(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A61K 38/03 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년01월18일
(11) 등록번호 10-0671036
(24) 등록일자 2007년01월11일

(21) 출원번호	10-2001-7003379	(65) 공개번호	10-2001-0085807
(22) 출원일자	2001년03월15일	(43) 공개일자	2001년09월07일
심사청구일자	2004년09월10일		
번역문 제출일자	2001년03월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/DK1999/000481	(87) 국제공개번호	WO 2000/15807
국제출원일자	1999년09월13일	국제공개일자	2000년03월23일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 도미니카, 남아프리카, 코스타리카, 인도, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장

PA199801164	1998년09월15일	덴마크(DK)
60/102,896	1998년10월02일	미국(US)

(73) 특허권자
파멕사 에이 / 에스
덴마크 디케이-2970 회르스홀름 코글레 알레 6

(72) 발명자
할키에르 토르벤
덴마크 디케이-2680 솔뢰드 스트랜드 링베이 5

하아닝 제스퍼
덴마크 디케이-3460 비르케뢰드 비스콥 스반스 베이 2이

(74) 대리인
박장원

심사관 : 임혜준

전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 오스테오프로테게린 리간드 활성을 하향-조절하는 방법

(57) 요약

본 발명은 오스테오프로테게린 리간드(OPGL, TRANCE)의 생리적 활성을 하향-조절하는 신규한 방법을 제공하고, 그로 인해 과도한 뼈 질량의 손실을 특징으로 하는 질병, 예컨대 골다공증을 치료/개선할 수 있다. 하향-조절은 이를 요구하는 개체에서 OPGL에 대항하는 면역 반응을 유발함으로써 초래된다. 면역 반응은 OPGL의 면역원성 변종을 이용한 전형적인 면역화 또는 핵산에 의해 OPGL 변종을 코딩하는 핵산 면역화에 의해 발생할 수 있다. 또한 본 발명은 본 발명에서 유용한 조성물, 폴리펩타이드 및 핵산에 관한 것이고, 그 제조에 이용되는 벡터 및 형질 전환된 숙주 세포에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1.

- 동물의 OPGL 폴리펩타이드 또는 그의 서브서열, 또는

- 동물의 OPGL 폴리펩타이드로부터 유도된 OPGL 유사체로서, 이 유사체로 그 동물을 면역화시킬 경우 그 동물의 OPGL 폴리펩타이드에 대한 항체 생산이 유도되도록 변형된 OPGL 유사체

를 유효성분으로서 함유하는, 상기 동물에서 OPGL을 하향 조절하기 위한 약학적 조성물로서, 여기서 상기 OPGL 폴리펩타이드는 골다공증 또는 뼈의 과도한 재흡수를 특징으로 하는 기타 증상을 치료, 예방 또는 경감시키기 위한 자가 단백질인 것인 약학적 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 변형에 의해 OPGL B-세포 에피토프의 실질적인 분획이 보존되고

- 적어도 하나의 외래 T 헬퍼 림프구 에피토프 (T_H 에피토프)가 도입되고/도입되거나

- 변형된 분자를 항원 제시 세포(APC) 또는 B-림프구에 표적화시키는 첫번째 부분(moiety)이 적어도 하나 도입되고/도입되거나

- 면역계를 자극하는 두번째 부분이 적어도 하나 도입되고/도입되거나

- 면역계에 대한 변형된 OPGL 폴리펩타이드의 제시를 최적화시켜주는 세번째 부분이 적어도 하나 도입되는 조성물.

청구항 3.

제2항에 있어서, 상기 변형이, OPGL 또는 그의 서브서열에서 적절한 화학 작용기와의 공유결합 또는 비공유결합에 의해 외래 T_H 에피토프 및/또는 첫번째 및/또는 두번째 및/또는 세번째 부분을 측기(side groups)로서 도입하는 것을 포함하는 조성물.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 변형이 아미노산 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입 및/또는 부가를 포함하는 조성물.

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 변형에 의해 융합 폴리펩타이드가 제공되는 조성물.

청구항 6.

제4항 또는 제5항에 있어서, 아미노산의 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입 및/또는 부가의 도입이 OPGL의 전체적인 삼차 구조를 실질적으로 보존되게 하는 조성물.

청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 변형이 하나 이상의 OPGL B-세포 에피토프의 복제 및/또는 합텐의 도입을 포함하는 조성물.

청구항 8.

제2항에 있어서, 외래의 T-세포 에피토프가 동물에서 면역우성인 조성물.

청구항 9.

제2항에 있어서, 외래 T-세포 에피토프가 대부분의 MHC 클래스 II 분자들과 결합할 수 있는 것인 조성물.

청구항 10.

제9항에 있어서, 적어도 하나의 외래 T-세포 에피토프가 천연의 T-세포 에피토프 및 인공적인 MHC-II 결합 펩타이드 서열 중에서 선택되는 조성물.

청구항 11.

제10항에 있어서, 천연의 T-세포 에피토프가, P2 또는 P30과 같은 파상풍 톡소이드 에피토프, 디프테리아 톡소이드 에피토프, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 에피토프 및 *피. 팔시파룸*(*P. falciparum*) CS 에피토프 중에서 선택되는 조성물.

청구항 12.

제2항에 있어서, 첫번째 부분이, 합텐 또는 B-림프구 또는 APC 상에 수용체가 존재하는 탄수화물과 같이 B-림프구 특이적인 표면 항원 또는 APC 특이적인 표면 항원에 대하여 특이적인 결합 파트너인 조성물.

청구항 13.

제2항에 있어서, 두번째 부분이 사이토카인, 호르몬 및 열충격 단백질 중에서 선택되는 조성물.

청구항 14.

제13항에 있어서, 사이토카인이 인터페론 γ(IFN-γ), Flt3L, 인터루킨 1(IL-1), 인터루킨 2(IL-2), 인터루킨 4(IL-4), 인터루킨 6(IL-6), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨 13(IL-13), 인터루킨 15(IL-15) 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 중에서 선택된 것이거나, 그 유효 부분이고, 열충격 단백질은 HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 및 칼레티큘린(calreticulin)(CRT) 중에서 선택되거나 그 유효 부분인 조성물.

청구항 15.

제2항에 있어서, 세번째 부분이, 팔미토일기, 미리스틸기, 파르네실기, 제라닐-제라닐기, GPI-유지 및 N-아실 디글리세라이드기와 같은 지질성인 조성물.

청구항 16.

제1항에 있어서, 상기 변형이, OPGL 폴리펩타이드 또는 그의 서브배열이, 위치 170-192 중 어느 하나, 위치 198-218 중 어느 하나, 위치 221-246 중 어느 하나, 위치 256-261 중 어느 하나 또는 위치 285-316 중 어느 하나(여기서 아미노산 번호는 SEQ ID NOs: 4, 6, 및 12 중 어느 하나의 번호에 따름)에서 변형된 것이거나, 또는 OPGL 폴리펩타이드가 위치 171-193 중 어느 하나, 위치 199-219 중 어느 하나, 위치 222-247 중 어느 하나, 위치 257-262 중 어느 하나 또는 위치 286-317 중 어느 하나(여기서 아미노산 번호는 SEQ ID NO: 2의 번호에 따름)에서 변형된 것이고 한편으로 동물의 OPGL B-세포 에피토프의 실질적인 분획은 보전된 것인 조성물.

청구항 17.

제16항에 있어서, 상기 변형이, 제16항에서 정의된 위치 내의 적어도 하나의 아미노산 서열을 외래의 T_H 에피토프를 포함하는, 이것과 동등하거나 상이한 길이의 아미노산 서열로 치환하는 것을 포함하는 조성물.

청구항 18.

제17항에 있어서, 외래의 T_H 에피토프를 함유하는 아미노산 서열이, SEQ ID NO: 4에서 발견된 아미노산 256-261 및/또는 288-302 및/또는 221-241, 또는 SEQ ID NO: 2 또는 Cys-221에 상응하는 시스테인이 Ser로 치환되어 있는 폴리펩타이드에서 발견된 아미노산 257-262 및/또는 289-303 및/또는 222-243을 치환한 것인 조성물.

청구항 19.

동물에 있어서 골다공증 또는 뼈의 과도한 재흡수를 특징으로 하는 기타 증상을 치료, 예방 또는 경감시키기 위해 OPGL을 하향 조절하기 위한 면역원성 조성물을 함유하는 약학적 조성물로서, 상기 면역원성 조성물은 다음을 포함하여 이루어지는 것인 약학적 조성물:

- OPGL 폴리펩타이드에 대한 당해 동물의 자가관용성(autotolerance)을 파괴하도록, 면역학적으로 허용되는 어쥬번트와 함께 배합된, 그 동물의 자기유래성(autologous) OPGL 폴리펩타이드의 면역학적 유효량: 여기서, 상기 조성물은 약학적 및 면역학적으로 허용되는 담체 및/또는 비히클을 추가로 함유한다; 또는

- 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 정의된 OPGL 유사체의 면역학적 유효량, 여기서 상기 조성물은 약학적 및 면역학적으로 허용되는 담체 및/또는 비히클 및 필요한 경우 어쥬번트를 추가로 함유한다.

청구항 20.

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에서 정의된 OPGL, OPGL의 서브서열 또는 OPGL 유사체를 코딩하는 핵산 단편을 유효성분으로서 함유하는, 골다공증 또는 뼈의 과도한 재흡수를 특징으로 하는 기타 증상을 치료, 예방 또는 경감시키기 위해 동물에 있어서 OPGL을 하향 조절하기 위한 약학적 조성물.

청구항 21.

제20항에서 정의된 핵산 단편을 함유하는 벡터를 유효성분으로서 함유하는, 동물에 있어서 골다공증 또는 뼈의 과도한 재흡수를 특징으로 하는 기타 증상을 치료, 예방 또는 경감시키기 위해 OPGL을 하향 조절하기 위한 약학적 조성물.

청구항 22.

제21항에 있어서, 상기 벡터가 자율복제를 할 수 있는 것인 조성물.

청구항 23.

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 벡터가 플라스미드 및 바이러스 중에서 선택된 것인 조성물.

청구항 24.

제21항에 있어서, 5'→3' 방향 및 조작가능한 결합에 있어서, 상기 벡터가 제20항에서 정의된 핵산 단편의 발현을 구동하는 프로모터, 필요에 따라 폴리펩타이드 단편의 분비 또는 막 중으로의 통합(integration)을 가능케하는 선도 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열, 제20항에서 정의된 핵산 단편, 및 필요에 따라 종결인자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 25.

제21항에 있어서, 상기 벡터가 숙주 세포 내로 도입될 경우 숙주 세포 게놈 내로 통합되거나 통합되지 못하는 조성물.

청구항 26.

제24항 또는 제25항에 있어서, 벡터 내의 프로모터가 진핵 세포 및/또는 원핵 세포에서의 발현을 구동하는 것인 조성물.

청구항 27.

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에서 정의된 벡터를 담지 및 발현하는 비병원성 형질전환 세포를 유효성분으로서 함유하는, 동물에 있어서 골다공증 또는 뼈의 과도한 재흡수를 특징으로 하는 기타 증상을 치료, 예방 또는 경감시키기 위해 OPGL을 하향 조절하기 위한 약학적 조성물.

청구항 28.

제27항에 있어서, 상기 형질전환 세포가 제20항에서 정의된 핵산 단편을 복제할 수 있는 것인 조성물.

청구항 29.

제28항에 있어서, 상기 형질전환 세포가 박테리아인 조성물.

청구항 30.

제29항에 있어서, 상기 박테리아가 미코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) BCG., 스트렙토코커스 종(*Streptococcus* spp.), 이. 콜라이(*E. coli*), 살모넬라 종(*Salmonella* spp.), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 및 시겔라(*Shigella*) 중에서 선택되는 조성물.

청구항 31.

제30항에 있어서, 상기 형질전환 세포가 그의 표면에 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에서 정의된 OPGL, OPGL 서브서열 또는 OPGL 유사체를 분비하거나 갖는 것인 조성물.

청구항 32.

동물에 있어서 골다공증 또는 뼈의 과도한 재흡수를 특징으로 하는 기타 증상을 치료, 예방 또는 경감시키기 위해 OPGL을 하향 조절하고, OPGL에 대한 항체 생산을 유발하기 위한, 다음을 함유하는 약학적 조성물:

- 제20항에서 정의된 핵산 단편 또는 제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에서 정의된 벡터, 및

- 약학적 및 면역학적으로 허용되는 담체 및/또는 비히클 및/또는 어쥬번트.

청구항 33.

- 펩타이드 합성 또는 유전공학 기술에 의해, 동물종의 OPGL 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 아미노산을 부가, 삽입, 결실 또는 치환시켜 상호 다른 변형된 OPGL 폴리펩타이드 세트를 제조하고, 그에 의해, 그 동물종에 외래인 T-세포 에피토프를 포함하는 세트에서 아미노산 서열을 발생시키거나, 또는 상호 다른 변형된 OPGL 폴리펩타이드 세트를 코딩하는 핵산 단편 세트를 제조하고,

- 비변형 OPGL에 대한 동물종에 의한 항체 생산 유발능력에 있어서의 변형된 OPGL 폴리펩타이드 또는 핵산 단편 세트의 멤버들을 시험하고,

- 그 동물종에 있어서 비변형 OPGL에 대한 항체의 생산을 유의적으로 유발하는 변형된 OPGL 폴리펩타이드 세트의 멤버(들)을 동정 및 임의로 분리하거나, 또는, 그 동물종에 있어서 비변형 OPGL에 대한 항체의 생산을 유의적으로 유발하는 변형된 OPGL 폴리펩타이드 세트의 멤버들에 의해 코딩된 폴리펩타이드 발현 산물을 동정 및 임의로 분리하는 단계를 포함하여 이루어지는, 비변형 OPGL 폴리펩타이드가 자가단백질인 동물종에 있어서, 비변형 OPGL에 대한 항체를 유발할 수 있는 변형된 OPGL 폴리펩타이드의 동정 방법.

청구항 34.

- 펩타이드 합성 또는 유전공학 기술에 의해, 동물종의 OPGL 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 아미노산을 부가, 삽입, 결실 또는 치환시켜 상호 다른 변형된 OPGL 폴리펩타이드 세트를 제조하고, 그에 의해, 그 동물종에 외래인 T-세포 에피토프를 포함하는 세트에서 아미노산 서열을 발생시키고,

- 비변형 OPGL에 대한 동물종에 의한 항체 생산 유발능력에 있어서의 핵산 단편 세트의 멤버들을 시험하고,

- OPGL과 반응성인 동물종에서 항체 생산을 유의적으로 유발하는 세트의 멤버(들)을, 약학적 및 면역학적으로 허용되는 담체 및/또는 비히클과 혼합하고, 임의로 약학적 및 면역학적으로 허용되는 적어도 한가지 어쥬번트와 조합시키는 단계를 포함하여 이루어지는, 비변형 OPGL 폴리펩타이드가 자기단백질인 동물종에 있어서, 비변형 OPGL에 대한 항체를 유발시킬 수 있는 적어도 하나의 변형된 OPGL 폴리펩타이드를 함유하는 면역원성 조성물의 제조방법.

청구항 35.

제33항 또는 제34항에 있어서, 세트의 멤버들의 제조가, 각 서열이 제20항에 따른 핵산 서열인 상호 다른 핵산 서열의 제조, 당해 핵산 서열의 적절한 발현 벡터 내로의 삽입, 벡터를 이용한 적절한 숙주 세포의 형질전환 및 핵산 서열의 발현, 임의로 그 후의 발현 산물의 분리를 포함하는 것인 방법.

청구항 36.

제35항에 있어서, 핵산 서열 및/또는 벡터의 제조가 PCR과 같은 분자 증폭 기술 또는 핵산 합성의 지원으로 달성되는 방법.

청구항 37.
삭제

청구항 38.
삭제

청구항 39.
삭제

청구항 40.
삭제

청구항 41.
삭제

청구항 42.
삭제

청구항 43.
삭제

청구항 44.
삭제

청구항 45.
삭제

청구항 46.
삭제

청구항 47.
삭제

청구항 48.
삭제

청구항 49.
삭제

청구항 50.
삭제

청구항 51.
삭제

청구항 52.
삭제

청구항 53.
삭제

청구항 54.
삭제

청구항 55.
삭제

청구항 56.
삭제

명세서

기술분야

본 발명은 골다공증 및 지속적인 뼈 조직의 손실을 특징으로 하는 다른 질병들의 치료와 예방을 향상시키기 위한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 골다공증을 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 대상에서 오스테오프로테게린 리간드(OPGL)에 대항하는 항체의 생산을 가능하게 함으로써 OPGL를 하향-조절하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 그러한 변형된 OPGL 뿐 아니라 이 방법에서 유용한 변형된 OPGL을 생산하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명에 의해, 변형된 OPGL을 코딩하는 핵산 단편뿐 아니라 이러한 핵산 단편을 병합시키는 벡터 그리고 그들에 의하여 형질 전환된 숙주 세포와 세포 라인을 초래한다. 본 발명은 또한 변형된 OPGL을 함유하거나 OPGL 유사체(OPGL analogue)를 코딩하는 핵산을 함유하는 조성물 뿐 아니라 본 발명의 방법에서 유용한 OPGL 유사체의 동정 방법을 제공한다.

배경기술

골다공증은 세계적으로 주요하며 증가 추세에 있는 건강상의 문제이다. 미국, 유럽 및 일본을 통털어 칠천 오백만으로 추정되는 사람들이 이 질병에 걸렸다. 따라서 이것은 세계의 산업화 분야에서 가장 일반적인 전신의 뼈 장애이다.

골다공증은 상당한 수의 남성을 포함하여, 폐경 후 여성의 4분의 1과 대부분의 노령층에서 나타난다. 미국에서 병에 걸린 천 오백만명의 환자가 1984년 1년에 38억 U.S.달라로 추정되는 비용을 골다공증에 소비하였다. 외삽법에 의해 이것은 세계적으로 적어도 200억 U.S.달라에 해당하는 비용으로 해석된다.

골다공증은 뼈의 저질량과 뼈 조직의 미세-구조상 약화에 의해 뼈의 취약성과 파쇄성을 증가시키는 전신의 골격 질병이다. 모든 뼈가 약화될 수 있으나, 척추, 손목 및 둔부의 파쇄가 통상적이며 가장 일반적이다. 골다공증의 발병 위험은 연령에 따라 증가하고 남성에 비해 여성에서 보다 높다. 이 병인학은 표준의 뼈 질량 손실을 강조하는 메카니즘에 역점을 두며, 폐경기 여성에게 수반되고 연령이 증가하는 모든 개인에서 발생한다.

약 35세에서 최고의 뼈 질량에 도달한다. 이 최고점에 도달한 이후, 리모델링의 불균형에 의해 일생을 통해 뼈 질량이 감소한다. 뼈는 미네랄과 유기 매트릭스를 잃으나 그 기본적인 유기 구조를 유지한다.

뼈는 다양한 단백질과 단백질글리칸; 타입 I 콜라겐인 주요 성분을 포함하는 미네랄화 세포외 매트릭스로 구성된다. 세포외 매트릭스의 외피를 형성하는 미네랄은 하이드록시아파타이트($Ca_3(PO_4)_2 \cdot Ca(OH)_2$)이다. 뼈는 성장과 발육 동안 끊임없이 모델링되고 물리 화학적 신호에 반응하여 일생 동안 리모델링된다.

뼈의 성장, 발육 및 보존은 고도로 조절된 작용이며, 세포 수준에서 뼈-형성 세포(조골세포)와 뼈-재흡수 세포(파골세포)의 등위 조절을 포함한다. 뼈의 질량 수준은 뼈 형성과 재흡수의 균형을 반영한다.

조골세포는 중간엽 간세포로부터 발생하며, 일생의 발육 동안, 뼈 손상 후 그리고 표준 뼈의 리모델링 동안 뼈 매트릭스를 생산한다. 파골세포는 단구-대식세포 직계의 조혈성 전구체로부터 분화된 것으로 뼈 매트릭스를 재흡수한다.

조골세포와 파골세포 기능의 불균형은 뼈 질량의 증가(골경화증) 또는 뼈 질량의 감소(골다공증)에 의한 골격의 이상을 야기할 수 있다.

돌연변이 생쥐에서 골다공증 연구 결과, 파골세포 발육, 성숙 및/또는 활성에서의 유전적인 결함이 뼈 재흡수를 감소시키고 한결같이 심각한 골경화증을 야기시킴을 발견하였다(Marks, 1989). 그럼에도 불구하고, 상대적으로 파골세포의 발육을 조절하기 위해 생리적으로 작용하는 용해성 인자에 대해서는 거의 알려져 있지 않다.

그러나, 최근에 이 조절에 관여하는 두가지 단백질이 설명 및 기술되었다(Simonet 등, 1997; Lacey 등, 1998). 이들 두 단백질이 오스테오프로테게린과 오스테오프로테게린 리간드이다.

오스테오프로테게린은 종양 괴사 인자 수용체 족의 신규한 분비 요소이다. 실험관에서, 오스테오프로테게린은 용량 의존성 방법으로 파골세포의 생성을 억제한다. 오스테오프로테게린을 발현시키는 형질 도입된 생쥐는 파골세포의 감소와 연관하여 일반적으로 뼈 질량의 증가(골경화증)를 나타낸다. 재조합 오스테오프로테게린의 투여로 표준적인 생쥐에서 유사한 효과가 나타나고 래트에서 난소 절제술-관련의 뼈 손실에 대항하는 보호를 제공한다(Simonet 등, 1997). 게다가, 태어났을 때 표준 생쥐에 비해 오스테오프로테게린-결핍 생쥐(녹아웃 생쥐)는 골다공증과 동맥 석회화의 개시가 보다 빨리 전개된다(Bucay 등, 1998). 이러한 관찰은 오스테오프로테게린이 뼈 재흡수의 체액성 조절자로서 작용할 수 있음을 제안하며, 유일한 뼈-재흡수 세포 타입이 아니라면 주요하게 파골세포의 분화를 억제할 수 있다는 것을 강력하게 지적한다. 오스테오프로테게린이 WO97/23614의 주제이다.

