fusion proteins created by fusing a HAM polypeptide or bioactive fragment of the invention to an Fc polypeptide derived from an antibody. A gene fusion encoding a HAM polypeptide/Fc fusion protein is inserted into an appropriate expression vector. HAM polypeptide/Fc fusion proteins are expressed in host cells transformed with the recombinant expression vector, and allowed to assemble much like antibody molecules, whereupon interchain disulfide bonds form between the Fc moieties to yield divalent molecules.

An Fc polypeptide includes native and mutein forms of polypeptides made up of the Fc region of an antibody comprising any or all of the CH domains of the Fc region. Truncated forms of such

WO 02/097120

PCT/US02/16391

polypeptides containing the hinge region that promotes dimerization are also included. Preferred polypeptides comprise an Fc polypeptide derived from a human IgG1 antibody. The Fc polypeptides preferably are linked to the COOH-terminus of a HAM polypeptide or bioactive fragment of the invention.

5 One suitable Fc polypeptide, described in PCT application WO 93/10151 (hereby incorporated by reference), is a single chain polypeptide extending from the N-terminal hinge region to the native C-terminus of the Fc region of a human IgG1 antibody. Another useful Fc polypeptide is the Fc mutein described in U.S. Patent 5,457,035 and in Baum *et al.*, (*EMBO J.* 13:3992-4001, 1994) incorporated herein by reference. The amino acid sequence of this mutein is identical to that of the native Fc
10 sequence presented in WO 93/10151, except that amino acid 19 has been changed from Leu to Ala, amino acid 20 has been changed from Leu to Glu, and amino acid 22 has been changed from Gly to Ala. The mutein exhibits reduced affinity for Fc receptors.

The above-described fusion proteins comprising Fc moieties (and oligomers formed therefrom) offer the advantage of facile purification by affinity chromatography over Protein A or
15 Protein G columns.

In other embodiments, the polypeptides of the invention may be substituted for the variable portion of an antibody heavy or light chain. If fusion proteins are made with both heavy and light chains of an antibody, it is possible, for example, to form an oligomer with as many as four HAM extracellular regions.

20 Another method for preparing the oligomers of the invention involves use of a leucine zipper. Leucine zipper domains are peptides that promote oligomerization of the proteins in which they are found. Leucine zippers were originally identified in several DNA-binding proteins (Landschulz *et al.*, *Science* 240:1759, 1988), and have since been found in a variety of different proteins. Among the known leucine zippers are naturally occurring peptides and derivatives thereof that dimerize or
25 trimerize.

The zipper domain (also referred to herein as an oligomerizing, or oligomer-forming, domain) comprises a repetitive heptad repeat, often with four or five leucine residues interspersed with other amino acids. Examples of zipper domains are those found in the yeast transcription factor GCN4 and a heat-stable DNA-binding protein found in rat liver (CEBP; Landschulz *et al.*, *Science* 243:1681,
30 1989). Two nuclear transforming proteins, *fos* and *jun*, also exhibit zipper domains, as does the gene product of the murine proto-oncogene, *c-myc* (Landschulz *et al.*, *Science* 240:1759, 1988). The products of the nuclear oncogenes *fos* and *jun* comprise zipper domains that preferentially form heterodimer (O'Shea *et al.*, *Science* 245:646, 1989, Turner and Tjian, *Science* 243:1689, 1989).

The fusogenic proteins of several different viruses, including paramyxovirus, coronavirus,
35 measles virus and many retroviruses, also possess zipper domains (Buckland and Wild, *Nature* 338:547, 1989; Britton, *Nature* 353:394, 1991; Delwart and Mosialos, *AIDS Research and Human Retroviruses* 6:703, 1990). The zipper domains in these fusogenic viral proteins are near the transmembrane region of the proteins; it has been suggested that the zipper domains could contribute to the oligomeric structure of the fusogenic proteins. Oligomerization of fusogenic viral proteins is
40 involved in fusion pore formation (Spruce *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3523, 1991). Zipper

WO 02/097120

PCT/US02/16391

domains have also been reported to play a role in oligomerization of heat-shock transcription factors (Rabindran *et al.*, *Science* 259:230, 1993).

Zipper domains fold as short, parallel coiled coils (O'Shea *et al.*, *Science* 254:539, 1991). The general architecture of the parallel coiled coil has been characterized, with a "knobs-into-holes" packing as proposed by Crick in 1953 (*Acta Crystallogr.* 6:689). The dimer formed by a zipper domain is stabilized by the heptad repeat, designated $(abcdefg)_n$ according to the notation of McLachlan and Stewart (*J. Mol. Biol.* 98:293; 1975), in which residues *a* and *d* are generally hydrophobic residues, with *d* being a leucine, which line up on the same face of a helix. Oppositely-charged residues commonly occur at positions *g* and *e*. Thus, in a parallel coiled coil formed from two helical zipper domains, the "knobs" formed by the hydrophobic side chains of the first helix are packed into the "holes" formed between the side chains of the second helix.

The residues at position *d* (often leucine) contribute large hydrophobic stabilization energies, and are important for oligomer formation (Krystek: *et al.*, *Int. J. Peptide Res.* 38:229, 1991). Lovejoy *et al.* (*Science* 259:1288, 1993) reported the synthesis of a triple-stranded α -helical bundle in which the helices run up-up-down. Their studies confirmed that hydrophobic stabilization energy provides the main driving force for the formation of coiled coils from helical monomers. These studies also indicate that electrostatic interactions contribute to the stoichiometry and geometry of coiled coils. Additional discussion of the structure of leucine zippers is found in Harbury *et al.* (*Science* 262:1401, 26 November 1993).

Examples of leucine zipper domains suitable for producing soluble oligomeric proteins include the leucine zipper described in PCT application WO 94/10308 and the leucine zipper derived from lung surfactant protein D (SPD) described in Hoppe *et al.* (*FEBS Letters* 344:191, 1994), hereby incorporated by reference. The use of a modified leucine zipper that allows for stable trimerization of a heterologous protein fused thereto is described in Fanslow *et al.* (*Semin. Immunol.* 6:267-278, 1994). Recombinant fusion proteins comprising a bioactive fragment of the invention (e.g., a soluble fragment) fused to a leucine zipper peptide are expressed in suitable host cells, and the soluble oligomer that forms is recovered from the culture supernatant.

Certain leucine zipper moieties form trimers. One example is a leucine zipper derived from lung surfactant protein D (SPD) noted above, as described in Hoppe *et al.* and in U.S. Patent 5,716,805, hereby incorporated by reference in their entirety. This lung SPD-derived leucine zipper peptide comprises the amino acid sequence: Pro-Asp-Val-Ala-Ser-Leu-Arg-Gln-Gln-Val-Glu-Ala-Leu-Gln-Gly-Gln-Val-Gln-His-Leu-Gln-Ala-Ala-Phe-Ser-Gln-Tyr (SEQ ID NO:11).

Another example of a leucine zipper that promotes trimerization is a peptide comprising the amino acid sequence Arg-Met-Lys-Gln-Ile-Glu-Asp-Lys-Ile-Glu-Glu-Ile-Leu-Ser-Lys-Ile-Tyr-His-Ile-Glu-Asn-Glu-Ile-Ala-Arg-Ile-Lys-Lys-Leu-Ile-Gly-Glu-Arg (SEQ ID NO:12), as described in U.S. Patent 5,716,805. In one alternative embodiment, an N-terminal Asp residue is added; in another, the peptide lacks the N-terminal Arg residue.

Fragments of the foregoing zipper peptides that retain the property of promoting oligomerization may be employed as well. Examples of such fragments include, but are not limited to, peptides lacking one or two of the N-terminal or C-terminal residues presented in the foregoing amino

WO 02/097120

PCT/US02/16391

acid sequences. Leucine zippers may be derived from naturally occurring leucine zipper peptides, e.g., via conservative substitution(s) in the native amino acid sequence, wherein the peptide's ability to promote oligomerization is retained. In particular embodiments, leucine residues in a leucine zipper moiety are replaced by isoleucine residues. Such peptides comprising isoleucine may be referred to as isoleucine zippers, but are encompassed by the term "leucine zippers" as employed herein.

Antibodies

The polypeptides, fragments (e.g., soluble or bioactive fragments), variants, fusion proteins, and the like, as set forth above may be employed as "immunogens" in producing antibodies immunoreactive therewith. More specifically, the polypeptides, fragment, variants, fusion proteins, and the like, contain antigenic determinants or epitopes that elicit the formation of antibodies. Suitable antigenic determinants or epitopes may be either linear or conformational (discontinuous). Linear epitopes are composed of a linear series of amino acids linked to one another by covalent bonds, while conformational or discontinuous epitopes are composed of amino acids sections from different regions of the polypeptide chain that are brought into close proximity upon protein folding (C. A. Janeway, Jr. and P. Travers, *Immuno Biology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). Because folded proteins have complex surfaces, the number of epitopes available is quite numerous; however, due to the conformation of the protein and steric hinderances, the number of antibodies that actually bind to the epitopes is less than the number of available epitopes (C. A. Janeway, Jr. and P. Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). Epitopes may be identified by any number of methods known in the art.

The epitopes derived from the disclosed polypeptides are useful for raising antibodies, including monoclonal antibodies, and can be used as research reagents, in assays, and to purify specific binding antibodies from substances such as polyclonal sera or supernatants from cultured hybridomas. Such epitopes or variants thereof can be produced using techniques well known in the art such as solid-phase synthesis, chemical or enzymatic cleavage of a polypeptide, or using recombinant DNA technology.

The polyclonal and monoclonal antibodies elicited by the disclosed polypeptides, whether the epitopes have been isolated or remain part of the polypeptides, may be prepared by conventional techniques. See, for example, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, New York (1980); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies specific for the polypeptides of the invention are also contemplated herein, and may be produced and identified by conventional techniques. One method for producing such a hybridoma cell line comprises immunizing an animal with a polypeptide; harvesting spleen cells from the immunized animal; fusing said spleen cells to a myeloma cell line, thereby generating hybridoma cells; and identifying a hybridoma cell line that produces a monoclonal antibody that binds the polypeptide. The monoclonal antibodies may be recovered by conventional techniques.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

The monoclonal antibodies of the present invention include chimeric antibodies, *e.g.*, humanized versions of murine monoclonal antibodies. Such humanized antibodies may be prepared by known techniques and offer the advantage of reduced immunogenicity when the antibodies are administered to humans, such as for therapeutic purposes. In one embodiment, a humanized monoclonal antibody comprises the variable region of a murine antibody (or just the antigen-binding site thereof) and a constant region derived from a human antibody. Alternatively, a humanized antibody fragment may comprise the antigen-binding site of a murine monoclonal antibody and a variable region fragment (lacking the antigen-binding site) derived from a human antibody. Procedures for the production of chimeric and further engineered monoclonal antibodies include those described in Riechmann *et al.* (*Nature* 332:323, 1988), Liu *et al.* (*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick *et al.* (*Bio/Technology* 7:934, 1989), and Winter and Harris (*TIPS* 14:139, May, 1993). Procedures to generate antibodies transgenically can be found in GB 2,272,440, US Patent Nos. 5,569,825 and 5,545,806 and related patents claiming priority therefrom, all of which are incorporated by reference herein. Procedures to generate antibodies transgenically can be found in GB 2,272,440, US Patent Nos. 5,569,825 and 5,545,806 and related patents claiming priority therefrom, all of which are incorporated by reference herein. Preferably, for use in humans, the antibodies are human; techniques for creating such human antibodies are also known and transgenic mice useful for creating such antibodies are commercially available from, for example, Medarex Inc. (Princeton, NJ) and Abgenix Inc. (Fremont, CA).

Antigen-binding fragments of the antibodies, which may be produced by conventional techniques, are also encompassed by the present invention. Examples of such fragments include, but are not limited to, scFv, Fab and F(ab)₂ fragments. Antibody fragments and derivatives produced by genetic engineering techniques are also provided.

The antibodies of the invention can be used in assays to detect the presence of the polypeptides or fragments of the invention, either *in vitro* or *in vivo*. The antibodies also may be employed in purifying polypeptides or fragments of the invention by immunoaffinity chromatography.

Those antibodies that block binding of the polypeptides of the invention to their binding partners may be used to inhibit a biological activity that results from such binding. Such blocking antibodies may be identified using any suitable assay procedure, such as by testing antibodies for the ability to inhibit binding of a HAM polypeptide or bioactive fragment thereof to certain cells expressing the binding partners of such polypeptide or fragment. Alternatively, blocking antibodies may be identified in assays for the ability to inhibit a biological effect that results from binding of the polypeptides of the invention to target cells. Antibodies may be assayed for the ability to inhibit HAM polypeptide-mediated cellular activities, for example.

Such antibodies may be employed in *in vitro* procedures, or administered *in vivo* to inhibit a biological activity mediated by the polypeptide to which the antibody binds. Disorders caused or exacerbated (directly or indirectly) by the interaction of the polypeptides of the invention with cell surface (binding partner) receptor thus may be treated. A therapeutic method involves *in vivo* administration of a blocking antibody to a mammal in an amount effective in inhibiting a HAM polypeptide-mediated biological activity. Monoclonal antibodies are generally preferred for use in such

WO 02/097120

PCT/US02/16391

therapeutic methods. In one embodiment, an antigen-binding antibody fragment is employed. In addition, therapeutics of diagnostic labels may be conjugated to the antibodies of the invention thereby targeting the therapeutic or diagnostic to cells expressing a HAM polypeptide.

Antibodies may be screened for agonistic (*i.e.*, HAM-mimicking) properties. An agonistic antibody includes antibodies that bind to HAM and activate HAM (*e.g.*, by cross-linking the HAM molecule). Such antibodies, upon binding to HAM cognate on a cell surface, induce biological effects (*e.g.*, transduction of biological signals) similar to the biological effects induced when a HAM polypeptide binds to cell surface ligands.

Compositions comprising an antibody that is directed against a HAM polypeptide or fragment thereof and a physiologically acceptable diluent, excipient, or carrier, are provided herein. Suitable components of such compositions are as described here and are similar to those described for compositions containing a HAM polypeptide or fragment thereof. Also provided herein are conjugates comprising a detectable (*e.g.*, diagnostic) or therapeutic agent, attached to the antibody. The conjugates find use in *in vitro* or *in vivo* procedures.

15

Polynucleotides

The invention also provides polynucleotides encoding HAM polypeptides and bioactive fragments thereof. The term "polynucleotide" refers to a polymeric form of nucleotides of at least 10 bases in length. The nucleotides can be ribonucleotides, deoxyribonucleotides, or modified forms of either type of nucleotide. The term includes single and double stranded forms of DNA or RNA. DNA includes, for example, cDNA, genomic DNA (*e.g.*, a sequence containing introns and exons), chemically synthesized DNA, DNA amplified by PCR, and combinations thereof. The polynucleotides of the invention include full-length genes and cDNA molecules as well as a combination of fragments thereof. The polynucleotides of the invention are preferentially derived from human sources, but the invention includes those derived from non-human species, as well.

By "isolated polynucleotide" is meant a polynucleotide that is not immediately contiguous with both of the coding sequences with which it is immediately contiguous (one on the 5' end and one on the 3' end) in the naturally occurring genome of the organism from which it is derived. The term therefore includes, for example, a recombinant polynucleotide molecule, which is incorporated into a vector, *e.g.*, an expression vector, into an autonomously replicating plasmid or virus; or into the genomic DNA of a prokaryote or eukaryote, or which exists as a separate molecule (*e.g.*, a cDNA) independent of other sequences.

A polynucleotide of the invention comprises (1) a sequence as set forth in SEQ ID NO:1 or 18; (2) sequences complementary to a sequence as set forth in SEQ ID NO:1 or 18; (3) fragments of SEQ ID NO:1 or 18 or their complements that specifically hybridize to the polynucleotide of (1) or (2) under moderate to highly stringent conditions, wherein the fragments are about 50 to 100 consecutive bases in length, 200 to 300 consecutive bases in length, or 500 to 1000 consecutive bases in length or longer; and (4) sequences of (1), (2), or (3) wherein T can also be U (*e.g.*, RNA sequences). Also encompassed by the invention are homologues of a polynucleotide of the invention. These homologues can be identified in several ways, including isolation of genomic or cDNA molecules from a suitable

40

WO 02/097120

PCT/US02/16391

source, or computer searches of available sequence databases. Oligonucleotides or polynucleotides corresponding to the amino acid sequences described herein can be used as probes or primers for the isolation of polynucleotide homologues or as query sequences for database searches. Degenerate oligonucleotide sequences can be obtained by "back-translation" from the amino acid sequences (e.g., a sequence of SEQ ID NO:2 or 19). The polymerase chain reaction (PCR) procedure can be employed to isolate and amplify a polynucleotide encoding a HAM polypeptide. Fragments of the polynucleotides of the invention are useful as probes and primers to identify or amplify related sequence or obtain full-length sequences of a HAM polynucleotide of the invention. The oligonucleotides can additionally contain recognition sites for restriction endonucleases, to facilitate insertion of the amplified combination of DNA fragments into an expression vector. PCR techniques are described in Saiki *et al.*, Science 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu *et al.*, eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; and PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*, eds., Academic Press, Inc. (1990).

The invention also includes polynucleotides and oligonucleotides that hybridize under reduced stringency conditions, more preferably moderately stringent conditions, and most preferably highly stringent conditions, to polynucleotides encoding HAM polypeptides described herein. The basic parameters affecting the choice of hybridization conditions and guidance for devising suitable conditions are set forth by Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; and Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F. M. Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4, incorporated herein by reference), and can be readily determined by those having ordinary skill in the art based on, for example, the length and/or base composition of the nucleic acid. One way of achieving moderately stringent conditions involves the use of a prewashing solution containing 5 x SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0), hybridization buffer of about 50% formamide, 6 x SSC, and a hybridization temperature of about 55 °C (or other similar hybridization solutions, such as one containing about 50% formamide, with a hybridization temperature of about 42 °C), and washing conditions of about 60 °C, in 0.5 x SSC, 0.1% SDS. Generally, highly stringent conditions are defined as hybridization conditions as above, but with washing at approximately 68 °C, 0.2 x SSC, 0.1% SDS. SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, and 1.25 mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15 mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 minutes after hybridization is complete. It should be understood that the wash temperature and wash salt concentration can be adjusted as necessary to achieve a desired degree of stringency by applying the basic principles that govern hybridization reactions and duplex stability, as known to those skilled in the art and described further below (see, e.g., Sambrook *et al.*, 1989). When hybridizing a nucleic acid to a target polynucleotide of unknown sequence, the hybrid length is assumed to be that of the hybridizing nucleic acid. When nucleic acids of known sequence are hybridized, the hybrid length can be determined by aligning the sequences of the nucleic acids and identifying the region or regions of optimal sequence complementarity. The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5 to 10 °C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the

WO 02/097120

PCT/US02/16391

following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(\# \text{ of } A + T \text{ bases}) + 4(\# \text{ of } G + C \text{ bases})$. For hybrids above 18 base pairs in length, $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41(\% G + C) - (600/N)$, where N is the number of bases in the hybrid, and $[\text{Na}^+]$ is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ($[\text{Na}^+]$ for 1xSSC = 0.165M). Preferably, each such hybridizing nucleic acid has a length that is at least 25% (more preferably at least 50%, or at least 60%, or at least 70%, and most preferably at least 80%) of the length of the nucleic acid of the invention to which it hybridizes, and has at least 60% sequence identity (more preferably at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, or at least 99%, and most preferably at least 99.5%) with the polynucleotide of the invention to which it hybridizes.

Other embodiments of the invention include polynucleotides having sequences that encode discrete domains of a HAM polypeptide having a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19. Computer analysis predicts that the signal peptide of the HAM polypeptides is most likely to be cleaved after residue 60 of SEQ ID NO:2 and after residue 59 of SEQ ID NO:19, though other possible cleavage sites include after amino acids 54, 55, 59, 172, or 173. These cleavage sites predict a mature HAM polypeptide comprising from about amino acid 55 to 1379, from about 56 to 1379, from about 60 to 1379, from about 61 to 1379, or from about 174 to 1379 of SEQ ID NO:2, and from about 55 to 1376, from about 56 to 1376, from about 60 to 1376, from about 61 to 1376, or from about 173 to 1376 of SEQ ID NO:19. The EGF-like domains located, for example, at about amino acids 63-90, 211-243, and 261-280 of SEQ ID NO:2 are likely to be involved in extracellular signaling or cellular guidance. A CUB domain, a KELCH motif, a C-type Lectin or carbohydrate-recognition domain, a putative ligand binding motif of the common gamma cytokine chain, and a Laminin EGF-like domain located at about amino acids 93-208, 581-612, 749-873, 670-686, and 1014-1055 of SEQ ID NO:2, respectively (see Figure 3). A transmembrane region is present at about amino acids 1231 to 1251, and a cytoplasmic domain at about amino acids 1252 to 1379 of SEQ ID NO:2. Thus, the invention provides polynucleotides encoding these discrete polypeptide fragments, as well as the polypeptide fragments comprising each domain separately or in various combinations. The invention provides polynucleotides comprising from about nucleotide 1-162, from about 1-165, from about 1-177, from about 1-180, or from about 1-522 of SEQ ID NO:1, which encode the signal peptides residing at about amino acids 1-54, 1-55, 1-59, 1-60, or 1-173 of SEQ ID NO:2; from about nucleotides 163-4137, from about 166-4137, from about 178-4137, from about 181-4137, or from about 523-4137 of SEQ ID NO:1, which encode mature HAM polypeptides comprising, respectively, amino acids 55-1379, 56-1379, 60-1379, 61-1379, or 174-1379 of SEQ ID NO:2; nucleotides 3691-3753 of SEQ ID NO:1, encoding a transmembrane region comprising amino acids 1231-1251 of SEQ ID NO:2; nucleotides 163-3690, 166-3690, 178-3690, 181-3690, or 523-3690 of SEQ ID NO:1, encoding extracellular domains of the HAM polypeptide comprising amino acids 55-1230, 56-1230, 60-1230, 61-1230, or 174-1230, respectively, of SEQ ID NO:2; and nucleotides 3754-4137 of SEQ ID NO:1, encoding a cytoplasmic domain comprising amino acids 1252-1379 of SEQ ID NO:2.

In addition, the invention provides polynucleotides comprising from about nucleotides 1-177 of SEQ ID NO:18, which encode the signal peptide residing at about amino acids 1-59 of SEQ ID NO:19; from about nucleotides 173-4128 of SEQ ID NO:18, which encodes a mature murine HAM

WO 02/097120

PCT/US02/16391

polypeptide comprising amino acids 60-1376 of SEQ ID NO:19; and from about nucleotides 178-3681 of SEQ ID NO:18, encoding an extracellular domain of a murine HAM polypeptide comprising amino acids 60-1227 of SEQ ID NO:19.

Polynucleotides of the invention may be used in developing treatments for any disorder mediated (directly or indirectly) by defective, or insufficient amounts of, the genes corresponding to the polynucleotides of the invention. Disclosure herein of sequences corresponding to the polynucleotides of the invention permits the detection of defective genes, and the replacement thereof with normal genes. Defective genes may be detected in *in vitro* diagnostic assays, and by comparison of the polynucleotide sequences disclosed herein with that of a gene derived from a subject suspected of harboring a defect in the genes.

Expression, isolation and purification of the polypeptides and fragments of the invention may be accomplished by any suitable technique, including the utilization of expression systems such as those known in the art as well as those described herein. In one embodiment, the invention provides an expression vector comprising a polynucleotide encoding a HAM polypeptide of the invention. The polynucleotide of the invention (e.g., a polynucleotide comprising a sequence as set forth in SEQ ID NO:1 or 18) may be operably inserted into, for example, a commercially available expression vector by recombinant techniques known in the art. Typically the polynucleotide will be inserted downstream (or 3') of and operably linked to a control or regulatory sequence. As used herein, a "control sequence" or "regulatory sequence" are used interchangeably to include a promoter, enhancer-promoter combination, or other sequence that effects the expression or transcription of the downstream polynucleotide sequence. A promoter is a transcriptional regulatory element composed of a region of a DNA molecule typically within 100 nucleotide pairs in front of (upstream of) the point at which transcription starts. Another transcriptional regulatory element is an enhancer, which provides specificity in terms of time, location, and expression level. Unlike a promoter, an enhancer can function when located at variable distances from the transcription site, provided a promoter is present. An enhancer can also be located downstream of the transcription initiation site. Other regulatory sequences include transcription termination sequence, internal ribosome entry sites (IRES), and the like.

Typically, to bring a coding sequence under control of a promoter, it is necessary to position the translation initiation site of the translational reading frame of the peptide or polypeptide between one and about fifty nucleotides downstream (3') of the promoter. Such regulatory elements include but are not limited to the cytomegalovirus hCMV immediate early gene, the early or late promoters of SV40 adenovirus, the lac system, the trp system, the TAC system, the TRC system, the major operator and promoter regions of phage A, the control regions of fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase, the promoters of acid phosphatase, and the promoters of the yeast α -mating factors, to name a few.

