

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-500919
(P2006-500919A)

(43) 公表日 平成18年1月12日(2006.1.12)

(51) Int.CI.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 4
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 172 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-517500 (P2004-517500)	(71) 出願人	500049831 ザイモジエネティクス, インコーポレイテ ィド アメリカ合衆国, ワシントン 98102 , シアトル, イーストレイン アベニュー イースト 1201
(86) (22) 出願日	平成15年1月21日 (2003.1.21)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月7日 (2004.9.7)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/001983	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 國際公開番号	W02004/003140	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 國際公開日	平成16年1月8日 (2004.1.8)		
(31) 優先権主張番号	60/350, 325		
(32) 優先日	平成14年1月18日 (2002.1.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/389, 108		
(32) 優先日	平成14年6月14日 (2002.6.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/435, 361		
(32) 優先日	平成14年12月19日 (2002.12.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】サイトカイン受容体 z c y t o r 17 マルチマー

(57) 【要約】

新規サイトカインアンタゴニストとして、及びインビトロ及びインビボでの造血、リンパ及び骨髓性細胞の増殖及び/又は成長を刺激するリガンドを検出するための方法内に使用され得る、zcyt17 - 含有マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体のための新規ポリペプチド組合せ、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び関連する組成物及び方法が開示される。本発明はまた、前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の調製方法、前記受容体の使用及び前記受容体に対する抗体を包含する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号111又は配列番号109と少なくとも90%の配列同一性を有する少なくとも1つのポリペプチドを含んで成り、そして配列番号2を含んで成るリガンドを結合する、単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 2】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体がさらに、クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメインを含んで成る請求項1記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 3】

前記クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメインが、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基979、又は配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基979を含んで成る請求項2記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 4】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が、配列番号2の活性を拮抗する請求項1記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 5】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害する請求項1記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 6】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が、可溶性である請求項1記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 7】

親和性標識又は細胞毒性分子をさらに含んで成る請求項1記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 8】

前記親和性標識が、ポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Glu、物質P、FlagTMポリペプチド、ストレプタビジン結合ペプチド、又は免疫グロブリンFcポリペプチドである請求項7記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 9】

前記細胞毒性分子が、トキシン又は放射性核種である請求項7記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 10】

配列番号111と少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドが、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基732、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基543、又は配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基732を含んで成る請求項1記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項 11】

配列番号109と少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドが、配列番号109のアミノ酸残基1～アミノ酸残基649、又は配列番号109のアミノ酸残基20～アミノ酸残基649を含

10

20

30

40

50

んで成る請求項1記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項12】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227を含んで成る少なくとも1つのポリペプチドを含んで成る、単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項13】

前記ポリペプチドが、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基732、又は配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基732を含んで成る請求項12記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。10

【請求項14】

クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメインをさらに含んで成る請求項12記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項15】

前記クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメインが、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基979、又は配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基979を含んで成る請求項14記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。20

【請求項16】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が、配列番号2を含んで成るリガンドの活性を拮抗する請求項12記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項17】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害する請求項12記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。30

【請求項18】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が、可溶性である請求項12記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項19】

親和性標識又は細胞毒性分子をさらに含んで成る請求項12記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項20】

前記親和性標識が、ポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Glu、物質P、FlagTMポリペプチド、ストレプタビジン結合ペプチド、又は免疫グロブリンFcポリペプチドである請求項19記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。40

【請求項21】

前記細胞毒性分子が、トキシン又は放射性核種である請求項19記載の単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【請求項22】

配列番号111又は配列番号109と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んで成る、配列番号2を含んで成るリガンドを結合する、マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を形成するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。50

【請求項 23】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体がさらに、クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメインを含んで成る請求項22記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 24】

前記クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメインが、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基979、又は配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基979を含んで成る請求項23記載の単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 25】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が、配列番号2の活性を拮抗する請求項22記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 26】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害する請求項22記載の単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項 27】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が、可溶性である請求項22記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 28】

親和性標識又は細胞毒性分子をさらに含んで成る請求項22記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 29】

前記親和性標識が、ポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Glu、物質P、FlagTMポリペプチド、ストレプタビジン結合ペプチド、又は免疫グロブリンFcポリペプチドである請求項28記載の単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 30】

前記細胞毒性分子が、トキシン又は放射性核種である請求項28記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 31】

配列番号111と少なくとも90%の同一性を有するサイトカイン受容体ポリペプチドが、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基732、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基543、又は配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基732を含んで成る請求項22記載の単離されたポリヌクレオチド。

40

【請求項 32】

配列番号109と少なくとも90%の同一性を有するサイトカイン受容体ポリペプチドが、配列番号109のアミノ酸残基1～アミノ酸残基649、又は配列番号109のアミノ酸残基20～アミノ酸残基649を含んで成る請求項22記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 33】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227を含んで成る、マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を形成するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 34】

50

前記サイトカイン受容体ポリペプチドが、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基732、又は配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基732を含んで成る請求項33記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項35】

前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体がさらに、クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る請求項33記載の単離されたポリヌクレオチド。
10

【請求項36】

前記クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインが、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基979、又は配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基979を含んで成る請求項35記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項37】

前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体が、配列番号2を含んで成るリガンドの活性を拮抗する請求項33記載の単離されたポリヌクレオチド。
20

【請求項38】

前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体が、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害する請求項33記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項39】

前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体が、可溶性である請求項33記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項40】

前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体が、親和性標識又は細胞毒性分子をさらに含んで成る請求項33記載の単離されたポリヌクレオチド。
30

【請求項41】

前記親和性標識が、ポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Glu、物質P、FlagTMポリペプチド、ストレプタビジン結合ペプチド、又は免疫グロブリンFcポリペプチドである請求項40記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項42】

前記細胞毒性分子が、トキシン又は放射性核種である請求項40記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項43】

次の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター；

配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードするDNAセグメント；及び

転写ターミネーターを含んで成り、

ここで前記サイトカイン受容体ポリペプチドがマルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体を形成し、そして前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体が配列番号2を含んで成るリガンドを接合することを特徴とする発現ベクター。

【請求項44】

次の作用可能に連結された要素：

10

20

30

40

50

a) 第 1 転写プロモーター；配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする第 1 DNAセグメント；及び第 1 転写ターミネーター；及び

b) 第 2 転写プロモーター；クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメインをコードする第 2 DNAセグメント；及び第 2 転写ターミネーターを含んで成り、

ここで前記サイトカイン受容体ポリペプチド及びクラスIサイトカイン受容体がマルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体を形成し；そして

前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体が配列番号 2 を含んで成るリガンドに結合することを特徴とする発現ベクター。

【請求項 4 5】

請求項43記載の発現ベクターを含んで成る、DNAセグメントによりコードされるサイトカイン受容体ポリペプチドを発現する培養された細胞。

【請求項 4 6】

請求項44記載の発現ベクターを含んで成る、DNAセグメントによりコードされるサイトカイン受容体ポリペプチド及びクラスIサイトカイン受容体を発現する培養された細胞。

【請求項 4 7】

a) 転写ターミネーター；

b) 配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードするDNAセグメント；及び

c) 転写ターミネーターを含んで成る第 1 発現ベクター；及び

a) 転写プロモーター；

b) クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメインをコードするDNAセグメント；及び

c) 転写ターミネーターを含んで成る第 2 発現ベクターを含んで成り、

ここで、前記サイトカイン受容体ポリペプチド及びクラスIサイトカイン受容体がマルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体を形成し；そして

前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体が配列番号 2 を含んで成るリガンドに結合することを特徴とする培養された細胞。

【請求項 4 8】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメインを含んで成るマルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体に対する抗体の生成方法であって、

前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体により動物を接種し、ここで前記マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体がそのマルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体を特異的に結合する抗体を生成するために、動物において免疫応答を誘発し；そして

前記動物から抗体を単離することを含んで成る方法。

【請求項 4 9】

請求項 1 記載のマルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体に対して特異的に結合する抗体。

【請求項 5 0】

請求項12記載のマルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体に対して特異的に結合する抗体。

【請求項 5 1】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体；及び

医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物。

【請求項 5 2】

マルチマー又はヘテロダイマー-サイトカイン受容体の生成方法であって、

10

20

30

40

50

請求項45記載の細胞を培養し；そして

前記細胞により生成されるマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を単離することを含んで成る方法。

【請求項53】

マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の生成方法であって、

請求項46記載の細胞を培養し；そして

前記細胞により生成されるマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を単離することを含んで成る方法。

【請求項54】

マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の生成方法であって、

請求項47記載の細胞を培養し；そして

前記細胞により生成されるマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を単離することを含んで成る方法。

【請求項55】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体；及び

医薬的に許容できるビーグルを含んで成り、

ここで前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が免疫細胞の増殖を阻害することを含んで成る免疫細胞阻害組成物。

【請求項56】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体；及び

医薬的に許容できるビーグルを含んで成り、

ここで前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が免疫応答を阻害することを含んで成る免疫応答阻害組成物。

【請求項57】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体；及び

医薬的に許容できるビーグルを含んで成り、

ここで前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が炎症細胞の増殖を阻害することを含んで成る炎症細胞阻害組成物。

【請求項58】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体；及び

医薬的に許容できるビーグルを含んで成り、

ここで前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が炎症応答を阻害することを含んで成る炎症応答阻害組成物。

【請求項59】

抗原又は病原体に対して暴露される哺乳類における免疫応答を阻害するための方法であつて、

a) 哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；

b) 可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体、及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物を投与し；

c) 哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；そして

d) 段階(b)における抗原又は病原体のレベルに対して、段階(a)における抗原又は病原体のレベルを比較し、ここで前記レベルの変化が免疫応答の阻害を示すことを特徴と

10

20

30

40

50

する方法。

【請求項 6 0】

(e) マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物を再投与し；

(f) 哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；そして

(g) 段階(f)における抗原又は病原体のレベルに対して、段階(a)における抗原又は病原体のレベルを比較し、ここで前記レベルの変化が免疫応答の阻害を示すことを特徴とする方法。

【請求項 6 1】

哺乳類における造血細胞及び造血前駆体細胞を低めるための方法であって、

可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の不在下で培養される骨髓又は末梢血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞におけるリンパ細胞の数の低下を引き起こすために、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を含んで成る組成物と共に骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る方法。

【請求項 6 2】

前記造血細胞及び造血前駆体細胞がリンパ細胞である請求項61記載の方法。

【請求項 6 3】

前記リンパ細胞が、単球細胞、マクロマージ又はT細胞である請求項62記載の方法。

【請求項 6 4】

生物学的サンプルにおけるマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の存在を検出するための方法であって、

(a) 前記生物学的サンプルと、請求項50記載の抗体又は抗体フラグメントとを接触せしめ、ここで前記接触は、生物学的サンプルへの抗体又はフラグメントの結合を可能にする条件下で行われ；そして

(b) いずれかの結合された抗体又は結合された抗体フラグメントを検出する段階を含んで成る方法。

【請求項 6 5】

癌細胞の殺害方法であって、

患者からの癌細胞を含む組織又は生物学的サンプルを、エクスピリオで獲得するか、又は癌細胞をインビボで同定し；

請求項52記載の方法によりマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を生成し；

医薬的に許容できるビーグルにおいて、前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を配合し；そして

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン配合物を前記患者に投与するか、又は前記配合物に癌細胞を暴露することを含んで成り、ここで前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が細胞を殺害することを特徴とする方法。

【請求項 6 6】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体がさらに、トキシンに接合される請求項65記載の癌細胞の殺害方法。

【請求項 6 7】

前記抗体が、(a) ポリクローナル抗体、(b) ネズミモノクローナル抗体、(c) (b) ヒト適合された抗体、(d) 抗体フラグメント、及び(e) ヒトモノクローナル抗体の群からである請求項50記載の抗体。

【請求項 6 8】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227、及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成るマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体に対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント。

【請求項 6 9】

前記抗体がさらに、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネセン

10

20

30

40

50

スマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又はトキシンを含んで成る請求項50記載の抗体。

【請求項 7 0】

造血細胞及び造血前駆体細胞の $zcytor17\text{lig}$ - 誘発された増殖又は分化を阻害するための方法であって、可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の不在下で培養される骨髓又は抹消血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞における造血細胞の増殖又は分化を低めるのに十分な量の、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメインを含んで成る可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を含んで成る組成物と共に、骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る方法。 10

【請求項 7 1】

前記造血細胞及び造血前駆体細胞がリンパ細胞である請求項70記載の方法。

【請求項 7 2】

前記リンパ細胞が、単球細胞、マクロマージ又はT細胞である請求項71記載の方法。

【請求項 7 3】

$zcytor17\text{lig}$ - 誘発された炎症を低めるための方法であって、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメインを含んで成る組成物の炎症を低めるのに十分な量を、炎症を有する哺乳類に投与することを含んで成る方法。 20

【請求項 7 4】

炎症を有する哺乳類における炎症応答を抑制するための方法であって、

(1) 炎症分子レベルを決定し；

(2) 配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメイン、並びに医薬的に許容できるピークルを含んで成る組成物を投与し、

(3) 炎症分子の投与後のレベルを決定し；

(4) 段階(3)における炎症分子のレベルに、段階(1)における炎症分子のレベルを比較することを含んで成り、ここで炎症分子の上昇又は低下の欠失が炎症応答の抑制を示すことを特徴とする方法。 30

【請求項 7 5】

前記抗体がさらに、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネセンスマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又はトキシンを含んで成る請求項68記載の抗体。

【請求項 7 6】

造血細胞及び造血前駆体細胞の $zcytor17\text{lis}$ - 誘発された増殖又は分化の阻害方法であって、可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の不在下で培養される骨髓又は抹消血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞における造血細胞の増殖又は分化を低めるのに十分な、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメイン、並びに医薬的に許容できるピークルを含んで成る組成物と共に、骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る方法。 40

【請求項 7 7】

前記造血細胞及び造血前駆体細胞がリンパ細胞である請求項76記載の方法。

【請求項 7 8】

前記リンパ細胞が、単球細胞、マクロマージ又はT細胞である請求項77記載の方法。

【請求項 7 9】

$zcytor17\text{lig}$ - 誘発された炎症を低めるための方法であって、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメイン並びに医薬的に許容できるピークルを含んで成る組成物の炎症を低めるのに十分な量を、炎症を有する哺乳類に投与することを含んで成る方法。

【請求項 8 0】

10

20

30

40

50

炎症を有する哺乳類における炎症応答を抑制するための方法であって、

(1) 炎症分子レベルを決定し；

(2) 配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227を含んで成るマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体、及び医薬的に許容できるピークルを含んで成る組成物を投与し、

(3) 炎症分子の投与後のレベルを決定し；

(4) 段階(3)における炎症分子のレベルに、段階(1)における炎症分子のレベルを比較することを含んで成り、ここで炎症分子の上昇又は低下の欠失が炎症応答の抑制を示すことを特徴とする方法。

【請求項 8 1】

zcytor17ligが役割を演じる炎症疾患を有する哺乳類の処理方法であって、

炎症が低められるよう前記哺乳類にzcytor17ligのアンタゴニストを投与し、ここで前記アンタゴニストは、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメイン、並びに医薬的に許容できるピークルを含んで成る可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体であることを特徴とする方法。

【請求項 8 2】

前記疾患が、慢性炎症疾患である請求項81記載の方法。

【請求項 8 3】

前記疾患が、

(a) 炎症性腸疾患；

(b) 潰瘍性大腸炎；

(c) クローン病；

(d) 関節炎；及び

(e) 乾癬から成る群からの慢性炎症性疾患である請求項82記載の方法。

【請求項 8 4】

前記疾患が急性炎症性疾患である請求項81記載の方法。

【請求項 8 5】

前記疾患が、

(a) 内毒素血症；

(b) 敗血症；

(c) 毒性ショック症候群；及び

(d) 感染性疾患から成る群からの急性炎症性疾患である請求項84記載の方法。

【請求項 8 6】

前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体がさらに、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネセンスマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又はトキシンを含んで成る請求項81記載の方法。

【請求項 8 7】

患者における炎症を検出するための方法であって、

患者から組織又は生物学的サンプルを獲得し；

前記組織又は生物学的サンプルと、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメインを含んで成る可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体とを、前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が組織又は生物学的サンプルにおけるその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートし；

前記組織又は生物学的サンプルにおいて結合する可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を可視化し；そして

前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおける結合される可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイクリン受容体のレベルを、正常な対照の組織又は生物学的サンプルにおけるそのレベルと比較することを含んで成り、

10

20

30

40

50

ここで、正常な対照組織又は生物学的サンプルに比較して、患者の組織又は生物学的サンプルに結合される可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体のレベルの上昇が患者における炎症を示すことを特徴とする方法。

【請求項 8 8】

配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227、及び配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429を含んで成る可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の背景：

多細胞生物の細胞の増殖及び分化は、ホルモン及びポリペプチド成長因子により調節される。それらの拡散性分子は、細胞のお互いの連絡を可能し、そして細胞、組織及び器官の形成、そして損傷された組織の修復に関して作用する。ホルモン及び成長因子の例は、ステロイドホルモン（例えば、テストステロン）、副甲状腺ホルモン、卵胞刺激ホルモン、インターロイキン、血小板由来の成長因子（PDGF）、上皮成長因子（EGF）、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、エリトロポエチン（EPO）及びカルシトニンを包含する。

【0 0 0 2】

ホルモン及び成長因子は、受容体に結合することによって細胞代謝に影響を及ぼす。受容体は、細胞内のシグナル化経路、例えば第2メッセンジャーシステムに結合される内在性膜タンパク質であり得る。他の種類の受容体は、可溶性分子、例えば転写因子である。

サイトカインは一般的に、造血系の細胞の増殖又は分化を刺激し、又は身体の免疫及び炎症応答に関係している。造血に影響を及ぼすサイトカインの例は、赤血球細胞の成長を刺激するエリトロポエチン（EPO）；巨核球系の細胞の成長を刺激するトロンボポエチン（TPO）；及び好中球の成長を刺激する顆粒球・刺激因子（G-CSF）である。それらのサイトカインは、貧血、血小板減少症及び好中球減少症を有する患者における正常な血液細胞レベルの回復、又は癌のための化学療法の受容において有用である。

【0 0 0 3】

インターロイキンは、免疫学的応答、例えば炎症を仲介するサイトカインのファミリーである。インターロイキンは、広範囲の種類の炎症病理学を仲介する。免疫応答の中核は、多くのサイトカイン及び抗原に対する適合できる免疫性を生成するT細胞である。T細胞により生成されるサイトカインは、タイプ1及びタイプ2として分類されて来た（Kelsch, A. Immun. Cell Biol. 76: 300-317, 1998）。タイプ1サイトカインは、IL-2、IFN-

、LT- を包含し、そして炎症応答、ウィルス免疫性、細胞内寄生虫免疫性及び同種移植拒絶に包含される。タイプ2サイトカインは、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10及びIL-13を包含し、そして体液性応答、寄生虫免疫性及びアレルギー応答に関与する。タイプ1とタイプ2との間の共有されるサイトカインは、IL-3, GM-CSF及びTNF- を包含する。T細胞集団を生成するタイプ1及びタイプ2が異なった型の炎症組織中に選択的に移動することを示すある証拠が存在する。

【0 0 0 4】

成熟T細胞は、例えばサイトカイン、生化学的シグナル分子、又はT細胞集団の運命にさらに影響を及ぼす受容体を生成するために、抗原又は他の刺激物により活性化され得る。

B細胞は、補助細胞機能、例えばサイトカインの生成を行うために、それらの細胞表面上の受容体、例えばB細胞受容体及び他の補助分子を通して活性化され得る。

単球/マイクロファージ及びT-細胞は、それらの細胞表面上の受容体により活性化され、そしてリンパ球に対して抗原を提供することによって免疫応答において中心的役割を演じ、そしてまた、多数のサイトカインを分泌することによってリンパ球に対するアクセサリー細胞としても作用することができる。

【0 0 0 5】

10

20

30

40

50

天然のキラー（NK）細胞は、T細胞及びB細胞と共に、共通する前駆体細胞を有し、そして免疫監視において役割を演じる。15%までの血液リンパ球を含んで成るNK細胞は、抗原受容体を発現せず、そして従って、標的細胞への結合のために、必要なら、MHC認識を使用しない。インビボで、NK細胞は、活性化を必要とすると思われるが、しかしながら、インビトロで、NK細胞は、活性化を伴なわないで、いくつかのタイプの腫瘍細胞を殺害することが示されている。

【0006】

それらのサイトカインの例示されたインビボ活性は、他のサイトカイン、サイトカインアゴニスト及びサイトカインアンタゴニストまたは結合パートナーの莫大な臨床学的可能性及びそれらの必要性を説明する。本発明は、新規造血マルチマーサイトカイン受容体、並びに関連する組成物及び方法を提供することにより、それらの必要性と取り組む。10

本発明は、当業者に明らかであるそれらの及び他の使用のために、そのようなポリペプチドを提供する。

【発明の開示】

【0007】

本発明は、配列番号111又は配列番号109と少なくとも90%の配列同一性を有する少なくとも1つのポリペプチドを含んで成る、配列番号2を含んで成るリガンドを結合する、単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を提供する。任意には、前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る。前記クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインは、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基979、又は配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基979を含んで成る。20

【0008】

前記単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、配列番号2の活性を拮抗する。前記単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害する。前記単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、可溶性である。前記単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、親和性標識、例えばポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Glu、物質P、FlagTMポリペプチド、ストレブタビジン結合ペプチド、又は免疫グロブリンFcポリペプチド、又は細胞毒性分子、例えばトキシン又は放射性核種を含んで成ることができる。30

【0009】

配列番号111と少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドは、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基732、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基543、又は配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基732を含んで成る。配列番号109と少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドは、配列番号109のアミノ酸残基1～アミノ酸残基649、又は配列番号109のアミノ酸残基20～アミノ酸残基649を含んで成る。40

【0010】

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227を含んで成る少なくとも1つのポリペプチドを含んで成る、単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を提供する。前記少なくとも1つのポリペプチドは、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基519、配列番号150

11のアミノ酸残基1～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基732、又は配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基732を含んで成る。

【0011】

前記単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメイン、例えば配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基979、又は配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基979を含んで成る。前記単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、配列番号2を含んで成るリガンドの活性を拮抗することができる。10

【0012】

前記単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。任意には、前記単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、可溶性である。前記単離されたマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、親和性標識、例えばポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Glu、物質P、FlagTM ポリペプチド、ストレプタビジン結合ペプチド、又は免疫グロブリンFcポリペプチド、又は細胞毒性分子、例えばトキシン又は放射性核種を含んで成る。20

【0013】

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及び配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429を含んで成る可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を提供する。

【0014】

本発明はまた、配列番号111又は配列番号109と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んで成る、配列番号2を含んで成るリガンドを結合する、マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を形成するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメイン、例えば配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基979、又は配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基979を含んで成る。30

【0015】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、配列番号2の活性を拮抗することができる。前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。任意には、前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、可溶性である。前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、親和性標識、例えばポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Glu、物質P、FlagTM ポリペプチド、ストレプタビジン結合ペプチド、又は免疫グロブリンFcポリペプチド、又は細胞毒性分子、例えばトキシン又は放射性核種を含んで成る。40

【0016】

配列番号111と少なくとも90%の同一性を有する、コードされるサイトカイン受容体ポリペプチドは、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基543、配列番

10

20

30

40

50

号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基732、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基543、又は配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基732を含んで成る。配列番号109と少なくとも90%の同一性を有する、コードされるサイトカイン受容体ポリペプチドは、配列番号109のアミノ酸残基1～アミノ酸残基649、又は配列番号109のアミノ酸残基20～アミノ酸残基649を含んで成る。

【0017】

本発明はまた、列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227を含んで成る、マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を形成するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。前記サイトカイン受容体ポリペプチドは、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基519、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基1～アミノ酸残基732、又は配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基732を含んで成る。

10

【0018】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメイン、例えば配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基979、又は配列番号7のアミノ酸残基1～アミノ酸残基979を含んで成る。前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、配列番号2を含んで成るリガンドの活性を拮抗することができる。

20

【0019】

前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。任意には、前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、可溶性である。前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、本明細書に記載されるような親和性標識又は細胞毒性分子をさらに含んで成る。

30

【0020】

本発明はまた、次の作用可能に連結された要素：転写プロモーター；配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードするDNAセグメント；及び転写ターミネーターを含んで成り、ここで前記サイトカイン受容体ポリペプチドがマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を形成し、そして前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が配列番号2を含んで成るリガンドを接合することを特徴とする発現ベクターを提供する。

40

【0021】

他方では、本発明はまた、次の作用可能に連結された要素：a) 第1転写プロモーター；配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする第1DNAセグメント；及び第1転写ターミネーター；及びb) 第2転写プロモーター；クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン・結合ドメインをコードする第2DNAセグメント；及び第2転写ターミネーターを含んで成り、ここで前記サイトカイン受容体ポリペプチド及びクラスIサイトカイン受容体がマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を形成し；そして前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が配列番号2を含んで成るリガンドに結合することを特徴とする発現ベクターを提供する。

50

【0022】

他方では、本発明はまた、次の作用可能に連結された要素：a) 第1転写プロモーター；配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドをコードする第1DNA

50

セグメント；及び第1転写ターミネーター；及びb)第2転写プロモーター；クラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部をコードする第2DNAセグメント；及び第2転写ターミネーターを含んで成り、ここで前記ポリペプチド及びクラスIサイトカイン受容体がマルチマーサイトカイン受容体を形成し；そして前記マルチマーサイトカイン受容体が配列番号2の少なくとも一部に結合することを特徴とする発現ベクターを提供する。

【0023】

本発明の発現ベクターはさらに、第1及び第2のDNAセグメントに結合される分泌シグナル配列を包含する。マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、可溶性で、膜結合され、又は固体支持体に結合され得る。マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、配列番号2を含んで成るリガンドの活性を拮抗することができる。前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。任意には、前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、可溶性である。前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、本明細書に記載されるような親和性標識又は細胞毒性分子をさらに含んで成る。

【0024】

本発明はまた、本明細書に記載されるような発現ベクターを包含する培養された細胞を提供し、ここで前記細胞は、DNAセグメント又はセグメント類によりコードされたポリペプチド又はポリペプチド類を発現する。細胞は、マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を分泌することができる。マルチマーサイトカイン受容体は、さらに本明細書に記載されるように、配列番号2を結合し、そして/又はそれを培養することができる。

【0025】

本発明はまた、a)転写ターミネーター；b)配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するサイトカイン受容体ポリペプチドをコードするDNAセグメント；及びc)転写ターミネーターを含んで成る第1発現ベクター；及びa)転写プロモーター；b)クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインをコードするDNAセグメント；及びc)転写ターミネーターを含んで成る第2発現ベクターを含んで成り、ここで、前記サイトカイン受容体ポリペプチド及びクラスIサイトカイン受容体がマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を形成し；そして前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が配列番号2を含んで成るリガンドに結合することを特徴とする培養された細胞を提供する。第1及び第2発現ベクターは、第1及び第2DNAセグメントに操作可能に連結される分泌シグナル配列を包含することができる。

【0026】

培養された細胞はさらに、a)転写プロモーター；b)第2クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインをコードするDNAセグメント；及びc)転写ターミネーターを含んで成る第3発現ベクターを含んで成り、ここで、前記サイトカイン受容体ポリペプチド、第1クラスIサイトカイン受容体、及び第2クラスIサイトカイン受容体がマルチマーサイトカイン受容体を形成する。クラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインは、配列番号7及び/又は配列番号9のものであり得る。任意には、マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は可溶性であり得る。マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、本明細書に記載のような親和性標識を包含することができる。マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、配列番号2の少なくとも一部に結合し、そして/又は本明細書に記載のように配列番号2の活性を拮抗することができる。

【0027】

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成るマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体に対する抗体の生成方法を提供する。前記方法は、前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体により動物を接種し、ここで前記マルチマー又はヘテ

10

20

30

40

50

ロダイマーサイトカイン受容体がそのマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を特異的に結合する抗体を生成するために、動物において免疫応答を誘発し；そして

前記動物から抗体を単離することを含んで成る。前記抗体は任意には、モノクローナル抗体であり得る。抗体は任意には、中和性抗体であり得る。抗体は、本明細書に記載されるように、マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体に対して特異的に結合することができる。

【0028】

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体；及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物を提供する。クラスIサイトカイン受容体の結合ドメインは、配列番号7のアミノ酸残基28～429を含むことができる。可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は、配列番号2を含んで成るリガンドに結合することができる。可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、本明細書に記載されるような親和性標識又は細胞毒性分子を含むことができる。組成物は、配列番号2を含んで成るリガンドの活性を拮抗することができる。組成物は、造血細胞の増殖を阻害し、免疫細胞の増殖を阻害し、炎症細胞の増殖を阻害し、免疫応答を阻害し、炎症応答を阻害し、又は上皮起源の腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。

【0029】

本発明はまた、本明細書に記載されるような細胞を培養し；そして前記細胞により生成されるマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を単離することを含んで成る、マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の生成方法を提供する。

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体；及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る免疫細胞阻害組成物を提供し、ここで前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体は免疫細胞の増殖を阻害することを特徴とする。

【0030】

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体；及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る免疫応答阻害組成物を提供し、ここで前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が免疫応答を阻害することを特徴とする。

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体；及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る炎症細胞阻害組成物を提供し、ここで前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が炎症細胞の増殖を阻害することを特徴とする。

【0031】

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体；及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る炎症応答阻害組成物を提供し、ここで前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が炎症応答を阻害することを特徴とする。

【0032】

本発明はまた、抗原又は病原体に対して暴露される哺乳類における免疫応答を阻害するための方法を提供する。前記方法は、(a) 哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；(b) 可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体、及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物を投与し；(c) 哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；そして(d) 段階(b)に

10

20

30

40

50

おける抗原又は病原体のレベルに対して、段階(a)おける抗原又は病原体のレベルを比較し、ここで前記レベルの変化が免疫応答の阻害を示すことを特徴とする。前記方法はさらに、(e)マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物を再投与し；(f)哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；そして(g)段階(f)における抗原又は病原体のレベルに対して、段階(a)おける抗原又は病原体のレベルを比較し、ここで前記レベルの変化が免疫応答の阻害を示すことを特徴とする。

【 0 0 3 3 】

本発明はまた、哺乳類における造血細胞及び造血前駆体細胞を低めるための方法を提供する。前記方法は、可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の不在下で培養される骨髓又は末梢血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞におけるリンパ細胞の数の低下を引き起こすために、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を含んで成る組成物と共に骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る。前記造血細胞及び造血前駆体細胞は、単球細胞、マクロマージ又はT細胞であり得るリンパ細胞であり得る。

10

【 0 0 3 4 】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の存在を検出するための方法を提供する。前記方法は、前記生物学的サンプルと、本明細書に記載の抗体又は抗体フラグメントとを接触せしめ、ここで前記接触は、生物学的サンプルへの抗体又はフラグメントの結合を可能にする条件下で行われ；そしていずれかの結合された抗体又は結合された抗体フラグメントを検出する段階を含んで成る。

20

【 0 0 3 5 】

本発明はまた、癌細胞の殺害方法を提供する。前記方法は、患者からの癌細胞を含む組織又は生物学的サンプルを、エクスピリオで獲得するか、又は癌細胞をインビボで同定し；本明細書に記載の方法によりマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を生成し；医薬的に許容できるビーグルにおいて、前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を配合し；そして前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン配合物を前記患者に投与するか、又は前記配合物に癌細胞を暴露することを含んで成り、ここで前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が細胞を殺害することを特徴とする。前記マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体はさらに、トキシンに接合される。

30

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、本明細書に記載のマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体に対して特異的に結合する抗体も提供する。前記抗体は、ポリクローナル抗体、ネズミモノクローナル抗体、ネズミモノクローナル抗体由来のヒト適合された抗体、抗体フラグメント、中和性抗体、又はヒトモノクローナル抗体であり得る。前記抗体又は抗体フラグメントは、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227、及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成るサイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る本発明のマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体に対して特異的に結合することができる。前記抗体はさらに、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネセンスマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又はトキシンを含んで成る。

40

【 0 0 3 7 】

本発明はまた、造血細胞及び造血前駆体細胞のzytor17lig-誘発された増殖又は分化を阻害するための方法を提供する。前記方法は、可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の不在下で培養される骨髓又は抹消血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞における造血細胞の増殖又は分化を低めるのに十分な量の、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を含んで成る組成物と共に、骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る。前記造血細胞及び造血前駆体細胞は、リンパ細胞、例えはマクロマージ又はT細胞であり得る。

50

【 0 0 3 8 】

本発明はまた、*zcytor17lig* - 誘発された炎症を低めるための方法を提供する。前記方法は、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメインを含んで成る組成物の炎症を低めるのに十分な量を、炎症を有する哺乳類に投与することを含んで成る。

【 0 0 3 9 】

本発明はまた、炎症を有する哺乳類における炎症応答を抑制するための方法を提供する。前記方法は、(1)炎症分子レベルを決定し；(2)配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメイン、並びに医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物を投与し、(3)炎症分子の投与後のレベルを決定し；(4)段階(3)における炎症分子のレベルに、段階(1)における炎症分子のレベルを比較することを含んで成り、ここで炎症分子の上昇又は低下の欠失が炎症応答の抑制を示すことを特徴とする。10

【 0 0 4 0 】

本発明はまた、造血細胞及び造血前駆体細胞の*zcytor17lis* - 誘発された増殖又は分化の阻害方法を提供する。前記方法は、可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の不在下で培養される骨髄又は抹消血液細胞に比較して、骨髄又は末梢血液細胞における造血細胞の増殖又は分化を低めるのに十分な、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメイン、並びに医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物と共に、骨髄又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る。前記造血細胞及び造血前駆体細胞は、リンパ細胞、例えはマクロマージ又はT細胞であり得る。20

【 0 0 4 1 】

本発明はまた、*zcytor17lig* - 誘発された炎症を低めるための方法を提供する。前記方法は、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメイン並びに医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物の炎症を低めるのに十分な量を、炎症を有する哺乳類に投与することを含んで成る。

【 0 0 4 2 】

本発明はまた、炎症を有する哺乳類における炎症応答を抑制するための方法を提供する。前記方法は、(1)炎症分子レベルを決定し；(2)配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227を含んで成るマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体、及び医薬的に許容できるビーグルを含んで成る組成物を投与し、(3)炎症分子の投与後のレベルを決定し；(4)段階(3)における炎症分子のレベルに、段階(1)における炎症分子のレベルを比較することを含んで成り、ここで炎症分子の上昇又は低下の欠失が炎症応答の抑制を示すことを特徴とする。30

【 0 0 4 3 】

本発明はまた、*zcytor17lig*が役割を演じる炎症疾患を有する哺乳類の処理方法を提供する。前記方法は、炎症が低められるよう前記哺乳類に*zcytor17lig*のアンタゴニストを投与し、ここで前記アンタゴニストは、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン - 結合ドメイン、並びに医薬的に許容できるビーグルを含んで成る可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体であることを特徴とする。前記炎症疾患は、慢性炎症疾患、例えは炎症性腸疾患；潰瘍性大腸炎；クローン病；関節炎；及び乾癬であり得る。前記炎症疾患は、急性炎症性疾患、例えは内毒素血症；敗血症；毒性ショック症候群；及び感染性疾患であり得る。任意には、前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体がさらに、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネセンスマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又はトキシンを含んで成る。40

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、患者における炎症を検出するための方法を提供する。前記方法は、患者から組織又は生物学的サンプルを獲得し；前記組織又は生物学的サンプルと、配列番号1150

1のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体とを、前記可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体が組織又は生物学的サンプルにおけるその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートし；前記組織又は生物学的サンプルにおいて結合する可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を可視化し；そして前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおける結合される可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイクリン受容体のレベルを、正常な対照の組織又は生物学的サンプルにおけるそのレベルと比較することを含んで成り、ここで、正常な対照組織又は生物学的サンプルに比較して、患者の組織又は生物学的サンプルに結合される可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体のレベルの上昇が患者における炎症を示すことを特徴とする。

10

【0045】

本発明はまた、試験サンプルからの複数のサイトカイン受容体リガンドを検出するための方法も提供する。前記方法は、前記試験サンプルと、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインを含んで成るサイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成るマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体とを接触せしめ；そして試験サンプルにおけるリガンドへのマルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の結合を検出することを包含する。

20

【0046】

定義：

本発明を詳細に記載する前、次の用語を定義することで本発明の理解を助けることができる：

特にことわらない限り、“1つの（“a”）”、“その（“the”）”、及び“少なくとも1つの”とは、交換可能的に使用され、そして1つの又は1つよりも多くを意味する。

【0047】

“親和性標識”とは、第2ポリペプチドの精製又は検出を提供し、又は基質への第2ポリペプチドの結合のための部位を供給するために、第2ポリペプチドに結合され得るポリペプチドセグメントを示すために本明細書において使用される。主に、抗体又は、他の特異的結合剤が利用できるいすれかのペプチド又はタンパク質が親和性標識として使用され得る。親和性標識は、ポリ-ヒスチジン系、すなわちプロテインA (Nilssonなど.., EMB 0 J. 4: 1075, 1985; Nilssonなど.., Methods Enzymol. 198: 3, 1991), グルタチオンSトランスフェラーゼ (Smits and Johnson, Gene 67: 31, 1988), Glu-Glu親和性標識 (Grussenmeyerなど.., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 1985), 物質P、すなわちFlagTMペプチド (Hoppなど.., Biotechnology 6: 1204-1210, 1988)、ストレプタビシン結合ペプチド、又は他の抗原性エピトープ又は結合ドメインを包含する。一般的に、Fordなど.., Protein Expression and Purification 2:95-107, 1991を参照のこと。親和性標識をコードするDNAは、商品供給者（例えはPharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Eastman Kodak, New Haven, CT; New England Biolabs, Beverly, MA）から入手できる。

30

【0048】

用語“対立遺伝子変異体”とは、同じ染色体遺伝子座を占める遺伝子の複数の遺伝子の二者択一形のいすれかを示すために、本明細書において使用される。対立遺伝子変異は、突然変異を通して天然では生じ、そして集団内の表現型多型現象をもたらすことができる。遺伝子突然変異は、サイレントであり（コードされたポリペプチドにおいて変化がない）、又は変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。用語、対立遺伝子変異体はまた、遺伝子の対立遺伝子変異体によりコードされるタンパク質を示すために本明細書において使用される。

40

【0049】

用語“アミノ-末端”及び“カルボキシル-末端”とは、ポリペプチド内の位置を示すために本明細書において使用される。その情況が可能である場合、それらの用語は、接近

50

性又は相対的位置を示すためにポリペプチドの特定の配列又は一部に関して使用される。例えば、ポリペプチド内の対象配列のカルボキシル末端側に位置する一定の配列は、その対象配列のカルボキシル末端に隣接して位置するが、しかし完全なポリペプチドのカルボキシル末端では必ずしも必要ではない。

【0050】

用語“相補体／抗・相補体対”とは、適切な条件下で、非共有的に会合される安定した対を形成する非同一性成分を示す。例えば、ビオチン及びアビシン(又はストレプタビシン)は、相補体／抗・相補体対の基本型メンバーである。他の典型的な相補体／抗・相補体対は、受容体／リガンド対、抗体／抗原(又はハブテン又はエピトープ)対、センス／アンチセンス ポリヌクレオチド対、及び同様のものを包含する。相補体／抗・相補体対の続く解離が所望される場合、その相補体／抗・相補体対は好ましくは、 $< 10^9 M^{-1}$ の結合親和性を有する。

用語“ポリヌクレオチド分子の補体”とは、相補的塩基配列、及び対照配列に比較して逆の配向を有するポリペプチド分子である。例えば、配列5' ATGCACGGG 3' は、5' CGTGCAT 3' に対して相補的である。

【0051】

用語“contig”とは、他のポリヌクレオチドに対する一連の連續した同一の又は相補的な配列を有するポリヌクレオチドを示す。連續した配列とは、ポリヌクレオチドの全体において、又はその一部に沿って、一定の長さのポリヌクレオチド配列を“オーバーラップ”すると言われる。例えば、ポリヌクレオチド配列5' -ATGGCTTAGCTT-3' に対する代表的なcontig とは、5' -TAGCTTgagtct-3' 及び3' -gtcgactACCGA-5' である。

用語“縮重ヌクレオチド配列”とは、1又は複数の縮重コドンを含むヌクレオチドの配列(ポリペプチドをコードする対照ポリヌクレオチドに比較して)を示す。縮重コドンは、ヌクレオチドの異なったトリプレットを含むが、しかし同じアミノ酸残基をコードする(すなわち、GAU及びGACトリプレットはそれぞれAspをコードする)。

【0052】

用語“発現ベクター”とは、その転写を提供する追加のセグメントに操作可能的に連結される興味あるポリペプチドをコードするセグメントを含んで成る線状又は環状DNA分子を示すために使用される。そのような追加のセグメントは、プロモーター及びターミネーター配列及び複製の1又は複数の起点、1又は複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、及び同様のものを包含する。発現ベクターは一般的に、プラスミド又はウイルスDNAから誘導され、又は両者の要素を含むことができる。

【0053】

用語“単離された”とは、ポリヌクレオチドに適用される場合、ポリヌクレオチドがその天然の遺伝的環境から除去され、そして従って、他の無関係な又は所望しないコード配列を有さず、そして遺伝子的に構築されたタンパク質生成システム内での使用のために適切な形で存在することを示す。そのような単離された分子は、それらの天然の環境から分離され、そしてcDNA及びゲノム クローンを含む分子である。本発明の単離されたDNA分子は、通常関係しない他の遺伝子を含まないが、しかし天然において存在する5' 及び3' 未翻訳領域、例えばプロモーター及びターミネーターを含むことができる。関連する領域の同定は、当業者に明らかであろう(例えば、Dynan and Tijan, Nature 316: 774 78, 1985を参照のこと)。

【0054】

“単離された”ポリペプチド又はタンパク質は、その生来の環境以外の条件、例えば血液及び動物組織とは別の条件下で見出されるポリペプチド又はタンパク質である。好ましい形においては、単離されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に動物起源の他のポリペプチドを実質的に含まない。高く精製された形、すなわち95%以上の純度、より好ましくは99%以上の純度でポリペプチドを供給することが好ましい。この情気下で使用される場合、用語“単離された”とは、他の物理的形、例えばダイマー形又は他のグリコシル化された又は誘導体化された形での同じポリペプチドの存在を排除しない。

10

20

30

40

50

【0055】

用語“腫瘍性”とは、細胞を言及する場合、新規で且つ異常な増殖を受ける細胞、特に増殖において、制御できなく、且つ前進性であり、特に新形成をもたらす組織を示す。腫瘍性細胞は、悪性、すなわち侵襲性で且つ転移性であるか、又は良性であり得る。

“作用可能に連結された”とは、DNAセグメントに適用される場合、前記セグメントが、それらの意図された目的のために協力して機能し、例えば転写がプロモーターにおいて開始し、そしてコードセグメントを通してターミネーターに進行するよう配列されることを示す。

【0056】

用語“オルト体(orthology)”とは、異なった種からのポリペプチド又はタンパク質の機能的相対物である、1つの種から得られるポリペプチド又はタンパク質を示す。オルト体間の配列の差異は、特定化の結果である。10

“パラ体(paralogs)”とは、生物によって製造される、異なっているが、しかし構造的に関連するタンパク質である。パラ体は、遺伝子重複を通して生じると思われる。例えば、-グロビン、-グロビン及びミオグロビンは、お互いパラ体である。

【0057】

“ポリヌクレオチド”は、5'末端から3'末端に読み取られるデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の一本鎖又は二本鎖ポリマーである。ポリヌクレオチドは、RNA及びDNAを包含し、そして天然源から単離され、インビトロで合成され、又は天然及び合成分子の組み合わせから調製され得る。ポリヌクレオチドのサイズは、塩基対(略語“bp”)、ヌクレオチド(“nt”)、又はキロ塩基(“kb”)として表される。ここで、後者の2つの用語は、一本鎖又は二本鎖であるポリヌクレオチドを記載する。この用語が二本鎖分子に適用される場合、それは全体の長さを示すために使用され、そして用語、“塩基対”に等しいことが理解されるであろう。二本鎖ポリヌクレオチドの二本の鎖は長さにおいてわずかに異なり、そしてその末端が酵素分解の結果として異なることは、当業者により理解されており；従って、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドは一対に成り得ない。20

【0058】

“ポリペプチド”は、天然において生成されても又は合成的に生成されてもいずれにせよ、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基のポリマーである。約10個以下のアミノ酸残基のポリペプチドが、通常“ポリペプチド”として言及される。30

用語“プロモーター”とは、RNAポリメラーゼの結合及び転写の開始を提供するDNA配列を含む遺伝子の部分を示すために本明細書において使用される。プロモーター配列は通常、遺伝子の5'非コード領域に見出されるが、しかし必ずしもそうではない。

【0059】

用語“タンパク質”は、1又は複数のポリペプチド鎖を含んで成る高分子である。タンパク質はまた、非ペプチド成分、例えば炭水化物基を含むことができる。炭水化物及び他の非ペプチド置換基は、タンパク質が生成される細胞により付加され、そして細胞型により変化するであろう。タンパク質は、それらのアミノ酸主鎖により本明細書において定義され；置換基、例えば炭水化物基は一般的に、特定されないが、しかしそれにもかかわらず、存在することができる。40

【0060】

用語“受容体”は、生物活性分子(すなわち“リガンド”)に結合し、そして細胞上のリガンドの効果を仲介する細胞関連タンパク質を示す。膜結合受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン、及び典型的には、シグナルransダクションに関する細胞内エフェクタードメインを含んで成る多ペプチド構造により特徴づけられる。受容体へのリガンドの結合は、細胞におけるエフェクタードメインと他の分子との間の相互作用を引き起こす受容体におけるコンホメーション変化をもたらす。この相互作用は、細胞の代謝の変更を誘導する。受容体-リガンド相互作用に連結される代謝現象は、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、AMP生成の上昇、細胞カルシウムの代謝、膜脂質の代謝、細胞付着、イノシト50

ール脂質の加水分解、及びリン脂質の加水分解を包含する。一般的に、受容体は、膜結合され、シトソール性又は核性であり；モノマー(例えば甲状腺刺激ホルモン受容体、-アドレナリン性受容体)、又はマルチマー(例えばPDGF受容体、成長ホルモン受容体、IL-3受容体、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、エリトロポイエチン受容体及びIL-6受容体)であり得る。

【0061】

用語“分泌シグナル配列”とは、それが合成される細胞の分泌路を通してより大きなポリペプチドを、より大きなポリペプチドの成分として方向づけるポリペプチド(“分泌ペプチド”)をコードするDNA配列を示す。前記のより大きなポリペプチドは、分泌路を通しての移動の間、分泌ペプチドを除去するために通常分解される。

10

【0062】

“可溶性受容体”とは、細胞膜に結合されない受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、最も通常には、トランスメンブラン及び細胞質ドメインを欠いているリガンド-結合受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、追加のアミノ酸残基、例えばポリペプチドの精製を提供し、又は基質へのポリペプチドの結合のための部位、又は免疫グロブリン不变領域配列を提供する親和性標識を含んで成る。多くの細胞-表面受容体は、タンパク質加水分解により、又は交互にスプライシングされたmRNAから翻訳される天然に存在する可溶性相対物を有する。受容体ポリペプチドは、それがそれぞれ、膜固定化又はシグナルトランスダクションを提供するために、それらのセグメントの十分な部分を欠いている場合、トランスメンブラン及び細胞内ポリペプチドセグメントを実質的に有さないと言われる。

20

【0063】

用語“スプライス変異体”とは、遺伝子から転写されるRNAの二者択一の形を示すために、本明細書において使用される。スプライス変異は、転写されたRNA分子内の、又は通常低いが、別々に転写されたRNA分子間の二者択一のスプライシング部位の使用を通して天然において生じ、そして同じ遺伝子から転写されるいくつかのmRNAをもたらすことができる。スプライス変異体は、変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。用語スプライス変異体はまた、遺伝子から転写されるmRNAのスプライス変異体によりコードされるタンパク質を示すために本明細書において使用される。

30

【0064】

不正確な分析方法(例えば、ゲル電気泳動)により決定されるポリマーの分子量及び長さは、およそその値であることが理解されるであろう。そのような値が“約”X又は“およそ”Xとして表される場合、その言及されたXの値は、正確には±10%であることが理解されるであろう。

【0065】

本発明は、“マルチマーサイトカイン受容体”又は“zcytor17マルチマーサイトカイン受容体”として本発明において言及される、クラスIサイトカイン受容体の構造を有する新規マルチマーサイトカイン受容体タンパク質の発現に一部、基づかれる。マルチマーサイトカイン受容体は、同一所有のアメリカ特許出願番号第09/892,949号に開示されるzcytor17受容体サブユニットの少なくとも1部を包含する。本発明のマルチマーサイトカイン受容体に包含されるもう1つの受容体サブユニットポリペプチドは、クラスIサイトカイン受容体、例えばOSMR及び/又はWSX-1の少なくとも1つのポリペプチドの少なくとも1部を包含する。

40

【0066】

例えば、推定されるアミノ酸配列は、zcytor17が、gp130, LIF, IL-12, oncostatinM受容体(OSMR)(配列番号7)、WSX-1受容体(配列番号9)(Sprecher, CAなど., Biochem. Biophys. Res. Comm., 246: 81-90 (1998); 及びアメリカ特許第5,925,735号)、DCRS2(WIPO公開番号W000/73451号)、IL-2受容体-サブユニット及び-共通受容体(すなわち、IL-3, IL-5及びGM-CSF受容体サブユニット)を包含する受容体ファミリーに属することを示した。マルチマーサイトカイン受容体に包含され得るクラスIサイトカイ

50

ン受容体サブユニットポリペプチドのさらなる例は、IL-2, IL-4, IL-7, LIF, IL-12, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF及びG-CSFのための受容体である(Cosman, Cytokine, 5(2): 95-106 (1993))。

【0067】

サイトカイン受容体サブユニットは、細胞外ドメイン、細胞膜にポリペプチドを固定するトランスメンブランドメイン、及び細胞内ドメインを含んで成る多重-ドメイン構造により特徴づけられる。細胞外ドメインはリガンド-結合ドメインであり得、そして細胞内ドメインはシグナルトランスタクションに包含されるエフェクタードメインであり得るが、但しリガンド-結合及びエフェクター機能は、マルチマー受容体の別々のサブユニット上に存在する。マルチマー受容体は、ホモダイマー(例えば、PDGF受容体 及び イソフォーム、エリトロポエチン受容体、MPL及びG-CSF受容体)、サブユニットがそれぞれリガンド-結合及びエフェクタードメインを有するヘテロダイマー(例えば、PDGF受容体 イソフォーム)、及び種々の機能を有する成分サブユニットを有するマルチマー(例えば、IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7及びGM-CSF受容体)を包含する。いくつかの受容体サブユニットは、多くの受容体に共通する。

【0068】

例えば、単独ではリガンドを結合できないが、しかし細胞内シグナルトランスタクションドメインを包含するAIC2Bサブユニットは、IL-3及びGM-CSF受容体の成分である。多くのサイトカイン受容体は、その構造及び機能に基づいて、4種の関連するファミリーの1つに配置され得る。例えば、造血受容体は、保存されたシステイン残基及びWSXWSモチーフ(配列番号3)を含むドメインの存在により特徴づけられる。サイトカイン受容体構造は、Urdal, Ann. Reports Med. Chem. 26: 221-228, 1991及びCosman, Cytokine 5:95-106, 1993により再考されている。新規生物学的機能を生物が獲得するための選択的圧力下で、新規のファミリーメンバーは、多重遺伝子ファミリーの存在を導く存在する受容体遺伝子の重複から、たぶん生まれる。

【0069】

従って、ファミリーメンバーは、祖先遺伝子の痕跡を含み、そしてそれらの特徴は、追加のファミリーメンバーの単離及び同定において利用され得る。従って、サイトカイン受容体スーパーファミリーは、いくつかのファミリー、例えば免疫グロブリンファミリー(例えば、CSF-1, MGF, IL-1及びPDGF受容体)；ヘマトポイエチンファミリー(例えば、IL-2受容体 - サブユニット、GM-CSF受容体の - サブユニット、GM-CSF受容体 - サブユニット、及びG-CSF, EPO, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7及びIL-9受容体)；TNF受容体ファミリー(例えば、TNF(p80) TNF(p60)受容体、CD27, CD30, CD40, Fas及びNGF受容体)に再分割される。

【0070】

zcytor17配列の分析は、それがgp130, LIF, IL-12, WSA-1, IL-2受容体 - サブユニット、IL-3, IL-4及びIL-6受容体と同じ受容体サブファミリーのメンバーであることを示唆する。このサブファミリーにおける一定の受容体(例えば、G-CSF)は、シグナルを形質導入するホモダイマーを形成するために会合する。サブファミリーの他のメンバー(例えば、IL-6, IL-11及びLIF受容体)は、リガンドを結合し、そしてシグナルを形質導入するために第2サブユニット(- サブユニットと呼ばれる)と結合する。特定の - サブユニットは、多くの特定のサイトカイン受容体サブユニットと会合する。例えば、 - サブユニットgp130(Hibiなど., Cell63: 1149-1157, 1990)は、IL-6, IL-11及びLIFに対して特異的な受容体サブユニットと会合する(Gearingなど., EMBOJ. 10: 2839-2849, 1991; Gearingなど., アメリカ特許第5,284,755号)。オンコスタチンM(Oncostatin M)は、LIF受容体及びgp130のヘテロダイマーに結合する。CNTFは、CNTF受容体、LIF受容体及びgp130サブユニットを含んで成るトリマー受容体に結合する。

【0071】

本発明のマルチマーサイトカイン受容体は、zcytor17の少なくとも一部及びクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部を含んで成る、ヘテロダイマー、トリマー、テトラマ

10

20

30

40

50

一、ペントマー及び同様のものであり得る。さらに、マルチマーサイトカイン受容体は、可溶性で、膜結合されるか、又は固体支持体に結合され得る。zcytor17受容体のmRNAの組織分布の分析は、活性化されたCD4+及びCD8+T-細胞サブセット、CD14+単球における発現、及びCD19+B細胞における弱い発現を示した。さらに、mRNAが、休止又は活性化された単球細胞系THP-1(ATCC番号TIB-202)、U937(ATCC番号CRL-1593.2)及びHL60(ATCC番号CCL-240)に存在した。

【0072】

代表的なzcytor17コードのDNAのヌクレオチド配列は、配列番号110(ヌクレオチド171～2366(その推定される732個のアミノ酸配列が配列番号111で記載される))；配列番号108(ヌクレオチド162～2108)(その推定される649個のアミノ酸配列が配列番号109で記載される)；及び配列番号4(ヌクレオチド497～2482)(その推定される662個のアミノ酸は配列番号5で記載される)により記載される。全体として、zcytor17ポリペプチド(配列番号111, 109又は5)は、十分な長さのポリペプチドセグメント(配列番号111の残基1(Met)～残基732(Val)；配列番号109の残基1(Met)～残基648(Ile)；配列番号5の残基1(Met)～残基662(Ile))を表す。zcytor17ポリペプチドのドメイン及び構造特性は、さらに下記に記載される。

【0073】

配列番号110のDNA配列によりコードされるzcytor17ポリペプチドの分析は、19個のアミノ酸残基(配列番号111の残基1(Met)～残基19(Ala))の予測される分泌シグナルペプチド、及び713個のアミノ酸(配列番号111の残基20(Ala)～残基732(Val))を含んで成る732個のアミノ酸(配列番号111)をコードする読み取り枠を表す。配列番号108のDNA配列によりコードされるzcytor17ポリペプチドの分析は、19個のアミノ酸残基(配列番号109の残基1(Met)～残基19(Ala))の予測される分泌シグナルペプチド、及び630個のアミノ酸(配列番号109の残基20(Ala)～残基649(Ile))を含んで成る649個のアミノ酸(配列番号109)をコードする読み取り枠を表す。

【0074】

配列番号4のDNA配列によりコードされるzcytor17ポリペプチドの分析は、32個のアミノ酸残基(配列番号5の残基1(Met)～残基32(Ala))の予測される分泌シグナルペプチド、及び630個のアミノ酸(配列番号5の残基33(Ala)～残基662(Ile))を含んで成る662個のアミノ酸(配列番号5)をコードする読み取り枠を表す。