오스테오프로테게린이 파골세포의 발육을 촉진하는 인자에 결합하여 중화시키고, 따라서 파골세포의 성숙을 억제함으로써 그 효과를 발휘한다는 가설이 성립되었다(Simonet 등, 1997).

오스테오프로테게린 리간드(OPGL)는 막-결합과 용해 형태 모두로 존재하는 사이토카인의 종양 괴사 인자 족의 신규한 요소이다. OPGL은 4nM의 결합 친화력으로 오스테오프로테게린과 결합한다. 실험관에서, OPGL은 성숙한 파골세포를 활성화시키고 CSF-1의 존재하에 골수 전구체로부터 파골 세포의 형성을 조절한다. 또한 OPGL이 CSF-1 처리된 골수에서 파골세포 전구물의 표면에 결합하는 것이 입증되었다. 그러나, 이러한 조혈성 전구 세포 위에 존재하는 OPGL의 수용체는 알려져 있지 않다. 재조합 용해성 OPGL이 생체내 뼈 재흡수의 유력한 유도인자이다(Lacey 등, 1998).

OPGL의 설명

OPGL은 317의 아미노산 잔기(인간, cf. SEQ ID NO:2) 또는 316의 아미노산 잔기(쥐, cf. SEQ ID NOs:4와 6)로 구성된 타입 II 막통과 단백질로서 합성된다. 두 아미노산 서열의 정렬 결과 동일한 아미노산 잔기가 87%의 상동 위치에서 발견된다는 것을 알 수 있다.

OPGL 아미노산 서열은 N-말단에서 짧은 세포질 영역을 포함하며 이것은 아미노산 잔기 49와 69간에 막통과 영역으로 추정된다. 종양 괴사 인자 알파에 대한 그 상동성에 기초하여 두개의 영역: 아미노산 잔기 70에서 157까지 확장하는 줄기 영역, 그리고 아미노산 잔기 158에서 C-말단까지 확장하는 활성 리간드 부분이 OPGL의 세포외 부분을 포함한다고 제안되어졌다.

OPGL과 가장 근접하게 관련된 단백질은 25% 미만의 상동 아미노산 잔기를 가지며 세포 자멸을 유도하는 사이토카인 트레일(TRAIL)인 것으로 보인다. 또한 OPGL은 매우 최근에 다른 환경에서 복제되었고 각각 트랜스(TRANCE)(Wong 등, 1997, J.Biol.Chem. 272:25190-25194)와 랭클(RANKL)(Anderson 등, 1997, Nature 390:175-179)이라 불린다. 또한 이 단백질은 파골세포 분화 인자(ODF)로서 알려져 있다.

쥐 OPGL의 여러가지 N-말단 삭제 변종을 이. 콜라이(*E. coli*)에서 발현 및 정제시켰다. 이들 변종은 각각 아미노산 잔기 75-316, 128-316, 137-316 및 158-316으로 구성된다. 세개의 가장 짧은 변종은 순환의 이색성 연구에 기초할 때 유사한 β-시트 구조를 갖고, 모두 오스테오프로테게린에 결합할 수 있다. 역시 보다 중요한 것은 세개의 변종이 실험관 분석에서 활성을 갖는 것이다(Lacey 등, 1998).

가장 짧은 변종이 추가로 연구되었다. 종양 괴사 인자 알파와 같이, 이 변종 OPGL은 용액에 삼량체로서 존재하고 오스테오프로테게린과 함께 배양될 때 3:3 복합체를 형성한다. 결합 친화력은 4nM이었다. 이 변종은 생쥐의 생체내에서 혈액내 이온화 칼슘(고칼슘혈증)을 상당하게 증가시킨다. 오스테오프로테게린의 공-투여로 OPGL의 고칼슘혈증 효과를 상당하게 감소시킨다.

OPGL의 가장 긴 변종(아미노산 잔기 75-316)은 오스테오프로테게린에 결합하지 않았고 어떠한 생리적 활성도 갖지 않았다.

N-말단의 삭제 변종을 구성할 때 천연의 절단 부위는 알려져 있지 않다. 인간의 293 섬유모세포에서 총-길이 OPGL의 발현은 쥐 단백질의 아미노 잔기 139 또는 인간 단백질의 상동의 아미노 잔기 140에서 시작하는 용해성 OPGL을 야기시킨다. 또한 이러한 발현 연구들은 인간 세포에서 발현된 용해성 OPGL이 글리코실화되는 것을 보여준다. 쥐와 인간의 OPGL 모두 C-말단의 리간드 영역에서 세개의 잠재적인 N-글리코실화 부위를 포함하므로 이것은 놀라운 것이 아니다.

혈액과 조직에서 오스테오프로테게린의 농도는 알려져 있지 않으나 1ng/ml의 농도에서 이 단백질이 상당한 생리적 활성을 갖는다.

OPGL의 생리적 활성

OPGL은 CSF-1과 결합할 때 유력한 파골세포 분화 인자이다. 이 성분들 단독으로는 전구 세포로부터 파골세포의 분화를 유도할 수 없다.

OPGL은 성숙한 파골세포의 잠재적인 활성자이다. OPGL 스스로 뼈를 재흡수하는 성숙한 파골세포를 활성시킨다. OPGL은 이들 실험에서 파골세포 성장 인자 또는 파골세포 생존 인자로서 작용하지 않는 것으로 관찰된다.

OPGL의 작용은 인간의 말초 혈액 단핵 세포의 배양에서 쥐의 OPGL로서 종에 제한하지 않고 파골세포의 형성을 유발하는 것으로 보인다.

발명의 목적

본 발명의 목적은, 예컨대 골다골증, 과도한 뼈의 재흡수를 특징으로 하는 질병에 대항하는 신규한 치료를 제공하는 것이다. 부가의 목적은 골다공증과, 과도한 뼈의 재흡수를 포함하는 다른 병리적 질병을 위한 신규한 치료를 얻기 위해 OPGL에 대항하는 자가백신을 개발하는 것이다.

발명의 요약

본 발명자들은 상기-언급한 자료들이 OPGL의 병리 생리학적인 역할을 제시함을 발견한다. 생체내에서의 입증은 부분적으로 부수적 또는 간접적이나 그들의 의견으로는 직접적인 증거와 연합하여 특히 납득할 만한 것이다.

OPGL의 재조합 C-말단 영역을 생쥐내로 주입하고 관찰한 결과 심각한 고칼슘혈증이 야기되었고 그들의 의견으로는 직접적으로 병리 생리학적인 역할을 나타낸 것이다.

간접적인 입증은 태어났을 때 표준일지라도 골다공증이 보다 빨리 개시되는 오스테오프로테게린-결함 생쥐(녹아웃 생쥐)에서 나타난다. 이것은 OPGL과 결합하여 그 효과를 중화시키는 단백질의 제거가 골다공증을 야기시킴을 보여준다. 본 발명자들은 이의 가장 합당한 이유가 OPGL에 의해 야기되는 파골세포의 성숙과 활성의 증가라고 결론지었다.

간접 입증의 두개의 다른 부분은 오스테오프로테게린으로 형질 도입된 생쥐와 재조합 오스테로프로테게린 주입된 생쥐 모두 골경화증을 진행시킨다는 것이다. 이것은 OPGL과 결합하여 그 효과를 중화시키는 단백질의 비천연적인 높은 수준이 골경화증을 야기시키는 것을 보여준다. 여기서, 본 발명자들은 이것의 이유가 OPGL의 중화에 의해 야기된 파골세포 성숙과 활성의 감소라는 결론에 도달했다.

따라서, 본 발명자들은 OPGL과 오스테로프로테게린이 파골세포 발달에서 각각 양성 및 음성 조절자로서 작용하는 모델을 제안한다. 바꾸어 말해 오스테오프로테게린은 뼈의 재흡수를 억제하는 한편 OPGL은 뼈의 재흡수를 촉진시킨다.

따라서, 골다공증과 관련하여 OPGL은 뼈의 재흡수를 촉진하고 결국 골다공증을 야기시키는 "발병 약제"로서 고려될 수 있다. 마찬가지로 오스테오프로테게린은 그 효과의 중화를 통해 "발병 약제"와 상호 작용하는 "치료 약제"로서 보여질 수 있다.

그러므로, 본 발명자들은 생체내에서 OPGL을 중화시킬 수 있는 항체의 생산을 통해 파골세포의 분화/성숙/형성과 파골세포의 활성을 하향-조절하고, 그로써 뼈의 형성률에 비해 과도한 뼈 재흡수률이 특징인 다른 질병들과 골다공증을 치료/개선 및/또는 예방하는 안전하고 효과적인 수단을 제공한다.

따라서, 본 발명은, 그 가장 넓고 일반적인 범위에서, 인간을 포함한 동물에서 오스테오프로테게린 리간드(OPGL) 활성을 생체내 하향-조절하는 방법에 관한 것이고, 그 방법은 다음의 면역적으로 유효한 양을 동물의 항원 제시 세포계에 제공하는 것을 포함한다.

-OPGL 폴리펩타이드 또는 그 서브서열(subsequence)를 이용한 동물의 면역화가 OPGL 폴리펩타이드에 대항하는 항체의 생산을 유발하도록 배합되어진 하나 이상의 OPGL 폴리펩타이드 또는 그 서브서열, 및/또는

-유사체를 이용한 동물의 면역화가 OPGL 폴리펩타이드에 대항하는 항체의 생산을 유발하도록 OPGL 아미노산 서열에 한가지 이상의 변형을 도입시킨 하나 이상의 OPGL 유사체.

이러한 접근의 가장 흥미로운 양상은, 그 OPGL 유사체에 결합 친화력을 갖는 오스테오프로테게린 또는 분자의 잦은(예컨대, 일당) 투여를 포함하는 치료적 접근과 대조적으로, 예컨대 주기적이나 매우 빈번하지 않은 면역화에 의해 골다공증을 조절할 수 있는 것이다. 면역 조성물을 일년에 1-4회 주입하여 충분히 소망하는 효과를 얻을 수 있는 반면, 오스테오프로테게린 또는 OPGL 활성의 다른 저해제는 일당 투여하는 것이 요구된다.

또한 본 발명은 이들의 서브셋(subset)을 코딩하는 핵산 단편 뿐 아니라 OPGL 유사체에 관한 것이다. 또한 유사체 또는 핵산 단편을 포함하는 면역 조성물이 본 발명의 일부이다.

본 발명은 또한 OPGL 유사체를 포함하는 조성물의 제조 방법 뿐 아니라 OPGL의 유사체를 동정하는 방법에 관한 것이다.

마지막으로, 본 발명은 과도한 뼈의 재흡수를 특징으로 하는 다른 질병 및 골다공증의 치료 방법에 관한 것이고, 이는 파골세포 상에서 OPGL과 그 수용체간의 인력을 억제하는 비-OPGL 분자(통상적으로 항체)를 투여하는 것이다.

발명의 상세한 설명

정의

본 발명의 한계와 범위를 명확히 하기 위하여 본 명세서와 청구항에서 사용된 많은 용어를 다음과 같이 정의하고 자세하게 설명할 것이다.

"T-림프구"와 "T-세포"는 체액의 면역 반응에서 보조(helper)능 뿐 아니라 면역 반응을 매개하는 다양한 세포를 초래하는 흉선 기원의 림프구를 일컬어 상호교환적으로 사용된다. 마찬가지로, "B-림프구"와 "B-세포"라는 용어는 항체-생산 림프구에 대하여 상호교환적으로 사용될 것이다.

여기서, "OPGL 폴리펩타이드"는 인간과 쥐로부터 유래된 상기-논의한 OPGL 단백질의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(또는 완전한 OPGL과 상당한 양의 B-세포 에피토프를 공유하는 그 단편)를 지적하고, 또한 이 용어는 다른 종으로부터 분리된 이들 두 단백질의 유사체와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 또한 원핵 시스템에서 제조된 OPGL의 비글리코실화 형태가, 예컨대 효모 또는 다른 비-포유류 진핵 발현 시스템의 사용으로 인해 다양한 글리코실화 패턴을 갖는 형태로서 본 용어의 범주안에 포함된다. 그러나, "OPGL 폴리펩타이드"라는 용어를 사용할 때 대상이 되는 폴리펩타이드가 당연히 치료될 동물에서 초래되는 비-유전적인 것을 의도함을 지적해야 한다. 바꾸어 말해, OPGL 폴리펩타이드는 당연히 대상이 되는 동물의 OPGL에 대항하여 면역 반응을 일으키지 않는 자가 단백질(self-protein)이거나 그러한 자가 단백질의 유사체가다.

"OPGL 유사체"는 그 일차 구조를 변경하여 제공되는 OPGL 폴리펩타이드이다. 그러한 변경은, 예컨대 OPGL 폴리펩타이드와 적절한 융합 파트너의 융합 형태(즉, 아미노산 잔기에 추가로 오로지 C- 와/또는 N-말단만을 포함하는 일차 구조의 변경)일 수 있고 또는 OPGL 폴리펩타이드의 아미노산 서열에서 삽입 및/또는 결실 및/또는 치환된 형태일 수 있다. 또한, 참고로 후술하는 OPGL의 변형으로, 파생된 OPGL 분자가 이 용어에 포함된다.

인간 OPGL의 이종-유사체(예컨대, 개 또는 돼지 유사체)를 백신으로서 인간에게 이용하는 것이 OPGL에 대항하는 소망하는 면역성을 생산한다고 추측된다. 면역화를 위한 이종-유사체의 이용이 또한 본 발명의 일부로서 고려된다.

본 문맥에서 "폴리펩타이드"는 2 내지 10개의 아미노산 잔기의 짧은 펩타이드, 11 내지 100개의 아미노산 잔기의 올리고펩타이드, 그리고 100개 이상의 아미노산 잔기의 폴리펩타이드 모두를 의미한다. 더욱이, 이 용어는 또한 단백질, 즉 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 기능성 이분자를 의미하고, 두개 이상의 폴리펩타이드를 포함할 때 이들이 공유적으로 결합하거나 비-공유적으로 결합하여 복합체를 형성할 수 있다. 단백질에서 폴리펩타이드(들)은 글리코실화 및/또는 지질화 및/또는 보철기(prosthetic groups)를 포함할 수 있다.

"서브서열(subsequence)"는, 적절하다면, 각각 자연 발생의 OPGL 아미노산 서열 또는 핵산 서열로부터 직접 유래된 아미노산 3 이상의 또는 뉴클레오타이드 3 이상의 어떠한 연속적인 스트레치를 의미한다.

본 문맥에서 "동물"은 일반적으로 호모 사피엔스(*Homo sapiens*), 카니스 도메스티쿠스(*Canis domesticus*) 등과 같은 동물 종을 지적하고 단지 하나의 단일한 동물이 아니다. 그러나, 또한 본 발명의 방법에 따라 면역화되는 모든 개체가 동일한 면역원(들)을 이용하여 동물을 면역화시킬 수 있는 동일한 OPGL을 실질적으로 포함한다는 것이 중요하기 때문에, 이 용어는 동물 종과 같은 집단을 의미한다. 예를 들어, OPGL의 유전적 변종이 별개의 인간 집단에 존재한다면, 각 집단에서 OPGL을 향한 자가관용성(autotolerance)을 깨드릴 수 있도록 이들 별개의 집단에서 다른 면역원을 이용하는 것이 필수적이다. 본 문맥의 동물이 항원 제시 세포계를 갖는 생명체라는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 그 동물이 포유 도물과 같은 척추 동물인 것이 바람직하다.

여기서 "OPGL 활성의 생체내 하향-조절"이라는 용어는 살아있는 유기체의 OPGL과 그 (알려지지 않은) 수용체 간(또는 OPGL과 이 분자에 대해 생물학적으로 중요한 다른 가능한 결합 파트너 간)에 상호 작용의 수가 감소함을 의미한다. 하향-조절은 여러가지 메카니즘에 의해 이루어질 수 있다; 이들 중, 항체 결합에 의해 OPGL의 활성 부위를 단순 간섭하는 것이 가장 간단하다. 그러나, 또한 항체 결합이 청소 세포(예컨대, 대식세포와 다른 포식세포)에 의해 OPGL의 제거를 야기하는 것이 본 발명의 범위 내에 있다.

"항원 제시 세포계에... 제공을 유발하는"의 표현은 관리된 방법으로 동물의 항원 제시 세포계가 면역원성에 시험감염되는 것이다. 후술하는대로, 항원 제시 세포계의 그러한 시험감염은 수많은 방법으로 이루어질 수 있고 가장 중요한 것은 "파마신(pharmaccines)"(즉, 진행중인 질병을 치료 또는 개선하기 위해 투여하는 백신)을 포함하는 폴리펩타이드를 이용한 백신화 또는 핵산 "파마신" 백신화이다. 면역적으로 유효한 방법으로 면역적격 세포가 동물에서 항원과 맞서는 중요한 결과가 달성된 반면, 이 결과를 달성하는 정확한 방법은 기초가 되는 본 발명의 진보성에서 덜 중요하다.

"면역적으로 유효한 양"은 당해 분야에서 통상적인 의미, 즉 면역적인 특성을 면역원과 공유하는 발병 약제를 상당하게 보증하는 면역 반응을 유발시킬 수 있는 면역원의 양이다.

여기서 "변형된" OPGL이라는 표현은 OPGL의 뼈대를 구성하는 폴리펩타이드의 화학적 변형을 의미한다. 그러한 변형은, 예컨대 OPGL 서열에 존재하는 특정 아미노산 잔기의 파생(예컨대, 알킬화)일 수 있으나, 후술하는대로 바람직한 변형은 OPGL 아미노산 서열의 일차 구조의 변경을 포함한다.

"OPGL을 향한 자가관용성"은, OPGL이 백신화되는 집단에서 자가 단백질이기 때문에 집단에서 표준의 개체들은 OPGL에 대항하는 면역 반응을 일으키지 않는 것으로 이해된다; 그럼에도 불구하고 동물 집단에서 임의의 개체들이, 예컨대 자가면역 장애의 일부로써 음성 OPGL에 대항하는 항체를 생산할 수 있슴이 배제될 수 없다. 하여튼, 동물이 그 자신의 OPGL에 대해서만 당연히 자가관용성을 가지나 다른 동물 종 또는 다른 OPGL 표현형을 갖는 집단에서 유래된 OPGL 유사체가 또한 상기 동물에 의해 내성이 된다는 것을 배제할 수 없다.

"외래 T-세포 에피토프"(또는 "외래 T-림프구 에피토프")는 MHC 분자와 결합할 수 있고 동물 종에서 T-세포를 자극하는 펩타이드이다. 본 발명에서 바람직한 외래 T-세포 에피토프는 "혼잡(promiscuous)" 에피토프, 즉 동물 종 또는 집단에서 MHC 분자 중 특정 군의 상당한 부분과 결합하는 에피토프이다. 그러한 혼잡 T-세포 에피토프 중 단지 매우 제한된 수가 알려져 있고, 자세하게 후술할 것이다. 가능한 동물 집단의 대부분에서 유효하게 본 발명에 따라 면역원을 이용하기 위하여 1)수개의 외래 T-세포 에피토프를 동일한 OPGL 유사체에 삽입하거나 2)각 유사체에 별개의 혼잡 에피토프를 삽입시킨 수개의 OPGL 유사체를 제조하는 것이 필수적이다. 또한 외래 T-세포 에피토프의 개념이, 잠재적인 T-세포 에피토프의 이용, 즉 자가 단백질로부터 유래되고 대상이 되는 자가 단백질의 부분으로 존재하지 않으면서 분리된 형태로 존재할 때 단지 면역원성 작용을 발휘하는 에피토프의 이용을 포함한다.

"외래 T 헬퍼 림프구 에피토프"(외래 T_H 에피토프)는 MHC의 클래스 II 분자와 결합하고 MHC의 클래스 II 분자에 결합한 항원 제시 세포(APC)의 표면위에 제시될 수 있는 외래 T-세포 에피토프이다.

(바이오)분자의 "기능성 부분"은 본 문맥에서 한가지 이상의 생화학적 또는 생리적 효과를 분자에 의해 발휘할 수 있는 분자의 일부를 의미한다. 많은 효소와 작용체 분자가 대상이 되는 분자에 의해 효과를 발휘할 수 있는 활성 부위를 갖는 것이 당해 분야에 잘 알려져 있다. 분자의 다른 부분들은 안정화 또는 용해성을 강화시키는 용도로 소용될 수 있고 따라서 이들 용도가 본 발명의 특정 구체예에서 적절하지 않다면 무시될 수 있다. 예를 들어, 특정 사이토카인을 OPGL의 변형 부분으로서 사용할 수 있고(자세한 설명은 후술함), 그러한 경우 OPGL과의 커플링이 필요한 안정성을 제공하므로 안정성이라는 논점은 무의미하다.

"어쥬번트(adjuvant)"라는 용어는 당해 백신 기술에서 통상적인 의미를 갖는, 즉 1)그 자체로는 백신의 면역원에 대항하여 특정한 면역 반응을 유발하지 않으나, 2)그럼에도 불구하고 면역원에 대항하는 면역 반응을 향상시킬 수 있는 물질 또는 조성물이다. 또는 바꾸어 말해, 어쥬번트 단독의 백신화는 면역원에 대항하는 면역 반응을 제공하지 않고 면역원에 의한 백신화는 면역원에 대항하는 면역 반응을 일으키거나 또는 일으키지 않으나, 면역원과 어쥬번트를 혼합하여 이용한 백신화는 면역원 단독에 의해 유발된 것 보다 강하게 면역원에 대항하는 면역 반응을 유도한다.