Expression vectors and methods for their construction are known to those skilled in the art (Ausubel *et al.*, cited herein). Suitable vectors include plasmids, and viral vectors such as herpes viruses, retroviruses, canary poxviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses, among others, and derivatives thereof.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

A polynucleotide and regulatory sequences are "operably linked" when they are connected in such a way as to permit expression when the coding sequence (e.g., the HAM coding sequence) of the polynucleotide is bound to the regulatory sequences, e.g., within an expression vector. An origin of replication that confers the ability to replicate in the desired host cells, and a selection gene (e.g., kan^r, amp^r) by which transformants are identified, are generally incorporated into the expression vector.

Expression vectors comprising a polynucleotide of the invention may be used to prepare the polypeptides or fragments of the invention encoded by the polynucleotide. A method for producing polypeptides comprises culturing host cells transformed or transfected with a recombinant expression vector encoding the polypeptide, under conditions that promote expression of the polypeptide, then recovering the expressed polypeptides from the cells or from culture medium in which the host cell is grown. The procedure for purifying the expressed polypeptides will vary according to the type of host cells employed, and whether the polypeptide is membrane-bound or is a secreted soluble form of the polypeptide.

In addition, a sequence encoding an appropriate signal peptide (native or heterologous) can be incorporated into expression vectors. A DNA sequence for a signal peptide may be fused in frame to a polynucleotide sequence of the invention so that the polynucleotide is initially transcribed, and the mRNA translated, into a fusion protein comprising the signal peptide. Signal peptides may be employed that direct transmembrane proteins to the cell surface or different signal peptides may be used that promote the secretion of a soluble form of the protein. Generally, the signal peptide is cleaved during maturation of the protein. A polynucleotide encoding a localization sequence, or signal sequence, can be ligated or fused at the 5' terminus of a polynucleotide encoding a HAM polypeptide such that the signal peptide is located at the amino terminal end of the resulting fusion polynucleotide/polypeptide. In eukaryotes, the signal peptide functions to transport the fusion polypeptide across the endoplasmic reticulum. The secretory protein is then transported through the Golgi apparatus, into secretory vesicles and into the extracellular space or, preferably, the external environment. Signal peptides, which can be utilized according to the invention, include pre-pro peptides, which contain a proteolytic enzyme recognition site.

The localization sequence can be a nuclear localization sequence, an endoplasmic reticulum localization sequence, a peroxisome localization sequence, a mitochondrial localization sequence, or a localized protein. Localization sequences can be targeting sequences that are described, for example, in "Protein Targeting", chapter 35 of Stryer, L., *Biochemistry* (4th ed.), W. H. Freeman, 1995. Some important localization sequences include those targeting the nucleus (e.g., KKKRK (SEQ ID NO:13)), mitochondrion (MLRTSSLFTRRVQPSLFRNLRQLQST (SEQ ID NO:14)), endoplasmic reticulum (KDEL (SEQ ID NO:15)), peroxisome (SKF), prenylation or insertion into plasma membrane (CAAX (SEQ ID NO:16), CC, CXC, or CCXX (SEQ ID NO:17)), cytoplasmic side of plasma membrane (fusion to SNAP-25), or the Golgi apparatus (fusion to furin). Other examples of heterologous signal peptides that are functional in mammalian host cells include the signal sequence for interleukin-7 (IL-7) described in United States Patent 4,965,195; the signal sequence for interleukin-2 receptor described in Cosman *et al.*, *Nature* 312:768 (1984); the interleukin-4 receptor signal peptide described in EP

WO 02/097120

PCT/US02/16391

367,566; the type I interleukin-1 receptor signal peptide described in U.S. Patent 4,968,607; and the type II interleukin-1 receptor signal peptide described in EP 460,846.

The skilled artisan will also recognize that the position(s) at which the signal peptide is cleaved may differ from that predicted by computer program, and may vary according to such factors as the type of host cells employed in expressing a recombinant polypeptide. A protein preparation may include a mixture of protein molecules having different N-terminal amino acids, resulting from cleavage of the signal peptide at more than one site. Particular embodiments of mature HAM polypeptides provided herein having a native signal sequence include, but are not limited to, polypeptides wherein the N-terminus amino acid is any amino acid between 55 and 61 of SEQ ID NO:2.

Suitable host cells for expression of polypeptides include prokaryotes (e.g., *E. coli*), yeast, plant cells, and insect or higher eukaryotic cells. Most typically, yeast or mammalian cells are used. Appropriate cloning and expression vectors for use with bacterial, fungal, yeast, and mammalian cellular hosts are described, for example, in Pouwels *et al.* Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, (1985). Cell-free translation systems could also be employed to produce polypeptides using RNAs derived from DNA constructs disclosed herein.

Suitable prokaryotic host cells for transformation may be gram-negative or gram-positive, and include, for example, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, and various other species within the genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*. In a prokaryotic host cell, such as *E. coli*, a polypeptide may include an N-terminal methionine (met) residue to facilitate expression of the recombinant polypeptide in the prokaryotic host cell. The N-terminal Met may be cleaved from the expressed recombinant polypeptide.

Expression vectors for use in prokaryotic host cells generally comprise one or more phenotypic selectable marker genes, which may include, for example, a gene encoding a protein that confers antibiotic resistance or that supplies an autotrophic requirement. Useful prokaryotic expression vectors include those derived from commercially available plasmids such as the cloning vector pBR322 (ATCC 37017), with ampicillin and tetracycline resistance genes. Other suitable vectors include, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). An appropriate promoter and a polynucleotide sequence encoding the desired polypeptide may be inserted into the vector.

Promoter sequences commonly used for recombinant prokaryotic host cell expression vectors include β -lactamase (penicillinase), lactose promoter system (Chang *et al.*, Nature 275:615, 1978; and Goeddel *et al.*, Nature 281:544, 1979), tryptophan (trp) promoter system (Goeddel *et al.*, Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980) and tac promoter (Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, first ed., Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982). A particularly useful prokaryotic host cell expression system employs a phage λ PL promoter and a c1857ts thermolabile repressor sequence. Plasmid vectors available from the American Type Culture Collection which incorporate derivatives of the λ PL promoter include plasmid pHUB2 (resident in *E. coli* strain JMB9, ATCC 37092) and pPLc28 (resident in *E. coli* RR1, ATCC 53082).

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Alternatively, the polypeptides may be expressed in yeast host cells, such as from the *Saccharomyces* genus (e.g., *S. cerevisiae*). Alternatively, *Pichia*, *Kluyveromyces*, or other yeast genera may be employed. Yeast vectors will often contain an origin of replication sequence from a 2 μ yeast plasmid, an autonomously replicating sequence (ARS), a promoter region, sequences for polyadenylation, sequences for transcription termination, and a selectable marker gene. Suitable promoter sequences include those derived from the yeast metallothionein or 3-phosphoglycerate kinase genes (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 255:2073, 1980) or other genes encoding glycolytic enzymes (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968; and Holland *et al.*, *Biochem.* 17:4900, 1978), such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phospho-glucose isomerase, and glucokinase. Other suitable vectors and promoters for use in yeast expression are known in the art (e.g., see in Hitzeman, EPA-73,657; Russell *et al.*, *J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982; and Beier *et al.*, *Nature* 300:724, 1982).

The yeast α -factor leader sequence may be employed to direct secretion of the polypeptide, and often is inserted between the promoter sequence and the structural gene sequence (e.g., Kurjan *et al.*, *Cell* 30:933, 1982 and Bitter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330, 1984).

Yeast transformation protocols are known to those of skill in the art, including a protocol involving selection for Trp⁺ transformants in a medium containing yeast nitrogen base, casamino acids, glucose, 10 mg/ml adenine and 20 mg/ml uracil (see, e.g., Hinnen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978). In other protocols, yeast cells transformed by vectors containing an ADH2 promoter sequence may be grown in a "rich" medium. An example of a rich medium is one consisting of 1% yeast extract, 2% peptone, and 1% glucose supplemented with 80 mg/ml adenine and 80 mg/ml uracil. Derepression of the ADH2 promoter occurs when glucose is exhausted from the medium.

Mammalian or insect host cell culture systems also may be employed to express recombinant polypeptides, such as the baculovirus systems reviewed by Luckow and Summers, *BioTechnology* 6:47 (1988). Established cell lines of mammalian origin also may be employed. Examples of suitable mammalian host cell lines include the COS-7 line of monkey kidney cells (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, *Cell* 23:175, 1981), L cells, C127 cells, 3T3 cells (ATCC CCL 163), Chinese hamster ovary (CHO) cells, HeLa cells, and BHK (ATCC CRL 10) cell lines, and the CV1/EBNA cell line derived from the African green monkey kidney cell line CV1 (ATCC CCL 70) as described by McMahan *et al.* (*EMBO J.* 10:2821, 1991).

Established methods for introducing polynucleotides into mammalian cells have been described (Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69). Additional protocols using commercially available reagents, such as Lipofectamine lipid reagent (Gibco/BRL) or Lipofectamine-Plus lipid reagent, can be used to transfect cells (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1987). In addition, electroporation can be used to transfect mammalian cells using conventional procedures, such as those in Sambrook *et al.*, 1989. Selection of stable transformants can be performed using methods known in the art, such as, for example, resistance to cytotoxic drugs. Kaufman *et al.*, *Meth. in Enzymology* 185:487-511, 1990, describes several selection schemes, such as dihydrofolate reductase (DHFR) resistance. A suitable host strain for DHFR selection is CHO strain

WO 02/097120

PCT/US02/16391

DX-B11, which is deficient in DHFR (Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980). A plasmid expressing the DHFR cDNA can be introduced into strain DX-B11, and only cells that contain the plasmid can grow in the appropriate selective media. Other examples of selectable markers include genes conferring resistance to antibiotics, such as G418 and hygromycin B, which permit selection of cells harboring the vector on the basis of resistance to these agents.

Transcriptional and translational control sequences for mammalian host cell expression vectors can be excised from viral genomes. Commonly used promoter sequences and enhancer sequences are derived from polyoma virus, adenovirus 2, simian virus 40 (SV40), and human cytomegalovirus. Polynucleotide sequences derived from the SV40 viral genome, for example, SV40 origin, early and late promoter, enhancer, splice, and polyadenylation sites can be used to provide other genetic elements for expression of a structural gene sequence in a mammalian host cell. Viral early and late promoters are particularly useful because both are easily obtained from a viral genome as a fragment, which can also contain a viral origin of replication (Fiers *et al.*, Nature 273:113, 1978; Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990). Smaller or larger SV40 fragments can also be used, provided the approximately 250 bp sequence extending from the Hind III site toward the Bgl I site located in the SV40 viral origin of replication site is included.

Additional control sequences shown to improve expression of heterologous genes from mammalian expression vectors include such elements as the expression augmenting sequence element (EASE) derived from CHO cells (Morris *et al.*, Animal Cell Technology, 1997, pp. 529-534 and PCT Application WO 97/25420) and the tripartite leader (TPL) and VA gene RNAs from Adenovirus 2 (Gingeras *et al.*, J. Biol. Chem. 257:13475-13491, 1982). The internal ribosome entry site (IRES) sequences of viral origin allows dicistronic mRNAs to be translated efficiently (Oh and Sarnow, Current Opinion in Genetics and Development 3:295-300, 1993; Ramesh *et al.*, Nucleic Acids Research 24:2697-2700, 1996). Expression of a heterologous cDNA as part of a dicistronic mRNA followed by the gene for a selectable marker (e.g. DHFR) has been shown to improve transfectability of the host and expression of the heterologous polynucleotides (Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990). Exemplary expression vectors that employ dicistronic mRNAs are pTR-DC/GFP described by Mosser *et al.*, Biotechniques 22:150-161, 1997, and p2A51 described by Morris *et al.*, Animal Cell Technology, 1997, pp. 529-534.

A useful high expression vector, pCAVNOT, has been described by Mosley *et al.*, Cell 59:335-348, 1989. Other expression vectors for use in mammalian host cells can be constructed as disclosed by Okayama and Berg (Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983). A useful system for stable high level expression of mammalian cDNAs in C127 murine mammary epithelial cells can be constructed substantially as described by Cosman *et al.* (Mol. Immunol. 23:935, 1986). A useful high expression vector, PMLSV N1/N4, described by Cosman *et al.*, Nature 312:768, 1984, has been deposited as ATCC 39890. Additional useful mammalian expression vectors are described in EP-A-0367566, and in WO 91/18982, incorporated by reference herein. In yet another alternative, the vectors can be derived from retroviruses.

Additional useful expression vectors, pFLAG® and pDC311, can also be used. FLAG® technology is centered on the fusion of a low molecular weight (1kD), hydrophilic, FLAG® marker

WO 02/097120

PCT/US02/16391

peptide to the N-terminus of a recombinant protein expressed by pFLAG® expression vectors. pDC311 is another specialized vector used for expressing proteins in CHO cells. pDC311 is characterized by a bicistronic sequence containing the gene of interest and a dihydrofolate reductase (DHFR) gene with an internal ribosome binding site for DHFR translation, an expression augmenting sequence element (EASE), the human CMV promoter, a tripartite leader sequence, and a polyadenylation site.

5 Other useful fragments of the disclosed polynucleotides include antisense or sense oligonucleotides comprising a single-stranded polynucleotide sequence (either RNA or DNA) capable of binding to target mRNA (sense) or DNA (antisense) sequences. Antisense or sense oligonucleotides, according to the present invention, comprise fragments of the polynucleotide having a sequence as set forth in SEQ ID NO.1 or 18. Such a fragment generally comprises at least about 14 nucleotides, preferably from about 14 to about 30 nucleotides. The ability to derive an antisense or a sense oligonucleotide, based upon a nucleic acid sequence encoding a given protein is described in, for example, Stein and Cohen (*Cancer Res.* 48:2659, 1988) and van der Krol *et al.* (*BioTechniques* 6:958, 1988).

15 Binding of antisense or sense oligonucleotides to target nucleic acids results in the formation of duplexes that block or inhibit protein expression by one of several means, including enhanced degradation of the mRNA by RNase H, inhibition of splicing, premature termination of transcription or translation, or by other means. The antisense oligonucleotides thus may be used to block expression of proteins. Antisense or sense oligonucleotides further comprise oligonucleotides having modified sugar-phosphodiester backbones (or other sugar linkages, such as those described in WO91/06629) and wherein such sugar linkages are resistant to endogenous nucleases. Such oligonucleotides with resistant sugar linkages are stable *in vivo* (*i.e.*, capable of resisting enzymatic degradation) but retain sequence specificity to be able to bind to target nucleic acids.

20 Other examples of sense or antisense oligonucleotides include those oligonucleotides which are covalently linked to organic moieties, such as those described in WO 90/10448, and other moieties that increases affinity of the oligonucleotide for a target nucleic acid, such as poly- (L)-lysine. Further still, intercalating agents, such as ellipticine, and alkylating agents or metal complexes may be attached to sense or antisense oligonucleotides to modify binding specificities of the antisense or sense oligonucleotide for the target nucleotide sequence.

30 Antisense or sense oligonucleotides may be introduced into a cell containing the target nucleic acid by any gene transfer method, including, for example, lipofection, CaPO₄-mediated DNA transfection, electroporation, or by using gene transfer vectors such as Epstein-Barr virus or adenovirus.

35 Sense or antisense oligonucleotides also may be introduced into a cell containing the target nucleic acid by formation of a conjugate with a ligand-binding molecule, as described in WO 91/04753. Suitable ligand binding molecules include, but are not limited to, cell surface receptors, growth factors, other cytokines, or other ligands that bind to cell surface receptors. Preferably, conjugation of the ligand-binding molecule does not substantially interfere with the ability of the ligand-binding molecule to bind to its corresponding molecule or receptor, or block entry of the sense or antisense oligonucleotide or its conjugated version into the cell.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Alternatively, a sense or an antisense oligonucleotide may be introduced into a cell containing the target nucleic acid by formation of an oligonucleotide-lipid complex, as described in WO 90/10448. The sense or antisense oligonucleotide-lipid complex is preferably dissociated within the cell by an endogenous lipase.

5 The polynucleotides of the invention enable the construction of vectors (*e.g.*, expression vectors) comprising a polynucleotide encoding a HAM polypeptide of the invention, or fragment thereof; host cells transfected or transformed with the vectors; methods of producing and purifying biologically active polypeptides and bioactive fragments thereof; the use of the polynucleotides or oligonucleotides thereof as probes to identify nucleic acids encoding related attractin or mahogany
10 family proteins; the use of the polynucleotides or oligonucleotides thereof to correlate the location of genes encoding HAM polypeptides of the invention with chromosome regions associated with human diseases; the use of the polynucleotides or oligonucleotides thereof to identify genes associated with tumors, immune disorders, syndromes or other human conditions; the administration of the disclosed proteins or fragments thereof for the treatment of disorders characterized by a mutation in a gene
15 encoding a HAM polypeptide or by an excess or a deficiency of a HAM polypeptide; and the use of single-stranded sense or antisense oligonucleotides to inhibit expression of polynucleotides encoding a HAM polypeptide. In addition, the invention provides the use of the disclosed polypeptides and soluble fragments thereof as competitive inhibitors of the binding of native HAM polypeptides to their ligands, cognates, or counter-structure binding partners; the use of HAM polypeptides and fragments
20 thereof as unique molecular weight markers or as controls for peptide fragmentation as well as kits comprising these reagents; the use of HAM polypeptides and fragments thereof to generate antibodies; and the use of such antibodies to purify HAM polypeptides; as affinity reagents for the separation of hematopoietic cells expressing the proteins as well as the use of the antibodies in the modulation of HAM polypeptide biological activity. For treatment of humans, typically human HAM polypeptides,
25 fragments and polynucleotides encoding the foregoing are used.

Activity Assays

The purified polypeptides of the invention (including proteins, polypeptides, fragments, variants, oligomers, and other forms) may be tested for the ability to bind a HAM binding partner. Such
30 activities can be measured in any suitable assay, such as a conventional binding or enzymatic assay. To illustrate, in a typical binding assay the polypeptide may be labeled with a detectable reagent (*e.g.*, a radionuclide, chromophore, enzyme that catalyzes a colorimetric or fluorometric reaction, and the like), and then contacted with cells expressing a HAM binding partner on its surface. The cells are washed to remove unbound-labeled polypeptide, and the presence of cell-bound label is determined by a suitable
35 technique. For example, a recombinant expression vector is constructed containing a polynucleotide encoding a HAM polypeptide (or bioactive fragment thereof) fused to an Fc region according to methods well known in the art. Upon expression the polynucleotide encodes, for example, a soluble HAM polypeptide comprising the extracellular portions of the HAM polypeptide, or the extracellular domain and a cytoplasmic domain with the transmembrane region removed. For example, host cells are
40 transfected with the recombinant expression vector comprising a polynucleotide of the invention. After

WO 02/097120

PCT/US02/16391

culturing the transfected cells, culture medium containing a HAM or other soluble polypeptide of the invention is collected from the transfected cells and the amount of the polypeptide is quantified using standard methods.

5 Cells expressing the HAM binding partner are cultured and washed with BM-NFDM, which is binding medium (RPMI 1640 containing 25 mg/ml bovine serum albumin, 2 mg/ml sodium azide, 20 mM Hepes pH 7.2) to which 50 mg/ml nonfat dry milk has been added. The cells then are incubated with various concentrations of, for example, a soluble polypeptide/Fc fusion protein made as set forth above. Cells are washed and incubated with a constant saturating concentration of a ¹²⁵I-mouse anti-human IgG in binding medium, with gentle agitation for 1 hour at 37 °C. After extensive washing, cells
10 are released via trypsinization.

The mouse anti-human IgG employed above is directed against the Fc region of human IgG and can be obtained from Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. The antibody is radioiodinated using the standard chloramine-T method. The antibody will bind to the Fc portion of any polypeptide/Fc protein that has bound to the cells. In all assays, non-specific binding of ¹²⁵I-antibody is assayed in the absence of the Fc fusion protein/Fc, as well as in the presence of the Fc fusion protein and a 200-fold molar excess of unlabeled mouse anti-human IgG antibody.
15

Cell-bound ¹²⁵I-antibody is quantified on a Packard Autogamma counter. Affinity calculations (Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949) are generated on RS/1 (BBN Software, Boston, MA) run on a Microvax computer.

20 To illustrate, the substrate may be labeled with a detectable reagent (e.g., a radionuclide, chromophore, and the like), and then contacted with cells or a sample containing a HAM polypeptide or fragment thereof. The labeled-substrate is typically bound to a microtiter plate or the like. Following incubation of the two components the plate is washed and the amount of label still present on the plate is quantitated compared to a control plate. A reduction in label on the plate is indicative of enzymatic activity.
25

Another type of suitable binding assay is a competitive binding assay. To illustrate, biological activity of a variant may be determined by assaying for the variant's ability to compete with the native proteins for binding to its binding partner.

Competitive binding assays can be performed by conventional methodology. Reagents that
30 may be employed in competitive binding assays include a radiolabeled soluble HAM polypeptide or intact cells expressing a HAM polypeptide (endogenous or recombinant) on the cell surface. For example, a radiolabeled bioactive fragment of a HAM polypeptide can be used to compete with a soluble variant for binding to a cell surface-binding partner. Instead of intact cells, one could substitute a bioactive fragment of a HAM polypeptide/Fc fusion protein bound to a solid phase through the
35 interaction of Protein A or Protein G (on the solid phase) with the Fc moiety. Chromatography columns that contain Protein A and Protein G include those available from Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ.

Another type of competitive binding assay utilizes a radiolabeled soluble bioactive fragment
40 of a HAM polypeptide, such as a soluble bioactive fragment/Fc fusion protein, and intact cells expressing HAM binding partners. Qualitative results can be obtained by competitive autoradiographic

WO 02/097120

PCT/US02/16391

plate binding assays, while Scatchard plots (Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949) may be utilized to generate quantitative results.

Diagnostic Assays

5 The polynucleotides and polypeptides provided herein are useful as diagnostic reagents in assays to detect malfunctioning or mutant HAM genes. Samples for diagnosis may be obtained from a subject's tissues, for example, throat swab, blood, serum, urine, saliva, cerebrospinal fluid, feces, tissue biopsy, and so on. Similar samples are taken from normal individuals (from persons not suffering from the disorder or mutation in question), and these normal or standard samples provide a basis for
10 comparison. Alternatively, purified reagents (e.g., HAM polynucleotides, polypeptides, and antibodies) may be used as standards for the diagnostic assays. In some embodiments, fragments of the polynucleotides of the invention are used as probes for Northern or Southern blots or as PCR primers to detect mutated forms of a HAM polypeptide encoded by the target nucleic acid.

15 Conditions that may be diagnosed include those characterized by an excess or deficiency of a HAM polypeptide, or that are characterized by a mutated form of such a polypeptide. Such conditions include, but are not limited to, absence of the polypeptide in a cell that requires its expression, altered enzymatic activity, altered signalling ability, overexpression or underexpression in a cell that under normal conditions has such an activity.

Particular conditions that may be diagnosed using these assays include but are not limited to:
20 rheumatologic diseases (e.g., rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, seronegative spondyloarthropathies), inflammatory conditions, bone marrow or solid organ transplantation, graft-versus-host disease, allergies (e.g., asthma, allergic rhinitis), neurologic disorders (e.g., Alzheimer's, Parkinson's, dementia, brain cancer, Bell's palsy, post-herpetic neuralgia), cell proliferative disorders including neoplasms or cancer (e.g., lymphoma, B-cell, T-cell and myeloid cell leukemias), infections
25 (e.g., bacterial, parasitic, protozoal and viral infections, including AIDS), chemotherapy or radiation-induced toxicity, cachexia, cardiovascular disorders (e.g., congestive heart failure, myocardial infarction, ischemia/reperfusion injury, arteritis, stroke), gastrointestinal disorders (e.g., inflammatory bowel disease, Crohn's disease, celiac disease), diabetes mellitus, skin diseases (e.g., psoriasis, scleroderma, dermatomyositis), hematologic disorders (e.g., myelodysplastic syndromes, acquired or
30 Fanconi's aplastic anemia), septic shock, liver diseases (e.g., viral hepatitis or alcohol-associated), bone disorders (e.g., osteoporosis, osteopetrosis).

In some embodiments of the invention, the condition being diagnosed is a hematologic disorder, and the tissue sample is blood or a lymph node biopsy.

35 Screening for Modulators of HAM Polypeptides and Polynucleotides

The HAM polypeptides and polynucleotides disclosed herein find use in screening assays for identifying agents that modulate the expression or activity of the polynucleotides and polypeptides of the invention, respectively. Once identified, agents that modulate expression or activity of a HAM polynucleotides and polypeptides may be administered, for example, to suppress HAM expression in
40 conditions characterized by overproduction of HAM or other attractin/mahogany related proteins.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Similarly, agents that stimulate the biological activity or expression of a HAM polypeptide in cultured cells or in subjects may be administered to stimulate activity or expression where a condition is characterized by a deficiency of the normal endogenous activator of HAM.