【0075】

WSXWSモチーフ(配列番号3)(配列番号111及び109の残基211～215；及び配列番号5の残基224～228に対応する)の他に、受容体は、約200個のアミノ酸残基(配列番号111及び109の残基20(Ala)～227(Pro)；配列番号5の残基33(Ala)～240(Pro))のサイトカイン結合ドメインを含む細胞外ドメイン(配列番号111及び109の残基20(Ala)～519(Gln)；配列番号5の残基33(Ala)～532(Gln))；ドメインリンカー(配列番号111及び109の残基122(Thr)～125(Pro)；配列番号111の残基135(Thr)～138(Pro))；終わりから2番目の鎖領域(配列番号111及び109の残基194(Phe)～202(Arg)；配列番号5の残基207(Phe)～215(Arg))；フィプロネクチンIII型ドメイン(配列番号111及び109の残基228(Cys)～519(Gln)；配列番号5の残基241(Cys)～532(Gly))；トランスマンブランドメイン(配列番号111及び109の残基520(Ile)～543(Leu)；配列番号5の残基533(Ile)～556(Leu))；“Box I”シグナル化部位(配列番号111及び109の残基554(Trp)～560(Pro)；配列番号5の残基567(Trp)～573(Pro))及び“Box II”シグナル化部位(配列番号111及び109の残基617(Gln)～620(Phe)；配列番号5の残基630(Gln)～633(Phe))を含む完全な細胞内シグナル化ドメイン(配列番号111の残基109(Lys)～732(Val)；配列番号5の残基554(Lys)～649(Ile)；及び配列番号5の残基557(Lys)～662(Ile))を含んで成る。

【0076】

当業者は、それらのドメイン境界はおおよそであり、そして既知タンパク質との一列整列及びタンパク質折りたたみの予測に基づかることを理解するであろう。それらのドメ

10

20

20

30

40

40

50

インの他に、コードされる受容体における保存された受容体特性は、配列番号111及び109に示されるように、位置30でのCys残基（配列番号5に示されるような位置43）での保存されたCys残基、位置40 - 42（配列番号5に示されるような位置53 - 55）でのCXWモチーフ（ここで、Xはいずれかのアミノ酸である）、位置170（配列番号5に示されるような位置183）でのTrp残基、及び位置202（配列番号5に示されるような位置215）での保存されたArg残基を包含する。上記に記載されるzcytor17ポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードするその対応するポリヌクレオチドは、配列番号11、108及び4に示される。

【0077】

さらに、zcytor17ポリペプチドの切断された形は、天然において発現されると思われる。両形は、可溶性zcytor17受容体をコードする。フィブロネクチンIII型ドメイン内の切斷された“長形”の可溶性zcytor17受容体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号112に示され、そしてその対応するポリペプチドは配列番号113に示される。この切斷された形は、配列番号111及び109の残基1（Met）～324（Lys）をコードし、そして従って、損なわれていないシグナル配列、WSXWS（配列番号3）モチーフ、リンカー、サイトカイン結合ドメイン、最後から2番目の鎖、及び保存されたCys、CXWモチーフ、Trp及びArg残基を含んで成る。サイトカイン結合ドメインの末端で切斷された、“短形”の可溶性zcytor17受容体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号114に示され、そしてその対応するポリペプチドは、配列番号115に示される。

【0078】

この切斷された形は、配列番号111及び109の残基1（Met）～225（Glu）と同一であり、そして次に分岐する239個の残基ポリペプチドをコードし、そして従って、上記のように、損なわれていないシグナル配列、WSXWS（配列番号3）モチーフ、リンカー、サイトカイン結合ドメイン、最後から2番目の鎖、及び保存された、Cys、CXWモチーフ、Trp及びArg残基を含んで成る。十分な長さの形のzcytor17に比較しての切斷された形の複一列整列が図1に示される。

【0079】

さらに、配列番号110、108、112及び114のzcytor17 cDNAは、配列番号111、109、113及び115のzcytor17ポリペプチドと同じ読み取り枠（ORF）でポリペプチドをコードする他の開始メチオニン（配列番号110のヌクレオチド75で、配列番号108のヌクレオチド66で、配列番号112のヌクレオチドで、及び配列番号114のヌクレオチド66で）を使用できるポリペプチドをコードする。前記他の開始メチオニンの使用は、配列番号111、109、113及び111のN-末端に整合して、32個のアミノ酸（配列番号48に示される）を付加する。さらに、配列番号4のヌクレオチド536は、他の開始メチオニンとして使用し、従って、配列番号111、109、113及び115と同じN-末端（配列番号5のアミノ酸14（Met）で開始する）及びシグナルポリペプチド配列を生成する。さらに、配列番号111、109、113及び115の配列におけるアミノ酸番号2（同様に配列番号5におけるアミノ酸番号15（Met）での）での第2 Metはまた、ポリペプチドのための他の開始メチオニンとしても作用することができる。

【0080】

代表的なOSMRコードのDNAのヌクレオチド配列は、配列番号6（ヌクレオチド368～3304）に記載され、そしてその推定される979個のアミノ酸配列が配列番号7に記載されている。全体として、OSMRポリペプチド（配列番号7）は、配列番号7の十分な長さのポリペプチドセグメント（残基1（Met）～残基979（Cys））を表す。OSMRポリペプチドのドメイン及び構造特徴はさらに、下記に記載されている。

【0081】

配列番号6のDNA配列によりコードされるOSMRポリペプチドの分析は、27個のアミノ酸残基（配列番号7の残基1（Met）～残基27（Ala））の予測される分泌シグナルペプチド、及び952個のアミノ酸（配列番号7の残基28（Glu）～残基979（Cys））成熟ポリペプチドを含んで成る979個のアミノ酸（配列番号7）をコードする読み取り枠を表す。2種

10

20

30

40

50

のWSXWSモチーフ（配列番号3）（配列番号7の残基129～133；及び残基415～419に対応する）の他に、受容体は、約400個のアミノ酸残基のサイトカイン-結合ドメイン（配列番号7の残基28（Glu）～429（Ala）、2種のリンカードメイン（残基31（Pro）～34（Pro）及び残基28（Asn）～347（Thr））、サイトカイン結合の3種の領域（残基35（Val）～137（Glu）、残基240（Pro）～342（Glu）、及び残基348（Asn）～429（Ala））、免疫グロブリンドメイン（残基138（Val）～239（Glu））、2種の終わりから2番目の鎖領域（残基106（His）～115（Lys）及び残基398（Thr）～405（Arg））、及びフィブロネクチンタイプIIIドメイン（残基430（Pro）～739（Ser）を含む）を含む細胞外ドメイン（配列番号7の残基28（Glu）～739（Ser）；トランスメンブランドメイン（配列番号7の残基740（Met）～761（Leu）；“Box I”シグナル化部位（配列番号7の残基771（Tyr）～777（Pro））及び“Box II”シグナル化部位（配列番号7の残基829（Glu）～832（Leu））を含んで成る。 10

【0082】

当業者は、それらのドメイン境界はおおよそであり、そして既知タンパク質との一列整列及びタンパク質折りたたみの予測に基づかれてることを理解するであろう。それらのドメインの他に、コードされる受容体における保存された受容体特性は、配列番号7に示されるように、位置52及び353での保存されたTrp残基、位置288での保存されたCys残基、位置294～296でのCXWモチーフ（ここで、Xはいずれかのアミノ酸である）、及び位置405での保存されたArg残基を包含する。上記に記載されるOSMRポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードするその対応するポリヌクレオチドは、配列番号6に示される。 20

【0083】

トランスメンブラン領域、及び保存され、そして低い変動性のモチーフの存在は一般的に、タンパク質における重要な構造領域と相互関係するか、又はその領域を定義する。低い変動性の領域（例えば、疎水性クラスター）は、一般的に、構造的に重要な領域に存在する（Sheppard, P.など、前記）。低い変動性のそのような領域はしばしば、まれな又は数少ないアミノ酸、例えばトリプトファンを含む。そのような保存され且つ低い変動性のモチーフを端に有し、そしてそのモチーフ間の領域は、より変動性であるが、しかし、それらは重要な構造及び活性、例えば結合ドメイン、生物学的及び酵素学的活性、シグナルトランスクレーション、細胞-細胞相互作用、組織極性ドメイン及び同様のものに関連し、又はそれらを明確にすることができるので、しばしば機能的に有意である。 30

【0084】

上記のzcytor17における保存されたアミノ酸残基の領域は、新規ファミリーメンバーを同定するための手段として使用され得る。例えば、逆転写-ポリメラーゼ鎖反応（RT-PCR）は、種々の組織源又は細胞系から得られるRNAからの保存された領域をコードする配列を増幅するために使用され得る。特に、zcytor17配列から企画された高い変性プライマーがこの目的のために有用である。そのような変性プライマーの企画及び使用は、当業者により容易に実施され得る。

【0085】

本発明はまた、細胞内シグナル化できる、本明細書に詳細されるようなマルチマー-zcyt or17受容体も企画する。そのような受容体は、zcytor17受容体の少なくとも1つの細胞外ドメインの少なくとも一部、及びzcytor17受容体又はもう1つのクラスIサイトカイン受容体からの細胞内ドメインを含むことができる。zcytor17の細胞外ドメインの他に、マルチマーサイトカイン受容体はまた、クラスIサイトカイン受容体の少なくとも1一部の細胞外ドメイン、例えばOSMR受容体及び/又はWSX-1受容体のリガンド結合ドメインを包含することができる。他方では、マルチマーサイトカイン受容体は、もう1つの受容体、例えばもう1つのクラスIサイトカイン受容体の細胞ドメイン、及び細胞内シグナル化をもたらすためのzcytor17の細胞内ドメインを包含することができる。 40

【0086】

本発明はさらに、可溶性であるマルチマーサイトカイン受容体を企画する。例えば、マ 50

ルチマーサイトカイン受容体は、例えばzcytor17の細胞外ドメインの一部、及びクラスIサイトカイン受容体、例えばOSMR（配列番号7）及び/又はWSX-1（配列番号9）の細胞外ドメインの一部を含むヘテロダイマーであり得る。さらに、可溶性マルチマーサイトカイン受容体はまた、親和性標識、例えば免疫グロブリンFcポリペプチドを含むことができる。可溶性マルチマーサイトカイン受容体は、免疫グロブリンH鎖不变領域、例えば2つの不变領域ドメインを含み、そして可変領域を欠いているFcフラグメントとの融合体として発現され得る。そのような融合体は典型的には、マルチマー分子として分泌され、ここでFc部分はお互いジスルフィド結合され、そして2つの非-Igポリペプチドはお互い接近して整列されている。このタイプの融合体は例えば、インビトロアッセイ手段又はアンタゴニストとして、リガンドを親和性精製するために、安定性及びインビボ半減期を高める二量体化のために使用され得る。

10

【0087】

本明細書に詳細されるクローニング及び増殖アッセイの工程を通して、本発明のマルチマーサイトカイン受容体は、共通所有のアメリカ特許出願第60/350, 325号及び共通所有のアメリカ特許出願第60/375, 323号に高い特異性で開示される、新規リガンドポリペプチド(zcytor17lig)（配列番号2）を結合することが示されている。zcytor17ligは、CD3のために選択された、活性化されたヒト末梢血液細胞(hPBC)から生成されるcDNAライブラリーから単離された。CD3は、リンパ起源の細胞、特にT細胞に対してユニークな細胞表面マーカーである。

20

【0088】

zcytor17lig陽性クローナーが単離され、そして配列分析は、プラスミドDNA内に含まれるポリヌクレオチド配列が新規であることを示した。分泌シグナル配列は、アミノ酸残基1(Met)～23(Ala)から成り、そして成熟ポリペプチドは、アミノ酸残基24(Ser)～164(Thr)（配列番号2で示されるような）から成る。さらに、293T細胞からの精製されたzcytor17ligのN-末端配列決定分析は、配列番号2で示されるような残基27(Leu)でのN-末端を示し、ここで成熟ポリペプチドはアミノ酸残基27(Leu)～164(Thr)（配列番号2で示されるような）から成る。

【0089】

一般的に、4-ヘリックス構造を有することが予測され、ここでヘリックスA, C及びDがリガンド-受容体相互作用において最も重要であり、そしてそのファミリーのメンバー間でより高く保存される。配列番号2に示されるヒトzcytor17ligアミノ酸配列、すなわちヒトzcytor17lig、ヒトIL-3, 及びヒトサイトカインアミノ酸配列の一列整列に関しては、好ましくは、配列番号2に示されるように、zcytor17ligヘリックスAはアミノ酸残基38-52により定義され；ヘリックスBはアミノ酸残基83-98により定義され；ヘリックスCはアミノ酸残基104-117により定義され；そしてヘリックスDはアミノ酸残基137-152により定義される。

30

【0090】

構造分析は、A/Bループが長く、B/Cループが短く、そしてC/Dループが平行して長いことを示す。このループ構造は、アップ-アップ-ダウン-ダウンヘリカル構成をもたらす。4-ヘリックス束構造に基づいて、保存される、zcytor17lig内のシステイン基は、本明細書に記載される配列番号2のアミノ酸残基72, 133及び147；及び配列番号11のアミノ酸残基74, 137及び151に対応する。矛盾しないシステイン置換は、その4-ヘリカル束構造のさらなる認識である。残基43での配列2に示されるようなGlu残基かまた、zcytor17lig高く保存される。

40

【0091】

さらに、ネズミzcytor17ligの推定されるアミノ酸配列は、配列（配列番号2及び11）の全体の長さにわたって、推定されるヒトタンパク質に対して31%の同一性を示す。ヒト及びネズミzcytor17ligの配列間の比較に基づいて、保存された残基は、ヘリックスC及びDをコードすることが予測される領域に見出された。本明細書に記載されるヒトzcytor17ligポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードするその対応するボ

50

リヌクレオチドは、配列番号1で示される。

【0092】

ヘリックスDは、ヒト及びネズミzcytor17lig間に比較的保存され、そしてヘリックスCはもっとも保存される。両種はこの領域において有力な酸性アミノ酸を有し、そしてその差異は、zcytor17ligと、モノマー、ヘテロダイマー（例えば、zcytor17/OSMR、WSX-1/OSMR、zcytor17/WSX-1）又はマルチマー（例えば、zcytor17/OSMR/WSX-1）受容体を含んで成るその受容体zcytor17との間の相互作用における種特異性を説明することができる。

【0093】

zcytor17ligのループA/B及びヘリックスBは、わずかに保存され、そしてループC/Dを通してのヘリックスC～ヘリックスDは種間に最も保存され；この領域を通しての保存は、それが機能的に有意であることを示唆する。ヒト及びネズミzcytor17ligのDヘリックスもまた保存される。zcytor17受容体アンタゴニストは、zcytor17ligヘリックスD内の突然変異を通して企画され得る。それらは、残基Thr156（配列番号2）からのタンパク質の切断、又は受容体へのリガンドの結合を付与するが、しかしシグナル活性を低める残基の保存を包含することができる。

【0094】

4-ヘリカル束サイトカインはまた、それらの成分ヘリックスの長さにより分類される。“長い-ヘリックス”形のサイトカインは一般的に、24～30個の残基のヘリックスから成り、そしてIL-6、纖毛好中球因子（CNTF）、白血病阻害因子（LIF）及びヒト成長ホルモン（hGH）を包含する。“短い-ヘリックス”形のサイトカインは一般的に、18～21個の残基のヘリックスから成り、そしてIL-2、IL-4及びGM-CSFを包含する。zcytor17ligは、短い-ヘリックス形のサイトカイングループの新規メンバーであると思われる。CNTF及びIL-6を用いての研究は、CNTFヘリックスがIL-6における相当のヘリックスにより交換され得、キメラにCTNF-結合性質を付与することを示した。

【0095】

従って、4-ヘリカルサイトカインの機能的ドメインが配列同一性に関係なく、構造的相同性に基づいて決定され、そしてキメラにおいて機能的に組み込みを維持することができると思われる（Kallenなど、J. Biol. Chem. 274: 11859-11867, 1999）。従って、zcytor17ligのヘリカルドメインは、受容体結合特異性を決定し、そして調節するために他の短い-ヘリックス形のサイトカインを有するキメラ融合分子を調製するために有用であろう。本発明はまた、ヘリックスA及び/又はヘリックスDにより構築された融合タンパク質、及び他の短い形のサイトカイン、IL-2、IL-4、IL-15、Lif、IL-12、IL-3及びGM-CSFからのヘリカル及びループドメインを組合す融合タンパク質を構想する。

【0096】

ヒトIL-2についてのポリヌクレオチド配列は、配列番号176で示され、そしてその対応するアミノ酸配列は配列番号177で示される。分泌シグナル配列は、配列番号177のアミノ酸残基1（Met）～20（Ser）（配列番号176のヌクレオチド48～107）から構成される。成熟ポリペプチドは、配列番号177のアミノ酸残基21（Ala）～156（Thr）（配列番号176のヌクレオチド108～515）から構成される。ヒトIL-2のヘリックスAは、配列番号177のアミノ酸残基27（Thr）～48（Leu）（配列番号176のヌクレオチド126～191）から構成される。ヒトIL-2のヘリックスBは、ヘリックスB1及びヘリックスB2を含んで成る。ヒトIL-2のヘリックスB1は、配列番号177のアミノ酸残基73（Ala）～80（Gln）（配列番号176のヌクレオチド264～287）から構成される。

【0097】

ヒトIL-2のヘリックスB2は、配列番号177のアミノ酸残基83（Glu）～92（Val）（配列番号176のヌクレオチド294～323）から構成される。従って、IL-2のヘリックスB（ヘリックスB1及びB2を含んで成る）は、配列番号183のアミノ酸配列（配列番号182のヌクレオチド配列）により示され、ここでアミノ酸残基9及び10はいずれのアミノ酸でもあり得る。配列番号183は、配列番号177のアミノ酸73（Ala）～92（Val）と同一であり、ここで

10

20

30

40

50

アミノ酸81及び82はいずれのアミノ酸であっても良い。好ましい形においては、IL-2のヘリックスBは、配列番号177のアミノ酸73(Ala)～92(Val)(配列番号176のヌクレオチド264～323)を含んで成る。ヒトIL-2のヘリックスCは、配列番号177のアミノ酸残基102(His)～116(Val)(配列番号177のアミノ酸残基134(Thr)～149(Gln)(配列番号176のヌクレオチド447～494)から構成される。

【0098】

ヒトIL-4についてのポリヌクレオチド配列は、配列番号178で示され、そしてその対応するアミノ酸配列は配列番号179で示される。分泌シグナル配列は、配列番号179のアミノ酸残基1(Met)～24(Gly)(配列番号178のヌクレオチド64～135)から構成される。成熟ポリペプチドは、配列番号179のアミノ酸残基25(His)～153(Ser)(配列番号178のヌクレオチド136～522)から構成される。ヒトIL-4のヘリックスAは、配列番号179のアミノ酸残基30(Thr)～42(Thr)(配列番号178のヌクレオチド151～189)から構成される。ヒトIL-4のヘリックスBは、配列番号179のアミノ酸残基65(Glu)～83(His)(配列番号178のヌクレオチド256～312)から構成される。ヒトIL-4のヘリックスCは、配列番号179のアミノ酸残基94(Ala)～118(Ala)(配列番号178のヌクレオチド343～417)から構成される。ヒトIL-4のヘリックスDは、配列番号179のアミノ酸残基133(Leu)～151(Cys)(配列番号178のヌクレオチド460～516)から構成される。

【0099】

ヒトGM-CSFについてのポリヌクレオチド配列は、配列番号180で示され、そしてその対応するアミノ酸配列は配列番号181で示される。分泌シグナル配列は、配列番号181のアミノ酸残基1(Met)～17(Ser)(配列番号180のヌクレオチド9～59)から構成される。成熟ポリペプチドは、配列番号181のアミノ酸残基18(Ala)～144(Glu)(配列番号180のヌクレオチド60～440)から構成される。ヒトGM-CSFのヘリックスAは、配列番号181のアミノ酸残基30(Trp)～44(Asn)(配列番号180のヌクレオチド96～140)から構成される。ヒトGM-CSFのヘリックスBは、配列番号181のアミノ酸残基72(Leu)～81(Gln)(配列番号180のヌクレオチド222～251)から構成される。ヒトGM-CSFのヘリックスCは、配列番号181のアミノ酸残基85(Gly)～103(Gln)(配列番号180のヌクレオチド261～317)から構成される。ヒトGM-CSFのヘリックスDは、配列番号181のアミノ酸残基120(Phe)～131(Leu)(配列番号180のヌクレオチド366～401)から構成される。

【0100】

ヒト $\text{zcytor17l}\text{ig}$, IL-3, IL-2, IL-4及びGM-CSFについて、ヘリックスA, B, C及びDを含んで成るアミノ酸残基が、表1に示される。

10

20

30

【表1】

表1:

	ヘリックスA	ヘリックスB	ヘリックスC	ヘリックスD	
zcytor17 lig	38-52	83-98	104-117	137-152	配列番号2の
IL-3	35-45	73-86	91-103	123-141	配列番号102の
IL-2	27-48	73-92	102-116	134-149	配列番号177の、又は配列番号183に記載されるようなヘリックスB
IL-4	30-42	65-83	94-118	133-151	配列番号179の
GM-CSF	30-44	72-81	85-103	120-131	配列番号181の

10

20

30

40

【0101】

本発明はまた、ポリヌクレオチド分子、例えばマルチマーサイトカイン受容体に包含され得る、本明細書に開示されるzcytor17ポリペプチドをコードするDNA及びRNA分子を提供する。当業者は、遺伝子コードの縮重の観点から、相当の配列変動がそれらのポリヌクレオチド分子間で可能であることを容易に認識するであろう。配列番号120、121及び122は、配列番号111、109及び5のzcytor17ポリペプチド、及びそのフラグメントをコードするすべてのDNAを包含する縮重DNA配列である。当業者はまた、配列番号120、121及び122の変性配列がUとTとを置換することによって、それぞれ、配列番号111、109及び5をコードするすべてのRNA配列も供給することを理解するであろう。

【0102】

従って、配列番号120のヌクレオチド1-2196、配列番号121のヌクレオチド1-1947及び配列番号122のヌクレオチド1-1986を含んで成るzcytor17ポリペプチド-コードのポリヌクレオチド及びそれらのRNA相当物は、本発明により包含される。表2は、縮重ヌクレオチド位置を示すために、配列番号120、121及び122内に使用される1文字コードを示す。“解”は、コード文字により示されるヌクレオチドである。“相補体”とは、相補的ヌクレオチドのためのコードを示す。例えば、コードYはC又はTのいずれかを示し、そしてその補体RはA又はGを示し、AはTに対して相補的であり、そしてGはCに対して相補的である。

【0103】

【表2】

表2

ヌクレオチド	解	相補体	解
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

10

20

30

【0104】

与えられたアミノ酸のためのすべての可能なコドンを包含する配列番号120、121及び122に使用される縮重コドンが表3に示される。

【表3】

表3

アミノ酸	1文字コード	コドン	縮重コドン
Cys	C	TGCTGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter		TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
任意	X		NNN

【0105】

当業者は、いくらかのあいまいさが、個々のアミノ酸をコードするすべての可能なコドンの代表である縮重コドンの決定において導入されることを理解するであろう。例えば、セリン(WSN)のための縮重コドンは、ある環境下で、アルギニン(AGR)をコードすることができ、そしてアルギニン(MGN)のための縮重コドンは、ある環境下で、セリン(GAY) 50

)をコードすることができる。類似する関係が、フェニルアラニン及びロイシンをコードするコドン間に存在する。従って、縮重配列により包含されるいくつかのポリヌクレオチドは、変異体アミノ酸配列をコードすることができるが、しかし当業者は、配列番号111、109及び5、又は117及び119のアミノ酸配列への参照によりそのような変異体配列を容易に同定することができる。変異体配列は、本明細書に記載のようにして官能性について容易に試験され得る。

【0106】

当業者はまた、異なった種が“選択的コドン使用法”を示すことも理解するであろう。一般的には、Granthamなど., Nuc. Acids Res. 8: 1893 - 912, 1980; Haas, など., Cur. Biol. 6: 315 - 24, 1996; Wain-Hobson, など., Gene 13: 355 - 64, 1981; Grosjean and Fiera, Gene 18: 199 - 209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14: 3075 - 87, 1986; Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573 - 97, 1982を参照のこと。本明細書において使用される場合、用語、“選択的コドン使用法”又は“選択的コドン”とは、一定の種の細胞に最も頻繁に使用され、従って個々のアミノ酸をコードする可能なコドンの1又は少数の代表を好むタンパク質翻訳コドンを言及する技術的用語である(表3を参照のこと)。

【0107】

例えば、アミノ酸トレオニン(Thr)は、ACA、ACC、ACG、又はACTによりコードされるが、しかし哺乳類細胞においては、ACCが最も通常に使用されるコドンであり；他の種においては、例えば昆虫細胞、酵母、ウィルス又は細菌においては、異なったThrコドンが好ましい。特定の種のための選択的コドンは、当業界において知られている種々の方法により、本発明のポリヌクレオチド中に導入され得る。例えば、組換えDNA中への選択的コドン配列の導入は、特定の細胞型又は種内でタンパク質の翻訳により効果的にすることによって、そのタンパク質の生成を増強する。従って、配列番号120、121及び122に開示される縮重コドン配列は、当業界において通常使用され、そして本明細書において開示される種々の細胞型及び種においてポリペプチドの発現を最適化するための鋳型として作用する。選択コドンを含む配列は、種々の種における発見について試験され、そして本明細書に開示される官能性について試験され得る。

【0108】

前で示されたように、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、DNA及びRNAを包含する。DNA及びRNAを調製するための方法は、当業界において良く知られている。一般的には、RNAは、多量のzcytor17 RNAを生成する組織又は細胞から単離される。そのような組織及び細胞は、ノザンプロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980)により同定され、そしてPBL、脾臓、胸腺、骨髄、前立腺、リンパ組織、ヒト赤白血病細胞系、急性单球白血病細胞系、他のリンパ球及び造血細胞系、及び同様のものを包含する。前記活性、又はRNA生成細胞又は組織が同定されると、全RNAは、グアニジウムHCl抽出、続くCsClグラジェントにおける遠心分離による単離により調製され得る(Chirgwinなど., Biochemistry 18: 52 - 94, 1979)。

【0109】

ポリ(A)⁺ RNAは、Aviv and Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408 - 1412, 1972)の方法を用いて全RNAから調製される。相補的DNA(cDNA)は、既知の方法を用いて、ポリ(A)⁺ RNAから調製される。他方では、ゲノムDNAが単離され得る。次に、zcytor17ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、例えばハイブリダイゼーション又はポリメラーゼ鎖反応(PCR)により同定され、そして単離される(Mullis, アメリカ特許第4,683,202号)。

【0110】

zcytor17をコードする十分な長さのクローンは、従来のクローニング方法により得られる。相補的DNA(cDNA)クローンが好ましいが、但し、いくつかの用途(例えば、トランスジェニック動物における発現)に関しては、ゲノムクローンを使用し、又は少なくとも1つのゲノムインtronを含むようcDNAクローンを修飾することが好ましい。cDNA及びゲノムクローンを調製するための方法は、よく知られており、そして当業者のレベルの範囲

10

20

30

40

50

内であり、そしてライプラリーをプロープし又は感作するために、本明細書に開示される配列又はその一部の使用を包含する。発現ライプラリーは、*zcyt017*、受容体フラグメント、又は他の特定の結合パートナーに対する抗体によりプロープされ得る。

【 0 1 1 1 】

本発明のポリヌクレオチドはまた、DNA合成機械を用いても合成され得る。現在、好ましい方法は、ホスホラミジット方法である。化学的に合成された二本鎖DNAが遺伝子又は遺伝子フラグメントの合成のために必要とされる場合、個々の相補的鎖が、別々に製造される。短い遺伝子(60~80bp)の生成は技術的に直接的であり、そして相補的鎖の合成及び続いて、それらのアニーリングにより達成され得る。しかしながら、より長いポリヌクレオチド(300bp以上)の生成に関しては、化学的DNA合成の間、個々のサイクルのカップリング効率はめったに100%でないので、特定の工程が通常使用される。この問題を解決するために、合成遺伝子(二本鎖)が、20~100個の長さのヌクレオチドである一本鎖フラグメントから調整形でアセンブルされる。10

【 0 1 1 2 】

十分な長さの遺伝子を調製するための他の手段は、特定組みのオーバーラップするオリゴヌクレオチド(40~100個のヌクレオチド)を合成することである。3'及び5'の短いオーバーラップする相補的領域(6~10個のヌクレオチド)がアニーリングされた後、大きなギャップが残存するが、しかし短い塩基対合された領域は、その構造体と一緒に維持するのに十分に長く且つ十分に安定性である。ギャップが満たされ、そしてDNA複合体がE.コリDNAポリメラーゼIによる酵素DNA合成により完結される。酵素合成の完結の後、ニックがT4 DNAリガーゼにより密閉される。二本鎖構造体は、DNA配列分析により確かめられる完全な遺伝子配列を形成するために、お互い連続的に連結される。Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA, (ASM Press, Washington, D.C. 1994); Itakuraなど., Annu. Rev. Biochem. 53: 323-56, 1984及びClimieなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 633-7, 1990を参照のこと。さらに、転写及び翻訳の正しい開始及び停止のためのシグナルを含む他の配列が一般的に付加される。20

【 0 1 1 3 】

本発明はまた、診断用途に使用される試薬を提供する。例えば、*zcyt017lig*遺伝子、すなわち*zcyt017lig* DNA又はRNA又はその副配列を含んで成るプロープは、*zcyt017lig*遺伝子がヒト染色体、例えば染色体12上に存在するかどうか、又は突然変異が生じたかどうかを決定するために使用され得る。*zcyt017lig*は染色体12の12q24.31領域に存在する(例13を参照のこと)。*zcyt017lig*遺伝子座での検出できる染色体異常型は、異数性、遺伝子コピー数変化、異種性の損失(LOH)、トランスロケーション、挿入、欠失、制限部位変更及び転位を包含するが、但しそれらだけには限定されない。30

【 0 1 1 4 】

これらの異常性は、コード配列内、イントロン内、又は上流のプロモーター及び調節領域を包含するフランкиング配列内で発生することができ、そしてコード配列内での物理的変更、又は遺伝子発現レベルでの変化として明らかである。そのような異常性は、分子遺伝学的技法、例えば制限フラグメント長さ多型現象(RELP)分析、PCR技法を用いる短いタンデム反復体(STR)分析、及び当業界において知られている他の遺伝子連鎖分析技法を用いることによって、本発明のポリヌクレオチドを用いて検出され得る(Sambrookなど., 前記; Ausubelなど., 前記; Marian, Chest 108: 255-65, 1995)。40

【 0 1 1 5 】

遺伝子位置の正確な知識は、次のような多くの目的のために有用である：1)配列が存在するコンティグの一部であるかどうかの決定及び種々の形、例えばYAC, BAC又はcDNAクローンにおける追加の周囲遺伝子配列の獲得；2)同じ染色体領域への結合を示す遺伝的な疾病についての可能な候補体遺伝子の提供；及び3)特定遺伝子が有する機能の決定を助けるモデル生物、例えばマウスの相互参照。

【 0 1 1 6 】

10

20

30

40

50

当業者は、12q24領域が時折、種々の癌に関連する全体的なゲノム転位、例えばトランスロケーション、欠失、逆位及び重複に包含されることを認識するであろう。インターネット上に位置する、the Mitelman Database of Chromosomal Aberrations in Cancer, at the Cancer Genome Anatomy Project, National Institutes of Health, Bethesda, Mdは、12q24を包含するゲノム転位を有する199の癌の症例を列挙する。それらのうち、ほとんどは、他の転位を有する複雑な核型の一部であり；しかしながら、いくつかの場合、12q24に関連する転位が、唯一のゲノム変更である。

【0117】

リンパ及び骨髄性系統の細胞上でのzcytor17ligのための受容体の発現が存在するなら、トランスロケーション（2つの症例：Yamagataなど.., Cancer Genet 114: 51-57, 1999 10）、又は重複（2つの症例：Bonamiなど.., Cancer Genet Cytogenet 108: 75-78, 1999）のいずれかが唯一のゲノム変更である、文献に報告される骨髄性白血病の少なくとも4つの症例が存在することを注目することは特に有意である。これは、12q24内に存在する遺伝子又は遺伝子類がそれらの患者の細胞の悪性形質転換に直接的に包含され得る。zcytor17ligの不適切な過剰発現は、オートクライイン又はパラクリン機構のいずれかを通して、受容体 - 担持の細胞の異常増殖を促進することによって、悪性形質転換に寄与する。

【0118】

従って、zcyto17lig活性の阻害が、そのような細胞の増殖を阻害する。他方では、zcyt17lig遺伝子の不活性化をもたらすゲノム転位は、zcytor17lig免疫調節機能を除くことによって、悪性形質転換及び/又は転移を促進することができる。実際、前立腺癌における転移を抑制する遺伝子は、12q24-qter上に位置づけられている（Ichikawaなど.., Asian J. Androl. 2: 167-171, 2000）。zcytor17ligが転移の抑制を担当するこの領域内の遺伝子である場合、zcytor17lig自体は、癌の処理において治療価値を有することができる。

【0119】

診断は、疾病のタイプ及び適切な関連する治療の決定において医者を助けることができるか、又は遺伝的カウンセリングを助けることができる。それ自体、本発明の抗-zcytor17lig抗体、ポリヌクレオチド及びポリペプチドは、zcytor17ligポリペプチド、mRNA又は抗-zcytor17lig抗体の検出のために使用され、従って当業界において知られており、そして本明細書において記載される方法を用いて、本明細書に記載されるようにして、遺伝的疾患又は癌の検出のためのマーカーとして作用し、そしてそのために直接的に使用される。

【0120】

さらに、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブは、ヒト疾患に関連する染色体12q24.3欠失及びトランスロケーション、又は悪性又は他の癌における染色体転位に関与することが予測される、腫瘍の悪性進行又は他の12q24.3突然変異に関与する他のトランスロケーションに関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。同様に、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブが、染色体12三染色体性、及びヒト疾患又は自然流産に関連する染色体欠失に関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。従って、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブは、それらの欠陥の関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。

【0121】

当業者は、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブが異種性の損失（LOH）、染色体獲得（例えば、トリソミー）、トランスロケーション、DNA増幅、及び同様のものに関連する全体的な染色体異常性の診断のために特に有用であることを認識するであろう。zcytor17lig遺伝子が位置する染色体遺伝子座12q24.3内でのトランスロケーションは、ヒト疾患に関連していることが知られている。例えば、12q24欠失及びトランスロケーション、重複及びトリソミーは、上記で論じられたような癌に関連している。従って、zcytor17lig遺伝子は、この決定的な領域に位置するので、本発明のzcytor17ligポリヌクレオチドプローブは、12q24トランスロケーション、欠失、トリソミー及び同様のものに関連する異常

10

20

30

40

50

性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。

【0122】

上記で論じられるように、*zcyt0r17lig*遺伝子自体における欠陥は、遺伝性ヒト疾病状態をもたらすことができる。本発明の分子、例えば本発明のポリペプチド、アンタゴニスト、アゴニスト、ポリヌクレオチド及び抗体は、*zcyt0r17lig*遺伝子欠陥に関連する疾病的検出、診断予防及び処理を助ける。さらに、*zcyt0r17lig*ポリペプチドプローブは、*zcyt0r17lig*染色体遺伝子座で、疾病又は非疾病の個人間での対立遺伝子差異を検出するために使用され得る。それ自体、*zcyt0r17lig*配列は、法的なDNAプロフィーリングにおける診断として使用され得る。

【0123】

一般的に、患者における遺伝子異常性又は異常型を検出するために遺伝子連鎖分析に使用される診断方法は、当業界において知られている。分析用プローブは一般的に、少なくとも20個の長さのntを有するが、但し幾分短いプローブも使用され得る（例えば、14 - 17 nt）。PCRプライマーは、少なくとも5個の長さのnt、好ましくは15又はそれ以上の長さのnt、より好ましくは20 - 30個の長さのntである。遺伝子又は染色体DNAの全体的な分析のために、*zcyt0r17lig*ポリヌクレオチドプローブは、完全なエキソン又はそれ以上を含むことができる。エキソンは、*zcyt0r17lig*配列（配列番号1）とマウス*zcyt0r17lig*についてのゲノムDNA（配列番号76）とを比較することによって、容易に決定される。一般的に、患者における遺伝子異常性又は異常型を検出するために遺伝子連鎖分析に使用される診断方法は、当業界に知られている。

10

20

30

40

【0124】

ほとんどの診断方法は、(i)潜在的に疾病の患者、疾病的患者又は劣性疾患対立遺伝子の可能性ある非疾病キャリヤーから遺伝子サンプルを得；(ii)*zcyt0r17lig*ポリヌクレオチドプローブと共に遺伝子サンプルをインキュベートすることにより（ここで、前記ポリヌクレオチドは、RFIP分析においては、相補的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするであろう）、又は適切なPCR反応条件下でPCR反応において、センス及びアンチセンスプライマーと共に遺伝子サンプルをインキュベートすることにより、第1反応生成物を生成し；(iii)前記第1反応生物を、電気泳動及び/又は他の既知方法により可視化し、例えば、前記第1反応生成物を、*zcyt0r17lig*ポリヌクレオチドプローブ（ここで、前記ポリヌクレオチドは第1反応の相補的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするであろう）により可視化し、そして(iv)正常又は対照の個人からの遺伝子サンプルの第2対照反応生成物と、前記可視化された第1反応生成物とを比較する段階を含んで成る。

【0125】

第1反応生成物と対照反応生成物との間の差異は、疾病又は潜在的に疾病的患者における遺伝子異常性の、又は非疾病患者についてのヘテロ接合性劣性キャリヤー表現型の存在の、又は疾病患者からの腫瘍における遺伝子欠陥の存在の、又は胎児又は移植前胚における遺伝子異常性の存在の表示である。例えば、制限フラグメントパターン、PCR生成物の長さ、*zcyt0r17lig*遺伝子座の反復性配列の長さ、及び同様のもの差異は、遺伝子異常性、遺伝子異常型、又は正常な対照に比較しての対立遺伝子差異の表示である。対照は、サンプルの試験及び利用性に依存して、影響されていないファミリーメンバー又は無関係の個人からであり得る。本発明内への使用のための遺伝子サンプルは、患者からのいざれかの組織又は他の生物学的サンプル、例えば血液、唾液、精子、胚細胞、羊水及び同様のもの（但し、それらだけには限定されない）から単離されたゲノムDNA、mRNA及びcDNAを包含する。

【0126】

ポリヌクレオチドプローブ又はプライマーは、RNA又はDNAであり得、そして配列番号1の一部、配列番号1の補体、又はそれらのRNA同等物を含んで成る。ヒト疾患表現型への遺伝子連鎖分析を示すそのような方法は、当業界において良く知られている。診断における、PCRに基づく方法の参照のためには、一般的、次の文献を参照のこと：Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), PC

50

R Protocols; Current Methods and Applications (Humana Press, Inc, 1993), Cotter (ed), molecular Diagnosis of Cancer (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek and Walszek (eds.), Tumor Marker Protocols. (Humana Press, Inc. 1998). Lo (ed), Clinical Application of PCR (Humana Press, Inc. 1998), 及びMeltzer (ed), PCR in Bioanalysis (Humana Press. Inc. 1998))。

【0127】

zcyt0r17lig遺伝子座に関連する突然変異は、直接的名突然変異分析のための標準の方法、例えば制限フラグメント長さ他型現象分析、PCR技法を用いる短いタンデム反復体分析、増幅 - 不応性突然変異システム分析、一本鎖コンホメーション多型現象検出、RNアーゼ切断方法、変性グラジエントゲル電気泳動、蛍光 - 助力のミスマッチ分析、及び当業界において知られている他の遺伝子分析により、本発明の核酸分子を用いて検出され得る(例えは、Mathew (ed.), Protocols in Human Molecular Genetics (Humana Press. Inc. 1991), Marian, Chest 108 : 255 (1995), Coleman and Tsongalis, Molecular Diagnostics (Human Press, Inc. 1996), Elles (ed.) Morecular Diagnosis of Genetic Disease (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), Laboratory Protocols for Mutation Detection (Oxford University Press 1996), Burren など. (eds.), Genome Analysis, Vol. 2: Detecting Genes (Cold Spring Habor Laboratory Press 1998), Dracopoli など. (eds.), Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons 1998), 及びRichards and Ward, "Molecular Diagnostic Testing," in Principles of Molecular Medicine, Pages 83-88 (Humana Presa. Inc. 1998) を参照のこと)。

【0128】

突然変異についてのzcyt0r17lig遺伝子の直接的な分析は、対象のゲノムDNAを用いて行われ得る。末梢血液リンパ球から得られるゲノムDNAを増幅するための方法は、当業者に良く知られている(例えは、Dracopoliなど. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, at page 7.1.6 to 7.1.7 (John Wiley & Sons 1998) を参照のこと)。

【0129】

本発明はさらに、他の種(オルト体)からの相対物リガンド及びポリヌクレオチドを供給する。これらの種は、哺乳類、鳥類、両性類、ハ虫類、魚類、昆虫及び他の脊椎及び無脊椎動物種を包含するが、但しそれらだけには限定されない。特に興味あるものは、他の哺乳類種、例えはネズミ、ブタ、羊、ウシ、犬、ネコ、馬及び他の靈長類ポリペプチドからのzcyt0r17ポリペプチドである。ヒトzcyt0r17ポリペプチドのオルト体は、従来のクローニング技法と組合して、本発明により供給される情報及び組成物を用いてクローン化され得る。例えは、c DNAは、zcyt0r17を発現する組織又は細胞型から得られるm RNAを用いてクローン化され得る。m RNAの適切な源は、本明細書に開示される配列から企画されたプローブによりノザンプロットをプローブすることによって同定され得る。

【0130】

次に、ライプラリーが陽性の組織又は細胞系のm RNAから調製される。次に、オルト体のzcyt0r17-コードのc DNAが種々の方法、例えは完全な又は部分的なヒトc DNAにより、又は前記開示される配列に基づく1又は複数の変性プローブにより、プローブすることによって単離され得る。c DNAはまた、本明細書に開示される代表的なヒトzcyt0r17配列から企画されたプライマーを用いて、PCR (Mullis, 前記) を用いてもクローン化され得る。さらなる方法においては、c DNAライプラリーが宿主細胞を形質転換し、又はトランسفエクトするために使用され、そして興味あるc DNAの発現がzcyt0r17ポリペプチドに対する抗体により検出され得る。類似する技法がまた、ゲノムクローンの単離に適用され得る。

【0131】

ヒトzcyt0r17のマウスオルト体についてのポリヌクレオチド配列は、同定されており、そして配列番号116で示されており、そしてその対応するアミノ酸配列は、配列番号117で示される。配列番号116のDNA配列によりコードされるマウスzcyt0r17ポリペプチドの分析は、45個のアミノ酸残基(配列番号117の残基1(Met) ~ 残基45(Ala))の推定される

10

20

30

40

50

分泌シグナルペプチド及び617個のアミノ酸（配列番号117の残基46（Val）～残基662（Cys））の成熟ポリペプチドを含んで成る662個のアミノ酸（配列番号117）をコードする読み取り枠を示した。さらに、18個のアミノ酸残基（配列番号117の残基28（Met）～残基45（Ala））及び617個のアミノ酸の同じ成熟ポリペプチド（配列番号117の残基46（Val）～残基662（Cys））の第2の予測される分泌されるシグナルペプチドを含んで成る追加のMet残基、Met（28）が開始メチオニンとして使用され得る。

【0132】

配列番号117の残基224～228に対応するWSXWSモチーフ（配列番号3）の他に、受容体は、約200個のアミノ酸残基のサイトカイン-結合ドメイン（配列番号117の残基46（Val）～240（Pro））及びフィブロネクチンIIIドメイン（配列番号117の残基241（His）～533（Glu））を含む、配列番号117の残基46（Val）～533（Glu）の細胞外ドメイン；CXWモチーフ（配列番号117の残基66（Cys）～68（Trp））；ドメインリンカー（配列番号117の残基142（Thr）～145（Pro））；最後から2番目の鎖領域（配列番号117の残基207（Phe）～214（Arg））；トランスメンブランドメイン（配列番号117の残基534（Ile）～550（Ile））；“BoxI”シグナル部位（配列番号117の残基568（Cys）～574（Pro））、及び“BoxII”シグナル化部位（配列番号117の残基628（Glu）～631（Ile））を含む完全な細胞内シグナル化ドメイン（配列番号117の残基551（Lys）～662（Cys））を含んで成る。
10

【0133】

クラスIサイトカイン受容体に共通する保存された残基は、残基56（Cys）、187（Trp）及び215（Arg）で存在する。ヒト及びマウスアミノ酸配列の比較は、ヒト及びオルト体ボリペプチドの両者が上記の対応する構造特性を含むことを示す（図2を参照のこと）。マウスzcytor17についての成熟配列は、ヒト配列におけるAla₃₃（配列番号5に示されるような）に対応する、Val₄₆（配列番号117に示されるような）で開始する。
20

【0134】

配列番号5及び配列番号117に対応する全アミノ酸配列にわたって、マウス及びヒト配列間に約61%の同一性が存在する。上記の%同一性は、Ktup = 1、ギャップ開放ペナルティー = 12、ギャップ延長ペナルティー = 2及び置換マトリックス = BLOSUM62、並びにデフォールトとして設定される他のFASTAパラメーターを有するFASTAプログラムを用いて決定された。上記に記載されるマウスzcytor17ポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードする、その対応するポリヌクレオチドは、配列番号116に示される通りである。
30

【0135】

さらに、切断された可溶性形のマウスzcytor17受容体ポリペプチドは、天然において発現すると思われる。切断された可溶性形のマウスzcytor17受容体についてのポリヌクレオチド配列は、同定されており、そして配列番号118で示されており、そしてその対応するアミノ酸配列は、配列番号119で示される。配列番号118のDNA配列によりコードされる切断された可溶性形のマウスzcytor17ポリペプチドの分析は、45個のアミノ酸残基（配列番号119の残基1（Met）～残基45（Ala））の推定される分泌シグナルペプチド及び502個のアミノ酸（配列番号119の残基46（Val）～残基547（Val））の成熟ポリペプチドを含んで成る547個のアミノ酸をコードする読み取り枠を示した。
40

【0136】

さらに、18個のアミノ酸残基（配列番号119の残基28（Met）～残基45（Ala））及び502個のアミノ酸の同じ成熟ポリペプチド（配列番号119の残基46（Val）～残基547（Val））の第2の予測される分泌されるシグナルペプチドを含んで成る追加のMet残基、Met（28）が開始メチオニンとして使用され得る。配列番号119の残基224～228に対応するWSXWSモチーフ（配列番号3）の他に、受容体は、約200個のアミノ酸残基のサイトカイン-結合ドメイン（配列番号119の残基46（Val）～240（Pro））及びフィブロネクチンIIIドメイン（配列番号119の残基241（His）～533（Trp））を含む、配列番号119の残基46（Val）～533（Trp）の細胞外ドメイン；CXWモチーフ（配列番号119の残基66（Cys）～68（Trp））；ドメインリンカー（配列番号119の残基142（Thr）～145（Pro））；最後から2番目の

10

20

30

40

50

鎖領域（配列番号119の残基207（Phe）～215（Arg））；及びC-末端領域（残基551（Leu）～547（Val））を含んで成る。

【0137】

クラスIサイトカイン受容体に共通する保存された残基は、残基56（Cys）、187（Trp）及び215（Arg）で存在する。ヒト及びマウスアミノ酸配列、例えば切断された可溶性マウスzcytor17の比較は、ヒト及びオルト体ポリペプチドの両者が上記の対応する構造特性を含むことを示す（図2を参照のこと）。上記に記載される、切断された可溶性マウスzcytor17ポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードするその対応するポリヌクレオチドは、配列番号118に示される通りである。

【0138】

当業者は、配列番号110、108及び4に開示される配列がヒトzcytor17の単一の対立遺伝子を表し、そして対立遺伝子変動及び交互のスプライシングが生じることが予測されることを認識するであろう。この配列の対立遺伝子変異体は、標準の方法に従って、異なった個人からのcDNA又はゲノムライブラリーをプローブすることによってクローニングされ得る。配列番号110、108及び4に示されるDNA配列の対立遺伝子変異体、例えばサイレント突然変異を含むそれらの変異体及び突然変異がアミノ酸配列変更をもたらすそれらの変異体は、配列番号111、109、5、117又は119の対立遺伝子変異体であるタンパク質と同じように、本発明の範囲内である。

【0139】

zcytor17ポリペプチドの性質を保持する、もう1つのスプライスされたmRNAから生成されるcDNAは、そのようなcDNA及びmRNAによりコードされるポリペプチドと同じように、本発明の範囲内に包含される。それらの配列の対立遺伝子変異体及びスプライス変異体は、当業界において知られている標準の方法に従って、異なった個人又は組織からのcDNA又はゲノムライブラリーをプローブすることによってクローニングされ得る。例えば、上記の及び配列番号112及び113、又は配列番号114及び115での短形及び長形の可溶性zcytor17受容体は、zcytor17の対立遺伝子又はスプライス変異体であると思われる。

【0140】

本発明はまた、配列番号111、109又は5のポリペプチド、及びそれらのオルト体、例えば配列番号117及び119に対して実質的に類似する単離されたzcytor17ポリペプチドも提供する。用語“実質的に類似する”とは、配列番号111、109又は5に示される配列又はそれらのオルト体、例えば配列番号117及び119に対して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを示すために本明細書において使用される。そのようなポリペプチドは、より好ましくは、配列番号111、109及び5、又はそのオルト体に対して、少なくとも90%、及び最も好ましくは95%又はそれ以上同一であろう。

【0141】

%配列同一性は、従来の方法により決定される。例えば、Altschulなど., Bull. Math. Bio. 48 : 603 - 616, 1986及びHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 - 10919, 1992を参照のこと。手短に言及するば、2種のアミノ酸配列が、10のギャップ開始ペナルティー、1のギャップ拡張ペナルティー、及び表3（アミノ酸は標準の1文字コードにより示される）に示されるようなHenikoff and Henikoff（前記）の“blosum 62”評点マトリックスを用いて、その整合評点を最適化するために整合される。次に、%同一性が次のようにして計算される：

【0142】

10

20

30

40

【数1】

〔同一の適合の合計数〕

 $\times 100$

[長い方の配列の長さ + 2つの配列
を整合させるために長い方の配列
に導入されるギャップの数]

10

【0 1 4 3】

【表4】

表4

A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																		
R	-1	5																	
N	-2	0	6																
D	-2	-2	1	6															
C	0	-3	-3	-3	9														
Q	-1	1	0	0	-3	5													
E	-1	0	0	2	-4	2	5												
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6											
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8										
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4									
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4								
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5							
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5						
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6					
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7				
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4			
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11	
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1

【0 1 4 4】

ポリヌクレオチド分子の配列同一性は、上記に開示されるような割合を用いて、類似する方法により決定される。

当業者は、2種のアミノ酸配列を整列するために多くの確立されたアルゴリズムが存在することを理解している。Pearson and Lipmanの“FASTA”類似性調査アルゴリズムは、本明細書に開示されるアミノ酸配列及び推定上の変異体zcytor17のアミノ酸配列により共

50

有される同一性のレベルを試験するための適切なタンパク質整列方法である。前記FASTAアルゴリズムは、Pearson and Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), 及びPearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990) により記載される。

【0145】

手短には、FASTAがまず、問題の配列（例えば、配列番号111、109、5、117、及び119）及び保存性アミノ酸置換、挿入又は欠失を考慮しないで、最高密度の同一性（ktup変数が1である場合）又は対の同一性（ktup=2である場合）のいずれかを有する試験配列により共有される領域を同定することによって配列を特徴づける。次に、最高密度の同一性を有する10の領域が、アミノ酸置換マトリックスを用いて、すべての対合されたアミノ酸の類似性を比較することによって再評価され、そして前記領域の末端が、最高の評点に寄与するそれらの残基のみを含むよう“整えられる”。 “カットオフ”値（配列の長さ及びktup値に基づいて予定された式により計算される）よりも高い評点を有するいくつかの領域が存在する場合、その整えられた初期領域が、その領域がギャップとのおおよその一列配列を形成するために結合され得るかどうかを決定するために試験される。

【0146】

最終的に、2種のアミノ酸配列の最高評点領域が、アミノ酸挿入及び欠失を可能にする、Needleman-Wunschアルゴリズム（Needleman and Winsch, J. Mol. Biol. 48: 444, 1970; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787, 1974）の変法を用いて整列される。FASTA分析のための例示的なパラメーターは次のものである：ktup = 1、ギャップ開始ペナルティー = 10、ギャップ拡張ペナルティー = 1 及び置換マトリックス = BLOSUM62。それらのパラメーターは、Appendix 2 of Pearson, 1990（前記）に説明されるように、評点マトリックスを調節することによってFASTAプログラム中に導入され得る。

【0147】

FASTAはまた、上記に開示されるような割合を用いて、核酸分子の配列同一性を決定するためにも使用され得る。ヌクレオチド配列比較のためには、ktup値は、誤りとして設定される他のFASTAパラメーターを伴って、1～6、好ましくは3～6、最も好ましくは3であり得る。

【0148】

BLOSUM62表（表4）は、関連するタンパク質の500以上のグループの高く保存された領域を表す、タンパク質配列セグメントの約2,000の局部の複数整列に由来するアミノ酸置換マトリックスである [Henikoff and Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992)]。従って、BLOSUM62置換頻度は、本発明のアミノ酸配列中に導入され得る保存性アミノ酸置換を定義するために使用され得る。化学的性質に基づいてのみアミノ酸置換を企画することが可能であるが（上記のように）、用語“保存性アミノ酸置換”とは、-1よりも大きなBLOSUM62値により表される置換を言及する。例えば、アミノ酸置換は、その置換が0, 1, 2又は3のBLOSUM62値により特徴づけられる場合、保存性である。このシステムによれば、好ましい保存性アミノ酸置換は、少なくとも1（例えば、1, 2又は3）のBLOSUM62値により特徴づけられ、ところがより好ましくは保存性置換は、少なくとも2（例えば、2又は3）のBLOSUM62値により特徴づけられる。

【0149】

変異体zcytor17ポリペプチド又は実質的に相同のzcytor17ポリペプチドは、1又は複数のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するものとして特徴づけられる。それらの変化は、好ましくは、保存性アミノ酸置換（表5を参照のこと）及びタンパク質及びポリペプチドの折りたたみ又は活性に実質的に影響を及ぼさない他の置換；小さな欠失、典型的には1～約30個のアミノ酸の欠失；及び小さなアミノ-又はカルボキシル-末端の延長、例えばアミノ-末端メチオニン残基、約20～25個までの残基の小さなリンカーペプチドの延長、又は親和性標識の延長である。従って、本発明は、配列番号111、109、5、117又は119のその対応する領域（標識、延長、リンカー配列及び同様のものを除く）に対して80%、好ましくは少なくとも90%、及びより好ましくは95%又はそれ以上の同一性を有する配列を含んで成るポリペプチドを包含する。親和性標識を含んで成るポリペプチドはさらに、zcyt

10

20

30

40

50

or17ポリペプチドと親和性標識との間にタンパク質分解部位を含む。好ましいそのような部位は、トロンビン分解部位及び第Xa因子分解部位を含む。

【0150】

【表5】

表5

保存的アミノ酸置換

塩基性 :	アルギニン
	リシン
	ヒスチジン
酸性 :	グルタミン酸
	アスパラギン酸
極性 :	グルタミン
	アスパラギン
疎水性 :	ロイシン
	イソロイシン
	バリン
芳香族 :	フェニルアラニン
	トリプトファン
	チロシン
小さな :	グリシン
	アラニン
	セリン
	トレオニン
	メチオニン

10

20

30

40

【0151】

本発明は、配列番号111、109又は5と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチド、及び少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部を含んで成る、単離されたマルチマーサイトカイン受容体を提供し、ここで前記マルチマーサイトカイン受容体は配列番号2の少なくとも一部に結合する。配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドは、例えば配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227、配列番号519のアミノ酸残基20～アミノ酸残基227、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基543、配列番号111のアミノ酸残基544～アミノ酸残基732、配列番号109のアミ

50

ノ酸残基544～アミノ酸残基649、配列番号111のアミノ酸残基20～アミノ酸残基732、配列番号109のアミノ酸残基20～アミノ酸残基649及びそれらの組合せを含むことができる。少なくとも1つのクラスIサイトカインの少なくとも一部は、例えばOSMR（配列番号7）及び/又はWSX-1（配列番号9）を含む。

【0152】

例えば、配列番号7の少なくとも一部を含んで成る少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部は、配列番号7のアミノ酸残基35～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基35～アミノ酸残基137、配列番号7のアミノ酸残基240～アミノ酸残基342、配列番号7のアミノ酸残基348～アミノ酸残基429、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基739、配列番号7のアミノ酸残基28～アミノ酸残基761、配列番号7のアミノ酸残基762～アミノ酸残基979及び/又はそれらの組合せを含んで成る。マルチマーサイトカイン受容体は、ヘテロダイマー、トリマー、テトラマー、ペントマー又は同様のものであり得る。10

【0153】

さらに、マルチマーサイトカイン受容体は、可溶性であり、固体支持体上に固定されるか、又は膜結合され得る。任意には、マルチマーサイトカイン受容体は、配列番号2の活性を拮抗し、例えば造血、免疫及び/又は炎症細胞の増殖を阻害するか又は低め、又は造血、免疫及び/又は炎症工程の増強を阻害するか又は低め、又は造血細胞、例えばリンパ細胞、例えば単球、マクロファージ及び/又はT細胞の増殖を阻害するか又は低めることができる。本発明のマルチマーサイトカイン受容体はまた、ポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Glu、物質P、FlagTMポリペプチド、ストレプタビジン結合ペプチド、及び免疫グロブリンFcポリペプチドの群から選択された親和性標識を含んで成る。20