본 문맥에서 분자의 "표적화"는 동물에 도입된 분자가 특정 조직(들)에서 우선적으로 출현하고 특정 세포 또는 세포 타입과 우선적으로 결합하게 되는 상태를 지적한다. 표적화를 촉진하는 조성물내에 분자를 배합시키는 수많은 방법 또는 표적화를 촉진하는 작용기의 분자내 도입에 의해 그 효과를 달성할 수 있다. 이러한 논점을 후술할 것이다.

"항원 제시 세포계의 자극"은 대상이 되는 물질 또는 조성물이 일반적이고 비-특이적인 면역 자극 효과를 나타내는 것을 의미한다. 수많은 어쥬번트와 추정의 어쥬번트(예컨대 특정 사이토카인)가 항원 제시 세포계의 자극력을 분담한다. 면역 자극제를 사용한 결과, 면역원에 동시적 또는 후속적인 면역화가 분리된 면역원의 사용에 비교하여 상당하게 효과적인 면역 반응을 유발하는 것을 의미하는 항원 제시 세포계의 "경계성"을 증가시킨다.

OPGL 활성 하향-조절의 바람직한 구체예

본 발명의 방법에서 면역원으로서 사용하는 OPGL 폴리펩타이드는, 그러한 방식으로 OPGL에 대한 자가관용성의 모든-중요한 깨어짐을 얻는 변화가 상당히 촉진되어지므로 OPGL 아미노산 서열상에 한가지 이상의 변화가 존재하는 변형된 분자인 것이 바람직하다. 추가로 OPGL에 대한 자가관용성의 깨어짐을 촉진하는 배합물, 예컨대 어쥬번트를 포함하는 배합물에서 그러한 변형된 OPGL의 사용 가능성을 제외시키는 것이 아님을 주목해야 한다.

자가 단백질을 인식하는 잠재적으로 자가-반응성인 B-림프구가 표준 개체에 생리적으로 존재함을 보여준다(in Dalum I 등, 1996, J.Immunol.157:4796-4804). 그러나, 유래되는 이들 B-림프구가 실질적으로 적절한 자가 단백질에 반응성인 항체를 생산하기 위하여, T 헬퍼 림프구(T_H-세포 또는 T_H-림프구)를 생산하는 사이토카인의 원조가 필요하다. 당연히 이 원조는, T-림프구가 일반적으로 항원 제시 세포(APCs)에 의해 제시될 때 자가 단백질로부터 유래된 T-세포 에피토프를 인식하지 않으므로 제공되지 않는다. 그러나, 자가 단백질에서 "외래성"의 요소를 제공(즉, 면역적으로 유의한 변형을 도입하여)함으로써, 외래 요소를 인식하는 T-세포가 APC 상 외래 에피토프를 인식하도록 활성화된다(예컨대, 최초로, 단핵세포). 변형된 자가 단백질 상에서 자가-에피토프를 인식할 수 있는 폴리클로날 B-림프구(또한 APCs)는 항원을 흡수하고 이어서 그 외래 T-세포 에피토프(들)를 출현시키며 활성화된 T-림프구는 후속적으로 이 자가-반응성의 폴리클로날 B-림프구에 사이토카인 원조를 제공한다. 이들 폴리클로날 B-림프구에 의해 생산된 항체들은 변형된 폴리펩타이드 상의 다른 에피토프와 반응성을 가지므로, 또한 음성 폴리펩타이드에 존재하는 것들을 포함하여, 비-변형된 자가 단백질에 교차-반응성인 항체를 유발한다. 결론적으로, T-림프구는 폴리클로날 B-림프구의 집단이 완전히 외래 항원을 인식하는 것처럼 작용시킬 수 있는 반면, 사실상 단지 삽입된 에피토프(들)이 숙주에 외래적이다. 이러한 방법으로, 비-변형된 자가-항원에 교차-반응할 수 있는 항체들을 유발한다.

자가관용성을 깨뜨리기 위하여 펩타이드 자가-항원을 변형시키는 여러가지 방법이 당해 분야에 알려져 있다. 그러므로 본 발명에 따른 변형은

- 하나 이상의 외래 T-세포 에피토프를 도입, 및/또는

- 항원 제시 세포(APC)에 변형된 분자를 표적화하는 하나 이상의 첫번째 부분을 도입, 및/또는

- 항원 제시 세포계를 자극하는 하나 이상의 두번째 부분을 도입, 및/또는

- 항원 제시 세포계에 변형된 OPGL 폴리펩타이드의 제시를 최적화하는 하나 이상의 세번째 부분을 도입하는 것을 포함할 수 있다.

그러나, 천연 분자의 B-림프구 인식이 그로 인해 향상되기 때문에 이들 모든 변형이 OPGL에 존재하는 원시 B-림프구 에피토프의 실질적인 부분을 유지하면서 수행되어야 한다.

한 바람직한 구체예에서, 측기(side groups: 외래 T-세포 에피토프 또는 상기-언급한 첫번째, 두번째 및 세번째 부분의 형태에서)가 공유적 또는 비-공유적으로 도입된다. 이것은 OPGL로부터 유래되는 아미노산 잔기의 스트레치가, 일차 아미노산 서열을 바꾸지 않으면서 또는 적어도 사슬상 개개 아미노산 간의 펩타이드 결합에 변화를 유발하지 않으면서 유도화되는 것을 의미한다.

선택적이고 바람직한 구체예는 아미노산의 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입 및/또는 부가를 이용한다(재조합 방법 또는 펩타이드 합성 방법에 의해 초래될 수 있다; 아미노산의 보다 긴 스트레치를 포함하는 변형이 융합 폴리펩타이드를 발생시킬 수 있다). 이 구체예의 특히 바람직한 한 설명이 WO 95/05849에서 언급한 기술이다. 이것은 자가 단백질의 유사체를 이용하여 면역화시킴으로써 자가 단백질을 하향-조절하는 방법이고, 여기서 유사체상의 자가 단백질의 전체적인 삼차 구조를 유지하는 동시에 수많은 아미노산 서열(들)이 외래의 면역우성인 T-세포 에피토프를 포함하는 각 상응하는 수많은 아미노산 서열(들)로 치환된다. 본 발명의 목적을 위하여, 그러나, 변형(삽입, 부가, 결실 또는 치환)이 외래 T-세포 에피토프를 발생시키는 동시에 OPGL에서 B-세포 에피토프의 상당히 다수를 보존한다면 그것으로 충분하다. 그러한 유발된 면역 반응의 최대 효능을 얻기 위하여 변형된 분자에서 OPGL의 전체적인 삼차 구조가 유지되는 것이 바람직하다.

다음 식은 본 발명의 일반적인 OPGL 구조를 기술한 것이다:

$$(MOD_1)_{s1}(OPGL_{e1})_{n1}(MOD_2)_{s2}(OPGL_{e2})_{n2}.....(MOC_x)_{sx}(OPGL_{ex})_{nx} \quad (I)$$

- 식 중, $OPGL_{e1}$-$OPGL_{ex}$는 독립적으로 동일하거나 다르며 외래의 측기를 함유하거나 함유하지 않은 OPGL의 서브서열을 포함하는 x B-세포 에피토프이고, x는 ≥3의 정수, n1-nx 는 ≥0의 x 정수(적어도 하나가 ≥1), MOD_1-MOD_x는 보존된 B-세포 에피토프간에 도입된 x 변형, 그리고 s_1-s_x는 ≥0의 x 정수($OPGL_e$ 서브서열에 측기가 도입되지 않으면 적어도 하나가 ≥1)이다. 따라서 구조의 면역성에 일반적인 기능성 제한이 가해진다면 본 발명은 모든 종류의 원시 OPGL 서열

의 순열 및 그 모든 종류의 변형을 인정한다. 따라서, 예컨대 생체내에서 역효과를 나타내는 OPGL 서열의 부분적인 생략 또는 정상적으로 세포간에 존재하여 소망하지 않는 면역 반응을 일으킬 수 있는 부분의 생략에 의해 얻어지는 변형 OPGL이 본 발명에 포함된다.

B-세포 에피토프의 실질적인 부분과 심지어 여기서 기술한 변형에 따르는 단백질의 전체적인 삼차 구조의 보존이 여러가지 방법으로 달성될 수 있다. 한가지는 단순히 OPGL에 대항하는 폴리클로날 항-혈청을 제조하고(예컨대 토끼에서 제조한 항혈청) 이후에 이 혈청을 제공된 변형 단백질에 대항하는 시험 약제(예컨대 경쟁적인 ELISA에서)로서 사용하는 것이다. OPGL처럼 항혈청에 동일한 정도로 반응하는 변형물(유사체)은 OPGL과 동일하며 포괄적인 삼차 구조를 갖는 것으로 간주되어야 하는 반면 그러한 항혈청에 제한된(그러나 여전히 현저하고 특이적인) 반응성을 나타내는 유사체는 원시 B-세포 에피토프의 실질적인 부분을 유지하는 것으로 간주된다.

선택적으로, OPGL상 별개의 에피토프에 반응성인 모노클로날 항체의 선택이 가능하고 시험 패널로서 이용할 수 있다. 이러한 접근은 1)OPGL의 에피토프 지도와 2)제조된 유사체에서 보존되는 에피토프의 지도화가 가능하다는 이점을 갖는다.

물론, 세번째 접근은 OPGL 또는 그 생리적으로 활성인 단편의 3-차원 구조(cf. 상술함)를 분석하고 이것을 제조된 유사체의 해석된 3-차원 구조와 비교할 것이다. 3-차원 구조는 X-선 회절 연구와 NMR-분광학을 이용하여 분석할 수 있다. 주어진 분자의 삼차 구조에 대한 유용한 정보를 제공하기 위하여 단지 순수한 형태의 폴리펩타이드를 요구하는(반면 X-선 회절은 결정화 폴리펩타이드를 요구하고 NMR은 폴리펩타이드의 등방성 변종을 요구한다) 이점을 갖는 순환의 이색성 연구로부터 어떠한 한도까지 삼차 구조에 관련된 추가 정보를 얻을 수 있다. 그러나 순환의 이색성 연구는 단지 이차 구조 요소들의 정보를 통해 완전한 3-차원 구조의 간접적인 입증을 제공할 뿐이므로 궁극적으로는 최종적인 자료를 얻기 위해 X-선 회절 및/또는 NMR이 필수적이다.

본 발명의 한 바람직한 구체예는 OPGL의 B-림프구 에피토프의 다중 제시를 이용한다(즉, 식 I에서 하나 이상의 B-세포 에피토프가 두 위치에 존재한다). 이 효과는 다양한 방법, 예컨대 단순히 구조 $(OPGL)_m$(이 때 m은 ≥2의 정수)을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제조하고 하나 이상의 OPGL 서열에 여기서 논의한 변형을 도입시킴으로써 달성할 수 있다. 도입된 변형이 한번 이상의 B-림프구 에피토프의 복제 및/또는 합텐의 도입을 포함하는 것이 바람직하다.

상기 기술한대로, 외래 T-세포 에피토프의 도입은 하나 이상의 아미노산 삽입, 부가, 결실 또는 치환의 도입에 의해 수행할 수 있다. 물론, 표준 상태는 아미노산 서열상 한가지 이상의 변화를 도입할 것이나 (예컨대, 완전한 T-세포 에피토프에 의한 삽입 또는 치환) 도달하려는 중요한 목적은 항원 제시 세포(APC)에 의해 처리할 때 OPGL 유사체가 APC 표면상에 MCH 클래스 II 분자의 관계에서 제시되는 그러한 외래의 면역우성인 T-세포 에피토프를 발생시키는 것이다. 따라서 적절한 위치에서 OPGL 아미노산 서열이 외래의 T_H 에피토프에서 발견될 수 있는 수많은 아미노산 잔기를 포함한다면, 그때에 아미노산 삽입, 부가, 결실 및 치환에 의해 외래 에피토프의 보존된 아미노산을 제공함으로써 외래의 T_H 에피토프의 도입이 이루어질 수 있다. 바꾸어 말해, 본 발명의 목적을 수행하기 위해 삽입 또는 치환으로 완전한 T_H 에피토프를 반드시 도입할 필요는 없다.

삽입, 결실, 치환 또는 부가의 아미노산 수는 2 이상, 예컨대 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 및 25의 삽입, 치환, 부가 또는 결실인 것이 바람직하다. 더욱이 삽입, 결실, 치환 또는 부가의 아미노산 수가 150을 초과하지 않고, 예컨대 많아야 100, 90, 80 및 70인 것이 바람직하다. 특히 바람직하게는 치환, 삽입, 결실 또는 부가의 수가 60을 초과하지 않고, 보다 구체적으로 50 또는 심지어 40을 초과하지 않는 수이어야 한다. 가장 바람직한 것은 30을 넘지 않는 수이다. 아미노산의 부가에서, 생성된 구조가 융합 폴리펩타이드의 형태일 때 이들이 종종 150보다 상당히 높다는 것을 지적해야 한다.

본 발명의 바람직한 구체예는 한가지 이상의 면역우성인 외래의 T-세포 에피토프를 도입시킨 변형을 포함한다. 논점이 되는 T-세포 에피토프의 면역 우성은 대상이 되는 동물 종에 달려있다. 여기서 이용한 대로, "면역 우성"은 단순히 백신화 개체/집단에서 현저한 면역 반응을 일으키는 에피토프를 언급하나, 하나의 개체/집단에서 면역우성인 T-세포 에피토프가, 비록 후자의 개체에서 MHC-II 분자와 결합하는 것이 가능할지라도, 반드시 동일한 종의 다른 개체에서도 면역우성이지는 않다는 사실이 잘 알려져 있다. 그러므로, 본 발명의 목적을 위해, 면역우성인 T-세포 에피토프는 항원에 존재할 때 T-세포 보조를 제공하는데 효과적인 T-세포 에피토프이다. 통상적으로, 면역우성인 T-세포 에피토프는 그들이 나타낸 폴리펩타이드에 상관없이 MHC 클래스 II 분자에 실질적으로 항상 결합하도록 존재하는 고유의 특성을 갖는다.

또 다른 중요한 점은 T-세포 에피토프의 MHC 제한점에 있다. 일반적으로, 천연 발생의 T-세포 에피토프는 제한된 MHC이고, 즉 T-세포 에피토프를 구성하는 특정 펩타이드가 단지 효과적으로 MHC 클래스 II 분자의 서브셋과 결합할 것이다. 바꾸어 말해, 이것은 대부분의 경우 하나의 특이적인 T-세포 에피토프의 사용이 단지 집단의 일부에서 유효한 백신 성분을 야기하는 효과를 갖고, 그 일부의 크기에 따라서, 동일 분자에 보다 많은 T-세포 에피토프를 포함할 필요가 있으며, 또는 선택적으로 성분들이 도입된 T-세포 에피토프의 본질과 서로 구별되는 OPGL 변종인 다중-성분 백신을 제조할 수 있다.

사용된 T-세포의 MHC 제한이 완전하게 알려지지 않았다면(예를 들어 백신화 동물이 불충분하게 정의된 MHC 조성물을 갖는 상태에서) 특정 백신 조성물이 적용된 개체 부분은 다음 식으로 결정할 수 있다:

$$f_{\text{집단}} = 1 - \prod_{i=1}^{n} (1 - p_i) \quad \text{(II)}$$

식 중, P_i는 백신 조성물에 존재하는 i번째 외래 T-세포 에피토프에 대한 집단 내 응답자의 빈도이고, n은 백신 조성물 내 외래 T-세포 에피토프의 총 수이다. 따라서, 집단 내 각각 0.8, 0.7 및 0.6의 반응 빈도를 갖는 3 외래 T-세포 에피토프를 함유하는 백신 조성물은

$1 - 0.2 \times 0.3 \times 0.4 = 0.976$

으로 주어진다. 즉 통계적으로 집단의 97.6 퍼센트가 백신에 MHC-II 매개 반응을 유발할 것이다.

상기 식은 이용된 펩타이드의 다소간 정확한 MHC 제한 패턴이 알려진 조건에서는 적용시키지 않는다. 예를 들어 특정 펩타이드가 단지 HLA-DR 대립유전자 DR1, DR3, DR5 및 DR7에 의해 코딩되는 인간의 MHC-II 분자와 결합한다면 이 펩타이드와 함께, HLA-DR 대립유전자에 의해 코딩되는 존속한 MHC-II 분자와 결합하는 또 다른 펩타이드의 이용은 대상이 되는 집단에서 100% 적용을 성취할 것이다. 마찬가지로, 만약 두번째 펩타이드가 단지 DR3 및 DR5와 결합한다면 이 펩타이드의 첨가는 전혀 적용을 증가시키지 않는다. 만약 백신에서 T-세포 에피토프의 MHC 제한에 순수하게 반응하는 집단의 추정을 기초로 한다면, 특정 백신 조성물에 의해 적용되는 집단의 부분을 다음 식에 의해 결정할 수 있다:

$$f_{\text{집단}} = 1 - \prod_{j=1}^{3} (1 - \varphi_j)^2 \quad \text{(III)}$$

식 중, ϕ_j는 백신에서 T-세포 에피토프의 어떠한 하나와 결합하고 알려진 3 HLA 위치(DP, DR 및 DQ) 중 j번째에 속하는 MHC 분자를 코딩하는 대립 유전자 단일타입의 집단에서 빈도의 총합이다; 실제, MHC 분자가 백신에서 각 T-세포 에피토프를 인식한 후 이들이 타입(DP, DR 및 DQ)에 따라 나열되는 것을 우선 결정한다 - 그리고 나서, 나열된 대립 유전자 단일타입의 다른 개개 빈도들을 합하여 ϕ_1, ϕ_2 및 ϕ_3을 얻는다.

식 II에서 수치 P_i가 상응하는 이론상의 수치 Π_i를 초과할 수 있다:

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^{3} (1 - \nu_j)^2 \quad \text{(IV)}$$

식 중, v_j는 백신에서 i번째 T-세포 에피토프와 결합하고 알려진 3 HLA 위치(DP, DR 및 DQ) 중 j번째에 속하는 MHC 분자를 코딩하는 대립 유전자 단일타입의 집단에서 빈도의 총합이다. 이것은 집단의 $1-\Pi_i$에서 $f_{\text{잔기-i}} = (p_i - \Pi_i)/(1 - \Pi_i)$의 응답자의 빈도를 의미한다. 따라서 식 III를 보완하여 식 V를 얻을 수 있다:

$$f_{\text{집단}} = 1 - \prod_{j=1}^{3} (1 - \varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{i=1}^{n} (1 - f_{\text{잔사}_i})\right) \quad \text{(V)}$$

식 중, $1-f_{\text{잔기-i}}$이 음수라면 0으로 한다. 식 V는, 모든 에피토프가 동일한 세트의 단일타입에 대항하는 지도화된 단일타입을 요구한다.

따라서, OPGL 유사체에 도입되는 T-세포 에피토프를 선택할 때 유효한 에피토프의 모든 정보를 포함하는 것이 중요한다: 1)집단에서 각 에피토프에 대한 응답자의 빈도, 2)MHC 제한 수치, 및 3)집단에서 관련 단일타입의 빈도.

동물 종 또는 동물 집단의 대다수 개체에서 활성인 수많은 천연 발생의 "혼잡" T-세포 에피토프가 존재하고 바람직하게도 이들을 백신에 도입하여 동일 백신에서 다른 OPGL 유사체의 수많은 요구를 감소시킨다.

혼잡 에피토프는 본 발명에 따라서, 예컨대 파상풍 톡소이드(예를 들어 P2와 P30 에피토프), 디프테리아 톡소이드, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA) 및 피. 팔시파룸(*P. falciparum*) CS 항원에서 선택된 에피토프와 같이 천연 발생의 인간 T-세포 에피토프일 수 있다.

수년에 걸쳐서 수많은 다른 혼잡 T-세포 에피토프가 동정되었다. 특히 다른 HLA-DR 대립 유전자에 의해 코딩되는 대다수의 HLA-DR 분자와 결합할 수 있는 펩타이드가 동정되었고 이들 모두가 본 발명에 따라 이용되는 OPGL 유사체에 도입되는 T-세포 에피토프일 수 있다. 참고로 또한 다음 참조에서 논의된 에피토프가 모두 여기서 참조로써 관계한다: WO 98/23635 (Frazer IH 등, assigned to The University of Queensland); Southwood S 등, 1998, J.Immunol. 160:3363-3373; Sinigaglia F 등, 1988, Nature 336:778-780; Chicz RM 등, 1993, J.Exp. Med 178:27-47; Hammer J 등, 1993, Cell 74:197-203; 및 Falk K 등, 1994, Immunogenetics 39:230-242. 후반부의 참조는 HLA-DQ와 -DP 리간드를 다룬 것이다. 이들 5개의 참조에 나열된 모든 에피토프는 본 발명에서 이용되는 천연 에피토프의 후보로서, 이들과 공통의 모티프를 공유하는 에피토프로서 적절하다.