5 Methods to identify an agent that modulates the activity or expression of a HAM polypeptide can be carried out using the teachings provided herein. For example, to identify an agent that modulates HAM polypeptide activity a test agent is contacted with a sample containing a HAM polypeptide of the invention. The sample is then assayed to measure HAM activity and the HAM activity in the presence of the test agent is compared to the activity present in a standard (*i.e.*, a control) sample that does not have the agent present. A sample can be, for example, a cell-free sample, a cell-containing sample (*e.g.*, a cell culture), or a tissue sample (*e.g.*, a tissue sample obtained or derived from a subject). A standard sample includes, for example, the sample prior to contact with the test agent or a sample that represents normal activity. Activity can be measured using any of the assay methods identified herein (*e.g.*, competitive binding assays, enzymatic assays, and the like). A change in activity compared to a control or standard sample is indicative of an agent that modulates (*e.g.*, increases or decreases) activity.

15 Similarly, the invention provides a method for identifying an agent that modulates expression of a HAM polypeptide. Such methods include, for example, contacting a sample comprising a polynucleotide of the invention with a test agent and measuring expression of the polynucleotide compared to a standard or control sample. The level of expression can be determined by methods known in the art, including detecting protein (*e.g.*, by Western Blot), or by detecting the amount of mRNA transcribed (*e.g.*, by PCR). As above, the sample can be a cellular sample, a tissue sample, and the like. A change in expression compared to a control or standard sample is indicative of an agent that modulates (*e.g.*, increases or decreases) expression.

A test agent can include, for example, a protein, a peptide, a peptidomimetic, and antibody, a small molecule, or a polynucleotide (*e.g.*, an antisense or ribozyme). An example of a test agent is a ligand that binds specifically with a HAM polypeptide, or other molecules capable of forming functional heteromers with a HAM polypeptide.

25 Cells used for these screening assays may include, for example, cells that naturally express a HAM polypeptide, such as glial cells, T-cells, myeloid cells and other hematopoietic cells, or any convenient cell type that has been transformed or transfected with a heterologous nucleic acid that directs the expression of a HAM polypeptide.

In other assays, cells expressing a bioactive fragment of a HAM polypeptide (*e.g.*, a soluble form) may be cultured with the test molecule to determine whether the molecule has the capacity to modulate the amount of the bioactive fragment produced by the cells. The amount of bioactive fragment produced may be measured by any suitable method, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot blot employing an antibody that binds the bioactive fragment, or a solid phase binding assay.

Methods of Therapy

40 This invention provides compounds, compositions, and methods for treating a subject, preferably a mammalian subject, and most preferably a human subject, who is suffering from a medical

WO 02/097120

PCT/US02/16391

disorder, and in particular a HAM-mediated disorder. Such HAM-mediated disorders include conditions caused (directly or indirectly) or exacerbated by binding between a HAM polypeptide and a binding partner. For purposes of this disclosure, the terms "illness," "disease," "medical condition," "abnormal condition," and the like are used interchangeably with the term "medical disorder." The terms "treat", "treating", and "treatment" used herein include curative, preventative (*e.g.*, prophylactic) and palliative or ameliorative treatment.

The polypeptides and polynucleotides of the invention may be administered therapeutically to a mammalian subject (*e.g.*, bovine, equine, feline, canine, porcine, primates), preferably a human subject, having a disorder involving a malfunctioning HAM gene or polypeptide, including an excess or a deficiency of such a polypeptide, or expression of a deleterious mutant form of the polypeptide. Such disorders include conditions caused (directly or indirectly) or exacerbated by such forms of the polypeptides. Where administration is to a human subject the molecules are preferably based upon a human HAM sequence (*e.g.*, a sequence as set forth in SEQ ID NO:1 or 2).

For these therapeutic methods, agents that modulate activity or expression of a HAM polypeptide or polynucleotide, respectively, may be employed. Such modulating agents are identified by screening, such as by employing the screening methods disclosed herein. Antibodies that bind specifically with the HAM polypeptide or its ligand may modulate the biological activity of the HAM polypeptide.

Disorders and diseases treatable by the methods and compositions of the invention include, but are not limited to: rheumatologic disorders (*e.g.*, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, seronegative spondyloarthropathies), bone marrow or solid organ transplant, graft-versus-host reaction, inflammatory conditions, autoimmune disorders (*e.g.*, systemic lupus erythematosus, Hashimoto's thyroiditis, Sjogren's syndrome), allergies (*e.g.*, asthma, allergic rhinitis), neurologic disorders (*e.g.*, Alzheimer's, Parkinson's, dementia, brain cancer, Bell's palsy, post-herpetic neuralgia), cancers (*e.g.*, lymphoma, B-cell, T-cell and myeloid cell leukemias), infections (*e.g.*, bacterial, parasitic, protozoal and viral infections, including AIDS), chemotherapy or radiation-induced toxicity, cachexia, cardiovascular disorders (*e.g.*, congestive heart failure, myocardial infarction, ischemia/reperfusion injury, arteritis, stroke), diabetes mellitus, skin diseases (*e.g.*, psoriasis, scleroderma, dermatomyositis), hematologic disorders (*e.g.*, myelodysplastic syndromes, acquired or Fanconi's aplastic anemia), septic shock, liver diseases (*e.g.*, viral hepatitis or alcohol-associated), bone disorders (*e.g.*, osteoporosis, osteopetrosis), and weight-related or energy metabolism disorders including obesity.

For treating any one or more of the above disorders, the therapeutic agent, may be administered in an amount effective to measurably reduce one or more signs or symptoms of the disorder being treated. In addition, such disorders may be treated by administration *in vivo* or *ex vivo* of a vector or liposome that delivers a non-defective form of the malfunctioning gene to the cell type in which the malfunction is present.

Therapeutic compositions may comprise a substantially purified HAM polypeptide in any form described herein, such as a native polypeptide, a variant, a derivative, an oligomer, and a bioactive fragment. The composition may comprise a soluble polypeptide or an oligomer comprising a soluble HAM polypeptide. In another embodiment, a composition comprises an antibody directed

WO 02/097120

PCT/US02/16391

against at least one HAM polypeptide epitope. In yet another embodiment, a therapeutic agent is attached to the antibody and the antibody is used to target the therapeutic agent to a cell expressing a HAM polypeptide.

5 Combination therapies also are envisioned, in which another pharmacologically active agent is co-administered with a therapeutic agent of the present invention. Other agents suitable for co-administration include, but are not limited to, cytokines, lymphokines, chemokines, chemotherapy agents, anti-inflammatories, DMARDs, anti-angiogenic agents (e.g., anti-VEGF antibodies), or any other compound effective in treating the target disease or disorder.

10 Pharmaceutical compositions of the invention furthermore may comprise other components such as a physiologically acceptable diluent, carrier, or excipient, and are formulated according to known methods. They can be combined in admixture, either as the sole active material or with other known active materials suitable for a given indication, with pharmaceutically acceptable diluents (e.g., saline, Tris-HCl, acetate, and phosphate buffered solutions), preservatives (e.g., thimerosal, benzyl alcohol, parabens), emulsifiers, solubilizers, adjuvants and/or carriers. Suitable formulations for pharmaceutical compositions include those described in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th ed. 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA.

15 In addition, such compositions can be complexed with polyethylene glycol (PEG), metal ions, or incorporated into polymeric compounds such as polyacetic acid, polyglycolic acid, hydrogels, dextran, and the like, or incorporated into liposomes, microemulsions, micelles, unilamellar or multilamellar vesicles, erythrocyte ghosts or spheroblasts. Such compositions will influence the physical state, solubility, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance, and are thus chosen according to the intended application.

20 The compositions of the invention can be administered in any suitable manner, e.g., orally, topically, parenterally, or by inhalation. The term "parenteral" includes injection, e.g., by subcutaneous, intravenous, or intramuscular routes, also including localized administration, e.g., at a site of disease or injury. Sustained release from implants is also contemplated. Suitable dosages will vary, depending upon such factors as the nature of the disorder to be treated, the subject's body weight, age, and general condition, and the route of administration. Preliminary doses can be determined according to animal tests, and the scaling of dosages for human administration is performed according to art-accepted practices.

30 The dose, route of administration, frequency of administration and duration of an effective regimen of treatment will vary, depending factors such as the particular condition being treated, the severity of the condition, the age, weight, and health of the subject, and the like, and may be adjusted accordingly by the subject's physician.

35 In one method of treatment, the active agent is a polypeptide, and is administered by injection one to three times a week at a dose ranging from 0.1-100 mg/kg, or more preferably at a dose of 0.4-50 mg/kg. Treatment is continued until a measurable improvement in the subject's condition has been ascertained, which in most cases will require at least two to eight weeks or more of treatment. Maintenance doses may be administered thereafter, and treatment may be resumed if evidence of disease should reappear. Suitable regimens for other routes of administration may be determined

40

WO 02/097120

PC/T/US02/16391

according to methods known in the art. Similarly, suitable regimens for administering antibodies, small molecules, antisense or gene therapy reagents may be determined according to methods known in the art.

Included within the scope of the invention are pharmacologically acceptable compositions comprising the described therapeutic agents, including compositions suitable for administration by each of the described routes. Such compositions are formulated in accord with standard practices.

The following examples are provided to further illustrate particular embodiments of the invention, and are not to be construed as limiting the scope of the present invention.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

Identification, Cloning, and Sequencing of HAM

Mouse dendritic cell (DC) cDNA microarrays were used to identify novel DC-related genes. High-density nylon arrays were prepared from inserts from a cDNA library prepared from CD11c+ mouse DCs, which were isolated from the spleens of Flt3L-treated/resting and Flt3L-treated/SEB-stimulated mice. These arrays were then hybridized with labeled first strand cDNAs from mouse DC subsets derived under a number of stimulation conditions. Differentially expressed genes were identified by differential array signals. Changes in signal patterns were identified and the corresponding clones were sequenced and analyzed. One identified clone which contained a sequence that was upregulated in CD8+/CD11b low (see Table immediately below), in vivo DC, was identified by a BLAST search as being most closely related to Attractin, a type I membrane protein with multiple biological functions, including immunoregulatory (promotion of macrophage spreading coupled to T cell adhesion; defective expression in Combined Variable Immunodeficiency), myelination (mutant gene in the Zitter rat), and metabolism (mutant gene in the Mahogany mouse). A BLAST search using the sequence obtained from the DC clone also identified GenBank accession CAC12966, an ORF predicted from a human genomic contig (GenBank AL355530) which appeared to be orthologous to the mouse DC sequence, and homologous to the N-terminus of Attractin. Additional BLAST analyses identified an EST from human brain cDNA (GenBank AB011106) which showed homology with the 3' end of Attractin. Both CAC12966 and AB011106 are incorporated herein by reference.

Upregulated sequence in CD8+/CD11b low

GGAGCCGGGGTCCGGCCCGCTCGGGTGCCTCCGAGCCGGCCCTCCCGTGCCTGGAG
E P G V R A R S G A P Q P A S P V L W R
GGCTCGGCCGGGGGGCGGTGGGGCGCCTCCTCCTGGCTGCTGGACGGGAACAGCTG
A R P A G G G G A S S W L L L D G N S W
GCTGCTGTCTATGGCTTCCTTACCTGGCGCTCTATGCTCAGGTGTCCAGTCCAAAGCC
L L C Y G F L Y L A L Y A Q V S Q S K P
CTCCGAGAGGACTGGCTCCTGCTTCCTCCGGTCGCTGTGTCAACTCCACCTGGCCGTGCGA
C E R T G S C F S G R C V H S T C L C D
CCCCGGCTGGGTGGGGACCACTGCCAGCACTGCCAGGGCAGGTTCAAGTTAACAGAAACC
P G W V G D Q C Q H C O G R F K L T E P
TTCTGGATATTTAACAGATGGCCAAATTAACATAAATAAACAAGGTACATGGCT
S G Y L T D G P I N Y K Y K T K C T W L
AATTGAAGGCTATCCAAATGCAGTGCCTAAGGTTAAGATTCAATCATTTTGCACAGAAATG
I E G Y P N A V L R L R F N H F A T E C
CAGCTGGGATCATATGTATGTTTATGATGGAGATCTATATACGCACCTTTAGTAGCTGT

WO 02/097120

PCT/US02/16391

```

S W D H M Y V Y D G D S I Y A P L V A V
ACTTAGTGGCTTGATCGTTCCTGAAGTGAAGGGTAAAGGACCGTGCCTGAGGTGGTCAC
L S G L I V P E V R G N E T V P E V V T
GACGTCGGCTACGGCTGCTCCACCTTTTCAGCGATGCTGCATATAACCTACTGGCTT
T S G Y A L L H F P S D A A Y N L T G F
CAACATTTTATTCGATCATTCCTGTCCTAACCACTGCTCTGGTCATGAAGTGC
N I P Y S I N S C P N N C S G H E S

```

A full-length cDNA was amplified in six segments, using PCR primers based on AL355530 and AB011106 sequence. Human ovary cDNA library was used as a template for the PCR. Arrows superimposed on the sequence shown in Figure 1 depict that position of primers for each fragment.

5

Fragment	Size	Strand	Primers
A	494 bp	sense:	5'-GGGGAAGATGGAGACTGG
		antisense:	5'-GTACAGCTATTAAAGTGCATATATTGAATCTCC
B	952 bp	sense:	5'-TTAACAGAACCTTCGGATATTTAACAGATGGC
		antisense:	5'-CTGAATGTCCCTCCACAGCATACTGCTG
C	837 bp	sense:	5'-GTTCTTGGACATGGTCAGCAGTATGCTGTG
		antisense:	5'-TTGTATTGGCAGTACAGCTGGCACAATCTG
D	897 bp	sense:	5'-GCTGCTTCTGATGACAGATGTTACAGATATGC
		antisense:	5'-CACATCCAGGCTGTTCCAAACACTGTCCAC
E	855 bp	sense:	5'-CCATATGGACAATGCTAGAGTGGCAAACCTGC
		antisense:	5'-GCTGACGTACACATAGAACGTAATGTTAGGATTGC
F	650 bp	sense:	5'-CAATATCTGGGGAAGAGACTTCTATAGTTTCCAAG
		antisense:	5'-GGTTTCCAATTTCTCAGACACAAGTTCCTTGACGTGT

Several PCR fragments from each amplification were ligated into a cloning vector for sequencing. Sequencing was conducted using standard methodology.

10

EXAMPLE 2

Sequence Analysis

The open reading frame (ORF) of human HAM (SEQ ID NO:1) is predicted to be encoded on 29 exons. Four putative alternatively spliced variants were found during the PCR amplifications including a deletion of exon 7, deletion of exon 10, deletion of exon 19, and a deletion of exon 21. These variants/deletions may occur individually or in combination. In addition, various nucleotide substitutions were identified as follows with reference to SEQ ID NO:1:

15

Nucleotide of SEQ ID NO:1	Change	Type of Change	Result
120	aaC>aaT	silent	Asn>Asn
140	gCc>gAc		Gly>Asp
400	Aga>Gga		Arg>Gly
696	taT>taC	silent	Tyr>Tyr
783	tgT>tgC	silent	Cys>Cys
1213	CaT>Tat		His>Tyr
1244	tCa>tTa		Ser>Leu
1334	cAg>cGg		Gln>Arg
1418	gTg>gCc		Val>Ala
1779	atG>atA		Met>Ile
1950	aaT>aaC	silent	Asn>Asn
2084	aAt>aGt		Asn>Ser
2097	agT>agC	silent	Ser>Ser

WO 02/097120

PCT/US02/16391

2275	Tgt>Cgt		Cys>Arg
2510	cTb>cCt		Leu>Pro
2809	Acc>Gcc		Thr>Ala
2843	aCc>aTc		Thr>Ile
2947	Ctt>TTT		Leu>Phe
3005	aAg>aGg		Lys>Arg
3013	Gag>Aag		Glu>Lys
3222	deleted	frameshift	premature stop
3226	Tgt>Cgt		Cys>Arg
3262	Tgc>Cgc		Cys>Arg
3288	cgC>cgT	silent	Arg>Arg
3374	gAd>gGt		Asp>Gly
3376	Cgc>Tgc		Arg>Cys
3523	Tct>Cct		Ser>Pro
3621-3626	Deletion (in-frame)		
3609	acG>acA	silent	Thr>Thr
3653	cAg>cGG		Gln>Arg
3718	Tgt>Cgt		Cys>Arg
3750	gtG>gtA	silent	Val>Val
3877	Aca>Gca		Thr>Ala
3881	gAg>gGg		Glu>Gly
4039	Cta>Tta	silent	Leu>Leu
4116	tcA>tcG	silent	Ser>Ser

An analysis of the sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19 identified distinct regions of the HAM polypeptides of the invention. A leader sequence, also called a signal peptide, is present in these polypeptides. For example, the leader sequence present in the full-length human HAM polypeptide of the invention is predicted to include amino acids 1-60 of SEQ ID NO:2 and amino acids 1-59 of SEQ ID NO:19. The signal peptide cleavage site for HAM was predicted using a computer algorithm. However, one of skill in the art will recognize that the cleavage site of the signal sequence may vary depending upon a number of factors including the organism in which the polypeptide is expressed. Accordingly, the N-terminus of a mature form of a HAM polypeptide of the invention may vary by about 2 to 5 amino acids. Thus, a mature form of the human HAM polypeptide of the invention may include at its N-terminus amino acids 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, or 65 of SEQ ID NO:2. Accordingly, a mature form human HAM can include amino acid 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, or 65 to about amino acid 1379 (or, in the case of a soluble polypeptide, to amino acid 1230) of SEQ ID NO:2. The extracellular regions of the human HAM polypeptides are located at about amino acids 61 to 1230 of SEQ ID NO:2. The EGF-like domains, CUB domain, C-type Lectin or carbohydrate-recognition domain (CLECT domain), KELCH motif and Laminin EGF-like domain assignments, as well as those for the transmembrane and cytoplasmic domains are based upon computer algorithms and on previous reports (Gunn *et al.*, Nature 398:152-157, 1999). The extracellular region of human HAM putatively contains three EGF-like domains, a CUB domain, a KELCH motif, a C-type Lectin or carbohydrate-recognition domain, a putative ligand binding motif of the common gamma cytokine chain, and a Laminin EGF-like domain located at about amino acids 63-90, 211-243, 261-280, 93-208, 581-612, 749-873, 670-686, and 1014-1055 of SEQ ID NO:2, respectively (see Figure 3). The transmembrane region for the human HAM polypeptides are located at about amino acids 1231 to 1251 of SEQ ID NO:2. The intracellular regions are located at about amino acids 1252 to 1379 of SEQ ID NO:2. In addition, the the recognized sequences above, the sequence

WO 02/097120

PCT/US02/16391

RXXHISAVXINGXXIFGG was found to be repeated in the human HAM sequence of the invention (see for example, amino acids 521 to 540 and 581 to 600 of SEQ ID NO:2). A BLAST of this repeated sequence identified a number attractin and mahogany sequences. Accordingly, this repeat sequence is a putative HAM conserved domain. Figure 3 shows the relative domains and conserved residues of HAM indicative of an attractin or mahogany polypeptide.

EXAMPLE 3

Tissue Expression of HAM

PCR for the attractin homolog used the following primers, which were designed to amplify an approximately 650 bp fragment from the predicted 3' end of the coding region. The primers were based on the predicted coding region found within the genomic sequence and are identical to sequences found in the AB011106 sequence:

sense strand 5'CAATATCTGGGAAGAGACTTCTATAGTTTCCAAG (SEQ ID NO:20)
antisense 5'GGTTCCATTCTCAGACACAAGTTCCTTGACGTGT (SEQ ID NO:21)

PCR showed a positive signal using these first strand cDNAs as templates in: placenta, liver, kidney, pancreas, spleen, testis, lymph node, heart, skeletal muscle, brain, ovary, small intestine, esophagus, fetal liver, fetal brain, fetal lung, fetal spleen, fetal, thymus, fetal kidney, and fetal skeletal muscle. No PCR product was detectable in stomach, bone marrow, lung, colon, prostate, thymus, leukocyte and skin. Accordingly, HAM may be used as a tissue specific marker.

EXAMPLE 4

Monoclonal Antibodies That Bind HAM Polypeptides

Substantially purified HAM polypeptides or fragments thereof can be used to generate monoclonal antibodies immunoreactive therewith, using conventional techniques such as those described in U.S. Patent 4,411,993. Briefly, mice are immunized with a HAM polypeptide immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant, and injected in amounts ranging from 10-100 µg subcutaneously or intraperitoneally. Ten to twelve days later, the immunized animals are boosted with additional HAM polypeptide, or fragment thereof, emulsified in incomplete Freund's adjuvant. Mice are periodically boosted thereafter on a weekly to bi-weekly immunization schedule. Serum samples are periodically taken by retro-orbital bleeding or tail-tip excision to test for HAM antibodies by dot blot assay, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), or inhibition of binding of a HAM polypeptide to a HAM polypeptide binding partner.

Following detection of an appropriate antibody titer, positive animals are provided one last intravenous injection of a HAM polypeptide or fragment in saline. Three to four days later, the animals are sacrificed, spleen cells harvested, and spleen cells are fused to a murine myeloma cell line, e.g., NS1 or preferably P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Fusions generate hybridoma cells, which are plated in multiple microtiter plates in a HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine) selective medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

The hybridoma cells are screened by ELISA for reactivity against a substantially pure HAM polypeptide by adaptations of the techniques disclosed in Engvall *et al.*, (*Immunochem.* 8:871, 1971) and in U.S. Patent 4,703,004. A preferred screening technique is the antibody capture technique described in Beckmann *et al.*, (*J. Immunol.* 144:4212, 1990). Positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic BALB/c mice to produce ascites containing high concentrations of anti-HAM polypeptide monoclonal antibody. Alternatively, hybridoma cells can be grown *in vitro* in flasks or roller bottles by various techniques. Monoclonal antibodies produced in mouse ascites can be purified by ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to Polypeptide A or Polypeptide G can also be used, as can affinity chromatography based upon binding to HAM polypeptide.

EXAMPLE 5

Chromosome mapping

Chromosome mapping can be carried out in, for example, one of the following two methods. The gene corresponding to a HAM polypeptide is mapped using PCR-based mapping strategies. Initial human chromosomal assignments are made using HAM-specific PCR primers and a BIOS Somatic Cell Hybrid PCRable DNA kit from BIOS Laboratories (New Haven, CT), following the manufacturer's instructions. More detailed mapping is performed using a Genebridge 4 Radiation Hybrid Panel (Research Genetics, Huntsville, AL; described in Walter, MA *et al.*, *Nature Genetics* 7:22-28, 1994). Data from this analysis is then submitted electronically to the MIT Radiation Hybrid Mapper (URL: <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) following the instructions contained therein. This analysis yields specific genetic marker names which, when submitted electronically to the NCBI Genemap browser (www.ncbi.nlm.nih.gov/80/cgi-bin/entrez/hum_srch?chr=hum_chr.ing&query), yield the specific chromosome interval.

Alternatively, database analysis can yield information on the location of the polynucleotide sequence encoding HAM polypeptide. Analysis of human genomic contigs using the Celera human genome database identified the HAM sequence as being located on human chromosome 10q26.

EXAMPLE 6

Binding Assay

HAM polypeptides or fragments thereof are expressed by recombinant DNA techniques, purified and tested for the ability to bind with various cells of the various lineages (*e.g.*, hematopoietic cells). The binding assays employ HAM polypeptides, including soluble forms of these polypeptides, and oligomers formed as described below.

Oligomers for assays are prepared as follows. Fusion proteins comprising a leucine zipper peptide fused to the COOH-terminus of a HAM polypeptide are constructed as described above. The polypeptide can comprise a soluble form of HAM polypeptide, such as the extracellular region of a HAM polypeptide. An expression construct is prepared, essentially as described in Baum *et al.* (*EMBO J.* 13:3992-4001, 1994). The construct, in expression vector pDC409, encodes a leader sequence derived from human cytomegalovirus, followed by the leucine zipper moiety fused to the C-terminus of

WO 02/097120

PCT/US02/16391

a soluble HAM polypeptide. Alternatively, a gene fusion encoding a HAM polypeptide/Fc fusion protein is inserted into an appropriate expression vector. Polypeptide/Fc fusion proteins are expressed in host cells transformed with the recombinant expression vector, and allowed to assemble by the formation of interchain disulfide bonds between the Fc moieties, thus yielding dimeric molecules.