【0154】

本発明は、配列番号2の少なくとも一部を含むポリペプチド；及び配列番号111、109、7及び9の群から選択された少なくとも1つのポリペプチドの少なくとも1部を含んで成る可溶性マルチマーサイトカイン受容体を含んで成るリガンド/受容体複合体を提供し、ここで前記ポリペプチドは前記可溶性マルチマーサイトカイン受容体に結合される。可溶性マルチマーサイトカイン受容体は、zcceptor17（配列番号111）、OSMR（配列番号7）及び/又はWSX-1（配列番号9）の細胞外ドメイン及び/又はトランスメンブランドメインを含んで成ることができる。30

【0155】

例えば、可溶性マルチマーサイトカイン受容体は、配列番号111のアミノ酸残基20～227、配列番号111のアミノ酸残基20～519、配列番号111のアミノ酸残基20～543、配列番号111のアミノ酸残基28～739、配列番号111のアミノ酸残基28～429、配列番号111のアミノ酸残基35～137、配列番号111のアミノ酸残基240～342、配列番号111のアミノ酸残基348～429又はそれらの組合せを含んで成る。可溶性マルチマーサイトカイン受容体は、ヘテロダイマー、トリマー、テトラマー、ペントマー又は同様のものであり得る。本発明のマルチマーサイトカイン受容体はまた、本明細書に記載されるような親和性標識も含んで成る。リガンド/受容体複合体のポリペプチドは、アミノ酸残基38～152、27～164、24～164、1～164、38～52、83～98、104～117、137～152、及びそれらの組合せの群から選択された、配列番号2のアミノ酸残基を含んで成る。40

【0156】

本発明のリガンド/受容体複合体はまた、融合体タンパク質も含んで成る。この融合体タンパク質は少なくとも4種のポリペプチドを含んで成り、ここでN-末端からC-末端の方へのポリペプチドの順序は、配列番号2のアミノ酸残基38～52を含んで成る第1ポリペプチド；6～27個のアミノ酸残基第1スペーサー；（a）配列番号183のIL-2ヘリックスB残基；（b）配列番号179のIL-4ヘリックスB残基65～83；（c）配列番号102のIL-3のヘリックスB残基73～86；（d）配列番号181のGM-CSFヘリックスB残基72～81；及び（e）配列番号2のアミノ酸残基83～98の群から選択されたアミノ酸残基を含んで成る第2ポ50

リペプチド；5～11個のアミノ酸残基の第2スペーサー；(a)配列番号177のIL-2ヘリックスC残基102～116；(b)配列番号179のIL-4ヘリックスC残基94～118；(c)配列番号102のIL-3ヘリックスC残基91～103；(d)配列番号181のGM-CSFヘリックスC残基85～103；及び(e)配列番号2のアミノ酸残基104～117の群から選択されたアミノ酸残基を含んで成る第3ポリペプチド；3～29個のアミノ酸残基の第3スペーサー；及び(a)配列番号177のIL-2ヘリックスD残基134～149；(b)配列番号102のIL-3ヘリックスD残基123～141；(c)配列番号179のIL-4ヘリックスD残基133～151；(d)配列番号181のGM-CSFヘリックスD残基120～131；及び(e)配列番号2のアミノ酸残基137～152の群から選択されたアミノ酸残基を含んで成る第4ポリペプチド；及び配列番号111、109、7及び9の群から選択された少なくとも1つのポリペプチドの少なくとも一部を含んで成るマルチマーサイトカイン受容体であり、ここで前記融合体タンパク質は前記マルチマーサイトカイン受容体に結合される。

【0157】

他方では、融合体タンパク質は少なくとも4種のポリペプチドを含んで成り、ここでN-末端からC-末端の方へのポリペプチドの順序は、(a)配列番号177のIL-2ヘリックスA残基27～48；(b)配列番号179のIL-4ヘリックスA残基30～42；(c)配列番号102のIL-3のヘリックスA残基35～45；(d)配列番号181のGM-CSFヘリックスA残基30～44；及び(e)配列番号2のアミノ酸残基38～52の群から選択されたアミノ酸残基を含んで成る第1ポリペプチド；6～27個のアミノ酸残基の第1スペーサー；(a)配列番号183のIL-2ヘリックスB残基；(b)配列番号179のIL-4ヘリックスB残基65～83；(c)配列番号102のIL-3ヘリックスB残基73～86；(d)配列番号181のGM-CSFヘリックスB残基72～81；及び(e)配列番号2のアミノ酸残基83～98の群から選択されたアミノ酸残基を含んで成る第2ポリペプチド；5～11個のアミノ酸残基の第2スペーサー；(a)配列番号177のIL-2ヘリックスC残基102～116；(b)配列番号179のIL-4ヘリックスC残基94～118；(c)配列番号102のIL-3ヘリックスC残基91～103；(d)配列番号181のGM-CSFヘリックスC残基85～103；及び(e)配列番号2のアミノ酸残基104～117の群から選択されたアミノ酸残基を含んで成る第3ポリペプチド；及び配列番号2のアミノ酸残基137～152を含んで成る第4ポリペプチド；及び配列番号111、109、7、及び9の群から選択された少なくとも1つのポリペプチドの少なくとも1つを含んで成るマルチマーサイトカイン受容体であり、ここで前記融合体タンパク質は前記マルチマーサイトカイン受容体に結合される。マルチマーサイトカイン受容体は、配列番号111、109、7、9、又はその細胞外ドメインの次のポリペプチドの少なくとも1つを含んで成る。前記リガンド/受容体複合体は可溶性であり、そしてさらに、本明細書に記載される親和性標識を包含する。

【0158】

本発明はまた、配列番号111、109又は5と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドをコードする、単離され、そして精製されたポリヌクレオチドを提供し、ここで前記ポリペプチド、及び少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部がマルチマーサイトカイン受容体を形成し、そして前記マルチマーサイトカイン受容体が配列番号2の少なくとも一部に結合する。本発明はまた、少なくとも1つの配列番号111、109、又は5の少なくとも一部を含んで成るポリペプチドをコードする、単離され、そして精製されたポリヌクレオチドも提供し、ここで前記ポリペプチド、及び少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部がマルチマーサイトカイン受容体を形成し、そして前記マルチマーサイトカイン受容体が配列番号2の少なくとも一部に結合する。

【0159】

前記ポリヌクレオチドは、可溶性マルチマーサイトカイン受容体に包含され、そしてまた、本明細書に記載されるような親和性標識を包含するポリペプチドをコードすることができる。前記ポリペプチドは例えば、配列番号111のアミノ酸残基20～227、配列番号111のアミノ酸残基20～519、配列番号111のアミノ酸残基20～543、及び/又はそれらの組合せを含んで成る。さらに、少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部

10

20

30

40

50

は、例えば配列番号7のアミノ酸残基28~739、配列番号7のアミノ酸残基28~429、配列番号7のアミノ酸残基35~137、配列番号7のアミノ酸残基240~342、配列番号7のアミノ酸残基348~429、及び/又はそれらの組合せを含んで成ることができる。

【0160】

可溶性マルチマーサイトカイン受容体は、ヘテロダイマー、トリマー、テトラ、ペンタマー又は同様のものであり得る。前記配列番号2の少なくとも一部は、アミノ酸残基38~152、27~164、24~164、1~164、38~52、83~98、104~117、137~152、及びそれらの組合せの群から選択された、配列番号2のアミノ酸残基を含んで成る。任意には、マルチマーサイトカイン受容体は、本明細書に記載されるような配列番号2の活性を拮抗することができる。

10

【0161】

本発明はさらに、種々の他のポリペプチド融合体、及び1又は複数のポリペプチド融合体を含んで成る関連するマルチマータンパク質を提供する。例えば、zcytor17ポリペプチドは、アメリカ特許第5,155,027号及び第5,567,584号に開示されるようなダイマータンパク質への融合として調製され得る。それに関しての好ましいダイマータンパク質は、免疫グロブリン不变領域ドメインを包含する。免疫グロブリン-zcytor17ポリペプチド融合体は、種々のマルチマーゼzcytor17類似体を生成するために、遺伝子的に構築された細胞において発現され得る。補助ドメインは、特定の細胞、組織又は高分子(例えば、コラーゲン)に対してそれらを標的化するためにzcytor17ポリペプチドに融合され得る。zcytor17ポリペプチドは、複数の成分、例えば精製のための親和性標識及び標的化ドメインに融合され得る。

20

【0162】

ポリペプチド融合はまた、特にドメイン間に、1又は複数の切断部位を含むことができる。Tuanなど., Connective Tissue Research 34: 1-9, 1996を参照のこと。例えば、zcytor17可溶性受容体からの1又は複数のドメインは、それらの生物学的性質又は生成効率を増強できる可溶性サイトカイン受容体、例えばOSMR 及び/又はWSX-1に連結され得る。さらに、可溶性マルチマーサイトカイン受容体はさらに、親和性標識を包含することができる。親和性標識は、例えば、ポリヒスチジン、プロテインA、グルタチオンSトランスフェラーゼ、Glu-Glu、物質P、FlagTM ポリペプチド、ストレプタビジン結合ペプチド、及び免疫グロブリンFcポリペプチドの群から選択された標識であり得る。

30

【0163】

本発明のタンパク質はまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含んで成る。天然に存在しないアミノ酸は、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、アロ-トレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシエチルシスティン、ヒドロキシエチルホモシスティン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピベコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、3-及び4-メチルプロリン、3,3-ジメチルプロリン、tert-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、及び4-フルオロフェニルアラニンを包含する。

40

【0164】

天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質中に導入するためのいくつかの方法が当業界において知られている。例えばナンセンス突然変異が化学的にアミノアシリ化されたサプレッサーtRNAを用いて抑制されるインビトロシステムが使用され得る。アミノ酸を合成し、そしてtRNAをアミノアシリ化するための方法は、当業者において知られている。ナンセンス突然変異を含むプラスミドの転写及び翻訳は、E.コリS30抽出物及び市販の酵素及び他の試薬の含んで成る細胞フリーシステムにおいて実施される。タンパク質は、クロマトグラフィーにより精製される。

【0165】

例えば、Rovertsonなど., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellmanなど., Meth. Enzymol. 202: 301, 1991; Chungなど., Science 259: 806-09, 1993; 及びChungなど.,

50

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145 - 49, 1993を参照のこと。第2の方法においては、翻訳は、突然変異誘発されたmRNA及び化学的にアミノアミル化されたサプレッサ-tRNAのマイクロインジェクションによりアフリカツメガエル卵母細胞において行われる(Tucatttiなど., J. Biol. Chem. 271: 1991 - 98, 1996)。

【0166】

第3の方法においては、E.コリ細胞が、置換される予定である天然のアミノ酸（例えば、フェニルアラニン）の不在下で及び所望する天然に存在しないアミノ酸（例えば、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン又は4-フルオロフェニルアラニン）の存在下で培養される。天然に存在しないアミノ酸は、その天然の相対物の代わりにタンパク質中に導入される。Koideなど., Biochem. 33: 7470 - 46, 1994を参照のこと。天然に存在するアミノ酸残基は、インビトロ化学的に修飾により天然に存在しない種に転換され得る。化学的修飾は、置換の範囲をさらに拡張するために特定部位の突然変異誘発と組み合わされ得る (Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395 - 403, 1993)。

限定された数の非保存性アミノ酸、遺伝子コードによりコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、及び不自然なアミノ酸が、zcytor17アミノ酸により置換され得る。

【0167】

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸は、当業界において知られている方法、例えば特定部位の突然変異誘発又はアラニン-走査突然変異誘発により同定され得る (Cunningham and Wells, Science 244: 1081 - 1085, 1989; Bassなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4498 - 502, 1991)。後者の技法においては、単一のアラニン突然変異が分子中のあらゆる残基で導入され、そして得られる変異体分子が、前記分子の活性に対して決定的であるアミノ酸残基を同定するために、下記に開示されるようして、生物学的活性（例えば、リガンド結合及びシグナルransダクション）について試験される。また、Hiltonなど., J. Biol. Chem. 271: 4699 - 5708, 1996を参照のこと。

【0168】

リガンド-受容体相互作用の部位はまた、推定上の接触部位アミノ酸の突然変異に関して、核磁気共鳴、結晶学、電子回折又は光親和性ラベリングのような技法により決定され得る。例えば、de Vosなど., Science 255: 306 - 312, 1992; Smithなど., J. Mol. Biol. 224: 899 - 904, 1992; Wlodaverなど., FEBS Lett. 309: 59 - 64, 1992を参照のこと。必須アミノ酸の同一性は、関連する受容体による相同体の分析からも推定され得る。

【0169】

構造統合性の維持に対して決定的である領域又はドメイン内に存在するアミノ酸残基の決定が行われ得る。それらの領域内で、多かれ少なかれ、変化に耐性であり、そして分子の全体的な三次構造を維持するであろう特定の残基を決定することができる。配列構造を分析するための方法は、高いアミノ酸又はスクレオチド同一性を有する複数配列の一列整列、及び利用できるソフトウェア（例えば、the Insight II（商標）viewer and hmolology modeling tools; MSI, San Diego, CA）、二次構造性質、二元パターン、相補的パッケージング及び埋もれた極性相互作用を用いてのコンピューター分析を包含するが、但しそれらだけには限定されない (Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5:372-376, 1995 及び Cordesなど., Current Opin. Struct. Biol. 6: 3-10, 1996)。一般的に、分子への修飾を企画するか又は特定のフラグメントを同定する場合、構造の決定は、修飾された分子の活性を評価することによって付随されるであろう。

【0170】

アミノ酸配列の変更が、生物学的活性に対して必須である高次構造体の破壊を最少にするためにzcytor17ポリペプチドにおいて行われる。例えば、zcytor17ポリペプチドが1又は複数のヘリックスを含む場合、アミノ酸残基の変更が、分子のヘリックス幾何学的及び他の成分を破壊しないよう行われ、ここでコンホーメーションの変化が、いくらかの決定的な機能、例えば分子の、その結合パートナー、例えばA及びDヘリックス、すなわち配列番

号2の残基44、47及び135への結合を妨害する。アミノ酸配列の変更の効果は、例えば上記に開示されるようなコンピューター・モデルにより予測され得、又は結晶構造の分析により決定され得る(例えば、Lapthornなど., Nat. Struct. Biol. 2: 266-268, 1995)。

【0171】

当業界において良く知られている他の技法は、標準の分子(例えば、生来のタンパク質)と変異体タンパク質の折りたたみを比較する。例えば、変異体及び標準の分子におけるシステインパターンの比較が行われ得る。質量分光及び還元及びアルキル化を用いての化学的修飾は、ジスルフィド結合に関連するか又はそのような関連を有さないシステイン残基を決定するための方法を提供する(Beanなど., Anal. Biochem. 201: 216-226, 1992; Gray, Protein Sci. 2: 1732-1748, 1993: 及びPattersonなど., Anal. Chem. 66: 3727-3732, 1994)。

【0172】

一般的に、修飾された分子が標準の分子と同じジスルフィド結合パターンを有さない場合、折りたたみが影響を及ぼされると思われる。折りたたみを測定するためのもう1つの良く知られており、且つ許容できる方法は、円二色性(CD)である。修飾された分子及び標準の分子により生成されるCDスペクトルの測定及び比較は、通常のことである(Johnson, Protein 7:205-214, 1990)。結晶学は、折りたたみ及び構造を分析するためのもう1つの良く知られた方法である。核磁気共鳴(NMR)、消化ペプチドマッピング及びエピトープマッピングはまた、タンパク質とポリペプチドとの間の折りたたみ及び構造的類似性を分析するための既知方法でもある(Schaananなど., Science 257: 961-964, 1992)。

【0173】

配列番号2、46、54、57及び93に示されるようなzcytor17タンパク質配列のHopp/Woods親水性プロフィールが生成され得る(Hoppなど., Proc Natl. Acad. Sci. 78: 3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88: 1-18, 1986及びTriquierなど., Protein Engineering 1: 153-169, 1998)。図1を参照のこと。前記プロフィールは、スライドする6-残基窓(sliding six-residue window)に基づかれている。埋もれたG, S及びT残基及び暴露されたH, Y及びW残基は無視された。例えば、zcytor17ポリペプチドにおいては、親水性領域は、配列番号2及び46のアミノ酸残基43~48(配列番号54の残基56~61);配列番号2及び46のアミノ酸残基157~162(配列番号54の残基170~175);配列番号2及び46のアミノ酸残基158~163(配列番号54の残基171~176);配列番号2及び46のアミノ酸残基221~226(配列番号54の残基234~239);及び配列番号2及び46のアミノ酸残基426~431(配列番号54の残基439~444)を包含する。

【0174】

当業者は、親水性又は疎水性が、全体的な構造及び生物学的プロフィールを破壊しないよう、zcytor17ポリペプチドのアミノ酸配列における修飾を企画する場合、考慮されるであろうことを認識するであろう。Val, Leu及びIleから成る群、又はMet, Gly, Ser, Ala, Tyr及びTrpから成る群から選択された疎水性残基の置換が特に興味の対象である。例えば、置換に耐性の残基は、配列番号2、46、54、57及び93に示されるような残基を包含する。システイン残基は、置換に対して比較的耐性であろう。

【0175】

必須アミノ酸の正体はまた、zcytor17ポリペプチドとの、クラスIサイトカイン受容体ファミリーメンバー間の配列類似性の分析から推定され得る。前に記載された“FASTA”分析のような方法を用いて、高い類似性の領域が、タンパク質ファミリー内に同定され、そして保存された領域のためのアミノ酸配列を分析するために使用される。構造に基づいて変異体ポリヌクレオチドを同定するためのもう1つのアプローチは、可能性ある変異体ポリヌクレオチドをコードする核酸分子が、上記で論じられたように、配列番号1、45又は53のヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズできるかどうかを決定することである。

【0176】

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸を同定する他の方法は、当業界において知

10

20

30

40

50

られている方法、例えば特定部位の突然変異誘発又はアラニン走査突然変異誘発である (Cunningham and Wells, Science 244: 1081 (1989); Bass など., Pro. Nat. Acad. Sci. USA 88: 4498 (1991); Coombs and Gorey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering", in Proteins. Analysis and Design, Angeletti (ed.), P. 259-311 (Academic Press, Inc. 1998))。後者の技法においては、単一のアラニン突然変異が分子におけるあらゆる残基で導入され、そして得られる変異体分子が、分子の活性に対して決定的であるアミノ酸残基を同定するために、下記に開示されるように、生物学的又は生化学的活性について試験される。また、Hiltonなど., J. Biol. Chem. 271: 4699 (1996) を参照のこと。

【0177】

10

本発明はまた、zcytor17ポリペプチドの機能的フラグメント、及びそのような機能的フラグメントをコードする核酸分子を包含するマルチマーサイトカイン受容体を包含する。本明細書において定義されるような、“機能的” zcytor17又はそのフラグメントは、その増殖又は分化活性により、特殊化された細胞機能を誘発し、又は阻害するその能力により、又は可溶性又は固定された抗 - zcytor17抗体、zcytor17リガンドに特異的に結合するその能力により特徴づけられる。さらに、機能的フラグメントはまた、シグナルペプチド、細胞内シグナルドメイン、及び同様のものを包含する。

【0178】

20

前に本明細書において記載されたように、zcytor17は、クラスIサイトカイン受容体構造により特徴づけられる。従って、本発明はさらに、(a) 本明細書に記載される細胞外ドメイン、サイトカイン - 結合ドメイン、又は細胞内ドメインを含んで成るポリペプチド分子；及び(b) 1又は複数のそれらのドメインを含んで成る機能的フラグメントを包含する融合タンパク質を提供する。融合タンパク質の他のポリペプチド部分は、もう1つのクラスIサイトカイン受容体、例えばgp130, LIF, IL-12, WSX-1, IL-2受容体 - サブユニット及び - 共通受容体 (すなわち、IL-3, IL-5及びGM-CSF受容体 - サブユニット) により、又は可溶性融合タンパク質の分泌を促進する非生来の及び/又は関連のない分泌シグナルペプチドにより寄与され得る。

【0179】

30

核酸分子の通常の欠失分析は、zcytor17ポリペプチドをコードする核酸分子の機能的フラグメントを得るために行われ得る。例示されるように、配列番号1、45又は53のヌクレオチド配列又はそのフラグメントを有するDNA分子は、一連の欠失を得るためにBal31ヌクレアーゼにより消化され得る。次に、それらのDNAフラグメントが正しい読み取り枠を整合して発現ベクター中に挿入され、そして発現されたポリペプチドが単離され、そしてzcytor17活性について、又は抗 - zcytor17抗体又はzcytor17受容体を結合する能力について試験される。エキソヌクレアーゼ消化のための1つの方法は、欠失を導入するためにオリゴヌクレオチド - 指図された突然変異誘発を使用し、又は所望するzcytor17フラグメントの生成を特定するために停止コドンを使用することである。他方では、zcytor17ポリヌクレオチドの特定のフラグメントは、ポリメラーゼ鎖反応を用いて合成され得る。

【0180】

40

機能的ドメインを同定するための標準の方法は、当業者に良く知られている。例えば、インターフェロンのいずれかの又は両末端での切断に対する研究が、Horisberger and Di Marco, pharmac. Ther. 66: 507 (1995) により要約されている。さらに、タンパク質の機能的分析のための標準技法は、例えばTreulterなど., Molec. Gen. Genet. 240: 113 (1993), Content など., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon", in Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), Pages 65-72 (Nijhoff 1987), Herschman, "The EGF Enzyme", in Control of Animal Cell Proliferation, Vol. 1, Boynton など., (eds.) pages 169-199 (Academic Press 1985), Counailleau など., J. Biol. Chem. 270: 29270 (1995); Fukunaga など., J. Biol. Chem. 270: 25291 (1995); Yamaguchi など., Biochem. Pharmacol. 50: 1295 (1995);

50

及びMeiselなど., Plant Molec. Biol. 30: 1 (1996)により記載される。

【0181】

複数アミノ酸置換は、突然変異誘発及びスクリーニングの既知方法、例えばReidhaar-Olson and Sauer (science 241: 53 - 57, 1988) 又はBowie and Sauer(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152 - 2156, 1989)により開示される方法を用いて行われ、そして試験される。手短に言及すれば、それらの著者は、ポリペプチドにおける複数の位置を同時ランダム化し、機能的ポリペプチドをスクリーンし、そして次に個々の位置での可能な置換の範囲を決定するために、突然変異誘発されたポリペプチドを配列決定するための方法を開示する。使用され得る他の方法は、ファージ表示（例えば、Lowmanなど., Biochem. 30 : 10832 - 10837, 1991; Ladnerなど., アメリカ特許第5,223,409号；Huse, WIPO公開WO 92 / 06204号）、及び領域 - 指図された突然変異誘発 (Derbyshireなど., Gene 46 : 145, 1986; Nerなど., DNA 7 : 127, 1988)を包含する。
10

【0182】

開示されるzcytor17 DNA及びポリペプチド配列の変異体は、Stemmer, Nature 370 : 389 - 91, 1994, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747 - 51, 1994及びWIPO公開WI97 / 20078により開示されるように、DNA シャフリングを通して生成され得る。手短に言及すれば、変異体DNA分子が、ランダムに導入された点突然変異をもたらす、親DNAのランダム断片化、続く、PCRを用いてのアセンブリーによるインピトロ相同組換えにより生成される。この技法は、前記工程中に追加の変動性を導入するために、親DNAのファミリー、例えば異なった種からの対立遺伝子変異体又はDNAを用いて改良され得る。所望する活性の選択又はスクリーニング、突然変異誘発及びアッセイの続くさらなる相互作用が、有害な変化に対して同時に選択しながら、所望する突然変異について選択することによって、配列の急速な“進化”を提供する。
20

【0183】

本明細書に開示されるような突然変異誘発方法は、宿主細胞におけるクローン化された突然変異誘発されたzcytor17受容体ポリペプチドの活性を検出するために高処理量の自動化されたスクリーニング方法と組み合わされ得る。これに関する好ましいアッセイは、下記に記載される、細胞増殖アッセイ及びバイオセンサー - 基づくりガンド - 結合アッセイを包含する。活性受容体又はその一部（例えば、又はリガンド - 結合フラグメント、シグナル化ドメイン及び同様のもの）をコードする突然変異誘発されたDNA分子が、宿主細胞から回収され、そしてすぐに、近代的装置を用いて配列され得る。それらの方法は、興味あるポリペプチドにおける個々のアミノ酸残基の重要性の急速な決定を可能にし、そして未知の構造のポリペプチドに適用され得る。
30

【0184】

本発明はまた、zcytor17の1又は複数の分泌、細胞外、トランスメンプラン及び細胞内ドメインの少なくとも1部を含んで成るセグメントが、もう1つのポリペプチド、例えばクラスIサイトカイン受容体、例えばOSMR 及び/又はWSX - 1の細胞外ドメイン融合されている新規マルチマーサイトカイン受容体を提供する。融合は好ましくは、組換え生成システムにおけるキメラ分子の発現を可能にするためにDNAレベルでスプライシングすることにより行われる。
40

【0185】

次に、得られる分子は、改良された溶解性、改良された安定性、延長されたクリアランス半減期、改良された発現及び分泌レベル、及び薬力学のような性質についてアッセイされる。そのようなマルチマーサイトカイン受容体はさらに、成分タンパク質又はポリペプチド間に追加のアミノ酸残基（例えば、ポリペプチドリンカー）を含むことができる。ドメインリンカーは、約3～約20個の長さのアミノ酸、約5～約15個の長さのアミノ酸、約8～約12個の長さのアミノ酸、及び約10個の長さのアミノ酸の配列を含んで成ることができる。リンカーの1つの機能は、それらの独立した生活性を促進するために活性タンパク質領域を分離し、そしてその隣接する構造からの妨害に無関係なその生活性コンホーメーションの個々の領域での想定を可能にすることである。
50

【0186】

本明細書に論議される方法を用いて、当業者は、シグナルransダクション又はリガンド結合活性を保持する、配列番号111、109、5、117又は119の種々のポリペプチドフラグメント又は変異体を同定し、そして/又は調製することができる。例えば、サイトカイン-結合ドメイン（配列番号111及び109の残基20（Ala）～227（Pro）；配列番号5の残基33（Ala）～240（Pro））、細胞外ドメイン（配列番号111及び109の残基20（Ala）～519（Glu）；配列番号5の残基33（Ala）～532（Glu））、又はその対立遺伝子変異体又は種オルト体（例えば、本明細書に記載されるような、配列番号117及び119、及びその機能的フラグメント）に対して実質的に相同であり、そして野生型zcytor17タンパク質のリガンド-結合活性を保持する種々のポリペプチドを調製することによって、zcytor17を10、“可溶性受容体”にすることができる。

【0187】

さらに、変異体zcytor17可溶性受容体、例えば配列番号113及び115の示されるそれらの受容体がまた単離され得る。そのようなポリペプチドは、トランスメンブラン及び細胞内ドメインの一部又はすべてからの追加のアミノ酸を包含することができる。そのようなポリペプチドはまた、一般的に本明細書に開示されるような追加のポリペプチドセグメント、例えばラベル、親和性標識及び同様のものも包含することができる。

【0188】

変異体及び融合タンパク質を包含するいずれかのzcytor17ポリペプチド、例えば変異体、可溶性受容体及び融合ポリペプチド又はタンパク質に関しては、当業者は、上記表1及び2に示される情報を用いて、その変異体をコードする十分な縮重ポリヌクレオチド配列を用意に生成することができる。

【0189】

本発明のzcytor17ポリペプチド、例えば十分な長さのポリペプチド、生物学的に活性のフラグメント及び融合ポリペプチドは、従来の技法に従って、遺伝的に構築された宿主細胞において生成され得る。適切な宿主細胞は、外因性DNAにより形質転換又はトランスフェクトされ得、そして培養において増殖され得るそれらの細胞型であり、そして細菌、菌類細胞、及び培養された高等真核細胞を包含する。真核細胞、特に多細胞生物の培養された細胞が好ましい。クローン化されたDNA分子を操作し、そして種々の宿主細胞中に外因性DNAを導入するための技法は次の文献に開示される：Sambrookなど.., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 及びAusubelなど.., eds., Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987。

【0190】

本発明はまた、単離され、そして精製されたDNA分子、例えば次の作用可能に連結された要素：第1転写プロモーター、配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドをコードする第1DNAセグメント及び第1転写ターミネーター；及び第2転写プロモーター、クラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部をコードする第2DNAセグメント；及び第2転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターを提供し、ここで前記ポリペプチド及びクラスIサイトカイン受容体がマルチマーサイトカイン受容体を形成し；そして前記マルチマーサイトカイン受容体が配列番号2の少なくとも一部に結合する。DNA分子はさらに、第1及び第2DNAセグメントに操作可能的に連結される分泌シグナル配列を含んで成る。

【0191】

マルチマーサイトカイン受容体は、可溶性であり、そして/又はさらに、本明細書に記載されるような親和性標識を含んで成る。さらに、マルチマーサイトカイン受容体は、本明細書に記載されるように配列番号2の活性を拮抗することができる。クラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部は、配列番号7及び/又は9の一部、例えば配列番号7のアミノ酸残基28～429、配列番号7のアミノ酸残基35～137、配列番号7のアミノ酸残基240～324、配列番号7のアミノ酸残基348～429、配列番号7のアミノ酸残基28～739、配列番

10

20

30

40

50

号7のアミノ酸残基28～761、配列番号7のアミノ酸残基762～979、又はその組合せを含んで成ることができる。本発明はまた、上記発現ベクターを含む培養される細胞も提供する。

【0192】

一般的に、本発明のzcytor17ポリペプチドをコードするDNA配列は、その発現のために必要とされる他の遺伝子的要素、例えば一般的に、発現ベクター内の転写プロモーター及びターミネーターに操作可能的に連結される。ベクターはまた、通常、1又は複数の選択マーカー及び1又は複数の複製の起点を含むであろうが、しかし当業者は、一定のシステム内で、選択マーカーが別のベクター上に供給され得、そして外因性DNAの複製が宿主細胞ゲノム中への組み込みにより供給され得ることを認識するであろう。プロモーター、ターミネーター、選択マーカー、ベクター及び要素の選択は、当業者のレベルの範囲内の通常のことである。多くのそのような要素は文献に記載されており、そして商業的供給者を通して入手できる。

【0193】

zcytor17ポリペプチドを、宿主細胞の分泌路中に方向づけるためには、分泌シグナル配列（又は、シグナル配列、リーダー配列、プレプロ配列又はプレ配列としても知られている）が、発現ベクターに供給される。分泌シグナル配列は、zcytor17の配列であり得、又はもう1つの分泌されたタンパク質（例えばt-PA）に由来し、又は新たに合成され得る。分泌シグナル配列は、zcytor17 DNA配列に操作可能的に連結され、すなわち2つの配列は正しく読み取り枠を整合して連結され、そして宿主細胞の分泌経路中に新しく合成されたポリヌクレオチドを方向づけるように配置される。分泌シグナル配列は通常、興味あるポリペプチドをコードするDNA配列の5'側に位置するが、但し一定の分泌シグナル配列は、興味あるDNA配列の他の場所に位置することもできる（例えば、Welchなど、アメリカ特許第5,037,743号；Hollandなど、アメリカ特許第5,143,830号を参照のこと）。

【0194】

他方では、本発明のポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列は、分泌路中に他のポリペプチドを方向づけるために使用される。本発明はそのような融合ポリペプチドを提供する。シグナル融合ポリペプチドが製造され得、ここで配列番号111及び109のアミノ酸1(Met)～アミノ酸19(Ala)又は配列番号5のアミノ酸1(Met)～アミノ酸32(Ala)又は配列番号117又は119のアミノ酸1(Met)～アミノ酸45(Ala)又は配列番号117又は119のアミノ酸28(Met)～アミノ酸45(Ala)に由来する分泌シグナル配列が当業界において知られている方法及び本明細書に開示される方法を用いて、もう1つのポリペプチドに作用可能に連結されている。

【0195】

本発明の融合ポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列は好ましくは、分泌路中の追加のペプチドを方向づけるためにその追加のペプチドにアミノ末端的に融合される。そのような構造体は、当業界において知られている多くの用途を有する。例えば、それらの新規の分泌シグナル配列融合構造体は通常分泌されないタンパク質の活性成分の分泌を方向づけることができる。そのような融合は、分泌路を通してペプチドを方向づけるためにインビボ又はインビトロで使用され得る。

【0196】

本発明はまた、次の作用可能に連結された要素：転写ターミネーター、配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするDNAセグメント、及び転写ターミネーターを含んで成る第1発現ベクター；及び転写プロモーター、クラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部をコードするDNAセグメント、及び転写ターミネーターを含んで成る第2発現ベクターを含んで成る培養された細胞を提供しここで、前記ポリペプチド及びクラスIサイトカイン受容体がマルチマーサイトカイン受容体を形成する。前記第1及び第2発現ベクターはさらに、前記第1及び第2 DNAセグメントに操作可能的に連結される分泌シグナル配列を含んで成ることができる。

【0197】

10

20

30

40

50

マルチマーサイトカイン受容体は、可溶性であり、ヘテロダイマーであり得、そして/又はさらに、本明細書に記載されるような親和性標識を含んで成る。さらに、マルチマーサイトカイン受容体は、本明細書に記載されるように配列番号2の活性を拮抗することができる。クラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部は、配列番号7及び/又は9の一部、例えば配列番号7のアミノ酸残基28~429、配列番号7のアミノ酸残基35~137、配列番号7のアミノ酸残基240~324、配列番号7のアミノ酸残基348~429、配列番号7のアミノ酸残基28~739、配列番号7のアミノ酸残基28~761、配列番号7のアミノ酸残基762~979、又はその組合せを含んで成ることができる。

【0198】

培養された哺乳類細胞または、本発明内の適切な宿主である。外因性DNAを、哺乳類宿主細胞中に導入するための方法は、リン酸カルシウム・仲介トランスフェクション(Wiglerなど., Cell 14: 725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Grahamなど., Virology 52: 456, 1973), エレクトロポレーション(Neumannなど., EMBO J. 1: 841-845, 1982); DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション(Ausubelなど., 前記)、及びリポソーム・仲介トランスフェクション(Hawley-Nelsonなど., Focus 15: 73, 1993; Ciccaroneなど., Focus 15: 80, 1993)を包含する。

【0199】

培養された哺乳類細胞における組換えポリペプチドの生成は、例えばLevinsonなど., アメリカ特許第4,713,339号; Hagenなど., アメリカ特許第4,784,950号; Palmiterなど., アメリカ特許第4,579,821号; 及びRingold, アメリカ特許第4,656,134号により開示される。培養された適切な哺乳類細胞は、COS-1(ATCC No. CRL 165)、COS-7(ATCC No. CRL 1651)、BHK(ATCC No. CRL 1632)、BHK 570(ATCC No. CRL 10314)、293(ATCC No. CRL 1573; Grahamなど., J. Gen. Viro. 36: 59-72, 1977)、及びチャイニーズハムスター卵巣(例えばCHO-K1; ATCC No. CCL61)細胞系を包含する。

【0200】

追加の適切な細胞系は当業界において知られており、そして公的な寄託所、例えばAmerican Type Culture Collection, Manassas, VAから入手できる。一般的に、強い転写プロモーター、例えばSV-40又はサイトメガロウィルスからのプロモーターが好ましい。例えば、アメリカ特許第4,956,288号を参照のこと。他の適切なプロモーターは、メタロチオネイン遺伝子からのプロモーター(アメリカ特許4,579,821号及び第4,601,978号)、アデノウィルス主要後期プロモーターを包含する。

【0201】

薬物選択は一般的に、外来性DNAが挿入されている、培養された哺乳類細胞を選択するために使用される。そのような細胞は通常、“トランスフェクタント”として言及される。選択剤の存在下で培養され、そしてそれらの子孫に興味ある遺伝子を伝達することができる細胞は、“適切なトランスフェクタント”として言及される。好ましい選択マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性をコードする遺伝子である。選択は、ネオマイシン型薬物、例えばG-418又は同様のもの存在下で実施される。“増幅”として言及される方法である選択システムは、興味ある遺伝子の発現レベルを高めるためにも使用される。増幅は、低レベルの選択剤の存在下でトランスフェクタントを培養し、そして次に、導入された遺伝子の生成物を高レベルで生成する細胞を選択するために選択剤の量を高めることによって実施される。

【0202】

好ましい増幅可能選択マーカーは、メトトレキセートに対する耐性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼである。他の耐薬物性遺伝子(例えば、ヒグロマイシン耐性、複数薬物耐性、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ)もまた、使用され得る。変更された表現型を導入する他のマーカー、例えば緑色蛍光タンパク質、又は細胞表面タンパク質、例えばCD4, CD8, クラスI MHC、胎盤アルカリホスファターゼが、FACS分類又は磁気ビース分離技法のような手段により、トランスフェクトされていない細胞とトランスフェクトされた細胞とを分類するために使用され得る。

10

20

30

40

50

【0203】

他の高等真核細胞、例えば昆虫細胞、植物細胞及び鳥類細胞もまた、宿主として使用され得る。植物細胞において遺伝子を発現するためのベクターとしてのアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) の使用は、Sinkarなど、J. Biosci. (Bangalore) 11: 47 - 58, 1987 により再考されている。昆虫細胞の形質転換、及びそこにおける外来性ポリペプチドの生成は、Guarino など、アメリカ特許第5,162,222号；及びWIP 0公開W094 / 06463号により公開される。

【0204】

昆虫細胞は、オートグラファ・カリホルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウィルス (AcNPV) に通常由来する組換えバキュロウィルスにより感染され得る。King, L. A. and Possee, R.D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, London, Chapman & Hall; O'Reilly, D. R. , Baculovirus Expression Vector: A Laboratory Manual, New York, Oxford University Press., 1994; 及びRichardson, C. D., E d., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995を参照のこと。10

【0205】

組換えzcytor17バキュロウィルスを製造するための第2の方法は、Luckow (Luckow, V A, など、J. Virol 67: 4566 - 79, 1993) により記載されるトランスポゾンに基づくシステムを利用する。トランスファーべクターを利用するこのシステムは、Bac - to - BacTM キット (Life Technologies, Rockville, MD) として市販されている。このシステムは、“bacmid”と呼ばれる大きなプラスミドとして、E.コリに維持されるバキュロウィルスゲノム中に、zcytor17ポリペプチドをコードするDNAを移動せしめるために、Tn7トランスポゾンを含むトランスファーべクター、pFastBacITM (Life Technologies) を利用する。Hill - Perkins, M.S. and Possee, R.D., J. Gen. Virol. 71: 971 - 6, 1990; Bonning, B.C. など、J. Gen. Virol. 75: 1551 - 6, 1994; 及びChazenbalk, G. D., and Rapoport, B., J. Biol Chem. 270: 1543 - 9, 1995 を参照のこと。20

【0206】

さらに、トランスファーべクターは発現されたzcytor17ポリペプチドのC-又はN-末端でエピトープ標識、例えばGlu - Glu エピトープ標識をコードするDNAとのイン - フレーム融合体を含むことができる (Grussenmeyer, T. など、Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7 952 - 6, 1985)。当業界において知られている技法を用いて、zcytor17を含むトランスファーべクターにより、E.コリが形質転換され、そして組換えバキュロウィルスの表示である断続的lacZ遺伝子を含むbacmid DNAについてスクリーンされる。組換えバキュロウィルスゲノムを含むbacmid DNAが、通常の技法を用いて単離され、そしてスパドブテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞、例えばSf9 細胞をトランスフェクトするために使用される。zcytor17を発現する組換えウィルスが結果的に生成される。組換えウィルス ストックは、当業者において通常使用される方法により製造される。30

【0207】

組換えウィルスは、宿主細胞、典型的には、アワヨトウの幼虫、スパドブテラ・フルギペルダに由来する細胞系を感染せしめるために使用される。一般的には、Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Application of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C., 1994を参照のこと。もう1つの適切な細胞系は、トリコブルシア・ニ (*Trichoplusia ni*) に由来するHigh FiveTM 細胞系 (Invitrogen) である (アメリカ特許第5,300,435号)。40

【0208】

市販の血清フリー培地が、細胞を増殖し、そして維持するために使用される。適切な培地は、Sf9細胞のためには、SF900IITM (Life Technologies), 又はEST 921TM (Expression Systems); 及びT. ni 細胞のためには、Ex - Cell0405TM (JRH Biosciences, Lenza, KS) 又はExpress FiveTM (Life Technologies) である。使用される方法は一般的に、入手できる実験用マニュアルに記載されている (King, L. A. and Possee, R. D., 前記; O' 50

Reilly, D. R. など., 前記 ; Richardson, C. D., 前記)。上清液からのzcyclor17ポリペプチドの続く精製は、本明細書に記載される方法を用いて達成され得る。

【0209】

菌類細胞、例えば酵母細胞はまた、本発明内で使用され得る。これに関して、特に興味ある酵母種は、サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 及びピチア・メタノリカ (*pichia methanolica*) を包含する。外因性DNAによりS. セレビシアエ細胞を形質転換し、そしてそれから組換えポリペプチドを生成するための方法は、例えばKawasaki, アメリカ特許第4,599,311号；Kawasaki など., アメリカ特許第4,931,373号；Brake, アメリカ特許第4,870,008号；Welchなど., アメリカ特許第5,037,743号；及びMurray など., アメリカ特許第4,845,075号により開示される。形質転換された細胞は、選択マーカー、通常、耐薬物性、又は、特定の栄養物(例えばロイシン)の不在下で増殖する能力により決定される表現型により選択される。

【0210】

サッカロミセス・セレビシアエへの使用のための好ましいベクターシステムは、グルコース含有培地における増殖により形質転換された細胞の選択を可能にする、Kawasaki など。(アメリカ特許第4,931,373号)により開示されるPOT1ベクターシステムである。酵母への使用のための適切なプロモーター及びターミネーターは、解糖酵素遺伝子(例えば、Kawasaki, アメリカ特許第4,599,311号；Kingsmanなど., アメリカ特許第4,615,974号；及びBitter, アメリカ特許第4,977,092号を参照のこと)及びアルコール デヒドロゲナーゼ遺伝子からのものを包含する。また、アメリカ特許第4,990,446号；第5,063,154号；第5,139,936号；及び第4,661,454号を参照のこと。

【0211】

他の酵素、例えばハンセンラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベリミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、クルイベリミセス・フラギリス (*Kluyveromyces fragilis*)、ウスチラゴ・マイジス (*Ustilago maydis*)、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピチア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピチア・グイレルモンジ (*Pichia guillermondi*)、及びカンジタ・マルトサ (*Candida maltosa*) のための形質転換システムは、当業界において知られている。

【0212】

例えば、Gleeson など., *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459 - 3465, 1986 及びCregg, アメリカ特許第4,882,279号を参照のこと。アスペルギラス細胞は、McKnight など., アメリカ特許第4,935,349号の方法に従って使用され得る。アクレモニウム・クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum*) を形質転換するための方法は、Sumino ., アメリカ特許第5,162,228号により開示される。ニューロスボラ (*Neurospora*) を形質転換するための方法は、Lambowitz, アメリカ特許第4,486,533号により開示される。

【0213】

組換えタンパク質の生成のための宿主としてのピチア・メタノリカの使用は、WIPO公開W097 / 17450, W097 / 17451, W098 / 02536及びW098 / 02565に開示される。P.メタノリカの形質転換に使用するためのDNA分子は通常、形質転換の前、好ましくは線状化される、二本鎖の環状プラスミドとして調製されるであろう。P.メタノリカにおけるポリペプチド生成のためには、プラスミドにおけるプロモーター及びターミネーターは、P.メタノリカ遺伝子、例えばP.メタノリカ アルコール利用遺伝子 (AUG1又はAUG2) のものであることが好ましい。他の有用なプロモーターは、ジヒドロキシアセトンシンターゼ (DHAS)、ギ酸デヒドロゲナーゼ (FMD)、及びカタラーゼ (CAT) 遺伝子のものを包含する。宿主染色体中へのDNAの組み込みを促進するためには、宿主DNA配列を両端に有するプラスミドの完全な発現セグメントを有することが好ましい。

【0214】

ピチア・メタノリカへの使用のための好ましい選択マーカーは、アデニンの不在下でad e2宿主細胞の増殖を可能にする、ホスホリボシル-5-アミノイミダゾールカルボキシラ

10

20

30

40

50

ーゼ (AIRC; EC. 4.1.1.21) をコードするP.メタノリカADE2遺伝子である。メタノールの使用を最少にすることが所望される大規模産業方法のためには、両メタノール利用遺伝子 (AUG 1 及びAUG 2) が欠失されている宿主細胞を使用することが好ましい。分泌されたタンパク質の生成のためには、液胞プロテアーゼ遺伝子 (PEP 4 及びPRB 1) を欠いている宿主細胞が好ましい。エレクトロポレーションが、P.メタノリカ細胞中への、興味あるポリペプチドをコードするDNAを含むプラスミドの導入を促進するために使用される。2.5~4.5kV/cm, 好ましくは約3.75kV/cmの電場の強さ、及び1~40m秒、最も好ましくは約20m秒の時定数 (t) を有する、指数的に減衰する、パルスされた電場を用いて、エレクトロポレーションによりP.メタノリカ細胞を形質転換することが好ましい。

【0215】

10

原核宿主細胞、例えば細菌E.コリ、バシラス及び他の属の菌株はまた、本発明において有用な宿主細胞である。それらの宿主を形質転換し、そしてそこにクローニングされる外来性DNA配列を発現するための技法は、当業界において良く知られている（例えば、Sambrookなど、前記を参照のこと）。細菌、例えばE.コリにおいてzcyt017ポリペプチドを発現する場合、そのポリペプチドは、典型的には不溶性顆粒として細胞質に保持され得、又は細菌の分泌配列により細胞周辺腔に向けられ得る。前者の場合、細胞は溶解され、そして顆粒が回収され、そして例えばグアニジンイソチオシアネート又はウレアを用いて変性される。

【0216】

20

次に、変性されたポリペプチドが再生され、そして例えばウレア、及び還元された及び酸化されたグルタチオンの組み合わせの溶液に対する透析、続く緩衝溶液に対する透析により、前記変成体を希釈することによって二量体化され得る。後者の場合、ポリペプチドは、細胞周辺腔の内容物を開放するために細胞を破壊し（例えば、音波処理又は浸透ショックにより）、そしてタンパク質を回収することによって、細胞周辺腔から可溶性及び機能性形で回収され、それにより、変性及び再生のための必要性を回避することができる。

【0217】

30

形質転換され又はトランスフェクトされた宿主細胞は、選択された宿主細胞の増殖のために必要とされる栄養物及び他の成分を含む培養培地において、従来の方法に従って培養される。種々の適切な培地、例えば定義された培地及び複合培地は、当業界において知られており、そして一般的には、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミン及び鉱物を含む。培地はまた、必要とされる場合、成長因子又は血清のような成分も含むことができる。増殖培地は一般的に、外因的に付加されたDNAを含む細胞を、例えば発現ベクター上に担持される選択マーカーにより補足され、又は宿主細胞中に同時トランスフェクトされる必須栄養物における薬物選択又は栄養欠乏により選択するであろう。

【0218】

40

P.メタノリカ細胞は適切な炭素源、窒素源及び微量栄養物を含んでなる培地において、約25~35の温度で培養される。液体培養物は、従来の手段、例えば小さなフラスコの振盪又は発酵器のスパージングにより十分なエアレーションを提供される。P.メタノリカのため的好ましい培養培地は、YE PD (2% D-グルコース、2%のBactoTMペプトン (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1%のBactoTM 酵母抽出物 (Difco Laboratories), 0.004%のアデニン及び0.006%のL-ロイシン) である。

【0219】

50

本発明の1つの観点においては、zcyt017マルチマーサイトカイン受容体（例えば、トランスメンブラン及び細胞内ドメイン）は、培養された細胞により生成され、そして細胞は、受容体のためのリガンド、例えば天然のリガンド（配列番号2）、及び天然のリガンドのアゴニスト及びアンタゴニストについてスクリーンするために使用される。このアプローチを要約すると、受容体をコードするcDNA又は遺伝子がその発現のために必要とされる他の遺伝子要素（例えば、転写プロモーター）と組合され、そしてその得られる発現ベクターが宿主細胞中に挿入される。DNAを発現し、そして機能的受容体を生成する細胞が選択され、そして種々のスクリーニングシステム内に使用される。

【0220】

本発明の新規受容体の発現及び受容体 - 介在性シグナルのトランスタクションへの使用のために適切な哺乳類細胞は、 - サブユニット、例えばgp130を発現する細胞、及びgp130及びLIF受容体を同時発現する細胞を包含する (Gearingなど., EMBO J. 10: 2839-2848, 1991; Gearingなど., アメリカ特許第5,284,755号)。これに関して、同じサブファミリーにおける受容体、例えばIL-6又はLIFに結合する他のサイトカインに対して応答性である細胞を使用することが一般的に好ましい。なぜならば、そのような細胞は必要なシグナルトランスタクション経路を含むであろうからである。このタイプの好ましい細胞は、ヒトTF-1細胞系 (ATCC番号CRL-2003) 及びDA-1細胞系を包含する (Branchなど., Blood 69: 1782, 1987; Broudyなど., Blood 75: 1622-1626, 1990)。

10

【0221】

他方では、適切な宿主細胞は、所望する細胞応答のために必要とされる - サブユニット又は他の細胞成分を生成するために構築され得る。例えば、ネズミ細胞系BaF3 (Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevotなど., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), 子供ハムスター腎臓 (BHK) 細胞系、又はCTLL-2細胞系 (ATTC TIB-214) が、マウスgp130サブユニット、又はマウスgp130及びLIF受容体、並びにzcytor17発現するためにトランスフェクトされ得る。

【0222】

同じ種からの宿主細胞及び受容体を使用することが一般的に好ましいが、しかしながら、このアプローチは、いずれかの種からの多数の受容体サブユニットを発現するための細胞系の構築を可能にし、それにより、種特異性から生じる可能性ある制限を克服する。他方では、マスス受容体cDNAの種相同体、例えばBaF3細胞系におけるマウスcDNAが、同じ種からの細胞系内でクローニングされ、そしてその細胞内で使用され得る。従って、1つの造血成長因子、例えばIL-3に依存する細胞系が、zcytor17リガンド、又は抗-zcytor17抗体に依存性になるように構築され得る。

20

【0223】

機能的zcytor17を発現する細胞が、スクリーニングアッセイ内に使用される。種々の適切なアッセイは、当業界において良く知られている。それらのアッセイは、標的細胞における生物学的反応の検出に依存する。1つのそのようなアッセイは、細胞増殖アッセイである。細胞は、試験化合物の存在又は不在下で培養され、そして細胞増殖は、例えばトリチウム化されたチミジンの組み込みを測定することにより、又はAlamar BlueTM (AccuMed, Chicago, IL) 又は3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド (MTT) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983) の代謝性分解に基づく比色分析により検出される。

30

【0224】

他のアッセイ型は、レポーター遺伝子を発現するよう、さらに構築される細胞を用いる。レポーター遺伝子は、レポーター - 連結経路に応答するプロモーター要素に連結され、そしてアッセイは、レポーター遺伝子の転写の活性化を検出する。これに関しての好ましいプロモーター要素は、血清応答要素、STAT又はSREである (例えば、Shawなど., Cell 56: 63-72, 1989を参照のこと)。好ましいそのようなレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ遺伝子である (de Wetなど., Mol. Cell. Biol. 7: 1987)。ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、当業界において知られている方法を用いて発光により検出される (Baumgartnerなど., J. Biol. Chem. 269: 19094-29101, 1994; Schenborn and Goiffin, Promega Notes 41: 11, 1993)。

40

【0225】

ルシフェラーゼアッセイキットは、例えばPromega Corp., Madison, WIから市販されている。この型の標的細胞系は、化学物質、細胞 - ならし培養培地、菌類ブイヨン、土壤サンプル、水サンプル及び同様のもののライブラリーをスクリーンするために使用され得る。例えば、細胞 - 又は組織 - ならし培地サンプルのバンクが、リガンドを生成する細胞を同定するために標的細胞に対してアッセイされ得る。次に、陽性細胞が、プールに分けら

50

れ、宿主細胞中にトランスフェクトされ、そして発現される、哺乳類細胞発現ベクターにおいてcDNAライブラリーを生成するために使用される。次にトランスフェクトされた細胞からの培地サンプルがアッセイされ、続くプールの分割、トランスフェクション、継代培養、及び陽性細胞の再アッセイが伴ない、リガンドを発現するクローニング細胞系が単離され得る。腎臓、肝臓、脾臓、胸腺、他のリンパ組織により条件付けされた培地サンプルが、スクリーニング方法への使用のためのリガンドの好ましい源である。

【0226】

本発明はまた、マルチマーサイトカイン受容体の生成方法も提供する。前記方法は、本明細書に記載されるような細胞を培養し、そしてその細胞により生成されるマルチマーサイトカイン受容体を単離することを包含する。

10

【0227】

本発明はまた、試験サンプルにおける複数のサイトカイン受容体リガンドを検出するための方法も提供する。前記方法は、前記試験サンプルと、配列番号111又は109のアミノ酸残基20～227（配列番号5のアミノ酸残基33～240）を含んで成るポリペプチド、及び少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部を含んで成るマルチマーサイトカイン受容体とを接触せしめ；そして試験サンプルにおけるリガンドへのマルチマーサイトカイン受容体の結合を検出することを包含する。クラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部は、配列番号7及び/又は9の一部、例えば配列番号7のアミノ酸残基28～429、配列番号7のアミノ酸残基35～137、配列番号7のアミノ酸残基240～324、配列番号7のアミノ酸残基348～429、配列番号7のアミノ酸残基28～739又はその組合せを含んで成ることができる。

20

【0228】

本発明のzcytor17マルチマーサイトカイン受容体のための天然のリガンドはまた、zcytor17を発現するサイトカイン-依存性細胞系を突然変異誘発し、そしてそれを、オートクライン増殖について選択する条件下で培養することによって同定され得る。WIPO公開W095/21930号を参照のこと。典型的な方法においては、zcytor17を発現する細胞が、例えばEMSにより突然変異誘発される。次に、細胞が、必要とされるサイトカインの存在下で回収され、次に、サイトカインを欠いている培養培地にトランスファーされる。

30

【0229】

生存細胞が、リガンドに対して競争するために、本明細書に記載されるzcytor17サイトカイン-結合ドメイン、及びクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部、例え葉OSMR（配列番号7）及び/又はWSX-1（配列番号9）のサイトカイン-結合ドメインを含んで成る可溶性受容体ポリペプチドを、培養培地に添加することにより、又はzcytor17マルチマーサイトカイン受容体を発現するトランスフェクトされた細胞に比較して、野生型細胞に基づいてならし培地をアッセイすることにより、zcytor17マルチマーサイトカイン受容体のためのリガンドの生成についてスクリーンされる。この方法に使用するための好ましい細胞系は、gp130又は、IF受容体と組合してgp130を発現するためにトランスフェクトされる細胞を包含する。好ましいそのような宿主細胞系は、トランスフェクトされたCTLL-2細胞（Gillis and Smith, Nature 268: 154-156, 1977）及びトランスフェクトされたBaF3細胞を包含する。

40

【0230】

さらに、zcytor17可溶性マルチマーサイトカイン受容体を使用する分泌トラップ方法は、zcytor17リガンド、例えば配列番号2を単離するために使用され得る（Aldrich, など., Cell 87: 1161-1169, 1996）。既知の又は疑わしいリガンド源から調製されたcDNA発現ライブラリーが、COS-7細胞中にトランスフェクトされる。cDNAライブラリーベクターは一般的に、COS-7細胞における増殖のためのSV40起点、及び高い発現のためのCMVプロモーターを有する。トランスフェクトされたCOS-7細胞は、単層において増殖され、そして次に固定され、そして浸透せしめられる。次に、本明細書に記載される、標的化されているか、又はビオチン-ラベルされたzcytor17可溶性マルチマーサイトカイン受容体が、細胞像と接触して配置され、そして抗-相補的分子、すなわちzcytor17リガンドを発現する、

50

単層における細胞の結合を可能にされる。従って、リガンドを発現する細胞が、受容体分子により結合されるであろう。

【0231】

ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) により接合される抗 - 標的抗体 (Ig融合体のための抗 - Ig、FLAG - 標的化された融合体のためのM2又は抗 - FLAG、ストレプタビジン及び同様のもの) は、標的化されているか、又はビオチン - ラベルされた zcytor17 可溶性マルチマーサイトカイン受容体が結合しているそれらの細胞を可視化するために使用される。HRPは、チラミド試薬、例えばチラミド - FITCの付着を触媒する。市販のキットが、この検出のために使用され得る (Renaissance TSA-DirectTM Kit; NEN Life ScienceProducts, Boston, MA)。 zcytor17マルチマーサイトカイン受容体リガンドを発現する細胞は、緑色の細胞として蛍光顕微鏡下で同定され、そして Aldrich, など., 前記に概略されるように、プラスミド救助のための方法を用いてのリガンドの続くクローニング、クローニングが同定されるまでの続くラウンドの分泌トラップアッセイのために採取されるであろう。