선택적으로, 에피토프는 MHC 클래스 II 분자의 대다수와 결합할 수 있는 어떠한 인공 T-세포 에피토프일 수 있다. 이러한 문맥에서 WO 95/07707과 상응하는 논문 Alexander J 등, 1994, Immunity 1:751-761(두 발표가 여기서 참조로써 관계한다)에 기술된 팬(pan) DR 에피토프 펩타이드("파드레(PADRE)")가 본 발명에 따라 이용되는 에피토프의 후보로서 흥미롭다. 이들 논문에서 기술한 가장 효과적인 파드레 펩타이드가 투여 안정성을 향상시키기 위해 C- 및 N-말단에서 D-아미노산을 운반한다. 그러나, 본 발명은 우선 변형된 OPGL의 일부로써 적절한 에피토프를 병합시키고 이어서 MHC-II 분자와의 관계에서 후속의 제시를 허가하기 위하여 APCs의 리소솜성 구획내에서 효소적으로 변화를 일으키는 것을 목적으로 하므로 본 발명에 따른 에피토프에서 D-아미노산을 병합시키기 위한 방편이 아니다.

특히 바람직한 하나의 파드레 펩타이드는 아미노산 서열 AKFVAAWTLKAAA 또는 그 면역적으로 유효한 서열을 갖는 것이다. 이것과, MHC 제한의 동일 결여를 포함하는 다른 에피토프가 본 발명의 방법에 따라 이용된 OPGL 유사체에 존재해야 하는 바람직한 T-세포 에피토프이다. 그러한 슈퍼-혼잡 에피토프가 본 발명의 가장 단순한 구현을 가능하게 하고 이때 단지 하나의 단일 변형 OPGL이 백신화 동물의 항원 제시 세포계에 나타난다.

상기 기술한대로, OPGL의 변형은 또한 APC 또는 B-림프구에 변형된 OPGL을 표적화시키는 첫번째 부분의 도입을 포함한다. 예를 들어, 첫번째 부분은 B-림프구 특이적인 표면 항원 또는 APC 특이적인 표면 항원을 위한 특이적인 결합 파트너일 수 있다. 다수의 그러한 특이적인 표면 항원이 당해 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 그 부분은 B-림프구 또는 APC상에 수용체가 존재하는 탄수화물일 수 있다(예컨대 만난 또는 만노오스). 선택적으로 두번째 부분은 합텐일 수 있다. 또한 특이적으로 APCs 또는 림프구상 표면 분자를 인식하는 항체 단편을 첫번째 부분으로서 이용할 수 있다(표면 분자는, 예컨대 대식세포 및 단구세포, 예컨대 FCyRI의 FCy 수용체일 수 있고, 선택적으로 CD40 또는 CTLA-4와 같은 어떠한 다른 특이적인 표면 마커일 수 있다). 모든 구체적인 표적화 분자를 또한 후술하는 어쥬번트의 일부로써 이용할 수 있다.

향상된 면역 반응을 얻기 위하여 특정 세포 타입에 대해 변형된 OPGL 폴리펩타이드를 표적화하는 대안 또는 보완책으로서, 항원 제시 세포계를 자극하는 상기의 두번째 부분을 포함시킴으로써 항원 제시 세포계의 반응성 수준을 증가시킬 수 있다. 그러한 두번째 부분의 통상적인 예가 사이토카인이고, 열충격 단백질 또는 분자 샤페론(chaperones)뿐 아니라 그 유효 부분을 들 수 있다.

본 발명에 이용되는 적절한 사이토카인은 또한 백신 조성물에서 어쥬번트로서 기능한다. 즉, 예를 들어 인터페론 ɣ(IFN-ɣ), 인터루킨 1(IL-1), 인터루킨 2(IL-2), 인터루킨 4(IL-4), 인터루킨 6(IL-6), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨 13(IL-13), 인터루킨 15(IL-15) 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF); 선택적으로 사이토카인 분자의 기능성 부분이 두번째 부분으로서 충분하다. 어쥬번트 물질로서 그러한 사이토카인을 이용하는 것이 후술되어 있다.

본 발명에서, 두번째 부분으로서 이용되는 적절한 열충격 단백질 또는 분자 샤페론이 HSP70, HSP90, HSC70, GRP94(또한 Wearsch PA 등, 1998, Biochemistry 37:5709-19에서 gp96으로 알려져 있다) 및 CRT(칼레티큘린(calreticulin))이다.

선택적으로, 두번째 부분은 리스테리오라이신(LLO), 지질 A 및 열-불안정성 엔테로톡신과 같은 독소이다. 또한 수많은 미코박테리아성 유도체, 예컨대 MDP(뮤라밀 디펩타이드), CFA(완전한 프로인즈 어쥬번트) 및 트레할로스 디에스테르 TDM과 TDE의 가능성이 흥미롭다.

항원 제시 세포계에 변형된 OPGL의 제공을 향상시키는 세번째 부분의 도입 가능성이 본 발명에서 중요한 구체예이다. 당해 분야에서 이 원리의 여러가지 구체예를 제시한다. 예를 들어, 보렐리아 버그도르페리(*Borrelia burgdorferi*) 단백질 OspA에서 팔미토일 지질화 유지를 자가-보조적인 폴리펩타이드를 제공하기 위하여 이용할 수 있다(cf. 예컨대 WO 96/40718) - 지질화 단백질이 폴리펩타이드의 지질화 유지 부분으로 구성된 코어와 그로부터 나온 분자의 보존 부분과 함께 미셀-과 같은 구조를 형성하고, 그 결과 항원성 결정자의 다중 제시를 야기한다. 따라서, 특히 재조합으로 생산된 단백질에서 그러한 지질화 유지의 제공은 명백하게 수월하고 단지 변형된 OPGL 폴리펩타이드에 대한 융합 파트너로서, 예컨대 천연 발생의 시그날 서열의 이용을 요구하므로, 이러한 이용과 다른 지질화 유지(예컨대, 미리스틸기, 파르네실기, 제라닐-제라닐기, GPI-유지 및 N-아실 디글리세라이드기)를 이용하는 관련 접근은 본 발명의 바람직한 구체예이다. 또 다른 가능성은 보조 인자 C3의 C3d 단편 또는 C3 자체의 이용이다(cf. Dempsey 등, 1996, Science 271, 348-350 및 Lou & Kohler, 1998, Nature Biotechnology 16, 458-462).

항원 제시 세포계에 대해 OPGL의 중요한 에피토프 영역의 복수개(예컨대, 2 이상)의 카피의 바람직한 제시를 야기하는 본 발명의 선택적인 구체예는 특정 분자에 대한 OPGL, 그 서브서열 또는 변종의 공유적인 연결이다. 예를 들어, 폴리머, 덱스트란과 같은 탄수화물, cf. 예컨대 Lees A 등, 1994, Vaccine 12:1160-1166; Lees A 등, 1990, J.Immunol. 145:3594-3600이 이용될 수 있으나, 또한 만노오스 및 만난이 유용한 그 대안이 될 수 있다. 예컨대, 이. 콜라이(*E. coli*)와 다른 박테리아로부터 얻은 필수적인 막 단백질이 또한 유용한 컨쥬게이션 파트너이다. 전통적인 담체 분자, 예컨대 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 파상풍 톡소이드, 디프테리아 톡소이드 및 소의 혈청 알부민(BSA)이 또한 바람직하고 유용한 컨쥬게이션 파트너이다.

변형을 수행하는데 천연 OPGL의 특정 영역들이 가장 적절한 것으로 보인다. TNF-α 및 종양 괴사 인자 족의 다른 요소들에 대한 OPGL의 구조적 연관성 때문에, 170-192, 198-218, 221-246, 256-261 또는 285-316의 위치(SEQ ID NOSs:4, 6 및 12의 아미노산 번호)로 정의되는 영역에서 T-세포 에피토프를 도입하거나 변형시키는 것이 소망하는 결과를 얻는데 가장 적절할 것으로 예견된다. 이러한 위치는 쥐의 OPGL을 언급한 것이다 - 인간의 분자에서 그 상응하는 위치는 171-193, 199-219, 222-247, 257-262 및 286-317이다(SEQ ID NO: 2의 아미노산 번호).

기본적인 이러한 선택 영역에서 고려할 점은 a)알려지고 예견된 B-세포 에피토프의 보존, b)삼차 구조의 보존 등이다. 하여튼, 상기 논의한대로, 다른 위치에 T-세포 에피토프가 도입되는 모든 변형된 OPGL 분자의 세트를 선별하는 것이 매우 용이하다.

본 발명의 가장 바람직한 구체예가 인간 OPGL의 하향-조절을 포함하기 때문에, 결과적으로 상기 논의한 OPGL 폴리펩타이드가 인간의 OPGL 폴리펩타이드인 것이 바람직하다. 이 구체예에서, SEQ ID NO: 2 중 하나 이상의 아미노산이 동일한 또는 다른 길이를 갖는 하나 이상의 아미노산 서열로 치환되고(또는 SEQ ID NO: 2 중 Cys-221이 세린으로 치환되는 폴리펩타이드에서) 외래의 T_H 에피토프를 포함시킴으로써 인간의 OPGL 폴리펩타이드를 변형시키는 것이 특히 바람직하다. 치환되는 아미노산 잔기는 SEQ ID NO: 2에서 잔기 257-262, 289-303 및 222-243로부터 선택된다. 그러한 구성 이면의 근본적 원리를 구체예에서 상세하게 논의한다.

<u>OPGL과 변형된 OPGL 폴리펩타이드의 배합</u>

동물에 투여함으로써 동물의 항원 제시 세포계에 대하여 OPGL 폴리펩타이드 또는 변형된 OPGL 폴리펩타이드를 제공할 때, 폴리펩타이드의 배합은 당해 분야에 일반적으로 알려진 원리를 따른다.

활성 성분으로서 펩타이드 서열을 포함하는 백신의 제조는 일반적으로 당해 분야에 잘 알려져 있고, 그 예로 미국 특허 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; 및 4,578,770를 들 수 있으며 이들 모두가 여기서 참조로써 관계한다. 통상적으로, 그러한 백신은 주사 가능한 액체 용액 또는 현탁액; 용액 또는 현탁액내에 이용하기 적절한 고체 형태, 주사 이전에 액체로 제조할 수 있는 것들이다. 또한 조제물은 유화될 수 있다. 종종 활성의 면역원성 성분을, 약리적으로 허용되며 활성 성분과 양립할 수 있는 부형제와 혼합시킨다. 적절한 부형제는, 예를 들어, 물, 살린, 덱스트로스, 글리세롤, 에탄올 및 그 혼합물이다. 게다가, 소망한다면 백신의 유효성을 향상시키기 위해 습윤제 또는 유화제, pH 완충제 또는 어쥬번트와 같은 소량의 보조 물질을 포함시킬 수 있다; cf. 상세한 어쥬번트의 논의를 후술한다.

백신은 통상적으로 주사에 의해, 예를 들어 피하적으로, 피내적으로, 진피내로, 피하 또는 근육내로 비경구 투여된다. 다른 투여 방법으로 적절한 부가의 배합물로는 좌약, 그리고 몇몇 경우에 경구, 협측, 설하, 복강내, 질내, 항문, 경막외, 척수 및 두개강내 배합물이 있다. 좌약에서, 전통적인 결합제 및 담체는, 예를 들어 폴리알칼렌 글리콜 또는 트리글리세라이드가 있다; 그러한 좌약은 활성 성분을 0.5% 내지 10%, 바람직하게는 1-2% 범위로 함유하는 혼합물로부터 형성될 수 있다. 경구용 배합물은 일반적으로 적용되는 부형제, 예컨대 약리적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 셀룰로스, 마그네슘 카르보네이트등을 포함할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 알약, 캡슐, 서방성 배합물 또는 분말의 형태이고 10-96%, 바람직하게는 25-70%의 활성 성분을 함유한다. 경구용 배합물에서, 콜레라 독소가 흥미로운 배합 파트너이다(그리고 또한 가능한 컨쥬게이션 파트너이다).

폴리펩타이드가 중성 또는 염 형태로서 백신에 배합될 수 있다. 약리적으로 허용되는 염으로 산 첨가염이 있다(펩타이드의 자유 아미노기 및 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타타르산, 만델산 등과 같은 유기산을 이용하여 형성된다). 자유 카르복실기를 이용하여 형성되는 염이 또한, 예컨대 소듐, 포타슘, 암모늄, 칼슘 또는 철 히드록사이드와 같은 무기 염기, 그리고 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다.

백신은 조제 배합물에 적합한 방법으로 투여되고, 그 양은 치료적으로 유효하며 면역원성을 갖는다. 투여되는 양은 치료의 대상에 따라 달라지고, 예컨대 면역 반응을 일으키는 개체의 항원 제시 세포계 용량 및 소망하는 보호 정도에 따라 다르다. 적절한 복용 범위는, 바람직한 범위 약 0.1㎍ 내지 2,000㎍(비록 1-10㎎의 보다 높은 범위량이 고려될 수 있으나), 예컨대 약 0.5㎍ 내지 1,000㎍의 범위, 바람직하게는 1㎍ 내지 500㎍의 범위 그리고 특히 약 10㎍ 내지 100㎍ 범위의 백신화 당 대략 활성 성분 수백 마이크로그램이다. 초기 투여와 두번째 예방 주사의 적절한 관리가 또한 다양하나 초기 투여에 이어 후속의 접종 또는 그밖의 투여를 하는 것으로 정형화된다.

투여 방법은 매우 다양하다. 백신 투여를 위한 어떠한 통상적인 방법도 적용 가능하다. 이것은 생리적으로 허용되는 기재상 고체의 경구 적용 또는 생리적으로 허용되는 분산액을 이용한 경구 적용, 주사에 의한 비경구 투여 등을 포함한다. 백신의 복용량은 투여 경로에 따라 달라지고 백신화되는 사람의 연령 및 항원 배합물에 따라 다양할 것이다.

백신의 몇몇 폴리펩타이드는 백신에서 충분히 면역원성을 가지나, 백신이 부가로 보조 물질을 함유한다면 다른 몇몇에 대한 면역 반응이 향상될 것이다.

백신에 대한 보조 효과를 달성하는 다양한 방법이 알려져 있다. 일반적인 원리와 방법이 "The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E.S.Stewart-Tull (ed.), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6 및 "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G 등,(eds.), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9에 상세하게 기술되어 있고 이들 모두가 여기서 참조로써 관계한다.

자가항원에 대한 자가관용성의 파괴를 촉진한다고 입증된 어쥬번트를 사용하는 것이 특히 바람직하다; 사실상, 이것은 변형되지 않은 OPGL이 자가백신에서 활성 성분으로서 사용되는 경우에 필수적이다. 적절한 어쥬번트의 비-제한적인 예들이 면역 표적화 어쥬번트를 구성하는 군으로부터 선택된다; 톡신, 사이토카인 및 미코박테리아 유도체와 같은 면역 조절 어쥬번트; 오일 배합물; 폴리머; 미셀 형성 어쥬번트; 사포닌; 면역자극 복합 매트릭스(ISCOM 매트릭스); 입자; DDA; 알루미늄 어쥬번트; DNA 어쥬번트; γ-이눌린; 및 캡슐화 어쥬번트. 일반적으로 유사체에서 첫번째, 두번째 및 세번째 부분으로서 유용한 화합물 및 약제에 관련하여 상기 기술한 내용이 또한 필요한 변경을 가하여 본 발명의 백신 어쥬번트에서 그 용도에 귀착됨을 주의해야 한다.

어쥬번트의 적용은, 통상적으로 완충 살린에서 0.05 내지 0.1% 용액으로 이용되는 알루미늄 히드록사이드 또는 포스페이트(alum)와 같은 약제, 0.25% 용액으로 이용되는 당의 합성 폴리머(예컨대, Carbopol®)와의 혼합물을 사용하여 70 내지 101℃ 사이의 온도 범위에서 30초 내지 2분 동안 각각 열처리함으로써 백신내 단백질을 응집시키는 것을 포함하고 또한 가교-결합에 의해 응집시키는 것이 가능하다. 펩신 처리된 항체(Fab 단편)를 이용한 알부민으로의 반응, 씨. 파르붐(*C. parvum*) 또는 그램-음성 박테리아의 균체내 독소 또는 리포다당류 성분과 같은 박테리아 세포를 이용한 혼합물, 만니드 모노-올레이트(Aracel A)와 같은 생리적으로 허용되는 오일 비히클에서 에멀젼 또는 방해 대용물로서 이용된 퍼플루오로카본(Fluosol-DA)의 20% 용액을 이용한 에멀젼에 의한 응집을 또한 이용할 수 있다. 스쿠알렌 및 IFA와 같은 오일과의 혼합물이 또한 바람직하다.

본 발명에 따라서, DDA(디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드)가, DNA 및 γ-이눌린과 같이, 후보가 되는 흥미로운 어쥬번트이다. 그러나 또한 QuilA과 QS21과 같은 퀼라야피 사포닌 뿐 아니라 프로인즈의 완전 및 불완전 어쥬번트가 RIBI와 같이 흥미롭다. 추가로 모노포스포릴 리피드 A(MPL), 상기 언급한 C3과 C3d 및 뮤라밀 디펩타이드(MDP)가 가능하다.

보조 효과를 내기 위해 리포솜 배합이 또한 알려져 있고 따라서 리포솜 어쥬번트가 본 발명에서 바람직하다.

또한 면역 자극 복합 매트릭스 타입(ISCOM® 매트릭스) 어쥬번트는, 특히 이 타입의 어쥬번트가 APCs에 의한 MHC 클래스 II 발현을 상향-조절할 수 있으므로, 본 발명에서 바람직하다. ISCOM® 매트릭스는 퀼라야피 사포나리아(*Quillaja saponaria*), 콜레스테롤 및 포스포리피드로부터 얻은 사포닌(트리테르페노이드)으로 구성된다(임의 분류). 면역원성 단백질과 혼합할 때, 생성된 미립자 배합물은 사포닌 60-70% w/w, 콜레스테롤과 포스포리피드 10-15% w/w 및 단백질 10-15% w/w로 구성되는 ISCOM 입자로서 알려져 있다. 조성물 및 면역자극 복합물에 관련된 상세한 설명은, 예컨대 어쥬번트를 다룬 상기 언급한 교본에서 찾아볼 수 있고, 또한 Barr IG와 Mitchell GF, 1996, Immunol. 및 Cell Biol. 74:8-25 뿐 아니라 Morein B 등, 1995, Clin. Immunother. 3:461-475 (모두 여기서 참조로써 관계함)에서 완전한 면역자극 복합물의 제조에 관한 유용한 정보를 제공한다.

보조 효과를 달성하는 또 다른 매우 흥미로운(그리고 바람직한) 가능성은 Gosselin 등, 1992의 기술을 적용하는 것이다(여기서 참조로써 관계함). 간단하게, 본 발명의 항원과 같은 적절한 항원의 제시는 단구/대식세포상의 Fcγ 수용체에 대항하여 항체(또는 항체 단편과 결합한 항원)에 항원을 컨쥬게이팅함으로써 향상될 수 있다. 특히 항원과 항-FcγRI간 컨쥬게이트는 백신화의 용도를 위한 면역원성을 향상시키는 것이 입증되었다.

OPGL의 변형 형태에서 첫번째 및 두번째 부분에 대한 후보로서 상기 언급한 표적화 및 면역 조절용 물질(즉, 사이토카인)을 이용하는 것이 그 밖의 가능성이다. 이러한 관계에서, 또한 폴리 I:C와 같은 사이토카인의 합성 유도 인자가 가능하다.

적절한 미코박테리아 유도체가 뮤라밀 디펩타이드, 완전한 프로인즈 어쥬번트, RIBI 및 TDM과 TDE와 같은 트레할로스의 디에스테르로 구성된 군에서 선택된다.

적절한 면역 표적화 어쥬번트가 CD40 리간드와 CD40 항체 또는 특이적으로 결합하는 그 단편(cf.상술함), 만노오스, Fab 단편 및 CTLA-4로 구성된 군에서 선택된다.

적절한 폴리머 어쥬번트가 덱스트란, PEG, 전분, 만난 및 만노오스와 같은 탄수화물; 가소성 폴리머; 및 라텍스 비즈와 같은 라텍스로 구성된 군에서 선택된다.

면역 반응을 조절하는 또 다른 흥미로운 방법은 "가상의 림프 노드"(VLN)에 OPGL 면역원(임의로 어쥬번트 및 약리적으로 허용되는 담체와 비히클을 함께)을 끌어들이는 것이다(ImmunoTherapy, Inc.가 개발한 독점 의학 장치, 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501). VLN(얇은 관의 장치)은 림프 노드의 구조와 기능을 모방한 것이다. 피부내 VLN의 삽입은 사이토카인과 케모킨의 출현과 함께 무균의 염증 부위를 생산한다. APCs 뿐 아니라 T- 및 B-세포가 위험 시그날에 급속하게 반응하여 염증 부위를 가라앉히고 VLN의 다공성 매트릭스 내부에 축적된다. VLN을 사용하면 항원에 대한 면역 반응을 일으키는데 요구되는 필수적인 항원량이 감소하고, VLN을 이용한 백신화에 의해 야기된 면역 보호의 경우 어쥬번트로서 RiBi를 이용하는 통상적인 면역화를 능가하는 것으로 보인다. 본 기술은 "From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, October 12th - 15th 1998, Seascape Resort, Aptos, California"에서 Gelber C 등, 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Samll Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node"에 간단하게 기술되어 있다.

백신은 그것이 요구되는 개체에게 일년에, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5 또는 6회, 연간 1-6회 투여되어야 한다. 본 발명의 바람직한 자가백신을 이용하여 유발된 기억 면역이 영구적이지 않으므로 항원 제시 세포계가 OPGL 또는 변형된 OPGL 폴리펩타이드를 이용한 주기적인 감염을 요구하는 것이 이미 알려져 있다.