- 5 The expressed Fc/HAM polypeptide or leucine zipper/HAM polypeptide fusion protein is contacted with a cell suspected of expressing a HAM polypeptide-binding partner. In one embodiment, the activity of the fusion protein is measured by detecting a change in energy metabolism or immune cell activation via any number of indicators. In another embodiment, the activity of the fusion protein is measured by detecting the ability of a cell expressing a native HAM polypeptide to bind to or interact
- 10 with a cell expressing a HAM polypeptide-binding partner in the presence and absence of the fusion protein. In yet another embodiment, the binding activity of the fusion construct is detected by detecting binding of the fusion protein to a HAM polypeptide cognate using, for example, a labeled anti-IgG antibody.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

What is claimed is:

1. A substantially purified polypeptide comprising a HAM polypeptide, wherein the HAM polypeptide is at least 80% identical to a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19.
2. The substantially purified polypeptide of claim 1, wherein the HAM polypeptide is at least 90% identical to a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19.
3. The substantially purified polypeptide of claim 1, wherein the HAM polypeptide has a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19.
4. The substantially purified polypeptide of claim 1, wherein the sequence comprises from about amino acid 61 to 1379 of SEQ ID NO:2 or from about amino acid 60 to 1376 of SEQ ID NO:19.
5. The substantially purified polypeptide of claim 1, wherein the sequence comprises from about amino acid 61 to 1230 of SEQ ID NO:2 or fragment thereof, or from about amino acid 60 to 1227 of SEQ ID NO:19 or a fragment thereof.
6. A substantially purified polypeptide comprising a HAM polypeptide, wherein the HAM polypeptide is at least 80% identical to a sequence as set forth from about amino acid 61 to 1230 of SEQ ID NO:2 or fragment thereof, or from about amino acid 60 to 1227 of SEQ ID NO:19 or a fragment thereof, and wherein the HAM polypeptide has a HAM polypeptide activity.
7. The substantially purified polypeptide of claim 6, wherein the sequence is at least 90% identical to a sequence as set forth from about amino acid 61 to 1230 of SEQ ID NO:2 or fragment thereof, or from about amino acid 60 to 1227 of SEQ ID NO:19 or a fragment thereof.
8. A substantially pure polypeptide comprising an amino acid sequence as set forth from about amino acid 61 to 1230 of SEQ ID NO:2 or from about amino acid 60 to 1227 of SEQ ID NO:19.
9. A fusion polypeptide comprising a first polypeptide operably linked to a second polypeptide, wherein the first polypeptide is selected from the consisting of:
 - (i) a polypeptide having a sequence as set forth from about amino acid 61 to 1230 of SEQ ID NO:2;
 - (ii) a polypeptide having a sequence as set forth from about amino acid 60 to 1227 of SEQ ID NO:19;
 - (iii) a polypeptide having a sequence as set forth from about amino acid 61 to 1379 of SEQ ID NO:2; and
 - (iv) a polypeptide having a sequence as set forth from about amino acid 60 to 1376 of SEQ ID NO:19.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

10. The fusion polypeptide of claim 9, wherein the second polypeptide is an Fc polypeptide.
11. The fusion polypeptide of claim 9, wherein the second polypeptide is a leucine zipper polypeptide.
12. The fusion polypeptide of claim 9, comprising a linker polypeptide separating the first polypeptide and the second polypeptide and operably linked to the first and second polypeptide.
13. An isolated polynucleotide encoding the polypeptide of claim 1, 6, or 9.
14. An isolated polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of:
 - a) SEQ ID NO:1 or 18;
 - b) SEQ ID NO:1 or 18, wherein T can also be U;
 - c) sequences complementary to SEQ ID NO:1 or 18; and
 - d) fragments of a), b), or c) that are at least 50 bases in length and that will hybridize under moderate to highly stringent conditions to a nucleic acid molecule that encodes a polypeptide comprising a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19.
15. An isolated polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of:
 - a) SEQ ID NO:1 from about nucleotide 181 to 4137;
 - b) SEQ ID NO:1 from about nucleotide 181 to 3690;
 - c) SEQ ID NO:18 from about nucleotide 178 to 4128;
 - d) SEQ ID NO:18 from about nucleotide 178 to 3681;
 - e) sequences complementary to a), b), c), and d); and
 - f) any of a), b), c), or d) wherein T can also be U.
16. A vector comprising the polynucleotide of claim 14 or 15.
17. The vector of claim 16, wherein the vector is a plasmid.
18. The vector of claim 16, wherein the vector is a viral vector.
19. A host cell containing the vector of claim 16.
20. A recombinant host cell comprising a polynucleotide of claim 14 or 15 under the control of a heterologous regulatory sequence.
21. The host cell of claim 20, wherein the cell is prokaryotic.
22. The host cell of claim 20, wherein the cell is eukaryotic.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

23. A method of producing a polypeptide comprising culturing a host cell of claim 20 under condition that promote expression of the polypeptide.
24. A polypeptide produced by culturing a host cell of claim 20 under conditions that promote expression of the polypeptide.
25. A purified antibody that specifically binds to a polypeptide consisting of a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 18.
26. The antibody of claim 25, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
27. The antibody of claim 25, wherein the antibody is a human or humanized antibody.
28. A pharmaceutical composition comprising the antibody of claim 25 or a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 - (a) SEQ ID NO:2 from amino acid 61 to 1379;
 - (b) SEQ ID NO:2 from amino acid 61 to 1230;
 - (c) SEQ ID NO:18 from amino acid 60 to 1376; and
 - (d) SEQ ID NO:18 from amino acid 60 to 1227.and a pharmaceutical carrier, excipient or diluent.
29. A method for identifying an agent which modulates the expression of a polynucleotide comprising a sequence as set forth in SEQ ID NO:1 or 18, comprising contacting a sample containing the polynucleotide with a test agent and measuring the expression of the polynucleotide compared to a control, wherein a change in expression compared to the control is indicative of an agent that modulates expression of the polynucleotide.
30. The method of claim 29, wherein the agent is selected from the group consisting of a polypeptide, a peptide, a peptidomimetic, a nucleic acid, and a small molecule.
31. The method of claim 29, wherein the sample is a biological sample from a subject.
32. The method of claim 29, wherein the sample comprises cells.
33. The method of claim 29, wherein the change in expression is an increase in expression.
34. The method of claim 29, wherein the measuring is by PCR or Northern Blot.
35. The method of claim 29, wherein the measuring is by detecting a polypeptide expressed by the polynucleotide.

WO 02/097120

PCT/US02/16391

36. A method for identifying an agent which modulates the activity of a polypeptide comprising a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19 comprising contacting a sample containing the polypeptide with a test agent and measuring the activity of the polypeptide compared to a control, wherein a change in activity compared to the control is indicative of an agent that modulates activity of the polypeptide.
37. The method of claim 36, wherein the agent is selected from the group consisting of a polypeptide, a peptide, a peptidomimetic, a nucleic acid, and a small molecule.
38. The method of claim 36, wherein the sample is a biological sample from a subject.
39. The method of claim 36, wherein the sample comprises cells.
40. The method of claim 36, wherein the change in activity is an increase in activity.
41. The method of claim 36, wherein the measuring is by quantitating the amount of polypeptide in the sample.
42. A method of treating a HAM-associated disorder or disease comprising contacting a subject with a HAM polypeptide, a HAM polynucleotide, or an antibody that specifically binds to a HAM polypeptide in an amount effective to treat the HAM-associated disorder or disease.
43. The method of claim 42, wherein the HAM-associated disorder is selected from the group consisting of a rheumatologic disorder, a bone marrow or solid organ transplant disorder, a graft-versus-host disorder, an inflammatory disorder, an autoimmune disorder, a neurologic disorder, a myelination disorder, a cell proliferative disorder, an infection, a cardiovascular disorder, a hematologic disorder, liver disorder, a metabolic disorder, a weight disorder, and a bone disorder.
44. The method of claim 42, wherein the HAM polypeptide has a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or 19 or a bioactive fragment thereof.
45. The method of claim 42, wherein the bioactive fragment has a sequence as set forth in SEQ ID NO:2 from about amino acid 61 to 1230, or as set forth in SEQ ID NO:19 from about amino acid 60 to 1227.
46. The method of claim 42, wherein the HAM polynucleotide has a sequence as set forth in SEQ ID NO:1 or 18.
47. The method of claim 42, wherein the subject is a mammal.

FIGURE 1(b)

ACTGPTCTTGGACATGGTCAGCAGTATGCTGTGGAGGGACATTCAGCACATATTATGGAG
 ThrValLeuGlyHisGlyGlnGlnTyrAlaValGluGlyHisSerAlaHisIleMetGlu
 TTGGATAGTAGAGATGTTGTCATGATCATAAATTTGGATATTTCCAAATATATGGTTAT
 LeuAspSerArgAspValValMetIleIleIlePheGlyTyrSerAlaIleTyrGlyTyr
 ACAAGCAGCATACAGAAATACCATATCTCATCAAACACTTGGCTTGTCCAGAAACAAA
 ThrSerSerIleGlnGluTyrHisIleSerSerAsnThrTrpLeuValProGluThrLys
 GGRGCTATTGTACAAGTGGATATGGCCATACTAGTGTGTATGATGAARTAACAAAAGTCC
 GlyAlaIleValGlnGlyTyrGlyHisThrSerValTyrAspGluIleThrLysSer
 ATTTATGTTTCATGGAGGGTATAAAGCATTGCCAGGGAACAAATATGGATTGGTTGATGAT
 IleTyrValHisGlyGlyTyrLysAlaLeuProGlyAsnLysTyrGlyLeuValAspAsp
 CTTTATAAATATGAAGTTAACACTRAGACTTGGACTTTTGGAAAGAAAGTGGGTTTGGCC
 LeuTyrLysTyrGluValAsnThrLysThrTrpThrIleLeuLysGluSerGlyPheAla
 AGATAACCTTCATTCAGCTGTTCTTATCAATGGAGCTATGCTTATTTTGGAGGAAATACC
 ArgTyrLeuHisSerAlaValLeuIleAsnGlyAlaMetLeuIlePheGlyGlyAsnThr
 CNTAATGACACTTCCTTGAGTAACGGTGCAAAATGTTTTCCTGCCGATTCCTGGCATAT
 HisAsnAspThrSerLeuSerAsnGlyAlaLysCysPheSerAlaAspPheLeuAlaTyr
 GACATAGCTTCTGATGAATGGAAAATACACAAAACCAAATCTTCATAGAGATGTCAAC
 AspIleAlaCysAspGluTrpLysIleLeuProLysProAsnLeuHisArgAspValAsn
 AGATTTGGACACTCTGCACTAGTCATTAACGGGTCCATGTATATATTTGGGGGATTTTCT
 ArgPheGlyHisSerAlaValValIleAsnGlySerMetTyrIlePheGlyGlyPheSer
 AGTGTACTCCTTAATCATATCCTTCTATACAGCCTCCAAATTCAGGCTTTCAGAGAT
 SerValLeuLeuAsnAspIleLeuValTyrLysProProAsnCysLysAlaPheArgAsp
 GAAGAACTTTGTAAAATGCTGCTCCAGGGTAAAAATGTTTGGAAATAAAATCACTGT
 GluGluLeuCysLysAsnAlaGlyProGlyIleLysCysValTrpAsnLysAsnHisCys
 GAATCTTGGGAATCTGGGAATACTAATAATATTTCTAGAGCAAAGTGCCTCTCAAACA
 GluSerTrpGluSerGlyAsnThrAsnAsnIleLeuArgAlaLysCysProProLysThr
 GGTGCTTCTGATGACAGATGTTACAGATATGCAAGATTGTGCCAGCTGTACTGCCAATACA
 AlaAlaSerAspAspArgCysTyrArgTyrAlaAspCysAlaSerCysThrAlaAsnThr
 -
 AATGGGTGCCAATGGTGTGATGACAAGAAATGCATTTCCGGCAAATAGTAACTGCAGTATG
 AsnGlyCysGlnTrpCysAspAspLysLysCysIleSerAlaAsnSerAsnCysSerMet
 TCTGTCAAGAACTACACCAATGTCATGTGAGAATGAGCAGATTTGTAAACAACTTACC
 SerValLysAsnTyrThrLysCysHisValArgAsnGluGlnIleCysAsnLysLeuThr
 AGCTGTAAAAGCTGTTCACTAAACTTGAATTGCCAGTGGGATCAGAGACAGAGAATGC
 SerCysLysSerCysSerLeuAsnLeuAsnCysGlnTrpAspGlnArgGlnGlnGluCys
 CAGGCTTACCAGCTCATCTTTTGGAGAAGATGGAGTCATATTTGGGGATGCTTGTCTT
 GlnAlaLeuProAlaHisLeuCysGlyGluGlyTrpSerHisIleGlyAspAlaCysLeu
 NGAGTCAATTTCCAGTAGAGAAAACATGRCATGCAAACTTTATGCTATATCTTAGT
 ArgValAsnSerSerArgGluAsnTyrAspAsnAlaLysLeuTyrCysTyrAsnLeuSer
 GGAAATCTTGCTTCACTAACAACTCAAAGAACTAGAAATTTGTTCTGGATGAAATACAG
 GlyAsnLeuAlaSerLeuThrThrSerLysGluValGluPheValLeuAspGluIleGln
 AAGTATACACAACAGAAATATCACCTTGGGTAGGCTTGGCAAGATCAATATATCTTAT
 LysTyrThrGlnGlnLysValSerProTrpValGlyLeuArgLysIleAsnIleSerTyr

FIGURE 1(c)

TGGGGATGGGAAGACATGTCCTCTTTTACAACACACACACTACAGTGGCTTCCTGGCGAA
 TrpGlyTrpGluAspMetSerProPheThrAsnThrThrLeuGlnTrpLeuProGlyGlu

CCCAATGATTCTGGGTTTTGTGCATATCTGGAAGGGCTGCAGTGGCAGGCTTAAAAGCT
 ProAsnAspSerGlyPheCysAlaTyrLeuGluArgAlaAlaValAlaGlyLeuLysAla

AATCCTTGTACATCTATGGCAAATGGCCPTGTCTGTGAAAAACCTGTGTAGTCCAAAT
 AsnProCysThrSerMetAlaAsnGlyLeuValCysGluLysProValValSerProAsn

CAAAATGCGAGGCGGTGCAAAAAGCCATGCTCTCTGAGGACATCATGTTCCAACCTGTACA
 GlnAsnAlaArgProCysLysLysProCysSerLeuArgThrSerCysSerAsnCysThr

AGCAATGGCATGGAGTGTATCTGGTSCAGCAGTACGAAACGATGTGTGACTCTAATGCC
 SerAsnGlyMetGluCysMetTrpCysSerSerThrLysArgCysValAspSerAsnAla

TATATCATCTCTTTTCCATATGGACAATGTCTAGAGTGGCAACTGCCACCTGCTCCCT
 TyrIleIleSerPheProTyrGlyGlnCysLeuGluTrpGlnThrAlaThrCysSerPro

CAAAATTTCTCTGGATTGAGAACCTGTGGACAGTGTGGAAACGCTGGATGTGGCTGG
 GlnAsnCysSerGlyLeuArgThrCysGlyGlnCysLeuGluGlnProGlyCysGlyTrp

TGCATGATCTCTAGTANTACAGGAAGAGGACATGTCATTGAAGTTCTTCACGGGGACCA
 CysAsnAspProSerAsnThrGlyArgGlyHisCysIleGluGlySerSerArgGlyPro

ATGAGCTTATGGGAATGCACCACAATGAGATGGTCTTGACACCAATCTTGGCCCAA
 MetLysLeuIleGlyMetHisHisAsnGluMetValLeuAspThrAsnLeuCysProLys

GAAAAGAACATGAGTGGTCTCTTATCCAGTGTCCAGCTTCCAGTGAATGGACATAGC
 GlnLysAsnTyrGluTrpSerPheIleGlnCysProAlaCysGlnCysAsnGlyHisSer

ACTTGCATCAATAATAATGTGGGAACAGTGTAAAAATCTCACACAGGAAAGCAGTGT
 ThrCysIleAsnAsnValCysGluGlnCysLysAsnLeuThrThrGlyLysGlnCys

CAAGATTGTATGCCAGTATATATGGAGATCCAAACCAATGGTGGACAGTGCACAGCTTGT
 GlnAspCysMetProGlyTyrTyrGlyAspProThrAsnGlyGlyGlnCysThrAlaCys

ACATGCACTGGCCATCCAAATATCTGTCTCTGACACACAGGAAATGTTCTGCACAACT
 ThrCysSerGlyHisAlaAsnIleCysHisLeuHisThrGlyLysCysPheCysThrThr

AAAGGAATAAAAGTGACCAATGCCAATATGTGACTCTGAAAAATCGCTATGTTGGTAAT
 LysGlyIleLysGlyAspGlnCysGlnLeuCysAspSerGluAsnArgTyrValGlyAsn

CCACTTAGAGGAACAATGTTATTACAGCCTTTGTATTGATTATCAATTTACCTTCAGCTTA
 ProLeuArgGlyThrCysTyrTyrSerLeuLeuIleAspTyrGlnPheThrPheSerLeu

TTRCAGGAGATGATCGCCACCCTACTGCCPTAACTTTATAGCAAACCCGAAACAGCTCG
 LeuGlnGluAspAspArgHisHisThrAlaIleAsnPheIleAlaAsnProGluGlnSer

AACAAAAATCTGGATATATCAATTAATGCATCAAAACAACPTTAATCTCAACATTACGTTG
 AsnLysAsnLeuAspIleSerIleAsnAlaSerAsnAsnPheAsnLeuAsnIleThrTrp

TCTGTCGTCACACAGCTGGAACAAATATCTGGGAAACAGACTTCTATAGTTTCCAGAAAT
 SerValGlySerThrAlaGlyThrIleSerGlyGluGluThrSerIleValSerLysAsn

AATATAAGGAATACAGAGATAGTTTTTCCATGAAAAATTAACCTTAGAAGCAATCCT
 AsnIleLysGluTyrArgAspSerPheSerTyrGluLysPheAsnPheArgSerAsnPro

AACATTACGTTCTATGTGACGTACGCAACTTTCTCGCCATTTAAAATACAGATTGCA
 AsnIleThrPheTyrValTyrValSerAsnPheSerTrpProIleLysIleGlnIleAla

FIGURE 2(a)

```

1                               50
Attractin -----
Mahogany mvavsaatat earlrgsttt taapagrkgqr qhrpctatga wvqgprarlC
HAMprotein -----
Consensus -----

51                               100
Attractin ----- -mvaaaaate arlrrrtaaa
Mahogany lprvls... ralppppllp lifellllpl preeaaaaava aavsgsaaae
HAMprotein TPQPAAFGVW RARFAGGGGG GASSWLLDGN SWLLCYGFLY LALYAQ.VSQ
Consensus -----

101                              150
Attractin aalagrsggp hCvnggrCnp gtggCvCpag wvgeqCqhCg grfrltgssg
Mahogany akecdr...p .CvnggrCnp gtggCvCptg wvgeqCqhCg grfrltgssg
HAMprotein GRPCBRRTGS .CFS.GRCVN ST..CLCDPG WVGDCQCHCQ GRFKLTPEPSG
Consensus -----R-----C---GRC-- -T--C-C--G WVG-QCQHC- GRF-LT--SG

151                              200
Attractin fvtgdgpenyk ykttCtwlie gqpnrimrlr fnhfateCsw dhlyrvydgds
Mahogany fvtgdgpenyk ykttCtwlie gqpnrimrlr fnhfateCsw dhlyrvydgds
HAMprotein YLTGDPINVK YKTKCTWLE GYPNAVLRRLR FNHFATECSW DHMYVYDGDG
Consensus --TDGP-NYK YKTKCTWLE G-PN--RLR FNHFATECSW DH-VYVDGDS

201                              250
Attractin lysplvaafs glivperdgn etvpevtats gyallhffsd aaynlgtfni
Mahogany lysplvaafs glivperdgn etapevtvts gyallhffsd aaynlgtfni
HAMprotein IYAPLIAVLS GLIVPEIRGM ETVPEVVTTS GYALLHFFSD AAYNLGTGFI
Consensus IYAPL-A--S GLIVPE--GN ET-PEV--TS GYALLHFFSD AAYNLGTGFI

251                              300
Attractin tysEdmCpnn CsgrgeCkis ns.sdtveCe CsenwkgeaC diphCtdnCg
Mahogany tynfdmCpnn CsgrgeCkss ns.ssaveCe CsenwkgesC diphCtdnCg
HAMprotein FYSINSCPNN CSHGKCTTS VSVPSQVCE CDKYNKGBAC DIPYCKANCG
Consensus -Y----CPNN CSG-G-C--S -S----V-CE C---WKGB-C DIP-C--NCG

301                              350
Attractin fphrgiCnas dvrgeCaCfsd wqggpCevpv pangsfwtre eysnl.klp
Mahogany fphrgiCnas dtrgCaCfph wqggpCsipv pangsfwtre eysdl.klp
HAMprotein SPDHGYCDLT GEKLCVCNDS WQGPDCSLNV PSTESYWLIP NVKPFPSVVG
Consensus -P--G-C--- ----C-C--- WQGP-CS--V P---S-W-----

351                              400
Attractin rashkavvng nimwvvggym fnhsdymvl aydlaarewl plnrsvnmrv
Mahogany rashkavvng nimwvvggym fnhsdymvl aydltarewl plnhsvnsrv
HAMprotein RASHKAVLHG KFMWVIGGYT FNYSSPQMWL NYNLESSIW. NVGTSPSRGPL
Consensus RASHKAV--G --MWV-GGY- FN-S--MVL -Y-L-S--W-----

401                              450
Attractin vryghslaly kdklymvggk idst.gvvtn elrvfhins swlltpka.
Mahogany vryghslalh kdklymvggk idst.gvvtn elrvfhins swlltpka.
HAMprotein QRYGHSLALY QENIFMYGGR IETNDGNVTD ELMVFNHSQ SMSYKTPYVL
Consensus -RYGHSLAL- ---I-MYGG- I----GNVT- EL-VF-IH-- SW---TP--

451                              500
Attractin .kqgyavvg hsahivtkn grvnmvifg hcplygyisv vgeydlknt
Mahogany .kqgyavvg hsahivtlas grvnmvifg hcplygyisv vgeydlknt
HAMprotein GFGQYAVVG HSAHIMBELDS RDVVMILIFG ISAIYGTSS IQEYHSSNT
Consensus ---QYAV-G HSAHI-L-- --VVM--IFG ---YGY-S- -QY-----

```

FIGURE 2(b)

```

501                                     550
Attractin wsilhtqgal vqgyghesv ydhrtralyv hgyykafsan kyrladdlyr
Mahogany wsilhtqgal vqgyghesv ydrtkalyv hgyykafsan kyrladdlyr
HAMprotein MLVPEYKGA I VQGGYGHSTV YDEITKSLYV HGGYKALPGN KYGLVDDLYK
Consensus W----T-GA- VQGGYGH-SV YD--T---YV HGGYKA---N KY-L-DDLY-

551                                     600
Attractin ydvdtdgwti lkdrffryl htavivsgtm lvfgnhtnd tsmshgakcf
Mahogany ydvdtdgwti lkdrffryl htavivsgtm lvfgnhtnd tsmshgakcf
HAMprotein YEVNTRKWTI LKESGFARYL HSAVLINGAM LIFGNTNND TSLNMGAKCF
Consensus Y-V-T--WTI LK-S-P-RYL H-AV---G-M L-FGNTNND TS-S-GAKCF

601                                     650
Attractin ssdfmaydia Cdrwsvlprp dstmmstia ipavlnhstm yvfggfnsll
Mahogany ssdfmaydia Cdrwsvlprp elnhdvnrfg hsavlynstm yvfggfnsll
HAMprotein SADFAYDLA CDEWKILPKF NLHRDVMRFG HSAVVLNGSM YIFGGFSSVL
Consensus S-DF-AYDLA CD-W--LP-P ----- --AV--N--M Y-FGGF-S-L

651                                     700
Attractin lsdilvftse qCdahrseaa ClaagpgirC VwntgssqCi swalatdeqe
Mahogany lsdilvftse qCdahrseaa CvaagpgirC lwdtgssrCt swelateeqe
HAMprotein LNDLILVYKPP NCKAFRDEEL CKNAGPGIRK VWN..KNHCE SWESGNTNNI
Consensus L-D-LV---- -C-A-R-E-- C--AGPGL-C -W-----C SW-----

701                                     750
Attractin eklkseCfsk rtdlhdrCdq htdCysCtan tndChwCnd. hCvprnhsCs
Mahogany eklkseCfsk rtdlhdrCdq htdCysCtan tndChwCnd. hCvprnhsCs
HAMprotein .LRAKCPK TAASDDRCYR YADCASCSTAN TNGCQWDDK KCISANSNCS
Consensus --L--C--K ----DRC-- --DC-SCTAN TN-C-WC-D- --C--N--C-

751                                     800
Attractin egqisifrye nCpkdnpmwy CnkktcCrsC aldgpcwep rnceCialpe
Mahogany egqisifrye nCpkdnpmwy CnkktcCrsC aldgpcwep rnceCialpe
HAMprotein .MSVKNVT KCHVRNEQ.I CNKLTCKSK SLNLNCQWDO RQQCQALPA
Consensus ---S---Y- -C---N--- CNK-TSC-SC -L--NCQW-- R-QEC-ALP-

801                                     850
Attractin niCgigwhlv gnsClkitta kenydnaklf Crnhnallas lttgkkveiv
Mahogany niCgigwhlv gnsClkitta kenydnaklf Crnhnallas lttgkkveiv
HAMprotein HLCGEGWHLI GDACLRVMSS RENYDHAFLY CYNLSGNLAS LTTSEVEVEFV
Consensus --CG-GW--- G--CL----- -ENYDHAFL- C-N----LAS LT--R-VEFV

851                                     900
Attractin lkqlrimqss qmskltltp wvglrkinvs ywcwedmspf tnsllqmps
Mahogany lkqlrimqss qmskltltp wvglrkinvs ywcwedmspf tnsllqmps
HAMprotein LDEI..... QKYTQKQVSP WVGRLKINIS YWGVEDMSPF TNYTLQWLPG
Consensus L----- Q-----P WVGRLKIN-S YW-WEDMSPF TN--LQW-P-

901                                     950
Attractin epsdagfCgi lsepstrgk aatCinplng svCerpa... nhsakCrtP
Mahogany epsdagfCgi lsepstrgk aatCinplng svCerpa... nhsakCrtP
HAMprotein EPNDSGFCAY LERA AVAGLK ANPCTSMANG LVCEKPVVSP NQNARPCCKP
Consensus EP-D-GFC-- L-----GLK A--C----NG -VCE-P---- N--A--C--P

951                                     1000
Attractin CalrtaCgdC tsgesseCmwC snmkqCvdsn ayvasfpfgg Cnewytmsc
Mahogany CalrtaCgeC tsgesseCmwC snmkqCvdsn ayvasfpfgg Cnewytmsc
HAMprotein CSLRTSCSNC TSNMGECMWC SSTRKCVDSN AYIISFPYQO CLEWQT.ATC
Consensus C-LRT-C--C TS---ECMWC S--K-CVDSN AY--SFP-GQ C-EW-T---C