【0232】

マルチマーサイトカイン受容体複合体として、 zcytor17ポリペプチドの活性は、受容体結合及び続く生理学的細胞応答に関連する細胞外酸性化速度又はプロトン排泄を測定する珪素基材のバイオセンサーマイクロフィジオメーターにより測定され得る。典型的な装置は、 Molecular device, Sunnyvale, CA により製造される CytosensorTM Microphysiometer である。種々の細胞応答、たとえば細胞増殖、イオン輸送、エネルギー生成、炎症応答、調節及び受容体活性化及び同様のものが、この方法により測定され得る。例えば、 McConnell, H.M. など., Science 257: 1905-1912, 1992; Pitchford, S. など., Meth. Enzymol. 228: 84-108, 1997; Arimilli, S. など., J. Immunol. Meth. 212: 49-59, 1998; Van Liefde, I. など., Eur. J. Pharmacol. 346: 87-95, 1998 を参考のこと。マイクロフィジオメーターは、付着性又は非付着性真核又は原核細胞をアッセイするために使用され得る。

【0233】

時間にわたって細胞培地における細胞外酸性化の変化を測定することによって、マイクロフィジオメーターは、種々の刺激、例えば zcytor17ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストに対する細胞応答を直接的に測定する。好ましくは、マイクロフィジオメーターは、 zcytor17ポリペプチドを発現しない対照の真核細胞に比較して、 zcytor17 - 発現性真核細胞の応答を測定するために使用される。 zcytor17 - 発現性真核細胞は、 zcytor17 - 調整刺激に対して応答性である細胞を創造するか、又は天然において発現性の zcytor17 細胞、例えばリンパ球、脾臓、胸腺組織、又はPBLに由来する zcytor17 - 発現性細胞である細胞を創造する、本明細書に記載されるように、アデノウィルスベクターを通して、 zcytor17 がトランスフェクトされているか、又は感染されている細胞を包含する。

【0234】

対照に比較して、マウス zcytor10を発現する細胞の応答における細胞外酸性化の上昇又は低下により測定される差異が、 zcytor17 - 調節された細胞応答の直接的に測定である。さらに、そのような zcytor17 - 調節された応答は、種々の刺激下でアッセイされ得る。また、マイクロフィジオメーターを用いれば、 zcytor17マルチマーサイトカイン受容体を発現する細胞を供給し、前記細胞の第1部分を試験化合物の不在下で培養し、前記細胞の第2部分を試験化合物の存在下で培養し、そして前記細胞の第1部分に比較して、前記細胞の第2部分の細胞応答の上昇又は低下の変化を検出することを含んでなる、 zcytor17マルチマーサイトカイン受容体のアゴニスト及びアンタゴニストを同定するための方法が提供される。 zcytor17マルチマーサイトカイン受容体のためのアンタゴニスト及びアゴニストは、この方法を用いて急速に同定され得る。

【0235】

zcytor17マルチマーサイトカイン受容体は、免疫グロブリンH鎖不变領域、典型的には2つの不变領域ドメインを含み、そして可変領域を欠いているFcフラグメントとの融合体として発現され得る。そのような融合体を調製するための方法は、アメリカ特許第5,155,

10

20

30

40

50

027号及び第5,567,584号に開示される。そのような融合体は典型的には、マルチマー分子として分泌され、ここでFc部分はお互いジスルフィド結合され、そして2つの非-Igポリペプチドはお互い接近して整列されている。このタイプの融合体は例えば、インビトロアッセイ手段又はアンタゴニストとして、リガンドを親和性精製するために、安定性及びインビボ半減期を高める二量体化のために使用され得る。

【0236】

本発明により提供される追加のアッセイは、ハイブリッド受容体ポリペプチドの使用を包含する。それらのハイブリッドポリペプチドは、2種の一般的なクラスに分けられる。第1のクラスにおいては、配列番号111の残基544(Lys)～732(Val)、配列番号109の残基544(Lys)～649(Ile)、配列番号5の残基557(Lys)～662(Ile)又は配列番号117の残基551(Lys)～662(Cys)を含んで成るzcytor17の細胞内ドメインは、第2受容体のリガンド-結合ドメインに連結される。好ましくは、第2受容体は造血サイトカイン受容体、例えばmpl受容体である(Souyriなど., Cell 63: 1137-1147, 1990)。ハイブリッド受容体はさらに、いずれかの受容体に由来するトランスメンブランドメインを含んで成るであろう。

【0237】

次に、ハイブリッド受容体をコードするDNA構造体が宿主細胞中に挿入される。ハイブリッド受容体を発現する細胞が、結合ドメインのためのリガンドの存在下で培養され、そして応答についてアッセイされる。このシステムは、容易に入手できるリガンドを用いて、zcytor17により介在されるシグナルトランスダクションを分析するための手段を提供する。このシステムはまた、特定の細胞系がzcytor17により形質導入されたシグナルに応答できるかどうかを決定するためにも使用され得る。

【0238】

第2クラスのハイブリッド受容体ポリペプチドは、第2受容体、好ましくはサイトカイン受容体の細胞質ドメイン及びトランスメンブランドメインと共に、zcytor17の細胞外(リガンド結合)ドメイン(配列番号111及び109の残基20(Ala)～519(Glu);配列番号5の残基33(Ala)～532(Glu))又はサイトカイン-結合ドメイン(配列番号111及び109の残基20(Ala)～227(Pro);又は配列番号5の残基33(Ala)～240(Pro);配列番号117の残基46(Val)～533(Glu);又は配列番号119の残基46(Val)～533(Trp))を含んで成る。トランスメンブランドメインは、いずれかの受容体に由来することができる。この第2クラスのハイブリッド受容体は、第2受容体により形質導入されるシグナルに応答することが知らされている細胞において発現される。それらの2種のハイブリッド受容体は、受容体に基づいてアッセイシステム内の広範囲の細胞型の使用を可能にする。

【0239】

WSX-1の発現は胸腺、脾臓、PBL及びリンパ節において強く、そして高められた発現が活性化されたT-細胞に関して観察された。OSMRについての組織分布は、非常に広いものとして記載されている。それらの3種の受容体の組織分布は、zcytor17ligについての標的が造血系細胞、特にT-細胞、単球/マクロファージ及びリンパ球前駆体細胞及びリンパ球細胞であることを示す。リンパ球細胞に対して作用する他の既知の4-ヘリカル-束のサイトカインは、IL-2, IL-4, IL-7及びIL-15を包含する。4-ヘリカル-束のサイトカインの再考については、Nicolaなど., Advances in Protein Chemistry 52: 1-65, 1999及びKeiso, A., Immunol. Cell Biol. 76:300-317, 1998を参照のこと。

【0240】

CD3+選択された、PMA/イノマイシン-刺激されたヒト末梢血液細胞からのならし培地(CM)は、zcytor17受容体、OSMR及びWSX-1受容体を発現し、そして他方では、IL-3に依存するBaF3細胞の増殖を支持した。1) PMA/イノマイシン-刺激されなかったか、又は2) CD選択されなかった(PMA/イノマイシン刺激を伴なって、又は伴なわない)細胞からのならし培地は、zcytor17、OSMR及びWSX-1を発現するBaF3細胞(BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR受容体-発現細胞)の増殖を支持しなかった。対照実験は、この増殖活性が他の既知の増殖因子に帰因せず、そしてzcytor17/WSX-1/OSMR受容体-発現細胞の

10

20

30

40

50

増殖を刺激するそのようなならし培地の能力が受容体の可溶形により中和され得ることを示した。

【0241】

PMA/イノマイシンにより活性化された、CD3+選択された細胞からのならし培地はまた、zcytor17受容体及びOSMR 受容体 (zcytor17/OSMR) を発現するBaF3細胞の増殖を支持するBaF3細胞の増殖を支持し、そしてzcytor17受容体及びWSX-1受容体 (zcytor17/ WSX-1) のみを発現するか、又はOSMR 受容体のみをふくむBaF3細胞は、このならし培地により刺激されなかった。

【0242】

CD3+選択された、PMA/イノマイシン - 刺激されたヒト末梢血液細胞からのCMに暴露されたzcytor17/ WSX-1 /OSMR 受容体 - 発現BaF3細胞の増殖が、培養物の眼での観察及び/又は増殖アッセイにより同定された。多くの適切な増殖アッセイが当業界において知られており、そして色素、例えばalamarBlueTM (AccuMed International, Inc. Westlake, Ohio); 3 - (4 , 5 -ジメチルチアゾール - 2 -イル) - 2 , 5 -ジフェニルテトラゾリウムプロマイド (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983) ; 3 - (4 , 5 -ジメチル - チアゾール - 2 -イル) - 5 , 3 -カルボキシメトキシフェニル - 2H - テトラゾリウム ; 2 , 3 - ビス (2 - メトキシ - 4 - ニトロ - 5 - スルホフェニル) - 5 - [(フェニルアミノ)カルボニル] - 2H - テトラゾリウムヒドロキシド；及びシアノジトリイル - テトラゾリウムプロマイド (Polysciences, Inc., Warrington, PA から市販されている)の還元についてのアッセイ；有糸分裂誘発アッセイ、例えば³H - チミジンの組み込みの測定；例えばナフタレンブラック又はトリパンブルーを用いての色素排除アッセイ；ジアセチルフルオレセインを用いての色素摂取；及びクロム開放を包含する。一般には、Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3rd ed., Wiley-Liss, 1994 (引用により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。

【0243】

cDNAライブラリーが、CD3+選択された、PMA - 及びイノマイシン - 刺激された一次ヒト末梢血液細胞から調製された。そのCD3+選択された、PMA - 及びイノマイシン - 刺激されたヒト末梢血液細胞cDNAライブラリーが、複数のcDNA分子を含むプールに分けられ、そして宿主細胞系、例えばBHK570細胞 (ATCC受託番号10314号) 中にトランスフェクトされた。トランスフェクトされた宿主細胞が、外因性増殖因子 (例えば、5 % FBS) を含まない培地において培養され、そしてならし培地が集められた。そのならし培地が、zcytor17、WSX-1 及びOSMR 受容体によりトランスフェクトされたBaF3 細胞の増殖を刺激する能力についてアッセイされた。BaF3/zcytor17/ WSX-1 /OSMR 受容体細胞を刺激したならし培地を生成するcDNAプールが同定された。このプールされたプラスミドcDNAが、E.コリ中にエレクトロポレーションされた。cDNA が単一のコロニーから単離され、そしてBHK570細胞中にそれぞれトランスフェクトされた。陽性クローニングが、BaF3/zcytor17/ WSX-1 /OSMR 受容体増殖アッセイにおける陽性結果により同定され、そして特異性が可溶性zcytor17受容体を用いての増殖の中和により試験された。

【0244】

zcytor17lig受容体アゴニストに関して観察され組織分布の観点においては、アゴニスト (例えば、天然のzcytor17lig/基質/補因子/等) 及びアンタゴニストは、インビトロ及びインビオ用途において莫大な可能性を有する。zcytor17ligアゴニストとして同定される化合物は、造血機能及び免疫機能の恒常性に関連する細胞の特殊化された細胞機能の拡張、増殖、活性化、分化及び/又は誘発又は阻害を刺激するために有用である。例えば、zcytor17lig及びアゴニスト化合物は、定義された細胞培養培地の成分として有用であり、そして細胞培養物において通常使用される血清を置換するために、単独で、又は他のサイトカインと組合して使用され得る。従って、アゴニストは、培養物におけるT-細胞、B-細胞、単球/マクロファージ、NK細胞、細胞毒性リンパ球、及びリンパ球及び骨髄系の増殖及び/又は成長を特異的に促進することにおいて有用である。

【0245】

10

20

30

40

50

アンタゴニストはまた、リガンド - 受容体相互作用の部位を特徴づけるための研究試薬として有用である。アンタゴニストは、造血機能の調節に関する細胞の拡張、増殖、活性化、及び/又は分化を阻害するために有用である。zcytor17lig活性のインヒビター (zcytor17ligアンタゴニスト) は、抗 - zcytor17lig抗体、及び可溶性マルチマーサイトカイン受容体、並びに他のペプチド及び非ペプチド剤 (例えば、リボザイム) を包含する。

【 0 2 4 6 】

zcytor17lig - 結合ポリペプチド、例えば本発明のマルチマーサイトカイン受容体はまた、リガンドの精製のためにも使用される。前記マルチマーサイトカイン受容体は、固体支持体、例えばアガロース、架橋されたアガロース、ガラス、セルロース樹脂、シリカ基材の樹脂、ポリスチレン、架橋されたポリアクリルアミド又は使用の条件下で安定している同様の材料のビーズ上に固定される。固体支持体にポリペプチドを結合するための方法は、当業界において知られており、そしてアミン化学、臭化シアノゲン活性化、N - ヒドロキシスクシンイミド活性化、エポキシド活性化、スルフヒドリル活性化及びヒドラジド活性化を包含する。得られる媒体は一般的に、カラムの形で形状化され、そしてリガンドを含む流体が、受容体ポリペプチドへのリガンドの結合を可能にするために、カラムに1又は複数回、通される。次に、リガンドが、塩濃度の変化、カオトロピック剤 (グアニジンHCl) 、又はリガンド - 受容体結合を破壊するpHを用いて溶出される。

【 0 2 4 7 】

リガンド - 結合受容体 (又は抗体、相補体 / 抗相補体対の1つのメンバー) 、又はその結合フラグメント、及び市販のバイオセンサー装置を用いるアッセイシステムが、好都合には、使用され得る (例えば、BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) 。そのような受容体、抗体、相補体 / 抗相補体対のメンバー、又はフラグメントは、受容体チップの表面上に固定される。この装置の使用は、Karlsson, J. Immunol. Methods 145: 229 - 40, 1991 及び Cunningham and Wells, J. Mol. Biol. 234: 554 - 63, 1993により開示される。受容体、抗体、メンバー又はフラグメントは、アミン又はスルフヒドリル化学を用いて、流動細胞内の金フィルムに結合されるデキストラン線維に共有結合される。

【 0 2 4 8 】

試験サンプルが細胞に通される。リガンド、エピトープ又は補体 / 抗補体対の反対のメンバーがサンプルに存在する場合、それは、それぞれ固定された受容体、抗体又はメンバーに結合し、金フィルムの表面のプラズモン共鳴の変化として検出される、媒体の屈折率の変化を引き起す。このシステムは、オン - 及びオフ - 速度の決定を可能にし、これから、結合親和性が計算され、そして結合の化学量の評価が可能にされる。他方では、リガンド / 受容体結合は、SELDITM technology (Ciphergen, Inc. Palo Alto, CA) を用いて分析され得る。

【 0 2 4 9 】

リガンド - 結合受容体ポリペプチドはまた当業界において知られている他のアッセイシステム内でも使用され得る。そのようなシステムは、結合親和性の決定のためのスカチャード分析 (Scatchard, Ann. NY. Acad. Sci. 51:660 - 72, 1949) 及び熱量測定アッセイ (Cunningham など., Science 253: 545 - 48, 1991; Cunningham など., Science 245: 82 1 - 25, 1991) を包含する。

本発明はまた、ポリペプチド、又は本明細書に記載されるマルチマーサイトカイン受容体の少なくとも一部に対して特異的に結合する抗体を提供する。

【 0 2 5 0 】

zcytor17マルチマーサイトカイン受容体はまた、エピトープ、ペプチド又はそのポリペプチドに特異的に結合する抗体を調製するためにも使用され得る。マルチマーサイトカイン受容体又はそのフラグメントは、動物を接種し、そして免疫応答を誘発するための抗原 (免疫原) として作用する。当業者は、抗原性エピトープ担持のポリペプチドが、マルチマーサイトカイン受容体、例えば zcytor17 (配列番号 11) 、OSMR (配列番号 7) 及び / 又は WSX-1 (配列番号 9) の少なくとも 6 、好ましくは少なくとも 9 及びより好ましくは少なくとも 15 ~ 約 30 個の連続したアミノ酸残基の配列を含むことを認識するであろう。マル

10

20

30

40

50

チマーサイトカイン受容体の大きな部分、すなわちアミノ酸配列の30～100個の残基～その全体の長さの残基を含んでなるポリペプチドが含まれる。抗原又は免疫原エピトープはまた、本明細書に記載されるように、結合された標識、アジュバント及びキャリヤーを含むことができる。

【0251】

それらの抗原による動物の接種により生成される免疫応答からの抗体は、本明細書に記載のようにして単離され、そして精製され得る。ポリクローナル及びモノクローナル抗体を調製し、そして単離するための方法は、当業界において良く知られている。例えば、Current Protocols in Immunology, Cooligan, など., (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook など., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 及びHurrell, J.G.R ., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982 を参照のこと。10

【0252】

当業者に明らかなように、ポリクローナル抗体は、種々の温血動物、例えば馬、ウシ、ヤギ、羊、犬、鶏、ウサギ、マウス、及びラットを、マルチマーサイトカイン受容体又はそのフラグメントにより接種することにより生成され得る。マルチマーサイトカイン受容体の免疫性は、アジュバント、例えばミヨウバン（水酸化アルミニュウム）又はフロイント完全又は不完全アジュバントの使用により高められ得る。免疫化のために有用なマルチマーサイトカイン受容体はまた、免疫グロブリンポリペプチド又はマルトース結合タンパク質との融合体ポリペプチド、例えばzcceptor17、OSMR 及び/又はWSX-1、又はその一部の融合体を包含する。ポリペプチド免疫原は、十分な長さの分子又はその一部であり得る。ポリペプチド部分が“ハプテン - 様”である場合、そのような部分は、免疫化のために、高分子キャリヤー（例えば、カサガイヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）又は破傷風トキソイド）に都合良く連結又は結合され得る。20

【0253】

本明細書で使用される場合、用語“抗体”とは、ポリクローナル抗体、親和性精製されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び抗原結合フラグメント、例えばF(ab')₂ 及びFabタンパク質分解性フラグメントを包含する。遺伝子的に構築された損なわれていない抗体又はフラグメント、例えばキメラ抗体、Fvフラグメント、一本鎖抗体及び同様のもの、並びに合成抗原結合ペプチド及びポリペプチドもまた包含される。非ヒト抗体は、ヒト骨格及び不变領域上に非ヒトCDRのみを移植することによって、又は完全な非ヒト可変ドメインを組み込むことによって（任意には、暴露された残基の置換によってヒト - 様表面によりそれらのドメインを“おおう（cloaking）”ことによって；ここで結果物は“張り合わされた”抗体である）、ヒト適合され得る。30

【0254】

多くの場合、ヒト適合された抗体は、正しい結合特性を増強するために、ヒト可変領域骨格ドメイン内に非ヒト残基を保持することができる。ヒト適合化抗体を通して、生物学的半減期が高められ、そしてヒトへの投与に基づく有害な免疫反応の可能性が低められる。さらに、ヒト抗体は、WIPO公開W098/24893号に開示されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むよう構築されたトランスジェニック非 - ヒト動物において生成される。好ましくは、それらの動物における内因性免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えにより不活性化されるか又は排除される。40

【0255】

抗体は、1) それらが限界レベルの結合活性を示す場合、及び2) それらが関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しない場合、特異的に結合すると考えられる。限界レベルの結合は、本明細書における抗 - マルチマーサイトカイン受容体抗体が対照（非 - マルチマーサイトカイン受容体）タンパク質への結合親和性よりも少なくとも10倍高い親和性を伴って、マルチマーサイトカイン受容体、ペプチド又はエピトープに結合するかどうか決定される。好ましくは、抗体は、 $10^6 M^{-1}$ 又はそれ以上、好ましくは $10^7 M^{-1}$ 又はそれ以上

、より好ましくは $10^8 M^{-1}$ 又はそれ以上、及び最も好ましくは $10^9 M^{-1}$ 又はそれ以上の結合親和性(K_a)を示す。抗体の結合親和性は、例えばScatchard分析(Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949)を用いて、当業者によって容易に決定され得る。

【0256】

抗-マルチマーサイトカイン受容体抗体は関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しないかどうかは、例えば、標準のウェスターントンプロット分析を用いて、zcyclor17マルチマーサイトカイン受容体であるが、しかし知られていない関連するポリペプチドを検出する抗体により示される(Ausubelなど., 前記)。既知の関連するポリペプチドの例は、従来技術に開示されているそれらのもの、例えば既知のオルト体及びパラ体、及びタンパク質ファミリーの類似する既知メンバーである。スクリーニングはまた、非ヒトマルチマーサイトカイン受容体及びマルチマーサイトカイン受容体変異体ポチペプチドを用いて行われ得る。

【0257】

さらに、抗体は、マルチマーサイトカイン受容体に対して特異的に結合する集団を単離するために、既知の関連するポリペプチドに“対してスクリーンされ得る”。例えば、マルチマーサイトカイン受容体に対して生ぜしめられた抗体は不溶性マトリックスに付着される関連するポリペプチドに吸着され；マルチマーサイトカイン受容体に対して特異的な抗体は適切な緩衝液条件下で前記マトリックスを通して流れるであろう。スクリーニングは、既知の溶接に関連するポリペプチドに対して交差反応しないポリクローナル及びモノクローナル抗体の単離を可能にする(Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, など. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995)。

【0258】

特異的抗体のスクリーニング及び単離は当業界において当業界において良く知られている。Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoffなど., Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjaminなど., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984を参照のこと。特異的に結合する抗-マルチマーサイトカイン受容体抗体は、当業界において知られており、そして下記に開示される多くの方法により検出され得る。

【0259】

当業者に知られている種々のアッセイがマルチマーサイトカイン受容体タンパク質又はペプチドに特異的に結合する抗体を検出するために使用され得る。典型的なアッセイは、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Speing Harbor Laboratory Press, 1988 に詳細に記載されている。そのようなアッセイの代表的な例は次のものを包含する：同時免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ、ラジオイムノ沈殿、酵素結合の免疫吸着アッセイ(ELISA)、ドットプロット又はウェスターントンプロットアッセイ、阻害又は競争アッセイ、及びサンドイッチアッセイ。さらに、野生型対変異体のマルチマーサイトカイン受容体タンパク質又はペプチドに結合する抗体がスクリーンされ得る。

【0260】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に開示されるような方法により生成される抗体を提供し、ここで前記抗体は、配列番号111、109又は5の少なくとも一部を含んで成るマルチマーサイトカイン受容体の少なくとも一部に結合する。1つの態様においては、上記に開示される抗体は、配列番号111、109又は5に示されるポリペプチドに対して特異的に結合する。もう1つの態様においては、抗体はモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり得る。

【0261】

マルチマーサイトカイン受容体に対する抗体は、マルチマーサイトカイン受容体を発現する細胞を標識するために；アフィニティー精製によりマルチマーサイトカイン受容体を

10

20

30

40

50

単離するために；マルチマーサイトカイン受容体の循環レベルを決定するための診断アッセイのために；根本的な病理学又は疾病のマーカーとして可溶性マルチマーサイトカイン受容体を検出し又は定量化するために；FACS を使用する分析方法において、発現ライブラリーをスクリーニングするために；抗-インディオタイプ抗体を生成するために；及びインビトロでマルチマーサイトカイン受容体活性を阻止するための中和抗体又はアンタゴニスとして使用され得る。

【0262】

適切な直接的標識又はラベルは、放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子及び同様のものを包含し；間接的な標識又はラベルは、中間体としてのビオチン-アビジン又は他の補体／抗-補体対の使用を特徴とする。本発明書における抗体及び結合タンパク質はまた、薬物、トキシン、放射性核種、及び同様のものに直接的に又は間接的に接合され得、そしてそれらの接合体はインビボ診断又は治療用途のために使用され得る。さらに、マルチマーサイトカイン受容体又はそのフラグメントに対する抗体は、アッセイ、例えば当業界において知られているウェスタンプロット又は他のアッセイにおいて、変性されたマルチマーサイトカイン受容体又はそのフラグメントを検出するためにインビトロで使用され得る。

【0263】

適切な検出可能分子は、マルチマーサイトカイン受容体又は抗体に直接的に又は間接的に結合され、そして放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子、及び同様のものを包含する。適切な細胞毒性分子は、ポリペプチド又は抗体に直接的に又は間接的に結合され得、そして細菌又は植物毒性（例えば、ジフェリア毒素、ツソイドモナシス内毒素、リシン、アブリン及び同様のもの）、及び治療用放射性核種、例えばI-131、レニウム-188又はイットニウム-90（ポリペプチド又は抗体に直接的に結合されるか、又はキレート成分により間接的に結合される）を包含する。マルチマーサイトカイン受容体又は抗体はまた、細胞毒性薬物、例えばアドリアマイシンに結合され得る。検出可能又は細胞毒性分子の間接的な結合に関しては、検出可能又は細胞毒性分子は相補的/抗相補的対のメンバーにより結合され得、ここで他のメンバーは結合ポリペプチド又は抗体部分に結合される。それらの目的のためには、ビオチン/ストレプタビジンが典型的な相補的/抗相補的対である。

【0264】

可溶性マルチマーサイトカイン受容体はまた、zcytor17lig結合及びシグナルトランスダクションをインビトロ及びインビボで阻止するために、zcytor17lig “アンタゴニスト”として作用することができる。それらの抗-zcytor17lig結合タンパク質は、zcytor17lig活性又はタンパク質結合を阻害するために有用である。

【0265】

ポリペプチド-毒素融合タンパク質又は抗体-毒素融合タンパク質は、標的化された細胞又は組織阻害又は除去（例えば、癌細胞又は組織を処理するために）のために使用され得る。他方では、ポリペプチドが複数の機能ドメイン（すなわち、活性化ドメイン又はリガンド結合ドメイン、及び標的化ドメイン）を有する場合、標的化ドメインのみを包含する融合タンパク質は、検出可能分子、細胞毒性分子又は相補的分子を、興味ある細胞又は組織型に向けるために適切である。ドメインのみの融合タンパク質が相補的分子を含む場合、抗-相補的分子は検出可能又は細胞毒性分子に接合され得る。従って、そのようなドメイン-相補的分子融合タンパク質は、一般的抗-相補的-検出可能/細胞毒性分子接合体のための一般的標的化ビーグルを表す。

【0266】

さらに、炎症は、侵入剤を受けとめるための生物による保護応答である。炎症は、多くの細胞及び体液メディエーターを包含する段階的に連続した現象である。他方では、炎症応答の制御は宿主を免疫無防備状態にするが、しかしながら、抑制されなければ、炎症は、慢性炎症性疾患（例えば、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患及び同様のもの）、敗血性ショック及び多発性器官不全を包含する重度の合併症を導くことができる

10

20

30

40

50

。重要なことには、それらの種々の疾病状態は、共通する炎症性メディエーターを共有する。

【0267】

炎症により特徴づけられる集合的疾患は、ヒト罹病率及び死亡率に対して大きな衝撃を有する。従って、抗-炎症性抗体及び結合ポリペプチド、例えば本明細書に記載される抗-zcytor17lig抗体及び結合ポリペプチドが、喘息及びアレルギーから自己免疫性及び敗血性ショックまでの莫大に多くのヒト及び動物疾患のための決定的な治療可能性を有することが明白である。本明細書に記載される抗-炎症性抗zcytor17lig抗体及び結合ポリペプチドの使用は、特に関節炎、内毒血症、炎症性腸疾患、乾癬、関連する疾患及び同様のもののような疾患において、本明細書に記載されるzcytor17ligアンタゴニストとして治療的に使用され得る。10

【0268】

1. 関節炎：

変形性関節炎、リウマチ様関節炎、損傷の結果としての関節炎性の関節、及び同様のものを包含する関節炎は、抗炎症性抗体及び結合ポリペプチド、例えば本発明のzcytor17lig抗体及び結合ポリペプチドの治療使用から利益を得る通常の炎症状態である。例えば、リウマチ様関節炎（RA）は、全身体に影響を及ぼす全身性疾患であり、そして最も通常の形の関節炎の1つである。それは、痛み、硬直、発熱、赤み及び膨潤を引き起こす、関節の内側をおおう膜の炎症によって特徴づけられる。炎症細胞は、骨及び軟骨を消化することができる酵素を開放する。リウマチ様関節炎の結果として、炎症の関節内層、すなわち滑液が侵入し、そして骨及び軟骨に損傷を与え、他の生理学的效果の中で、関節変性及び重度の痛みを導く。その関連する関節は、その形状及び整合を失い、痛み及び運動の損傷をもたらす。20

【0269】

リウマチ様関節炎（RA）は、重度の疾患及び高められた死亡率を導く、炎症及び続く組織損傷により特に特徴づけられる免疫介在性疾病である。種々のサイトカインがリウマチ様関節炎において局部的に生成される。多くの研究は、IL-1及びTNF-30（2種のプロトタイプのプロ炎症性サイトカイン）が滑膜炎症及び進行性関節破壊に関与する機構において重要な役割を演じることを実証している。実際、RAを有する患者におけるTNF-30及びIL-1インヒビターの投与は、炎症の臨床学的及び生物学的徴候の劇的な改良、及び骨侵食及び軟骨破壊の放射線学徴候の低下を誘導して来た。

【0270】

しかしながら、それらの有望な結果にもかかわらず、有用な%の患者がそれらの剤に対して応答せず、このことは、他のメディエイターがまた、関節炎の病理学にも関与することを示唆する（Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2): 135-149, 2002）。それらのメディエーターの1つは、zcytor17ligであり、そしてzcytor17lig、例えば抗zcytor17lig抗体又は結合パートナーを結合するか又は阻害するそのような分子として、リウマチ様関節炎及び他の関節炎患者における炎症を低めるための価値ある治療剤として作用することができる。

【0271】

当業界において知られているリウマチ様関節炎についてのいくつかの動物モデルが存在する。例えば、コラーゲン-誘発された関節炎（CIA）モデルにおいては、マウスは、ヒトリウマチ様関節炎に密接に類似する慢性炎症性関節炎を進行する。CIAはRAと、類似する免疫学的及び病理学的特徴とを共有するので、これは、可能性あるヒト抗炎症性化合物をスクリーニングのための理想的モデルにする。このCIAモデルは、免疫応答及び炎症性応答の両者に依存する、マウスにおける良く知られているモデルである。免疫応答は、抗原として与えられ、そして抗-コラーゲン抗体の生成を導く、コラーゲンに応答してB-細胞及びCD4+ T-細胞の相互作用を包含する。40

【0272】

炎症相は、マウスの生来のコラーゲンと交差反応し、そして補体カスケードを活性化す50

るそれらのいくつかの抗体の結果として、炎症のメディエーターからの組織応答の結果である。CIAモデルを用いることの利点は、病因の基本的機構が知られていることである。タイプIIコラーゲン上の適切なT-細胞及びB-細胞エピトープは同定されており、そして免疫介在性関節炎に関係する、種々の免疫学的（例えば、遲延性型過敏症及び抗-コラーゲン抗体）及び炎症性（例えば、サイトカイン、ケモカイン及びマトリックス-分解酵素）パートナーが決定されており、そして従って、CIAモデルにおける試験化合物の効率を評価するために使用され得る。（Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3: 407-20, 1999; Williamsなど., Immunol. 89: 9784-788, 1992; Myersなど., Life Sci. 61: 1861-78, 1997; 及びWangなど., Immunol. 92: 8955-959, 1995）。

【0273】

10

可溶性zcytor17含有ポリペプチド（本明細書に記載されるヘテロダイマー及びマルチマーを包含する）、例えばzcytor17-Fc4又は他のzcytor17可溶性及び融合タンパク質のそれらのCIAモデルマウスへの投与は、症状を改善し、そして疾病の経路を変更するためへのzcytor17の使用を評価するために使用された。免疫及び炎症性応答を調節する分子zcytor17ligは、リウマチ様関節炎の病因に関連するSAAの生成を誘発し、そしてzcytor17ligアンタゴニストはインビトロ及びインビボでSAA活性を阻害することができる。そこで、zcytor17ligアンタゴニスト、例えば抗-zcytor17lig抗体又は結合パートナー、すなわちzcytor17含有ポリペプチド（本明細書に記載されるヘテロダイマー及びマルチマーを包含する）例えばzcytor17-Fc4又は他のzcytor17可溶性及び融合タンパク質の全身性又は局部投与は、RAにおける炎症性応答を実質的に抑制することができる。他の可能性ある治療剤は、zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド、又は本発明の抗zcytor17lig抗体又は結合パートナー及び同様のものを包含する。

20

【0274】

2. 内毒血症：

内毒血症は、感染剤、例えば細菌及び他の感染性疾病剤、敗血症、毒性ショック症候群に通常起因するか、又は日和見性感染及び同様のものに由来した免疫無防備状態の患者における重症状態である。治療的に有用な抗炎症性抗体及び結合パートナー、例えば本発明の抗-zcytor17lig抗体及び結合パートナーは、ヒト及び動物における内毒血症の予防及び処理を助ける。zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド、又は抗zcytor17lig抗体又は結合パートナー及び同様のものを包含する他の可能性ある治療剤は、内毒血症における炎症及び病理学的効果を低めるための価値ある治療剤として作用することができる。

30

【0275】

ポリ多糖類（LPS）誘発された内毒血症は、感染性疾病において病理学的効果を生成する多くのプロ炎症メディエーターと連動し、そして齧歯動物におけるLPS誘発された内毒血症は、可能性あるプロ炎症又は免疫調節剤の薬理学的効果を研究するための広く使用され、そして許容できるモデルである。グラム陰性細菌において生成されるLPSは、敗血性ショックの病因における主要原因剤である（Glausnerなど., Lancet 338: 732, 1991）。ショック様状態は実際、LPSの動物中への1回の注射により実験的に誘発され得る。

40

【0276】

LPSに応答する細胞により生成される分子は、病原体を直接的に又は間接的に標的化することができる。それらの生物学的応答は侵入性病原体に対して宿主を保護するが、それらは損傷を引き起こすことができる。従って、重度のグラム陰性細菌感染の結果として生じる生来の免疫性の強力な刺激が、サイトカイン及び他の分子の過剰の生成、及び致命的症状、発熱により特徴づけられる敗血性ショック症状、低血圧、散在性血管内凝固、及び多発性器官不全の進行を誘導する（Dumitruなど., Cell 103: 1071-1083, 2000）。

【0277】

LPSのそれらの毒性効果は、複数の炎症性メディエーターの導くマクロファージ活性化に最も関連している。それらのメディエーターの中で、TNFは、中和化抗-TNF抗体の投与によるLPS毒性の予防により示されるように、決定的な役割を演じるように見える（Beutl

50

erなど., Science 229: 869, 1985)。C57B1/6マウス中へのE. コリLPS 1 μgの注射が、注射の約2時間後、循環性IL-6、TNF-、IL-1、及び急性相タンパク質(例えば、SAA)の有意な上昇をもたらすであろうことは、十分に確立されている。LPSの毒性は、それらのメディエーターに対する受動性免疫化が低められた致死性をもたらすので、それらのサイトカインにより介在されると思われる(Beutlerなど., Science 229: 869, 1985)。

【0278】

敗血性ショックの予防及び/又は処理のための可能性ある免疫介入方法は、抗-TNF mAb, IL-1受動体アンタゴニスト、LIF、IL-10及びG-CSFを包含する。LPSは、内毒血症の病理学にたぶん寄与するプロ-炎症性因子の生成を誘発するので、zcytor17ligポリペプチドを拮抗することによるzcytor17lig活性、SAA又は他のプロ-炎症因子のその中和は、例えば内毒性ショックに見られる内毒血液の症状を減じるために使用され得る。他の可能性ある治療剤は、zcytor17ligポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド、又は抗zcytor17lig抗体又は結合パートナー及び同様のものを包含する。10

【0279】

3. 炎症性腸疾患、IBD:

アメリカ合衆国においては、約500,000人の人々が、結腸又は直腸のいずれか(潰瘍性大腸炎)、又は小及び大腸の両者(クローン病)に影響を及ぼすことができる炎症性腸疾患(IBD)を有する。それらの疾病的病因は不明であるが、しかしそれらは影響される組織の慢性炎症を包含する。zcytor17ligポリペプチド、可溶性ヘテロマー及びマルチマー受容体ポリペプチド又は本発明の抗-zcytor17lig抗体又は結合パートナー、及び同様のものを包含する有力な治療剤は、IBD及び関連する疾病における炎症性及び病理的効果を低めるための価値ある治療剤として作用する。20

【0280】

潰瘍性大腸炎(UC)は、結腸の粘膜又は最も内部の内層の炎症及び潰瘍により特徴づけられた、通常結腸と呼ばれる大腸の炎症性疾患である。この炎症は、時折結腸を空にし、下痢をもたらす。症状は、下痢ぎみ及び関連する腸の痙攣、発熱及び体重の低下を包含する。UCの正確な原因は未知であるが、最近の研究は、身体の天然の防御が、身体が外来性と見なすタンパク質に対して作用する("自己免疫反応")ことを示唆する。たぶん、それらは腸における細菌タンパク質に類似するので、それらのタンパク質は、結腸の内層を破壊し始める炎症工程を生ぜしめるか又は刺激することができる。30

【0281】

結腸の内層が破壊されるにつれて、潰瘍が開放性粘液、膿及び血液を形成する。その疾患は通常、直腸領域で始まり、そして最終的に、全大腸中に拡張する。炎症の反復された症状の発現は、瘢痕組織を伴なって、腸及び直腸の壁の肥厚化を導く。結腸組織の死又は販血症は、重度の疾病を生ぜしめる。潰瘍性大腸炎の症状は重症度において変化し、そしてそれらの開始は徐々であるか又は突然であり得る。攻撃は、多くの要因、例えば呼吸器感染又はストレスにより刺激され得る。

【0282】

現在、UCについての有益な治療は存在しないが、処理は、結腸内層における異常炎症工程の抑制に集中される。コルチコステロイド免疫抑制剤(例えば、アザチオプリン、メルカaptoprin及びメトトレキセート)及びアミノサリチレートを包含する処理は、その疾患を処理するために入手できる。しかしながら、免疫抑制剤、例えばコルチコステロイド及びアザチオプリンの長期使用は、骨の微細化、白内障、感染、及び腎臓及び骨髄の効果を包含する重度の副作用をもたらすことができる。現在の治療が好都合でない患者においては、手術が任意である。手術は、全結腸及び直腸の除去を包含する。40

【0283】

慢性潰瘍性大腸炎に部分的に類似するいくつかの動物モデルが存在する。最も広く使用されるモデルは、結腸において慢性炎症及び潰瘍を誘発する、2, 4, 6-トリニトロベンズルホン酸/エタノール(TNBS)誘発された大腸炎モデルである。TNBSが直腸内点滴を

10

20

30

40

50

通して敏感なマウスの結腸中に導入される場合、それは、結腸粘膜において、T-細胞介在性免疫応答を誘発し、この場合、大腸の全壁じゅうへのT-細胞及びマクロファージの強い浸潤により特徴づけされた大量の粘膜浸潤を導く。さらに、この組織病理学的臨床像は、進行性体重の低下（消耗）、出血性下痢、直腸脱出及び大腸壁の肥厚化の臨床学的像を付随する（Neurathなど., Intern. Rev. Immunol. 19: 51-62, 2000）。

【0284】

もう1つの大腸炎モデルは、出血性下痢により明白な急性大腸炎、体重の低下、結腸の短縮、及び好中球浸潤を伴なっての粘膜性潰瘍を誘発する硫酸デキストランナトリウム（DSS）を使用する。DSS誘発された大腸炎は、リンパ過形成、病巣陰窓損傷及び上皮潰瘍を伴なって、粘膜固有層中への炎症細胞の浸潤により組織学的に特徴づけられる。それらの変化は、上皮上へのDSSの毒性効果により、及び粘膜固有層細胞のファゴサイトーシス、及びTNF- α 及びIFN- γ の生成により進行すると思われる。その通常の使用にもかかわらず、ヒト疾患への関連性についてのDSSの機構に関するいくつかの問題点は未解決のままである。DSSは、それがT細胞欠失動物、例えばSCIDマウスにおいて観察されるので、T細胞-無関係モデルとして見なされる。10

【0285】

抗-zcytor17lig抗体又は結合パートナー、可溶性zcytor17含有ポリペプチド（ヘテロダイマー及びマルチマー受容体を包含する）、例えばzcytor17-Fc4又は他の可溶性zcytor17及び融合タンパク質のそれらのTNBS又はDSSモデルへの投与は、症状を改善し、そして胃腸病の経路を変更するためにzcytor17ligアンタゴニズムの使用を評価するために使用され得る。zcytor17ligは、大腸炎における炎症応答において役割を演じ、そしてzcytor17ligアンタゴニズムを投与することによるzcytor17lig活性の中和がIBDに関しての可能性ある治療アプローチである。他の可能性ある治療剤は、zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド、又は抗-zcytor17lig抗体又は本発明の結合パートナー、及び同様のものを包含する。20

【0286】

4. 乾癬：

乾癬は、700万以上のアメリカ人に影響を及ぼす慢性皮膚状態である。乾癬は、新しい皮膚細胞が異常に増殖する場合に生じ、古い皮膚がすばやく十分に脱皮しない皮膚の赤く熱をもち、はれ上がった、鱗状の皮膚パッチをもたらす。最も通常の形であるplaques乾癬は、銀色がかった白色鱗片を上部に有する皮膚の炎症性パッチ（“病変”）により特徴づけられる。乾癬は、少数のplaquesに限定されるか、又は頭皮、膝、肘及び体幹上に最も通常には出現する、中位～強い皮膚領域を包含する。それは高く認識できるが、乾癬は感染性疾患ではない。疾患の病因は、影響された組織の慢性炎症を包含する。zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド又は抗-zcytor17lig抗体又は結合パートナーは、乾癬、他の炎症性皮膚疾患、皮膚及び粘膜アレルギー及び関連する疾患における炎症及び病理学的効果を低めるために価値ある治療剤として作用することができる。30

【0287】

乾癬は、相当な不快性を引き起こすことができる皮膚のT-細胞介在性炎症障害である。それは、治癒せず、そしてすべての年齢の人々に影響を及ぼす疾患である。乾癬は、ヨーロッパ及び北アメリカの人口の約2%に影響する。軽い乾癬を有する個人はしばしば、局部剤によりこれらの疾病を制御することができるが、世界じゅうの10万人以上の患者は、紫外線又は全身性免疫抑制療法を必要とする。不運なことには、紫外線の不便性及び危険性、及び多くの治療の毒性が、それらの長期使用を制限する。さらに、患者は通常、乾癬の再発、及び多くの場合、免疫抑制療法の停止後すぐに、再発を有する。40

【0288】

分化は進行性で且つ動的な工程であり、多能性幹細胞で始まり、そして最終的に分化された細胞で終結する。拘束なしに系統に再生することができる多能生幹細胞は、細胞系統への拘束が行われる場合、失われる一組の分化マーカーを発現する。前駆体細胞は、細胞50

が成熟に向かって細胞系統路を進行する場合に、発現され続けることができても又はできなくても良い一組の分化マーカーを発現する。成熟細胞により独占的に発現される分化マーカーは通常、機能的性質のもの、例えば細胞生成物、細胞生成物を生成するための酵素、及び受容体である。細胞集団の分化の段階は、細胞集団に存在するマーカーの同定によりモニターされる。

【 0 2 8 9 】

最終分化又は脱分化の方の経路に特定細胞型を刺激する化又は調節する因子が、通常の前駆体又は幹細胞に起因する全細胞集団に影響を及ぼすことを示唆する証拠が存在する。

本発明のマルチマーサイトカイン受容体は、造血及び免疫機能の関与する恒常性の細胞の特殊化された細胞機能の増殖、活性化、分化及び/又は誘発又は阻害を刺激するために有用であり得る。特に、本明細書に記載されるようなマルチマーサイトカイン受容体は、造血系の細胞、例えばT細胞、B細胞、単球/マクロファージ、NK細胞、好中球、内皮細胞、線維芽細胞、好酸球、軟骨細胞、肥満細胞、ラングハンス細胞、単球及びマクロファージ、並びに上皮細胞（但し、それらだけには限定されない）の特殊化された細胞機能の増殖、活性化、分化、誘発又は阻害を刺激するために有用である。上皮細胞は、例えばエナメル芽細胞、主細胞、色素体、腸クロム親和細胞、腸クロム親和様細胞、杯細胞、ケラチノサイト、樹状細胞、迷路支持細胞、メラノサイト、メルケル細胞、パーネット細胞、壁細胞、セルトリ細胞及び同様のものを包含する。

【 0 2 9 0 】

本発明はまた、哺乳類における造血細胞及び造血前駆体細胞を低めるための方法を提供する。前記方法は、可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体の不在下で培養される骨髄又は末梢血液細胞に比較して、骨髄又は末梢血液細胞におけるリンパ細胞の数の低下を引き起こすために、有効量の可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体を含んで成る組成物と共に骨髄又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る。前記造血細胞及び造血前駆体細胞は、リンパ細胞、例えば、単球細胞、マクロマージ又はT細胞である。

【 0 2 9 1 】

本発明はまた、抗原又は病原体に対して暴露される哺乳類における免疫応答を阻害するための方法を提供する。前記方法は、(a) 哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；(b) 可溶性マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体、及び医薬的に許容できるピークルを含んで成る組成物を投与し；(c) 哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；そして(d) 段階(b)における抗原又は病原体のレベルに対して、段階(a)における抗原又は病原体のレベルを比較することを包含し、ここで前記レベルの変化は免疫応答の阻害を示す。前記方法は、(e) マルチマー又はヘテロダイマーサイトカイン受容体及び医薬的に許容できるピークルを含んで成る組成物を再投与し；(f) 哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；そして(g) 段階(f)における抗原又は病原体のレベルに対して、段階(a)における抗原又は病原体のレベルを比較し、ここで前記レベルの変化が免疫応答の阻害を示す。

【 0 2 9 2 】

他方では、前記方法は、(a) 抗原又は病原体 - 特異的抗体のレベルを決定し；(b) 可溶性マルチマーサイトカイン受容体及び許容できる医薬的ピークルを含んで成る組成物を投与し；(c) 抗原又は病原体 - 特異的抗体の投与後のレベルを決定し；(d) 段階(c)における抗体のレベルに、段階(a)における抗体のレベルを比較することを包含し、ここで抗体レベルの低下が免疫応答の阻害を示す。

【 0 2 9 3 】

zcytor17ligは、重要な免疫学的機能を有することが知られており、そして免疫系において役割を演じる細胞を含む組織から単離される。zcytor17ligは、CD3+選択された、活性化された末梢血液細胞において発現され、そしてzcytor17lig発現は、T細胞活性化の後、上昇することが示されている。さらに、本明細書における例セクションに記載される実

10

20

30

40

50

験の結果は、本発明のマルチマーサイトカイン受容体が単球/マクロファージ、T-細胞、B-細胞、NK細胞の増殖/拡張、及び/又は単球/マクロファージ、T-細胞、B-細胞、NK細胞又はそれらの細胞の前駆体の分化された状態に対して効果を有することを示す。造血前駆体の増殖を刺激し、そして成熟細胞を活性化する因子は一般的に知られているが、しかしながら増殖及び活性化はまた、追加の成長因子を必要とする。

【0294】

例えば、IL-7及びSteel因子(c-キットリガンド)がNK前駆体のコロニー形成のために必要とされたことが示されている。IL-7及びSteel因子と組合してのIL-15+IL-2はより効果的であった(Mrozekなど., Blood 87:2640, 1996)。しかしながら、未確認のサイトカインが、NK細胞及び/又はNK前駆体の特定サブユニットの増殖のために必要である(Robertsonなど., Blood 76: 2451-2438, 1990)。同様に、zcytor17ligは、単球/マクロファージ、T-細胞、B-細胞、NK細胞の分化の成長、増殖拡張及び変性を増強するために、単独で、又は他のサイトカインと共に相乗的に作用することができる。

【0295】

分化を測定するアッセイは例えば、組織、酵素活性、機能的活性又は形態学的变化の段階-特異的発現に関連する細胞-マーカーを測定することに包含する(Watt, FASEB, 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; すべては引用により本明細書に組み込まれる)。他方では、zcytor17ligポリペプチド自体は、組織の段階-特異的発現に関連する追加の細胞表面又は分泌されたマーカーとして作用することができる。zcytor17ligポリペプチドの直接的な測定、又はそれが分化するにつれての組織における発現のその損失は、組織の分化のためのマーカーとして作用することができる。

【0296】

同様に、zcytor17ligポリペプチドの直接的な測定、又は組織における発現のその損失が、それらが腫瘍の進行を受けるにつれて、組織又は細胞において決定され得る。前癌又は癌状態における細胞の侵襲性及び運動性の上昇、又はzcytor17ligの発現の獲得又は損失が、正常な組織に比較して、腫瘍進行における形質転換、侵襲性及び転移についての診断として作用することができる。進行又は転移の腫瘍段階の知識は、所定の個々の癌患者のために、最も適切な治療又は処理の攻撃性を選択する上で医薬を助けるであろう。

【0297】

発現(mRNA又はタンパク質のいずれかの)の獲得及び損失を測定する方法は、当業界において良く知られており、そして本明細書に記載されており、そしてzcytor17lig発現に適用され得る。例えば、細胞運動性を調節するポリペプチドの出現又は消出が、前立腺癌の診断及び予後を助けるために使用され得る(Banyard, J. and Zetter, B. R., Cancer and Metast. Rev. 17: 449-458, 1999)。細胞運動性のエフェクターとして、発現のzcytor17lig獲得又は損失がリンパ球、B-細胞、上皮、造血、及び他の癌についての診断分析として作用することができる。

【0298】

さらに、腫瘍進行及び転移に対するzcytor17ligの活性及び効果が、インビオで測定され得る。いくつかの同系マウスモデルが、腫瘍進行に対するポリペプチド、化合物又は他の処理の影響を研究するために開発されてきた。それらのモデルにおいては、培養継代された腫瘍細胞が、腫瘍ドナーと同じ株のマウス中に移植される。細胞は、受容体マウスにおいて類似する特徴を有する腫瘍中に増殖し、そして転移がまた、そのモデルのいくつかにおいて生じるであろう。本発明者の研究のための適切な腫瘍モデルは、中でも、Lewis肺癌(ATCC No. CRL-1642)及びB16黒色腫(ATCC No. Crl-6323)を包含する。それらは、インビトロで容易に培養され、そして操作される、C57BL6マウスと同種の通常使用される腫瘍系である。それらの細胞系のいずれかの移植に起因する腫瘍は、C57BL6マウスの肺に転移することができる。

【0299】

Lewis肺癌モデルが最近、脈管形成のインヒビターを同定するためにマウスに使用され

10

20

30

40

50

ている (O'Reilly MS, など. Cell 79: 315-328, 1994)。C57BL6/Jマウスが、組換えタンパク質、アゴニスト又はアンタゴニストの毎日の注入、又は組換えアデノウィルスの1回の注入を通して、実験剤により処理される。この処理に続いて3日で、 $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞が背面の皮膚下に移植される。他方では、細胞自体が、タンパク質が全身的によりもむしろ腫瘍部位で又は細胞内で合成されるよう、移植の前、組換えアデノウィルス、例えばzcytor17ligを発現するアデノウィルスにより感染され得る。マウスは、通常5日以内に眼に見える腫瘍を進行する。腫瘍が3週間までの間、増殖され、この間、それらは対照の処理グループにおいて $1500 - 1800\text{mm}^3$ のサイズに達することができる。腫瘍サイズ及び体重が、その実験を通して注意してモニターされる。

【0300】

10

殺す時点で、腫瘍が、肺及び肝臓と共に除去され、そして計量される。肺の重量が、転移性腫瘍負荷量と相互関係することが示された。さらなる測定として、肺表面転移が計数される。切除された腫瘍、肺及び肝臓が、当業界において知られており、そして本明細書に記載される方法を用いて、組織学的試験、免疫組織化学及び現場ハイブリダイゼーションのために調製される。従って血管構造を回復し、そして転移を受ける腫瘍の能力に対する、問題の発現されたポリペプチド、例えばzcytor17ligの影響が評価され得る。さらに、アデノウィルスとは別に、移植された細胞がzcytor17ligにより一時的にトランスフェクトされ得る。

【0301】

20

安定したzcytor17ligトランスフェクトの使用、及びインビボでのzcytor17lig発現を活性化する誘発性プロモーターの使用は、当業界において知られており、そして転移のzcyt or17lig誘発を評価するためにこのシステムに使用され得る。さらに、精製されたzcytor1 7lig又はzcytor17ligならし培地が、このマウスモデルに直接的に注入され、そして従つて、このシステムに使用される。一般的な文献については、O'Reilly MS, など. Cell 7 9: 315-328, 1994, 及びRusciano D, など、Murine Models of Liver Metastasis, Invasion Metastasis 14: 349-361, 1995を参照のこと。

【0302】

30

本発明の可溶性マルチマーサイトカイン受容体又はそれに対する抗体は、腫瘍形成を処理することにおいて有用であり、そして従つて、癌の処理において有用である。zcytor17 ligは、活性化されたT-細胞、単球及びマクロファージにおいて発現され、そしてヒト染色体の領域に結合され、ここでトランスロケーションが白血病に共通する。さらに、zcyt or17ligは、活性化されたT細胞、単球及びマクロファージにおいてもまた発現されるサイトカイン受容体、すなわちzcytor17マルチマーサイトカイン受容体を通して作用することが示されている。zcytor17ligによる、活性化されたT-細胞、単球及びマクロファージの過剰刺激は、ヒト疾病状態、例えば免疫細胞癌をもたらす。

【0303】

40

zcytor17lig発現を同定すると、ポリペプチド（例えば、抗-zcytor17lig抗体、zcytor 17可溶性マルチマーサイトカイン受容体（例えば、zcytor17受容体、ヘテロダイマー（例えば、zcytor17/OSAMR, zcytor17/WSX-1）、マルチマー（例えば、zcytor17/OSMR /WS X-1））、又は他のzcytor17lig結合パートナー）は、診断剤として作用し、そしてzcytor 17lig増殖活性のアンタゴニストとして作用することができる。リガンドは、従来の化学治療剤及び免疫モジュレーター、例えばインターフェロン を包含する使用において、他の剤と組合して投与され得る。/ インターフェロンは、いくつかの白血病及び動物疾患モデルの処理において効果的であることが示されており、そしてインターフェクト 及びzcytor17ligの増殖阻害効果は付加的である。

【0304】

50

NK細胞は転移性腫瘍細胞の排除において重要な役割を演じると思われ、そして転移及び固形腫瘍を有する患者は、低められたレベルのNK細胞活性を有する(Whitesideなど., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230: 221-244, 1998)。

本発明は、可溶性マルチマーサイトカイン受容体又はそれに対する抗体を含む組成物を

、腫瘍性単球/マクロファージの増殖を低めるのに十分な量、単球/マクロファージ腫瘍を有する哺乳類に投与することを含んで成る、腫瘍性単球/マクロファージの増殖を低めるための方法を提供する。

【0305】

本発明は、単球/マクロファージの活性化又は分化を阻害するための方法を提供する。単球は、それらが成熟し、そしてマクロファージになる種々の組織に移動する、不完全に分化された細胞である。マクロファージは、リンパ球に抗原を提供することによって免疫応答において中心的役割を演じ、そして多くのサイトカインを分泌することによってリンパ球に対するアクセサリー細胞として支持的な役割を演じる。マクロファージは、細胞外分子を取り込み、そして活性化に基づいて、細胞内微生物及び腫瘍細胞を殺害する高められた能力を有する。活性化されたマクロファージはまた、急性又は局部炎症の刺激にも関与している。10

【0306】

もう1つの観点においては、可溶性マルチマーサイトカイン受容体を含む組成物を、腫瘍性B又はT-細胞の増殖を低めるのに十分な量、単球/マクロファージ腫瘍を有する哺乳類に投与することを含んで成る、腫瘍性B又はT-細胞の増殖を低めるための方法を提供する。。

【0307】

zcytor17マルチマーサイトカイン受容体 - サポリン融合トキシンは、類似する組の白血病及びリンパ腫に対して使用され得、その範囲は、サイトカインアンタゴニストにより処理され得る白血病に拡張する。例えば、そのような白血病は、zcytor17受容体（例えば、zcytor17受容体、ヘテロダイマー（例えば、zcytor17/OSAMR, zcytor17/WSX-1）、マルチマー（例えば、zcytor17/OSMR /WSX-1））を過剰発現するそれらである。zcytor17受容体、zcytor17受容体ヘテロダイマー又はマルチマー（例えば、zcytor17/OSAMR, zcytor17/WSX-1又はzcytor17/OSMR /WSX-1）の融合トキシン介在性活性化は、標的細胞の増殖を阻害するための2種の独立した手段を提供し、ここで1つはリガンドのみにより見出される効果と同一であり、そして2つ目は、受容体インターナリゼーションを通してのトキシンの供給のためである。zcytor17受容体のリンパ及び単球制限された発現パターンは、リガンド - サポリン接合体が患者に耐性であることを示唆する。20

【0308】

所定のサイトカインのための受容体の組織分布は、そのサイトカインの作用の可能性ある部位の強い徴候を付与する。zcytor17の発現は単球及びB-細胞に見られ、そしてCD3+、CD4+及びCD8+ T-細胞のための活性化に基づいて発現の劇的な上昇が見られた。さらに、2種の単球細胞系、すなわちTHP-1 (Tsuchiyaなど., Int. J. Cancer 26: 171-176, 1980) 及びU937 (Sundstromなど., Int. J. Cancer 17: 565-577, 1996) は、zcytor17発現に関しては陽性であった。30