유전적 다양성 때문에, 다른 개체라면 동일한 폴리펩타이드에 대해 다양한 강도의 면역 반응으로 반응할 수 있다. 따라서, 본 발명의 백신은 면역 반응을 증가시키기 위해 여러가지 다른 폴리펩타이드를 함유할 수 있고, 참고로 외래의 T-세포 에피토프 도입의 선택에 관련하여 상기 논의한 바 있다. 백신은 두가지 이상의 폴리펩타이드를 함유하고, 이 때 폴리펩타이드는 상기 정의된 바와 같다.

결과적으로 백신은 3-20의 별개의 변형된 또는 변형되지 않은 폴리펩타이드, 예컨대 3-10의 별개의 폴리펩타이드를 함유할 수 있다.

핵산 백신화

전형적인 펩타이드-기재 백신의 투여에 대한 대안으로서, 핵산 백신화 기술(또한 "핵산 면역화", "유전적 면역화" 및 "유전자 면역화"로 알려진)이 흥미로운 많은 특징을 제공한다.

우선, 전통적인 백신 접근과 대조적으로, 핵산 백신화는 면역원 약제의 대량 생산을 소비하는 공급원을 요구하지 않는다(예컨대, 변형된 OPGL을 생산하는 미생물의 산업적 규모의 발효 형태에서). 더욱이, 정제 장치 및 면역원을 위한 되접힘 설계가 필요없다. 그리고 마지막으로, 도입된 핵산의 발현 생성물을 제공하기 위하여 핵산 백신화가 백신화 개체의 생화학적인 기관에 의존하기 때문에, 발현 생성물의 번역후 최적의 처리가 발생한다고 예상된다; 이것은 상기 기술한대로 원시 OPGL B-세포 에피토프의 상당한 부분이 변형된 분자에서 보존되어야 하고, 대체로 B-세포 에피토프가 어떠한 (바이오) 분자(예컨대, 탄수화물, 지질, 단백질 등)의 부분에 의해 구성될 수 있기 때문에 자가백신화의 경우 특히 중요하다. 따라서 면역원의 본래 글리코실화 및 지질화 패턴이 전체적인 면역원성에 매우 중요하고 이것은 면역원을 제공하는 숙주를 가짐으로써 가장 잘 보증된다.

그러므로, 본 발명의 바람직한 구체예는 변형된 OPGL을 코딩하는 핵산(들)을 동물 세포에 도입시킴으로써 항원 제시 세포계에 변형된 OPGL을 제시하고, 핵산(들)이 도입된 세포에 의해 생체내 발현을 달성하는 것을 포함한다.

이 구체예에서, 도입된 핵산은 네이키드 DNA, 전하 또는 비전하의 지질과 배합된 DNA, 리포솜상에서 배합된 DNA, 바이러스 벡터에 포함된 DNA, 형질도입-촉진 단백질 또는 폴리펩타이드와 배합된 DNA, 칼슘 침전제와 배합된 DNA, 불활성 담체 분자와 결합된 DNA, 키틴 또는 키토산에 캡슐화된 DNA 및 어쥬번트와 배합된 DNA의 형태가 될 수 있는 DNA인 것이 바람직하다. 이러한 관계에서, 전통적인 백신 배합물에 어쥬번트를 사용하는 경우 고려되는 모든 실질적인 사항들이 DNA 백신의 배합에 적용된다. 그러므로 폴리펩타이드를 기재로 하는 백신에서 어쥬번트의 사용과 관련하여 언급한 모든 설명이 필요한 변경을 가하여 핵산 백신화 기술에 그 용도를 적용시킬 수 있다.

상기 기술한 폴리펩타이드 기재 백신의 투여 경로 및 투여 설계에서, 이들을 또한 본 발명의 핵산 백신에 적용시킬 수 있고 폴리펩타이드에 대한 투여 경로 및 투여 설계에 부속하는 상기 모든 기술이 필요한 변경을 가하여 핵산에 적용된다. 핵산 백신이 정맥내 및 동맥내로 적절하게 투여될 수 있슴이 부연되어야 한다. 더욱이, 핵산 백신이 소위 유전자 총을 사용하여 투여 가능하다는 것이 당해 분야에 잘 알려져 있고 따라서 또한 이것과 동등한 투여 방법이 본 발명의 일부로써 간주된다. 마지막으로, 우수한 결과를 얻기 위하여 핵산 투여에 VLN을 사용하며, 이 특정한 투여 방법이 특히 바람직하다.

게다가, 면역화 약제로서 이용된 핵산(들)이, 예컨대 유용한 어쥬번트로서 논의한 사이토카인과 같이 상기 기술한 면역조절 물질의 형태로서 첫번째, 두번째 및/또는 세번째 부분을 코딩하는 영역을 포함한다. 이러한 구체예의 바람직한 형태는 유사체의 코딩 영역과 별개의 해독틀(reading frame)에서 또는 적어도 별개 프로모터의 조절하에 면역조절자의 코딩 영역을 갖도록 초래된다. 따라서 유사체 또는 에피토프가 면역조절자의 융합 파트너로서 제공되는 것을 피할 수 있다. 선택적으로, 별개의 두 뉴클레오타이드 단편을 이용할 수 있으나, 두개 모두의 코딩 영역을 동일한 분자에 포함시킬 때 확보되는 공동-발현의 이점 때문에 이것은 보다 덜 바람직하다.

따라서, 본 발명은 또한 OPGL에 대항하는 항체의 생산을 유발하는 조성물에 관한 것이고, 그 조성물은

- 본 발명의 핵산 단편 또는 벡터(cf. 벡터의 논의는 후술함), 및

- 상기 기술한 약리적 그리고 면역적으로 허용되는 비히클 및/또는 담체 및/또는 어쥬번트를 함유한다.

정상적인 환경에서, OPGL 변종-코딩의 핵산이 벡터 형태로 도입되고, 이 때 발현은 바이러스 프로모터의 조절하에 있다. 본 발명의 벡터에 대한 보다 상세한 설명은 후술한다. 또한 핵산 백신의 배합 및 용도와 관련한 상세한 설명을 Donnelly JJ 등, 1997, Annu. Rev. Immunol. 15:617-648 및 Donnelly JJ 등, 1997, Life Sciences 60:163-172에서 볼 수 있다. 두 참조 모두 여기서 참조로써 관계한다.

생백신

항원 제시 세포계에 대한 변형된 OPGL 제시를 초래하는 세번째 대안은 생백신 기술을 사용하는 것이다. 생백신화는, 변형된 OPGL을 코딩하는 핵산 단편 또는 그러한 핵산 단편과 병합된 백터를 이용하여 형질전환된 비병원성 미생물을 동물에 투여시킴으로써 항원 제시 세포계에 제공을 유발한다. 비병원성 미생물은 어떠한 적절한 독성약화 박테리아 균주(계대에 의해 또는 재조합 DNA 기술을 이용한 병원성 발현 생성물의 제거에 의해 독성이 약화된) 일 수 있다. 예컨대, 미코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*) BCG., 비병원성 스트렙토코커스 종(*Streptococcus* spp.), 이. 콜라이(*E. coli*), 살모넬라 종(*Salmonella* spp.), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 시겔라(*Shigella*) 등이 있다. 최고 기술 수준의 생백신의 제조를 다룬 내용이 Saliou P, 1995, Rev. Prat. 45:1492-1496 및 Walker PD, 1992, Vaccine 10:977-990에 실려있고, 두가지 모두 여기서 참조로써 관계한다. 그러한 생백신에 이용된 핵산 단편과 벡터에 대한 상세한 설명은 후술한다.

박테리아 생백신의 대안으로서, 후술하는 본 발명의 핵산 단편이 백시니아 종 또는 어떠한 다른 적절한 폭스 바이러스와 같이 무독성 바이러스 백신 백터에 병합될 수 있다.

당연히, 비병원성 미생물 또는 바이러스는 동물에 단지 한번 투여되나, 특정한 경우 보호 면역을 유지하기 위해 일생에 한번 이상 투여하는 것이 필요할 것이다. 심지어 폴리펩타이드 백신화에 대해 상기 설명한 면역화 설계가 생백신 또는 바이러스 백신을 이용할 때 유용할 것으로 고려된다.

선택적으로, 생백신화 또는 바이러스 백신화를 사전 또는 후속의 폴리펩타이드 및/또는 핵산 백신화와 겸할 수 있다. 예를 들어, 생백신 또는 바이러스 백신을 이용하여 우선 면역화시키고 이어서 폴리펩타이드 또는 핵산으로 접근하여 후속의 이차 면역화를 진행하는 것이 가능하다.

미생물 또는 바이러스는, 예컨대 유용한 어쥬번트로서 논의한 사이토카인과 같이 상기 기술한 면역 조절 물질의 형태로, 첫번째, 두번째 및/또는 세번째 부분을 코딩하는 영역을 포함하는 핵산(들)을 이용하여 형질 전환시킬 수 있다. 이러한 구체예의 바람직한 형태는 유사체의 코딩 영역과 별개의 해독틀에서 또는 적어도 별개 프로모터의 조절하에 면역조절자의 코딩 영역을 갖도록 초래된다. 따라서 유사체 또는 에피토프가 면역조절자의 융합 파트너로서 제공되는 것을 피할 수 있다. 선택적으로 별개의 두 뉴클레오타이드 단편을 형질 전환제로서 이용할 수 있다. 물론, 동일한 해독틀에서 첫번째 및/또는 두번째 및/또는 세번째 부분을 갖는 것을 본 발명의 발현 생성물, 유사체로서 제공할 수 있고 그러한 구체예가 본 발명에서 특히 바람직하다.

<u>질병 치료에 본 발명을 이용하는 방법</u>

상기 논점에서 알 수 있듯이, 본 발명의 방법은 과도한 뼈 질량의 손실을 특징으로 하는 질병을 조절할 수 있다. 이러한 관계에서, 골다공증은 본 방법의 주된 목표이며 뼈의 파쇄를 악화시키는 뼈 손실 또한 치료/개선을 위한 실행 가능한 목표이다. 그러므로, OPGL 활성을 하향-조절하는 본 방법의 중요한 구체예는 골다공증 또는 과도한 뼈의 재흡수를 특징으로 하는 다른 질병을 치료 및/또는 예방 및/또는 개선시키는 것을 포함하고, 그 방법은 뼈의 재흡수율이 상당히 감소하는 한도까지 본 방법에 따라 OPGL 활성을 하향-조절하는 것이다.

본 문맥에서 뼈 흡수의 상당한 감소는 병리적 비율과 비교하여 3% 이상이나, 예컨대 5% 이상, 7% 이상, 9% 이상, 11% 이상, 13% 이상, 15% 이상 및 17% 이상의 보다 높은 퍼센티지로 고려되며, 심지어 그 이상의 퍼센티지, 예컨대 20% 이상 또는 심지어 30% 이상이 기대된다. 뼈 재흡수의 감소가 뼈 형성과 뼈 재흡수간 균형을 전도, 즉 뼈 형성율이 뼈 재흡수율을 초과하도록 하는 것이 특히 바람직하다. 물론, 이 불균형이 유지되어서는 안되나(그것이 골경화증을 야기하므로), 대상이 되는 개체의 면역화 횟수와 면역 효과를 신중하게 조절함으로써 최종적인 뼈 질량의 보존을 야기하는 기간에 걸쳐서 균형을 이룰 수 있다. 선택적으로, 만약 개체에서 본 발명의 방법이 뼈 손실을 차단하지 못한하면, 뼈 손실을 상당하게 감소시키는데(임의로 골다공증 환자에서 뼈 손실을 감소시키는 기타 알려진 방법과 공동으로) 본 방법을 이용할 수 있고 그로 인해 충분한 뼈 질량이 개체에 존재하는 기간을 연장시킨다.

뼈 재흡수율과 뼈 형성율의 측정 방법이 당해 분야에 알려져 있다. 콜라겐 타입 I의 특정 단편의 혈액 농도를 측정함으로써 뼈 재흡수율을 계측할 수 있는 생화하적 분석을 이용한다(cf. WO 93/15107 및 WO 94/14844). 선택적으로, 물리적 방법으로 뼈 손실율을 측정할 수 있다; 비-침입성, 물리적 방법에 의해 뼈 질량을 측정하는 당해 분야의 대표적인 기술을 WO 88/06862, WO 94/12855, WO 94/14431 및 WO 97/00643에서 볼 수 있다.

<u>본 발명의 펩타이드, 폴리펩타이드 및 조성물</u>

상기 설명에서 명백하듯이, 본 발명은 파골세포 활성을 간접적으로 감소시키기 위해 OPGL 항원에 대항하여 개체를 면역시키는 발상에 기초한 것이다. 그러한 면역화를 얻는 바람직한 방법은 변형된 OPGL 형태를 이용하는 것이고, 이를 위해 이전에 당해 분야에 밝혀지지 않았던 분자를 제공한다.

여기서 논의한 변형된 OPGL 분자는 본래 독창적인 것이고, 따라서 본 발명의 주요 부분이 동물의 OPGL로부터 유래된 OPGL 유사체에 관한 것이며, 이 때 변형되지 않은 OPGL 폴리펩타이드와 특이적으로 반응하는 항체의 생산을 유발하는 유사체를 이용하여 동물의 면역화를 야기시키는 변형이 도입된다. 바람직하게도, 변형의 특성은 변형된 OPGL을 사용하는 경우 본 방법의 다양한 구체예를 논의하면서 상기 기술한 변형의 타입과 합치한다. 그러므로, 변형된 OPGL 분자와 관련하여 여기서 기술한 어떠한 설명도 본 발명의 OPGL 유사체를 기술하는데 적절하며, 어떠한 그 설명들도 필요한 변경을 가하여 이러한 유사체의 기술에 적용된다.

변형된 OPGL 분자는 OPGL 또는 10개 이상의 아미노산 길이를 갖는 그 서열과 적어도 70% 이상 동일한 서열의 폴리펩타이드를 야기시키는 변형을 포함하는 것이 바람직하다. 보다 높은 서열 동일성, 예컨대 75% 이상 또는 심지어 80, 85, 90 또는 95% 이상이 바람직하다. 단백질과 핵산에 대한 서열 동일성은 $(N_{ref} - N_{dif}) \cdot 100 / N_{ref}$의 식으로 계산할 수 있고, 식 중 N_{dif}은 정렬시 두 서열간 동일하지 않은 잔기의 총수이고 N_{ref}는 한 서열의 잔기 수이다. 그러므로, DNA 서열 AGTCAGTC는 서열 AATCAATC와 75%의 서열 동일성을 갖는다(N_{dif}=2와 N_{ref}=8).

또한 본 발명은 본 발명의 방법을 수행하는데 유용한 조성물에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 동물에서 자가 단백질인 OPGL 폴리펩타이드의 면역적으로 유효한 양을 포함하는 면역적 조성물에 관한 것이고, 상기 OPGL 폴리펩타이드는 OPGL 폴리펩타이드에 대한 동물의 자가관용성을 깨뜨리기 위해 면역적으로 허용되는 어쥬번트와 함께 배합되며, 조성물은 추가로 약리적 그리고 면역적으로 허용되는 희석제 및/또는 비히클 및/또는 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 바꾸어 말해, 본 발명의 한 부분은 본 방법의 구체예와 관련하여 기술한 천연 발생의 OPGL 폴리펩타이드를 이용한 배합물에 관한 것이다.

또한 본 발명은 상기 정의한 OPGL 유사체의 면역적으로 유효한 양을 포함하는 면역적 조성물에 관한 것이고, 상기 조성물은 추가로 약리적 그리고 면역적으로 허용되는 희석제 및/또는 비히클 및/또는 담체 및/또는 부형제 그리고 임의로 어쥬번트를 포함한다. 바꾸어 말해, 본 발명의 한 부분은, 필수적으로 상기 기술한대로, 변형된 OPGL의 배합물에 관한 것이다. 어쥬번트, 담체 및 비히클의 선택은 OPGL을 하향-조절하는 본 발명의 방법을 이용하기 위해 변형된 그리고 변형되지 않은 OPGL의 배합물을 언급하면서 상기 논의한 바에 따른다.

당해 분야에 잘 알려진 방법에 따라 폴리펩타이드를 제조한다. 보다 긴 폴리펩타이드는 당연히 재조합 유전자 기술에 의해 제조한다. 이 기술은 OPGL 유사체를 코딩하는 핵산 서열을 적절한 벡터에 도입하고, 벡터를 이용하여 적절한 숙주 세포를 형질전환시키며, 핵산 서열을 발현시키고, 숙주 세포 또는 그 배양 상등액으로부터 발현 생성물을 회수한 후, 후속의 정제 및 임의의 추가 변형, 예컨대 되접힘 또는 유도화시키는 것을 포함한다.

보다 짧은 펩타이드는 잘 알려진 고체- 또는 액체-상 펩타이드 합성 기술에 의해 제조하는 것이 바람직하다. 그러나, 이들 기술의 최근의 진보로 인해 총-길이의 폴리펩타이드 및 단백질의 생산이 가능하고, 따라서 또한 합성 방법에 의해 길이가 긴 구성물을 제조하는 것이 본 발명의 범위내에 있다.

<u>본 발명의 핵산 단편과 벡터</u>

재조합 유전자 기술, 또한 화학적 합성 또는 반합성에 의해 변형된 OPGL 폴리펩타이드를 제조할 수 있음이 상기 기술에 의해 명백하다; 후자의 두 가능성은, 변형이 단백질 담체(예컨대 KLH, 디프테리아 톡소이드, 파상풍 톡소이드 및 BSA) 및 탄수화물 폴리머와 같은 비-단백질성 분자와 커플링할 때, 그리고 또한 변형이 OPGL 폴리펩타이드-유도 펩타이드 사슬에 측쇄(side chains) 또는 측기(side groups)를 첨가시킬 때 특히 적절하다.

재조합 유전자 기술, 또한 핵산 면역화의 목적을 위하여, 변형된 OPGL을 코딩하는 핵산 단편이 중요한 화학 생성물이다. 그러므로, 본 발명의 중요한 한 부분은 OPGL 유사체를 코딩하는 핵산 단편, 즉 융합 파트너에 첨가 또는 삽입되는 천연의 OPGL 서열을 포함하는 OPGL 유도의 폴리펩타이드, 또는 바람직하게는 삽입 및/또는 부가, 바람직하게는 치환 및/또는 결실에 의해 외래의 T-세포 에피토프에 도입되는 OPGL 유도의 폴리펩타이드에 관한 것이다.

본 발명의 핵산 단편은 정상적으로 적절한 벡터에 삽입되어 본 발명의 핵산 단편을 운반하는 클로닝 또는 발현 벡터를 형성한다; 그러한 신규한 벡터가 또한 본 발명의 일부분이다. 이들 벡터의 구조에 관련된 상세한 설명은 후술하는 형질 전환 세포 및 미생물에서 논의할 것이다. 적용 목적과 타입에 따라서 본 벡터는 플라스미드, 파지, 코스미드, 미니-크로모솜 또는 바이러스의 형태일 수 있고, 또한 특정 세포에서 단지 일시적으로 발현되는 네이키드 DNA가 중요한 벡터이다. 본 발명의 바람직한 클로닝 및 발현 벡터는 자율적으로 복제할 수 있으므로 후속 클로닝의 높은 발현 또는 높은 수준의 복제를 위해 높은 복사 수를 부여할 수 있다.

본 벡터의 일반적인 개요는 5'-3' 방향과 조작가능한 결합에서 다음 특징들을 포함한다: 본 발명의 핵산 단편의 발현을 이끄는 프로모터, 임의로 폴리펩타이드 단편의 분비(적용가능하다면, 세포외 상으로 또는 페리플라즈마로) 또는 막으로의 융합을 가능하게 하는 선도 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열, 본 발명의 핵산 서열 및 임의로 종료 인자를 코딩하는 핵산 서열. 생산 균주 또는 세포 라인에서 발현 벡터를 조작할 때, 형질 전환 세포의 유전적 안정성을 얻기 위하여 숙주 세포에 도입되는 벡터가 숙주 세포 게놈에 융합되는 것이 바람직하다. 대조적으로, 동물에서 생체내 발현을 초래하기 위해 이용되는 벡터를 다룰 때(즉, DNA 백신화에 벡터를 이용할 때) 벡터가 숙주 세포 게놈에 융합 불가능한 것이 안전성의 이유로 바람직하다; 통상적으로, 네이키드 DNA 또는 비-융합성 바이러스 벡터를 이용하고, 이것은 당업자에게 잘 알려진 선택이다.

본 발명의 벡터는 숙주 세포를 형질 전환시켜 본 발명의 변형된 OPGL 폴리펩타이드를 생산하는데 이용된다. 또한 본 발명의 일부인 그러한 형질전환된 세포는 본 발명의 핵산 단편과 벡터를 증식하기 위한 세포 또는 세포 라인으로 배양될 수 있고, 또는 본 발명의 변형된 OPGL 폴리펩타이드의 재조합 생산을 위해 이용된다. 선택적으로, 형질 전환된 세포는 생백신 균주에 적절하고 이 때 핵산 단편(하나의 단일 또는 다중 복사)이 변형된 OPGL의 박테리아 막 또는 세포벽에 융합 또는 분비되기 위해 삽입된다.

본 발명의 형질 전환되는 세포는 박테리아(예컨대, 에스체리치아 종(*Escherichia*)[예컨대 이. 콜라이(*E. coli*)], 바실러스(*Bacillus*)[예컨대 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)], 살모넬라(*Salmonella*), 또는 미코박테리움(*Mycobacterium*)[바람직하게는 비병원성, 예컨대 엠. 보비스(*M. bovis*) BCG])와 같은 미생물, 효모(예컨대 사카로마이세스 세리비제(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 원충류인 것이 바람직하다. 선택적으로, 형질 전환되는 세포가 곰팡이, 곤충 세포, 식물 세포 또는 포유류 세포와 같은 다중 세포의 유기체로부터 유래된다. 가장 바람직한 것은 인간에서 유래된 세포이고, 참고로 세포 라인과 벡터의 논의는 후술한다. 최근의 성과에서 시판되는 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)의 이용이 본 발명자들의 실험에서 폴리펩타이드의 재조합 생산을 위한 우수한 가망성을 보여주었으므로 이 발현 시스템이 특히 바람직하다.