```

WO 02/097120

PCT/US02/16391

FIGURE 2(c)

```

1001                                     1050
Attractin ppenCsgyct CshCleppgC gwCtdpsntg kqkCiegsyk gpvkmpscap
Mahogany ppenCsgyct CshCleppgC gwCtdpsntg kqkCiegsyk gpvkmpscap
HAMprotein SPQNCSQLRT CQCCLBQPC GWCNDPSNTG RGHCIEGSSR GPMKL....
Consensus -P-NCSG--T C--CLEPQPC GWC-DPSNTG -G-CIEGS-- GP-K-----

1051                                     1100
Attractin tgnfyppqll nssmCledsr ymwsfihCpa CqCngshkCi nqsiCekCen
Mahogany agnyvypqll nssmCledsr ymwsfihCpa CqCngshkCi nqsiCekCed
HAMprotein IGMHHNEMVL DTNLCPEKN YEWSFIQCPA CQCNGHSTCI NRRVCEQCKN
Consensus -G-----L ----C----- Y-WSFI-CPA CQCNGHS-CI N---CE-C--

1101                                     1150
Attractin lttgkhCetC isgyfygdptn gqkCqpCkCn ghaslCntnt gkCfCttKgv
Mahogany lttgkhCetC isgyfygdptn gqkCqpCkCn ghaslCntnt gkCfCttKgv
HAMprotein LTTGKQCQDC MFSYIGDPTN GQCTACACS GHANICHLHT GKCFCTTKGI
Consensus LTTGK-C--C --G-YGDPTN GG-C--C-C- GHA--C---T GKCFCTTRG-

1151                                     1200
Attractin kgdeCqlCev enryqgnplr gtCyytllid ygftfslsqe ddryytainf
Mahogany kgdeCqlCev enryqgnplr gtCyytllid ygftfslsqe ddryytainf
HAMprotein KGDQCQLCDS ENRYVGNPLR GTCYYSLLID YQPTFSLQE DDRHHTAINF
Consensus KGD-CQLC-- ENRY-GNPL- GTCYI-LLID YQPTFSL-QE DDR--TAINF

1201                                     1250
Attractin vatpdeqmrD ldmfinaskn fnlnitwaas fsagtqagee mpvvsKtnik
Mahogany vatpdeqmrD ldmfinaskn fnlnitwaas fsagtqagee mpvvsKtnik
HAMprotein IANPEQSNKN LDISINASN PNLNITWSVG STAGTISGEE TSIVSKNNIK
Consensus -A-P---N-- LD--INAS-N PNLNITW--- --AGT--GEE ---VSK-NIK

1251                                     1300
Attractin eykdsfsnek fdfrnhpnt ffvyvsntw pikiqvgtgq -----
Mahogany eykdsfsnek fdfrnhpnt ffvyvsntw pikiqvgtgq hsnfmdlvqf
HAMprotein EYRDSFSYEK FNFRSNPNIT FVYVSNFWS PIKIQVAFSQ HWTIMDLVQF
Consensus EY-DSFS-EK F-FR--PNIT F-VYVSNF-W PIKIQ----Q -----

1301                                     1350
Attractin -----
Mahogany -----
HAMprotein -----
Consensus -----

1351                                     1400
Attractin -----
Mahogany valetdepp dligsiktv pkpialepcf gnkaavlsvf vrlprlggi
HAMprotein VALEVGAET EFLRPLEGA PKPIALEPCA GNRAAVLTVF LCLPRGSSGA
Consensus -----

1401                                     1450
Attractin -----
Mahogany pppgqsrsrc gqcpghfsa dansvqgev sckkpeaaaa ctawnlhil
HAMprotein PPFQSGLAI ASALIDISQQ KASDSKDKTS GVRNRKHLST RQCTCV----
Consensus -----

1451                                     1491
Attractin -----
Mahogany gqefaltegv wstklstgea agrkqawgrr lgtleasnsc a
HAMprotein -----
Consensus -----

```

WO 02/097120

PCT/US02/16391

FIGURE 3(a)

Underlined = signal domain
 Bold = EGF-like domains
 Italics = CUB domain
 Dotted Underlined = KELCH motif
 Inverse text = C-type lectin (CTL) or carbohydrate-recognition domain
 Wavy Underline = putative ligand binding motif of the common gamma cytokine chain
 Bar = Laminin EGF-like Domain
 Double Underlined = Transmembrane Domain

1 MTGQEARATG TEPPAAPGVW RAPAGGGGG GASSWLLDGN SWLLCYGFHY LALVAVSOS
 61 **KPCERTGSCF** **SGRCVNSTCL** **CDPQWVGDQC** **QHCQGRFKLT** **EPGGLTDGP** **INRYKTKCT**
 121 *WLEGYFNAV* *LELRFWHFAT* *ECSDHMVYV* *DGDSIYAPLI* *AVLSGLIYPE* *IRGHEIVFEV*
 181 *VYTSGYALLH* *FFSDAAYNLT* *GFNIFYSINS* **CPNICSGHGK** **CTTSVSVFSQ** **VXCECDKYWK**
 241 **GRACDIYCK** **ANCGSPDHGY** **CDLTGEKLCV** **CNDSWQSPDC** **SLNVPSSTESY** **WILFNVKPFS**
 301 **FSVGRASHKA** **VLHGKFMWVI** **GGYTFNYSSP** **QMVLYNLES** **SIWNVGTFSR** **GFLQRYGHSL**
 361 **ALYQENIFMY** **GGRIETNDGN** **VTEDELWVFN** **HSQSMSTKTP** **TVLGHGQQYA** **VEGSAHIME**
 421 **LDSRDVVMII** **IPGYSAIYGY** **TSSIQEYHIS** **SNTMLVPBTK** **GAIVQGGYGH** **TSVYDEITKS**
 481 **IYVHGQYKAL** **FGNKYGLVDD** **LXKVEVMTKT** **WTLKESGFA** **FYLHSAVLIN** **GAMLIPIGGNT**
 541 **HNDLSLSNGA** **KCFADPLAY** **DIACDEWKIL** **EKFNLRHDVN** **RFGHSAVYIM** **GSMYIFGGFS**
 601 **SVLHNDLWY** **KPPNCKAFRD** **EELCKNAGPG** **IKCVWKNMHC** **ESWESGNTNN** **ILRAKCPFKT**
 661 **AASDRRCYRY** **ADGASCTANT** **NGCQWCDKX** **CISANSNCSM** **SVKNYTKCHV** **RNEQICNKLT**
 721 **SKSCSLNLN** **QWDRQEQEC** **QALPAHLQGE** **SWSHIGDACL** **RVNSSRENVYD** **NAKLYCYNLS**
 781 **SNLASLVTSK** **EVEFVLDLQ** **KVTOQRVSPN** **WGLRKINISY** **WGWEDMSFPT** **NPTLQWLDGE**
 841 **RNDGFCAYL** **BRAAVAGLKA** **NECTSMANGI** **VCEKPVVSPN** **QNAPECKKPC** **SIRTSKSNCT**
 901 **SNMECMWCS** **STRKCVDSNA** **YIISFPYGCQ** **LENQTATCSP** **QNCSGLETCG** **QCLEQEGCGW**
 961 **CNDESNTRGQ** **HCIEGSSRGP** **MLIGNHHRNE** **MVLDTMLCPK** **EKNYEWSPFIQ** **CPAQQGNHSE**
 1021 **TCINNVCEQ** **CKNLTFGKQC** **QDCMPGYGSD** **PTNGGQCTAC** **TCSGHANICH** **LHTGKCPCTT**
 1081 **EGIKGDQCQL** **CDSENRYVGN** **FLRGTCYYSL** **LIDYQFTFSL** **LQEDDRHHTA** **INFLANPEQS**

WO 02/097120

PCT/US02/16391

FIGURE 3(b)

1141 MNLDISINA SNNPNLNIHW SVGSTACTIS GEETSIVSKN NIKEYRDSFS YEKFNERSNF
1201 NITFYVYVSN PSWPIKIQIA FQHRNTIMDL VQFFVFFESC ELSDLLVAAM VWKIKQTCWA
1261 SRRREQLLRE RQQMASRPPA SVDVALEVGA EQTEFLRGPL EGAPKPIAIE PCAGNRAAVL
1321 TVFLCLPRGS SGAPPPQSG LAIASALIDI SQKASDSKD KTSQVRNRKH LSTRQSTCV*

FIGURE 4(a)

```

1 METGCRARTGTPQPAAPGVWRARPAAGGGGGGASSW.LLDGNSWLLCYGFL 49
1 MEFGVRARSGAPQASPVLRARPA..GGGGASSWLLLDGNSWLLCYGFL 48
50 YLALYAQVSQSKPCERFSGCFSGRCVNSTCLCDPGWVGDQCQHCQGRFKL 99
49 YLALYAQVSQSKPCERFSGCFSGRCVNSTCLCDPGWVGDQCQHCQGRFKL 98
100 TEPGSLTDGPTINYKYTKCTWLIBGYPNAVLR.LRPNHFATBCSWDHMYV 149
99 TEPGSLTDGPTINYKYTKCTWLIBGYPNAVLR.LRPNHFATBCSWDHMYV 148
150 YDGSYIAPL.LAVLSGLIVPEIRGNETVPEVVTTSGYAL.HFFSDAAYNL 199
149 YDGSYIAPL.VAVLSGLIVPEVRGNETVPEVVTTSGYAL.HFFSDAAYNL 198
200 TGFNIFYSINSCPNNC.SHGKCTTSVSVPSQVYCECDKYWKGEACDIPYC 249
199 TGFNIFYSINSCPNNC.SHGKCTTSVSVASQVYCECDKYWKGEACDIPYC 248
250 KANCGSPDHGYCDLITGEKLCVND.SWQGDCLNVPSTESYMLPNVKPF 299
249 KANCGSPDHGYCDLITGEKLCVND.SWQGDCLNVPSTESYMLPNVKPF 298
300 SFSVGRASHKAVLHGKFMWVIGGYTFNYS.SFQMLNLYNLBSSIMNVGTS 349
299 SFSVGRASHKAVLHGKFMWVIGGYTFNYS.SFQMLNLYNLBSSIMNVGAVS 348
350 RGPLQRYGHSALYQENIFMYGGRLETNDGNVTDDELWVFN.HSQSWSTKT 399
349 RGPLQRYGHSALYQENIFMYGGRMETSDGNVTDDELWVFN.RSQSWSTKT 398
400 PTVLGHGQQYAVBEGHSAHIMELD.SRDVVMIIIFGYSAIYGYTSSIQEYHI 449
399 PTVLGHGQQYAVBEGHSAHIMELD.SRDVVMIIIFGYSAIYGYTSSIQEYHI 448
450 SSNTWLVPETKGAIVQGGYGH.TSVYDEVT.KSIYVHGGYKALPGNKYGLVD 499
449 SSNTWLVPETKGAIVQGGYGH.TSVYDEVT.KSIYVHGGYKALPGNKYGLVD 498
500 DLYKYEVTNTRWTLIKESGFARYL.HSAVLINGAMLI.FGGNTHNDFSLNSG 549
499 DLYKYEVTNTRWTLIKESGFARYL.HSAVLINGAMLI.FGGNTHNDFSLNSG 548
550 AKCF.SADFLAYDIACDEWTKL.LPKPNLHRD.VNRFGHS.AVVINGSMYIFGGF 599
549 AKCF.SADFLAYDIACDEWTKL.LPKPNLHRD.VNRFGHS.AVVINGSMYIFGGF 598
600 SSVLLNDLIVYKPPNCKAF.RDEBELCKNAG.FGIKCVWNKNH.CESWESGNTN 649
599 SSVLLNDLIVYKPPNCKAF.RDEBELCKNAG.FGIKCVWNKNH.CESWESGNTN 648
650 NILRAKPPKTAASDR.CYRYADCASCTANTNGC.QWCDK.KCISAS.SMCS 699
649 NILRAKPPKTAATD.DRCYRYADCASCTANTNGC.QWCDK.KCISAS.SMCS 698
700 MSVKNYTKCHVRNEQIC.NKLT.SCKSKSLN.LNCQW.DORQQE.CQALPAH.LCG 749
699 TSVRNNTKCHIRNEQIC.NKLT.SCKSKSLN.LNCQW.DORQQE.CQALPAH.LCG 748
750 EGWSHICDACL.RVNS.SRENYDNA.KLYCYNL.SGNL.ASLATTSKEVEFVLD.EI 799
749 EGWNHVGDACL.RINS.SRESYDNA.KLYCYNL.SGNL.ASLATTSKEVEFVLD.EI 798

```


WO 02/097120

PCT/US02/16391

FIGURE 5(a)

ATGGAGCCGGGGTCCGGGCGCGCTGGGTGCGCCGCGAGCCGCGCTCCCGGCTGCTGG (SEQ ID No:18)
M E P G V R A R S G A P Q P A S F V L W (SEQ ID No:19)

AGGGCTGGGCGGGCGGGCGGTGGGGCGCCTCCTCTGGCTGCTGCTGGAGCGGAACAGC
R A R P A G G G G A S S W L L L D G N S

TGGCTGCTGCTAIGGCTTCCTTACCTGGCGCTCTAIGCTCAGGTGTCACAGTCCAG
W L L C Y G F L Y L A L Y A Q V S Q S K

CCCTGGAGAGGACTGGCTCTGCTTCCGGTGGCTGGTCAACTCCACCTGCTGCTGTC
P C E R T G S C F S G R C V N S T C L C

GACCGGCGTGGGTGGGACCCAGTGGCCGCACTGCCAGGCGAGTTCAAGTTAACAGAA
D P G W V G D Q C Q H C Q G R F K L T E

CCTCTGGATAITTAACAGATGGACCAATTAACATAAATAAACAARAAGTACATGG
P S G Y L T D G P I N Y K Y K T K C T W

CTAATTGAAGGCTATCCAAATGCAAGTAAAGTTAAGATTCAATCAATTTGCTACAGAA
L I E G Y P N A V L R L R F N H F A T E

TGCAGCTGGGATCATATGTTATGTTATGAGATTCATATACGCACTTTAGTAGCT
C S W D H H Y V Y D G D S I Y A F L V A

CTACTTACTGGCTGATCTCCTGAAGTGGAGGGTAACGAGACCTGCTGAGGTGGT
V L S G L I V P E V R G N E T V P E V V

AGGAGCTGGTACGGCTGCTCCACTTTTTCAGGGATGCTGATATACCACTAATCGC
T T S G Y A L L H F P S D A A Y N L T G

TTCAACATTTTATTCGATCAATTCCTGCTTCAACACTGCTCTGGTCAAGAAAGTGT
F N I P Y S I N S C P N N C S G H G K C

ACACCAAGTCTCTCTGCAAGTCAAGTGTATGTAATGCAAAATACGGAAGGG
T T S V S V A S Q V Y C E C D K Y W K G

GAAGCATGTGACATTCCTTACTGTAAGCCATGTTGGGAGTCCAGATCTTGGCTACTGT
E A C D I P Y C K A N C G S P D H G Y C

GACCTACAGGAGAGAACTCTGCTGCTGCAACGATAGTGGCAAGGCCAGATTGTTCT
D L T G E K L C V C N D S W Q G P D C S

CTGAATGTCCTTCTACTGAGTCTTACTGGATTTGGCAAAATGTTAAACCTTCAGCCCT
L N V P S T E S Y W I L P N V K P P S P

TCCGTAGGTCGGGCTCACAATAAGCAGTTTACATGGGAAATTCATCTGGCTGATTGGA
S V G R A S H K A V L H G K F M W V I G

GGATATACTTTTACACAGTCTCTTTTCAAAATGGTCTGAAATACAATTTAGAAAGCAGT
G Y T F N Y S S F Q H V L N Y N L E S S

ATATGGAAATGTAGTGGCTGATCAGGGGCGCTCTTCAGAGATACGGACATTCCTTGGC
I W N V G A V S R G P L Q R Y G H S L A

CTCTATCAGGAAACATCTTTATGTAAGGAGCAGATGGAGCAGGTGTCACAGCTC
L Y Q E N I F H M Y G C R M E T S D G N V

ACCSATGAATATGGGTGTTTACGTAAGCAGTCAATCATGGAGCAAGAAACCCCACT
T D E L W V F N V R S Q S W S T K T P T

GTCCTGGCCACAGTCAAGCAGTACGCTGGAGGGGACCTCGCCACATCATGGAGCTG
V L G H S Q Q Y A V E G H S A H I M E L

GACAGTAGGACCTGGCTGATTTGCTCATATTTGGATAATTCGCAATATATGGCTATACC
D S R D V V H I V I P G Y S A I Y G Y T

AGCAGCATACAGGAAATACCATATCTCCTCAAACACTTGGCTAGTTCAGAAACGAAAGGA
S S I Q E Y H I S S N T W L V P B T K G

GCCATTTGGCAAGGTGGATATGGCCACAAGTGTGTATACAGAGTGAACCAAGTCCATC
A I V Q G G Y G H T S V Y D E V T K S I

WO 02/097120

PCT/US02/16391

FIGURE 5(b)

TATGTTACAGGAGGCTACAAAGCATTCCTGGCANTATAGTACGGGCTGGTGGACGACCTC
Y V H G G G Y K A L P G N K Y G L V D D L

TATAAGTACGAAGTCAACACCAGGACTTGGACTATTTTGAAAGAAAGTGGGTTGCCAGA
Y K Y E V N T R T W T I L K E S G F A R

TACCTCAGTACAGCTGTTCTATCAATGGAGCTATGCTTATTTTGGAGGAAATACCCAT
Y L H S A V L I N G A M L I F G G N T H

AATGATACTTCCCTGAGTACCGCTGCAAAATGCTTTCTGCGGATTTCTGGCATATGAC
N D T S L S N G A K C F S A D F L A Y D

ATAGCTTTGACGAATGGAAAGACATTGCCTAAACCAAATCTCCATAGAGAGTCAACOGA
I A C D E W K T L P K P N L H R D V N R

TITGGGCATTTGCGAGTGGTCAATCAATGGGTCAAGTATATATTTGGTGGATTTCTAGT
F G H S A V V I N G S M Y I F G G P S S

GTACTCCCTTAAATATATCCCTTGGTATAAACCCCAATGCAAGCTTTCCGAGATGAA
V E L N D I L V Y K P P N C K A F R D E

GAACTGTGCAAAACCTGGTCCAGGGATRAAATGCTTTGGAAATAGAACTCACTGTGAA
E L C R N A G P G I K C V W N K N H C E

TCTTGGGAGTCTGGGATACAAATATATATTTCTCAGAGCCAGTCCCTCCCAAGACAGCT
S W E S G N T N N I L R A K C P P K T A

GCTACCGATGACAGATGTTACAGATATGCTGACTGTGCCAGCTGCACAGCCACACGAAAC
A T D D R C Y R Y A D C A S C T A N T H

GGTGCCAGTGGTGTGACACAGAAATGCATCTCAGCCAGCAGCACTGCAGCAGTCT
G C Q W C D D K K C I S A S S N C S T S

GTCAGAACTACACTAATATGTCATATAAGAAATGAGCAGATTTGTACAAACTTACAAAGC
V R N Y T K C H I R N E Q I C N K L T S

TGTAAAAGCTGTCACTCAACTTGAATGCCAGTGGGATCAGCGGACAGGGAATGTGAG
C R S C S L N L M C Q W D Q R Q Q R C Q

GCFTTCCAGCTCACCTTTGGGAGAGGCTGGAATCAATTTGGGAGCCTTGTCTTGA
A L F A H L C G E G W N H V G D A C L R

ATCAATCCAGTCSAGAAAGCTATGATATGCCAACTTTATTCCTTACCTCAGTGA
I N S S R E S Y D N A K L Y C Y N L S G

AATCTGCTCCCTGACCACGCTCCAAAGGAGTGGATTTGTGTTGGATGAATACAGAAG
N L A S L T T S K E V E F V L D E I Q K

TTCACACAGCAGAAAGTGTACCCCTGGGTAGGCTAGGCAAGATCAACATATCCCTACTGG
F T Q Q K V S P W V G L R K I N I S Y W

GGATGGGAGGACATGCTTCTTCCACAAATACAAAGCCTGCAATGGCTTCTGCTGAGCCA
G W E D M S P P T N T S L Q W L F G E P

AATGACTCTGGATCTGTCCTACTTTAGAAAGGGCTGCAGTGCAGGTTAAAGCAAAC
N D S G F C A Y L E R A A V A G L K A N

CCTTGCACATCCATGCGAGATGACTCGTTGTGAAAGCCTGTAGTAAAGCCAAATCAG
P C T S M A D G L V C E K P V V S P N Q

AACGCGAGCCCTGCAAGAGCCCTGCTCCCTGAGGACTTCTGCGCAACTGCACGAGC
N A R P C K K P C S L R T S C A N C T S

AGCGCATGGAATGCAATGGTGTGACAGCAGCAGAGCGCTGTGTGGACTCCAAAGCCTTAC
S G M E C M W C S S T K R C V D S N A Y

ATCATCTCCTTTCCCTACGGACAGTCCCTGGAGTGGCAGCTGCCACCTGCTCCCTCRA
I X S F P Y G Q C L E W Q T A T C S P Q

AATGTTCTGGGTTAAGAAAGCTGTGACAGTCTTTGGAGCAGCCAGGCTGTGGTGGTGC
N C S G L R T C G Q C L E Q P G C S W C

WO 02/097120

PCT/US02/16391

FIGURE 5 (c)

AACGATCCTAGTAAACACAGAAAGAGGCTATTTCCATCGAAAGGCTCTCCCGGGCCCAATG
N D P S N T G R G Y C I E G S S R G P H
AAACTCGTGGGGTCCACAAACAGTGACCTGGTCTCTGACACCAGCCTCTGCCCAAGGAG
K L V G V H N S D V V L D T S L C P K E
AAGAATCAGAGTGGTCTTTTATCCAGTGTCCAGCTTGCAGTGTAAATGGACACAGCACG
K N Y E W S F I Q C P A C Q C N G H S T
TGCATCAACAACAACGCTGTGTGAGCAGTGTAAATCTCACCACTGGGGACAGTGTGAG
C I R N N V C E Q C K H L T T G R Q C Q
GAATGCAATCCAGGGTACTATGGAGACCCAAACCAACGGTGGGCGAGTGCACAGCTTGCACG
E C M P G Y Y G D F T N G G Q C T A C T
TGGGGGCCATPSCGAGCTTGTTCACCTGACACGGGALAGTCTTTTCACACCAAG
C G G H A N V C H L H T G K C F C T T K
GGGATCAAGGTPACAGTGCAGCTATGTACTCTGAALATGGCTRTGTGTGATCA
G I K G D Q C Q L C D S E N R Y V G N P
CPTAGGGGACATGCTATACAGTCTCTGATGACTACAGTACCTTACCTTACCTTGCCTGCTG
L R G T C Y Y S L L I D Y Q F T P S L L
CAGGAAGATGACCCGACACACTGCCATCAACTTCATCCGACCCGAGCGCTCAAC
Q E D D R H H T A I N F I A N P R Q S N
AAAACTTGGACATTCGATTAATGCTTCCAAACCTTTAATCTCAACATACGGTCA
K N L D I S I N A S N N F N L N I T W S
GTTGGCTCAACAGTGGAAACCATATCTGGGAGAGACTCCCTATAGTTCTAAGACAAAT
V G S T G G T I S G E E T P I V S X T N
ATTAAGGAATACAGAGACAGCTTTTCCATGAAALATTTAACTTCAGLAGCAATCTAAT
I K E Y R D S F S Y E K F H P R S H P H
ATCACATTTTATGCTATGTCAGCACTCTCCCTGGCTTATTAATAACAGATTCGGTTT
I T F Y V Y V S N F S W P I K I Q I A P
TCACAACACACAGCATATGATCTCGTGCAGTCTTPTATACCTTCTCAGTGTGTTT
S Q H N T I H D L V Q F F V T P F S C F
TTATCTTACTGCTGGTGGCTGTGTGTGTGTGGAAGATCAACAAACTTGTGGGGTCT
L S L L L V A A V V W K I K Q T C W A S
CGTCGGAGGGACAACTGCTTCGAGAACGACAGCAGATGCCAGCCGCTCCCTTGGCTCT
R R R E Q L L R E R Q Q M A S R P F A S
GTTGATGTAAGCCCTGGAGTGGAGCTTAACAGACAGACTTTCTCGAGGGCCATTAGAG
V D V A L E V G A E Q T D P L R G P L E
GGTCCCTTAAGCAATAGCCATCGAACCTTGGCTGGGACAGAGCTGTGTCTGACT
G A P K P I A I E P C A G N R A A V L T
GTGTTCTCTGTCACAGGAGGATCTTCAGGCGCCCAACCCCTGGGAGTCAAGGCTT
V F L C L P R G S S G A P P P G Q S G L
GCTATCGGAGTCCCTGATAGACTCTCACAGCAGAGCCCTCTGATATLLAGACAG
A I A S A L I D I S Q Q K P S D N K D K
ACTTCTGGAGTCCCAATCGGAGCACTCTCCACAGTCAAGGAATTGTGTC
T S G V R N R K H L S T R Q G T C V

WO 02/097120

PCT/US02/16391

SEQUENCE LISTING

<110> Immunex Corporation
Anderson, Dirk M.