【0309】

WSX-1受容体のノザン分析は、試験されるすべての組織において転写体を示し、そしてヒト脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄及び末梢血液リンパ球において、発現の高められたレベルを有した。また、WSX-1の発現レベルは、T-細胞の活性化に基づいて上昇した。40

OSMRの発現は、非常に広いことが報告されている (Mosleyなど., JBC271: 32635-32643, 1996)。zcytor17, WXC-1及びOSMR 受容体のこの分布は、免疫応答、特に活性化に基づいてのT細胞の拡張についての役割、又は免疫系の単球/マクロファージアームにおける役割を支持する。

【0310】

従って、本発明の特定の態様は、炎症及びヒト疾病又は病状、例えば脾炎、I型糖尿病 (IDDM)、脾臓癌、Graves病、炎症性腸疾患 (IBD)、クローン病、結腸及び小腸癌、憩室症、自己免疫疾患、敗血症、器官又は骨髄移植；外傷、手術又は感染による炎症；アミロイドーシス；巨脾腫；対宿主性移植片病において；及び炎症の阻害、免疫抑制、造血、免疫、炎症又はリンパ細胞、マクロファージ、T-細胞 (Th1及びTh2細胞、CD4⁺ 及びCD8⁺)

50

細胞)の増殖の低下、病原体又は抗原に対する免疫応答の抑制の場合、アンタゴニストとしての可溶性マルチマーサイトカイン受容体、例えばzcytor17/WSX-1/OSMR 及びzcytor17/OSMR ヘテロダイマーの使用に向けられる。

【0311】

さらに、活性化された免疫細胞、例えば活性化されたCD4⁺及びCD19⁺細胞におけるzcytor17発現の存在は、zcytor17受容体が、外来性侵入体、例えば微生物及び細胞残骸に対する身体の免疫防御反応に包含され、そして炎症及び癌形成の間、免疫応答において役割を演じることができたことを示した。zcytor17機能に対して作用性又は拮抗性である本発明の抗体及び結合パートナー、例えば可溶性zcytor17マルチマーサイトカイン受容体は、免疫応答及び炎症を改良するために使用され得る。

10

【0312】

zcytor17lig構造及び組織発現は、初期造血又は胸腺細胞発生及び免疫応答調節又は炎症において役割を演じることができる。それらの工程は、1又は複数のサイトカインのそれらの同種受容体への結合に応答しての細胞増殖及び分化の刺激を包含する。このzcytor17ligに関して観察される組織分布の観点から、アゴニスト(天然の受容体を包含する)及びアンタゴニストは、インビトロ及びインビボ用途において莫大な可能性を有する。zcytor17ligアゴニストに同定される化合物は、インビトロ及びインビボで、標的細胞の増殖及び進化を刺激するため有用である。例えば、アゴニスト化合物、zcytor17lig、又は抗-zcytor17lig抗体は、定義された細胞培養培地の成分として有用であり、そして細胞培養において通常使用される血清を置換するために、単独で又は他のサイトカイン及びホルモンと組合して使用され得る。従って、アゴニストは、T-細胞、B-細胞、及びリンパ球及び骨髄性系の他の細胞、及び培養における造血細胞の増殖及び/又は進化又は活性化を特別に促進することにおいて有用である。

20

【0313】

本発明の分子は、免疫系の単級/マクロファージームに特に使用される。そのような活性を評価する方法は知られている。たとえば、インターフェロン(IFN-)は、単核食細胞の有能な活性化因子である。例えば、インターフェロンによるTHP-1細胞(A TCC No. TIB-202)の活性化に基づいてのzcytor17の発現の上昇は、この受容体が単球活性化に包含されることを示唆する。単球は、それらが成熟し、そしてマクロファージによる種々の組織に移動する不完全に分化された細胞である。

30

【0314】

マクロファージは、リンパ球に対する抗原を提供することによって免疫応答における中心的役割を演じ、そして多くのサイトカインを分泌することによってリンパ球に対する補助細胞として補助的役割を演じる。マクロファージは、細胞外分子をインターナライズすることができ、そして活性化に基づいて、細胞内微生物及び腫瘍細胞を殺害する高められた能力を有する。活性化されたマクロファージはまた、急性又は局部炎症を刺激することにおいても包含される。さらに、単球-マクロファージ機能は、種々の疾病状態において異常であることが示されている。例えば、Johnston, RB, New Eng. J. Med. 318: 747-752, 1998を参照のこと。

40

【0315】

当業者は、zcytor17マルチマーサイトカイン受容体のアゴニスト、例えばzcytor17ligが有用であることを認識するであろう。例えば、単球の抑制された移動が、感染の素因を有する集団、例えば新生児、コルチコステロイド又は他の免疫抑制治療を受ける患者、及び真生糖尿病、熱傷又はAIDSを有する患者において報告されている。zcytor17マルチマーサイトカイン受容体のアゴニスト、例えばzcytor17ligは、それらの集団において感染を移動し、そしてたぶん妨げる単球の能力の上昇をもたらすことができた。慢性肉芽腫の疾患を有する患者からの単核食細胞による食細胞性殺害の根深い欠陥がまた存在する。これは、皮下膿瘍、及び肝臓、肺、脾臓及びリンパ節における膿瘍の形成をもたらす。

【0316】

zcytor17マルチマーサイトカイン受容体のアゴニスト、例えばzcytor17ligは、この食

50

細胞欠陥を補正し、又は改良することができた。さらに、欠陥性単球細胞毒性が、癌及びWiskott - Aldrich症候群（湿疹、血小板減少症及び再発性感染）を有する患者において報告されている。zcytor17マルチマーサイトカイン受容体のアゴニスト、例えばzcytor17ligによる単球の活性化は、それらの状態の処理を助けることができる。単球 - マクロファージシステムは、いくつかの脂質 - 貯蔵疾患（スフィンゴリピドーシス）、例えばGaucher's病に優先的に包含される。感染に対する耐性は、zcytor17マルチマーサイトカイン受容体のアゴニスト、例えばzcytor17ligにより処理され得る、マクロファージ - 機能の欠陥のために、低められ得る。

【0317】

さらに、当業者は、zcytor17マルチマーサイトカイン受容体のアンタゴニストが有用であることを認識するであろう。例えばアテローム硬化症性病変においては、最初の異常性の1つは、内皮細胞への単球/マクロファージの局在化である。それらの病変は、zcytor17ligに対するアンタゴニストの使用により妨げられ得る。zcytor17可溶性マルチマーサイトカイン受容体、例えばヘテロダイマー及びトリマーはまた、zcytor17ligに対するアンタゴニストとしても使用され得る。さらに、单芽球性白血病は、マクロファージの生物学的生成物の開放に影響を及ぼす種々の臨床学的異常性により結合され、それらの例としては、血清及び尿における高レベルのリゾチーム及び高熱を包含する。さらに、そのような白血病は、単球細胞の異常上昇を示す。それらの結果は、たぶん、本明細書に記載されるような、zcytor17ligに対するアンタゴニストにより妨げられる。

【0318】

当業界において知られており、そして本明細書に開示される方法を用いて、当業者は、本明細書に開示される疾病状態、例えば炎症、癌又は感染、並びに単球細胞を包含する他の疾病状態におけるzcytor17マルチマーサイトカイン受容体の活性を容易に評価することができた。さらに、zcytor17ligはT-細胞、マクロファージ及び単級・特異的態様で発現され、そしてそれらの疾病が単球細胞の異常性、例えば細胞増殖、機能、局在化及び活性化を包含するので、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド及び抗体は、そのような単球細胞異常性を検出し、そして疾病の存在を示すための特徴として使用され得る。そのような方法は、患者から生物学的サンプル、例えば血液、唾液又は生検を取り、採取し、そしてそれと正常な対照サンプルとを比較することを包含する。

【0319】

組織学的、細胞学的、流動細胞計測性、生化学的及び他の方法が、zcytor17ligの相対的レベル又は局在化、又はzcytor17ligを発現する細胞を測定するために使用され得、すなわち患者サンプルにおける単球が正常対照に比較される。対照と比較しての、zcytor17lig発現のレベル（上昇又は下降）の変化、又は単球の数又は局在化の変化（例えば、それらが正常に存在しない組織における単球細胞の上昇又は浸潤）が、疾病的表示である。そのような診断方法はまた、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド又は抗体に結合される放射分析、蛍光及び比色標識の使用を包含することができる。そのような方法は、当業者において良く知られており、そして本明細書に開示される。

【0320】

zcytor17lig活性を有するアミノ酸配列は、可溶性zcytor17マルチマーサイトカイン受容体を結合し、そして従って、内因性zcytor17lig受容体によるzcytor17ligの結合を妨げることによって免疫系を調節するために使用され得る。zcytor17ligアンタゴニスト、例えばzcytor17ligマルチマーサイトカイン受容体はまた、内因性zcytor17lig受容体によるzcytor17リガンドの結合を阻害することによって免疫系を調節するために使用され得る。従って、本発明は、過剰のzcytor17lig又はzcytor17lig含有受容体のいずれかを生成する対象を処理するために使用され得るマルチマーサイトカイン受容体の使用を包含する。適切な対象は、哺乳類、例えばヒト又は家畜動物を包含する。

【0321】

zcytor17ligは、活性化された単核細胞において発現されることが示されており、そして炎症の調節に包含され得る。本発明のポリペプチドは、アッセイされ、そして炎症を改

10

20

30

40

50

良するために使用され得るか、又は炎症のためのマーカーとして使用され得る。zcytor17の前炎症及び抗炎症性質を決定するための方法は、当業界において知られており、そして本明細書に論じられる。さらに、それは、急性相反応体、例えば血清アミロイドA(SAA)、1-アンチキモトリップシン及びハプトグロビンの生成のアップ-レギュレーションに包含され得る。そしてzcytor17リガンドの発現は、炎症応答に関与するインビボでのリポ多糖(LPS)の注入に基づいて高められ得る(Dumoutier, L.など., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000)。

【0322】

急性相タンパク質、例えばSAAの生成は、炎症が有益である短期生存機構であると思われるが、しかしながら、長い期間、急性相タンパク質の維持が、慢性炎症に寄与し、そしてヒト健康に対して有害であり得る。再考のためには、Uhlar, CM and Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265: 501-523, 1999, 及びBaumann H, and Gauldie, J. Immunology Today 15: 74-80, 1994を参照のこと。さらに、急性相タンパク質SAAは、いくつかの慢性炎症患者の病因に關係し、アテローム硬化症及びリウマチ様関節炎に關与し、そしてアミロイド症において沈着するアミロイドAタンパク質への前駆体である(Uhlar, CM and Whitehead, 前記)。従って、zcytor17ligのためのリガンドが、前炎症性分子として作用し、そしてSAAの生成を誘発する場合、アンタゴニストが、炎症性疾患、及びリガンドにより誘発される急性相応答タンパク質に關連する他の疾病の処理において有用であろう。

【0323】

そのようなアンタゴニストが、本発明により提供される。例えば、炎症を減じるための方法は、炎症を低めるのに十分な量の、可溶性マルチマーサイトカイン受容体の組成物を、炎症を有するか、又はそれを進行する危険性の哺乳類に投与することを含んで成る。さらに、炎症を有する哺乳類における炎症応答を抑制するための方法は、(1) 血清アミロイドAタンパク質のレベルを決定し；(2) 許容できる医薬ビークル中、本明細書に記載されるような可溶性マルチマーサイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る組成物を投与し；(3) 血清アミロイドAタンパク質の後投与レベルを決定し；(4) 段階(3)における血清アミロイドAタンパク質のレベルに、段階(1)における血清アミロイドAタンパク質のレベルを比較することを含んで成り、ここで血清アミロイドAタンパク質の上昇又は下降の欠失が炎症応答の抑制の表示である。

【0324】

zcytor17lig のように、その zcytor17 cDNAに対応する mRNA の組織分布の分析は、mRNA レベルが単球及び前立腺細胞において最高であり、そして活性化された単球、及び活性化された CD4⁺, CD8⁺ 及び CD3⁺ 細胞において高められることを示した。従って、zcytor17受容体は、炎症及び免疫応答の誘発に包含される。従って、本発明の特定の態様は、炎症及びヒト疾病又は病状、例えば肺炎、I型糖尿病(IDDM)、肺腫瘍、Graves病、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病、結腸及び小腸癌、憩室症、自己免疫疾患、敗血症、器官又は骨髄移植；外傷、手術又は感染による炎症；アミロイドーシス；巨脾腫；対宿主性移植片病において；及び炎症の阻害、免疫抑制、造血、免疫、炎症又はリンパ細胞、マクロファージ、T-細胞(Th1及びTh2細胞、CD4⁺ 及び CD8⁺ 細胞)の増殖の低下、病原体又は抗原に対する免疫応答の抑制の場合、アンタゴニストとしての zcytor17lig - 抗体及び zcytor17lig、並びに可溶性 zcytor17受容体ヘテロダイマーの使用に向けられる。

【0325】

さらに、活性化された免疫細胞、例えば活性化された CD4⁺ 及び CD19⁺ 細胞における zcytor17受容体及び zcytor17lig 発現の存在は、zcytor17受容体が、外来性侵入体、例えば微生物及び細胞残骸に対する身体の免疫防御反応に包含され、そして炎症及び癌形成の間、免疫応答において役割を演じることができたことを示した。zcytor17受容体機能に対して作用性又は拮抗性である本発明の zcytor17lig 及び zcytor17lig - 抗体は、免疫応答及び炎症を改良するために使用され得る。

【0326】

さらに、zcytor17マルチマーサイトカイン受容体及びそれに対する抗体を結合する zcyt

10

20

30

40

50

or17ligポリペプチドは、次のことを実施するために有用である：

1) 急性炎症、外傷、組織損傷、手術、敗血症又は感染の結果としての炎症、及び慢性炎症疾患、例えばぜん息、炎症性腸疾患（IBD）、慢性大腸炎、巨脾腫、リウマチ様関節炎、再発性急性炎症性エピソード（例えば、結核）、及びアミロイドーシス及びアラローム硬化症、Castleman病、ぜん息、及び急性相応答の誘発に関連する他の疾患の処理においてzcytor17マルチマーサイトカイン受容体を通してのシグナル化を拮抗するか又は阻止するために；

【0327】

2) zcytor17マルチマーサイトカイン受容体を通して免疫細胞（例えば、リンパ球、単球、白血球）におけるシグナル化を妨げるか又は阻害するために、自己免疫疾患、例えばIDDM、多発性硬化症（MS）、全身性エリテマトーデス（SLE）、重症筋無力症、リウマチ様関節炎及びIBDの処理においてzcytor17受容体を通してのシグナル化を拮抗するか又は阻害するために（Hughes Cなど., J. Immunol. 153: 3319-3325, 1994）；ぜん息、アレルギー及び他のアトピー性疾患は、免疫応答を阻害するか又は攻撃性細胞を消耗するために、例えば可溶性zcytor17マルチマーサイトカイン受容体又はzcytor17/CRF2-4ヘテロダイマーに対するMAbにより処理され得る。

【0328】

本発明のポリペプチド及び抗体を用いて、zcytor17マルチマーサイトカイン受容体を通してシグナル化を阻止し、又は阻害することはまた、脾臓、肝臓及びニューロン細胞の疾患を治療することができる。IDDM、NIDDM、脾炎及び脾癌のためにも有益であり得る。zcytor17マルチマーサイトカイン受容体は、拮抗性MAbが癌増殖を阻害し、そして免疫介在性殺害を標的化する、癌のMAb治療のための標的物として作用することができる（Holliger P. and Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998）。可溶性zcytor17受容体モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマーに対するMAbはまた、腎症、糸球体硬化症、膜ニューロパシー、アミロイドーシス（他の組織の中で腎臓に影響を及ぼす）、腎動脈硬化症、種々の起原の糸球体腎炎、腎臓の線維増殖疾患、及びSLE、IDDM、I型糖尿病（NIDDM）、腎腫瘍及び他の疾患に関連する腎機能不全を処理するためにも有用であり；

【0329】

3) 自己免疫疾患、例えばIDDM、MS、SLE、重症筋無力症、リウマチ様関節炎及びIBDの処理においてzcytor17マルチマーサイトカイン受容体を通してのシグナル化を作用するか又は開始するために；zcytor17ligは、分化するリンパ球又は他の免疫細胞をシグナル化し、増殖を変更し、又は自己免疫性を改良する、サイトカイン又は細胞表面タンパク質の生成を変えることができる。特に、サイトカイン分泌の他のパターンに対するT-ヘルパー細胞応答の調節が、疾病を改善するために自己免疫応答を偏向することができる（Smit h SAなど., J. Immunol. 160: 4841-4849, 1998）。同様に、zcytor17ligは、ぜん息、アレルギー及びアトピー性疾患に関する免疫細胞を表示し、消耗し、そして偏向するために使用され得る。

【0330】

zcytor17マルチマーサイトカイン受容体によるシグナル化はまた、脾臓、腎臓、下垂体及びニューロン細胞の疾患に有益であり得る。IDDM、NIDDM、脾癌のためにも有益であり得る。zcytor17マルチマーサイトカイン受容体は、シグナル化MAbが癌増殖を阻害し、そして免疫介在性殺害を標的化する、脾臓のMAb治療のための標的物として作用することができる（Tutt、ALなど., J. Immunol. 161: 3175-3185, 1998）。同様に、T-細胞特異的白血病、リンパ腫、血漿細胞悪液質（例えば、多発性骨髄腫）及び癌は、本発明のzcytor17含有の可溶性受容体に対するモノクローナル抗体（例えば、中和性抗体）により処理され得る。

【0331】

本明細書に記載される可溶性zcytor17マルチマーサイトカイン受容体は、上記に記載されるような自己免疫疾患、アトピー性疾患、NIDDM、脾炎及び腎機能不全の処理においてz

10

20

30

40

50

cytor17受容体リガンド活性を中和するか、又は阻止するために使用され得る。可溶性形のzcytor17マルチマーサイトカイン受容体は、T細胞により介在される抗体応答を促進するために、及び/又はリンパ球又は他の免疫細胞によるIL-4又は他のサイトカインの生成を促進するために使用され得る。

【0332】

可溶性zcytor17マルチマーサイトカイン受容体は、zcytor17ligのアンタゴニストとして有用である。そのようなアンタゴニスト効果は、直接的な中和又はその天然のリガンドの結合により達成され得る。アンタゴニスト使用の他に、可溶性受容体は、zcytor17ligを結合し、そしてそのzcytor17ligを身体内の異なった組織、器官及び細胞に輸送するために、キャリヤー又はビーグルタンパク質として作用することができる。本発明の可溶性受容体は、特定の部位、例えば組織、特定の免疫細胞、単球又は腫瘍に可溶性受容体-リガンド複合体を方向づける、分子、ポリペプチド又は化学的成分に融合されるか又はカッティングされ得る。例えば、急性感染又はいくつかの癌においては、有益性は、炎症及び局部急性相応答タンパク質の誘発に起因することができる。従って、本明細書に記載される可溶性受容体又はそれに対する抗体は、前 - 炎症性zcytor17ligリガンドの作用を特異的に方向づけるために使用され得る。Cosman, D. Cytokine 5: 95-106, 1993; 及びFernandez - Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9: 497-513, 2000を参照のこと。

【0333】

さらに、可溶性zcytor17マルチマーサイトカイン受容体は、分解又はクリアランスからリガンドを安定化するか、又は身体内の作用の部位にリガンドを標的化することによって、リガンドの生物利用性及び/又は治療効力を高めるために、zcytor17ligの安定化のために使用され得る。例えば、天然に存在するIL-6/可溶性IL-6R複合体は、IL-6を安定化し、そしてgp130受容体を通してシグナル化することができる。Cosman, D. 前記及びFernandez - Botran, R. 前記を参照のこと。さらに、zcytor17は、リガンド/可溶性受容体複合体を含むよう、同種リガンド、例えばそのリガンドと共に組合され得る。そのような複合体は、コンパニオン受容体サブユニットを提供する細胞からの応答を刺激するために使用され得る。zcytor17マルチマーサイトカイン受容体/zcytor17lig複合体の細胞特異性は、単独で投与されるリガンドについて見られるその特異性とは異なる。

【0334】

さらに、前記複合体は、異なった薬力学的性質、例えば影響を及ぼす半減期、用量/応答性及び器官又は組織特異性を有する。従って、zcytor17マルチマーサイトカイン受容体/リガンド複合体は、免疫応答を増強し、又は糸球体間質細胞又は肝細胞を刺激するためにアゴニスト活性を有することができる。他方では、IL6/IL6R複合体に対する応答に類似する複合体とヘテロダイマー化するシグナル化サブユニットを発現する組織のみが、影響され得る(Hirota H. など., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 4862-4866, 1995; Hirano, T. in Thamason, A. (ED.) "The Cytokine Handbook", 3rd ED., p. 248-209)。IL12及びCNTFのための可溶性受容体/サイトカイン複合体は、類似する活性を示す。

【0335】

zcytor17ligはまた、リガンドの循環レベルの検出のために、及び急性相炎症応答の検出において、診断システム内で使用され得る。関連する態様においては、zcytor17ligに特異的に結合する抗体又は他の剤は、循環性zcytor17ligポリペプチドを検出するために使用され得；逆に言えば、zcytor17lig自体が、循環性又は局部的に作用するリガンドポリペプチドを検出するために使用され得る。リガンド又は受容体ポリペプチドの高められた又は低められたレベルが、炎症又は癌を包含する病理学的状態の表示であり得る。さらに、急性相タンパク質又は分子、例えばzcytor17ligの検出は、一定の疾病状態(例えば、リウマチ様、関節炎)における慢性炎症状態の表示であり得る。そのような状態の検出は、疾病診断を助け、そして正しい治療の医者による選択を助けるよう作用する。

【0336】

zcytor17マルチマーサイトカイン受容体をコードするポリヌクレオチドは、zcytor17lig活性を高め、又は阻害することが所望される遺伝子治療用途内で有用である。哺乳類が

10

20

30

40

50

突然変異誘発されたzcytor17遺伝子を有するか、又はそれを欠いている場合、zcytor17遺伝子が哺乳類の細胞中に導入され得る。1つの態様においては、zcytor17マルチマーサイトカイン受容体をコードする遺伝子がウィルスベクターにおいてインビボで導入される。そのようなベクターは、弱毒化された又は欠陥DNAウィルス、例えばヘルペス単純ウィルス(HSV)、乳頭種ウィルス、エプスタイン・バールウィルス(EBV)、アデノウィルス、アデノ関連ウィルス(AAV)及び同様のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0337】

ウィルス遺伝子を完全に又はほとんど完全に欠いている欠陥ウィルスが好ましい。欠陥ウィルスは、細胞中への導入の後、感染性ではない。欠陥ウィルスベクターの使用は、ベクターが他の細胞を感染することを心配しないで、特定の局在化された領域における細胞への投与を可能にする。特定のベクターの例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：欠陥ヘルペスウィルス1(HSV1)ベクター(Kaplittなど.., Molc. Cell. Neurosci. 2: 320-30, 1991)、弱毒化されたアデノウィルスベクター、例えばStratford-Perricaudatなど..(J. Clin. Invest. 90: 626-30, 1992)により記載されるベクター、及び欠陥アデノ・関連ウィルスベクター(Samulskiなど.., J. Virol. 61: 3096-101, 1987; Samulskiなど.., J. Virol. 63: 3822-28, 1989)。

【0338】

本発明のzcytor17遺伝子は、次の文献に記載のようにして、レトロウィルスベクターに導入され得る：Andersonなど.., アメリカ特許第5,399,346号；Mannなど.., Cell 33: 153, 1983; Teminなど.., アメリカ特許第4,650,764号；Teminなど.., アメリカ特許第4,980,289号；Markowitzなど.., J. Virol. 62: 1120, 1988; Teminなど.., アメリカ特許第5,124,263号；Doughertyなど.., WIPO Publication WO95/07358号；及びkuoなど.., Blood 82: 845-52, 1993。他方では、ベクターは、リポソームを用いてのインビボリポフェクションにより導入され得る。合成力チオニン脂質が、マーカーをコードする遺伝子のインビボトランスフェクションのためのリポソームを調製するために使用され得る(Felgnerなど.., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-17, 1987; 及びMackeyなど.., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8027-31, 1988)。

【0339】

インビボで特定の器官中に外因遺伝子を導入するためへのリポフェクションの使用は、一定の実際的な利点を有する。特定細胞へのリポソームの分子標的化は、1つの領域の利点を表す。より特定には、特定細胞へのトランスフェクションの方向づけは、1つの有益な分野を提供する。例えば、特定細胞型へのトランスフェクションの方向づけが、細胞異質性を有する組織、例えば臍臓、肝臓、腎臓及び脳において特に好都合であることは明白である。脂質は、標的化のために他の分子に科学的に得られる。標的化されたペプチド、例えばホルモン又は神経伝達物質、及びタンパク質、例えば抗体又は非ペプチド分子は、化学的にリポソームに結合され得る。

【0340】

身体から細胞を除去し、そして裸DNAプラスミドとしてベクターを導入し、そして次に、身体中に形質転換された細胞を再移植することは可能である。遺伝子治療のための裸DNAベクターは、所望する宿主細胞中に、当業界において知られている方法、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、トランスタクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子ガンの使用、又はDNAベクタートransporterの使用により導入され得る(例えば、Wuなど.., J. Biol. Chem. 267: 963-7, 1992; Wuなど.., J. Biol. Chem. 263: 14621-24, 1988)。

【0341】

アンチセンス方法は、zcytor17マルチマーサイトカイン受容体遺伝子転写を阻害するために、例えばインビボでの細胞増殖を阻害するために使用され得る。zcytor17-コードのポリヌクレオチドのセグメントに対して相補的であるポリヌクレオチド(例えば、配列番号110、108、又は4に示されるようなポリヌクレオチド)は、zcytor17lig-コードのmRNAに結合し、そしてそのようなmRNAの翻訳を阻害するよう企画される。そのようなアンチ

10

20

30

40

50

センスポリヌクレオチドは、細胞培養物、又は対象において、*zcyt17lig*ポリペプチド - コードの遺伝子の発現を阻害するために使用される。

【0342】

“トランスジェニックマウス”として言及される、*zcyt17lig*遺伝子を発現するように構築されたマウス、及び“ノックアウトマウス”として言及される、*zcyt17lig*遺伝子機能の完全な不在を示すマウスがまた、生成され得る (Snouwaertなど., Science 257: 1083, 1992; Lowellなど., Nature 366: 740-742, 1993; Capecchi, Science 244: 1288-1292, 1989; Palmiterなど., Annu. Rev. Genet. 20: 465-499, 1986)。例えば、偏在的に、又は組織 - 特異的又は組織 - 制限されたプロモーター下で*zcyt17lig*を過剰発現するトランスジェニックマウスは、過剰発現が表現型を引き起こすかどうかを決定するために使用され得る。

【0343】

例えば、野生型*zcyt17lig*ポリペプチド、そのポリペプチドフラグメント又は変異体の過剰発現は、正常な細胞工程を変更することができ、*zcyt17lig*発現が機能的に適切であり、そして*zcyt17lig*、そのアゴニスト又はアンタゴニストのための治療標的物を示すことができる組織を同定する表現型をもたらす。例えば、構築する好ましいトランスジェニックマウスは、*zcyt17lig*(配列番号2のアミノ酸残基23~164; 又は配列番号11の24~163)を過剰発現するマウスである。さらに、そのような過剰発現は、ヒト疾患との類似性を示す表現型をもたらすことができる。同様に、ノックアウト*zcyt17lig*マウスは、*zcyt17lig*がインビボで絶対的に必要とされる場所を決定するために使用され得る。

【0344】

ノックアウトマウスの表現型は、*zcyt17lig*アンタゴニスト、例えば可溶性*zcyt17*マルチマーサイトカイン受容体が有することができるインビボ効果を予測することができる。本明細書に記載されるヒト又はマウス*zcyt17lig* cDNAは、ノックアウトマウスを生成するために使用される。それらのマウスは、*zcyt17lig*遺伝子及びそれによりコードされるタンパク質をインビボシステムにおいて研究するために使用され得、そして対応するヒト疾患のためのインビボモデルとして使用され得る。さらに、本明細書に記載される、*zcyt17lig*に対して向けられた、*zcyt17lig*アンチセンスポリヌクレオチド又はリボザイムのトランスジェニックマウス発現がまた、上記トランスジェニックマウスと同じようにして使用され得る。研究は、精製された*zcyt17lig*タンパク質の投与により行われ得る。

【0345】

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20~543を含んで成るポリペプチド及び少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部を含んで成る、有効量の可溶性マルチマーサイトカイン受容体；及び医薬的に許容できるビークルを含む組成物を提供する。前記ポリペプチドは、配列番号111、109及び/又は5の細胞外ドメインの種々のフラグメント又は一部、例えば配列番号111のアミノ酸残基20~227、及び配列番号111のアミノ酸残基20~519から構成され得る。少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部は、例えば配列番号9の一部及び/又は配列番号7の一部、例えば配列番号7のアミノ酸残基28~429、配列番号7のアミノ酸残基35~137、配列番号7のアミノ酸残基240~342、配列番号7のアミノ酸残基348~429、配列番号7のアミノ酸残基28~739、及び/又はそれらの組合せを含むことができる。マルチマーサイトカイン受容体のさらに、本明細書に記載されるような親和性標識を含むことができる。

【0346】

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20~227を含んで成るポリペプチド及び少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部を含んで成る、有効量の可溶性マルチマーサイトカイン受容体；及び医薬的に許容できるビークルを含む、免疫細胞阻害性組成物を提供し、ここで可溶性マルチマーサイトカイン受容体が免疫細胞の増殖を阻害する。

10

20

30

40

50

本発明はまた、配列番号111のアミノ酸残基20～227を含んで成るポリペプチド及び少なくとも1つのクラスIサイトカイン受容体の少なくとも一部を含んで成る、有効量の可溶性マルチマーサイトカイン受容体；及び医薬的に許容できるビーグルを含む、炎症細胞阻害性組成物を提供し、ここで可溶性マルチマーサイトカイン受容体が免疫細胞の増殖を阻害する。

【0347】

実験的証拠は、皮膚又は内表面の上皮、例えば大腸、小腸、脾臓、肺、前立腺、子宮及び同様のものを包含する、疾病の進行におけるzcytor17ligについての役割を示す。最初に、本明細書に開示されるように、OSM受容体 及びzcytor17を包含するzcytor17受容体は、上皮細胞に位置するいくつかの細胞型、例えば肺上皮、肺線維芽細胞、前立腺、結腸、乳房、肺上皮、骨及び皮膚上皮、骨線維芽細胞及び同様のものに由来する細胞系において発現される。さらに、本明細書に開示されるように、それらの細胞型の個々からの例は、STATレポーター構造体のzcytor17lig活性化に応答した。さらに、いくつかの細胞系が、本明細書に記載されるような高められたレベルのIL-6, IL-8, MCP-1(走化性因子)を生成することによりzcytor17lig刺激に応答した。

【0348】

全体的に、それらのデータは、次の疾病におけるzcytor17ligについての役割を示す：アトピー性皮膚炎；皮膚炎；乾癬；乾癬性関節炎；湿疹；歯肉炎、歯周病；炎症性腸疾患（IBD）（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病）；生殖疾患、例えば子宮頸部形成異常、子宮頸部癌；他の皮膚病、例えば皮膚癌；肉腫、メラノーマ、等、すなわち免疫系が癌の活性化/治癒に関与するので、炎症性疾患ではない；バリア機能不全に関与する疾患、例えば対宿主性移植片病（GVHD）及び刺激性腸症候群（IBS）；及び肺皮膚に関与する疾病、及び喘息、気腫、及び同様のもの。さらに、zcytor17ligに暴露された細胞によるサイトカインIL-6, IL-8及びMCP-1の開放は、zcytor17ligが炎症に関与することを示唆する。

【0349】

従って、zcytor17ligの調節が、受容体を発現する組織に関連する、自己免疫性、炎症性又は癌性疾患の処理において有用である。それらの疾患は、例えば前立腺炎、肝炎、変形性関節炎及び同様のものを包含する。zcytor17ligは、それらの疾患を、陽性的に又は陰性的に、直接的に又は間接的に調節することができる。従って、zcytor17ligの投与は、zcytor17lig活性を阻害する分子、例えばzcytor17ligに対するモノクローナル抗体又はzcytor17に対するモノクローナル抗体、又はzcytor17及びOSM受容体 複合体を確認するモノクローナル抗体により、本明細書に記載されるような疾患を直接的に処理するために使用され得る。

【0350】

データはまた、zcytor17ligがTH2 T-細胞介在性疾病の調節に関与することを示唆する。第1に、zcytor17ligは、TH2サブセットの活性化されたT細胞により製造される。TH2細胞は、TH1細胞に比較して、より一層のzcytor17ligを発現する。さらに、少なくとも2種の肺上皮細胞系（SK-LU-1, A549）が、本明細書に記載されるようなzcytor17リガンド刺激に応答してIL-13受容体 - 2 mRNAを高めるために刺激された。IL-13受容体の2鎖、及びヒト乳及び脾臓腫瘍形成の関連性が存在する。これは、zcytor17ligが、それらのタイプの癌、及び他の癌の腫瘍形成の調節において役割を演じることができることを示唆する。従って、zcytor17ligアンタゴニストの投与、又はzcytor17ligの直接的な使用は、それらのタイプの癌（良性又は悪性）の処理において、及び種々の等級（I - IV等級）及び段階（例えば、TNM又はAJC段階方法）の腫瘍進行で、哺乳類、好ましくはヒトにおいて有用であり得る。

【0351】

IL-3が活性化されたTH2細胞の生成に、及びTH2介在性疾病、例えば喘息、アトピー性皮膚炎、及び同様のものに関与することは、当業界において良く知られている。zcytor17lig又はzcytor17ligアンタゴニストは、TH2 T-細胞に関与する疾病的処理において有用である。これは、疾病、例えばアトピー性皮膚炎、喘息、及び活性化されたTH2細胞により悪

10

20

30

40

50

化される他の疾病を包含する。疾病、例えばアトピー性皮膚炎へのzcytor17ligの関与がまた、zcytor17ligを過剰発現し、そして本明細書に記載されるようなアトピー性皮膚炎の症状を進行するトランスジェニックマウスの表現型によっても支持される。

【0352】

Zcytor17ligのTH2細胞による選択的発現にかかわらず、TH1細胞及びCD8+ T-細胞におけるzcytor17ligのいくらかの発現が存在する。従って、zcytor17lig又はそのアンタゴニストは、活性化されたT-細胞の免疫調節に関する疾患、例えばウィルス感染、癌、移植変拒絶及び同様のものの処理において有用であり得る。

【0353】

zcytor17ligはまた、癌の進行にも関与している。ヒト骨線維芽細胞骨肉腫、ヒト皮膚線維芽細胞メラノーマ、結腸上皮癌、腺癌、乳房上皮腺癌、前立腺上皮腺肉腫、及び肺上皮腺肉腫及び癌におけるzcytor17及びOSM受容体 受容体の発現が存在する。従って、zcytor17lig、そのフラグメント又はzcytor17ligアンタゴニストのいずれかにより、上皮起源の腫瘍、例えば癌、腺癌及びメラノーマ（但し、それだけには限定されない）を処理することが有用である。それにもかかわらず、zcytor17lig又はzcytor17ligアンタゴニストは、癌を処理するために、又は癌の1又は複数の症状を低めるために使用され得、ここで前記癌は、鱗状細胞又は類表皮癌、基底細胞癌、腺癌、乳頭腫、囊胞腺癌、気管支原性癌、気管支腺癌、メラノーマ、腎細胞癌、肝細胞癌、移行細胞癌、纖毛癌、精上皮腫、胚癌、唾液腺起源の悪性混合腫瘍、Wilms腫瘍、未成熟奇形腫、奇形癌、及び上皮起源の少なくともいくらかの細胞を包含する他の主要を包含するが、但しそれだけには限定されない。

10

20

30

40

50

【0354】

一般的に、投与されるzcytor17ligポリペプチド（又はzcytor17lig類似体又は融合タンパク質）の用量は、患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状態及びこれまでの医学的歴史のような要因に依存して変化するであろう。典型的には、約1 pg/kg ~ 10mg/kg（剤の量/患者の体重）の範囲でのzcytor17ligポリペプチドの用量（但し、それよりも低いか又は高い用量もまた、環境が指図する場合、投与され得る）を、受容体に供給することが所望される。当業者は、当業界において知られている方法を用いて、そのような用量及びそれに対する調節を容易に決定することができる。

【0355】

zcytor17マルチマー受容体アゴニスト又はアンタゴニストの対象への投与は、局部カテーテルを通しての灌流によるか又は直接的な病変内注入による、局部、吸入、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、鞘内投与であり得る。注射により治療用タンパク質を投与する場合、投与は連続的注入によるか、又は一回又は複数回のボーラスによることができる。

【0356】

投与の追加経路は、経口、粘膜、肺及び経皮を包含する。経口供給は、ポリエステル微小球、ゼイン微小球、プロテイノイド微小球、ポリシアノアクリレート微小球及び脂質基剤システムのために適切である（例えば、DiBase and Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Protein", in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), p.255-288 (Plenum Press 1977) を参照のこと）。鼻腔内供給の実行可能性は、インスリン投与のそのような態様により例示される（例えば、Hinchcliffe and Illium, Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 199 (1997) を参照のこと）。

【0357】

zcytor17マルチマー受容体アゴニスト又はアンタゴニストを含んで成る乾燥又は液体粒子は、乾燥 - 粉末分散機、液体エーロゾル発生器又はネブライザーの助けにより調製され、そして吸入され得る（例えば、Pettit and Gombotz, TIBTECH 16: 343 (1998); Patton など., Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 235 (1999) を参照のこと）。このアプローチは、エーロゾル化されたインスリンを肺に供給する電動吸入器であるAERX糖尿病治療システムにより例示される。研究によれば、48,000kDaほどの大きなタンパク質が、経皮投与の実

行可能性を例示する、低周波超音波の助けにより治療濃度で皮膚を通して供給されることが示された (Mitragotriなど., Science 269: 850 (1995))。エレクトロポレーションを用いての経皮供給は、zcytor17マルチマー受容体結合活性を有する分子を投与するもう1つの手段を提供する (Pottsなど., Pharm. Biotechnol. 10: 213 (1997))。

【0358】

zcytor17マルチマー受容体結合活性を有するタンパク質、ポリペプチド又はヘプチドを含んで成る医薬組成物は、医薬的に有用な組成物を調製する既知の方法に従って配合され得、それによれば、治療用タンパク質が医薬的に許容できるキャリヤーと共に混合される。組成物は、その投与が受容体患者により許容され得る場合、“医薬的に許容できるキャリヤー”であると言われる。無菌リン酸緩衝溶液は、医薬的に許容できるキャリヤーの1つの例である。他の適切なキャリヤーは、当業者に良く知られている。例えば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995) を参照のこと。10

【0359】

治療のためには、zcytor17マルチマー受容体結合活性を有する分子及び医薬的に許容できるキャリヤーが、治療的に有効な量で患者に投与される。zcytor17マルチマー受容体結合活性を有するタンパク質、ポリペプチド又はペプチド、及び医薬的に許容できキャリヤーの組み合わせは、その投与される量が生理学的に有意である場合、“治療的に有効な量”で投与されると言われる。剤は、その存在が受容体患者の生理学において検出される変化をもたらす場合、生理学的に有意である。例えば、炎症を処理するために使用される剤は、その存在が炎症応答を緩和する場合、生理学的に有意である。20

【0360】

zcytor17lig (又はzcytor17lig類似体又は融合タンパク質)を含んで成る医薬組成物は、液体形、エーロゾル、又は固体形で維持され得る。液体形は、注射用溶液、エアロゾル、液滴、局部溶液及び経口懸濁液により例示される。典型的な固体形は、カプセル、錠剤及び調節された開放形を包含する。後者の形は、ミニ浸透ポンプ及び移植体により例示される (Bremerなど., Pharm. Biotechnol. 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," in Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), pages 95-123 (CRC Press 1995); Bremerなど., "Protein Delivery with Infusion Pump-s," in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), Pages 239-254 (Plenum Press 1997); Yeweyなど., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), Pages 93-117 (Plenum Press 1997))。他の個体形は、クリーム、ペースト、他の局部適用、及び同様のものを包含する。30

【0361】

リポソームは、治療用ポリペプチドを、患者に、静脈内、腹膜内、鞘内、筋肉内、皮下、又は経口、吸入又は鼻腔内供給するための1つの手段を提供する。リポソームは、水性区画を取り組む1又は複数の脂質二層から成る微小ビーグルである (一般的には、Bakker Woudenbergなど., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Suppl. 1): S61 (1993), Kim Drugs 46:618 (1993), and Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," in Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), pages 3-24 (CRC Press 1995)を参照のこと)。40

【0362】

リポソームは、組成において細胞膜に類似し、そして結果として、リポソームは安全に投与され、そして生分解性である。調製方法に依存して、リポソームは、単層又は多層性であり得、そしてリポソームは0.02 μm~10 μm以上の範囲の直径でサイズ的に変化することができる。種々の剤がリポソームに封入され得る:疎水性剤は二層に分割され、そして親水性剤は内部水性空間内に封入される (例えば、Mackyなど., Liposomes In Cell Biology and Pharmacology (John Libbey 1987), 及びOstroなど., American J. Hosp. Pharm. 46: 1576 (1989) を参照のこと)。さらに、リポソームサイズ、二層の数、脂質組成50

、及びリポソームの電荷及び表面性質を変えることにより、封入される剤の治療利用性を調節することが可能である。

【0363】

リポソームは、実質的にいずれかのタイプの細胞に吸着することができ、そして次に、封入された剤をゆっくりと開放する。他方では、吸収されたリポソームは、食細胞性である細胞によりエンドサイト・シス化され得る。エンドサイト・シスに続いて、リポソーム脂質のリソソーム内分解が伴ない、そして封入された剤が開放される (Scherphofなど.., Ann. N.Y. Acad. Sci. 446: 368 (1985))。静脈内投与の後、小さなリポソーム (0.1~1.0 μm) は、典型的には、肝臓及び脾臓に主として位置する網内細胞系の細胞により摂取されるが、ところが3.0 μmよりも大きなリポソームは肺に沈着される。網内細胞系の細胞による小さなリポソームのこの好ましい摂取は、マクロファージ及び肝臓の腫瘍に化学治療剤を供給するために使用されて来た。10

【0364】

網内細胞系は、いくつかの方法、例えば多量のリポソーム粒子による飽和、又は薬理学的手段による選択的マクロファージ不活性化により回避され得る (Claassenなど.., Biochim. Biophys. Acta 802: 428 (1984))。さらに、リポソーム膜中への糖脂質 - 又はポリエチレンギリコール - 誘導されたリン脂質の組み込みは、網内細胞系による有意に低められた摂取をもたらすことが示されている (Allenなど.., Biochim. Biophys. Acta 1068: 133 (1991); Allenなど.., Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993))。20

【0365】

リポソームはまた、リン脂質組成を変えることによって、又はリポソーム中に受容体又はリガンドを挿入することによって、特定の細胞又は器官を標的化するために調製され得る。例えば、高い含有率の非イオン性界面活性剤により調製されたリポソームが、肝臓を標的化するために使用されて来た (Hayakawaなど.., 日本特許04-244,018号; Katoなど.., Biol. Pharm. Bull. 16: 960 (1993))。それらの配合物は、メタノールにおいて、大豆ホスファチジルコリン、 - トコフェロール及びエトキシリ化され、水素付加されたヒマシ油 (HCO-60) を混合し、前記混合物を真空下で濃縮し、そして次に、前記混合物を水により再構成することによって調製された。大豆由来のステリルグルコシド混合物 (SG) 及びコレステロール (Ch) と共にジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) のリポソーム配列物はまた、肝臓を標的化することが示されている (Shimizuなど.., Biol. Pharm. Bull. 20: 881 (1997))。30

【0366】

他方では、種々の標的化リガンドが、リポソーム、例えば抗体、抗体フラグメント、炭水化物、ビタミン及び輸送タンパク質の表面に結合され得る。例えば、リポソームは、肝臓細胞の表面上で独占的に発現されるアシアログリコプロテイン (ガラクトース) 受容体標的化するために、枝分かれ型のガラクトシル脂質誘導体により変性され得る (Kato and Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst. 14: 287 (1997); Murahashiなど.., Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997))。同様に、Wuなど.., Hepatology 27: 772 (1988) は、アジアロフェチュインによるリポソームのラベリングが短くされたリポソーム結晶半減期を導き、そしてアジアロフェチュイン - ラベルされたリポソームの肝細胞による摂取を非常に高めたことを示している。40

【0367】

他方では、枝分かれ型のガラクトシル脂質誘導体を含んで成るリポソームの肝臓蓄積が、アジアロフェチュインの前注入により阻害され得る (Murahashiなど.., Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997))。ポリアコニチル化されたヒト血清アルブミンリポソームは、肝臓細胞へのリポソームの標的化のためのもう1つのアプローチを提供する (Kampsなど.., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11681 (1997))。さらに、Gehoなど.., (アメリカ特許第4,603,044号) は、肝臓の特殊化された代謝細胞に関連する肝胆管受容体に対する特異性を有する、肝細胞 - 指図されたリポソーム小胞供給システムを記載する。

【0368】

10

20

30

40

50

組織標的化へのより一般的なアプローチにおいては、標的細胞は、標的細胞により発現されるリガンドに対して特異的な、ビオチニル化された抗体によりプレラベルされる (Harasymなど., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 99 (1998))。遊離抗体の血漿排除の後、ストレプタビシン - 接合されたりポソームが投与される。もう1つのアプローチにおいては、標的化抗体は、リポソームに直接的に結合される (Harasymなど., *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 32: 99 (1998))。

【0369】

*zcytor17マルチマー受容体結合活性を有するポリペプチド*は、タンパク質のマイクロカプセル封入の標準技法を用いて、リポソーム内に封入され得る (例えばAndersonなど., *Infect. Immun.* 31: 1099 (1981), Andersonなど., *Cancer Res.* 50: 1853 (1990), and Cohenなど., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991), Alvingなど., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in *Liposome Technology*, 2nd Edition, Vol. III, Gregoriadis (ed.), page 317 (CRC Press 1993), Wassefなど., *Meth. Enzymol.* 149: 124 (1987)を参照のこと)。上記に示されるように、治療的に有用なリポソームは、種々の成分を含むことができる。例えば、リポソームは、ポリ(エチレングリコール)の脂質誘導体を含むことができる (Allenなど., *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9 (1993))。

【0370】

分解性ポリマー微小球が、治療用タンパク質の高い全身レベルを維持するため企画された。微小球は、分解性ポリマー、例えばポリ(ラクチド - コ - グリコリド) (PLG)、ポリ無水物、ポリ(オルトエステル)、モノ生分解性エチルビニルアセテートポリマー (タンパク質がポリマー封入される) から調製される Gombotz and Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery." In *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 51-93 (CRC Press 1995); Roskos and Makiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 45-92 (Plenum Press 1997); Bartusなど., *Science* 281:1161 (1998); Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)。ポリエチレングリコール(PEG)被覆された超微小球はまた、治療用タンパク質の静脈内投与のためのキャリヤーを提供することができる (例えば、Grefなど., *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997) を参照のこと)。

【0371】

本発明はまた、上記で論じられたように、ポリペプチドがポリマーにより結合されている、結合 *zcytor17マルチマー受容体活性*、例えば *zcytor17マルチマー受容体ヘテロダイマー*又は *マルチマー可溶性受容体*を有する化学的に変性されたポリペプチド、及び *zcytor17マルチマー受容体アンタゴニスト*、例えば抗-*zcytor17マルチマー受容体抗体*又は結合ポリペプチドを企画する。

【0372】

他の用量形は、例えば、Anset and Popovich. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), Remington's *Pharmaceutical sciences*. 19th Edition (Mack Publishing Company 1995) により、及びRanade and Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996) により示されるよう、当業者により考案され得る。

【0373】

例示のように、医薬組成物は、*zcytor17マルチマー受容体細胞外ドメイン*、例えば*zcytor17マルチマー受容体ヘテロダイマー*又は*マルチマー可溶性受容体*、又は*zcytor17マルチマー受容体アンタゴニスト* (例えば、*zcytor17マルチマー受容体ポリペプチド*を結合する中和性抗体又は抗体フラグメント)と共に1つのポリペプチドを含んで成る容器を含んで成るキットとして供給され得る。治療用ポリペプチドは、单一又は複数回の用量のための注射用溶液の形で、又は注射の前、再構成されるであろう無菌粉末として供給され得る。

10

20

30

40

50

他方では、そのようなキットは、治療用ポリペプチドの投与のための乾燥粉末分散機、液体エーロゾル発生機又はネブライザーを包含することができる。そのようなキットはさらに、医薬組成物の指示及び使用法に対する文書での情報を包含する。さらに、そのような情報は、*zcytor17*マルチマー受容体組成物が、*zcytor17*マルチマー受容体に対する既知の過敏性を有する患者に禁忌を示される提示も包含することができる。

【0374】

本明細書に引用されるすべての特許、特許出願及び出版物、及び電子的に入手できる材料（例えば、GenBankアミノ酸及びヌクレオチド配列提出物）の完全な開示は、引用により組込まれる。前述の詳細な記載及び例は、理解を明瞭にするためにのみ与えられている。不必要的制限はそれらから理解されるべきではない。本発明は、示され、そして記載される正確な詳細に制限されず、当業者に明らかな変更は、本発明の範囲内であろう。10

【実施例】

【0375】

例1. MPL - *zcytor17*ポリペプチドキメラ、すなわち*zcytor17*細胞内シグナル化ドメインに融合される、MPL細胞外及びTMドメイン

ネズミMPL受容体の5'細胞外ドメインを、1164bpのフラグメントを生成する、EcoRI及びBamHIによる消化により、ネズミMPL受容体を含むプラスミド（PHZ1/MPLプラスミド）から単離した。消化物を、1%アガロースゲル上に負荷し、そしてフラグメントを、Qiaquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。MPL細胞外ドメイン及びトランスメンブランドメインの残りを、プライマーZC6,673（配列番号13）及びZC29,082（配列番号14）により、PCRを用いて生成した。反応条件は次の通りであった：94で1分、55で1分、72で2分（15サイクル）、続いて72で7分；次に4でのソーキング。PCR生成物を1%アガロースゲル上に負荷し、そして約400bpのMPL受容体フラグメントを、QiaquickTMゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。20

【0376】

ヒト*zcytor17*の細胞内ドメインを、*zcytor17*受容体cDNA（#23/pCAP）を含むプラスミドから、プライマーZC29,083（配列番号15）及びZC29,145（配列番号16）によるPCRを用いて単離した。*zcytor17*受容体コード配列に対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号5に示さる。反応条件は上記の通りであった。PCR生成物を、1%アガロースゲル上に負荷し、そして約320bpの*zcytor17*フラグメントを、Qiaquickゲル抽出キットを用いて、製造業者の説明に従って単離した。30

【0377】

上記の単離されたフラグメントの個々を、1:1の体積比で混合し、そしてZC6673（配列番号13）及びZC29,145（配列番号16）を用いてのPCR反応に使用し、*zcytor17*キメラの5'MPL部分を創造した。反応条件は次の通りであった；94で1分；55で1分、72で2分（15サイクル）；続いて、72で7分；次に4でのソーキング。全PCR生成物を、1%アガロースゲル上に負荷し、そして700bpのMPL - *zcytor17*キメラフラグメントを、Qiaquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。40

【0378】

MPL - *zcytor17*キメラフラグメントを、BamHI（BRL）及びXbaI（Boehringer Mannheim）により、製造業者の説明書に従って消化した。全消化物を、1%アガロースゲル上に負荷し、そして分離されたMPL - *zcytor17*キメラを、QiaquickTMゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。その得られる分解されたMPL - *zcytor17*キメラ及び上記5'MPL EcoRI/BamHIフラグメントを、下記のようにして発現ベクター中に挿入し、完全なMPL - *zcytor17*キメラ受容体を生成した。40

【0379】

受容体発現ベクターpZP-7を、EcoRI（BRL）及びXbaI（BRL）により、製造業者の説明書に従って消化し、そして上記のようにしてゲル精製した。このベクターフラグメントを、上記で単離された、EcoRI及びXbaI切断されたMPL - *zcytor17*キメラ及び、EcoRI/BamHI

5' MPLフラグメントと共に連結反応において組合した。この連結は、T4リガーゼ (Epicentre Technologies) を用いて、室温で1時間、行われた。連結のサンプルを、DH10B ElectroMAXTM エレクトロコンピテントE.コリ細胞においてエレクトロポレートした (25 μF, 200V, 1.8V)。形質転換体を、LB + Ampicillinプレート上にプレートし、そして単一のコロニーを、miniprep(Qiagen)によりスクリーンし、そしてEcoRIにより消化し、MPL-zcyt17キメラを調べた。正しいコロニーのEcoRI消化は、約2KBのフラグメントを生成する。MPL-zcyt17キメラ配列の確認を、配列分析により行った。この挿入体は、3.1 bpであり、そして十分な長さであった。

【0380】

例2. Alamar Blueを用いてのBAF3アッセイにおける、MPL-zcyt17キメラに基づく増殖

A. BaF3細胞発現のMPL-zcyt17キメラの構成：

BaF3、すなわちネズミ骨髄由来するインターロイキン-3 (IL-3) 依存性プレーリンバ球細胞系 (Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevotなど, Mol. Cell. Biol. 6:4133-4135, 1986) を、10%熱-不活性化されたウシ胎児血清、1-2 ng/mlのネズミIL-3 (mIL-3) (R&D. Minneapolis, MN)、2mMのL-glutaMax-1TM (Gibco BRL), 1mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL) 及びPSN抗生物質 (Gibco BRL) により補充された完全培地 (RPMI培地 (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS)) において維持した。

【0381】

エレクトロポレーションの前、pZP-5N/MPL-zcyt17プラスミドDNA (例4) を調製し、そしてQiagen Maxi Prepキット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。エレクトロポレーションのためのBaF3細胞を、RPMI培地により2度洗浄し、そして次に、RPMI培地に10⁷個の細胞/mlの細胞密度で再懸濁した。1mlの再懸濁されたBaF3細胞を、30 μgのpZP-7/MPL-zcyt17プラスミドDNAと共に混合し、そして別々の使い捨てエレクトロポレーションチャンバー (GIBCO BRL) に移した。室温で、細胞に、エレクトロポレーション装置 (Cyto-Pulse) により供給される5x2msの連続したショック (600V) を与えた。

【0382】

他方では、細胞を、Cell-Porator(GibcoBRL)エレクトロポレーションにより供給される一連の2回のパルス (800 μFAD/300V; 続いて、1180 μFAD/300V) によりエレクトロポレートした。エレクトロポレートされた細胞を、50mlの完全培地に移し、そしてインキュベーターに、15-24時間 (37°C, 5% CO₂) 配置した。次に、GeneticinTM (Gibco) 選択物 (1mg/mlのG418) をT-162フラスコにおける細胞に添加し、G418-耐性プールを単離した。この後、BaF3/MPL-zcyt17細胞と呼ばれる、トランスクレクトされたBaF3細胞のプールを、下記のようにして、シグナル化能力についてアッセイした。

【0383】

B. Alamar Blue増殖アッセイを用いてのBaF3/MPL-zcyt17細胞のシグナル化能力の試験：

BaF3/MPL-zcyt17細胞を、回転沈降し、そして上記のようであるが、しかしIL-3を含まない完全培地 (この後“mIL-3フリー培地”と称する) により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度洗浄し、mIL-3の除去を確かにした。次に、細胞を、血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100 μlの体積に5000個の細胞を含むような96-ウェル形式でプレートした。

【0384】

BaF3/MPL-zcyt17細胞の増殖を、mIL-3フリー培地により、200ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 3.1ng/ml, 1.5ng/mlの濃度に希釈されたネズミトロンボポエチン (mTPO) を用いて評価した。100 μlの希釈されたmTPOを、BaF3/MPL-zcyt17細胞に添加した。全アッセイ体積は200 μlである。負の対照を、mTPOの添加を伴なわないで、mIL-3フリー培地のみを用いて同時に実験した。アッセイプレートを、37

10

20

30

40

50

で、5% CO₂において3日間、インキュベートし、この時点で、Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) を、20 μl/ウェルで添加した。Alamar Blueは、細胞の代謝活性に基づいて蛍光計読み取りを与える、そして従って、負の対照に比較しての細胞増殖の直接的な測定である。

【0385】

プレートを再び、37°において、24時間インキュベートした。プレートを、SoftMaxTM Proプログラムを用いて、544(励起)及び590(放射)の波長で、FmaxTM プレートリーダー (Molecular Devices Sunnyvale, CA) 上で、又はWallac Victor 2 プレートリーダー (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) 上で読み取った。

結果は、トロンボポエチンが50ng/ml及びそれ以上のmTOP濃度でバックグラウンドよりも約9-13倍、増殖を誘発するので、zcytor17受容体の細胞内部分のシグナル化能力を確認した。
10