클로닝 및/또는 최적의 발현을 위하여, 형질 전환된 세포가 본 발명의 핵산 단편을 복제할 수 있는 것이 바람직하다. 본 발명의 유용한 구체예에서 핵산 단편을 발현시키는 세포를 취한다; 소규모 또는 대량 규모의 변형된 OPGL의 제조를 위해 또는 비병원성 박테리아의 경우, 생백신에서 백신 성분으로서 이들을 이용할 수 있다.

형질 전환된 세포에 의해 본 발명의 변형된 OPGL을 생산할 때, 비록 필수적인 것은 아니나, 발현 생성물을 배양 배지로 실어내거나 형질 전환된 세포의 표면위로 운반하는 것이 편리하다.

유효한 생산 세포를 동정할 때, 그것에 기초하여 본 발명의 벡터를 운반하고 변형된 OPGL을 코딩하는 핵산 단편을 발현시키는 안정한 세포 라인을 확정하는 것이 바람직하다. 바람직하게도, 이 안정한 세포 라인은 본 발명의 OPGL을 분비 또는 운반하여 그것의 정제를 촉진한다.

일반적으로, 숙주 세포와 양립할 수 있는 종으로부터 유래된 조절 서열과 레플리콘을 함유하는 플라스미드 벡터를 숙주와 관련하여 사용한다. 대개 벡터는 형질 전환된 세포에서 표현형의 선택을 제공할 수 있는 표지 서열 뿐 아니라 복제 부위를 운반한다. 예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*)는 통상적으로 *E. coli* 종으로부터 유래된 플라스미드 pBR322를 이용하여 형질 전환된다(예컨대 Bolivar 등, 1977). pBR322 플라스미드는 암피실린과 테트라시클린 내성을 위한 유전자를 함유하므로 형질 전환된 세포를 동정하기 위한 용이한 방법을 제공한다. pBR 플라스미드, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 파지는 원핵 미생물에서 발현을 위해 이용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 함유하도록 변형되어야 한다.

재조합 DNA 구조에 가장 일반적으로 사용되는 프로모터는 B-락타마제(페니실리나제) 및 락토오스 프로모터 시스템(Chang 등, 1978; Itakura 등, 1977; Goeddel 등, 1979)과 트립토판(trp) 프로모터 시스템이다(Goeddel 등, 1979; EP-A-0 036 776). 이들을 가장 일반적으로 사용하는 한편, 그 밖의 미생물 프로모터가 발견 및 사용되었으며, 당업자가 그들

을 플라스미드 벡터와 기능적으로 결찰시키면서 그들의 뉴클레오타이드 서열에 대한 상세한 설명이 공개되었다(Siebwenlist 등, 1980). 원핵 생물의 특정 유전자가 인위적인 방법에 의해 또 다른 프로모터 첨가의 필요성을 배제시키면서 그 자신의 프로모터 서열로부터 *E. coli*에서 효과적으로 발현될 수 있다.

원핵 생물에 부가하여, 예컨대 효모 배양균과 같은 진핵 생물을 또한 이용할 수 있고, 여기서 프로모터는 발현을 초래할 수 있어야 한다. 비록 수많은 다른 균주를 일반적으로 사용할 수 있으나, 사카로마이세스 세레비제(*Saccharomyces cerevisiase*) 또는 흔한 제빵용 효모가 원핵 미생물 중 가장 일반적이다. 사카로마이세스(*Saccharomyces*)의 발현에서, 통상적으로, 예를 들어 플라스미드 YRp7을 이용한다(Stinchcomb 등, 1979; Kingsman 등, 1979; Tschemper 등, 1980). 이 플라스미드는, 예를 들어 ATCC No.44076 또는 PEP-1과 같이 트립토판에서 성장력이 부족한 효모의 변이 균주에 대하여 선택 표지를 제공하는 trp1 유전자를 이미 포함하고 있다(Jones, 1977). 효모 숙주 세포 게놈의 특징으로서 trp1 장애의 존재는 트립토판을 부재시켜 성장시킴으로써 형질 전환을 탐지하는 유효한 환경을 제공한다.

효모 벡터에서 적절한 촉진 서열은 3-포스포글리세레이트 키나아제 또는 그 밖의 당분해 효소(Hess 등, 1968; Holland 등, 1978), 예컨대 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제, 헥소키나아제, 피루베이트 디카르복시라제, 포스포프럭토키나아제, 글루코스-6-포스페이트 아이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타아제, 피루베이트 키나아제, 트리오세포스페이트 아이소머라제, 포스포글루코스 아이소머라제 및 글루코키나아제에 대한 프로모터를 포함한다. 적절한 발현 플라스미드의 구성에서, 이들 유전자와 결합한 종료 서열이 또한 mRNA의 폴리아데닐화 및 종료를 제공하기 위해 발현이 소망되는 서열의 발현 벡터 3'에 결찰된다.

성장 조건에 의해 조절되는 전사의 추가적인 이점을 갖는 다른 프로모터로는 알코올 디하이드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 결합된 붕괴성 효소 및 전술한 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제에 대한 프로모터 영역 및 말토오스와 칼락토스 이용을 초래하는 효소를 들 수 있다. 효모-양립성의 프로모터, 원시의 복제 및 종료 서열을 포함하는 모든 플라스미드 벡터가 적절하다.

미생물에 추가하여, 다중 세포의 유기체로부터 유래된 세포 배양균을 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 원칙적으로, 척추 동물 또는 비척추 동물 배양균에 상관없이, 어떠한 모든 세포 배양균을 이용할 수 있다. 그러나 척추 동물 세포에 가장 큰 관심이 주목되었고, 척추 동물의 배양(조직 배양) 증식이 최근 관례적인 방법이 되었다(Tissue culture, 1973). 유용한 숙주 세포 라인의 예로는 VERO 및 HeLa 세포, 중국산 햄스터 난소(CHO) 세포 라인 및 W138, BHK, COS-7 293, 스포돕테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(SF) 세포(Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, U.S.A. 및 Invitrogen으로부터 완전한 발현 시스템이 시판됨) 및 MDCK 세포 라인이 있다. 본 발명에서 특히 바람직한 세포 라인은 Invitrogen, PO Box 2312, 9704 CH Groningen, The Netherlands의 S_2이다.

보통 그러한 세포의 발현 벡터는 (필요하다면) 복제원, 발현되는 유전자의 앞에 위치하는 프로모터, 필수적인 리보솜 결합 부위와 함께 RNA 접목 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종료 서열을 포함한다.

포유류 세포의 이용에서, 발현 벡터상 조절 기능은 종종 바이러스 물질에 의해 제공된다. 예를 들어, 흔히 이용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2 그리고 가장 빈번하게 시미안 바이러스 40(SV40) 으로부터 유래된다. SV40 바이러스의 프로모터는 바이러스로부터 용이하게 단편으로서 얻을 수 있고 또한 SV40 바이러스의 복제원을 포함하기 때문에 특히 유용하다(Fiers 등, 1978). 바이러스의 복제원에 위치하며 *Hind*III 부위로부터 *Bgl*I 부위로 확장되는 약 250 bp 서열을 포함한다면, 보다 작거나 보다 큰 SV40 단편을 또한 이용할 수 있다. 추가로 그러한 조절 서열이 숙주 세포 시스템과 양립할 수 있다면, 프로모터를 이용하거나 소망하는 유전자 서열과 정상적으로 결합된 서열을 조절하는 것이 또한 가능하고, 종종 바람직하다.

복제원은, 예컨대 SV40 또는 다른 바이러스(예컨대, 폴리오마, 아데노, VSV, BPV)로부터 유래된 외생 기원을 포함하는 벡터를 구성함으로써 제공하거나 또는 숙주 세포의 염색체 복제 메카니즘에 의해 제공할 수 있다. 벡터가 숙주 세포의 염색체에 합쳐지면, 후자가 종종 충분하다.

유용한 OPGL 유사체의 동정

원시 OPGL의 모든 가능한 변종 또는 변형이 원시 형태와 가교-반응성인 동물에서 항체의 유발력을 갖지 않는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 그러나 여기서 논의한 면역 활성의 최소 요구를 만족시키는 변형된 OPGL 분자에 대한 유효한 표준

스크린을 수행하는 것은 어렵지 않다. 그러므로, 본 발명의 또 다른 부분은 동물 종에서 변형되지 않은 OPGL에 대항하여 항체를 유발할 수 있는 변형된 OPGL 폴리펩타이드를 동정하는 방법에 관한 것이고, 변형되지 않은 OPGL 폴리펩타이드는 (비-면역성) 자가 단백질이며, 그 방법은

- 펩타이드 합성 또는 유전 공학 기술에 의해, 상호 별개의 변형된 OPGL 폴리펩타이드의 세트를 제조하고, 이 때 동물 종의 OPGL 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 아미노산을 부가, 삽입, 결실 또는 치환시키고, 그로 인해 동물 종에 대해 외래성인 T-세포 에피토프를 포함하는 세트로 아미노산 서열을 발생시키거나, 상호 별개인 변형된 OPGL 폴리펩타이드의 세트를 코딩하는 핵산 단편의 세트를 제조하고,

- 변형되지 않은 OPGL에 대항하는 동물 종에 의해 항체 생산의 유발력에 대한 변형된 OPGL 폴리펩타이드 또는 핵산 단편 세트의 멤버들을 시험하고

- 동물 종에서 변형되지 않은 OPGL에 대항하여 상당한 항체의 생산을 유발하는 변형된 OPGL 폴리펩타이드 세트의 멤버를 동정 및 임의로 분리하거나, 동물 종에서 변형되지 않은 OPGL에 대항하여 상당한 항체의 생산을 유발하는 핵산 단편 세트의 멤버에 의해 코딩되는 폴리펩타이드 발현 생성물을 동정 및 임의로 분리한다.

문맥에서, "상호 별개의 변형된 OPGL 폴리펩타이드의 세트"는, 예컨대 상기 기술한 기준을 근거(예컨대, 순환 이색성, NMR 분광법 및/또는 X-선 회절 패턴 연구를 공동으로)로 선택된 동일하지 않은 변형된 OPGL 폴리펩타이드의 집합이다. 이 세트는 단지 몇개의 멤버로 구성되나 수백개의 성분을 포함할 수 있다고 고려된다.

이 세트의 멤버에 대한 실험은 궁극적으로 생체내에서 수행되나, 수많은 실험관내 실험이 본 발명의 목적에 적합한 변형된 분자의 수를 좁히는데 적용될 수 있다.

외래의 T-세포 에피토프를 도입하는 목적이 T-세포 보조에 의해 B-세포 반응을 지지하는 것이므로, 변형된 OPGL에 의해 T-세포 증식이 유발되는 것이 필수적이다. T-세포 증식은 실험관내 표준화 증식 분석에 의해 실험될 수 있다. 요컨대, 대상균과 후속의 배양균 유지로 T-세포가 풍부한 샘플을 얻는다. 배양된 T-세포를 변형된 분자에서 이미 취한 대상균의 APCs와 접촉시키고 그 T-세포 에피토프를 제시하도록 그것을 처리한다. T-세포의 증식을 모니터링하고 적절한 대조군과 비교한다(예컨대, 배양균에서 완전한, 원시 OPGL로 처리한 APCs와 접촉시킨 T-세포). 선택적으로 외래의 T-세포에 대한 그들의 인식에 반응하여 T-세포에 의해 방출된 관련 사이토카인의 농도를 측정함으로써 증식을 평가할 수 있다.

세트의 타입 중 하나 이상의 변형된 OPGL이 OPGL에 대항하는 항체의 생산을 유발할 수 있는 가능성을 높이기 위하여, 변형되지 않은 OPGL 폴리펩타이드가 자가 단백질인 동물 종에서 변형되지 않은 OPGL에 대항하는 항체를 유발할 수 있는 하나 이상의 변형된 OPGL 펩타이드를 포함하는 면역적 조성물을 제조할 수 있고, 그 방법은, 약리적 및 면역적으로 허용되는 담체 및/또는 비히클 및/또는 희석제 및/또는 부형제, 임의로 약리적 및 면역적으로 허용되는 한가지 이상의 어쥬번트와 함께, 동물 종에서 OPGL에 반응성인 상당한 항체의 생산을 유발하는 세트의 멤버들을 혼합하는 것을 포함한다.

폴리펩타이드 세트의 실험에 관한 본 발명의 상기 양상은, 본 발명의 수많은 상호 별개의 핵산 서열 또는 벡터를 제조하고, 이들을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 이용하여 적절한 숙주 세포를 형질 전환시킨 후 본 발명의 핵산 서열을 발현시키는 것이다. 이들 단계 이후에 발현 생성물의 분리가 뒤따른다. 핵산 서열 및/또는 벡터는 PCR과 같은 분자의 증폭 기술의 실행을 포함하는 방법 또는 핵산 합성에 의해 제조되는 것이 바람직하다.

본 발명의 또 다른 부분은, 인간을 포함한 동물에서 과도한 뼈 재흡수를 특징으로 하는 질병을 치료, 예방 또는 경감하는 방법에 관한 것이고 그 방법은 파골세포의 활성상 OPGL의 자극적인 효과를 억제하는 오스테오프로테게린과 구별되는 하나 이상의 다른 물질의 유효한 양을 동물에게 투여하는 것이다. 그러한 접근이 당해 분야에서 제안된 적은 없었다.

본 발명의 바람직한 구체예는 OPGL의 자극 효과를 억제하는 물질로서 OPGL-특이적인 항체(폴리- 또는 모노클로날) 또는 그와 특이적으로 결합하는 변종의 이용을 포함한다. 항체는 IgG 또는 IgM 분자인 것이 바람직하고, 또는 특이적으로 결합하는 변종이 IgG 또는 IgM에서 유래된 것이 바람직하다. 항체에 특이적으로 결합하는 변종은 편리하게 Fab 단편, F(ab')$_2$ 단편, 인체에 적응시킨 모노클로날 항체 또는 그 단편, 또는 예컨대 디아보디(diabody)(Cambridge Antibody Technology에서 제조한 이중특이적 또는 이중 결합의 인공 항체-유도 분자)와 같은 이- 또는 다중 결합의 항체 단편일 수 있다.

실시예

쥐의 경우 아미노산 잔기 158-316 및 사람의 경우 아미노산 잔기 159-317(각각 SEQ ID NOs: 2와 4에 상응하는 수)을 포함하는 단편 형태에서 쥐와 인간의 OPGL을 코딩하는 cDNAs를 복제 또는 합성하였다. 이들 단편 형태가 생리적 활성을 제공하는대로 OPGL의 이 부분에 대항하는 자가 항체가 유발되는 논리이다. 게다가, 보다 작은 단백질을 생성하므로 다루기가 용이하다.

공개된 서열에서 하부-최적의 에스체리치아 콜라이(*Eschericia coli*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 코돈을 제거함으로써 쥐의 OPGL 잔기 158-316을 코딩하는 합성 cDNA를 합성하였다. 부가로, N-말단 히스티딘 태그, 사카로마이세스 세레비제(*Sacharomyces cerevisiae*)로부터 얻은 알파 교배 인자의 시그날 서열에 대한 절단 부위 및 적절한 제한 효소를 해독틀에 병합시켰다(cf. SEQ ID NO:7).

야생형 쥐의 OPGL을 코딩하는 cDNA를, *Bsp*HI와 *Hind*III 제한 효소를 이용하여 표준의 에스체리치아 콜라이(*Eschericia coli*) 발현 벡터(pTrc99a)에 그리고 *Sac*I와 *Kpn*I 제한 효소를 이용하여 표준의 클로닝 벡터(pBluescript KS+)에 복제하였다(SEQ ID NO:9 생산).

에스체리치아 콜라이(*Eschericia coli*) 세포에서의 발현은 총 에스체리치아 콜라이(*Eschericia coli*) 단백질에 대해 약 30%의 재조합 OPGL을 야기시켰다. 단백질을 되접힘시키고 다음 방법을 이용하여 정제하였다:

1. 원심 분리에 의해 세포를 회수한다.

2. 세포를 포스페이트 완충 살린(PBS)에 재현탁시키고 재원심분리한다.

3. 상등액을 제거하고 세포를 세배의 부피(100nM 트리스[히드록시메틸]아미노메탄 히드로클로라이드, 5mM 디티오트레이톨(DTT), 0.5M NaCl, pH 8.0)에 재현탁시킨다.

4. 세포에 세포 그램 당 8㎕ 50mM PMSK와 80㎕ 라이소자임(10㎎/㎖)을 첨가하고 실온에서 20분간 배양한다.

5. 각 그램의 세포 펠릿에 4㎎의 디옥시클로릭산을 첨가하고, 점성이 나타날 때까지 그 현탁액을 37℃에서 배양시킨다.

6. 세포 그램 중량 당 20㎕의 DNase(1㎎/㎖)을 첨가하고, $MgCl_2$를 5mM으로 하며, 그 현탁액을 실온에서 30분간 배양한다.

7. 현탁액을 점성이 사라질때까지 얼음상 초음파 분해한다.

8. 원심분리(20000 ×g 30분간) 후 펠릿을 H_2O에 재현탁시키고, 재원심분리, 그리고 세포 그램 중량 당 3㎖의 1M 우레아에 재현탁시킨다.

9. 원심분리(20000 ×g 30분간) 후 펠릿을 1M 구아니딘 히드로클로라이드, 100mM 트리스[히드록시메틸]아미노메탄 히드로클로라이드, pH 7.5에 재현탁시킨다.

10. 원심분리(20000 ×g 30분간) 후 펠릿을 6M 구아니딘 히드로클로라이드, 20mM 트리스[히드록시메틸]아미노메탄 히드로클로라이드, 5% 에탄올, 1% 베타-메르캅토에탄올, pH 8.0에 재현탁시키고, 4℃에서 하룻밤동안 교반시킨다.

11. 원심분리(40000 ×g 1-4시간) 후 상등액을 여과시키고 -20℃에서 저장한다.

12. 용해된 함유물을 Superdex 200 기계(Pharmacia)를 이용하여 겔 여과 크로마토그래피에 의해 분리한다.

13. 재조합 OPGL을 함유하는 부분을 혼주(pooled)시키고 1.5M 구아니딘 히드로클로라이드, 20mM 트리스[히드록시메틸]아미노메탄 히드로클로라이드, 1mM DTT, pH 7.5를 이용하여 0.1㎎/㎖로 희석시킨다.

14. 이 물질을 10배 부피의 1.5M 구아니딘 히드로클로라이드, 20mM 트리스[히드록시메틸]아미노메탄 히드로클로라이드, 1mM DTT, pH 7.5에 대하여 4℃에서 하룻밤동안 투석시킨다.

15. 이 물질을 10배 부피의 1.0M 구아니딘 히드로클로라이드, 20mM 트리스[히드록시메틸]아미노메탄 히드로클로라이드, 1mM DTT, pH 7.5에 대하여 4℃에서 하룻밤동안 투석시킨다.

16. 이 물질을 10배 부피의 0.5M 구아니딘 히드로클로라이드, 20mM 트리스[히드록시메틸]아미노메탄 히드로클로라이드, 1mM DTT, pH 7.5에 대하여 4℃에서 하룻밤동안 투석시킨다.

17. 이 물질을 10배 부피의 20mM 트리스[히드록시메틸]아미노메탄 히드로클로라이드, 150mM 아르기닌, 1mM DTT, pH 7.5에 대하여 4℃에서 하룻밤동안 투석시킨다.

18. 이 물질을 10배 부피의 20mM 트리스[히드록시메틸]아미노메탄 히드로클로라이드, 150mM 아르기닌, pH 7.5에 대하여 4℃에서 하룻밤동안 투석시킨다.

19. 되접힌 물질을 냉동 건조시키고 -20℃에 저장한다.

이 방법을 이용하는 되접힘 효율은 약 40%이고, 순도는 65% 이상이다. 정제 방법과 되접힘 처리는 여전히 개선의 대상이다. 고정화 되접힘이 조사중에 있고 히스티딘-태그의 효소적 제거가 Pedersen 등, 1999이 기술한대로 본질적으로 수행될 것이다. SDS-PAGE, N-말단 서열화, 아미노산 분석 및 질량 스펙트로메트리를 이용하여 재조합 단백질의 특성이 부여 및 입증되었다.

야생형 쥐 OPGL의 시스테인 치환 변이가 연구중에 있다(여기서 SEQ ID NO:4의 아미노산 잔기에 상응하는 시스테인이 세린으로 치환된다; cf. SEQ ID NOs:11과 12). 이것은 정제된 재조합 단백질에서 잠재적인 안정성 문제를 제거시킨다. 이 변이된 OPGL 단편은 SEQ ID NO:9를 갖는 DNA의 후술하는 완전한 유사체에서 백신 구성을 위한 기초로서 소용될 것이다. 추가로, 인간 OPGL의 상응하는 Cys-Ser 변이(이 때 Cys-221이 치환된다)가 또한 동일한 목적을 위해 제공될 것이다.

시초에 백신 분자는 선택된 위치에서 파상풍 톡소이드로부터 얻은 P2와 P30 에피토프를 삽입 또는 내부-치환시킴으로써 구성된다. 그 이후 단계에서 다른 적절한 면역우성인 T-세포 에피토프를 이용할 수 있다.