<120> ATTRACTIN/MAHOGANY-LIKE POLYPEPTIDES, POLYNUCLEOTIDES, ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 3224-WO

<140> Not yet assigned

<141> 2002-05-23

<150> US 60/293,608

<151> 2001-05-25

<150> US 60/324,626

<151> 2001-09-24

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4140

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(4140)

<223>

<400> 1

atg gag act ggg ggc cgg gcc cgc act ggt acc ccg cag cca gcg gcc 48
Met Glu Thr Gly Gly Arg Ala Arg Thr Gly Thr Pro Gln Pro Ala Ala
1 5 10 15

ccg ggg gts tgg agg gct cgg ccg gcc ggc gcc gcc gcc ggg gcc gcc 96
Pro Gly Val Trp Arg Ala Arg Pro Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala
20 25 30

tcc tcc tgg ctg ctg gac ggg aac agc tgg ctg ctg tgc tat gcc ttc 144
Ser Ser Trp Leu Leu Asp Gly Asn Ser Trp Leu Leu Cys Tyr Gly Phe
35 40 45

ctc tac ctg gcg ctc tac gcg cag gtg tcc cag tcc aag ccg tgc gag 192
Leu Tyr Leu Ala Leu Tyr Ala Gln Val Ser Gln Ser Lys Pro Cys Glu
50 55 60

agg acc ggc tcc tgc ttc tcg gcc cgc tgt gtc aac tcc acc tgc ctc 240
Arg Thr Gly Ser Cys Phe Ser Gly Arg Cys Val Asn Ser Thr Cys Leu
65 70 75 80

tgc gac ccg gcc tgg gtg ggg gac cag tgc cag cac tgc cag gcc agg 288
Cys Asp Pro Gly Trp Val Gly Asp Gln Cys Gln His Cys Gln Gly Arg
85 90 95

ttc aag tta aca gaa cct tct gga tat tta aca gat gcc cca att aac 336
Phe Lys Leu Thr Glu Pro Ser Gly Tyr Leu Thr Asp Gly Pro Ile Asn
100 105 110

WO 02/097120

PCT/US02/16391

tat aaa tat aaa act aaa tgt act tgg ctc att gaa ggc tat cca aat Tyr Lys Tyr Lys Thr Lys Cys Thr Trp Leu Ile Glu Gly Tyr Pro Asn 115 120 125	384
gca gtg tta aga tta aga ttc aat cat ttt gct aca gaa tgt agc tgg Ala Val Leu Arg Leu Arg Phe Asn His Phe Ala Thr Glu Cys Ser Trp 130 135 140	432
gat cat atg tat gtt tat gat gga gat tca ata tat gca cct tta ata Asp His Met Tyr Val Tyr Asp Gly Asp Ser Ile Tyr Ala Pro Leu Ile 145 150 155 160	480
gct gta ctt agt ggt ttg ata gtc cct gaa ata agg ggc aat gaa act Ala Val Leu Ser Gly Leu Ile Val Pro Glu Ile Arg Gly Asn Glu Thr 165 170 175	528
gtg cct gaa gtt gtt act aca tct ggc tat gca ctg tta cat ttt ttt Val Pro Glu Val Val Thr Thr Ser Gly Tyr Ala Leu Leu His Phe Phe 180 185 190	576
agt gat gct gcg tat aat cta act ggt ttc aac att ttc tat tca atc Ser Asp Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Gly Phe Asn Ile Phe Tyr Ser Ile 195 200 205	624
aat tct tgt cct aac aat tgc tct ggt cat ggg aag tgt aca act agt Asn Ser Cys Pro Asn Asn Cys Ser Gly His Gly Lys Cys Thr Thr Ser 210 215 220	672
gtc tct gtt cca agt caa gta tat tgt gaa tgt gat aaa tac tgg aag Val Ser Val Pro Ser Gln Val Tyr Cys Glu Cys Asp Lys Tyr Trp Lys 225 230 235 240	720
ggt gaa gct tgt gat att cct tac tgt aaa gcc aat tgc ggc agt cca Gly Glu Ala Cys Asp Ile Pro Tyr Cys Lys Ala Asn Cys Gly Ser Pro 245 250 255	768
gat cac ggt tac tgt gac ctg act gga gaa aaa tta tgt gtc tgc aat Asp His Gly Tyr Cys Asp Leu Thr Gly Glu Lys Leu Cys Val Cys Asn 260 265 270	816
gat agt tgg caa ggt cct gat tgt tct ttg aat gtt ccc tct act gag Asp Ser Trp Gln Gly Pro Asp Cys Ser Leu Asn Val Pro Ser Thr Glu 275 280 285	864
tct tac tgg att ctg cca aac gtt aaa ccc ttc agt cct tct gta ggt Ser Tyr Trp Ile Leu Pro Asn Val Lys Pro Phe Ser Pro Ser Val Gly 290 295 300	912
cgg gct tca cat aaa gca gtt tta cac ggg aaa ttt atg tgg gtg att Arg Ala Ser His Lys Ala Val Leu His Gly Lys Phe Met Trp Val Ile 305 310 315 320	960
ggt gga tat act ttt aac tac agt tct ttt caa atg gtc cta aat tac Gly Gly Tyr Thr Phe Asn Tyr Ser Ser Phe Gln Met Val Leu Asn Tyr 325 330 335	1008
aat tta gaa agc agt ata tgg aat gta gga act cca tca agg gga cct Asn Leu Glu Ser Ser Ile Trp Asn Val Gly Thr Pro Ser Arg Gly Pro 340 345 350	1056

WO 02/097120	PCT/US02/16391
ctc cag aga tat gga cac tct ctt gct tta tat cag gaa aac atc ttt Leu Gln Arg Tyr Gly His Ser Leu Ala Leu Tyr Gln Glu Asn Ile Phe 355 360 365	1104
atg tat gga ggc aga att gaa aca aat gat ggc aat gtc aca gat gaa Met Tyr Gly Gly Arg Ile Glu Thr Asn Asp Gly Asn Val Thr Asp Glu 370 375 380	1152
tta tgg gtt ttt aac ata cat agt cag tca tgg agt aca aaa act cct Leu Trp Val Phe Asn Ile His Ser Gln Ser Trp Ser Thr Lys Thr Pro 385 390 395 400	1200
act gtt ctt gga cat ggt cag cag tat gct gtg gag gga cat tca gca Thr Val Leu Gly His Gly Gln Gln Tyr Ala Val Glu Gly His Ser Ala 405 410 415	1248
cat att atg gag ttg gat agt aga gat gtt gtc atg atc ata ata ttt His Ile Met Glu Leu Asp Ser Arg Asp Val Val Met Ile Ile Ile Phe 420 425 430	1296
gga tat tct gca ata tat ggt tat aca agc agc ata cag gaa tac cat Gly Tyr Ser Ala Ile Tyr Gly Tyr Thr Ser Ser Ile Gln Glu Tyr His 435 440 445	1344
atc tca tca aac act tgg ctt gtt cca gaa act aaa gga gct att gta Ile Ser Ser Asn Thr Trp Leu Val Pro Glu Thr Lys Gly Ala Ile Val 450 455 460	1392
caa ggt gga tat ggc cat act agt gtg tat gat gaa aba aca aag tcc Gln Gly Gly Tyr Gly His Thr Ser Val Tyr Asp Glu Ile Thr Lys Ser 465 470 475 480	1440
att tat gtt cat gga ggg tat aaa gca ttg cca ggg aac aaa tat gga Ile Tyr Val His Gly Gly Tyr Lys Ala Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly 485 490 495	1488
ttg gtt gat gat ctt tat aaa tat gaa gtt aac act aag act tgg act Leu Val Asp Asp Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Asn Thr Lys Thr Trp Thr 500 505 510	1536
att ttg aaa gaa agt ggg ttt gcc aga tac ctt cat tca gct gtt ctt Ile Leu Lys Glu Ser Gly Phe Ala Arg Tyr Leu His Ser Ala Val Leu 515 520 525	1584
atc aat gga gct atg ctt att ttt gga gga aat acc cat aat gac act Ile Asn Gly Ala Met Leu Ile Phe Gly Gly Asn Thr His Asn Asp Thr 530 535 540	1632
tcc ttg agt aac ggt gca aaa tgt ttt tot gcc gat ttc ctg gca tat Ser Leu Ser Asn Gly Ala Lys Cys Phe Ser Ala Asp Phe Leu Ala Tyr 545 550 555 560	1680
gac ata gct tgt gat gaa tgg aaa ata cta cca aaa cca aat ctt cat Asp Ile Ala Cys Asp Glu Trp Lys Ile Leu Pro Lys Pro Asn Leu His 565 570 575	1728
aga gat gtc aac aga ttt gga cac tct gca gta gtc att aac ggg tcc Arg Asp Val Asn Arg Phe Gly His Ser Ala Val Val Ile Asn Gly Ser 580 585 590	1776

WO 02/097120													PCT/US02/16391												
atg tac ata ttt ggg gga ttt tct agt gta ctc ctt aat gat atc ctt	1824																								
Met Tyr Ile Phe Gly Gly Phe Ser Ser Val-Leu Leu Asn Asp Ile Leu																									
595	600																								
gta tac aag cct cca aat tgc aag gct ttc aga gat gaa gaa ctt tgt	1872																								
Val Tyr Lys Pro Pro Asn Cys Lys Ala Phe Arg Asp Glu Glu Leu Cys																									
610	615																								
aaa aat gct ggt cca ggg ata aaa tgt gtt tgg aat aaa aat cac tgt	1920																								
Lys Asn Ala Gly Pro Gly Ile Lys Cys Val Trp Asn Lys Asn His Cys																									
625	630																								
gaa tct tgg gaa tct ggg aat act aat aat att ctt aga gca aag tgc	1968																								
Pro Ser Trp Glu Ser Ala Asn Thr Asn Asn Ile Leu Arg Ala Lys Cys																									
645	650																								
cct cct aaa aca gct gct tct gat gac aga tgt tac aga tat gca gat	2016																								
Pro Pro Lys Thr Ala Ala Ser Asp Asp Arg Cys Tyr Arg Tyr Ala Asp																									
660	665																								
tgt gcc agc tgt act gcc aat aca aat ggg tgc caa tgg tgt gat gac	2064																								
Cys Ala Ser Cys Thr Ala Asn Thr Asn Gly Cys Gln Trp Cys Asp Asp																									
675	680																								
aag aaa tgc att tcg gca aat agt aac tgc agt atg tct gtc aag aac	2112																								
Lys Lys Cys Ile Ser Ala Asn Ser Asn Cys Ser Met Ser Val Lys Asn																									
690	695																								
tac acc aaa tgt cat gtg aga aat gag cag att tgt aac aaa ctt acc	2160																								
Tyr Thr Lys Cys His Val Arg Asn Glu Gln Ile Cys Asn Lys Leu Thr																									
705	710																								
agc tgt aaa agc tgt tca cta aac ttg aat tgc cag tgg gat cag aga	2208																								
Ser Cys Lys Ser Cys Ser Leu Asn Leu Asn Cys Gln Trp Asp Gln Arg																									
725	730																								
cag caa gaa tgc cag gct tta cca gct cat ctt tgt gga gaa gga tgg	2256																								
Gln Gln Glu Cys Gln Ala Leu Pro Ala His Leu Cys Gly Glu Gly Trp																									
740	745																								
agt cat att ggg gat gct tgt ctt aga gtc aat tcc agt aga gaa aac	2304																								
Ser His Ile Gly Asp Ala Cys Leu Arg Val Asn Ser Ser Arg Glu Asn																									
755	760																								
tat gac aat gca aaa ctt tat tgc tat aat ctt agt gga aat ctt gct	2352																								
Tyr Asp Asn Ala Lys Leu Tyr Cys Tyr Asn Leu Ser Gly Asn Leu Ala																									
770	775																								
tca tta aca acc tca aaa gaa gta gaa ttt gtt ctg gat gaa ata cag	2400																								
Ser Leu Thr Thr Ser Lys Glu Val Glu Phe Val Leu Asp Glu Ile Gln																									
785	790																								
aag tat aca caa cag aaa gta tca cct tgg gta gcc ttg cgc aag atc	2448																								
Lys Tyr Thr Gln Gln Lys Val Ser Pro Trp Val Gly Leu Arg Lys Ile																									
805	810																								
aat ata tcc tat tgg gga tgg gaa gac atg tct cct ttt aca aac aca	2496																								
Asn Ile Ser Tyr Trp Gly Trp Glu Asp Met Ser Pro Phe Thr Asn Thr																									
820	825																								

WO 02/097120	PCT/US02/16391
aca cta cag tgg ctt cct ggc gaa ccc aat gat tct ggg ttt tgt gca Thr Leu Gln Trp Leu Pro Gly Glu Pro Asn Asp Ser Gly Phe Cys Ala 835 840 845	2544
tat ctg gaa agg gct gca gtg gca ggc tta aaa gct aat cct tgt aca Tyr Leu Glu Arg Ala Ala Val Ala Gly Leu Lys Ala Asn Pro Cys Thr 850 855 860	2592
tct atg gca aat ggc ctt gtc tgt gaa aaa cct gtt gtt agt cca aat Ser Met Ala Asn Gly Leu Val Cys Glu Lys Pro Val Val Ser Pro Asn 865 870 875 880	2640
caa aat gcg agg ccg tgc aaa aag cca tgc tct ctg agg aca tca tgt Gln Asn Ala Arg Pro Cys Lys Lys Pro Cys Ser Leu Arg Thr Ser Cys 885 890 895	2688
tcc aac tgt aca agc aat ggc atg gag tgt atg tgg tgc agc agt acg Ser Asn Cys Thr Ser Asn Gly Met Glu Cys Met Trp Cys Ser Ser Thr 900 905 910	2736
aaa cga tgt gtt gac tct aat gcc tat atc atc tct ttt cca tat gga Lys Arg Cys Val Asp Ser Asn Ala Tyr Ile Ile Ser Phe Pro Tyr Gly 915 920 925	2784
caa tgt cta gag tgg caa act gcc acc tgc tcc cct caa aat tgt tct Gln Cys Leu Glu Trp Gln Thr Ala Thr Cys Ser Pro Gln Asn Cys Ser 930 935 940	2832
gga ttg aga acc tgt gga cag tgt ttg gaa cag cct gga tgt ggc tgg Gly Leu Arg Thr Cys Gly Gln Cys Leu Glu Gln Pro Gly Cys Gly Trp 945 950 955 960	2880
tgc aat gat cct agt aat aca gga aga gga cat tgc att gaa ggt tct Cys Asn Asp Pro Ser Asn Thr Gly Arg Gly His Cys Ile Glu Gly Ser 965 970 975	2928
tca cgg gga cca atg aag ctt att gga atg cac cac aat gag atg gtt Ser Arg Gly Pro Met Lys Leu Ile Gly Met His His Asn Glu Met Val 980 985 990	2976
ctt gac acc aat ctt tgc ccc aaa gaa aag aac tat gag tgg tcc ttt Leu Asp Thr Asn Leu Cys Pro Lys Glu Lys Asn Tyr Glu Trp Ser Phe 995 1000 1005	3024
atc cag tgt cca gct tgc cag tgt aat gga cat agc act tgc atc Ile Gln Cys Pro Ala Cys Gln Cys Asn Gly His Ser Thr Cys Ile 1010 1015 1020	3069
aat aat aat gtg tgc gaa cag tgt aaa aat ctc acc aca gga aag Asn Asn Asn Val Cys Glu Gln Cys Lys Asn Leu Thr Thr Gly Lys 1025 1030 1035	3114
cag tgt caa gat tgt atg cca ggt tat tat gga gat cca acc aat Gln Cys Gln Asp Cys Met Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Pro Thr Asn 1040 1045 1050	3159
ggt gga cag tgc aca gct tgt aca tgc agt ggc cat gca aat atc Gly Gly Gln Cys Thr Ala Cys Thr Cys Ser Gly His Ala Asn Ile 1055 1060 1065	3204

WO 02/097120										PCT/US02/16391									
tgt cat	ctg cac	aca gga	aaa	tgt ttc	tgc aca	act	aaa gga	ata	3249	Cys His	Leu His	Thr Gly	Lys	Cys Phe	Cys Thr	Thr	Lys Gly	Ile	
1070			1075			1080													
aaa ggt	gac caa	tgc caa	tta	tgt gac	tct gaa	aat	cgc tat	gtt	3294	Lys Gly	Asp Gln	Cys Gln	Leu	Cys Asp	Ser Ser	Glu Asn	Arg Tyr	Val	
1085			1090			1095													
ggt aat	cca ctt	aga gga	aca	tgt tat	tac agc	ctt	ttg att	gat	3339	Thr Gln	Pro Leu	Arg Gly	Thr	Cys Tyr	Tyr Ser	Leu	Leu Ile	Asp	
1100			1105			1110													
tat caa	ttt acc	ttc agc	tta	tta cag	gaa gat	gat	cgc cac	cat	3384	Thr Gln	Phe Thr	Phe Ser	Leu	Leu Gln	Glu Asp	Asp	Arg His	His	
1115			1120			1125													
act gcc	ata aac	ttt ata	gca	aac cca	gaa cag	tcg	aac aaa	aat	3429	Thr Ala	Ile Asn	Phe Ile	Asn	Asn Pro	Glu Gln	Ser	Asn Lys	Asn	
1130			1135			1140													
ctg gat	ata tca	att aat	gca	tca aac	aac ttt	aat	ctc aac	att	3474	Leu Asp	Ile Ser	Ile Asn	Ala	Ser Asn	Asn Phe	Asn	Leu Asn	Ile	
1145			1150			1155													
acg tgg	tct gtc	ggt tca	aca	gct gga	aca ata	tct	ggg gaa	gag	3519	Thr Trp	Ser Val	Gly Ser	Thr	Ala Gly	Thr Ile	Ser	Gly Glu	Glu	
1160			1165			1170													
act tct	ata gtt	ccc aag	aat	aat ata	aag gaa	tac	aga gat	agt	3564	Thr Ser	Ile Val	Ser Lys	Asn	Asn Ile	Lys Glu	Tyr	Arg Asp	Ser	
1175			1180			1185													
ttt ccc	tat gaa	aaa ttt	aac	ttt aga	agc aat	ccc	aac att	acg	3609	Phe Ser	Tyr Glu	Lys Phe	Asn	Phe Arg	Ser Asn	Pro	Asn Ile	Thr	
1190			1195			1200													
ttc tat	gtg tac	gtc agc	aac	ttt ccc	tgg cct	att	aaa ata	cag	3654	Phe Tyr	Val Tyr	Val Ser	Asn	Phe Ser	Trp Pro	Ile	Lys Ile	Gln	
1205			1210			1215													
att gca	ttc tca	caa cac	aat	aca atc	atg gac	ctt	gtg cag	ttt	3699	Ile Ala	Phe Ser	Gln His	Asn	Thr Ile	Met Asp	Leu	Val Gln	Phe	
1220			1225			1230													
ttt gtc	acc ttc	ttc agt	tgt	ttc cta	ccc tta	ttg	ctg gtg	get	3744	Phe Val	Thr Phe	Phe Ser	Cys	Phe Leu	Ser Leu	Leu	Leu Val	Ala	
1235			1240			1245													
gct gtg	gta tgg	aag atc	aaa	caa act	tgt tgg	gct	tct cga	cgg	3789	Ala Val	Val Trp	Lys Ile	Lys	Gln Thr	Cys Trp	Ala	Ser Arg	Arg	
1250			1255			1260													
aga gag	caa ctg	ctt cga	gaa	cga cag	cag atg	gcc	agc cgt	ccc	3834	Arg Glu	Gln Leu	Leu Arg	Glu	Arg Gln	Gln Met	Ala	Ser Arg	Pro	
1265			1270			1275													
ttt gct	tct gtt	gat gta	gct	ctg gaa	gtg gga	gct	gaa caa	aca	3879	Phe Ala	Ser Val	Asp Val	Ala	Leu Glu	Val Gly	Ala	Glu Gln	Thr	
1280			1285			1290													

WO 02/097120

PCT/US02/16391

gag ttt ctg cga ggg cca tta gag ggg gca ccc aag cca att gcc 3924
 Glu Phe Leu Arg Gly Pro Leu Glu Gly Ala Pro Lys Pro Ile Ala
 1295 1300 1305

att gaa cca tgt gct ggg aac aga gct gct gtt ctg act gtg ttt 3969
 Ile Glu Pro Cys Ala Gly Asn Arg Ala Ala Val Leu Thr Val Phe
 1310 1315 1320

ctt tgt cta cca cga gga tca tca ggt gcc cct ccc cct ggg cag 4014
 Leu Cys Leu Pro Arg Gly Ser Ser Gly Ala Pro Pro Gly Gln
 1325 1330 1335

tca ggc ctt gca att gcc agt gcc cta ata gat att tca caa cag 4059
 Ser Gly Leu Ala Ile Ala Ser Ala Leu Ile Asp Ile Ser Gln Gln
 1340 1345 1350

aaa gct tca gat agt aaa gat aag act tct gga gtc cgg aat cga 4104
 Lys Ala Ser Asp Ser Lys Asp Lys Thr Ser Gly Val Arg Asn Arg
 1355 1360 1365

aaa cac ctt tca aca cgt caa gga act tgt gtc tga 4140
 Lys His Leu Ser Thr Arg Gln Gly Thr Cys Val
 1370 1375

<210> 2
 <211> 1379
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 2

Met Glu Thr Gly Gly Arg Ala Arg Thr Gly Thr Pro Gln Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Pro Gly Val Trp Arg Ala Arg Pro Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala
 20 25 30

Ser Ser Trp Leu Leu Asp Gly Asn Ser Trp Leu Leu Cys Tyr Gly Phe
 35 40 45

Leu Tyr Leu Ala Leu Tyr Ala Gln Val Ser Gln Ser Lys Pro Cys Glu
 50 55 60

Arg Thr Gly Ser Cys Phe Ser Gly Arg Cys Val Asn Ser Thr Cys Leu
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Gly Trp Val Gly Asp Gln Cys Gln His Cys Gln Gly Arg
 85 90 95