【0386】

例3. 十分な長さのzcytor17を発現する発現ベクターpZp7px/zcytor17の構成

A. 発現のための十分な長さのzcytor17 cDNAのクローニング：

十分な長さのzcytor17 cDNAを得るために、5'及び3' PCR生成物を単離し、そして内部PstI部位を用いて連結した。PCRプライマーを、ヌクレオチド配列(配列番号4)を用いて企画し、そしてそれは、クローニング目的のためのBamHI及びXhoI制限部位を含む。

【0387】

5' PCRを、錆型としてWI-38 cDNAライブラリー及びプライマーとしてオリゴヌクレオチドZC29,359(配列番号18)及びZC27,899(配列番号19)を用いて生成した。WI-38は、ヒト胚の肺細胞系(ATCC CRL-2221)から生成された自家cDNAライブラリーである。この5' PCR反応は次の通りに行われた：94°で1分、65°で1分、72°で2分、次に72°で7分(30サイクル)；10°でのソーキング。PCR反応は、cDNAライブラリーから調製された約3μgのプラスミド、20pモルの個々のオリゴヌクレオチド及び5単位のPWO DNAポリメラーゼ(Roche)を使用した。
20

【0388】

5' PCR生成物の約90%を、エタノール沈殿し、BamHI及びPstIにより消化し、そして1.0%アガロースゲル上でゲル精製した。約600bpのバンドを切除し、そしてBamHI及びPstIにより消化されたクローニングベクターpUC18への連結のために使用した。得られる形質転換体を配列決定し、zcytor17 cDNA配列を確かめた。それらの形質転換体の1つに関して、プラスミドDNAを調製し、そしてBamHI及びPstIにより消化した。得られる約600bpのバンドをゲル精製し、そして下記連結のために使用し、十分な長さのcDNAを形成した。
30

【0389】

3' PCR生成物を、錆型としてヒト精巣自家cDNAライブラリー及びプライマーとしてオリゴヌクレオチドZC27,895(配列番号20)及びZC29,122(配列番号21)を用いて生成した。この3' PCR反応は次の通りに行われた：94°で45秒、65°で45秒、72°で2分、次に72°で7分(30サイクル)；10°でのソーキング。3' PCR反応物を、1.0%アガロースゲル上でゲル精製し、そして腫瘍1500bpバンドを切除した。このバンドを、ZeroBlunt TOP0キット(Invitrogen)を用いて、PCR Blunt II TOP0ベクター中にクローン化した。得られる形質転換体を配列決定し、zcytor17 cDNA配列を確かめた。それらの形質転換体の1つに関して、プラスミドDNAを調製し、そしてPstI及びXhoIにより消化した。その得られる約1500bpのバンドをゲル精製した。3部分連結を、上記5' BamHI～PstIフラグメント、3' PstI～XhoIフラグメント、及びBamHI及びXhoIにより消化された発現ベクターpZp7pxにより行った。
40

【0390】

これは、pZp7p/zcytor17と称する、zcytor17のための十分な長さのcDNAを含むpZp7pxプラスミド(配列番号4)を生成した。pZp7p/zcytor17における十分な長さのzcytor17 cDNAは、配列番号4の位置1888でTをGに変えるサイレント突然変異を有する(配列番号5の残基464でGly残基をコードする)。この突然変異はサイレントであるので、pZp7p/zcytor
50

17における`zcytor17` cDNAは、配列番号5に示されるようなポリペプチドをコードする。プラスミドpZp7pXは、CMVプロモーター、イントロンA、コード配列の挿入のための複数の制限部位、及びヒト成長ホルモンターミネーターを有する発現カセットを含む哺乳類発現ベクターである。プラスミドはまた、複製のE.コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、ピューロマイシン耐性遺伝子、及びSV40ターミネーターを有する。

【0391】

B. 十分な長さのWSX-1を発現する発現ベクターの構成：

完全なWSX-1受容体（配列番号9）を、WSX-1受容体cDNA（配列番号8）（アメリカ特許第5,925,735号）を含むプラスミドから単離した。hWSX-1/pBluescript SK(+)プラスミドDNA（Stratagene, La Jolla, CA）を、EcoRI及びXbaIにより消化し、1075bpのフラグメントを生成し、そしてまたXbaI及びXbaIにより消化し、900bpのフラグメントを得た。両消化物を1%アガロースゲル上で試験し、そして分離されたWSX-1フラグメントを単離した。

【0392】

受容体発現ベクターpZp7Zを、EcoRI及びXbaIにより消化し、そして上記のようにしてゲル精製した。このベクターフラグメントを、T4リガーゼ（BRL）を用いての連結反応において、上記の単離された2種の`zcytor17`フラグメントと共に組合した。その連結物を室温で一晩インキュベートした。その連結物のサンプルを、DH10BエレクトロMAX™ エレクトロコンピテントE.コリ細胞にエレクトロポレーションした（25μF, 200、2.3V）。6個のコロニーを培養増殖し、そしてミニプレードDNAを調製し、そして消化し、2.0kbの正しいWSX-1の十分な長さの挿入体を確めた。得られるプラスミドは、pZP7Z/WSX-1である。

【0393】

例4. Alamar Blue を用いてのBaF3アッセイにおける`zcytor17`に基づく増殖

A. `zcytor17`受容体、WSX-1受容体及びOSMRを発現するBaF3細胞の構成：

十分な長さの`zcytor17`受容体を発現するBaF3細胞を、上記例2Aに記載される`zcytor17`発現ベクター30μlを用いて、上記例3Aに従って構成した。1つの例外は、ジェネチシン選択の代わりに、2μg/mlのプロマイシン（ClonTech）を、T-162フラスコにおけるトランسفェクトされた細胞に添加し、プロマイシン耐性プールを単離することである。`zcytor17`受容体mRNAを発現するBaF3細胞を、BaF3/`zcytor17`として命名した。クローンを得るために、BaF3/`zcytor17`細胞を血球計数器において計数し、そして1細胞/ウェル、0.5細胞/ウェル、0.1細胞/ウェル及び0.01細胞/ウェルで96ウェル皿に配置した。

【0394】

15個のクローンを、T75皿に一定比率で増大し、そして5個のクローンを`zcytor17`発現についてアッセイした。全RNAを、細胞ペレットから、S.N.A.P™ 全RNA単離キット（Invitrogen）を用いて単離した。第1鎖cDNAを、proSTR™ 第1鎖RT-PCRキットを用いて合成し、そして次に、`zcytor17`特異的プライマーZC29, 180（配列番号22）及びZC29, 122（配列番号23）を用いて、PCRを行い、`zcytor17`の発現についてクローンをスクリーンした。1つのクローンBaF3/`zcytor17`#15を選択し、拡張し、そしてWSX-1発現ベクターによりトランسفェクトした。

【0395】

`zcytor17`及び十分な長さWSX-1を発現するBaF3細胞を、上記例2Aに従って、30μgのWSX-1発現ベクターWSX-1/pZp7Z（例3B）を用いて構成し、BaF3/`zcytor17`#15細胞をエレクトロポレーションした。1つの例外は、ゲネチシン選択の変わりに、200μg/mlのゼオシン（Invitrogen）を、T-162フラスコにおけるトランسفェクトされた細胞に添加し、ゼオシン耐性プールを単離することである。`zcytor17`及びWSX-1を発現するBaF3細胞を、BaF3/`zcytor17`/hWSX-1と命名した。クローンを得るために、BaF3/`zcytor17`/hWSX-1細胞のプールを、96mウェルプレートに制限希釈でプレートした。得られるクローンを拡張し、そして全RNAを、S.N.A.P.™ 全RNA単離キット（Invitrogen）を用いて単離した。第1鎖cDNAを、proSTR™ 第1鎖RT-PCRキットを用いて合成し、そして次に、WSX-1特異的プライマーZC9791

10

20

30

40

50

(配列番号24) 及びZC9793(配列番号25)を用いてPCRを行い、WSX-1の発現についてクローンをスクリーンした。1つのクローンBaF3/zcytor17/hWSX-1#5を選択し、さらに拡張し、そしてOSMR 発現ベクターによりトランスフェクトした。

【0396】

zcytor17、WSX-1及び十分な長さのOSMR を発現するBaF3細胞を、例29に記載されるOSMR 発現ベクターOSMR/pZp7NX30μlを用いて、上記例2Aに従って構成した。zcytor17、WSX-1及びOSMR mRNAを発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor17/ WSX-1/OSMRとして命名した。クローンを得るために、BaF3/zcytor17/ WSX-1/OSMR 細胞のプールを96mウェルプレートに制限希釈でプレートした。個々のクローンを拡張し、そしてRNAを、S.N.A.P.TM 全RNA単離キット(Invitrogen)を用いて単離し、そして次にOSMR 特異的プライマーZC40109(配列番号26)及びZC40112(配列番号27)を用いて、PCRを行い、zcytor17、WSX-1及びOSMRの発現についてクローンをスクリーンした。1つのクローンBaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR # 5を選択し、そしてそれらの細胞を用いて例5及び6に記載のようにしてzcytor17ligについてスクリーンした。

【0397】

B. zcytor17受容体及びOSMRを発現するBaF3細胞の構成：

十分な長さのzcytor17受容体を発現するBaF3細胞を、上記例3Aに記載されるzcytor17発現ベクター30μlを用いて、上記例2Aに従って構成した。1つの例外は、ジェネチシン選択の代わりに、2 μg/mlのプロマイシン(Clontech)を、T-162フラスコにおけるトランスフェクトされた細胞に添加し、プロマイシン耐性プールを単離することである。zcytor17受容体mRNAを発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor17として命名した。クローンを得るために、BaF3/zcytor17細胞のプールを、96mウェルプレートに制限希釈でプレートした。得られるクローンを培養において拡張し、そして全RNAを、S.N.A.P.TM 全RNA単離キット(Invitrogen)を用いて単離した。第1鎖cDNAを、proSTARTM 第1鎖RT-PCRキットを用いて合成し、そして次に、PCRを用いて、zcytor17の発現についてクローンをスクリーンした。1つのクローンBaF3/zcytor17#5を選択し、拡張し、そしてOSMR 発現ベクターによりトランスフェクトした。

【0398】

zcytor17及び十分な長さOSMR を発現するBaF3細胞を、上記例2Aに従って、30μgのOSMR 発現ベクターOSMR /pZp7NX(例29)を用いて構成し、BaF3/zcytor17#15細胞をエレクトロポレーションした。zcytor17及びOSMR mRNAを発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor17/OSMR と命名した。それらの細胞を用いて、例5に記載されるようにして、zcytor17ligについてスクリーンした。

【0399】

例5. Alamar Blue増殖アッセイによるBaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞を用いてのzcytor17ligについてのスクリーニング

A. zcytor17ligの存在について試験するためのCCRF-CEM及びCCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞の活性化：

CCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞をATCCから得、そして培養において刺激し、下記に記載されるようにzcytor17lig活性の存在について試験するためにならし培地を生成した。その懸濁細胞を、10% FBS、2mMのL-グルタミン(GibcoBRL)、1 × PSN(GibcoBRL)により補充されたRPMI-1640培地に、 2×10^5 個の細胞/ml又は 5×10^5 個の細胞/mlで接種し、100ng/mlのホルボール-12-ミリストート-13-アセテート(PMA)(Calbiochem, San Diego, CA)及び0.5 μg/mlのイノマイシンTM(Calbiochem)により24又は48時間、活性化した。前記刺激された細胞からの上清液を用いて、下記に記載されるようにして、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR 細胞の増殖についてアッセイした。

【0400】

B. Alamar Blue 増殖アッセイによる、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR 細胞を用いてのzcytor17ligについてのスクリーニング：

BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR 細胞を回転沈降し、そして

10

20

30

40

50

mIL-3フリー培地により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度洗浄し、mIL-3の除去を確保した。次に、細胞を血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり $100\mu\text{l}$ の体積に5000個の細胞を含むような96-ウェル形式でプレートした。

【0401】

BaF3/zcyt17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcyt17/OSMR 細胞の増殖を、活性化されたCCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞（例5A）からのならし培地を用いて評価した。ならし培地は、mIL-3フリー培地により、50%、25%、12.5%、6.2%、3.12%、1.5%、0.75%及び0.375%の濃度に希釈した。希釈されたならし培地 $100\mu\text{l}$ を、BaF3/zcyt17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcyt17/OSMR 細胞に添加した。合計アッセイ体積は $200\mu\text{l}$ である。アッセイプレートを37度、5%CO₂下で3日間インキュベートし、この時点で、Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) を、 $20\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で添加した。プレートを再び、37度、5%CO₂下で24時間インキュベートした。プレートを、上記（例2）のようにして、FmaxTM プレートリーダー（Molecular Devices）上で読み取った。
10

【0402】

結果は、活性化されたCCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞ならし培地に存在する因子に対するBaF3/zcyt17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcyt17/OSMR 細胞の増殖応答を確かめた。その応答は、測定される場合、25%の濃度でバックグラウンドの約10倍であった。トランスフェクトされていないBaF3細胞は、この因子に対する応答において増殖せず、zcyt17及びWSX-1によりトランスフェクトされたBaF3細胞（BaF3/zcyt17/WSX-1）はこの因子に対する応答において増殖せず、このことは、この因子がzcyt17/OSMR 又はzcyt17/OSMR /WSX-1受容体に対して特異的であることを示す。さらに、可溶性zcyt17受容体は、BaF3/zcyt17/WSX-1/OSMR 細胞においてzcyt17ligのこの増殖活性低めた（例11を参考のこと）。類似する結果がBaF3/zcyt17/OSMR 細胞において予測される。
20

【0403】

C. zcyt17ligを単離するために使用されるヒト一次源：

100mlの血液を、6人のドナーの個々から採血した。血液を、ヘパリンを含む $10 \times 10\text{ml}$ のバキュティナー（vacutainer）を用いて採取した。血液を、6人のドナーからプールL（600ml）、PBSにより1：1に希釈し、そしてFicoll-Paque（商標）PLUS（Pharmacia Biotech）を用いて、分離した。単離された一次ヒト細胞収量は、Ficollグラジエント上で分離の後、 1.2×10^4 個の細胞であった。
30

細胞を、9.6mlのMACS緩衝液（PBS、0.5%EDTA、2mMのEDTA）に懸濁した。細胞懸濁液1.6mlを除き、そして0.4mlのCD3微小ビーズ（Miltenyi Biotec, Auburn, CA）を添加した。その混合物を4度15分間インキュベートした。CD3ビーズによりラベルされたこれらの細胞を、30mlのMACS緩衝液により洗浄し、そして次に、2mlのMACS緩衝液に懸濁した。

【0404】

VS+カラム（Miltenyi）を、製造業者の説明書に従って調製した。次に、VS+カラムを、VarioMACSTM 磁場（Miltenyi）に配置した。カラムを、5mlのMACS緩衝液により平衡化した。次に、単離された一次ヒト細胞を、カラムに適用した。CD3陰性細胞を通過した。カラム9ml（ $3 \times 3\text{ml}$ ）のMACS緩衝液によりすすいだ。次に、カラムを磁石から除去し、そして15mlのファルコン管上に配置した。CD3+細胞を、カラムに5mlのMACS緩衝液を添加することにより溶出し、そして結合された細胞を、製造業者により提供されるプランジャーを用いて、フラッシュした。細胞とCD3磁気ビーズとのインキュベーション、洗浄、及び上記VS+カラム段階（インキュベーション～溶出）を、さらに5度、反復した。6種のカラム分離からのその得られるCD3+選択されたヒト細胞の収量は、合計 3×10^8 個の細胞であった。
40

【0405】

プールされたCD3+選択されたヒト細胞のサンプルを、それらの純度を評価するために、蛍光抗体細胞ソーター（FACS）に基づいて、染色し、そして分類するために除去した。ヒトCD3+選択された細胞は、91%のCD3+細胞であった。

ヒトCD3+選択された細胞を、RPMI + 5% FBS + 10ng/mlのPMA及び $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ のlonomycin
50

(Calbiochem)において37℃で13時間インキュベートすることにより活性化した。それらの活性化されたCD3+選択されたヒト細胞からの上清液を、下記のようにして、zalpha11リガンド活性について試験した。さらに、前記活性化されたCD3+選択されたヒト細胞を、下記例6に記載のようにして、cDNAライブラリーを調製するために使用した。

【0406】

D. BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞及びAlamar Blue 増殖アッセイを用いてのzcytor17ligについての活性化されたCD3+選択されたヒト細部からの上清液：

BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR 細胞を回転沈降し、そしてmIL-3フリー培地により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度洗浄し、mIL-3の除去を確保した。次に、細胞を血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100μlの体積に5000個の細胞を含むような96-ウェル形式でプレートした。

10

【0407】

BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR 細胞の増殖を、mIL-3フリー培地により25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.5%、0.75%、0.375%及び0.187%濃度に希釈された、活性化されたCD3+選択されたヒト細胞（例5Cを参照のこと）からのならし培地を用いて評価した。希釈されたならし培地100μlを、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR 細胞に添加した。合計のアッセイ体積は200μlである。アッセイプレートを、例5Bに記載のようにしてインキュベートし、そしてアッセイした。

【0408】

結果は、活性化されたCD3+選択されたヒト細胞ならし培地に存在する因子に対するBaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR 細胞の増殖応答を確かめた。前記応答は、測定される場合、25%濃度で、バックグラウンドよりも約15倍、高かった。トランスフェクトされていないBaF3細胞は、この因子に対する応答において増殖せず、zcytor17及びWSX-1によりトランスフェクトされたBaF3細胞（BaF3/zcytor17/WSX-1細胞）はこの因子に対する応答において増殖せず、このことは、この因子がzcytor17/OSMR 又はzcytor17/OSMR / WSX-1受容体に対して特異的であることを示す。

20

【0409】

例6. ヒトCD3+選択された細胞ライブラリーからの連結されるヒトzcytor17ligのクローニング

一次ヒト活性化された、CD3+選択された細胞cDNAライブラリーのスクリーニングは、4-ヘリックス-束サイトカインファミリーの新規メンバーである単離されたcDNAを示した。このcDNAは、zalpha11リガンドをコードした。このcDNAは、zcytor17/WSX-1/OSMR受容体を用いてzcytor17ligの活性についてスクリーニングすることにより同定された。

30

【0410】

A. CD3+選択されたライブラリー構成のためのベクター：

CD3+選択されたライブラリー構成のためのベクターは、pZP7NXであった。前記pZP7NXベクターを次の通りにして構成した：ベクター-pZP7におけるDHFR選択マーカーについてのコード領域を、NcoI及びPstI制限酸素（Boehringer Mannheim）によるDNA消化により除去した。消化されたDNAを、1%アガロースゲル上に負荷し、切断し、そしてQiagenゲル抽出キット（Qiage）を用いて、製造業者の説明書に従ってゲル精製した。Zeocin選択マーカーのコード領域を表すDNAフラグメントを、鑄型として、プライマーZC13,946（配列番号28）及びZC13,945（配列番号29）、及びpZcoSV2(+)を用いてのPCR方法により増殖した。

40

【0411】

プライマーZC13,946（配列番号28）に追加のPstI及びBclI制限部位、及びプライマーZC13,945（配列番号29）に追加のNcoI及びSfuI部位が存在する。PCRフラグメントを、PstI及びNcoI制限酸素により切断し、そして同じ2種の酸素により分離し、そして続いてゲル精製することによって調製されたpZP7ベクター中にクローン化した。このベクターをpZP7Zと命名した。次に、Zeocinコード領域を、BclI及びSfuI制限酸素によるベクター-pZP7ZのDNA消化により除去した。消化されたDNAを、1%アガロース上に負荷し、切断し、そして

50

ゲル精製し、そして次に、同じ酸素 (BclI 及び Sful) により pZem228ベクター (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA に寄託されている ; ATCC 寄託番号 69446 号) から切断されたネオマイシンコード領域のDNAフラグメントにより連結した。

【 0 4 1 2 】

この新規ベクターを pZP7N と命名し、ここで DHFR 選択マーカーのためのコード領域を、ベクター pZem228 からのネオマイシン選択マーカーのためのコード領域により置換した。Xhol 部位を包含するスタッフアーフラグメントを、cDNA の高い効率の方向づけクローニングのために適切なベクターを創造するために pZP7N に付加し；この新規ベクターを pZP7NX と命名した。cDNA のためのベクターを調製するために、20 μg の pZP7NX を、20 単位の EcoRI (Life Technologies gaithersberg, MD) 及び 20 単位の Xhol (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) により、37 度 5 時間、次に 68 度 15 分間、消化した。
10

【 0 4 1 3 】

次に、その消化物を、0.8% 低融点アガロース IXTAE ゲル上に負荷し、ベクターから前記スタッフアーフラグメントを分離した。ベクターバンドを切出し、そして “ - アガラーゼ ” (New England Biolabs. Beverly, MA) により、製造業者の推薦に従って消化した。エタノール沈殿の後、消化されたベクターを、下記の CD3+ 選択された cDNA ライブラリーの連結のための調製において、水に再懸濁し、45ng/ml の濃度にした。

【 0 4 1 4 】

B. 一次ヒト活性化された CD3+ 選択された細胞 cDNA ライブラリーの調製 :

イノマイシン / PMA において刺激された、約 1.5×10^8 個の一次ヒト CD3+ 選択された細胞を、37 度 13 時間の培養 (例 5C) の後、遠心分離により単離した。全 RNA を、Qiagen, Inc. (Valencia, CA) からの “ NNeasy Midi ” キットを用いて、細胞ペレットから単離した。mRNA を、CPG Inc. (Lincoln Park, NJ) からの “ MPG mRNA 精製キット ” を用いて、全 RNA 225 μg から単離した。3.4 μg の mRNA を単離し、そして次の方法を用いて、二本鎖 cDNA に転換した。
20

【 0 4 1 5 】

刺激されたヒト CD3+ 選択された細胞からの第 1 鎮 cDNA を、次の通りに合成した。0.34 μg/μl の濃度での 9 μl の Oligo d(T) - 選択されたポリ (A) CD3+ RNA、及び Xhol 制限部位を含む 1 μg/μl の第 1 プライマー ZC18,698 (配列番号 30) 1.0 μl を、混合し、そして 65 度 4 分間、加熱し、そして氷上で急冷により冷却した。第 1 鎮 cDNA 合成を、RNA - プライマー混合物への 9 μl の第 1 鎮緩衝液 (5 × SUPERSCRIPT (商標) 緩衝液 ; Life Technologies)、4 μl の 100mM ジチオトレイトル、及びそれぞれ 10mM の dATP, dGTP, dTTP 及び 5 - メチル - dCTP を含むデオキシヌクレオチドミリン酸溶液 (Pharmacia Biotech Inc.) 2 μl の添加により開始した。
30

【 0 4 1 6 】

反応混合物を、45 度 4 分間インキュベートし、続いて、200U/μl の SuperScript II (商標)、RNアーゼ II - 逆転写酵素 (Life Technologies) 8 μl を添加した。反応を 45 度 45 分間インキュベートし、続いて、50 度まで 2 分ごとに 1 のインキュベーション傾斜を伴ない、ここで反応は 10 分間、維持された。いずれかの二次構造を変性し、そして cDNA の追加の延長を可能にするために、反応を 70 度に 2 分間加熱し、次に 55 度に 4 分間、下げ、この後、2 μl の SuperScript II (商標) RT を添加し、そしてさらに 15 分間インキュベートし、続いて、70 度まで 1 分/1 の傾斜を伴なった。組み込まれなかったヌクレオチドを、2 μg のグリコーゲンキャリヤー、2.0M の酢酸アンモニウム及び 2.5 体積のエタノールの存在下で 2 度、沈殿せしめ、続いて 70% エタノールにより洗浄することにより、cDNA から除去した。cDNA を、第 2 鎮合成への使用のために、98 μl の水に再懸濁した。
40

【 0 4 1 7 】

第 2 鎮合成を、DNA へパリン形成をもたらす第 2 鎮プライミングを促進する条件下で、第 1 鎮 cDNA に対して行った。第 2 鎮反応は、98 μl の前記第 1 鎮 cDNA、30 μl の 5 × ポリメラーゼ I 緩衝液 (100mM のトリス - HCl, pH 7.5, 500mM の KCl, 25mM の MgCl₂, 50mM の (NH₄)₂SO₄)、2 μl の 100M ジチオトレイトル、それぞれ 10mM のデオキシヌクレオ

チドミリン酸を含む溶液 6 μ l、5 mMのb-NAD5 μ l、30/ μ lのE.コリDNAリガーゼ (New England Biolabs Inc.) 1 μ l、及び10U/ μ lのE.コリDNAポリメラーゼI (New England Biolabs Inc.) 4 μ lを含んだ。

【0418】

反応を、室温でアッセンブリーし、そして室温で2分間インキュベートし、続いて、3.8U/ μ lのRNアーゼH (Life Technologies) 4 μ lを添加した。反応を、15¹⁰で2時間、続いて室温で15分間インキュベートした。1MのTRIS (pH7.4) 10 μ lを反応に添加し、そしてフェノール/クロロホルムにより2度及びクロロホルムにより1度、抽出し、次に有機相を50 μ lのTE (10mMのTRIS 1、pH7.4、1 mMのEDTA) により戻し抽出し、他の水性物と共にプールし、そして0.3Mの酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿した。ペレットを、70%エタノール100 μ lにより洗浄し、空気乾燥し、そして水40 μ lに懸濁した。

【0419】

ヘアーピン構造の1本鎖のDNAを、ヤエナリヌクレアーゼを用いて切断した。反応混合物は、40 μ lの第2鎖cDNA、5 μ lの10×ヤエナリヌクレアーゼ緩衝液 (Life Technologies)、1×ヤエナリヌクレアーゼ緩衝液により1U/ μ lに希釈されたヤエナリヌクレアーゼ (Pharmacia Biotech Corp.) 5 μ lを含んだ。反応を37²⁰で45分間インキュベートした。反応を、1Mのトリス-HCl (pH7.4) 10 μ lの添加により停止し、続いて、上記のように、連続的フェノール/クロロホルム及びクロロホルム抽出を行った。抽出に続いて、cDNAを、0.3Mの酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿した。ペレットを、70%エタノール100 μ lにより洗浄し、空気乾燥し、そして38 μ lの水に再懸濁した。

【0420】

前記再懸濁されたcDNAを、T4 DNAポリメラーゼによりフラグメント末端化した。水38 μ lに再懸濁されたcDNAを、12 μ lの5×T4 DNAポリメラーゼ懸濁液 (250mMのトリス-HCl、pH8.0、250mMのKCl、25mMのMgCl₂)、2 μ lの0.1Mジチオトレイトール、それぞれ10mMのデオキシヌクレオチドミリン酸を含む溶液 6 μ l、及び1U/ μ lのT4 DNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim Corp.) 2 μ lと共に混合した。15³⁰で45分間のインキュベーションの後、反応を、30 μ lのTEの添加により停止し、続いて、連続的フェノール/クロロホルム及びクロロホルム抽出を行い、そして上記のように、20 μ lのTEにより戻し抽出を行った。DNAを、2 μ lのPellet PaintTM (Novagen) キャリヤー及び0.2Mの酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿し、そして水11 μ lに再懸濁した。

【0421】

EcoRIアダプターを、発現ベクター中へのクローニングを可能にするために、上記cDNAの5'末端上に連結した。11 μ lのcDNA及び65pモル/ μ lのEcoRIヘミリン酸化されたアダプター (Pharmacia Biotech Corp.) 4 μ lを、5 μ lの5×リガーゼ緩衝液 (Life Technologies)、10mMのATP 2 μ l及び1U/ μ lのT4 DNAリガーゼ (Life Technologies) 3 μ l、1 μ lの10×連結緩衝液 (Promega Corp)、9 μ lの水と共に混合した。1×緩衝液による特別な希釈は、ペレットペイントの沈殿を妨げることであった。反応を、10⁴⁰～22³⁰の水浴温度傾斜を伴なって、9時間、続いて25³⁰で45分間インキュベートした。反応を、68⁴⁰で15分間のインキュベーションにより停止した。

【0422】

発現ベクター中へのcDNAの方向づけクローニングを促進するために、cDNAをXholにより消化し、5'側EcoRI付着端及び3'側Xhol付着端を有するcDNAをもたらした。cDNAの3'末端でのXhol制限部位を、ZC18698 (配列番号31) プライマーを用いて、前もって導入した。制限酵素消化を、上記連結混合物35 μ l、10×H緩衝液 (Boehringer Mannheim Corp.) 6 μ l、2 mg/mlのBSA (Biolabs Corp.) 1 μ l、水17 μ l及び40U/ μ lのXhol (Boehringer Mannheim) 10 μ lを含む反応混合物において行った。消化は、37⁴⁰で1時間、行われた。反応を、68⁴⁰での15分間のインキュベーションにより停止し、続いてエタノール沈殿し、上記のようにして洗浄乾燥し、そして水30 μ lに再懸濁した。

【0423】

再懸濁されたcDNAを、65⁵⁰に5分間、加熱し、そして氷上で冷却し、4 μ lの5×ゲル

負荷色素 (Research Genetics Cor.) を添加し、cDNAを0.8%低溶融アガロース1×TAEゲル (SEA PLAQUE GTGTM 低溶融アガロース; FMC Corp.) 上に負荷し、そして電気泳動した。汚染性アダプター及び長さ0.6kb以下のcDNAをゲルから切除した。電極を逆にし、溶融されたアガロースを添加し、ウェルを満たし、緩衝液を変え、そしてcDNAを、レーン起点近くで濃縮されるまで、電気泳動した。濃縮されたcDNAを含むゲルの部分を切除し、そして微小遠心分離管に配置し、そしてアガロースを、65℃に15分間、加熱することにより溶解した。

【0424】

45にサンプルを平衡化した後、2μlの1U/μlの - アガロースI (Biolabs, Inc.) を添加し、そしてその混合物を45℃で90分間インキュベートし、アガロースを消化した。インキュベーションの後、1/10体積の3Mの酢酸ナトリウムをサンプルに添加し、そしてその混合物を15分間、氷上でインキュベートした。サンプルを、室温で14,000×gで15分間、遠心分離し、消化されなかったアガロースを除去し、cDNAをエタノール沈殿し、70%エタノールにより洗浄し、空気乾燥し、そして水40μlにおいて再懸濁した。

【0425】

ベクターに対するcDNAの最適比を決定するために、いくつかの連結をアセンブルし、そしてエレクトロポレートした。手短に言及すると、2μlの5×T4リガーゼ緩衝液 (Life Technologies)、10mMのATP 1μl、EcoRI - Xholにより消化されたpZP7NX、0.25μg/μlに希釈されたT4 DNAリガーゼ (Life Technologies) 1μl、10μlまでの水、及び0.5、1.2又は3μlのcDNAを、4回の別々の連結において混合し、22℃で4時間、68℃で20分間インキュベートし、酢酸ナトリウム - エタノール沈殿し、洗浄し、乾燥せしめ、そして再懸濁した。

【0426】

1μlの個々の連結物を、0.1cmのキュベット (Biorad) 及び2.5KV, 251F, 200Vに設定されたGenepulser, Pulse ControllerTM (Biorad) を用いて、40μlのDH10b ElectroMaxTM エレクトロコンピテント細菌 (Life Technologies) 中にエレクトロポレートした。それらの細胞をすぐに、1mlのSOCブイヨン (Manniatis, など。前記) に再懸濁し、続いて、保存剤としての50%グリセロール - SOS500を添加した。それらの“グリセロール原液”を、いくつかのアリコートに分け、-70℃で凍結した。個々のアリコートを融解し、そして100μg/mlでのアンピシリンにより補充されたLB - 寒天プレート上に連続的にプレートした。コロニー数は、pZP7NXベクターに対するCD3+cDNAの最適割合が1μl～45ngであることを示し；その連結は4.5百万の一次クローニングを生成した。

【0427】

上記からのBaF3に基づく増殖アッセイ (例5) を用いてこのライプラリーのスクリーニングのために、上記からのグリセロール原液を、深いウェルのマイクロタイヤープレートにおいてプレート当たり100又は250個のクローニングの液体培養物中に希釈し、振盪しながら37℃で24時間、増殖し、そしてプラスミドを、Qiagenキットを用いて、製造業者の説明書に従って単離した。続いて、そのようなDNAを、BHK細胞中にトランスフェクトし、培地を72時間、条件づけ、収穫し、そして-80℃で貯蔵し、そしてつづいて、5K BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR 細胞上に72時間、配置し、その後、増殖を、“Alamar ブルー”蛍光アッセイ (例5B及び例2B) を用いて評価した。

【0428】

例7. ヒトzcytor17ligの発現クローニング

活性化されたヒトCD3+選択された細胞ライプラリー (例6) からのグリセロール原液を、800μl当たり250個の細胞の濃度で、Super Broth IITM (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) + 0.1mg/mlのアンピシリン (amp) に添加した。E.コリ細胞を、室温で24時間、平衡化した。接種の時点で、100μlを、LB+ampプレートにプレートし、接種の実際の力値を決定した。24時間後、プレートを計数し、そして次に、SuperBrothIITM + E.コリの最終濃度を、その最終濃度が1.2ml当たり250個の細胞になるよう調節した。3×21が接種された (合計61)。

10

20

30

40

40

50

【0429】

次に、培地を、96-ウェルの深いウェルブロック (Qiagen) 中にプレートした。プレート化は、8-チャンネルQ-Fill2TM ディスペンサー (Genetic, Christchurch, Dorset, UK) 上で行われた。E.コリを、New Brunswick Scientific Innova 4900複数列振盪機上で、250回転/分で振盪しながら、37度で一晩、増殖した。E.コリを、Beckman GS-6KR 遠心分離機を用いて、3000rpmで溶液から回転沈殿せしめた。それらのE.コリペレットを、-20度で凍結し、又はプラスミドDNAをミニ-調製する前、新たに使用した。個々のペレットは、ヒトCD3+選択された細胞ライブラリーからの約250個のcDNAクローンを含む。

【0430】

次に、250個のcDNAクローンのそれらのプールを、QIAprepTM 96Turbo Miniprep キット (Qiagen) を用いてミニ-調製した。プラスミドDNAを、125μlのTE (10mMのトリス、pH8, 1mMのEDTA) を用いて溶出した。次に、このプラスミドDNAを用いて、BHK細胞をトランスフェクトした。 10

【0431】

BHKトランスフェクション；

BHK細胞を、ウェル当たり100μlの体積において、ウェル当たり12,000個の細胞の密度で96-ウェル組織培養プレートにプレートした。培養培地は、DMEM (GibcoBRL)、5%の熱不活性化されたウシ胎児血清、2mMのL-グルタミン (GibcoBRL)、1×PSN (Gibco BRL), 1mMのNaPyruvate (GibcoBRL) を含んだ。 20

次の日、BHK細胞を、100μlのSFAにより1度、洗浄した。SFAは、DMEM/F12 (Gibco/BRL)、2mMのGlutaMaxTM (Gibco/BRL)、1mMのNaPyruvate, 10μg/mlのトランスフェリン、5μg/mlのインスリン、10μg/mlフェチュイン、2μg/mlのセレニウム、25mMのHEPES (Gibco/BRL)、100μMの非必須アミノ酸 (Gibco/BRL) を含む血清フリー培地である。 20

【0432】

DNA/LipofectamineTM 混合物を次の通りにして製造した：22μlのLipofectamineTM 試薬 (Gibco/BRL) を、102.8μlのSFAと共に室温で組合し；次に、約μlのプラスミドDNA (200ng/μl) を、LipofectamineTM/SFAに添加し、DNA/LipofectamineTM 混合物を形成し、これを室温で30分間インキュベートした。SFAをBHK細胞から除去し、そして細胞を50μlのDNA/LipofectamineTM 混合物と共に37度、5%CO₂下で5時間、インキュベートした。50μlのDNA/LipofectamineTM 混合物を、BHK細胞の2つのウェルの個々に添加し、その結果、トランスフェクションを二重反復して行った。 30

【0433】

BHK細胞をDNA/LipofectamineTM 混合と共に5時間インキュベートした後、DNA/LipofectamineTM 混合物を除去し、そして100μlの培養培地を添加した。細胞を一晩インキュベートし、培地を除去し、そして100μlの培養培地により置換した。細胞を48-72時間、培養した後、ならし培地を除去し、-80度で最少20分間、凍結し、融解し、そして次に、その50μlを、例5に記載されるBaF3増殖アッセイによりアッセイし、リガンド活性を有する250個のクローンのプールを同定した。 40

【0434】

20個の96ウェルプレートを、単一のアッセイにおいてスクリーンした。これは、約250個のcDNA/ウェル又は合計480,000個のcDNAを表した。それらのうち、60個のウェル（ウェル当たり250個のcDNAを表す）からのならし培地が、増殖アッセイにおいて陽性であることを試験した。それらの陽性プールの1つを選択し、分解し、そしてzcyt or17 ligをコードする単一のcDNAを単離した。これは、プール62A12であった。 40

【0435】

プール62A12に関しては、1μgのDNAを使用して、エレクトロポレーションによりElectroMaxTM DH10B細胞 (Gibco/BRL) を形質転換した。形質転換体を、LB +amp (100μg/ml) プレート上にプレートし、単一のコロニーを得た。エレクトロポレーションされたプールから、672個の個々のコロニーを、ウェル当たり1.2mlのSuperBrothIITM を含む96-ウェルプレート中につま楊枝により入れた。それらのプレートを、#62.1 - #62.7の番号を付けら 50

れた。それらを一晩、培養し、そしてプラスミドDNAを上記のようにしてミニプレプドした。すべての7種のプレートに関しては、前記分解プレートからのプラスミドDNAを、上記のようにして、BHK細胞中にトランスフェクトし、そして増殖によりアッセイし、但しトランスフェクションは二重反復して行わなかった。

【0436】

2種の陽性クローン62.6C7及び62.6E9を、合計672個のクローンから活性により同定した。クローン62.6E9からミニプレプドされたプラスミドDNAを配列決定し、そして仮に同定し、但し混合された配列は、この陽性クローンから得られた。zcytor17lig cDNAを単一のクローンにさらに単離するために、プール62.6E9からのDNA1μlを用いて、DH10B細胞をエレクトロポレートし、そして形質転換体を、LB+amp (100μg/ml)プレート上にプレートし、單一コロニーを得た。7個のコロニーからミニプレプドされたプラスミドDNAを配列決定し、正確なDNA配列を得た。zcytor17ligのポリヌクレオチド配列は、十分な長さであり（配列番号1）、そしてそのような対応するアミノ酸配列が示される（配列番号2）。

【0437】

例8. 次のzcytor17可溶性受容体を発現する哺乳類発現ベクターの構成：zcytor17 CEE, zcytor17 CFLG, zcytor17 CHIS及びzcytor17 - Fc4

A. zcytor17 CEE, zcytor17 CFLG及びzcytor17 CHISを含むzcytor17哺乳類発現ベクターの構成：

発現ベクター、すなわちpZp9zcytor17CEEを、zcytor17ポリペプチドの可溶性、細胞外ドメインの発現のために調製し、ここで前記構造体は、予測される開始メチオニンから成り、そして予測されるトランスメンブランドメインに隣接して切断され、そしてC-末端Glu-Glu標識（配列番号32）を有するzcytor17ポリペプチドを発現するよう企画されている。

【0438】

約1500bpのPCR生成物を、EcoRI及びBamHI制限部位を付加するためにPCRプライマーとしてZC29,451（配列番号33）及びZC29,124（配列番号34）を用いて生成した。ヒトHPVS自家cDNAライブラリーを鋳型として使用し、そしてPCR増幅を次の通りに行った：94℃で1分、65℃で1分、72℃で1.5分、次に72℃で7分（30サイクル）；10℃でのソーキング。PCR反応をエタノール沈殿し、そしてEcoRI及びBamHI制限酵素により消化した。消化されたPCR生成物を1.0%アガロースゲル上でゲル精製し、そして約1500bpのバンドを切除した。次にこのバンドを、次のサイクリングにより、同一のプライマーを用いて再増幅した：94℃で1分、65℃で1分、72℃で3分、次に72℃で7分；10℃でのソーキング。

【0439】

PCR反応をエタノール沈殿し、そしてEcoRI及びBamHI制限酵素により消化した。消化されたPCR生成物を1.0%アガロースゲル上でゲル精製し、そして約1500bpのバンドを切除した。この切除されたDNAを、EcoRI及びBamHIにより切断されたプラスミドCEEpZp9中にサブクローニ化し、zcytor17のGLU-GLU C-末端標識された可溶性受容体、すなわちzcytor17 CEEpZp9を生成した。zcytor17CEEpZp9におけるzcytor17CEE cDNA中の細胞外ドメインは、配列番号4の位置1705でのTをCに変更するサイレント突然変異（配列番号5の残基403でのPro残基をコードする）を有する。この突然変異はサイレントであるので、zcytor17CEE pZp9におけるzcytor17 cDNAは、配列番号5に示されるようなポリペプチドをコードする。さらに、使用される構造体のために、Gly-Ser残基対を、zcytor17の可溶性細胞外ドメインのC-末端側に及びそのC-末端Glu-Glu標識（配列番号32）の前に挿入する。

【0440】

zcytor17細胞外ドメインのC-末端での標識は、配列番号17に示されるようなGlu-Glu標識であった。プラスミドCEEpZp9は、マウスマタロチオネイン-1プロモーター、コード配列の挿入のための複数の制限部位及びヒト成長ホルモンターミネーターを有する発現カセットを含む哺乳類発現ベクターである。プラスミドはまた、複数のE.コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、DHR遺伝子及びSV40ターミネーターを有する。

10

20

30

40

50

【0441】

標準の分子生物学技法を用いて、zcytor17CEEpZp9を、DH10Bコンピテント細胞 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 中に、その製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートし、そして100 μg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にプレートし、そして一晩インキュベートした。コロニーを、制限分析によりスクリーンし、又はDNAからのPCRを個々のコロニーから調製した。陽性クローニングの挿入体配列を、配列分析により確かめた。大規模プラスミド調製を、QIAGEN(商標) Maxi prepキット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って行った。

【0442】

同じ方法を用いて、一列に並んでの6個のHis残基から成るC-末端his標識及びC-末端フラッグ (配列番号36) 標識、すなわちzcytor17 CF1.AGを有するzcytor17可溶性受容体を調製した。それらの構造体を調製するためには、前記ベクターは、glu-glu標識 (配列番号17、32又は35) の変わりにHIS又はFLAG (商標) 標識のいずれかを有する。

【0443】

B. 可溶性ヒトzcytor17受容体、すなわちzcytor17 - Fc4の哺乳類発現構成：

発現ベクター、pEZE - 2hzcytor17/Fc4を調製し、PF CHO細胞においてhzcytor17のC末端Fc4標識された可溶性型 (ヒトzcytor17 - Fc4) を発現した。PF CHO細胞は、タンパク質フリーの培地 (ExCell325PF培地；JRH Biociences) において増殖のために適合された自家CHO細胞系である。前記自家CHO細胞系は、本来、CHO DG44細胞に起因した (G. Urlaub, J. Mitchell, E. Kas, L.A. Chasin, V.L., Funanage, T.T. Myoda and J.L. Hamlin, "The Effect of Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase Locus: Deletions and Inversions", Somatic cell and Molec. Genet., 12: 555-566 (1986))。

【0444】

zcytor17受容体の細胞外ドメインからのポリヌクレオチド配列を含む、zcytor17 cDNAのフラグメントを、Fc4ポリヌクレオチド配列 (配列番号37) に整合して融合し、zcytor17 - Fc4融合体 (配列番号38及び39) を生成した。pEZE - 2ベクターは、Fc4ポリヌクレオチド配列、及び標準の分子生物学技法を用いてC-末端Fc4融合体の急速な構成を可能にするクローニング部位を含む哺乳類発現ベクターである。

【0445】

ヒトzcytor17の細胞外ドメイン、及びそれぞれ、5'及び3'末端上にコードされるFseI及びBgIII部位と共に、Fc4の最初の2個のアミノ酸 (Glu及びPro) を含む、1566塩基対のフラグメントをPCRにより生成した。このPCRフラグメントを、ヒトzcytor17の細胞外ドメインを含むプラスミド (pZp9zcytor17CEE) (例8) からの增幅により、プライマーZC29,157 (配列番号40) 及びZC29,150 (配列番号41) を用いて生成した。PCR反応条件は次の通りであった：95°で1分、60°で1分及び72°で2分 (25サイクル) ; 72°で10分 (サイクル) ; 続いて4°でのソーキング。フラグメントを、FseI及びBgIII制限エンドヌクレアーゼにより消化し、そして続いて、1%ゲル電気泳動、及びQiaQuickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてのバンド精製により精製した。得られる精製されたDNAを、FseI及びBgIII部位のFc4 3'を含む、FseI及びBgIIIにより前もって消化されたpEZE-2ベクター中に、室温で5時間、連結した。

【0446】

20 μlの連結混合物を、37 μlのDH10BエレクトロコンピテントE.コリ (Gibco) において、製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートした。形質転換された細胞を、400 μlのLB培地に希釈し、そして100 μg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にプレートした。クローニングを制限消化により分析し、そして陽性クローニングをDNA配列決定のために送り、融合構造体の配列を確かめた。1 μlの陽性クローニングを用いて、37 μlのDH10BエレクトロコンピテントE.コリを形質転換し、そしてLB/ampプレート上に画線培養した。単一のコロニーを、この画線培養されたプレートから、250 mlのLB/amp培地に採取し、次に、250 rpmで振盪しながら、37°で一晩、増殖せしめた。この培養物を、QiagenプラスミドMaxiキット (Qiagen) を用いて、750 μgの精製されたDNAを生成するために使用した。

10

20

30

40

50

【0447】

例9 . zcytor17可溶性受容体ポリペプチドのトランフェクション及び発現

BHK 570細胞 (ATCC No. CRL-10314), DG44 CHO, 又は他の哺乳類細胞を、800 μ lの適切な血清フリー (SF) 培地 (例えば、DMEM、Gibco/BRL High Glucose) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)において、約 1.2×10^6 個の細胞/ウェル (6 - ウェルプレート)でプレートする。細胞を、血清フリー (SF) 培地において、LipofectinTM (Gibco BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、zcytor17 CEE, zcytor17 CFLG, zcytor17 CHIS又はzcytor17 - Fc4 (例8) を含む発現プラスミドによりトランスフェクトする。可溶性受容体を発現する単一のクローニングを単離し、スクリーンし、そして細胞培養培地において増殖せしめ、そして標準の方法を用いて精製する。

10

【0448】

A. 可溶性ヒトzcytor17 CEE受容体の哺乳類発現 :

BHK570細胞 (ATCC No: CRL-10314) を、T-75組織培養フラスコにプレートし、そしてDMEM/FBS培地 (DMEM、Gibco/BRL High Glucose, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)、5%ウシ胎児血清、1mMのL-グルタミン (JRH Biosciences, Lenea, KS)、1mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL))において、37 度5%CO₂において、約50~70%の集密性まで増殖した。次に、細胞を、血清フリー (SF) 培地配合物 (DMEM、10mg/mlのトランスフェリン、5mg/mlのインスリン、2mg/mgのフェチュイン、1%のL-グルタミン及び1%のピルビン酸ナトリウム)において、LipofectamineTM (Gibco BRL) を用いて、zcytor17CEE (例8) を含むプラスミドによりトランスフェクトした。

20

【0449】

10 μ gのプラスミドDNA pZp9zcytor17CEE (例8) を、15mlの管中に希釈し、SF培地により500 μ lの最終合計体積にした。50 μ lのLipofectamineを、450 μ lのSF培地と共に混合した。そのLipofectamine混合物を、DNA混合物に添加し、そして室温で約30分間インキュベートした。4mlのSF培地を、DNA : Lipofectamine混合物に添加した。細胞を5mlのSF培地により1度すぎ、吸引し、そしてDNA : Lipofectamine混合物を添加した。細胞を37 度5時間インキュベートし、そして次に、5mlのDMEM/10%FBS培地を添加した。

20

【0450】

フラスコを37 度一晩インキュベートし、この後、細胞を、1 : 2、1 : 10及び1 : 50で、150mmのプレートに1 μ Mのメトトレキセート又は10 μ Mのメトトレキセート (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を含む上記からの選択培地 (DMEM/PBS培地) 中に分けた。トランスフェクションの約10日後、1 μ Mのメトトレキセート耐性コロニーの1つの150mmプレートを、トリプシン処理し、細胞をプールし、そして細胞の半分を10 μ Mのメトトレキセートに再プレートし、zcytor17CEEタンパク質の発現をさらに増殖した。この増幅された細胞のプールからのならし培地サンプルを、SDS-PAGE及びウェスタン分析を用いて、発現レベルについて試験した。

30

【0451】

B. 可溶性ヒトzcytor17 - Fc4受容体の哺乳類発現 :

20 μ gのpEZE - 2hzcytor17Fc4プラスミドDNA (例8) の5個の複製体を、ベクター内を1度切断し、そして発現のために必要な遺伝子を妨げない制限酵素であるFspIによる制限消化により線状化した。200 μ gのCHO細胞ゲノムDNAを、キャリヤーDNAとして個々の複製体に添加し、そして次に、DNAを、0.1体積の3Mの酢酸ナトリウム (pH5.2) 及び2.2体積のエタノールの添加により沈殿せしめ、続いて4 度の15分間の氷インキュベーション及びマイクロ遠心分離を行った。得られるDNAペレットを、70%エタノールにより洗浄し、そして空気乾燥し、その後、100 μ lのタンパク質フリー (PF) CHO非 - 選択増殖培地 (21 g/lのPF CHO Ex細胞325/200mMのL-グルタミン (Gibco) /100mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco) / 1 × HT Supplement (Gibco)) に再懸濁した。

40

【0452】

1×10^7 個のPF CHO細胞を、600 μ lのPF CHO非 - 選択増殖培地におけるDNAに添加し、そして次に、0.4cmギャップGene Pulser (BioRad) エレクトロポレーションキュベッ

50

トを用いて、 $950\mu F$ のキャパシタンス及び300Kvを用いてのGene Pulser II Electroporation system(BioRad)においてエレクトロポレートした。エレクトロポレートされた細胞のすべての複製体を、プールし、そして、- HT培地 (21g/lのPF CHO Ex細胞325/200mMのL-グルタミン (Gibco) /100mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco))において直接的に選択した。細胞を - HT培地において5日間、選択し、その後、50nmのMTX選択のために $4 \times 10^5/mI$ で継代した。

【0453】

8日後、細胞を、200mMのMTX選択のために 3.5×10^5 個の細胞/mIで接種した。1週間後、細胞を、 $1\mu M$ のMTX選択のために $4 \times 10^5/mI$ で接種した。 $1\mu M$ のMTXでの2週間後、細胞を、 1×10^6 個の細胞/mIで50mlに接種し、ならし培地を生成した。得られる72時間のならし培地を、ヒトIgに対して生成された抗体によりウェスタンプロットをプローブすることによって分析した。細胞は、約1mg/lでhzcyt17/Fc4タンパク質を生成した。

【0454】

C. 可溶性ヒトzcyt17 - Fc4受容体の大規模哺乳類発現：

$200\mu g$ のpEZE - 2hzcyt17Fc4プラスミドDNA(例8)を、pEZE-2ベクター内を1度切斷し、そして発現のために必要な遺伝子を妨げない制限酵素であるFspIによる制限消化により線状化した。 $200\mu g$ のCHOゲノムDNA(自家調製された)を、キャリヤーDNAとして添加し、そして次に、DNAを、0.1体積の3Mの酢酸ナトリウム(pH5.2)及び2.5体積のエタノールの添加により沈殿せしめ、続いて室温でのマイクロ遠心分離を行った。5複製DNAペレットを製造し、そして形質転換した。得られるDNAペレットを、70%エタノールにより洗浄し、そして空気乾燥し、その後、 $100\mu l$ のPF CHO非 - 選択増殖培地 (21g/lのPF CHO Ex細胞325/200mMのL-グルタミン (Gibco) /100mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco) /1 × HT Supplement (Gibco))に再懸濁した。

【0455】

10×10^6 個のPF CHO細胞を、 $600\mu l$ のPF CHO非 - 選択増殖培地におけるDNAに添加し、そして次に、0.4cmギャップGene Pulser (BioRad) エレクトロポレーションキュベットを用いて、 $950\mu F$ のキャパシタンス及び380Vを用いてのGene Pulser II Electroporationにおいてエレクトロポレートした。エレクトロポレートされた細胞を、プールし、そして - HT培地 (21g/lのPF CHO Ex細胞325/200mMのL-グルタミン (Gibco) /100mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco))において選択した。細胞を - HT培地において14日間、選択し、その後、50nmのMTX選択のために $4 \times 10^5/mI$ で継代した。細胞を200nMのMTXで、及び次に $1\mu M$ のMTXで増殖した。- HT, 50nM及び $1\mu M$ のプールを、48時間、 $1 \times 10^6/mI$ の接種し、そしてその得られるならし培地を、ヒトIgに対して生成された抗体によりウェスタンプロットをプローブすることによって分析した。

【0456】

例10. BHK570及びCHO細胞からのzcyt17可溶性受容体の精製

A. 可溶性ヒトzcyt17 - Fc4受容体の過渡的哺乳類発現及び精製：

pEZE - 2hzcyt17/Fc4プラスミドDNA(例11B)を、Lipofectamine (Gibco BRL) を用いて、本明細書に記載のようにして、及び製造業者の説明書に従って、BHK細胞の40maxiプレート中に導入した。細胞を一晩、回収し、すすぎ、そして血清フリー培地(自家製造されたSL7V4)を再供給した。72時間後、培地を集め、そして濾過し、そして細胞を血清フリー培地に再供給した。72時間後、培地を再び集め、そして濾過した。

【0457】

過渡的にトランسفェクトされたBHK細胞からの血清フリーならし培地 ($2 \times 1.5L$ のバッチ)を、 $20mM$ のトリス(pH7.5)、 $0.5M$ のNaClの溶液中、 $1.5ml$ のプロテインA - アガロースカラム上に供給した。カラムをこの緩衝液により集中的に洗浄し、そして次に、結合されたタンパク質を、 $1ml$ の $0.2M$ のグリシン(pH2.5)、 $0.5M$ のNaCl溶液により溶出した。溶出されたタンパク質を、 $0.1ml$ の $2M$ のトリス(pH8.5)中に集めた。

アリコートを、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動のために集め、そして多量のzcyt17 - Fcを、PBSに対して一晩、透析した。可溶性受容体を無菌濾過し、そして - 80 度

10

20

30

40

50

アリコートで配置した。

【0458】

B. zcytor17-Fc4の精製：

組換えカルボキシル末端Fc4標識されたzcytor17(例8及び9)を、トランスフェクトされたCHO細胞から生成した。CHOトランスフェクションを、当業界において知られている方法を用いて行った。約5Lのならし培地を収穫し、そしてNalgene(0.2μm)フィルターを用いて無菌濾過した。

【0459】

タンパク質を、前記濾過された培地から、Poros50プロテインA親和性クロマトグラフィー(PerSeptive Biosystems, 1-5559-01, Framingham, MA)及びSuperdex200ゲル排除クロマトグラフィーカラム(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)の組合せにより精製した。培養培地を、約3~10ml/分の流速で、10×70mm(5.5mlの層体積)のプロテインA親和性カラム上に直接的に負荷した。10カラム体積のPBSによるカラムの洗浄の後、結合されたタンパク質を、5カラム体積の0.1Mのグリシン(pH3.0)により、10ml/分で溶出した。

【0460】

それぞれ2mlの画分を、溶出されたタンパク質を中和するために、100μlの2.0Mのトリス(pH8.0)を含む管中に集めた。親和性カラムからのサンプルを、クーマシー染色によるSDS-PAGE、及びウェスターんプロットにより、ヒトIg-HRPを用いて、zcytor17-Fc4の存在について分析した。zcytor17-Fc4含有画分をプールし、そしてBiomax-30濃縮機(Millipore)を用いて、1~2mlに濃縮し、そして20×580mmのSuperdex200ゲル濾過カラム上に負荷した。精製されたzcytor17-Fc4を含む画分をプールし、0.2μmのフィルターを通して濾過し、それぞれ100μlにアリコートし、そして-80℃で凍結した。最終の精製されたタンパク質の濃度を、BCAアッセイ(Pierce, Rockford, IL)により決定した。

【0461】

C. zcytor17/Fc4のSDS-PAGE及びウェスターんプロット：

組換えzcytor17-Fc4を、クーマシー染色方法を用いてのSDS-PAGE(Nupage4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA)及びヒトIg-HRPを用いてのウェスターんプロットにより分析した。ならし培地又は精製されたタンパク質のいずれかを、Invitrogen Novex's Xcell II mini-cellを用いて電気泳動し、そして装置のマニュアルに提供される指針に従って、Novex's Xcell IIプロットモデルを用いて室温でニトロセルロース(0.2mm; Invitrogen, Carlsbad, CA)に、攪拌しながらトランスファーした。トランスファーを、25mMのトリス塩基、200mMのグリシン及び20%メタノールを含む緩衝液において、500mAで1時間、行った。