변종의 도입을 위한 위치는 원시 분자에 존재하거나 예견되는 B-세포 에피토프 및 예견된 이차 구조 요소의 정보를 기초로 할 뿐 아니라 OPGL 세포외 부분의 이차 및 삼차 구조를 모델링하기 위한 TNFα(1a8m.pdb)와 CD40 리간드(laly.pdb)의 현존하는 삼차원 구조와 함께 정렬을 이용하여 선택된다. 쥐의 분자로의 도입은 아미노산 잔기 170-192, 198-218, 221-246, 256-261 및 285-316에 상응하는 영역에서 발생(cf. SEQ IC NO: 4에서 아미노산 번호)하고, 반면 인간 분자로의 도입은 아미노산 잔기 171-193, 199-219, 222-247, 257-262 및 286-317에 상응하는 영역에서 발생한다.

쥐 OPGL의 네 변종이 현재 구성되었고 에스체리치아 콜라이(*Eschericia coli*)에서 재조합으로 발현되었다.

N-말단 히스티딘 태그와 함께 mOPGL[158-316]_P30[256-261]을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO: 13)

SEQ ID NOs: 22와 25를 프라이머로서 이용하여 SEQ ID NO: 9의 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 단편을 *Sac*II와 *Kpn*I를 이용하여 제한적으로 분해하고 이어서 아가로스 겔로부터 정제시켰다. 주형으로서 SEQ ID NO: 9를 이용한 두번째 PCR을 프라이머 SEQ ID NO: 26과 벡터 특이적인 프라이머를 이용하여 수행하였다. 생성된 PCR 단편을 *Kpn*I와 *Hind*III를 이용하여 제한적으로 분해하였다. 그리고 나서 두 단편 모두를 *Sac*II와 *Hind*III를 이용하여 제한적으로 분해시킨 pBluescript KS+ 에서 SEQ ID NO: 9에 결찰시켰다. 이 구조에서 단일 염기 변이를 수정하기 위해, 프라이머 SEQ ID NOs:33과 29를 이용하여 주형으로서 이 구조를 이용하는 PCR를 수행하였다. 생성된 PCR 단편을 *Pst*I + *Eco*RI로 제한적으로 분해하고, 겔 정제시킨 후 *Pst*I + *Eco*RI을 이용하여 잘못 분해된 구조에 결찰시켰다. 검정된 구조(SEQ ID NO: 13)를 *Bsp*HI와 *Hind*III 제한 효소를 이용하여 pTrc99a로 운반하였다.

N-말단 히스티딘 태그와 함께 mOPGL[158-316]_P2[256-261]을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO: 15)

SEQ ID NOs: 27와 28을 프라이머로서 이용하여 주형 없이 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 단편을 *Pst*I와 *Eco*RI를 이용하여 제한적으로 분해하고 이어서 아가로스 겔로부터 정제시켰다. 생성된 단편을 *Sac*II와 *Hind*III를 이용하여 제한적으로 분해시킨 pBluescript KS+ 에서 SEQ ID NO: 9에 결찰시켰다. 검정된 구조(SEQ ID NO: 15)를 *Bsp*HI와 *Hind*III 제한 효소를 이용하여 pTrc99a로 운반하였다.

N-말단 히스티딘 태그와 함께 mOPGL[158-316]_P2[288-302]을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO: 17)

SEQ ID NOs: 22와 29를 프라이머로서 이용하여 SEQ ID NO: 9의 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 단편을 *Pst*I와 *Bst*BI를 이용하여 제한적으로 분해하고 이어서 아가로스 겔로부터 정제시켰다. 주형으로서 SEQ ID NO: 9를 이용한 두번째 PCR을 프라이머 SEQ ID NO: 30과 벡터 특이적인 프라이머를 이용하여 수행하였다. 생성된 PCR 단편을 *Bst*BI와 *Kpn*I를 이용하여 제한적으로 분해하고 이어서 겔 정제시켰다. 그리고 나서 두 단편 모두를 *Pst*I와 *Kpn*I를 이용하여 제한적으로 분해시킨 pBluescript KS+ 에서 SEQ ID NO: 9에 결찰시켰다. 검정된 구조(SEQ ID NO: 17)를 *Bsp*HI와 *Hind*III 제한 효소를 이용하여 pTrc99a로 운반하였다.

N-말단 히스티딘 태그와 함께 mOPGL[158-316]_P30[221-241]을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO: 19)

SEQ ID NOs: 22와 23을 프라이머로서 이용하여 SEQ ID NO: 9의 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 단편을 *Sac*II와 *Kpn*I를 이용하여 제한적으로 분해하고 이어서 아가로스 겔로부터 정제시켰다. 주형으로서 SEQ ID NO: 9를 이용한 두번째 PCR을 프라이머 SEQ ID NOs: 24와 31을 이용하여 수행하였다. PCR 단편을 *Kpn*I와 *Eco*RI를 이용하여 제한적으로 분해시킨 후 겔 정제시켰다. 두개의 단편 모두를 *Sac*II *Eco*RI를 이용하여 제한적으로 분해시킨 pBluescript KS+ 에서 SEQ ID NO: 9에 결찰시켰다. 검정된 구조(SEQ ID NO: 19)를 *Bsp*HI와 *Hind*III 제한 효소를 이용하여 pTrc99a로 운반하였다.

OPGL의 이들 단편화 변종은 모든 변종에 대해 총 단백질의 20% 이상을 생산하면서 이. 콜라이(*E. coli*)에서 발현되었다. 야생형 단백질(SEQ ID NO: 9)에 대한 상기 정제 및 되접힘 방법의 추가적인 개발이 이루어질 것이며 이 방법은 각 변종에서 최적의 방법을 개발하는 기초가 될 것이다. 히스티딘 태그를 이용하는 변종 단백질의 고정화 되접힘은 연구되어야 할 또 다른 접근방식이다.

선택적으로, 제한 효소를 이용하여 변종을 직접 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 발현 벡터로 운반하거나, 글리코실화가 요구된다면 PCR을 이용하여 그 밖의 효모 발현 시스템에 운반할 수 있다. 생체내 OPGL의 생리적 활성을 위해 글리코실화는 불필요함을 지적해야 한다. 또한 Lacey등이 보고한대로, 인간의 293 섬유모세포에서 단편화 OPGL을 발현시키는 것이 가능하다. 곤충 세포에서의 발현이 또한 고려된다(예컨대, Invitrogen에서 입수할 수 있는 Schneider 2 (S_2) 세포 라인과 벡터 시스템 또는 스포돕테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(SF) 세포와 벡터 시스템).

정제된 변종은 토끼에서 항체의 생산을 위해 이용되고 시판되는 항체가 존재하지 않으므로 검출 도구로서 이후 용도를 갖는다. 게다가, 이 물질은 자가백신의 후보를 결정하는 생리적 분석에서 매우 유용한 도구가 될 것이다. 항체는 당해 분야에 알려진 표준 방법에 의해 제조한다.

가장 우수한 자가백신 후보는 파골세포 성숙/활성의 실험관 분석 또는 골다공증에 대한 동물 생체 모델에서 평가한 억제 활성에 기초하여 선택된다. 유용한 분석과 모델 시스템이 문헌에 기술되어 있다(예컨대 Lacey 등, Fuller 등 및 Simonet 등).

재조합 단백질의 활성은, 마취되지 않은 수컷 Balb/C 생쥐에 100㎕를 정맥내 투여하고(생쥐 ㎏ 당 0, 0.1 및 1.0㎎ 단백질) 한시간 후 칼슘 포화의 헤파린으로 코팅된 모세관 튜브를 이용하여 주요 안정맥으로부터 125㎕의 혈액을 취하여 분석한다. ICA2(Radiometer, 덴마크)를 이용하여 칼슘 수준을 측정한다. 정제되고 되접힘된 쥐의 재조합 OPGL(SEQ ID NO: 9)은, 이온화 칼슘의 순환 수준을 10%까지 증가시키며, 이 분석에서 반응성을 갖는다.

자가백신 후보는, 자가백신화 및 후속의, 예컨대 생쥐에 재조합 mOPGL을 주사한 후 주변 혈액에 이온화 칼슘을 방출하는데 대한 그 억제를 모니터링함으로써 평가할 수 있다(Burgess 등이 기술한대로).

변형된 OPGL과 선택적으로, 항-OPGL 항체의 개별특이형에 대항하는 항개별특이형 항체가 또한 본 발명의 범위 내에서 유용한 면역원으로서 작용하는 것에 주목해야 한다. 마찬가지로, 포획 프로브로서 항-OPGL 또는 오스테오프로테게린을 이용하여, 예컨대 파지 제시 시스템에서 분리할 수 있는 미모형(mimotypic) 폴리펩타이드의 이용이 본 발명의 면역원의 일부로써 고려된다.

참고 문헌 목록

1. Bucay, N. 등 (1998), Genes Dev. 12, 1260-1268.

2. Lacey, D.L. 등 (1998), Cell 93, 165-176.

3. Marks, S.C., Jr. (1989), Am. J. Med. Genet. 34, 43-53.

4. Simonet, W.S. 등 (1997), Cell 89, 309-319.

5. Fuller, K. 등 (1998), J. Exp. Med. 188, 997-1001.

6. Burgess, T.L. 등 (1999), J. Cell Biol. 145, 527-538.

7. Pedersen J 등 (1999) Protein Expr. Purif. 15, 389-400.

서열목록

```
<110>    M & E BIOTECH A/S
<120>    METHOD FOR DOWN-REGULATING OSTEOPROTEGERIN LIGAND ACTIVITY
<130>    KP-CH-014246
<150>    DK PA 1998 01164
<151>    1998-09-15
<150>    US 60/102,896
<151>    1998-10-02
<160>    35
<170>    KOPATIN 1.5
<210>    1
<211>    2271
<212>    DNA
<213>    Homo sapiens
<220>
<221>    CDS
<222>    (185)..(1138)
<400>    1
aagcttggta ccgagctcgg atccactact cgacccacgc gtccgcgcgc cccaggagcc       60
aaagccgggc tccaagtcgg cgccccacgt cgaggctccg ccgcagcctc cggagttggc      120
cgcagacaag aaggggaggg agcgggagag ggaggagagc tccgaagcga gagggccgag      180
cgcc       atg cgc cgc gcc agc aga gac tac acc aag tac ctg cgt ggc     226
           Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly
             1               5                  10
tcg gag gag atg ggc ggc ggc ccc gga gcc ccg cac gag ggc ccc ctg        274
Ser Glu Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu
 15                  20                  25                  30
cac gcc ccg ccg ccg cct gcg ccg cac cag ccc ccc gcc gcc tcc cgc        322
His Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg
                 35                  40                  45
tcc atg ttc gtg gcc ctc ctg ggg ctg ggg ctg ggc cag gtt gtc tgc        370
Ser Met Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys
             50                  55                  60
agc gtc gcc ctg ttc ttc tat ttc aga gcg cag atg gat cct aat aga        418
Ser Val Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg
         65                  70                  75
ata tca gaa gat ggc act cac tgc att tat aga att ttg aga ctc cat        466
Ile Ser Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His
```

```
     80                  85                  90
gaa aat gca gat ttt caa gac aca act ctg gag agt caa gat aca aaa        514
Glu Asn Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys
 95                 100                 105                 110
tta ata cct gat tca tgt agg aga att aaa cag gcc ttt caa gga gct        562
Leu Ile Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala
                115                 120                 125
gtg caa aag gaa tta caa cat atc gtt gga tca cag cac atc aga gca        610
Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala
            130                 135                 140
gag aaa gcg atg gtg gat ggc tca tgg tta gat ctg gcc aag agg agc        658
Glu Lys Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser
        145                 150                 155
aag ctt gaa gct cag cct ttt gct cat ctc act att aat gcc acc gac        706
Lys Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp
    160                 165                 170
atc cca tct ggt tcc cat aaa gtg agt ctg tcc tct tgg tac cat gat        754
Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp
175                 180                 185                 190
cgg ggt tgg gcc aag atc tcc aac atg act ttt agc aat gga aaa cta        802
Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu
                195                 200                 205
ata gtt aat cag gat ggc ttt tat tac ctg tat gcc aac att tgc ttt        850
Ile Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe
            210                 215                 220
cga cat cat gaa act tca gga gac cta gct aca gag tat ctt caa cta        898
Arg His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu
        225                 230                 235
atg gtg tac gtc act aaa acc agc atc aaa atc cca agt tct cat acc        946
Met Val Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr
    240                 245                 250
ctg atg aaa gga gga agc acc aag tat tgg tca ggg aat tct gaa ttc        994
Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe
255                 260                 265                 270
cat ttt tat tcc ata aac gtt ggt gga ttt ttt aag tta cgg tct gga       1042
His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly
                275                 280                 285
gag gaa atc agc atc gag gtc tcc aac ccc tcc tta ctg gat ccg gat       1090
Glu Glu Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp
            290                 295                 300
cag gat gca aca tac ttt ggg gct ttt aaa gtt cga gat ata gat tga       1138
Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp ***
        305                 310                 315
        gc cccagttttt ggagtgttat gtatttcctg gatgtttgga aacatttttt      1190
aaaacaagcc aagaaagatg tatataggtg tgtgagacta ctaagaggca tggccccaac      1250
ggtacacgac tcagtatcca tgctcttgac cttgtagaga acacgcgtat ttacagccag      1310
tgggagatgt tagactcatg gtgtgttaca caatggtttt taaattttgt aatgaattcc      1370
tagaattaaa ccagattgga gcaattacgg gttgacctta tgagaaactg catgtgggct      1430
atgggagggg ttggtccctg gtcatgtgcc ccttcgcagc tgaagtggag agggtgtcat      1490
ctagcgcaat tgaaggatca tctgaagggg caaattcttt tgaattgtta catcatgctg      1550
gaacctgcaa aaaatacttt ttctaatgag gagagaaaat atatgtattt ttatataata      1610
tctaaagtta tatttcagat gtaatgtttt ctttgcaaag tattgtaaat tatatttgtg      1670
```

ctatagtatt tgattcaaaa tatttaaaaa tgtcttgctg ttgacatatt taatgtttta 1730
aatgtacaga catatttaac tggtgcactt tgtaaattcc ctggggaaaa cttgcagcta 1790
aggaggggaa aaaaatgttg tttcctaata tcaaatgcag tatatttctt cgttcttttt 1850
aagttaatag atttttcag acttgtcaag cctgtgcaaa aaaattaaaa tggatgcctt 1910
gaataataag caggatgttg gccaccaggt gcctttcaaa tttagaaact aattgacttt 1970
agaaagctga cattgccaaa aaggatacat aatgggccac tgaaatctgt caagagtagt 2030
tatataattg ttgaacaggt gtttttccac aagtgccgca aattgtacct ttttttttt 2090
ttcaaaatag aaaagttatt agtggtttat cagcaaaaaa gtccaatttt aatttagtaa 2150
atgttatctt atactgtaca ataaaaacat tgcctttgaa tgttaatttt ttggtacaaa 2210
aataaattta tatgaaaaaa aaaaaaaaag ggcggccgct ctagagggcc ctattctata 2270
g 2271

<210> 2
<211> 317
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

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

```
Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
    290                 295                 300
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp ***
305                 310                 315
<210>    3
<211>    951
<212>    DNA
<213>    Mus musculus
<220>
<221>    CDS
<222>    (1)..(951)
<220>
<221>    misc_feature
<222>    (142)..(213)
<223>    Transmembrane domain
<220>
<221>    misc_feature
<222>    (454)..(948)
<223>    Tumour Necrosis Factor(TNF)-like domain
<400>    3
atg cgc cgg gcc agc cga gac tac ggc aag tac ctg cgc agc tcg gag         48
Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu
  1               5                  10                  15
gag atg ggc agc ggc ccc ggc gtc cca cac gag ggt ccg ctg cac ccc         96
Glu Met Gly Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro
             20                  25                  30
gcg cct tct gca ccg gct ccg gcg ccg cca ccc gcc gcc tcc cgc tcc        144
Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser
         35                  40                  45
atg ttc ctg gcc ctc ctg ggg ctg gga ctg ggc cag gtg gtc tgc agc        192
Met Phe Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser
     50                  55                  60
atc gct ctg ttc ctg tac ttt cga gcg cag atg gat cct aac aga ata        240
Ile Ala Leu Phe Leu Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile
 65                  70                  75                  80
tca gaa gac agc act cac tgc ttt tat aga atc ctg aga ctc cat gaa        288
Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu
                 85                  90                  95
aac gca ggt ttg cag gac tcg act ctg gag agt gaa gac aca cta cct        336
Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro
            100                 105                 110
gac tcc tgc agg agg atg aaa caa gcc ttt cag ggg gcc gtg cag aag        384
Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys
        115                 120                 125
gaa ctg caa cac att gtg ggg cca cag cgc ttc tca gga gct cca gct        432
Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala
    130                 135                 140
atg atg gaa ggc tca tgg ttg gat gtg gcc cag cga ggc aag cct gag        480
Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu
145                 150                 155                 160
gcc cag cca ttt gca cac ctc acc atc aat gct gcc agc atc cca tcg        528
Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser
```

```
                165                 170                 175
ggt tcc cat aaa gtc act ctg tcc tct tgg tac cac gat cga ggc tgg        576
Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp
            180                 185                 190
gcc aag atc tct aac atg acg tta agc aac gga aaa cta agg gtt aac        624
Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn
        195                 200                 205
caa gat ggc ttc tat tac ctg tac gcc aac att tgc ttt cgg cat cat        672
Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His
    210                 215                 220
gaa aca tcg gga agc gta cct aca gac tat ctt cag ctg atg gtg tat        720
Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr
225                 230                 235                 240
gtc gtt aaa acc agc atc aaa atc cca agt tct cat aac ctg atg aaa        768
Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys
                245                 250                 255
gga ggg agc acg aaa aac tgg tcg ggc aat tct gaa ttc cac ttt tat        816
Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr
            260                 265                 270
tcc ata aat gtt ggg gga ttt ttc aag ctc cga gct ggt gaa gaa att        864
Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile
        275                 280                 285
agc att cag gtg tcc aac cct tcc ctg ctg gat ccg gat caa gat gcg        912
Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala
    290                 295                 300
acg tac ttt ggg gct ttc aaa gtt cag gac ata gac tga                    951
Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp ***
305                 310                 315
<210>  4
<211>  316
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  4
Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu
  1               5                  10                  15
Glu Met Gly Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro
             20                  25                  30
Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser
         35                  40                  45
Met Phe Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser
     50                  55                  60
Ile Ala Leu Phe Leu Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile
 65                  70                  75                  80
Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu
                 85                  90                  95
Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro
            100                 105                 110
Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys
        115                 120                 125
Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala
    130                 135                 140
Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu
```

```
145                 150                 155                 160
Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser
                165                 170                 175
Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp
            180                 185                 190
Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn
        195                 200                 205
Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His
    210                 215                 220
Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr
225                 230                 235                 240
Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys
                245                 250                 255
Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr
            260                 265                 270
Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile
        275                 280                 285
Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala
    290                 295                 300
Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp ***
305                 310                 315
<210>    5
<211>    2299
<212>    DNA
<213>    Mus musculus
<220>
<221>    CDS
<222>    (170)..(1120)
<400>    5
gagctcggat ccactactcg acccacgcgt ccgcccacgc gtccggccag gacctctgtg       60
aaccggtcgg ggcgggggcc gcctggccgg gagtctgctc ggcggtgggt ggccgaggaa      120
gggagagaac gatcgcggag cagggcgccc gaactccggg cgccgcgcc  atg cgc cgg     178
                                                       Met Arg Arg
                                                         1
gcc agc cga gac tac ggc aag tac ctg cgc agc tcg gag gag atg ggc        226
Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu Glu Met Gly
      5                  10                  15
agc ggc ccc ggc gtc cca cac gag ggt ccg ctg cac ccc gcg cct tct        274
Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro Ala Pro Ser
 20                  25                  30                  35
gca ccg gct ccg gcg ccg cca ccc gcc gcc tcc cgc tcc atg ttc ctg        322
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu
                 40                  45                  50
gcc ctc ctg ggg ctg gga ctg ggc cag gtg gtc tgc agc atc gct ctg        370
Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu
             55                  60                  65
ttc ctg tac ttt cga gcg cag atg gat cct aac aga ata tca gaa gac        418
Phe Leu Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp
         70                  75                  80
agc act cac tgc ttt tat aga atc ctg aga ctc cat gaa aac gca ggt        466
Ser Thr His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly
     85                  90                  95
```

```
ttg cag gac tcg act ctg gag agt gaa gac aca cta cct gac tcc tgc        514
Leu Gln Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys
100                 105                 110                 115
agg agg atg aaa caa gcc ttt cag ggg gcc gtg cag aag gaa ctg caa        562
Arg Arg Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln
                120                 125                 130
cac att gtg ggg cca cag cgc ttc tca gga gct cca gct atg atg gaa        610
His Ile Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu
            135                 140                 145
ggc tca tgg ttg gat gtg gcc cag cga ggc aag cct gag gcc cag cca        658
Gly Ser Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro
        150                 155                 160
ttt gca cac ctc acc atc aat gct gcc agc atc cca tcg ggt tcc cat        706
Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His
    165                 170                 175
aaa gtc act ctg tcc tct tgg tac cac gat cga ggc tgg gcc aag atc        754
Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile
180                 185                 190                 195
tct aac atg acg tta agc aac gga aaa cta agg gtt aac caa gat ggc        802
Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly
                200                 205                 210
ttc tat tac ctg tac gcc aac att tgc ttt cgg cat cat gaa aca tcg        850
Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser
            215                 220                 225
gga agc gta cct aca gac tat ctt cag ctg atg gtg tat gtc gtt aaa        898
Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys
        230                 235                 240
acc agc atc aaa atc cca agt tct cat aac ctg atg aaa gga ggg agc        946
Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser
    245                 250                 255
acg aaa aac tgg tcg ggc aat tct gaa ttc cac ttt tat tcc ata aat        994
Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn
260                 265                 270                 275
gtt ggg gga ttt ttc aag ctc cga gct ggt gaa gaa att agc att cag       1042
Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln
                280                 285                 290
gtg tcc aac cct tcc ctg ctg gat ccg gat caa gat gcg acg tac ttt       1090
Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe
            295                 300                 305
ggg gct ttc aaa gtt cag gac ata gac tga     gactcatttc gtggaacatt      1140
Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp ***
        310                 315
agcatggatg tcctagatgt ttggaaactt cttaaaaaat ggatgatgtc tatacatgtg      1200
taagactact aagagacatg gcccacggtg tatgaaactc acagccctct ctcttgagcc      1260
tgtacaggtt gtgtatatgt aaagtccata ggtgatgtta gattcatggt gattacacaa      1320
cggttttaca attttgtaat gatttcctag aattgaacca gattgggaga ggtattccga      1380
tgcttatgaa aaacttacac gtgagctatg gaaggggtc acagtctctg ggtctaaccc       1440
ctggacatgt gccactgaga accttgaaat taagaggatg ccatgtcatt gcaaagaaat      1500
gatagtgtga agggttaagt tcttttgaat tgttacattg cgctgggacc tgcaaataag      1560
ttctttttt ctaatgagga gagaaaaata tatgtatttt tatataatgt ctaaagttat       1620
atttcaggtg taatgttttc tgtgcaaagt tttgtaaatt atatttgtgc tatagtattt      1680
gattcaaaat atttaaaaat gtctcactgt tgacatattt aatgttttaa atgtacagat      1740
```

gtatttaact ggtgcacttt gtaattcccc tgaaggtact cgtagctaag ggggcagaat 1800
actgtttctg gtgaccacat gtagtttatt tctttattct ttttaactta atagagtctt 1860
cagacttgtc aaaactatgc aagcaaaata aataaataaa aataaaatga ataccttgaa 1920
taataagtag gatgttggtc accaggtgcc tttcaaattt agaagctaat tgactttagg 1980
agctgacata gccaaaaagg atacataata ggctactgaa atctgtcagg agtatttatg 2040
caattattga acaggtgtct ttttttacaa gagctacaaa ttgtaaattt tgtttctttt 2100
ttttcccata gaaaatgtac tatagtttat cagccaaaaa acaatccact ttttaattta 2160
gtgaaagtta ttttattata ctgtacaata aaagcattgt ctctgaatgt taatttttg 2220
gtacaaaaaa taaatttgta cgaaaacctg aaaaaaaaaa aaaaaaaggg cggccgctct 2280
agagggccct attctatag 2299