Phe Lys Leu Thr Glu Pro Ser Gly Tyr Leu Thr Asp Gly Pro Ile Asn
 100 105 110

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Tyr Lys Tyr Lys Thr Lys Cys Thr Trp Leu Ile Glu Gly Tyr Pro Asn
 115 120 125
 Ala Val Leu Arg Leu Arg Phe Asn His Phe Ala Thr Glu Cys Ser Trp
 130 135 140
 Asp His Met Tyr Val Tyr Asp Gly Asp Ser Ile Tyr Ala Pro Leu Ile
 145 150 155 160
 Ala Val Leu Ser Gly Leu Ile Val Pro Glu Ile Arg Gly Asn Glu Thr
 165 170 175
 Val Pro Glu Val Val Thr Thr Ser Gly Tyr Ala Leu Leu His Phe Phe
 180 185 190
 Ser Asp Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Gly Phe Asn Ile Phe Tyr Ser Ile
 195 200 205
 Asn Ser Cys Pro Asn Asn Cys Ser Gly His Gly Lys Cys Thr Thr Ser
 210 215 220
 Val Ser Val Pro Ser Gln Val Tyr Cys Glu Cys Asp Lys Tyr Trp Lys
 225 230 235 240
 Gly Glu Ala Cys Asp Ile Pro Tyr Cys Lys Ala Asn Cys Gly Ser Pro
 245 250 255
 Asp His Gly Tyr Cys Asp Leu Thr Gly Glu Lys Leu Cys Val Cys Asn
 260 265 270
 Asp Ser Trp Gln Gly Pro Asp Cys Ser Leu Asn Val Pro Ser Thr Glu
 275 280 285
 Ser Tyr Trp Ile Leu Pro Asn Val Lys Pro Phe Ser Pro Ser Val Gly
 290 295 300
 Arg Ala Ser His Lys Ala Val Leu His Gly Lys Phe Met Trp Val Ile
 305 310 315 320
 Gly Gly Tyr Thr Phe Asn Tyr Ser Ser Phe Gln Met Val Leu Asn Tyr
 325 330 335
 Asn Leu Glu Ser Ser Ile Trp Asn Val Gly Thr Pro Ser Arg Gly Pro
 340 345 350

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Leu Gln Arg Tyr Gly His Ser Leu Ala Leu Tyr Gln Glu Asn Ile Phe
 355 360 365
 Met Tyr Gly Gly Arg Ile Glu Thr Asn Asp Gly Asn Val Thr Asp Glu
 370 375 380
 Leu Trp Val Phe Asn Ile His Ser Gln Ser Trp Ser Thr Lys Thr Pro
 385 390 395 400
 Thr Val Leu Gly His Gly Gln Gln Tyr Ala Val Glu Gly His Ser Ala
 405 410 415
 His Ile Met Glu Leu Asp Ser Arg Asp Val Val Met Ile Ile Ile Phe
 420 425 430
 Gly Tyr Ser Ala Ile Tyr Gly Tyr Thr Ser Ser Ile Gln Glu Tyr His
 435 440 445
 Ile Ser Ser Asn Thr Trp Leu Val Pro Glu Thr Lys Gly Ala Ile Val
 450 455 460
 Gln Gly Gly Tyr Gly His Thr Ser Val Tyr Asp Glu Ile Thr Lys Ser
 465 470 475 480
 Ile Tyr Val His Gly Gly Tyr Lys Ala Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly
 485 490 495
 Leu Val Asp Asp Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Asn Thr Lys Thr Trp Thr
 500 505 510
 Ile Leu Lys Glu Ser Gly Phe Ala Arg Tyr Leu His Ser Ala Val Leu
 515 520 525
 Ile Asn Gly Ala Met Leu Ile Phe Gly Gly Asn Thr His Asn Asp Thr
 530 535 540
 Ser Leu Ser Asn Gly Ala Lys Cys Phe Ser Ala Asp Phe Leu Ala Tyr
 545 550 555 560
 Asp Ile Ala Cys Asp Glu Trp Lys Ile Leu Pro Lys Pro Asn Leu His
 565 570 575
 Arg Asp Val Asn Arg Phe Gly His Ser Ala Val Val Ile Asn Gly Ser
 580 585 590

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Met Tyr Ile Phe Gly Gly Phe Ser Ser Val Leu Leu Asn Asp Ile Leu
595 600 605

Val Tyr Lys Pro Pro Asn Cys Lys Ala Phe Arg Asp Glu Glu Leu Cys
610 615 620

Lys Asn Ala Gly Pro Gly Ile Lys Cys Val Trp Asn Lys Asn His Cys
625 630 635

Glu Ser Trp Glu Ser Gly Asn Thr Asn Asn Ile Leu Arg Ala Lys Cys
645 650 655

Pro Pro Lys Thr Ala Ala Ser Asp Asp Arg Cys Tyr Arg Tyr Ala Asp
660 665 670

Cys Ala Ser Cys Thr Ala Asn Thr Asn Gly Cys Gln Trp Cys Asp Asp
675 680 685

Lys Lys Cys Ile Ser Ala Asn Ser Asn Cys Ser Met Ser Val Lys Asn
690 695 700

Tyr Thr Lys Cys His Val Arg Asn Glu Gln Ile Cys Asn Lys Leu Thr
705 710 715 720

Ser Cys Lys Ser Cys Ser Leu Asn Leu Asn Cys Gln Trp Asp Gln Arg
725 730 735

Gln Gln Glu Cys Gln Ala Leu Pro Ala His Leu Cys Gly Glu Gly Trp
740 745 750

Ser His Ile Gly Asp Ala Cys Leu Arg Val Asn Ser Ser Arg Glu Asn
755 760 765

Tyr Asp Asn Ala Lys Leu Tyr Cys Tyr Asn Leu Ser Gly Asn Leu Ala
770 775 780

Ser Leu Thr Thr Ser Lys Glu Val Glu Phe Val Leu Asp Glu Ile Gln
785 790 795 800

Lys Tyr Thr Gln Gln Lys Val Ser Pro Trp Val Gly Leu Arg Lys Ile
805 810 815

Asn Ile Ser Tyr Trp Gly Trp Glu Asp Met Ser Pro Phe Thr Asn Thr
820 825 830

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Thr Leu Gln Trp Leu Pro Gly Glu Pro Asn Asp Ser Gly Phe Cys Ala
 835 840 845
 Tyr Leu Glu Arg Ala Ala Val Ala Gly Leu Lys Ala Asn Pro Cys Thr
 850 855 860
 Ser Met Ala Asn Gly Leu Val Cys Glu Lys Pro Val Val Ser Pro Asn
 865 870 875 880
 Gln Asn Ala Arg Pro Cys Lys Lys Pro Cys Ser Leu Arg Thr Ser Cys
 885 890 895
 Ser Asn Cys Thr Ser Asn Gly Met Glu Cys Met Trp Cys Ser Ser Thr
 900 905 910
 Lys Arg Cys Val Asp Ser Asn Ala Tyr Ile Ile Ser Phe Pro Tyr Gly
 915 920 925
 Gln Cys Leu Glu Trp Gln Thr Ala Thr Cys Ser Pro Gln Asn Cys Ser
 930 935 940
 Gly Leu Arg Thr Cys Gly Gln Cys Leu Glu Gln Pro Gly Cys Gly Trp
 945 950 955 960
 Cys Asn Asp Pro Ser Asn Thr Gly Arg Gly His Cys Ile Glu Gly Ser
 965 970 975
 Ser Arg Gly Pro Met Lys Leu Ile Gly Met His His Asn Glu Met Val
 980 985 990
 Leu Asp Thr Asn Leu Cys Pro Lys Glu Lys Asn Tyr Glu Trp Ser Phe
 995 1000 1005
 Ile Gln Cys Pro Ala Cys Gln Cys Asn Gly His Ser Thr Cys Ile
 1010 1015 1020
 Asn Asn Asn Val Cys Glu Gln Cys Lys Asn Leu Thr Thr Gly Lys
 1025 1030 1035
 Gln Cys Gln Asp Cys Met Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Pro Thr Asn
 1040 1045 1050
 Gly Gly Gln Cys Thr Ala Cys Thr Cys Ser Gly His Ala Asn Ile
 1055 1060 1065

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Cys His Leu His Thr Gly Lys Cys Phe Cys Thr Thr Lys Gly Ile
 1070 1075 1080
 Lys Gly Asp Gln Cys Gln Leu Cys Asp Ser Glu Asn Arg Tyr Val
 1085 1090 1095
 Gly Asn Pro Leu Arg Gly Thr Cys Tyr Tyr Ser Leu Leu Ile Asp
 1100 1105 1110
 Tyr Gln Phe Thr Phe Ser Leu Leu Gln Glu Asp Asp Arg His His
 1115 1120 1125
 Thr Ala Ile Asn Phe Ile Ala Asn Pro Glu Gln Ser Asn Lys Asn
 1130 1135 1140
 Leu Asp Ile Ser Ile Asn Ala Ser Asn Asn Phe Asn Leu Asn Ile
 1145 1150 1155
 Thr Trp Ser Val Gly Ser Thr Ala Gly Thr Ile Ser Gly Glu Glu
 1160 1165 1170
 Thr Ser Ile Val Ser Lys Asn Asn Ile Lys Glu Tyr Arg Asp Ser
 1175 1180 1185
 Phe Ser Tyr Glu Lys Phe Asn Phe Arg Ser Asn Pro Asn Ile Thr
 1190 1195 1200
 Phe Tyr Val Tyr Val Ser Asn Phe Ser Trp Pro Ile Lys Ile Gln
 1205 1210 1215
 Ile Ala Phe Ser Gln His Asn Thr Ile Met Asp Leu Val Gln Phe
 1220 1225 1230
 Phe Val Thr Phe Phe Ser Cys Phe Leu Ser Leu Leu Leu Val Ala
 1235 1240 1245
 Ala Val Val Trp Lys Ile Lys Gln Thr Cys Trp Ala Ser Arg Arg
 1250 1255 1260
 Arg Glu Gln Leu Leu Arg Glu Arg Gln Gln Met Ala Ser Arg Pro
 1265 1270 1275
 Phe Ala Ser Val Asp Val Ala Leu Glu Val Gly Ala Glu Gln Thr
 1280 1285 1290

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Glu Phe Leu Arg Gly Pro Leu Glu Gly Ala Pro Lys Pro Ile Ala
1295 1300 1305

Ile Glu Pro Cys Ala Gly Asn Arg Ala Ala Val Leu Thr Val Phe
1310 1315 1320

Leu Cys Leu Pro Arg Gly Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Gly Gln
1325 1330 1335

Ser Gly Leu Ala Ile Ala Ser Ala Leu Ile Asp Ile Ser Gln Gln
1340 1345 1350

Lys Ala Ser Asp Ser Lys Asp Lys Thr Ser Gly Val Arg Asn Arg
1355 1360 1365

Lys His Leu Ser Thr Arg Gln Gly Thr Cys Val
1370 1375

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FLAG peptide sequence

<400> 3

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Linker

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Linker

<220>

WO 02/097120

PCT/US02/16391

<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X is one or more repeats of GGGGS

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Linker

<400> 6

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Linker

<400> 7

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Linker

<400> 8

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/097120

PCT/US02/16391

<220>

<223> Peptide Linker

<400> 9

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide Linker

<400> 10

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
 1 5 10

<210> 11

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Leucine Zipper Peptide

<400> 11

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

Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr
 20 25

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Leucine Zipper Peptide

<400> 12

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

WO 02/097120

PCT/US02/16391

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

Arg

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Localization Sequence

<400> 13

Lys Lys Lys Arg Lys
1 5

<210> 14
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Localization Sequence

<400> 14

Met Leu Arg Thr Ser Ser Leu Phe Thr Arg Arg Val Gln Pro Ser Leu
1 5 10 15

Phe Arg Asn Ile Leu Arg Leu Gln Ser Thr
 20 25

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Localization Sequence

<400> 15

Lys Asp Glu Leu
1

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Localization Sequence

WO 02/097120

PCT/US02/16391

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X is any amino acid

<400> 16

Cys Ala Ala Xaa
1

<210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Peptide Localization Sequence

<220>
 <221> Misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> X is any amino acid

<400> 17

Cys Cys Xaa Xaa
1

<210> 18
 <211> 4134
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(4134)
 <223>

<400> 18

atg gag ccg ggg gtc cgg gcc cgc tcg ggt gcc ccg cag ccg gcc tcc	48
Met Glu Pro Gly Val Arg Ala Arg Ser Gly Ala Pro Gln Pro Ala Ser	
1 5 10 15	
ccg gtg ctg tgg agg gct cgg ccg gcc ggc ggt ggg gcc tcc tcc	96
Pro Val Leu Trp Arg Ala Arg Pro Ala Gly Gly Gly Ala Ser Ser	
20 25 30	
tgg ctg ctg ctg gac ggg aac acc tgg ctg ctg tgc tat gcc ttc ctc	144
Trp Leu Leu Leu Asp Gly Asn Ser Trp Leu Leu Cys Tyr Gly Phe Leu	
35 40 45	
tac ctg gcg ctc tat gct cag gtg tcc cag tcc aag ccc tgc gag agg	192
Tyr Leu Ala Leu Tyr Ala Gln Val Ser Gln Ser Lys Pro Cys Glu Arg	
50 55 60	

WO 02/097120

PCT/US02/16391

act ggc tcc tgc ttc tcc ggt cgc tgt gtc aac tcc acc tgc ctg tgc Thr Gly Ser Cys Phe Ser Gly Arg Cys Val Asn Ser Thr Cys Leu Cys 65 70 75 80	240
gac ccg ggc tgg gtt ggg gac cag tgc cag cac tgc cag ggc agg ttc Asp Pro Gly Trp Val Gly Asp Gln Cys Gln His Cys Gln Gly Arg Phe 85 90 95	288
aag tta aca gaa cct tct gga tat tta aca gat gga cca att aac tat Lys Leu Thr Glu Pro Ser Gly Tyr Leu Thr Asp Gly Pro Ile Asn Tyr 100 105 110	336
aaa tat aaa aca aag tgt aca tgg cta att gaa ggc tat cca aat gca Lys Tyr Lys Thr Lys Cys Thr Trp Leu Ile Glu Gly Tyr Pro Asn Ala 115 120 125	384
gtg cta agg tta aga ttc aat cat ttt gct aca gaa tgc agc tgg gat Val Leu Arg Leu Arg Phe Asn His Phe Ala Thr Glu Cys Ser Trp Asp 130 135 140	432
cat atg tat gtt tat gat gga gat tct ata tac gca cct tta gta gct His Met Tyr Val Tyr Asp Gly Asp Ser Ile Tyr Ala Pro Leu Val Ala 145 150 155 160	480
gta ctt agt ggc ttg atc gtt cct gaa gtg agg ggt aac gag acc gtg Val Leu Ser Gly Leu Ile Val Pro Glu Val Arg Gly Asn Glu Thr Val 165 170 175	528
cct gag gtg gtc acg acg tct ggc tac gcg ctg ctc cac ttt ttc agc Pro Glu Val Val Thr Thr Ser Gly Tyr Ala Leu Leu His Phe Phe Ser 180 185 190	576
gat gct gca tat aac cta act ggc ttc aac att ttt tat tgg atc aat Asp Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Gly Phe Asn Ile Phe Tyr Ser Ile Asn 195 200 205	624
tcc tgt cct aac aac tgc tct ggt cat gga aag tgt aca acc agt gtc Ser Cys Pro Asn Asn Cys Ser Gly His Gly Lys Cys Thr Thr Ser Val 210 215 220	672
tct gtt gca agt caa gtg tat tgt gaa tgc gac aaa tac tgg aaa ggg Ser Val Ala Ser Gln Val Tyr Cys Glu Cys Asp Lys Tyr Trp Lys Gly 225 230 235 240	720
gaa gca tgt gac att cct tac tgt aaa gcc aat tgt ggg agt cca gat Glu Ala Cys Asp Ile Pro Tyr Cys Lys Ala Asn Cys Gly Ser Pro Asp 245 250 255	768
cat ggc tac tgt gac cta aca gga gag aaa ctc tgt gtc tgc aac gat His Gly Tyr Cys Asp Leu Thr Gly Glu Lys Leu Cys Val Cys Asn Asp 260 265 270	816
agt tgg caa gcc cca gat tgt tct ctg aat gtc cct tct act gag tct Ser Trp Gln Gly Pro Asp Cys Ser Leu Asn Val Pro Ser Thr Glu Ser 275 280 285	864
tac tgg att ttg cca aat gtt aaa ccc ttc agc cct tcc gta ggt egg Tyr Trp Ile Leu Pro Asn Val Lys Pro Phe Ser Pro Ser Val Gly Arg 290 295 300	912

WO 02/097120										PCT/US02/16391									
gcc tca cat aaa gca gtt tta cat ggg aaa ttc atg tgg gtg att gga	960																		
Ala Ser His Lys Ala Val Leu His Gly Lys Phe Met Trp Val Ile Gly																			
305	310	315	320																
gga tat act ttt aac tac agt tct ttt caa atg gtt ctg aat tac aat	1008																		
Gly Tyr Thr Phe Asn Tyr Ser Ser Phe Gln Met Val Leu Asn Tyr Asn																			
325	330	335																	
tta gaa agc agt ata tgg aat gta ggt gct gta tca agg ggc cct ctt	1056																		
Leu Glu Ser Ser Ile Trp Asn Val Gly Ala Val Ser Arg Gly Pro Leu																			
340	345	350																	
cag aga tac gga cat tct ctt gcc ctg tat cag gaa aac atc ttt atg	1104																		
Tyr Arg Tyr Gly His Ser Leu Ala Leu Tyr Gln Glu Asn Ile Phe Met																			
355	360	365																	
tac gga ggc aga atg gag acc agt gat gcc aac gtc acc gat gaa tta	1152																		
Tyr Gly Gly Arg Met Glu Thr Ser Asp Gly Asn Val Thr Asp Glu Leu																			
370	375	380																	
tgg gtg ttt aac gta cgc agt caa tca tgg agc acg aaa acc ccc act	1200																		
Trp Val Phe Asn Val Arg Ser Gln Ser Trp Ser Thr Lys Thr Pro Thr																			
385	390	395	400																
gtc ctt ggc cac agt cag cag tac gct gtg gag gga cac tgg gca cac	1248																		
Val Leu Gly His Ser Gln Gln Tyr Ala Val Glu Gly His Ser Ala His																			
405	410	415																	
atc atg gag ctg gac agt aga gac gtg gtc atg gtc ata ttt gga	1296																		
Ile Met Glu Leu Asp Ser Arg Asp Val Val Met Ile Val Ile Phe Gly																			
420	425	430																	
tat tct gca ata tat ggc tat acc agc agc ata cag gaa tac cat atc	1344																		
Tyr Ser Ala Ile Tyr Gly Tyr Thr Ser Ser Ile Gln Glu Tyr His Ile																			
435	440	445																	
tcc tca aac act tgg cta gtt cca gaa acg aaa gga gcc att gtg caa	1392																		
Ser Ser Asn Thr Trp Leu Val Pro Glu Thr Lys Gly Ala Ile Val Gln																			
450	455	460																	
ggt gga tat ggc cac aca agt gtg tat gac gaa gtg acc aag tcc atc	1440																		
Gly Gly Tyr Gly His Thr Ser Val Tyr Asp Glu Val Thr Lys Ser Ile																			
465	470	475	480																
tat gtt cac gga ggc tac aaa gca ttg cct gcc aat aag tac ggg ctg	1488																		
Tyr Val His Gly Gly Tyr Lys Ala Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Leu																			
485	490	495																	
gtg gac gac ctg tat aag tac gaa gtc aac acc agg act tgg act att	1536																		
Val Asp Asp Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Asn Thr Arg Thr Trp Thr Ile																			
500	505	510																	
ttg aaa gaa agt ggg ttt gcc aga tac ctt cac tca gct gtt ctt atc	1584																		
Leu Lys Glu Ser Gly Phe Ala Arg Tyr Leu His Ser Ala Val Leu Ile																			
515	520	525																	
aat gga gct atg ctt att ttt gga gga aat acc cat aat gat act tcc	1632																		
Asn Gly Ala Met Leu Ile Phe Gly Gly Asn Thr His Asn Asp Thr Ser																			
530	535	540																	

WO 02/097120													PCT/US02/16391
ctg agt aac ggt gca aaa tgt ttt tct gcc gat ttc ctg gca tat gac	1680												
Leu Ser Asn Gly Ala Lys Cys Phe Ser Ala Asp Phe Leu Ala Tyr Asp													
545	550 555 560												
ata gct tgt gac gaa tgg aag aca ttg cct aaa cca aat ctc cat aga	1728												
Ile Ala Cys Asp Glu Trp Lys Thr Leu Pro Lys Pro Asn Leu His Arg													
565	570 575												
gac gtc aac cga ttt ggg cat tct gca gtc gtc atc aat ggg tca atg	1776												
Asp Val Asn Arg Phe Gly His Ser Ala Val Val Ile Asn Gly Ser Met													
580	585 590												
tat ata ttt ggt gga ttt tct agt gta ctc ctt aat gat atc ctt gtg	1824												
Tyr Ile Phe Gly Gly Phe Ser Ser Val Leu Leu Asn Asp Ile Leu Val													
595	600 605												
tat aaa ccc cca aat tgc aaa gct ttc cga gat gaa gaa ctg tgc aga	1872												
Tyr Lys Pro Pro Asn Cys Lys Ala Phe Arg Asp Glu Glu Leu Cys Arg													
610	615 620												
aac gct ggt cca ggg ata aaa tgt gtt tgg aat aag aat cac tgt gaa	1920												
Asn Ala Gly Pro Gly Ile Lys Cys Val Trp Asn Lys Asn His Cys Glu													
625	630 635 640												
tct tgg gag tct ggg aat aca aat aat att ctc aga gcc aag tgc cct	1968												
Ser Trp Glu Ser Gly Asn Thr Asn Asn Ile Leu Arg Ala Lys Cys Pro													
645	650 655												
ccc aag aca gct gct acc gat gac aga tgt tac aga tat gct gac tgt	2016												
Pro Lys Thr Ala Ala Thr Asp Asp Arg Cys Tyr Arg Tyr Ala Asp Cys													
660	665 670												
gcc agc tgc aca gcc aac acg aac ggg tgc cag tgg tgt gac gac aag	2064												
Ala Ser Cys Thr Ala Asn Thr Asn Gly Cys Gln Trp Cys Asp Asp Lys													
675	680 685												
aaa tgc atc tca gcc agc agc aac tgc agc acg tct gtc aga aac tac	2112												
Lys Cys Ile Ser Ala Ser Ser Asn Cys Ser Thr Ser Val Arg Asn Tyr													
690	695 700												
act aaa tgt cat ata aga aat gag cag att tgt aac aaa ctt aca agc	2160												
Thr Lys Cys His Ile Arg Asn Glu Gln Ile Cys Asn Lys Leu Thr Ser													
705	710 715 720												
tgt aaa agc tgt tca ctc aac ttg aat tgc cag tgg gat cag cgg cag	2208												
Cys Lys Ser Cys Ser Leu Asn Leu Asn Cys Gln Trp Asp Gln Arg Gln													
725	730 735												
cag gaa tgt cag gct ttg cca gct cac ctt tgt gga gaa ggc tgg aat	2256												
Gln Glu Cys Gln Ala Leu Pro Ala His Leu Cys Gly Glu Gly Trp Asn													
740	745 750												
cat gtt ggg gac gct tgt ctt cga atc aat tcc agt cga gaa agc tat	2304												
His Val Gly Asp Ala Cys Leu Arg Ile Asn Ser Ser Arg Glu Ser Tyr													
755	760 765												
gat aat gcc aaa ctt tat tgc tat aac ctc agt gga aat ctc gcc tcc	2352												
Asp Asn Ala Lys Leu Tyr Cys Tyr Asn Leu Ser Gly Asn Leu Ala Ser													
770	775 780												