【0462】

次に、フィルターを、PBS中、10%脱脂粉乳により、室温で10分間、ロックした。ニトロセルロースをすばやくすすぎ、次にヒトIg-HRP抗体(1:2000)を、2.5%の脱脂粉乳を含むPBSに添加した。プロットを、軽く振盪しながら、室温で2時間、又は4℃で一晩インキュベートした。インキュベーションに続いて、プロットを、それぞれPBSにより10分間、3度、洗浄し、次に水により、すばやくすすいだ。プロットを、市販の化学ルミネセント基質試薬(1:1で混合されたSuperSignal(商標)ULTRA試薬1及び2; Pierce, Rockford, ILから得られた試薬)を用いて進行せしめ、そしてシグナルを、Lumi-Image's Lumi Analyst 3.0ソフトウェア(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)を用いて、10秒~5分の範囲の暴露時間又は必要な時間、捕獲した。

【0463】

精製されたzcytor17-Fc4は、非還元条件下で約220kDaで、及び還元条件下で約120kDaで、クーマシー又は銀染色のいずれかにより単一バンドとして出現し、このことは、予測されるように、非還元条件下でzcytor17-Fc4の二量体形を示す。

【0464】

例11. 競争阻害アッセイにおけるzcytor17可溶性受容体zcytor17-Fc4可溶性受容体を用

10

20

30

40

50

いてのアッセイ

BaF3/zcyt17/WSX-1/OSMR 細胞又はBaF3/zcyt17/OSMR 細胞を、回転沈降せしめ、そしてmIL-3フリー培地により洗浄した。細胞回転せしめ、そして3度、洗浄し、mIL-3の除去を確保した。次に、細胞を、血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり $100\mu\text{l}$ の体積で、ウェル当たり5000個の細胞での96-ウェル形式プレートした。

【0465】

例5に記載される、CCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞活性化及びヒトCD3+選択された細胞からの両ならし培地を、 $1 \sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ でzcyt17可溶性受容体(zcyt17-Fc4;例9及び10を参照のこと)と共に又はそれを伴わないで、25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.5%、0.75%、0.375%及び0.187%濃度で、別々の実験において添加した。合計のアッセイ体積は $200\mu\text{l}$ であった。

【0466】

アッセイプレートを、 37°C 、5%CO₂で3~5日間インキュベートし、この時点でAlamar Blue(Accumed)を $20\mu\text{l}$ /ウェルで添加した。プレートを再び、 37°C 、5%CO₂で16~24時間インキュベートした。プレートを、例2に記載のようにして、FmaxTMプレートリーダー(Molecular Devices)上で読み取った、結果は、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ でのzcyt17-Fc4可溶性受容体による細胞増殖の部分的阻害を示し、このことは、個々のサンプルにおける因子がzcyt17受容体に対して特異的であることを確めた。

【0467】

可溶性受容体、又はzcyt17受容体を含んで成る可溶性受容体ヘテロダイマー及びトリマー(例えば、zcyt17/OSMR、zcyt17/ WSX-1又はzcyt17/OSMR / WSX-1、又は他のクラスIサイトカイン受容体サブユニット)を希釈する滴定曲線はまた、zcyt17受容体が例えば低いか又は生理学的濃度で、増殖を完全に阻害することができるかどうかを決定するために、上記で言及されたアッセイを用いて実施される。

【0468】

例12. 分泌トラップアッセイ

分泌トラップアッセイを用いて、zcyt17受容体を含んで成る受容体、例えばzcyt17受容体、又はzcyt17受容体を含んで成る受容体ヘテロダイマー及びトリマー(例えば、zcyt17/OSMR、zcyt17/ WSX-1又はzcyt17/OSMR / WSX-1、又は他のクラスIサイトカイン受容体サブユニット)へのzcyt17ligの結合を試験する。zcyt17ligプラスミドDNAを、COS細胞中にトランスフェクトし、そして下記のようにして、分泌トラップにより、zcyt17受容体を含んで成る受容体へのzcyt17ligの結合を評価するために使用する。

【0469】

A. COS細胞トランスフェクション:

COS細胞トランスフェクションを次の通りに行った: $92\mu\text{l}$ の血清フリーDMEM培地(500ml のDMEM中、 55mg のピルビン酸ナトリウム、 146mg のL-グルタミン、 5mg のトランスフェリン、 2.5mg のインスリン、 $1\mu\text{g}$ のセレニウム及び 5mg のフェテュイン)中、 800ng のzcyt17lig DNA及び $5\mu\text{l}$ のリポフェクタミンTMの混合物を、室温で30分間インキュベートし、そして次に、 400ml の血清フリーDMEM培地を添加した。この $500\mu\text{l}$ の混合物を、 1.5×10^5 個の細胞/ウェルで12-ウェル組織培養プレート上にプレートし、そして 37°C で5時間インキュベートした。追加の $500\mu\text{l}$ の20%FBS DMEM培地(500ml のDMEM中、 100ml のFBS、 55mg のピルビン酸ナトリウム及び 146mg のL-グルタミン)を添加し、そしてプレートを一晩インキュベートした。

【0470】

B. 分泌トラップアッセイ:

分泌トラップを次の通りにして行った: 培地を、PBSによりすすぎ、細胞を除き、そしてPBS中、1.8%ホルムアルデヒドにより15分間、固定した。次に、細胞を、TNT(水中、 0.1M のトリス-HCl、 0.15M のNaCl、及び0.05%のTween-20)により洗浄した。細胞を、PB

10

20

30

40

50

S中、0.1% Triton - Xにより15分間、透過せしめ、そしてTNTにより洗浄した。細胞を、水中、TNB(0.1Mのトリス-HCl、0.15MのNaCl及び0.5%のプロッキング試薬(NEN Renaissance TSA-Direct Kit)により1時間、阻止した。細胞を再びTNTにより洗浄した。ビオチニル化された受容体タンパク質を用いる場合、細胞は、アビジン及びビオチン(Vertor Labs)と共に15分間のインキュベーション、TNTによる中間的な洗浄によりブロックされる。

【0471】

可溶性受容体の使用に依存して、細胞を、次のものと共に、TNBにおいて1時間インキュベートする：

- (A) 1～3 μg/mlのzcytor17可溶性受容体zcytor17-Fc4融合タンパク質(例10)；
- (B) 1～3 μg/mlのzcytor17/OSMR 可溶性受容体タンパク質；
- (C) 1～3 μg/mlのzytor17/WSX-1可溶性受容体タンパク質；又は
- (D) 1～3 μg/mlのzcytor17/OSMR/WSX-1可溶性受容体タンパク質。

【0472】

次に細胞をTNTにより洗浄する。可溶性受容体の使用に依存して(例えば、Fc4標識(配列番号37)、C-末端FLAG標識(配列番号36)又はCEE標識(配列番号32; 35)によりラベルされる場合)、細胞を、TNB中、次のものと共にさらに1時間インキュベートする：(A)1:200に希釈された抗-Glu Glu抗体-HRP；又は(D)1:300に希釈されたストレプタビジン-HRP(NENキット)。再び細胞をTNTにより洗浄する。

【0473】

陽性結合を、希釈緩衝液(NENキット)において1:50に希釈されたフルオレセインチラミド試薬により検出し、そして4～6分間インキュベートし、そしてTNTにより洗浄する。細胞を、TNTにより1:5に希釈されたVectashield Mounting Media(Vector Labs Burlingame, CA)により保存する。細胞を、蛍光顕微鏡上で、FITCフィルターを用いて可視化する。

【0474】

例13. zcytor17ligについての遺伝子配列の染色体割り当て及び配置

zcytor17lig遺伝子配列を、市販のStanford G3 Radiation Hybrid Mapping Panel (Research Genetics, Inc. Huntsville, AL)を用いて、染色体12にマッピングした。そのStanford G3 RH Panelは、完全なヒトゲノムの83の放射線ハイブリッドクローニングの個々からのDNA、及び2種の対照DNA(RMドナー及びA3受容体)を含む。公開されているWWWサーバー(例えば、Stanford University)は、マーカー及び遺伝子の染色体局在化を可能にする。

【0475】

Stanford G3 RH Panelによるzcytor17ligのマッピングのために、20 μlの反応体をPCRのために適合する96-ウェルマイクロタイプレート(Stratagene, La Jolla, CA)に提供し、そして"RoboCycler Gradien 96"熱サイクラー(Stratagene)において使用した。個々の95のPCR反応体は、2 μlの10×PCR反応緩衝液(Qiagen, Inc., Valencia, CA)、1.6 μlのdNTP混合物(それぞれ2.5mM、PERKIN-ELMER, Foster City, CA)、1 μlのセンスプライマー、ZC41,458(配列番号42)、11 μlのアンチセンスプライマー、ZC41,457(配列番号43)、2 μlのRediLoad(Research Genetics, Inc. Huntsville, AL)、0.4 μlのQiaqen HotStarTaq DNAポリメラーゼ混合物(5単位/μl)、25ngの個々のハイブリッドクローニング又は対照からのDNA、及び20 μlの合計体積のための蒸留水から構成された。

【0476】

反応を同量の鉱油により被覆し、そして密封した。PCRサイクラー条件は次の通りであった：95℃で15分間の変性、初期の1サイクル、95℃で45秒間の変性、53℃で1分間のアニーリング及び72℃で1分間の延長、35サイクル、続いて72℃で7分間の延長、最終の1サイクル。反応を、2%アガロースゲル上で電気泳動により分離し(EM Science, Gibbstown, NJ)、そして臭化工チジウムによる染色により可視可した。

【0477】

10

20

30

40

50

結果は、11以上のKOD評点を伴って、及びマークーから17cR_1000の距離で、染色体2マークーSHGC - 83339への`zcytor17lig`遺伝子配列の連鎖を示した。このマークーは、12q24.31染色体領域における`zcytor17lig`遺伝子を位置決定する。

【0478】

例14. ネズミ`zcytor17lig`の同定及びクローニング

A. 十分な長さのネズミ`zcytor17lig`の同定：

社内DNAデータベースへの質問のためにヒト`zcytor17lig`ペプチド配列（配列番号12）を用いて、Genbank受託番号AK005939号のネズミcDNAを、ネズミ`cytor17lig`のための可能性ある部分配列として同定した。AK005939号のcDNA配列を用いて、ネズミゲノムフラグメントを含むデータベースを調べた。ネズミ`cytor17lig`のゲノムコンチグ（contig）をアセンブルした（配列番号76）。プログラムGenscanによるゲノムフラグメントに対するコード能力の予測は、ヒト`zcytor17lig`と同じ遺伝子構造を有する有力なcDNA配列を示したネズミcDNA配列は、配列番号10で示され、そして対応するポリペプチド配列は配列番号11で示される。

10

20

30

40

【0479】

B. マウス精巣cDNAライブラリーからのマウス`zcytor17lig`のPCRによるクローニング：

ゲノム配列（配列番号76）に基づいて、2種のPCRプライマーを企画し、そしてPCRによりマウス`zcytor17lig`のcDNA源を同定するために使用した。それらのプライマーZC41498（配列番号86）及びZC41496（配列番号87）を、マウス配列の推定上の5'及び3'未翻訳領域（配列番号76及び10）に対して企画した。いくつかのcDNA源、例えばMarathon - ready cDNA (Clontech) 及び局部的に製造されたcDNAライブラリーのアリコートを、PCRによりスクリーンした。生成物を、1%アガロースゲル上で可視化した。予測されるサイズのバンドが、マウス精巣cDNAライブラリー鋳型を用いての反応において観察された。

20

【0480】

それらのPCR反応は、製造業者の推薦に従って、`pfu turbo`ポリメラーゼ（Stratagene）を用いて、10%DMSOを伴って又は伴わないで約50μlの体積で、及びほっと開始50sを用いてワックスホット - スタート（Molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA）の追加の適用を伴って、都合よく行われた。PCRサーモサイクリングを次のように行った：94度4分（1サイクル）；続いて94度30秒、48度30秒、72度50秒（40サイクル）；72度7分の追加の最終拡張。2種のPCR反応をプールし、そして低溶融アガロース及びGelaseアガロース消化酵素（Epicenter, Inc. Madison, WI）を用いて、その製造業者の推薦に従って精製した。

30

【0481】

それらのPCR生成物のDNA配列決定は、配列番号10と同一のORFを含んで成るネズミ`zcytor17`cDNA配列（配列番号90）を表し、これは、配列番号10がマウス`zcytor17lig`ポリペプチドをコードすることを確めた。次に、PCRプライマーZC41583（配列番号88）及びZC41584（配列番号89）を用いて、`mcytor17lig`読み取り枠及び終結コドン（配列番号92）に、`FseI`及び`Ascl`制限部位及び部分Kozak配列を付加した。Robocycler40サーモサイクラー（Stratagene）を用いて、次の通りに、アニーリング温度及びサイクリングの温度グラジエントを行った。

40

【0482】

`Pfu`ター`ボ`ポリメラーゼ（Stratagene）を、上記のようにして、但し10%DMSOにおいてのみ適用した。サイクリングを、次のように行った：94度4分（1サイクル）；続いて94度30秒、65～51度のグラジエント、30秒、72度1分（20サイクル）；及び72度7分の1回の拡張。この第2のサーモサイクリング反応のための鋳型は、上記の1μlの初期ゲル精製された`mcytor17lig` PCR生成物であった。3種の最低温度反応からの得られるPCR生成物をプールし、そして上記のGelase（Epicenter）方法を用いて精製した。この精製された`mcytor17lig`を、`FseI`及び`Ascl`により消化し、そしてそのクローニング部位に`FseI`及び`Ascl`部位を有するよう修飾されたpZP7Xベクターに連結した。

【0483】

50

プラスミドpZP7Xは、マウスマタロチオネイン - 1 (MT-1) プロモーター、コード配列の挿入のため複数制限部位、及びヒト成長ホルモンターミネーターを有する発現カセットを含む哺乳類発現ベクターである。プラスミドはまた、複数のE.コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳選択マークー発現単位、DHFR遺伝子、及びSV40ターミネーターを有する。クローン化されたネズミcDNA配列は、配列番号90で表され、そしてその反応するポリペプチド配列は、配列番号91(配列番号11と同一である)で示される。

【0484】

例15. 活性化されたマウス脾臓ライブラリーからのマウスzcytor17lig cDNAクローンの単離

10

A. マウスzcytor17ligを単離するために使用されるネズミ - 次源:

Balb/Cマウスからのマウス脾臓を集め、そして細胞懸濁液を創造するために、フロスト仕上げの末端スライド間で押しつぶす。単離された一次マウス細胞収量は、下記選択の前、約 6.4×10^8 個の細胞であることが予測される。

脾臓細胞を、9.6mlのMACS緩衝液(PBS, 0.5%EDTA, 2mMのEDTA)に懸濁する。1.6mlの細胞懸濁液を除き、そして0.4mlのCD90(Thy1.2)マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)を添加する。この混合物を、4℃で15分間インキュベートする。CD90ビーズによりラベルされたそれらの細胞を、30mlのMAGS緩衝液により洗浄し、そして次に、2mlのMACS緩衝液に再懸濁する。

【0485】

VS+カラム(Miltenyi)を、その製造業者の説明書に従って調製する。次に、VS+カラム、VarioMACSTM磁気場(Miltenyi)に配置する。カラムを、5mlのMACS緩衝液により平衡化する。次に単離された一次マウス細胞をカラムに適用する。CD90陰性細胞を通す。カラムを、9ml(3×3ml)のMACS緩衝液によりすぎ、次に、カラムを磁気から除去し、そして15mlのファルコン管上に配置する。CD90+細胞を、カラムに5mlのMACS緩衝液を添加することにより溶出し、そして結合された細胞を、製造業者により提供されるプランジャーを用いてフラッシュする。CD90磁気ビーズと共に細胞のインキュベーション、洗浄及びVS+カラム段階(溶出を通してのインキュベーション)を、さらにもう1度、反復する。2カラム分離からの得られるCD90+画分をプールする。CD90+選択されたマウス脾臓細胞の収量は、合計的 1×10^8 個の細胞であることが予測される。

20

30

【0486】

プールされたCD90+選択されたマウス細胞のサンプルを、それらの純度を評価するために、染色及び蛍光抗体細胞ソーター(FACS)上での分類のために除去する。PE-接合されたハムスター抗-マウスCD3抗体(PharMingen)を、CD90+選択された細胞の染色及び分類のために使用する。マウスCD90+選択された細胞は約93%のCD3+細胞であり、細胞が92%のT-細胞であることを示唆する。

【0487】

ネズミCD90+選択された細胞を、RPMI+5%FBS+PMA10ng/ml及びイノマイシン0.5μg/ml(Calbiochem)において、 3×10^6 個の細胞/mlを、37℃で一晩インキュベートすることにより活性化する。それらの活性化されたCD90+選択されたマウス細胞からの上清液を、下記のようにしてzcytor17lig活性について試験する。さらに、その活性化されたCD90+選択されたマウスを用いて、下記例16に記載のようにして、cDNAライブラリーを調製する。

40

【0488】

例16. マウスCD90+選択された細胞ライブラリーからのマウスzcytor17ligのクローニング

50

一次マウス活性化されたCD90+選択された細胞cDNAライブラリーのスクリーニングは、ヒトzcytor17ligのマウスオルト体をコードする4-ヘリックス束のサイトカインファミリーの新規メンバーである単離されたcDNAを示すことができる。cDNAは、ハイブリダイゼーションスクリーニングにより同定される。

【0489】

A. CD90+選択されたライブラリー構成のためのベクター：

ベクターpZP7Nを、CD3+選択されたライブラリー構成のために使用する（例6Aを参照のこと）。

【0490】

B. 一次マウス活性化されたCD90+選択された細胞cDNAライブラリーの調製：

イノマイシン/PMAにおいて刺激された、約 1.5×10^8 個の一次マウスCD90+選択された細胞（例15）を、遠心分離により単離する。全RNAを細胞ペレットから単離し、そして例6Bに記載のようにして、二本鎖cDNAに転換する。続いて、このDNAを、例6Bに記載のようにして、BHK細胞中にトランスフェクトし、そして増殖を、“Alamar blue”蛍光アッセイ（例2B）を用いて評価する。

【0491】

分泌トラップクローニングによるライブラリーのスクリーニングのためには、ライブラリーの複雑な増幅された形が、COS-7細胞をトランスフェクトするために必要とされる。4.8×10⁶個のクローンを、100μg/mlのアンピシリン、10μg/mlのメチシリソルにより補充された110の15cm LB寒天プレート上にプレートする。37℃での一晩、プレートを増殖した後、細菌を削り取ることにより収穫し、そしてペレット化する。プラスミドDNAを、Nucleobond-gigaTM (Clonetech) を用いて、その製造業者の説明書に従って、ペレット化された細菌から抽出する。次に、このプラスミドを用いて、スライド上にCOS-7細胞をトランスフェクトし、そして下記分泌技法（例17）を用いてスクリーンする。

【0492】

C. 活性化されたマウスcDNAライブラリーのスクリーニング：

約5×10⁵個のクローンを、10のLB/Amp Maxiプレート上にプレートする。コロニーを、持ち上げ、変性し、中和し、そして標準の方法（Sambrook, J.など、前記）を用いて架橋する。50ngの300bpの5' RACE PCRフラグメント（例14）を、Prime-ItTM RmTランダムプライマーラベリングキット（Stratagene）を用いて、³²Pによりラベルする。10のフィルターを、このラベルされたプローブにより、ExpressHybTM ハイブリダイゼーション溶液（Clontech）を用いて、65℃で一晩ハイブリダイズする。

【0493】

次に、フィルターを、0.2×SSC（30mMのNaCl、3mMのクエン酸ナトリウム、pH7.0）0.1%SDSにより60℃で1時間、3度；及び65℃で1時間、連続的に洗浄する。フィルターを、80℃で一晩、暴露し、そしてX-線フィルムを現像する。陽性コロニーを含む寒天プラグを引き寄せ、そしてクローンを10-cmのLB/Ampプレート上にプレートする。次に、コロニーを、フィルター上に持ち上げ、そして再び、上記と同じ方法に従ってハイブリダイズする。単一のDNAクローンを単離し、そして標準の方法を用いて配列決定し、マウスcDNAを同定する。

【0494】

例17. マウスzcytor17ligは、分泌トラップアッセイにおいてヒトzcytor17可溶性受容体に結合しない

マウスクローンmzcytor17lig/pZP7を、COS細胞中にトランスフェクトし、そしてzcytor17含有可溶性受容体（ヒトzcytor17可溶性受容体zcytor17-Fc4）（例10）又は可溶性受容体ヘテロダイマー（zcytor17/WSX-1又はBaF3/zcytor17/OSMR）の前記トランスフェクトされたCOS細胞への結合を、分泌トラップアッセイ（例12）により試験した。このアッセイは、マウスzcytor17ligがヒトzcytor17可溶性受容体に結合しないことを確めた。

COS細胞トランスフェクションを、約0.7μgのマウスzcytor17lig cDNA（例16）を用いて、例12に従って行った。

【0495】

分泌トラップを、例えばTNB中、1μg/mlのzcytor17可溶性受容体Fc4融合タンパク質（例10）（又は、本明細書に記載されるようなzcytor17含有可溶性受容体ヘテロダイマー）、及び検出可能な抗のための、TNB中、1:200に希釀されたヤギ-抗-ヒトIg-HRP（Fc

10

20

30

40

50

特異的)を用いて、例12に従って行った。調製され、固定された細胞への可溶性ヒトzcyt or17受容体の陽性結合は、例12に従って、フルオレセインチラミド試薬により検出されなかった。細胞を、例12に従って、保存し、そして可視化した。

結果は、マウスzcyt or17ligがヒトzcyt or17可溶性受容体(又は本明細書に記載されるようなzcyt or17含有可溶性受容体ヘテロダイマー)に結合しないことを示した。

【0496】

例18. 哺乳類細胞におけるマウスzcyt or17ligの発現

マウスzcyt or17ligの哺乳類発現:

BHK570細胞(ATCC No. CRL-10314)を、10cmの組織培養皿にプレートし、そして37¹⁰、5%CO₂で一晩、DMEM/FBS培地[(DMEM, Gibco/BRL High Glucose培地; Gibco BRL, Gaithersburg, MD)、5%ウシ胎児血清(Hyclone, Logan, Ut)、1mMのL-グルタミン(JRH Biosciences, Lenexa, KS)、1mMのピルビン酸ナトリウム(GibcoBRL)]において、約20%の集密性まで増殖した。次に、細胞を、哺乳類安定性リポフェクタミン(GibcoBRL)トランسفェクションキットを用いて、その製造業者の説明書に従って、プラスミドmzcyt or17lig/pZP7X(例14)によりトランسفェクトした。

【0497】

トランسفェクトの1日後、細胞を、150mmのプレートにおける選択培地(1μMのメトトレキセートを含むDMEM/FBS(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO))中に、1:10及び1:20で分離した。細胞上の培地を、トランسفェクションの5日後、新鮮な選択培地により交換した。トランسفェクションの約10日後、メトトレキセート耐性コロニーを、トリプシン処理し、そして細胞をプールし、そして大規模培養フラスコ中にプレートした。細胞が約90%の集密性に増殖されるとすぐに、それらをPBSにより3度すすぎ、そして血清フリーのESTEP2培地(DMEM(GibcoBRL), 0.11g/Lのピルビン酸ナトリウム、3.7g/Lの炭酸水素ナトリウム、2.5mg/Lのインスリン、5mg/Lのトランسفェリン、pH7.0)により培養した。ならし培地を、3日後に集め、そして下記例19に記載される、Alamar Blueを用いてBaF3増殖アッセイ中に導入した。

【0498】

例19. マウスzcyt or17ligはAlamar Blueを用いてのBaF3アッセイにおけるヒトzcyt or17受容体を活性化しない

BaF3/zcyt or17, BaF3/zcyt or17/OSMR及びBaF3/zcyt or17/WSX-1細胞(例4及び5B)の増殖を、マウスzcyt or17ligを発現するBHK細胞(例18)からの血清フリーならし培地を用いて評価した。BaF3/zcyt or17, BaF3/zcyt or17/OSMR及びBaF3/zcyt or17/WSX-1細胞を、例5Bに記載のようにして、回転沈降し、洗浄し、そしてmIL-3フリー培地にプレートした。マウスzcyt or17ligを発現するBHK細胞(例18)からのならし培地を、mIL-3フリー培地により、50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.5%, 0.75%及び0.375%濃度に希釈した。増幅アッセイを、例5Bに従って行った。このアッセイの結果は陰性であり、このことはマウスzcyt or17ligがヒトzcyt or17, zcyt or17/OSMR又はzcyt or17/WSX-1受容体複合体を活性化しないことを示唆する。

【0499】

例20. ヒトzcyt or17ligはルシフェラーゼアッセイにおいてヒトzcyt or17/OSMR受容体を活性化する

A. BaF3/KZ134/zcyt or17細胞系の構成:

KZ134プラスミドは、次の4種の遺伝子からのSTAT転写因子結合要素を含む相補的オリゴヌクレオチドZC12,749配列番号44)及びZC12,748(配列番号45)により構成されたKZ134プラスミドから構成され:修飾されたc-fos Sis誘発性要素(m67SIE又はhSIE)(Sadowski, H.など., Science 261: 1739-1744, 1993)、p21 WAF1遺伝子からのp21 SIE1(Chin, Y.など., Science 272: 719-722, 1996)、-カゼイン遺伝子の乳腺応答要素(Schmitt-Ney, M.など., Mol. Cell. Biol. 11: 3745-3755, 1991)、及びFcγ RI遺伝子のSTAT誘発性要素(Seidel, H.など., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995)。

【0500】

10

20

30

40

50

それらのオリゴヌクレオチドは、Asp718-Xhol適合性末端を含み、そして同じ酵素により消化されたc-Fosプロモーター（Poulsen, L.K.など., J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998）を有し、そしてネオマイシン選択マーカーを含む受容体ホタルルシフェラーゼレポーターベクター中に、標準の方法を用いて連結された。KZ134プラスミドを用いて、BHK又はBaF3細胞を標準のトランスフェクション及び選択方法により安定してトランスフェクトし、BaF3/KZ134細胞系を製造する。

【0501】

十分な長さのzcytor17又はzcytor17/OSMR 受容体を発現する安定したBaF3/KZ134インジケーター細胞系を、例4に従って構成した。クローンを希釈し、プレートし、そして標準の技法を用いて選択した。クローンを、ヒトzcytor17ligならし培地インジューサーとしての精製されたzcytor17ligタンパク質（下記例35を参照のこと）を用いて、ルシフェラーゼアッセイ（下記例20Bを参照のこと）によりスクリーンした。最高のルシフェラーゼ応答（STATルシフェラーゼを通して）及び最低のバックグラウンドを有するクローンを選択した。安定したトランスフェクト細胞系を選択した。それらの細胞系は、それらの細胞系中にトランスフェクトされた受容体に依存して、BaF3/ KZ134/zcytor17又はBaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR と呼ばれた。

【0502】

同様に、BHK細胞系をまた、本明細書に記載される方法を用いて構成し、そして本明細書に記載されるルシフェラーゼアッセイに使用した。それらの細胞系を、それらの細胞系中にトランスフェクトされた受容体に依存して、BHK/ KZ134/ zcytor17又はBHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR と呼ばれた。

【0503】

B. ヒトzcytor17ligはBaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR 又はBHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR ルシフェラーゼアッセイにおいてヒトzcytor17受容体を活性化する：

BHK/ KZ134/ zcytor17又はBaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR 細胞を、回転沈降し、そしてmIL-3フリー培地により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度、洗浄し、mIL-3の除去を確めた。次に、細胞を血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いてウェル当たり100μlの体積で、約30,000個の細胞/ウェルで96-ウェル形にプレートした。同じ方法を、続くアッセイにおいて対照として使用するために、トランスフェクトされていないBaF3/KZ134細胞に関して使用した。BHK/ KZ134/ zcytor17又はBHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR 細胞を、100μlの培地において15,000個の細胞/ウェルで96ウェル形にプレートした。親BHK/KZ134細胞を対照として使用した。

【0504】

BaF3/ KZ134/zcytor17、BHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR 、BHK/ KZ134/ zcytor17又はBHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR 細胞のSTAT活性化を、次のものを用いて評価した：（1）ヒトzcytor17ligによりトランスフェクトされたBHK570細胞からのならし培地（例7）、（2）マウスzcytor17ligによりトランスフェクトされたBHK570細胞からのならし培地（例7）、（3）精製されたヒトzcytor17lig（例35）、又は（4）培地のみの対照応答を測定するためのmIL-3フリーの培地。ならし培地を、RPMI mIL-3フリー培地により、50%，25%，12.5%，6.25%，3.125%，1.5%，0.75%及び0.375%の濃度に希釈した。精製されたヒトzcytor17ligを、1200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75又は9.4pMの濃度に希釈した。

【0505】

100μlの希釈されたならし培地又はタンパク質を、BaF3/ KZ134/zcytor17、BaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR 、BHK/ KZ134/ zcytor17又はBHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR 細胞に添加した。ならし培地を用いてのアッセイを、対照としてのトランスフェクトされていないBaF3/KZ134又はBHK/KZ134細胞に対して同時に行った。合計のアッセイ体積は200μlであった。アッセイプレートを、37℃, 5%CO₂で24時間インキュベートし、この時点、BaF3細胞を、2000rpmでの10分間の遠心分離によりペレット化し、そして培地を吸引し、そして25μlの溶解緩衝液（Promega）を添加した。BHK細胞系に関しては、遠心分離段階は、細胞が付着性があるので、必要でない。室温での10分後、プレートは、40μlのルシフェラーゼ活性化液を添加した。

ゼアッセイ基質 (Promega) を、5秒の組込みで添加された発光計 (Labsystems Luminoskan, モデルRS) 上でそれらを読み取ることによって、STATレポーター構造体の活性化について測定された。

【0506】

このアッセイの結果は、BaF3/ KZ134/zcytor17細胞、BaF3/ KZ134/zcytor17細胞又はトランスフェクトされないBaF3/KZ134又はBHK/KZ134対照細胞のいずれかに比較して、ヒトzcytor17ligに対するBaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR 及びBaF3/ KZ134/zcytor17/ OSMR 細胞のSTATレポーター応答が、その応答がzcytor17/OSMR 受容体を通して介在されることを示したことを確認した。この結果はまた、マウスzcytor17ligがヒト受容体複合体を通してSTATレポーターアッセイを活性化しないことを示した。

10

【0507】

例21. マウスzcytor17ligはマウス骨髄アッセイにおいて活性的である

A. 非付着性低密度骨髄細胞の同定：

新鮮なマウス大腿骨吸引物（骨髄）を、生後6～10週の雄Balb/C又はC57BL/6マウスから得る。次に、骨髄を、RPMI + 10% FBS (JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT) により洗浄し、そして完全な骨髄細胞を懸濁液としてRPMI + 10% FBSに懸濁する。次に、完全な骨髄細胞懸濁液を、密度グラジエント (Nycoprep, 1.077, Animal; Gibco BRL) にゆだね、次のようにして、低密度の、ほとんど単核の細胞のために富化する：完全な骨髄細胞懸濁液（約8ml）を、15mlの円錐形管における約5mlのNycoprepグラジエント溶液の上部にピペットにより注意して取り、そして次に、 $600 \times g$ で20分間、遠心分離する。

20

【0508】

次に、低密度単核細胞を含む界面層を除き、過剰のRPMI + 10% FBSにより洗浄し、そして400Xgでの5～10分間の遠心分離によりペレット化する。このペレットを、RPMI + 10% FBSに再懸濁し、そして約 10^6 個の細胞/mlでT-75フラスコにプレートし、そして37℃、5% CO₂で約2時間インキュベートする。懸濁液におけるその細胞は、非付着性低密度 (NALD) 骨髄細胞である。

【0509】

B. 96 - ウエルアッセイ：

NALDマウス骨髄細胞を、RPMI + 10% FBS + 1ng/mlのマウス幹細胞因子 (mSCF) (R&D Systems, Minneapolis, MN) + 次の1つからの5%ならし培地を含む96ウェル組織培養プレートに、25,000～45,000個の細胞/ウェルでプレートする：(1)マウスzcytor17ligを発現するBHK 570細胞（例18）、(2)ヒトzcytor17ligを発現するBHK 570細胞（例7）、又は(3)ベクターを含み、そしていずれのリガンドも発現しない対照BHK 570細胞。

30

【0510】

次に、これらの細胞を、種々のサイトカイン処理にゆだね、骨髄からの造血細部の拡張又は分化について試験する。試験に関しては、プレートされたNALDマウス骨髄細胞を、ヒトインターロイキン-15 (hIL-15) (R&D Systems), 又は他のサイトカインのパネルの1つ (R&D Systems) にゆだねる。hIL-15又は他のサイトカインの一連の希釈溶液、すなわち約50ng/ml～約0.5ng/mlの濃度の一連の二倍希釈溶液を試験する。8～12日後、96 - ウエルアッセイを、例5Bに記載されるようにAlamar Blueアッセイにより、細胞増殖について評点を付ける。

40

【0511】

C. 96 - ウエルNALDマウス骨髄アッセイからの結果：

マウス及びヒトzcytor17ligを発現するBHK細胞からのならし培地は、対照のBHKならし培地に比較して、単独で、又はNALDマウス骨髄における他のサイトカインと共に、相乗的に、造血細胞集団の拡張を促進することができる。他のサイトカインを伴って、又はそれを伴わないでマウスzcytor17ligにより拡張された造血細胞集団、及び他のサイトカインを伴って、又はそれを伴わないでヒトzcytor17ligにより拡張されたそれらの造血細胞はさらに、細胞培養において増殖される。それらの造血細胞を、フィコエリトリンによりラベルされた抗-Pan NK細胞抗体 (RharMingen) により染色し、そして流動細胞計測分析に

50

ゆだね、これは、拡張された細胞がこの天然のキラー（NK）細胞マーカーを、陽性的に染色したことを見た。同様にして、他の特異的造血細胞マーカーは、例えばCD4+又はCD8+T細胞集団、B細胞及び他の免疫細胞マーカーの拡張を決定するために使用され得る。

【0512】

同じ96-ウェルアッセイを、Poietic Technologies, Gaithersburg, MDから購入された新鮮なヒト骨髄細胞を用いて行う。再び、陽性結果は、zcyt17ligが単独で、又は他のサイトカイン、すなわちマウス及びヒトzcyt17ligと共に相乗的に、上記に開示されるように、特異的細胞マーカーに対して陽性的に染色される造血細胞集団を拡張できることを示す。

【0513】

例22. zcyt17ligトランスジェニックマウスを生成するための構造体

A. MT-1プロモーターからヒトzcyt17ligを発現するための構造体：

コンセンサスKozak配列及びヒトzcyt17ligコード領域を含むPCRフラグメントを生成するようオリゴヌクレオチドを企画する。それらのオリゴヌクレオチドを、(a) pMT12-8(本発明者の標準のトランスジェニックベクター、又は(b) pKF051(リンパ特異的トランスジェニックベクター(例22B)中へのクローニングを促進するために、5'末端でのFseI部位及び3'末端でのAscl部位を有するよう企画する。

【0514】

PCR反応を、200ngのヒトzcyt17lig錆型(配列番号1)、及び十分な長さ又は活性部分のzcyt17ligを增幅するよう企画されたオリゴヌクレオチドにより行う。PCR反応条件を、当業界において知られている方法を用いて決定する。PCR生成物を、アガロースゲル電気泳動により分離し、そしてQiaQuickTM(Qiagen)ゲル抽出キットを用いて精製する。単離された、正しいサイズのDNAフラグメントを、FseI及びAscl(Boehringer-Mannheim)により消化し、エタノール沈殿し、そしてFseI及びAsclにより前もって消化されたpMT12-8中に連結する。トランスジェニックマウスにおける肝臓及び他の組織における興味ある遺伝子を発現するよう企画されたpMT12-8プラスミドは、10kbのMT-1 5' DNA及び7kbのMT-1 3' DNAを両端に有する発現カセットを含む。発現カセットは、MT-1プロモーター、ラットインスリンIIイントロン、所望するクローンの挿入のためのポリリンカー及びヒト成長ホルモン(hGH)ポリA配列を含んで成る。

【0515】

約1μlの個々の連結反応を、DH10B ElectroMaxTMコンピテント細胞(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)中に、その製造業者の説明書に従ってエレクトロポレーションし、そして100μg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にプレートし、そして一晩インキュベートする。コロニーを採取し、そして100μg/mlのアンピシリンを含むLB培地において増殖する。ミニプレップDNAを、前記採取されたクローンから調製し、そしてEcoRIのみ、又は組み合わされたFseI及びAsclによる制限消化及び続くアガロースゲル電気泳動によりヒトzcyt17lig挿入体についてスクリーンする。

【0516】

正しいpMT-ヒトzcyt17ligの最大調製を行う。5'及び3'フランкиング配列、MT-1プロモーター、ラットインスリンIIイントロン、ヒトzcyt17lig cDNA及びhGHポリA配列を含むSalIフラグメントを、受精されたネズミ卵母細胞中へのマイクロインジェクションのために使用されるよう調製する。トランスジェニックマウスのマイクロインジェクション及び生成は、Hogan, B.など。Manipulation of the Mouse Embryo, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1994に記載のようにして行われる。

【0517】

B. リンパ-特異的Eμ LCKプロモーターからのヒトzcyt17ligを発現するための構造体：

コンセンサスKozak配列及びヒトzcyt17ligコード領域を含むPCRフラグメントを生成するようオリゴヌクレオチドを企画する。それらのオリゴヌクレオチドを、pKF051(リンパ特異的トランスジェニックベクター)中へのクローニングを促進するために、5'末端

10

20

30

40

50

でのFseI部位及び3'末端でのAscl部位を有するよう企画する。

【0518】

PCR反応を、200ngのヒトzcytor17lig鑄型（配列番号1）、及び十分な長さ又は活性部分のzcytor17ligを増幅するよう企画されたオリゴヌクレオチドにより行う。PCR反応を、当業界において知られている方法を用いて行う。単離された、正しいサイズのDNAフラグメントを、FseI及びAscl(Boehringer-Mannheim)により消化し、エタノール沈殿し、そしてFseI及びAsclにより前もって消化されたpKF051中に連結する。pKF051トランスジェニックベクターは、p1026X(Iritani, B. M.,など., EMBO J. 16: 7019-31, 1997)に起因し、そしてT細胞 - 特異的lck近位プロモーター、B/T細胞 - 特異的免疫グロブリンμH鎖エンハンサー、所望するクローンの挿入のためのポリリンカー、及び不活性成長ホルモンタンパク質（3'イントロン及びポリアデニル化シグナルを供給する）をコードする、突然変異誘発されたhGH遺伝子を含む。
10

【0519】

約1μlの個々の連結反応を、エレクトロポレーションし、プレートし、クローンを採取し、上記のようにして、制限消化によりヒトzcytor17lig挿入体についてスクリーンする。pKF051-zcytor17ligの正しいクローンを、配列決定により認め、そしてこのクローンの最大調製を行う。lck近位プロモーター及び免疫グロブリンμエンハンサー(EμLCK)、zcytor17lig cDNA及び突然変異誘発されたhGH遺伝子を含むNotIフラグメントを、受精されたネズミ卵母細胞中へのマイクロインジェクションのために使用されるよう調製する。
20

【0520】

C. EF1プロモーターからのマウスzcytor17ligを発現するための構造体：

プライマーZC41,498(配列番号86)及びZC41,496(配列番号87)を用いて、マウス精巣cDNAライブラリー鑄型のPCRを行う。それらのPCR反応を、pfuターボポリメラーゼ(Stratagene)を用いて、その製造業者の推薦に従って、10%DMSOを伴って又はそれを伴わないで、約50μlの体積において都合よく行う；そしてホットスタート50s(Molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA)を用いるワックスホット-スタートの追加の適用も伴う。PCRサーモサイクリングを次の条件下で行う：94で4分(1サイクル)；続いて94で30秒、48で30秒、72で50秒(40サイクル)；72で7分の追加の最終拡張。2種のPCR反応をプールし、そして低溶融アガロース及びGelaseアガロース消化酵素(Epicenter, Inc. Madison, WI)を用いて、その製造業者の推薦に従って精製する。
30

【0521】

DNA配列決定されたPCR生成物は、配列番号10と同一のORFを含んで成るネズミzcytor17cDNA配列(配列番号90)を示し、これは、配列番号10がネズミzcytor17ligポリペプチドコードしたことを確認する。次に、PCRプライマーZC41583(配列番号88)及びZC41584(配列番号89)を用いて、mcytor17lig読み取り枠及び最終コドン(配列番号92)に、FseI及びAscl制限部位及び部分Kozak配列を附加した。Robocycler 40サーモサイクラー(Stratagene)を用いて、次の通りに、アニーリング温度グラジエント及びサイクリングを行う。Pfuターボポリメラーゼ(Stratagene)を上記のように適用したが、但し10%DNSOにおいてのみであった。

【0522】

サイクリングを、次の通りに行った：94で4分(1サイクル)；続いて94で30秒、65～51のグラジエント、30秒、72で1分(20サイクル)；及び72で7分の1回の拡張。この第2サーモサイクリング反応のための鑄型は、上記の1μlの初期ゲル精製されたmcytor17lig PCR生成物であった。3種の最低温度反応からの得られるPCR生成物をプールし、そして上記Gelase(Epicenter)方法を用いて精製した。次に、この精製されたフラグメントを、FseI及びAsclにより消化し、そしてそのクローニング部位にFseI及びAscl部位を有するよう修飾されたpZP7Xベクター中に連結した。これを、配列決定に送り、正しい配列を確めた。クローン化されたネズミcDNA配列は、配列番号90で示された、そして対応するポリペプチド配列は配列番号91(配列番号11と同一である)で示される。
40

【0523】

FseI及びAscl (Boehringer-Mannheim)により消化された、単離された正しいサイズのDNAフラグメントを、FseI及びAsclにより前もって消化されたEF1プロモーターを含むプラスミド中にサブクローン化した。正しいEF1マウスzcytor17ligの最少調製を行った。発現カセットは、EF1プロモーター（欠失されたFseI部を有する）、EF1イントロン、発現を促進するためのSUR IRES様部位、所望するクローンの挿入のためのFseI PmeI Ascl部位を付加する5'末端上にラットインスリンII部位を端に有するポリリンカー、及びヒト成長ホルモン(hGH)ポリA配列を含む。EF1プロモーター発現カセット及びマウスzcytor17ligを含む、7.5kbのNotIフラグメントを調製し、受精されたネズミ卵母細胞中へのマイクロインジェクションのために使用した。EF1プラスミドを、Taboit-Dameronなど、1999, Transgenic research 8: 223-235に記載のようにして、Louis-Marie of the Laboratoire de Differentiation Cellulaireから入手した。

【0524】

D. リンパ - 特異的E μ LCKプロモーターからマウスzcytor17ligを発現するための構造体
:

コンセンサスKozak配列及びマウスzcytor17ligコード領域を含むPCRフラグメントを生成するようオリゴヌクレオチドを企画する。それらのオリゴヌクレオチドを、pKF051（上記例22Bを参照のこと）中へのクローニングを促進するために、5'末端でのFseI部位及び3'末端でのAscl部位を有するよう企画する。

【0525】

FseI及びAscl (Boehringer-Mannheim)により消化された、EF1構造体に使用される、単離された正しいサイズのzcytor17lig DNAフラグメントを、pKF051、すなわちリンパ - 特異的トランスジェニックベクターを含むプラスミド中にサブクローン化した。pKF051トランスジェニックベクターは、p1026X (Iritani, B.M.,など., EMBO J. 16: 7019-31, 1997) に起因し、そしてT細胞 - 特異的lck近位プロモーター、B/T細胞 - 特異的免疫グロブリン μ H鎖エンハンサー、所望するクローンの挿入するためのポリリンカー、及び不活性成長ホルモンタンパク質（3'イントロ及びポリアデニル化シグナルを供給する）をコードする、突然変異誘発されたGH遺伝子を含む。lck近位プロモーター及び免疫グロブリン μ エンハンサー(E μ LCK)、マウスzcytor17lig cDNA及び突然変異誘発されたhGH遺伝子を含む、6.5kbのNotIフラグメントを調製し、受精されたネズミ卵母細胞中へのマイクロインジェクションのために使用した（例41）。30

【0526】

例23. zcytor17lig-CEEを発現する哺乳類発現ベクターの構成A. zCytor17lig-CEE/pZMP21の構成：

ヒトzCytor17ligをコードするポリヌクレオチドのすべて又は一部を含む発現プラスミドを、相同組換えにより構成した。プラスミドは、zCytor17lig-CEE/pZMP21と呼ばれた。

【0527】

zCytor17lig-CEE/pZMP21の構成を、PCR増幅を用いて、zCytor17Lig-CEEフラグメント（配列番号95）を生成することによって達成した。zCytor17Lig-CEEフラグメントの生成のために使用されるDNA鑄型は、zCytor17Lig/pZP7nxであった。zCytor17Lig-CEEフラグメントの生成のために使用されるプライマーは、次のものであった：(1) 5'から3'末端側に、28bpのベクターフランкиング配列（挿入体の5'側）及びzCytor17Ligの5'配列に対応する21bpを含むZC41607（配列番号97）（センス配列）；及び5'から3'末端側に、37bpのベクターフランギング配列（挿入体3'側）、3bpの停止コドン、C-末端EE標識をコードする21bp、及びzCytor17Lig配列3'末端に対応する21bpを含むZC41605（配列番号98）（アンチセンス配列）。上記PCR増殖に起因するフラグメントは、C末端EE標識の追加を有する鑄型zCytor17Ligのコピーであり、zCytor17Lig-CEEの最終生成物を生成する。40

【0528】

PCR反応を次の通りにして行った：100 μ lの最終体積に、次のものを添加した：15mMのMgCl₂を有する10×Taqポリメラーゼ反応緩衝液10 μ l、1 μ lのTaq DNAポリメラーゼ（5単位

/ μl、Gibco)、3 μlの10mMのdNTP、78 μlの蒸留水、プライマーZC41607(配列番号97)の20pモル/μlストック3 μl、プライマーZC41605(配列番号98)の20pモル/μlストック3 μl、及びzCyt or17 lig鑄型DNAの0.13 μg/μlストック2 μl。50 μlに等しい体積の鉱油を、前記混合物に添加した。反応を、94 への5分間の加熱；続いて94 で1分；55 で2分；72 で3分(35サイクル)；続いて、72 での10分の拡張、及び反応を集めるまで、4 での維持。

【0529】

プラスミドpZMP21を、BgIII酵素により制限消化し、超遠心分離プロトコールを用いて、QiaQuick PCR精製キット(Qiagen)により清浄し、そしてPCRフラグメントによる組換えのために使用した。プラスミドpZMP21を、pRS316(American Type Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託され、そしてNo. 77145として受託される)から取られた酵母遺伝子要素、ポリオウィルスからのIRES要素、及びトランスマンプレンドメインのカルボキシル末端で切断された、CD8の細胞外ドメインから構成されたpZMP20から構成した。10

【0530】

pZMP21は、MPSVプロモーター、免疫グロブリンシグナルペプチドイントロン、コード配列の挿入のための複数の制限部位、停止コドン及びヒト成長ホルモンターミネーターを有する発現力セットを含む哺乳類発現ベクターである。プラスミドはまた、複製のE.コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、SV40ターミネーター、及びS.セレビシアエにおける選択及び複製のために必要とされるURA3及びCEN-ARS配列を有する。20

【0531】

50 μlのコンピテント酵母細胞(S.セレビシアエ)を、それぞれ約100ngの切断されたプラスミド、5 μlの前記PCR混合物と共に組合し、そして0.2cmのエレクトロポレーションキュベットに移した。酵母/DNA混合物を、0.75kV(5kV/cm)、“無限”、25 μFで、電気パルスした。個々のキュベットに、1.2Mのソルビトール600 μlを添加し、そして酵母を、2種のURA-Dプレート上の1つの100 μlのアリコート及び1つの300 μlアリコートにプレートし、そして30 でインキュベートした。約72時間後、単一のプレートからのUra+酵母形質転換体を、1mlの水に再懸濁し、そして短時間、回転せしめ、酵母細胞をペレット化した。30

【0532】

その細胞ペレットを、500 μlの溶融緩衝液(2% Triton X-100, 1% SDS, 100mMのNaCl、10mMのトリス、pH8.0, 1mMのEDTA)に再懸濁した。この溶融混合物500 μlを、300 μlの酸洗浄されたガラスピース及び300 μlのフェノール-クロロホルムを含むEppendorf管に添加し、1分間、2又は3度、かき混ぜ、続いて5分間、最大速度で、Eppendorf遠心分離機において回転せしめた。300 μlの水性相を、新しい管に移し、そしてDNAを600 μlの100%エタノール(EtOH)により沈殿せしめ、続いて、4 で10分間、遠心分離した。次に、DNAペレットを、500 μlの70%エタノールにより洗浄し、続いて4 で1分間、遠心分離した。DNAペレットを30 μlの水に再懸濁した。

【0533】

エレクトロコンピテントE.コリ細胞(MC1061)の形質転換を、5 μlの酵母DNA調製物及び50 μlのMC1061細胞により行った。細胞を、2.0kV, 25mF及び400オームで電気パルスした。エレクトロポレーションの後、600 μlのSOC(2% BuctoTM Trypton(Difco, Detroit, MI), 0.5%酵母抽出物(Difco)、10mMのNaCl、2.5mMのKCl、10mMのMgCl₂、10mMのMgSO₄、20mMのグルコース)を、添加した。エレクトロポレートされたE.コリ細胞を、250 μl及び50 μlのアリコートで、2個のLB AMPプレート(LBブイヨン(Lennox)、1.8% Bacto Agar(Difco)、100mg/Lのアンピシリン)上にプレートした。プレートを、37 で約24時間、逆にしてインキュベートした。3個のアンピシリン-耐性コロニーを、ランダムに選択し、そして挿入体の配列分析のために提出した。大規模プラスミドDNAを、Qiagen Maxiキット(Qiagen)を用いて、その製造業者の説明書に従って、配列確認されたクローンから4050

単離した。

【 0 5 3 4 】

B.ヒトzcytor17ligの哺乳類発現：

十分な長さのzCytor17ligタンパク質を、zCytor17Lig-CEE /pZMP21（例23A）によりトランスクレクトされたBHK細胞において生成した。BHK細胞（ATCC CRL-10314）を、T75組織培養皿にプレートし、そして増殖培地（SL7V4、5% FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン）において、37度で一晩、5%CO₂下で、約50~70%の集密性まで増殖する。次に、細胞を、血清フリー（SF）培地（SL7V4）において、リポソーム-介在性トランスクレクション（LipofectamineTM；Life Technologiesを用いて）に従って、zCytor17Lig-CEE /pZMP21によりトランスクレクトした。プラスミド（16μg）を、1.5mlの管においてSF培地に希釈し、640μlの合計最終体積にした。脂質混合物35μlを、SF培地605μlと共に混合し、そしてその得られる混合物を、室温で約15分間インキュベートした。

10

【 0 5 3 5 】

次に、5mlのSF培地を、DNA：脂質混合物に添加した。細胞を10mlのSF培地により1度すぎ、PBSをデカンとし、そしてDNA：脂質混合物を添加した。細胞を、37度で5時間インキュベートし、次に15mlの培地（SL7V4、5%のFBS、1%のpen/strep）を個々のプレートに添加した。プレートを37度で一晩インキュベートし、そしてDNA：脂質混合物を、次の日、選択培地（SL7V4、5%のFBS、1%のpen/strep、1μMのMTX）により交換した。トランスクレクションの約10日後、T75トランスクレクションフラスコからのメトトレキセート耐性コロニーを、トリプシン処理し、そして細胞をプールし、そしてT-162フラスコ中にプレートし、そして大規模培養に移した。

20

【 0 5 3 6 】

例24. E.コリにおけるzcytor17可溶性受容体の発現

A.huzcytor17/MBP-6H融合ポリペプチドを発現する発現ベクターpCMH01の構成：

マルトース結合タンパク質（MBP）にC-末端で融合されるzcytor17可溶性受容体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、相同組換えにより構成する。融合ポリペプチドは、本明細書に記載されるzcytor17可溶性受容体のいずれかに融合される約388個のN-末端アミノ酸MBP部分を含む。zcytor17 cDNAのフラグメント（配列番号4）を、本明細書に記載のようなPCRを用いて単離する。

30

【 0 5 3 7 】

次の2種のプライマーを、標準のPCR反応におけるzcytor17フラグメントの生成に使用する：（1）1つは、約40bpのベクターフランкиング配列及び約25bpのアミノ末端に対する配列を含み、及び（2）もう1つは、前記フランкиングベクター配列に対応する3'末端約40bp及びzcytor17のカルボキシル末端に応答する配列約25bpを含む。100μlのPCR反応物2μlを、分析するために、1×TBE緩衝液中、1.0%アガロースゲル上で試験し、そして予測されるおよそのフラグメントが見られる。残るPCR反応物を、第2のPCR管において組合し、そして無水エタノール400μlにより沈殿せしめる。沈殿されたDNAを、下記のようにして、SmaI切断された受容体ベクターpTAP170中の組換えのために使用し、MBP-zcytor17融合体をコードする構造体を生成する。

30

【 0 5 3 8 】

プラスミドpTAP170は、プラスミドpRS316及びpMAL-c2に由来する。プラスミドpRS316は、サッカロミセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）シャトルベクターである（Hieter P. and Sikorski, R., *Genetics* 122: 19-27, 1989）。pMAL-C2（NEB）は、E.コリ発現プラスミドである。それは、tacプロモーター駆動 λ IE（MBPコードの遺伝子）、続いて、His標識、トロンビン切断部位、クローニング部位及びrrnBターミネーターを担持する。ベクターpTAP170を、酵母相同組換えを用いて構成する。

40

【 0 5 3 9 】

100ngのEcoRI切断された、pMAL-c2を、1μgのPvuI切断されたpRS316、1μgのリンクーと共に組合し、そして1μgのScaI/EcoRI切断されたpRS316を、PCR反応において再組合す。オリゴヌクレオチドzc19,372（配列番号172）（100pモル）、zc19,351（配列番号173）

50

(1pモル)、zc19,352(配列番号174)(1pモル)及びzc19,371(配列番号175)(100pモル)から成るリンカーを、PCR反応において組合した。条件は次の通りであった：94で30秒、50で30秒及び72で30秒(10サイクル)；続いて4でのソーキング。PCR生成物を、100%エタノール沈殿により濃縮した。

【0540】

100μlのコンピメント酵母細胞(S.セレビシアエ)を、約1μgのヒトzcytor17挿入体及び100ngのSmaI消化されたpTAP170ベクターを含む混合物数10μLと共に組合し、そして0.2cmのエレクトロポレーションキュベットに移した。酵母/DNA混合物を、0.75kV(5kV/cm)、無限オーム、25μFで電気パルスした。個々のキュベットに、1.2Mのソルビトール600μlを添加した。次に、酵母を、2つのURADプレート上に、2つの300μlのアリコートでプレートし、そして30でインキュベートした。

【0541】

約48時間後、單一プレートからUra⁺酵母形質転換体を採取し、DNAを単離し、そしてエレクトロコンピメントE.コリ細胞(例えば、MC1061, Casadabanなど., J. Mol. Biol. 138, 179-207)を形質転換し、そして標準方法を用いて、MM/CA + AMP 100mg/lプレート(Pryor and Leiting, Protein Expression and Purification. 10:309-319, 1997)上にプレートする。細胞を、25μg/mlのカナマイシンと共に、MM/CAにおいて、2時間、37で、振盪しながら増殖する。

【0542】

その培養物1mlを、1mMのIPTGにより誘発する。2~4時間後、個々の培養物250μlを、酸により洗浄されたガラスビーズ250μl、及び5%ME及び色素を含むThomer緩衝液(8Mの尿酸、100mMトリス、pH7.0, 10%グリセロール、2mMのEDTA, 5%SDS)250μlと共に混合する。サンプルを1分間、振盪し、そして65に10分間、加熱する。その20μlを、4%~12%PAGEゲル(NOVEL)上のライン当たりに負荷する。ゲルを、1×MES緩衝液において試験する。陽性クローンを、pCZR225と命名し、そして配列決定分析にゆだねる。

【0543】

1μlの配列決定DNAを用いて、BL21株を形質転換する。細胞を、2.0kV, 25μF及び400オームで電気パルスする。エレクトロポレーションに続いて、25μg/mlのカナマイシンを含むMM/CA溶液0.6ml上にプレートする。細胞を、MM/CAにおいて増殖し、そして上記のようにして、IPTGにより誘発する。陽性クローンを用いて、Huzcytor 17/MBP-6H融合タンパク質のタンパク質精製のために、標準技法により増殖する。

【0544】

B. E. コリ発酵からのhuzcytor17/MBP-6H可溶性受容体の精製：

特にことわらない限り、すべての操作は4で行われた。次の方法を、組換えhuzcytor 17/MBP-6H可溶性受容体ポリペプチドを精製するために使用した。pCMH01構造体を含み、そしてhuzcytor17/MBP-6H可溶性受容体ポリペプチドを発現するE.コリ細胞を、標準の分子生物学的方法を用いて構成し、そしてSuperBroth II(12g/lのカゼイン、24g/lの酵母抽出物、11.4g/lのリン酸二カリウム、1.7g/lのリン酸一カリウム; Becton Dickinson, Cockeysville, MD)において培養した。得られる細胞を収穫し、そして0.5%グリセロールにおいて凍結した。20gの凍結細胞を、タンパク質精製のために使用した。