<210> 6
<211> 316
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 6

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

```
    290                 295                 300
Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp ***
305                 310                 315
<210>    7
<211>    564
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220>
<223>    Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR product with op
         timum codons for E. coli and P. pastoris expression
<220>
<221>    CDS
<222>    (1)..(564)
<220>
<221>    misc_binding
<222>    (43)..(84)
<223>    His tag
<220>
<221>    misc_feature
<222>    (1)..(36)
<223>    C-terminal part of Saccharomyces cerevisiae alpha-mating factor
<220>
<221>    misc_feature
<222>    (85)..(561)
<223>    Encoding wild type murine OPGL, residues 158-316
<400>    7
gag ctc gga tcc ctc gag aaa aga gag gct gaa gct cat gtc atg aaa          48
Glu Leu Gly Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala His Val Met Lys
  1               5                  10                  15
cac caa cac caa cat caa cat caa cat caa cat caa aaa cct gaa gct          96
His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro Glu Ala
             20                  25                  30
cag cca ttc gct cat ctg acc atc aac gct gca tcg atc cct tct ggt         144
Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly
         35                  40                  45
tct cat aaa gtt acc ctg tct tct tgg tat cac gac cgc ggt tgg gct         192
Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala
     50                  55                  60
aaa atc tct aac atg acc ctg tct aac ggt aaa ctg aga gtt aac cag         240
Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln
 65                  70                  75                  80
gac ggt ttc tac tac ctg tac gct aac atc tgt ttc aga cat cac gaa         288
Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu
                 85                  90                  95
acc tct ggt tct gtt cca acc gac tac ctg cag ctg atg gtt tac gtt         336
Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val
            100                 105                 110
gtt aaa acc tct atc aaa atc cca tct tca cat aac ctg atg aaa ggt         384
Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly
        115                 120                 125
ggt tct acc aaa aac tgg tct ggt aac tct gaa ttc cat ttc tac tct         432
Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser
```

```
    130                 135                 140
atc aac gtt ggt ggt ttc ttc aaa ctg aga gct ggt gaa gaa atc tct        480
Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser
145                 150                 155                 160
atc cag gtt tct aac cct tct ctg ctg gac cca gac cag gac gct acc        528
Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr
                165                 170                 175
tac ttc ggg gcc ttc aaa gtt cag gac atc gac tag                        564
Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp ***
            180                 185
<210>  8
<211>  187
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<400>  8
Glu Leu Gly Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala His Val Met Lys
  1               5                  10                  15
His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro Glu Ala
             20                  25                  30
Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly
         35                  40                  45
Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala
     50                  55                  60
Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln
 65                  70                  75                  80
Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu
                 85                  90                  95
Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val
            100                 105                 110
Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly
        115                 120                 125
Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser
    130                 135                 140
Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser
145                 150                 155                 160
Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr
                165                 170                 175
Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp ***
            180                 185
<210>    9
<211>    519
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220>
<223>    Description of Artificial Sequence: DNA encoding murine OPGL, res
         idues 158-316, fused to His tag
<220>
<221>    CDS
<222>    (1)..(519)
<220>
<221>    misc_binding
<222>    (1)..(42)
```

<223> His tag
<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(519)
<223> Murine OPGL, residues 158-316
<400> 9

```
atg aaa cac caa cac caa cat caa cat caa cat caa cat caa aaa cct          48
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
  1               5                  10                  15
gaa gct cag cca ttc gct cat ctg acc atc aac gct gca tcg atc cct          96
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
             20                  25                  30
tct ggt tct cat aaa gtt acc ctg tct tct tgg tat cac gac cgc ggt         144
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
         35                  40                  45
tgg gct aaa atc tct aac atg acc ctg tct aac ggt aaa ctg aga gtt         192
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
     50                  55                  60
aac cag gac ggt ttc tac tac ctg tac gct aac atc tgt ttc aga cat         240
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
 65                  70                  75                  80
cac gaa acc tct ggt tct gtt cca acc gac tac ctg cag ctg atg gtt         288
His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val
                 85                  90                  95
tac gtt gtt aaa acc tct atc aaa atc cca tct tca cat aac ctg atg         336
Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
aaa ggt ggt tct acc aaa aac tgg tct ggt aac tct gaa ttc cat ttc         384
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
        115                 120                 125
tac tct atc aac gtt ggt ggt ttc ttc aaa ctg aga gct ggt gaa gaa         432
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu
    130                 135                 140
atc tct atc cag gtt tct aac cct tct ctg ctg gac cca gac cag gac         480
Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
145                 150                 155                 160
gct acc tac ttc ggg gcc ttc aaa gtt cag gac atc gac                     519
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
                165                 170
```

<210> 10
<211> 173
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 10

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

```
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
 65                  70                  75                  80
His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val
                 85                  90                  95
Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
        115                 120                 125
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu
    130                 135                 140
Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
145                 150                 155                 160
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
                165                 170
<210>    11
<211>    519
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220>
<223>    Descriptioin of Artificial Sequence: Fusion of murine OPGL, resid
         ues 158-316 with C to S mutation, and His tag
<220>
<221>    CDS
<222>    (1)..(519)
<220>
<221>    misc_binding
<222>    (1)..(42)
<223>    His tag
<220>
<221>    misc_feature
<222>    (43)..(228)
<223>    Murine OPGL, residues 158-219
<220>
<221>    misc_feature
<222>    (232)..(519)
<223>    Murine OPGL, residues 221-316
<220>
<221>    mutation
<222>    (229)..(231)
<223>    tgt (Cys) to tcc (Ser)
<400>    11
atg aaa cac caa cac caa cat caa cat caa cat caa cat caa aaa cct         48
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
  1               5                  10                  15
gaa gct cag cca ttc gct cat ctg acc atc aac gct gca tcg atc cct         96
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
             20                  25                  30
tct ggt tct cat aaa gtt acc ctg tct tct tgg tat cac gac cgc ggt        144
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
         35                  40                  45
tgg gct aaa atc tct aac atg acc ctg tct aac ggt aaa ctg aga gtt        192
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
```

```
     50                  55                  60
aac cag gac ggt ttc tac tac ctg tac gct aac atc tcc ttc aga cat        240
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Ser Phe Arg His
 65                  70                  75                  80
cac gaa acc tct ggt tct gtt cca acc gac tac ctg cag ctg atg gtt        288
His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val
                 85                  90                  95
tac gtt gtt aaa acc tct atc aaa atc cca tct tca cat aac ctg atg        336
Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
aaa ggt ggt tct acc aaa aac tgg tct ggt aac tct gaa ttc cat ttc        384
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
        115                 120                 125
tac tct atc aac gtt ggt ggt ttc ttc aaa ctg aga gct ggt gaa gaa        432
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu
    130                 135                 140
atc tct atc cag gtt tct aac cct tct ctg ctg gac cca gac cag gac        480
Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
145                 150                 155                 160
gct acc tac ttc ggg gcc ttc aaa gtt cag gac atc gac                    519
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
                165                 170
<210>  12
<211>  173
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<400>  12
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
  1               5                  10                  15
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
             20                  25                  30
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
         35                  40                  45
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
     50                  55                  60
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Ser Phe Arg His
 65                  70                  75                  80
His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val
                 85                  90                  95
Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
        115                 120                 125
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu
    130                 135                 140
Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
145                 150                 155                 160
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
                165                 170
<210>    13
<211>    564
<212>    DNA
```

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fusion of murine OPGL, residues 158-316 modified by introduction of tetanus toxoid P30 epitope, and His tag
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(564)
<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(42)
<223> His tag
<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(336)
<223> Murine OPGL, residues 158-255
<220>
<221> misc_feature
<222> (337)..(399)
<223> Tetanus toxoid P30 epitope
<220>
<221> misc_feature
<222> (400)..(564)
<223> Murine OPGL, residues 262-316
<400> 13

```
atg aaa cac caa cac caa cat caa cat caa cat caa cat caa aaa cct          48
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
  1               5                  10                  15

gaa gct cag cca ttc gct cat ctg acc atc aac gct gca tcg atc cct          96
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
             20                  25                  30

tct ggt tct cat aaa gtt acc ctg tct tct tgg tat cac gac cgc ggt         144
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
         35                  40                  45

tgg gct aaa atc tct aac atg acc ctg tct aac ggt aaa ctg aga gtt         192
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
     50                  55                  60

aac cag gac ggt ttc tac tac ctg tac gct aac atc tgt ttc aga cat         240
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
 65                  70                  75                  80

cac gaa acc tct ggt tct gtt cca acc gac tac ctg cag ctg atg gtt         288
His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val
                 85                  90                  95

tac gtt gtt aaa acc tct atc aaa atc cca tct tca cat aac ctg atg         336
Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110

ttc aac aac ttc acc gtt tct ttc tgg ctg agg gta ccg aaa gtt tct         384
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
        115                 120                 125

gct tct cac ctg gaa aac tgg tct ggt aac tct gaa ttc cat ttc tac         432
Ala Ser His Leu Glu Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr
    130                 135                 140
```

```
tct atc aac gtt ggt ggt ttc ttc aaa ctg aga gct ggt gaa gaa atc        480
Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile
145                 150                 155                 160
tct atc cag gtt tct aac cct tct ctg ctg gac cca gac cag gac gct        528
Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala
                165                 170                 175
acc tac ttc ggg gcc ttc aaa gtt cag gac atc gac                        564
Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
            180                 185
<210>  14
<211>  188
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<400>  14
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
  1               5                  10                  15
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
             20                  25                  30
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
         35                  40                  45
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
     50                  55                  60
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
 65                  70                  75                  80
His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val
                 85                  90                  95
Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
        115                 120                 125
Ala Ser His Leu Glu Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr
    130                 135                 140
Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile
145                 150                 155                 160
Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala
                165                 170                 175
Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
            180                 185
<210>    15
<211>    546
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220>
<223>    Description of Artificial Sequence: Fusion between murine OPGL, r
         esidues 158-316 with tetanus toxoid P2 epitope introduced, and Hi
         s tag
<220>
<221>    CDS
<222>    (1)..(546)
<220>
<221>    misc_binding
<222>    (1)..(42)
```

<223> His tag
<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(336)
<223> Murine OPGL, residues 158-255
<220>
<221> misc_feature
<222> (382)..(546)
<223> Murine OPGL, residues 262-316
<220>
<221> misc_feature
<222> (337)..(381)
<223> Tetanus toxoid P2 epitope
<400> 15

```
atg aaa cac caa cac caa cat caa cat caa cat caa cat caa aaa cct          48
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
  1               5                  10                  15
gaa gct cag cca ttc gct cat ctg acc atc aac gct gca tcg atc cct          96
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
             20                  25                  30
tct ggt tct cat aaa gtt acc ctg tct tct tgg tat cac gac cgc ggt         144
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
         35                  40                  45
tgg gct aaa atc tct aac atg acc ctg tct aac ggt aaa ctg aga gtt         192
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
     50                  55                  60
aac cag gac ggt ttc tac tac ctg tac gct aac atc tgt ttc aga cat         240
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
 65                  70                  75                  80
cac gaa acc tct ggt tct gtt cca acc gac tac ctg cag ctg atg gtt         288
His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val
                 85                  90                  95
tac gtt gtt aaa acc cct atc aaa atc caa tct tca cat aac ctg atg         336
Tyr Val Val Lys Thr Pro Ile Lys Ile Gln Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
cag tac atc aaa gct aat tcg aaa ttc atc ggt atc acc gaa ctg aac         384
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Asn
        115                 120                 125
tgg tct ggt aac tct gaa ttc cat ttc tac tct atc aac gtt ggt ggt         432
Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly
    130                 135                 140
ttc ttc aaa ctg aga gct ggt gaa gaa atc tct atc cag gtt tct aac         480
Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn
145                 150                 155                 160
cct tct ctg ctg gac cca gac cag gac gct acc tac ttc ggg gcc ttc         528
Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe
                165                 170                 175
aaa gtt cag gac atc gac                                                 546
Lys Val Gln Asp Ile Asp
            180
```

<210> 16
<211> 182

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 16
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
1 5 10 15
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
20 25 30
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
35 40 45
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
50 55 60
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
65 70 75 80
His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val
85 90 95
Tyr Val Val Lys Thr Pro Ile Lys Ile Gln Ser Ser His Asn Leu Met
100 105 110
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Asn
115 120 125
Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly
130 135 140
Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn
145 150 155 160
Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe
165 170 175
Lys Val Gln Asp Ile Asp
180
<210> 17
<211> 519
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fusion between murine OPGL, r
esidues 158-316 with tetanus toxoid P2 epitope introduced, and Hi
s tag
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(519)
<220>
<221> misc_binding
<222> (1)..(42)
<223> His tag
<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(432)
<223> Murine OPGL, residues 158-287
<220>
<221> misc_feature
<222> (478)..(519)
<223> Murine OPGL, residues 303-316
<220>
<221> misc_feature

<222> (433)..(477)
<223> Tetanus toxoid P2 epitope
<400> 17

```
atg aaa cac caa cac caa cat caa cat caa cat caa cat caa aaa cct          48
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
  1               5                  10                  15
gaa gct cag cca ttc gct cat ctg acc atc aac gct gca tcg atc cct          96
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
             20                  25                  30
tct ggt tct cat aaa gtt acc ctg tct tct tgg tat cac gac cgc ggt         144
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
         35                  40                  45
tgg gct aaa atc tct aac atg acc ctg tct aac ggt aaa ctg aga gtt         192
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
     50                  55                  60
aac cag gac ggt ttc tac tac ctg tac gct aac atc tgt ttc aga cat         240
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
 65                  70                  75                  80
cac gaa acc tct ggt tct gtt cca acc gac tac ctg cag ctg atg gtt         288
His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val
                 85                  90                  95
tac gtt gtt aaa acc tct atc aaa atc cca tct tca cat aac ctg atg         336
Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
aaa ggt ggt tct acc aaa aac tgg tct ggt aac tct gaa ttc cat ttc         384
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
        115                 120                 125
tac tct atc aac gtt ggt ggt ttc ttc aaa ctg aga gct ggt gaa gaa         432
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu
    130                 135                 140
cag tac atc aaa gct aat tcg aaa ttc atc ggt atc acc gaa ctg gac         480
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Asp
145                 150                 155                 160
gct acc tac ttc ggg gcc ttc aaa gtt cag gac atc gac                     519
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
                165                 170
```

<210> 18
<211> 173
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<400> 18

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

```
                85                  90                  95
Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
        115                 120                 125
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu
    130                 135                 140
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Asp
145                 150                 155                 160
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
                165                 170
<210>    19
<211>    519
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220>
<223>    Description of Artificial Sequence: Fusion between murine OPGL, r
         esidues 158-316 with tetanus toxoid P30 epitope introduced, and H
         is tag
<220>
<221>    CDS
<222>    (1)..(519)
<220>
<221>    misc_binding
<222>    (1)..(42)
<223>    His tag
<220>
<221>    misc_feature
<222>    (43)..(231)
<223>    Murine OPGL, residues 158-220
<220>
<221>    misc_feature
<222>    (295)..(519)
<223>    Murine OPGL, residues 242-316
<220>
<221>    misc_feature
<222>    (232)..(294)
<223>    Tetanus toxoid P30 epitope
<400>    19
atg aaa cac caa cac caa cat caa cat caa cat caa cat caa aaa cct         48
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
  1               5                  10                  15
gaa gct cag cca ttc gct cat ctg acc atc aac gct gca tcg atc cct         96
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
             20                  25                  30
tct ggt tct cat aaa gtt acc ctg tct tct tgg tat cac gac cgc ggt        144
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
         35                  40                  45
tgg gct aaa atc tct aac atg acc ctg tct aac ggt aaa ctg aga gtt        192
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
     50                  55                  60
aac cag gac ggt ttc tac tac ctg tac gct aac atc tgt ttc aac aac        240
```

```
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Asn Asn
 65                  70                  75                  80
ttc acc gtt tct ttc tgg ctg agg gta ccg aaa gtt tct gct tct cac        288
Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His
                85                  90                  95
ctg gaa gtt aaa acc tct atc aaa atc cca tct tca cat aac ctg atg        336
Leu Glu Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
aaa ggt ggt tct acc aaa aac tgg tct ggt aac tct gaa ttc cat ttc        384
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
        115                 120                 125
tac tct atc aac gtt ggt ggt ttc ttc aaa ctg aga gct ggt gaa gaa        432
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu
    130                 135                 140
atc tct atc cag gtt tct aac cct tct ctg ctg gac cca gac cag gac        480
Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
145                 150                 155                 160
gct acc tac ttc ggg gcc ttc aaa gtt cag gac atc gac                    519
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
                165                 170
<210>  20
<211>  173
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<400>  20
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Lys Pro
  1               5                  10                  15
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro
             20                  25                  30
Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
         35                  40                  45
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
     50                  55                  60
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Asn Asn
 65                  70                  75                  80
Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His
                85                  90                  95
Leu Glu Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
            100                 105                 110
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
        115                 120                 125
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu
    130                 135                 140
Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
145                 150                 155                 160
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
                165                 170
<210>    21
<211>    68
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220>
```

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 21
agctgcaggt agtcggttgg aacagaacca gaggtttcgt gatgtctgaa acagatgtta 60
gcgtacag 68
<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 22
ctcatctgac catcaacgct gcat 24
<210> 23
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 23
tttcggtacc ctcagccaga aagaaacggt gaagttgttg aaacagatgt tagcgtacag 60
gtag 64
<210> 24
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 24
tgagggtacc gaaagtttct gcttctcacc tggaagttaa aacccctatc aaaatccaat 60
c 61
<210> 25
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 25
tttcggtacc ctcagccaga aagaaacggt gaagttgttg aacatcaggt tatgtgaaga 60
ttg 63
<210> 26
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 26
tgagggtacc gaaagtttct gcttctcacc tggaaaactg gtctggtaac tctgaattcc 60
at 62
<210> 27
<211> 79
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 27
tacctgcagc tgatggttta cgttgttaaa acccctatca aaatccaatc ttcacataac 60
ctgatgcagt acatcaaag 79
<210> 28
<211> 83
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 28
tggaattcag agttaccaga ccagttcagt tcggtgatac cgatgaattt cgaattagct 60
ttgatgtact gcatcaggtt atg 83
<210> 29
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 29
gaatttcgaa ttagctttga tgtactgttc ttcaccagct ctcagtttg 49
<210> 30
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 30
gctaattcga aattcatcgg tatcaccgaa ctggacgcta cctacttcgg ggc 53
<210> 31
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 31
cttactagtc gatgtcctga actttg 26
<210> 32
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PCR primer
<400> 32
agtggaattc agagttacca gaccagtttt tggtagaacc acctttcatc aggttatgtg 60
aagatgggat tttg 74
<210> 33
<211> 65
<212> DNA
<213> Clostridium tetani
<400> 33

actacctgca gctgatggtt tacgttgtta aaacctctat caaaatccca tcttcacata 60
acctg 65
<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> Clostridium tetani
<400> 34
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15
<210> 35
<211> 21
<212> PRT
<213> Clostridium tetani
<400> 35
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15
Ala Ser His Leu Glu
20