WO 02/097120	PCT/US02/16391
ctg acc acg tcc aag gag gtg gag ttt gtg ttg gat gaa ata cag aag Leu Thr Thr Ser Lys Glu Val Glu Phe Val Leu Asp Glu Ile Gln Lys 785 790 795 800	2400
ttc aca cag cag aaa gtg tca ccg tgg gta ggc cta cgc aag atc aac Phe Thr Gln Gln Lys Val Ser Pro Trp Val Gly Leu Arg Lys Ile Asn 805 810 815	2448
ata tcc tac tgg gga tgg gag gac atg tct cct ttc aca aat aca agc Ile Ser Tyr Trp Gly Trp Glu Asp Met Ser Pro Phe Thr Asn Thr Ser 820 825 830	2496
ctg cag tgg ctt cct ggt gag cca aat gac tct gga ttc tgt gcc tac Leu Gln Trp Leu Pro Gly Glu Pro Asn Asp Ser Gly Phe Cys Ala Tyr 835 840 845	2544
tta gaa agg gct gca gtg gca ggg tta aaa gca aac cct tgc aca tcc Leu Glu Arg Ala Ala Val Ala Gly Leu Lys Ala Asn Pro Cys Thr Ser 850 855 860	2592
atg gca gat gga ctc gtt tgt gaa aag cct gta gta agc cca aat cag Met Ala Asp Gly Leu Val Cys Glu Lys Pro Val Val Ser Pro Asn Gln 865 870 875 880	2640
aac gcg agg ccg tgc aag aag ccg tgc tcc ctg agg acc tcc tgc gcc Asn Ala Arg Pro Cys Lys Lys Pro Cys Ser Leu Arg Thr Ser Cys Ala 885 890 895	2688
aac tgc acg agc agc ggc atg gag tgc atg tgg tgc agc agc acg aag Asn Cys Thr Ser Ser Gly Met Glu Cys Met Trp Cys Ser Ser Thr Lys 900 905 910	2736
cgc tgt gtg gac tcc aac gct tac atc atc tcc ttt ccc tac gga cag Arg Cys Val Asp Ser Asn Ala Tyr Ile Ile Ser Phe Pro Tyr Gly Gln 915 920 925	2784
tgc ctg gag tgg cag act gcc acc tgc tcy cct caa aat tgt tct ggg Cys Leu Glu Trp Gln Thr Ala Thr Cys Ser Pro Gln Asn Cys Ser Gly 930 935 940	2832
tta sga acc tgt gga cag tgc ttg gag cag cca ggg tgt ggc tgg tgc Leu Arg Thr Cys Gly Gln Cys Leu Glu Gln Pro Gly Cys Gly Trp Cys 945 950 955 960	2880
aac gat cct agt aac aca gga aga ggc tat tgc atc gaa ggg tct tcc Asn Asp Pro Ser Asn Thr Gly Arg Gly Tyr Cys Ile Glu Gly Ser Ser 965 970 975	2928
cgg ggc cca atg aaa ctc gtg ggg gtc cac aac agt gac gtg gtt ctt Arg Gly Pro Met Lys Leu Val Gly Val His Asn Ser Asp Val Val Leu 980 985 990	2976
gac acc agc ctc tgc ccc aag gag aag aac tac gag tgg tct ttt atc Asp Thr Ser Leu Cys Pro Lys Glu Lys Asn Tyr Glu Trp Ser Phe Ile 995 1000	3024
cag tgt cca gct tgc cag tgt aat gga cac agc acg tgc atc aac Gln Cys Pro Ala Cys Gln Cys Asn Gly His Ser Thr Cys Ile Asn 1010 1015 1020	3069

WO 02/097120										PCT/US02/16391									
aac aac gtc tgt gag cag tgt aag aat ctc acc act ggg cga cag	3114																		
Asn Asn Val Cys Glu Gln Cys Lys Asn Leu Thr Thr Gly Arg Gln																			
1025 1030 1035																			
tgt cag gaa tgc atg cca ggg tac tat gga gac cca acc aac ggt	3159																		
Cys Gln Glu Cys Met Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Pro Thr Asn Gly																			
1040 1045 1050																			
ggg cag tgc aca gct tgc acg tgc ggc ggc cat cgg aac gtc tgt	3204																		
Gly Gln Cys Thr Ala Cys Thr Cys Gly Gly His Ala Asn Val Cys																			
1055 1060 1065																			
cac ctg cac acg gga aag tgt ttt tgc aca acc aag ggg atc aag	3249																		
His Leu His Thr Gly Lys Cys Phe Cys Thr Thr Lys Gly Ile Lys																			
1070 1075 1080																			
ggt gac cag tgc cag cta tgt gac tct gaa aat cgc tat gtt ggt	3294																		
Gly Asp Gln Cys Gln Leu Cys Asp Ser Glu Asn Arg Tyr Val Gly																			
1085 1090 1095																			
aat cca ctt agg ggg aca tgc tat tac agt ctt ctg att gac tac	3339																		
Asn Pro Leu Arg Gly Thr Cys Tyr Tyr Ser Leu Leu Ile Asp Tyr																			
1100 1105 1110																			
cag ttt acc ttc agc ttg ctg cag gaa gat gac cgg cac cac act	3384																		
Gln Phe Thr Phe Ser Leu Leu Gln Glu Asp Asp Arg His His Thr																			
1115 1120 1125																			
gcc atc aac ttc atc gcc aac cca gag cag tca aac aaa aac ttg	3429																		
Ala Ile Asn Phe Ile Ala Asn Pro Glu Gln Ser Asn Lys Asn Leu																			
1130 1135 1140																			
gac att tgc att aat gct tcc aac aac ttt aat ctc aac att acg	3474																		
Asp Ile Ser Ile Asn Ala Ser Asn Asn Phe Asn Leu Asn Ile Thr																			
1145 1150 1155																			
tgg tca gtt gcc tca aca ggt gga acc ata tct ggg gaa gag act	3519																		
Trp Ser Val Gly Ser Thr Gly Gly Thr Ile Ser Gly Glu Glu Thr																			
1160 1165 1170																			
cct ata gtt tct aag aca aat ata aag gaa tac aga gac agc ttt	3564																		
Pro Ile Val Ser Lys Thr Asn Ile Lys Glu Tyr Arg Asp Ser Phe																			
1175 1180 1185																			
tcc tat gaa aaa ttt aac ttc aga agc aat cct aat atc aca ttt	3609																		
Ser Tyr Glu Lys Phe Asn Phe Arg Ser Asn Pro Asn Ile Thr Phe																			
1190 1195 1200																			
tat gtg tat gtc agc aac ttc tcc tgg cct att aaa ata cag att	3654																		
Tyr Val Tyr Val Ser Asn Phe Ser Trp Pro Ile Lys Ile Gln Ile																			
1205 1210 1215																			
gcg ttt tca caa cac aac acg atc atg gat ctc gtg cag ttc ttt	3699																		
Ala Phe Ser Gln His Asn Thr Ile Met Asp Leu Val Gln Phe Phe																			
1220 1225 1230																			
gtc acc ttc ttc agt tgt ttt tta tct tta ctg ctg gtg gct gct	3744																		
Val Thr Phe Phe Ser Cys Phe Leu Ser Leu Leu Leu Val Ala Ala																			
1235 1240 1245																			

WO 02/097120 PCT/US02/16391

gtg gtc tgg aag atc aaa caa act tgc tgg gct tct cgt cgg agg 3789
Val Val Trp Lys Ile Lys Gln Thr Cys Trp Ala Ser Arg Arg Arg
1250 1255 1260

gag caa ctg ctt cga gaa cga cag cag atg gcc agc cgt ccc ttt 3834
Glu Gln Leu Leu Arg Glu Arg Gln Gln Met Ala Ser Arg Pro Phe
1265 1270 1275

gct tct gtt gat gta gcc ctg gaa gta gga gct gaa cag aca gac 3879
Ala Ser Val Asp Val Ala Leu Glu Val Gly Ala Glu Gln Thr Asp
1280 1285 1290

ttt ctg cga ggg cca tta gag ggt gcc cct aag cca ata gcc atc 3924
Phe Leu Arg Gly Pro Leu Glu Gly Ala Pro Lys Pro Ile Ala Ile
1295 1300 1305

gaa ccc tgc gct ggg aac aga gct gct gtc ctg act gtg ttt ctc 3969
Glu Pro Cys Ala Gly Asn Arg Ala Ala Val Leu Thr Val Phe Leu
1310 1315 1320

tgt cta ccg aga gga tct tca ggc gcc cca ccc cct ggg cag tca 4014
Cys Leu Pro Arg Gly Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Gly Gln Ser
1325 1330 1335

ggc ctt gct atc gcc agt gcc ctg ata gac atc tca cag cag aag 4059
Gly Leu Ala Ile Ala Ser Ala Leu Ile Asp Ile Ser Gln Gln Lys
1340 1345 1350

cct tct gat aat aaa gac aag act tct gga gtc cgc aat cgg aag 4104
Pro Ser Asp Asn Lys Asp Lys Thr Ser Gly Val Arg Asn Arg Lys
1355 1360 1365

cac ctc tcc aca cgt caa gga act tgt gtc 4134
His Leu Ser Thr Arg Gln Gly Thr Cys Val
1370 1375

<210> 19
<211> 1378
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 19

Met Glu Pro Gly Val Arg Ala Arg Ser Gly Ala Pro Gln Pro Ala Ser
1 5 10 15

Pro Val Leu Trp Arg Ala Arg Pro Ala Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ser
20 25 30

Trp Leu Leu Leu Asp Gly Asn Ser Trp Leu Leu Cys Tyr Gly Phe Leu
35 40 45

Tyr Leu Ala Leu Tyr Ala Gln Val Ser Gln Ser Lys Pro Cys Glu Arg
50 55 60

WO 02/097120

PCT/US02/16391

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

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Ala Ser His Lys Ala Val Leu His Gly Lys Phe Met Trp Val Ile Gly
305 310 315 320

Gly Tyr Thr Phe Asn Tyr Ser Ser Phe Gln Met Val Leu Asn Tyr Asn
325 330 335

Leu Glu Ser Ser Ile Trp Asn Val Gly Ala Val Ser Arg Gly Pro Leu
340 345 350

Gln Arg Tyr Gly His Ser Leu Ala Leu Tyr Gln Glu Asn Ile Phe Met
355 360 365

Tyr Gly Gly Arg Met Glu Thr Ser Asp Gly Asn Val Thr Asp Glu Leu
370 375 380

Trp Val Phe Asn Val Arg Ser Gln Ser Trp Ser Thr Lys Thr Pro Thr
385 390 395 400

Val Leu Gly His Ser Gln Gln Tyr Ala Val Glu Gly His Ser Ala His
405 410 415

Ile Met Glu Leu Asp Ser Arg Asp Val Val Met Ile Val Ile Phe Gly
420 425 430

Tyr Ser Ala Ile Tyr Gly Tyr Thr Ser Ser Ile Gln Glu Tyr His Ile
435 440 445

Ser Ser Asn Thr Trp Leu Val Pro Glu Thr Lys Gly Ala Ile Val Gln
450 455 460

Gly Gly Tyr Gly His Thr Ser Val Tyr Asp Glu Val Thr Lys Ser Ile
465 470 475 480

Tyr Val His Gly Gly Tyr Lys Ala Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Leu
485 490 495

Val Asp Asp Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Asn Thr Arg Thr Trp Thr Ile
500 505 510

Leu Lys Glu Ser Gly Phe Ala Arg Tyr Leu His Ser Ala Val Leu Ile
515 520 525

Asn Gly Ala Met Leu Ile Phe Gly Gly Asn Thr His Asn Asp Thr Ser
530 535 540

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Leu Ser Asn Gly Ala Lys Cys Phe Ser Ala Asp Phe Leu Ala Tyr Asp
 545 550 555 560
 Ile Ala Cys Asp Glu Trp Lys Thr Leu Pro Lys Pro Asn Leu His Arg
 565 570 575
 Asp Val Asn Arg Phe Gly His Ser Ala Val Val Ile Asn Gly Ser Met
 580 585 590
 Tyr Ile Phe Gly Gly Phe Ser Ser Val Leu Leu Asn Asp Ile Leu Val
 595 600 605
 Tyr Lys Pro Pro Asn Cys Lys Ala Phe Arg Asp Glu Glu Leu Cys Arg
 610 615 620
 Asn Ala Gly Pro Gly Ile Lys Cys Val Trp Asn Lys Asn His Cys Glu
 625 630 635 640
 Ser Trp Glu Ser Gly Asn Thr Asn Asn Ile Leu Arg Ala Lys Cys Pro
 645 650 655
 Pro Lys Thr Ala Ala Thr Asp Asp Arg Cys Tyr Arg Tyr Ala Asp Cys
 660 665 670
 Ala Ser Cys Thr Ala Asn Thr Asn Gly Cys Gln Trp Cys Asp Asp Lys
 675 680 685
 Lys Cys Ile Ser Ala Ser Ser Asn Cys Ser Thr Ser Val Arg Asn Tyr
 690 695 700
 Thr Lys Cys His Ile Arg Asn Glu Gln Ile Cys Asn Lys Leu Thr Ser
 705 710 715 720
 Cys Lys Ser Cys Ser Leu Asn Leu Asn Cys Gln Trp Asp Gln Arg Gln
 725 730 735
 Gln Glu Cys Gln Ala Leu Pro Ala His Leu Cys Gly Glu Gly Trp Asn
 740 745 750
 His Val Gly Asp Ala Cys Leu Arg Ile Asn Ser Ser Arg Glu Ser Tyr
 755 760 765
 Asp Asn Ala Lys Leu Tyr Cys Tyr Asn Leu Ser Gly Asn Leu Ala Ser
 770 775 780

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Leu Thr Thr Ser Lys Glu Val Glu Phe Val Leu Asp Glu Ile Gln Lys
 785 790 795 800
 Phe Thr Gln Gln Lys Val Ser Pro Trp Val Gly Leu Arg Lys Ile Asn
 805 810 815
 Ile Ser Tyr Trp Gly Trp Glu Asp Met Ser Pro Phe Thr Asn Thr Ser
 820 825 830
 Leu Gln Trp Leu Pro Gly Glu Pro Asn Asp Ser Gly Phe Cys Ala Tyr
 835 840 845
 Leu Glu Arg Ala Ala Val Ala Gly Leu Lys Ala Asn Pro Cys Thr Ser
 850 855 860
 Met Ala Asp Gly Leu Val Cys Glu Lys Pro Val Val Ser Pro Asn Gln
 865 870 875 880
 Asn Ala Arg Pro Cys Lys Lys Pro Cys Ser Leu Arg Thr Ser Cys Ala
 885 890 895
 Asn Cys Thr Ser Ser Gly Met Glu Cys Met Trp Cys Ser Ser Thr Lys
 900 905 910
 Arg Cys Val Asp Ser Asn Ala Tyr Ile Ile Ser Phe Pro Tyr Gly Gln
 915 920 925
 Cys Leu Glu Trp Gln Thr Ala Thr Cys Ser Pro Gln Asn Cys Ser Gly
 930 935 940
 Leu Arg Thr Cys Gly Gln Cys Leu Glu Gln Pro Gly Cys Gly Trp Cys
 945 950 955 960
 Asn Asp Pro Ser Asn Thr Gly Arg Gly Tyr Cys Ile Glu Gly Ser Ser
 965 970 975
 Arg Gly Pro Met Lys Leu Val Gly Val His Asn Ser Asp Val Val Leu
 980 985 990
 Asp Thr Ser Leu Cys Pro Lys Glu Lys Asn Tyr Glu Trp Ser Phe Ile
 995 1000
 Gln Cys Pro Ala Cys Gln Cys Asn Gly His Ser Thr Cys Ile Asn
 1010 1015 1020

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Asn Asn Val Cys Glu Gln Cys Lys Asn Leu Thr Thr Gly Arg Gln
 1025 1030 1035
 Cys Gln Glu Cys Met Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Pro Thr Asn Gly
 1040 1045 1050
 Gly Gln Cys Thr Ala Cys Thr Cys Gly Gly His Ala Asn Val Cys
 1055 1060 1065
 His Leu His Thr Gly Lys Cys Phe Cys Thr Thr Lys Gly Ile Lys
 1070 1075 1080
 Gly Asp Gln Cys Gln Leu Cys Asp Ser Glu Asn Arg Tyr Val Gly
 1085 1090 1095
 Asn Pro Leu Arg Gly Thr Cys Tyr Tyr Ser Leu Leu Ile Asp Tyr
 1100 1105 1110
 Gln Phe Thr Phe Ser Leu Leu Gln Glu Asp Asp Arg His His Thr
 1115 1120 1125
 Ala Ile Asn Phe Ile Ala Asn Pro Glu Gln Ser Asn Lys Asn Leu
 1130 1135 1140
 Asp Ile Ser Ile Asn Ala Ser Asn Asn Phe Asn Leu Asn Ile Thr
 1145 1150 1155
 Trp Ser Val Gly Ser Thr Gly Gly Thr Ile Ser Gly Glu Glu Thr
 1160 1165 1170
 Pro Ile Val Ser Lys Thr Asn Ile Lys Glu Tyr Arg Asp Ser Phe
 1175 1180 1185
 Ser Tyr Glu Lys Phe Asn Phe Arg Ser Asn Pro Asn Ile Thr Phe
 1190 1195 1200
 Tyr Val Tyr Val Ser Asn Phe Ser Trp Pro Ile Lys Ile Gln Ile
 1205 1210 1215
 Ala Phe Ser Gln His Asn Thr Ile Met Asp Leu Val Gln Phe Phe
 1220 1225 1230
 Val Thr Phe Phe Ser Cys Phe Leu Ser Leu Leu Leu Val Ala Ala
 1235 1240 1245

WO 02/097120

PCT/US02/16391

Val Val Trp Lys Ile Lys Gln Thr Cys Trp Ala Ser Arg Arg Arg
1250 1255 1260

Glu Gln Leu Leu Arg Glu Arg Gln Gln Met Ala Ser Arg Pro Phe
1265 1270 1275

Ala Ser Val Asp Val Ala Leu Glu Val Gly Ala Glu Gln Thr Asp
1280 1285 1290

Phe Leu Arg Gly Pro Leu Glu Gly Ala Pro Lys Pro Ile Ala Ile
1295 1300 1305

Glu Pro Cys Ala Gly Asn Arg Ala Ala Val Leu Thr Val Phe Leu
1310 1315 1320

Cys Leu Pro Arg Gly Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Gly Gln Ser
1325 1330 1335

Gly Leu Ala Ile Ala Ser Ala Leu Ile Asp Ile Ser Gln Gln Lys
1340 1345 1350

Pro Ser Asp Asn Lys Asp Lys Thr Ser Gly Val Arg Asn Arg Lys
1355 1360 1365

His Leu Ser Thr Arg Gln Gly Thr Cys Val
1370 1375

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer; sense strand

<400> 20

caatatctgg ggaagagact tctatagttt ccaag

35

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

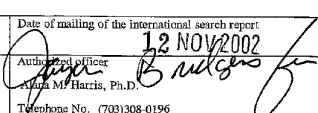
<223> PCR Primer; Antisense strand

<400> 21

ggtttcatt tctcagacac aagttccttg acgtgt

36

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/16391																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/00, 1/68; G01N 33/53, 1/00, 33/00, 33/48, 33/567, 33/574; A01N 61/00; A61K 31/00, 38/00, 31/07, 35/14; A01N 43/04; C07H 1/00, 19/00, 5/04, 5/06, 21/00, 21/04; C08B 37/00; C07K 2/00, 4/00, 5/00, 7/00, 14/00, 16/00, 17/00, 1/00																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Continuation Sheet 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	WO 00/15651 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE) 23 March 2000 (23.03.2000), page 13, lines 9-12; pages 21-29; pages 33-36 and Figures 13 and 14	6, 7, 13, 14 and 16-47																		
X	GenCore database, Accession number AAY70691. Sequence 12 from WO 00/15651 compared with Applicants' SEQ ID NO: 2 and 19. 25 March 2000.	6, 7 and 13																		
Y		14 and 16-47																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*†</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention.</td> </tr> <tr> <td>*A* documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*X*</td> <td>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.</td> </tr> <tr> <td>*B* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*Y*</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</td> </tr> <tr> <td>*L* documents 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)</td> <td>*A*</td> <td>document members of the same patent family.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	*†	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention.	*A* documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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.	*B* earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.	*L* documents 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)	*A*	document members of the same patent family.	*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		
* Special categories of cited documents:	*†	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention.																		
A documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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.																		
B earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.																		
L documents 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)	*A*	document members of the same patent family.																		
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																				
Date of the actual completion of the international search 28 September 2002 (28.09.2002)	Date of mailing of the international search report 12 NOV 2002																			
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized Officer  Anna M. Harris, Ph.D. Telephone No. (703)308-0196																			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/16391

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:
435/4, 6, 7.1, 7.21, 7.23, 325; 436/63, 64, 86, 174; 514//1, 2, 42, 43, 44; 530/300, 350, 386, 387.1; 536/1, 1.11, 18.7, 22.1, 23.1, 24.5

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
GenCore, DIALOG, BIOSIS PREVIEWS, CANCERLIT, MEDLINE, IMS WORLD PATENTS, CHINESE PATENT'S ABS

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 3/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 7/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/32	
A 6 1 P 25/32	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 31/22	A 6 1 P 31/22	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 33/02	A 6 1 P 33/02	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D

G 0 1 N 33/53
// C 1 2 P 21/08

G 0 1 N 33/53
C 1 2 N 5/00
A 6 1 K 37/02
C 1 2 P 21/08

M
A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行

(74)代理人 100092886
弁理士 村上 清

(72)発明者 アンダーソン, ダーク・エム
アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 0 7, シアトル, ノースウエスト・シックスティフォース・ス
トリート 3 6 1 6

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA40 BA11 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 CA01 CA04 CA07 CA11 DA02 DA05 DA11 EA02
EA03 EA04 FA02 GA01 GA11 HA01 HA03 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ01 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62
QS25 QS34 QS36 QX02
4B064 AG01 AG27 CA01 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA22 NA14 ZA011 ZA021 ZA081 ZA151
ZA161 ZA341 ZA361 ZA381 ZA401 ZA551 ZA591 ZA701 ZA751 ZA891
ZA941 ZA961 ZA971 ZB051 ZB071 ZB081 ZB111 ZB131 ZB151 ZB211
ZB261 ZB331 ZB371 ZB381 ZC061 ZC211 ZC351 ZC391 ZC541 ZC551
4C085 AA14 DD61
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 NA14 ZA01 ZA02 ZA08 ZA15 ZA16
ZA34 ZA36 ZA38 ZA40 ZA55 ZA59 ZA70 ZA75 ZA89 ZA94
ZA96 ZA97 ZB05 ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZB27 ZB33
ZB35 ZB37 ZB38 ZC06 ZC21 ZC35 ZC39 ZC54 ZC55
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA00 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	Atractin /桃花心木样多肽，多核苷酸，抗体和使用它们的方法		
公开(公告)号	JP2004535185A	公开(公告)日	2004-11-25
申请号	JP2003500285	申请日	2002-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	CORP Immunex公司 株式会社Immunex公司		
申请(专利权)人(译)	NEX了Immunex公司		
[标]发明人	アンダーソンダークエム		
发明人	アンダーソン,ダーク・エム		
IPC分类号	A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/02 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K5/103 C07K5/11 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K2039/505 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/04 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/02 A61P35/00 A61P35/02 C07K5/1013 C07K5/1019 C07K14/70596 C07K2319/00 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/5008 G01N33/5023 G01N33/5032 G01N33/5038 G01N33/5091 G01N33/564 G01N33/6863 G01N33/6893 G01N2500/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.N A61K48/00 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/02 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ01 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA081 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA341 4C084/ZA361 4C084/ZA381 4C084/ZA401 4C084/ZA551 4C084/ZA591 4C084/ZA701 4C084/ZA751 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB051 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZB371 4C084/ZB381 4C084/ZC061 4C084/ZC211 4C084/ZC351 4C084/ZC391 4C084/ZC541 4C084/ZC551 4C085/AA14 4C085/DD61 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA08 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA34 4C086/ZA36 4C086/ZA38 4C086/ZA40 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA70 4C086/ZA75 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB05 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZB37		

4C086/ZB38 4C086/ZC06 4C086/ZC21 4C086/ZC35 4C086/ZC39 4C086/ZC54 4C086/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA00 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74

代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 村上 清
優先权	60/293608 2001-05-25 US 60/324626 2001-09-24 US
其他公开文献	JP2004535185A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本公开内容提供了吸引素/桃花心木样多肽及其片段，编码此类多肽和片段的多核苷酸，产生此类多肽的重组形式的方法，针对这些多肽或片段产生的抗体，以及使用这些多肽，抗体和方法的测定和方法。多核苷酸。

【表 2】

断片	サイズ	順	プライマー
A	494 bp	センス:	5'-GGGGAAGATGGAGACTGG
		アンチセンス:	5'-GTACAGCTATTAAAGGTGCATATATTGAATCTCC
B	952 bp	センス:	5'-TTAACAGAACCTTCTGGATATTTAACAGATGGC
		アンチセンス:	5'-CTGAATGTCCTCCACAGCATACTGCTG
C	837 bp	センス:	5'-GTTCTTGGACATGGTCAGCAGTATGCTGTG
		アンチセンス:	5'-TTGTATTGGCAGTACAGCTGGCACAATCTG
D	897 bp	センス:	5'-GCTGCTTCTGATGACAGATGTTACAGATATGC
		アンチセンス:	5'-CACATCCAGGCTGTCCAAACACTGTCCAC
E	855 bp	センス:	5'-CCATATGGACAATGTCTAGAGTGGCAAACCTGC
		アンチセンス:	5'-GCTGACGTACACATAGAACGTAATGTTAGGATTGC
F	650 bp	センス:	5'-CAATATCTGGGAAGAGACTTCTATAGTTTCCAAG
		アンチセンス:	5'-GGTTTCCAATTTCTCAGACACAAGTTCCTTGACGTGT