【0545】

融解された細胞を、500mlのアミロース平衡化緩衝液(20mMのトリス、100mMのNaCl, pH8.0)に再懸濁した。-7~-10の温度設定及び30K PSIを有するFrenck Press細胞分解システム(Constant Systems Ltd., Warwick, UK)を用いて、細胞を溶解した。再懸濁された細胞を、Franch Pressを用いてのサイクリングの前及び後、A₆₀₀読み取りにより破壊について調べた。上清液を、タンパク質精製のために、残核ペレットから収穫した。

【0546】

アミロース樹脂の25mlカラム(New England Biolabs, Beverly, MA)(下記のようにして調製された)を、Bio-Rad, 2.5cm D×10cm Hのガラスカラムに入れた。カラムを充填し、そして10カラム体積(CV)のアミロース平衡化緩衝液(20mMのトリス、100mMのNaCl

10

20

30

40

50

、pH8.0)により平衡化した。収穫された細胞上清液を、一晩、振り動かしながら、アミロース樹脂にバッチ負荷した。

【0547】

負荷された樹脂を、ガラスカラムに戻し、10CVのアミロース平衡化緩衝液により洗浄し、そして約2CVのアミロース溶出緩衝液(アミロース平衡化緩衝液、10mMのマルトース、Fluka Biochemical, Switzerland)により重力により溶出した。10の5mlの画分を、溶出プロフィールにわたって集め、そして280及び320nmで吸光度についてアッセイした。アミロース樹脂を、1CVの蒸留水、5CVの0.1% (w/v) のSDS (Sigma)、5CVの蒸留水、5CVのアミロース平衡化緩衝液、及び最終的に1CVのアミロース貯蔵緩衝液(アミロース平衡化緩衝液、0.02% (w/v) のアジ化ナトリウム)により再生した。再生された樹脂を4で貯蔵した。
10

【0548】

興味ある溶出プロフィール画分をプールし、そして4LのPBS (pH7.4) (Sigma) (4回の交換を伴って)に対して、8時間にわたって、10K透析チャンバー(Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical)において透析した。透析に続いて、収穫された材料は、精製されたhuzcytor17/MBP-6Hポリペプチドを表した。精製されたhuzcytor17/MBP-6Hポリペプチドをフィルター殺菌し、そして適切な分子量の生成物について、SDS-PAGEクーマシー染色により分析した。huzcytor17/MBP-6Hポリペプチドの濃度を、BCA分析により、0.76mg/mlであるものとして決定した。

【0549】

精製されたhuzcytor17/MBP-6Hポリペプチドを、ウサギの免疫化のために適切に配合した。そしてポリクローナル抗体生成のために、R&R Research and Development (Stanwoud, WA)に送った。

【0550】

例25. ヒトzcytor17受容体ポリクローナル抗体

A. 調製及び精製:

ポリクローナル抗体を、精製された組換えhuzcytor17/MBP-6Hポリペプチド(例24)により、2匹の雌New Zealand白色ウサギを免疫化することによって、調製する。ウサギは、完全フロイントアジュvant中、精製されたタンパク質200mgの初期腹腔内(IP)注射、続いて、不完全フロイトアジュvant中、精製されたタンパク質100μgの追加免疫IP注射を、3週ごとに与えられる。第2の追加免疫注射(合計3回の注射)の投与後7~10日で、動物は放血され、そして血清が集められる。次に、動物を、追加免疫し、そして3週ごとに放血する。
30

【0551】

huzcytor17/MBP-6H特異的ウサギ血清を、CNBr-SEPHAROSE 1g当たり約10mgの非-特異的精製された組換えMBP-融合タンパク質を用いて調製されるCNBr-SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム(Pharmacia LKB)を用いて、抗-MBP抗体を予備吸着した。huzcytor17/MBP-6H-特異的ポリクローナル抗体を、10mgの特異的抗原精製された組換えタンパク質huzcytor17/MBP-6Hを用いて調製されたCNBr-SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム(Pharmacia LKB)を用いて、予備吸着されたウサギ血清から親和性精製した。精製に続いて、ポリクローナル抗体を、少なくとも8時間にわたって、抗体体積のPBSにより20回(4回の交換を伴って)、透析した。ヒトzcytor17-特異的抗体を、抗体標的物として、500ng/mlの精製された組換えタンパク質huzcytor17/MBP-6Hを用いて、ELISAにより特徴づけた。ウサギ抗-huzcytor17/MBP-6H親和性精製された抗体の検出の下限(LLD)は、その特異的精製された組換え組換え抗原huzcytor17/MBP-6Hに基づいて500pg/mlである。
40

【0552】

B. ウサギ抗-ヒトZcytoR17 MBP-6H抗体のSDS-PAGE及びウェスタンプロット:

ウサギ抗-ヒトZcytoR17 MBP-6H抗体を、クーマシー染色方法を用いてのSDS-PAGE(Nupage4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA)及びヤギ抗-IgG-HRPを用いてのウェスタンプロットにより試験した。精製されたタンパク質(200~25ng)又はzcytor17を含むな
50

らし培地のいずれかを、 Invitrogen Novex's Xcell II mini-cellを用いて電気泳動し、そして装置のマニュアルに提供される指針に従って、 Novex's Xcell IIプロットモデルを用いて室温でニトロセルロース (0.2mm; Invitorogenn, Carlsbad, CA) に、攪拌しながらトランスファーした。

【 0 5 5 3 】

トランスファーを、 25mMのトリス塩基、 200mMのグリシン及び20%メタノールを含む緩衝液において、 300mAで 1 時間、 行った。 次に、 フィルターを、 Western A緩衝液(50mMのトリス、 pH7.4、 5mMのEDTA、 pH8.0、 0.05%のIgepal CA-630、 150mMのNaCl及び0.25%のゼラチン)により、 4 で一晩、 軽く振り動かしながらブロックした。 ニトロセルロースをすばやくすすぎ、 次にウサギ抗 - ヒトzcytoR17 MBP - 6 H (1 : 1000) を、 Western A 緩衝液に添加した。 プロットを、 軽く振盪しながら、 室温で1.5時間、 室温でインキュベートした。 プロットを、 Western Aによりそれぞれ 5 分間、 3 度すすぎ、 次に、 ヤギ抗 - ウサギ IgG HRP抗体 (1 : 1000) を、 Western A緩衝液に添加した。

【 0 5 5 4 】

プロットを、 軽く振り動かしながら、 室温で1.25時間インキュベートした。 プロットを、 Western Aによりそれぞれ 5 分間、 3 度すすぎ、 次に水によりすばやく、 すすいだ。 プロットを市販の化学ルミネセント基質試薬 (1 : 1 に混合されたECLWesternプロット検出試薬 1 及び 2 : Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, Englandから得られた試薬) を用いて展開し、 そしてプロットをX-線フィルムに15分までの間、 照射した。

ウサギ抗 - ヒトzcytoR17 MBP-6Hは、ならし培地に存在するヒトzcytor17、 及び還元条件下で120 kDaでのバンドとしてのzcytoR17精製されたタンパク質を検出した。

【 0 5 5 5 】

例26 . PCRを用いての組織パネルにおけるマウスzcytor17の組織分布

ヒト組織からのcDNAのパネルを、 PCRを用いて、 zcytor17発現についてスクリーンした。 パネルは自家製造され、 そして種々の正常及び癌性ネズミ組織からの94種のマラソンcDNA及びcDNAサンプルを包含し、 そして細胞系は下記表6に示される。 前記cDNAは自家ライブラリーからであり、 又はマラソンcDNAは自家RNA調製物、 すなわちClontech RNA又はInvitrogen RNAからであった。 マウスマラソンcDNAは、 マラソン - ReadyTM キット (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて製造され、 そしてマウストransフェリンプライマーZC10,651 (配列番号46) 及びZC10,565 (配列番号47) によりQC試験し、 そして次に、 トランسفェリンバンドの強さに基づいて希釈された。

【 0 5 5 6 】

パネルサンプルにおける増幅されたライブラリーサンプルの性質を評価するために、品質管理 (QC) についての次の 3 種の試験を行った： (1) ライブラリーのために使用されるRNA品質を評価するために、 自家cDNAを、 個々のcDNAライブラリーについてのベクター配列に対して特異的であるベクターオリゴによるPCRにより、 平均挿入体について試験し； (2) パネルサンプルにおけるcDNAの濃度の標準化を、 5' ベクターオリゴZC14,063 (配列番号48) 及び3' - チュープリン特異的オリゴプライマーZC17,574 (配列番号49) 又は3' G3PDH特異的オリゴプライマーZC17,600 (配列番号50) を用いて、 十分な長さのチュープリン又はG3PDH cDNAを増幅するために、 標準のPCR方法を用いて達成し； そして (3) サンプルを、 可能なリボソーム又はミトコンドリアDNA汚染について調べるために配列決定に送った。

【 0 5 5 7 】

パネルを、 ヒトゲノムのDNA (Clontech, Palo, Alto, CA) 陽性対照サンプルを含む96 - ウエル形式において組み立てた。 個々のウェルは約0.2~100pg/μlのcDNAを含んだ。 PCR反応を、 オリゴZC38,065 (配列番号51) 及びZC38,068 (配列番号52) 、 Takara Ex TaqTM (TAKARA Shuzo Co. LTD, Biomedicals Group, Japan), 及びRadiload 色素 (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) を用いて組み立てた。 増幅を次の通りに行った： 94 で 5 分 (1 サイクル) ; 94 で 30 秒 (5 サイクル) ; 94 で 30 秒、 56 で 30 秒及び 72 で 30 秒 (35 サイクル) 、 続いて 72 で 5 分 (1 サイクル) 。 約 10 μl のPCR反応生成物を、 4

10

20

30

40

50

%アガロースゲルを用いての標準のアガロースゲル電気泳動にゆだねた。正しい推定されるDNAフラグメントサイズを、脳、CD90+細胞、樹状突起、胚、MEWt #2、Tuvak-前立腺細胞系、唾液腺、皮膚及び精巣において観察した。

【0558】

皮膚及び精巣についてのDNAフラグメントを切除し、そしてGel Extractionキット(Qiagen, Chatsworth, CA)を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。フラグメントを、それらが実際、zcytor17であることを示すために、配列決定により確かめた。

【0559】

【表6】

表6:

組織/細胞系	#サンプル	組織/細胞系	#サンプル
229	1		
7F2	1		
脂肪細胞ー増幅された	1		
ATC1.9	1		
脳	4		
CCC4	1		
CD90+増幅された	1		
OC10B	1		
樹状突起	1		
胚	1		
心臓	2		
腎臓	3		
肝臓	2		
肺	2		
MEWt#2	1		
P388D1	1		
脾臓	1		
胎盤	2		
Jakotay-前立腺細胞系	1		
NeLix-前立腺細胞系	1		
Paris-前立腺細胞系	1		
Torres-前立腺細胞系	1		
Tuvak-前立腺細胞系	1		
唾液腺	2		
骨格筋	1		
皮膚	2		
小腸	1		
平滑筋	2		
脾臓	2		
胃	1		
精巣	3		
胸腺	1		

10

20

30

40

【0560】

例27. 同時定量的RT/PCRを用いての種々の組織におけるヒトZcytor17発現

A. 従来の及び定量的RT-PCRのためのヒトZcytor17、OSMR 及びZcytor17ligのためのプライマー及びプローブ:

ity, CA) を用いて同時定量的RT - PCRは、これまでに記載されている (Heid, C.A. など., Genome Research 6: 986-994, 1996; Gibson, U.E.M. など., Genome Research 6:995-1001; Sundaresan, S. など., Endocrinology 139: 4756-4764, 1998を参照のこと)。この方法は、レポーター及び消光剤蛍光色素の両者を含む遺伝子特異的プローブの使用を組み込む。プローブが損なわれていない場合、レポーター色素発光は、消光色素の密接した接近性のために無効にされる。追加の遺伝子 - 特異的前方向及び逆方向プライマーを用いてのPCR延長の間、プローブは、プローブからレポーター色素を開放するTaqポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により分解され、蛍光発光の上昇がもたらされる。

【 0 5 6 1 】

ヒトZcytor17、OSMR 及びZcytor17lig発現の同時定量化RT - PCR分析のために使用されるプライマー及びプローブを、プライマー企画ソフトウェア-Primer ExpressTM (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて企画した。ヒトZcytor17のためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにインtron - エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC37,877 (配列番号53) 及び逆方向プライマー、ZC37,876 (配列番号54) を、73bpの生成物を合成するために約300nMの濃度でPCR反応 (下記) に使用した。ZG37,776 (配列番号55) と称する、その対応するZcytor17 TaqMa (商標) プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG37,776 (配列番号55) プローブを、レポーター蛍光色素 (6 - カルボキシ - フルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) により5'末端で、及び消光剤蛍光色素 (6 - カルボキシ - テトラメチル - ローダミン) (TAMRA) (Epoch Biosciences, Bothell, WA) により3'末端でラベルした。

【 0 5 6 2 】

ヒトOSMR のためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにインtron - エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC43,891 (配列番号137) 及び逆方向プライマー、ZC43,900 (配列番号138) を、73bpの生成物を合成するために約300nMの濃度でPCR反応 (下記) に使用した。ZG43,896 (配列番号139) と称する、その対応するOSMR TaqMa (商標) プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,896 (配列番号139) プローブを、レポーター蛍光色素 (6 - カルボキシ - フルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) により5'末端で、及び非 - 蛍光消光剤色素 (ECLIPSE) (Epoch Biosciences) により3'末端でラベルした。

【 0 5 6 3 】

ヒトZcytor17ligのためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにインtron - エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC43,280 (配列番号140) 及び逆方向プライマー、ZC43,281 (配列番号141) を、73bpの生成物を合成するために約200nMの濃度でPCR反応 (下記) に使用した。ZG43,275 (配列番号142) と称する、その対応するZcytor17lig TaqMa (商標) プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,275 (配列番号142) プローブを、レポーター蛍光色素 (6 - カルボキシ - フルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) により5'末端で、及び非 - 蛍光消光剤色素 (ECLIPSE) (Epoch Biosciences) により3'末端でラベルした。

【 0 5 6 4 】

試験されるRNAサンプルの統合性及び性質を試験するための対照として、すべてのRNAサンプルを、PE Applied Biosystems (rRNAキット) から指図された、又は社内 (GUS) と命名されたプライマー及びプローブ組を用いて、rRNA又はGUSについてスクリーンした。rRNAキットは、前方向プライマー (配列番号56) 、rRNA逆方向プライマー (配列番号57) 、及びrRNA TaqMan (商標) プローブ (配列番号58) を含む。rRNAプローブを、レポーター蛍光色素VIC (PE Applied Biosystems) によりその5'末端で、及び消光剤蛍光色素TAMRA (PE Applied Biosystems) によりその3'末端でラベルした。GUSプライマー及びプローブを、社内で生成し、そしてそれぞれ200nM及び100nMで個々のPCR反応 にをいて使用した。

【 0 5 6 5 】

前方向プライマーはZC40,573 (配列番号134) であり、そして逆方向プライマーはZC40,

10

20

30

40

50

575(配列番号144)であった。GUSプローブZG43,017(配列番号145)プローブを、レポーター蛍光色素(Yakima-Yellow)(Epoch Biosciences)により5'末端で、及び非-蛍光消光剤色素(ECLIPSE)(Epoch Biosciences)により3'末端でラベルした。そのrRNA及びGUS結果はまた、内因性対照としても作用し、そして試験サンプルに見られるZcytor17 mRNA発現結果の標準化を可能にする。

【0566】

従来の非定量的RT-PCRのために、プライマーを、プライマー企画ソフトウェア-Primer ExpressTM(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて企画した。ヒトZcytor17プライマーは、約1000塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマーZC28,917(配列番号83)及び逆方向プライマーZC28,480(配列番号146)。ヒトOSMR

10

プライマーは、202塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマー-ZC41,653(配列番号147)及び逆方向プライマー-ZC41,655(配列番号148)。ヒトZcytor17リガンドプライマーは305塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマー-ZC41,703(配列番号149)及び逆方向プライマー-ZC41,704(配列番号150)。

【0567】

B. 従来の及び定量的RT-PCRのためのネズミZcytor17、OSMR 及びZcytor17リガンドのためのプライマー及びプローブ：

ネズミZcytor17、OSMR 及びZcytor17lig発現の同時定量化RT-PCR分析のために使用されるプライマー及びプローブを、プライマー企画ソフトウェア-Primer ExpressTM(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて企画した。ネズミZcytor17のためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにイントロン-エキソン連結に及ぶよう企画した。

20

【0568】

前方向プライマー、ZC43,272(配列番号151)及び逆方向プライマー、ZC43,273(配列番号152)を、73bpの生成物を合成するために約300nMの濃度でPCR反応(下記)に使用した。ZG43,478(配列番号153)と称する、その対応するZcytor17 TaqMa(商標)プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,478(配列番号153)プローブを、レポーター蛍光色素(6-カルボキシ-フルオレセイン)(FAM)(PE Applied Biosystems)により5'末端で、及び消光剤蛍光色素(6-カルボキシ-テトラメチル-ローダミン)(TAMRA)(Epoch Biosciences, Bothell, WA)により3'末端でラベルした。ZG43,478(配列番号153)プローブを、100nMの濃度でPCR反応に使用した。

30

【0569】

ネズミZcytor17リガンドのためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにイントロン-エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC43,278(配列番号154)及び逆方向プライマー、ZC43,279(配列番号155)を、500nMの濃度でPCR反応に使用した。ZG43,276(配列番号156)と称する、その対応するZcytor17リガンド TaqMa(商標)プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,478(配列番号153)プローブを、レポーター蛍光色素(6-カルボキシ-フルオレセイン)(FAM)(PE Applied Biosystems)により5'末端で、及び非-蛍光消光剤色素(ECLIPSE)(Epoch Biosciences)により3'末端でラベルした。ZG43,276(配列番号156)プローブを、200nMの濃度でPCR反応(下記)に使用した。

40

【0570】

ネズミOSMR のためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにイントロン-エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC43,045(配列番号157)及び逆方向プライマー、ZC43,046(配列番号158)を、300nMの濃度でPCR反応に使用した。ZG43,141(配列番号159)と称する、その対応するOSMR TaqMa(商標)プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,141(配列番号159)プローブを、レポーター蛍光色素(6-カルボキシ-フルオレセイン)(FAM)(PE Applied Biosystems)により5'末端で、及び非-蛍光消光剤色素(ECLIPSE)(Epoch Biosciences)により3'末端でラベルした。ZG43,141(配列番号159)プローブを、100nMの濃度でPCR反応(下

50

記)に使用した。

【0571】

試験されるRNAサンプルの統合性及び性質を試験するための対照として、すべてのRNAサンプルを、プライマー企画ソフトウェアPrimer ExpressTM (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて企画されたプライマー及びプローブを用いて、ネズミGUS又はトランスフェリン受容体のいずれかについてスクリーンした。ネズミGUSプライマーは、次の通りである：前方向プライマー、ZC43,004(配列番号160)、逆方向プライマー、ZC43,005(配列番号161)、及びTaqMan(商標)プローブZC43,018(配列番号162)。ネズミGUSプローブZC43,018(配列番号162)を、レポーター蛍光色素(Yakima-Yellow)(Epoch Biosciences)により5'末端で、及び非-蛍光消光剤色素(ECLIPSE)(Epoch Biosciences)により3'末端でラベルした。10

【0572】

ネズミGUSプライマーを、300nMの濃度でPCR反応に使用し、そしてプローブ、ZC43,018(配列番号162)を100nMの濃度で使用した。多くの場合、ネズミトランスフェリン受容体を、内因性対照として、GUSの代わりに使用した。トランスフェリン受容体前方向プライマー、ZC40,269(配列番号163)、及び逆方向プライマー、ZC40,268(配列番号164)を、300nMの濃度で使用した。トランスフェリン受容体プローブ、ZC40,298(配列番号165)を、100nMの濃度でPCR反応に使用し、そしてレポーター蛍光色素VIC(PE Applied Biosystems)によりその5'末端で、及び消光剤蛍光色素TAMRA(PE Applied Biosystems)によりその3'末端でラベルした。ネズミGUS及びトランスフェリン受容体結果はまた、内因性対照としても作用し、そして試験サンプルに見られるZcytor17、OSMR 及びZcytor17リガンドmRNA発現の標準化を可能にする。20

【0573】

従来の半-定量的RT-PCRのために、プライマーを、プライマー企画ソフトウェアPrimer ExpressTM (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて企画した。ネズミZcytor17プライマーは、約276塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマー-ZC43,140(配列番号166)及び逆方向プライマー-ZC43,139(配列番号167)。ネズミOSMR プライマーは、575塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマー-ZC41,608(配列番号168)及び逆方向プライマー-ZC41,609(配列番号169)。ネズミZcytor17リガンドプライマーは657塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマー-ZC41,502(配列番号170)及び逆方向プライマー-ZC41,500(配列番号171)30。

【0574】

C. 同時定量的RT-PCR及び従来の半-定量的RT-PCRのためのプロトコール：

Zcytor17、OSMR 及びZcytor17リガンド mRNAの相対的レベルを、1-段階RT-PCR方法(PE Applied Biosystems)を用いて、全RNAサンプルを分析することによって決定した。Zcytor17-、及びOSMR -トランスフェクトされたBAF細胞(ヒト)又はBHK細胞(ネズミ)からの全RNAを、標準方法により単離し、そしてZcytor17、及びOSMR の定量化のために使用される標準曲線を生成するために使用した。曲線は、100~0.01ng/μlの一連の10倍希釈から成り、そして個々の標準曲線点は、三重反復して分析された。同様に、Zcytor17リガンドに関しては、活性化されたCD4+T細胞RNA(Zcytor17リガンドを製造するために前で示された)を用いて、同じ100~0.01ng/μlでの標準曲線を生成した。40

【0575】

ヒト又はネズミ細胞からの全RNAを、ヒト又はネズミZcytor17、OSMR 及びZcytor17リガンド転写体レベル及び次の内因性対照遺伝子の1つについて、三重反復して分析した：rRNA、GUS 又はトランスフェリン受容体。

【0576】

10μlの合計体積においては、個々のRNAサンプルを、次のものを含む1-段階RT-PCR反応にゆだねた：内部対照色素(ROX)(カルボキシ-x-ローダミン)及びThermo-Start(商標)DNAポリメラーゼ(Abgene, Surrey, UK)を服務予備配合された2Xマスター混合物50

中、約50 - 100ngの全RNA；興味ある遺伝子のための適切なプライマー（この例のA及びB部分を参照のこと）；適切なプローブ（濃度冠するA及びB部分を参照のこと）；Superscript（商標）逆転写酵素（50U/μl）（PE Applied Biosystems）；及び適切な体積のRNアーゼフリーに水。PCR熱サイクリング条件は次の通りであった：48で30分間の1つのサイクルの初期逆転写（RT）段階；続いて、95で10分間のThermo-Start（商標）酵素活性化段階；続いて、95で15秒間及び60で1分間の40サイクルの増幅。

【0577】

相対的Zcytor17、OSMR 及びZcytor17リガンド RNAレベルを、製造業者PE Biosystems (User Belletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997)により記載されるような標準曲線方法を用いて決定した。rRNA、GUS又はトランスフェリン受容体の測定を用いて、興味ある遺伝子のレベルを標準化した。

【0578】

半定量的RT-PCR反応は、“Superscript One-Step RT-PCR System with Platinum Tag”（Invitrogen, Carlsbad, CA）を使用した。個々の25μlの反応は、次のものから構成された：12.5μlの2×反応緩衝液、0.5μl（20pモル/μl）の前方向プライマー、0.5μl（20pモル/μl）の逆方向プライマー、0.4μlのRT/Taqポリメラーゼ混合物、5.0μlのRed iload Gel Loadin 緩衝液（Invitrogen）、5.1μlのRNアーゼフリーの水、及び1.0μlの合計のRMA（100ng/μl）。増幅を次の通りに行った：45で30分（1サイクル）、続いて、94で20秒、種々のクリーニング温度（下記表7を参照のこと）で20秒、72で45秒（35～38サイクル）、次に、72で5分の最終拡張。8～10μlのPCR反応生成物を、2%アガロースゲルを用いて、標準のアガロース電気泳動にゆだねた。

【0579】

【表7】

表7：

ネズミZcytor17	58°Cのアニーリング温度
ネズミOSMRβ	60°Cのアニーリング温度
ネズミZcytor17リガンド	52°Cのアニーリング温度
ヒトZcytor17	55°Cのアニーリング温度
ヒトOSMRβ	59°Cのアニーリング温度
ヒトZcytor17リガンド	59°Cのアニーリング温度

【0580】

D. ヒト及びネズミPBMCサブセット及び細胞系からのRNAの単離：

血液は、いくつかの匿名のドナーから採血され、そして標準のFicollグラジエント方法を用いて単離された抹消血液単核細胞（PBMC）であった。次に、単球を、Monocyte Isolationキット及びMagnetic Cell Separation System (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)を用いて単離した。次に単球を、超-低付着性24-ウェルプレート中の内毒素フリーの培地上にプレートした。それらを、刺激しないか、又は組換えヒトIFNg (R&D Systems Inc.)により10ng/mlで刺激した。細胞を、24及び48時間で集めた。類似する様で、CD4+及びCD8+ T細胞を、Miltenyi Biotecからの抗-CD4又は抗-CD8磁気ビーズを用いて、PBMCから単離した。

【0581】

次に、細胞を、5μg/mlの抗-CD28抗体を含む培地を含む、0.5μg/mlの抗-CD3抗体に

10

20

30

40

50

より被覆された組織培養プレートにおいて、4又は16時間、活性化した。NK細胞をまた、Miltengiの抗-CD56被覆された磁気ビーズを用いて、PBMCから単離した。NK細胞のいくつかをRNAのためにゼロ時点に集め、そして他のNK細胞を、ホルボールミリストアセテート(PMA)(5ng/ml)及びイノマイシン(0.5μg/ml)を含む培地に24時間プレートした。さらに、いくつかのヒト単球-様細胞、すなわちU937、THP-1及びHL-60を、それらの休止又は活性化された状態で集めた。

【0582】

U937細胞を、PMA(10ng/ml)により一晩、活性化した。HL-60を、PMA(10ng/ml)により一晩、又はIFNg(10ng/ml)により72及び96時間、活性化し、それらを単球経路に追いやった。THP-1細胞を、LPS(10ng/ml)及びIFNg(10ng/ml)の組合せにより一晩、活性化した。RNAを、Rneasy MidiprepTMキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて、その製造業者の説明書に従って、すべての一次細胞から調製した。担持するDNAを、DNA-FreeTMキット(Ambion, Inc., Austin, Tx)を用いて除去した。RNA濃度を、標準の分光計を用いて決定し、そしてRNA品質をBioanalyzer 2100(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)を用いて決定した。

【0583】

ネズミT細胞RNAを、当業界において良く知られている種々の方法を用いて集めた。一次脾臓細胞CD4+及びCD8+T細胞を、抗体被覆された磁気ビーズ、及びMiltengi Biotecからの磁気細胞分離システムを用いて、C57B1/6の脾臓から単離した。次にCD4+及びCD8+T細胞を、5μg/mlで抗-CD28抗体を含む培地を含む、抗-CD3抗体(500ng/ml)により被覆された24-ウェルプレートにおいて細胞を培養することによって活性化した。細胞を、0, 4及び16時間で、RNAについて収穫した。同時に、CD4+T細胞を単離し、そして次に、次のプロトコールを用いて、Th1又はTh2表現型に対してスキー(Skew)した。

【0584】

C57B1/6 T細胞はTh1方向においてすでにスキーされているので、必要とされるすべてでは、0.5μg/mlのPMA及び10ng/mlのイノマイシンにより6時間、活性化されるべきであった。“Th2”スキーは、0.5μg/mlの抗-CD3により被覆されたプレートに、生来のCD4+T細胞を、2.5μg/mlの抗-CD28、10ng/mlのmIL-2(R&D Systems Inc.)と共にプレートすることによって得た。培養での2日後、細胞を、10ng/mlのmIL-2(R&D Systems)及び25ng/mlのmIL-4を含む培地に再懸濁した。細胞を、さらに3日間、培養し、次にPMA及びイノマイシンにより6時間、活性化した。

【0585】

1つの追加の組のTh1及びTh2スキーされたT細胞を、T細胞受容体トランスジェニックD011.10T細胞系を用いて誘導した。すべての細胞を、抗-CD3及び抗-CD28被覆されたプレートにプレートした。“Th1”細胞を、mTL-12(1ng/ml)及び抗-IL-4(10μg/ml)を含む培地にプレートした。“Th2”細胞を、mTL-4(10ng/ml)及び抗-IFNg(10μg/ml)を含む培地にプレートした。24時間後、すべての培養物は、mIL-2(10ng/ml)を与えられた。さらに2日後、細胞上の培地を交換し、そして前述のサイトカインを含む新しい培地を添加し、そして細胞を、収穫の前、さらに4日間、培養した。

ネズミT細胞RNAのすべては、Rneasy MidiprepTMキット(Qiagen)を用いて調製し、そして汚染性DNAを、AmbionからのDNA-FreeTMキットを用いて除去した。

【0586】

E. 膜炎及び刺激性腸疾患のネズミモデルからのRNAの単離：

ヒト刺激性腸疾患(IBD)に類似する状態を誘発するために、ハイブリッドマウス株C57B16/129S6F1を使用した。マウスを、グループ当たり6匹のマウスの平均サイズを有する4つのグループに分けた。グループ1は、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を与えられず、そして14日目に殺害された。グループ2は、殺害する前、2日間、2%DSSを受けた。グループ3は、殺害する前、7日間、2%DSSを受けた、グループ4は、7日間、2%DSSを受け、次に7日間、回復せしめ、そして14日目に殺害された。殺害の日、遠位結腸断片を除き、そしてRNALaterTM(Ambion)に配置した。その結腸断片を、標準技法を用

10

20

20

30

30

40

50

いて均質化し、そしてRNAを、 Rneasy MidiprepTM キット (Qiagen) を用いて単離した。汚染性DNAを、 DNA - freeTM (Ambion) 処理により、製造業者の説明書に従って除去した。

【 0 5 8 7 】

異なった研究においては、急性臍炎を、雄CD-1マウスにおいて、カエルレイン (Caerulein) 注射により誘発した。マウスを3種のグループ ($n = 8$ 匹のマウス/グループ) に分けた。グループ1動物は、ビークル (塩溶液) による7回のi.p. 注射 (1つの注射/時) を与えられ、そして次に、最初の注射に続いて及び24時間で殺害した。グループ2及び3は、50 μg/kg/時の用量で6時間 (1注射/時) 、カエルレイン (Sigma) (カタログ番号C-9026) の7回のi.p. 注射を与えられた。グループ2は、最初の注射の12時間後に殺害され、そしてグループ3は、最初の注射に続いて24時間で殺害された。臍炎を、殺害の時点で除き、そしてRNA単離のために即座に凍結した。組織を均質化し、そしてRNAを、 Qiagen Rneasy MidiprepTM キットを用いて単離した。

【 0 5 8 8 】

さらにもう1つの研究においては、ネズミZcytor17リガンドトランスジェニックマウスを生成し、そして表現型変化について観察した (例41を参照のこと)。起毛及び脱毛が、トランスジェニックマウスの多くに観察された。4匹のトランスジェニックマウスを殺害し、そして正常及び無毛領域からの皮膚サンプルを除き、そして後でのRNA単離のために即座に凍結した。2匹の非トランスフェニック対照マウスからの皮膚断片を単離のために即座に凍結した。そして次に、プロティナーゼK (Qiagen) (カタログ番号19133) により、60度20分間、消化した。次に、RNAを、 Qiagen Rneasy MidiprepTM キットを用いて、製造業者の説明書に従って単離した。担持するDNAを、 AmbionからのDNA - freeTM キットを除去した。

【 0 5 8 9 】

F. ヒトZcytor17, OSMR 及びZcytor17リガンドについての定量的及び半定量的RT - PCRの結果 :

Zcytor17及びOSMR 発現を、それらの休止状態で存在するか又はIFNgにより24又は48時間、活性化された4組の一次ヒト単球における定量的RT - PCRにより試験した。Zcytor17発現は、刺激されていない細胞において検出されたが、しかしIFNgによる24時間の活性化の後、劇的に上昇し、そして48時間の活性化の後、最高であった。すべての場合、OSMR

は検出されなかった。Zcytor17リガンドは、それらのサンプルにおいて試験されなかつた。

【 0 5 9 0 】

一次T細胞においては、Zcytor17は、休止のCD4+及びCD8+サブセットの両者において検出されなかつた。しかしながら、zcytor17の発現は、両サブセットにおいて上昇し、そして16時間の点で、わずかに低いレベルに低下した。OSMR はそれらのサンプルにおいて検出されなかつた。Zcytor17リガンド発現を、半 - 定量的RT - PCRを用いて試験した。発現は、刺激されなかつたCD4+及びCD8+ T細胞において検出されなかつた。しかしながら、4時間の活性化の後、高レベルのZcytor17リガンドが検出された。このレベルは、16時間の点で幾分低下した。

【 0 5 9 1 】

Zcytor17の発現は、NK細胞においては試験されなかつた。OSMR はそれらのサンプルにおいては、検出されなかつた。Zcytor17リガンド発現は休止のNK細胞においては検出されなかつたが、しかしながら、活性化されたNK細胞により生成されるわずかなシグナルは、それらの細胞がある条件下でZcytor17リガンドを製造できることを示唆する。

【 0 5 9 2 】

ヒト単球 - 様細胞系、すなわちU937, THP-1及びHL - 60においては、OSMR 発現は、休止の及び活性化されたサンプルのすべてにおいて検出されなかつたが、但しわずかなシグナルが検出される、活性化されたTHP-1サンプルにおいてはそうではなかつた。Zcytor17 発現はU937及びTHP-1の休止の細胞系において高く、そして活性化に続いて強いアップリギュレーションを示した。U937における発現は、いずれの細胞型の最高であった。HL - 60

10

20

30

40

50

においては、Zcytor17は、刺激されたいない細胞において中位のレベルで発現され、そしてPMAによる刺激に基づいて低下した。しかしながら、Zcytor17の発現は、IFNgにより72及び96時間、刺激される場合、HL-60において劇的にアップレギュレートされた。ヒト発現データのすべては、下記表8に要約されている。

【0593】

【表8】

表8：

一次ヒト単球	活性化状態	Zcytor17	OSMR β	Zcytor17 リガンド
ヒト単球	刺激されていない	-	-	
ヒト単球	IFNgによる24時間の活性化	+	-	
ヒト単球	IFNgによる48時間の活性化	++	-	
ヒトCD4+	刺激されていない	-	-	-
ヒトCD4+	4時間の活性化	++	-	++
ヒトCD4+	16時間の活性化	+	-	+
ヒトCD8+	刺激されていない	-	-	-
ヒトCD8+	4時間の活性化	++	-	++
ヒトCD8+	16時間の活性化	+	-	+
ヒトNK細胞	刺激されていない		-	-
ヒトNK細胞	24時間の活性化		-	+
U937	刺激されていない	++	-	-
U937	16時間の活性化	+++	-	-
THP-1	刺激されていない	++	-	-
THP-1	16時間の活性化	+++	+	-
HL-60	刺激されていない	++	-	-
HL-60	PMAによる16時間の活性化	+	-	-
HL-60	IFNgによる72時間の活性化	+++	-	-
HL-60	IFNgによる96時間の活性化	+++	-	-

10

20

30

40

【0594】

G. ネズミZcytor17, OSMR 及びZcytor17リガンドについての定量的及び半定量的RT - PCRの結果：

ネズミZcytor17, OSMR 及びZcytor17リガンド発現レベルを、いくつかのネズミT細胞集団において試験し、そして結果を、下記表9に要約する。ネズミZcytor17発現を、半定量的RT - PCRにより試験し、そして、休止及び活性化された一次CD4+ T細胞の両者において低レベルで存在することを示した。Zcytor17の発現は、休止のCD8+ T細胞上で検出され、そして次に、4及び16時間の点で抗 - CD3及び抗 - CD28抗体による活性化に基づいて低下するように思えた。OSMR 発現が、定量的RT - PCRにより測定され、そして休止及び活性化されたCD4+ 及びCD8+ T細胞において発現されることを示された。

【0595】

OSMR の発現は、4時間の活性化の後、上昇し、そして次に、CD4+ 及びCD8+ T細胞の両者において16時間までに刺激されていないレベルに戻った。Zcytor17リガンドは、定量

50

的 RT - PCRにより検出され、そして刺激されていない CD4+ T細胞において非常に低いレベルで発現されることが示された。しかしながら、4時間の活性化に続いて、Zcytor17リガンド発現は劇的にアップレギュレートされ、そして16時間の点までにわずかに低下した。CD8+ T細胞においては、Zcytor17リガンドは、刺激されていない細胞においては検出されなかった。4時間の点でいくらかのZcytor17リガンド発現が存在するが、しかし16時間の発現レベルは、検出以下に低下した。

【 0 5 9 6 】

D011.10 T細胞においては、Zcytor17発現を、生来の及びTh2スキューされた細胞において検出したが、しかしTh1スキューされた細胞においては検出しなかった。OSMR 発現は、生来のD011.10細胞においては低レベルであった。Th1スキューされた細胞においては、OSMR 発現レベルの劇的な上昇が存在し、そしてTh2スキューされた細胞においては、中位の発現の上昇が存在した。それらの細胞におけるZcytor17リガンド発現は、Th2スキューされたサブセットにより有力的であることを示された。低レベルがTh1サブセットにおいて検出され、そして発現は生来の細胞においては、検出されなかった。それらの結果は、下記表 9 に要約される。

【 0 5 9 7 】

Th1又はTh2方向にスキューされた一次CD4+ T細胞においては、Zcytor17は試験されなかった。OSMR 発現は、すべての3種のサンプルにおいて検出され、そして最高レベルはTh2サンプルにおいて見出された。D011.10結果に類似して、Zcytor17リガンド発現はTh2スキューされたサブセットにおいて高レベルで検出され、少量がTh1サブセットにおいて検出され、そして刺激されていない細胞においては検出されなかった。それらの結果は、下記表 9 に要約される。

【 0 5 9 8 】

【表 9】

表9 :

ネズミT細胞	Zcytor17	OSMR β	Zcytor17リガンド
CD4+ T細胞 刺激されていない	+	+	+/-
CD4+ T細胞 4時間の活性化	+	++	++
CD4+ T細胞 16時間の活性化	+	+	+
CD8+ T細胞 刺激されていない	+	+	-
CD8+ T細胞 4時間の活性化	+/-	++	+
CD8+ T細胞 16時間の活性化	-	+	-
D011.10 生来の	+	+	-
D011.10 Th1	-	+++	+
D011.10 Th2	+	++	++
CD4+ T細胞 刺激されていない		++	-
CD4+ T細胞 - Th1スキューされた		+++	+
CD4+ T細胞 - Th2スキューされた		++	+++

【 0 5 9 9 】

Zcytor17リガンドトランスジェニック皮膚サンプルにおいては、Zcytor17、OSMR 及び Zcytor17リガンド発現レベルを、定量的RT - PCRを用いて決定した。Zcytor17は、すべて

10

20

30

40

50

のサンプルに、およそ同等のレベルで存在することが示された。トランスジェニックサンプルよりも非トランスジェニック対照動物においてより劇的に高いレベルのOSMR 発現が存在した。Zcytor17リガンド発現は、非トランスジェニック対照動物において検出されず、そしてトランスジェニック動物においては、中位～高レベルの発現が存在した。結果は、下記表10に要約する。

【 0 6 0 0 】

【表 1 0 】

10

表10：

ネズミZcytor17リガンド トランスジェニック皮膚	皮膚表現型	Zcytor17	OSMR β	Zcytor17 リガンド
野生型マウス	正常	+	+++	-
野生型マウス	正常	+	+++	-
トランスジェニック# 1	正常	+	+	+
トランスジェニック# 1	脱毛	+	+	+
トランスジェニック# 2	正常	+	+	+
トランスジェニック# 2	脱毛	+	+	+
トランスジェニック# 3	正常	+	+	+
トランスジェニック# 3	脱毛	+	+	+
トランスジェニック# 4	正常	+	+	+++
トランスジェニック# 4	脱毛	+	+	+++

20

【 0 6 0 1 】

異なった実験において、Zcytor17, OSMR 及びZcytor17リガンド発現レベルを、急性臓炎にされたマウスの臓において、定量的RT - PCRにより測定した。Zcytor17発現はすべてのサンプルにおいて検出されなかった。OSMR 発現は、正常な対照サンプル（グループ1）においては、低レベルで見出されたが、しかし12時間の点で強いアップレギュレーションを示し（グループ2）、そして24時間の点でわずかに低いレベルを示した（グループ3）。Zcytor17リガンド発現は、対照動物において検出されなかつたが、しかしカエルレイン注射されたグループにおいては、高いレベルを示した。データは下記表11に要約される。

30

【 0 6 0 2 】

【表 1 1 】

40

表11：

臓炎モデル	説明	Zcytor17	OSMR β	Zcytor17 リガンド
グループ1	正常な対照	-	+	-
グループ2	注射後12時間	-	+++	++
グループ3	注射後24時間	-	++	++

50

【 0 6 0 3 】

もう1つの実験においては、Zcytor17及びOSMR 発現レベルを、DSS処理にゆだねられたマウスの遠位結腸において試験した。炎症性腸疾患のことネズミモデルにおいては、両遺伝子の発現レベルを、定量的RT-PCRにより決定し、そして下記表12に要約される。Zcytor17発現レベルは、疾病の重症度と共に上昇し、グループ1の正常動物においては発現レベルは低く、そして上昇レベルがグループ2及び3に見出された。グループ4動物においては、Zcytor17レベルは、より正常なレベルに戻った。Zcytor17発現とは異なって、OSMR レベルは、対照動物においては最高であり、そしてそのレベルは、すべての3種のDSS 処理されたグループにおいて実際、低下した。

【0604】

【表12】

10

表12：

IBDモデル	説明	SAC日	Zcytor17	OSMR β
グループ1	正常な対照	14	+	++
グループ2	DSS-処理された、2日	2	++	+
グループ3	DSS-処理された、7日	7	+++	+
グループ4	DSS-処理された、7日	14	+	+

20

【0605】

例28. 多重組織第1鎖cDNAのRT-PCR分析に基づくヒトZcytor17lig組織分布発現

Zcytor17ligの遺伝子発現を、市販の標準化された多重組織第1鎖cDNAパネル (OriGene Technologies, Inc. Rockville, MD; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) を用いて試験した。それらは、OriGene “Human Tissue Rapid-Scan™ Panel” (カタログ番号CHSCA-101; 22の異なる組織、骨髄及び血漿血液白血球を含む) 及びBD Biosciences Clontech “Human Blood Fractions MTC™ Panel” (カタログ番号K1428 - 1; 9種の異なる血液画分を含む)を包含した。

30

【0606】

PCR反応を、139bpの生成物を生成する、Zcytor17lig特異的オリゴヌクレオチドプライマー-ZC41,458 (配列番号60) 及びZC41,457 (配列番号61)、及び92bpの生成物を生成する、ZC41,459 (配列番号62) 及びZC41,460 (配列番号63)、Qiagen HotStarTag DNAポリメラーゼ及び緩衝液 (Qiagen, Inc., Valencia, CA)、蒸留水、及びRediLoad™ 色素 (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) を用いて設定した。PCRサイクラー条件は次の通りであった：95 °Cでの15分間の初期変性 (1サイクル)、95 °Cでの45秒の第2変性、53 °Cでの1分のアニーリング及び72 °Cでの1分15秒の拡張 (45サイクル)、続いて72 °Cでの7分の最終拡張 (1サイクル)。反応を、2%アガロースゲル上で電気泳動により分離し (EM Science, Gibbstown, NJ)、そして臭化工チジュウムによる染色により可視化した。

40

【0607】

正しいサイズのDNAフラグメントを、OriGene “Human Tissue Rapid-Scan™ Panel” を用いて、次のヒト成人組織において観察した：精巣、血漿血液リンパ球 (PBL)、及び骨髄。

正しいサブのDNAフラグメントを、BD Biosciences Clontech “Human Blood Fractions MTC™ Panel” を用いて、次のヒト血液画分において観察した：活性化された単核細胞 (B-&T-細胞及び单球)、活性化されたCD8+細胞 (T-サプレッサー/細胞毒性)、活性化されたCD4+細胞 (T-ヘルパー/インジューサー) 及び休止CD8+細胞 (わずか)。

【0608】

50

例29. ヒトオンコスタチンM受容体のクローニング

オンコスタチンM 受容体（OSMR）は、IL12R - B2に類似する構造を有するタイプIサイトカイン受容体である。OSMR 及びzcytor17を、それらがサイトカインシグナル化複合体においてサブユニットとして相互作用するかどうか、及びそれらが一緒に、zcytor17 ligのためのシグナル化受容体又は可溶性受容体アンタゴニストとして作用できるかどうか見出すために試験した。

【0609】

OSMR を単離するために、オリゴヌクレオチドPCRプライマーZC39982（配列番号64）及びZC39983（配列番号65）を、ヒトオンコスタチンM cDNA配列（配列番号6）の十分な長さのコード領域を増幅するために企画した（Genbank受託番号U60805；Mosley B, JBC Volume 271, Number 50, Issue of December 20, 1996pp. 32635-32643）。

【0610】

PCR反応を、cDNAの源を同定するために、強いポリメラーゼAdvantage II (Cloneltech, PaloAlto, CA) を用いて、cDNAライプラリー鑄型のアレイに対して行った。使用される鑄型は、5百万の独立したcDNAクローンを個々に含む、増幅されたcDNAプラスミドライプラリーからであった。反応を、鑄型として400fモル/μlの個々のオリゴヌクレオチド及び2~20ng/μlの増幅されたプラスミドライプラリーDNAを用いて、製造業者の説明書に従つてアッセンブリーした。cDNAライプラリーは、次のヒト組織及び細胞系に由來した：胎児脳、前立腺平滑筋、骨髄、RPMI1588、甲状腺、WI-38、精巣、刺激された末梢血液単核細胞、刺激されたCD3+細胞、THP-1、活性化された扁桃、HACAT及び胎児肝臓。反応を、サーモサイクラー機械上で次の条件を用いて行った：95 で20秒、68 で3分（30サイクル）。

【0611】

30サイクルの終結で、68 で8分の追加の单一の拡張サイクルを行った。PCR生成物を、TAEアガロース、臭化工チジウムの存在下でのゲル電気泳動、続くUV照射により可視化した。最も富んだ生成物は、前立腺平滑筋cDNAライプラリーからであることが見出された。前立腺平滑筋鑄型、及びオリゴヌクレオチドZC39982（配列番号64）及びZC39983（配列番号65）を用いてのPCR反応を、やや強いが、しかしより高い適合性の熱安定性DNAポリメラーゼ“turboPfu”(Stratagene, La Jolla, CA) を用いて反復した。30の増幅サイクルを次の条件下で行った：94 で30秒の変性、63 で45秒のアニーリング、72 で3.5分の拡張。単一バンドの生成物を、0.8%TAE、アガロースゲル上でゲル精製した。

【0612】

次に、このDNAを、哺乳類発現ベクター中にこのcDNAのクローニングを可能にするために、制限酵素認識配列を含む企画されたプライマーZC39980（配列番号66）及びZC39981（配列番号67）を用いて、再び増幅した。

【0613】

PCR反応を、“TurboPfu”及び精製されたPCR生成物を用いて、次の条件（15サイクル）下で行った：95 で1分、64 で1分20秒、72 で4.5分。次に、PCR反応を、EcoRI及びXhol (Invitrogen, Carlsbad, CA) により消化し、そして上記のようにしてゲル精製した。哺乳類発現ベクターpZ7NXを、EcoRI及びXholによる消化により調製し、そしてPCR生成物を、このベクターに連結し、そしてE. コリDH10b 細胞中にエレクトロポレーションした。いくつかの細菌コロニーを単離し、そして配列決定した。1つのクローンが正しかった。但し、単一の非保存性突然変異を除く。予測される配列を適合させるようこの塩基を変えるために、オリゴヌクレオチド拡張突然変異及び隣接するPstI制限部位を、pZP7Nx-h, すなわち鑄型として前もって配列決定されているオンコスタチンM Rプラスミドを用いて、“TurboPfu”とのPCR反応に使用した。

【0614】

PCR増幅されたDNAを、PstI及びXholにより消化し、そして攻撃性突然変異を含むPstI/Xholフラグメントの代わりにpZP7Nx-hオンコスタチンM Rプラスミド中にクローン化した。この新規プラスミドを、最近増幅されたPstI～Xhol領域にわたって配列決定し、補正を確

10

20

30

40

50

かにし、そして他の誤りが増幅工程において創造されなかったことを確めた。この分析は、前記コード領域にわたって予測される配列が適合する配列を確認した。この配列は配列番号6で示され、そして対応するアミノ酸配列は、配列番号7で示される。

【0615】

例30. ヒトZcytor17/オンコスタチンM受容体(OSMR)ヘテロダイマーを創造するための構造体

そのような可溶性ヘテロダイマー受容体の構成、発現及び精製のためのシステムは、当業界において知られており、そして受容体対、すなわちヒトオンコスタチンM受容体(OSMR)及びヒトZcytor17適合されて来た。この構造体に関しては、OSMRのための可溶性受容体についてのポリヌクレオチドは、配列番号68で示され、そして対応するポリペプチドは配列番号69で示され；そしてヒトZcytor17のための可溶性受容体についてのポリヌクレオチドは配列番号70で示され、そして対応するポリペプチドは配列番号71で示される。

【0616】

分泌された可溶性hzcytor17/ヒトOSMRヘテロダイマーを発現する細胞を構成するためには、得られるヘテロダイマー可溶性受容体が、C-末端でGlu-Glu標識(配列番号35)と共にIgG(Fc4)(配列番号37)のH鎖に融合されるヒトOSMRの細胞外ドメインを含んで成るよう、構造体が製造され；そしてZcytor17の細胞ガイドドメインはC-末端でHis標識(配列番号72)と共にFc4(配列番号37)に融合される。Hzcytor17及びヘテロダイマーのヒトOSMRアームの両者に関しては、12個のアミノ酸(配列番号73)のGly-Serスペーサーが、受容体の細胞外部分とFc4のN末端との間に構築される。

【0617】

A. ヒト可溶性OSMR/Fc4-CEEの構成：

ヘテロダイマーのヒト可溶性OSMR/Fc4-CEE部分の構成に関しては、ヒトOSMRの細胞外部分を、オリゴZC14063(配列番号48)及びZC41557(配列番号74)によるPCRを用いて、次の通りのPCR反応条件下で単離した：95℃で60秒、57℃で30秒、及び72℃で100秒(30サイクル)；及び72℃で7分。PCR生成物をQIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製し、EcoRI及びBglIII(Boehringer-Mannheim)により消化し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いて精製した。

キメラの発現カセット、プラスミド主鎖及びFc4-GluGlu標識部分は、前もって製造された自家プラスミド内に含まれた。プラスミドベクターを、EcoRI及びBamHI(Boehringer-Mannheim)により消化し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いて精製した。ヒトOSMR及びFc4-CEE含有プラスミドの消化され、そして精製されたフラグメントを、T4 DNAリガーゼ(Life Technologies, Bethesda, MD)を用いて、標準連結方法により一緒に連結した。得られる連結のミニプレップを、可溶性OSMRについての正しいサイズ(772bp)のEcoRI/SmaI挿入体についてスクリーンし、そして陽性ミニプレップを、配列決定し、PCR反応の精度を確めた。この新規プラスミド構造体を、pZP9-ONCOMR-Fc4CEEと命名する。

【0618】

B. ヒト可溶性OSMR/Fc4-CHISの構成：

ヘテロダイマーのhzcytor17/Fc4-CHIS部分の構成に関しては、ヒトZcytor17の細胞外部分を、Zcytor17-Fc4可溶性受容体を前もって含むプラスミドの活性により単離した。プラスミドを、まずSall(New England Biolabs, Beverly, MA)により消化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルムにより抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。次に、消化されたDNAを、T4 DNAポリメラーゼ(Boehringer-Mannheim)により処理し、Sall消化により創造される5'オーバーハングをフィルインし、DNA末端をプラント化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。

【0619】

プラント化されたDNAを、BglIII(Boehringer-Mannheim)によりさらに消化し、3'末端で切断し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いて

10

20

30

40

50

、製造業者の説明書に従って精製した。zcytor17の細胞外ドメインをコードする配列を含む、その得られるDNAフラグメントを、次の通りに調製された哺乳類発現ベクターを含むFc4-CHIS標識に連結した。

【0620】

キメラの発現力セット、プラスミド主鎖及びFc4-CHIS標識部分は、前もって製造された自家プラスミドベクター内に含まれた。このプラスミドベクターを、EcoRI (Boehringer-Mannheim)により消化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてフェノール沈殿せしめた。次に、消化されたDNAを、T4 DNAポリメラーゼ (Boehringer-Mannheim)により処理し、EcoRI消化により創造される5'オーバーハングをフィルインし、DNA末端をブラント化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。ブラント化されたDNAを、BamHI (Boehringer-Mannheim)によりさらに消化し、3'末端で切断し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。ヒトzcytor17及びFc4-CHIS含有プラスミドの消化され、そして精製されたフラグメントを、ゲル電気泳動により分離し、そして標準の連結方法を用いて、T4 DNAリガーゼ (Life Technologies, Bethesda, MD) を用いて精製した。

【0621】

得られる連結のミニプレプを、次のPCR反応条件と共に、zcytor17特異的センスプライマーZC29180 (配列番号22) 及びFc4特異的アンチセンスプライマーZC29232 (配列番号75) を用いて、PCRによりスクリーンした：94 度60秒、68 度150秒及び72 度7分 (30サイクル)。848bpの予測される生成物サイズは、pZEM228 hzcytor17/Fc4HISと称するプラスミドの正しいアセンブリーを確認した。

【0622】

第2のzcytor17-Fc4構造を、COS細胞からのホモダイマータンパク質の生成に使用するために創造した。手短には、十分な融合タンパク質のためのコード領域を、Zcytor17-Fc4可溶性受容体を前もって含むプラスミドのSall (Boehringer-Mannheim)による消化により単離した。反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてフェノール沈殿せしめた。次に、消化されたDNAを、T4 DNAポリメラーゼ (Boehringer-Mannheim)により処理し、EcoRI消化により創造される5'オーバーハングをフィルインし、DNA末端をブラント化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。ブラント化されたDNAを、NotI (Boehringer-Mannheim)によりさらに消化し、3'末端で切断し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。

【0623】

CMV駆動の発現力セットを含む哺乳類発現ベクターを消化し、適合できる末端を生成し、そして2つのフラグメントを一緒に連結した。得られる連結のミニプレプを、次のPCR反応条件と共に、zcytor17特異的センスプライマーZC14063 (配列番号48) 及びzcytor17特異的アンチセンスプライマーZC27899 (配列番号19) を用いて、PCRによりスクリーンした：94 度60秒、68 度150秒及び72 度7分 (30サイクル)。1000bpの予測される生成物サイズは、pZP7NX-hzcytor17-Fc4と称するプラスミドの正しいアセンブリーを確認した。このプラスミドを、Lipofectamine (Gibco/BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、COS細胞中にトランスフェクトした。細胞を、DMEM + 5%FBS (Gibco/BRL) において60時間、条件付けし、この後、タンパク質を、プロテインG-セファロース4Bクロマトグラフィーカラム上で精製し、そしてインピトロバイオアッセイ、例えば本明細書に記載されるそれらのアッセイのために利用可能にした。

【0624】

C. ヒトZcytor17/オンコスタチンM受容体(OSMR)の創造：

約16 μgの個々のpZP9-ONCOMR-Fc4CEER及びpZEM228 hzcytor17/Fc4HISを、Lipofectamine (Gibco/BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、BHK-570 (ATCC No. CRL-10314) 細胞中に同時トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、0.5mg/mlのG418 (

10

20

30

40

50

Gibco/BRL) 及び250nMのメチルトレキセート(MTX)(Sigma, St. Louis, MO)を含むDME M+5%FBS(Gibco/BRL)において10日間、選択した。

【0625】

二重選択された細胞のその得られるプールを用いて、ヘテロダイマータンパク質を生成した。このプールの3種の細胞画分(Nunc, Denmark)を用いて、10Lの血清フリーのならし培地を生成した。ならし培地を、1mLのプロテイン-Aカラムに通してそして(10)750µlの画分を溶出した。最高濃度を有することが見出されたそれらの画分のうち4種をブレートし、そしてPBSに対して透析した(10KDのMWカットオフ)。所望するヘテロダイマー可溶性zcytor17/OSMRタンパク質複合体を、ニッケルカラムに前記プールを通し、そして種々の濃度のイミダゾールによりカラム洗浄することにより、他の培地成分から単離した。zcytor17/OSMRタンパク質は中間濃度のイミダゾールで溶出し、そしてhcytor17/Fc4HISホモダイマーはより高い濃度のイミダゾールで溶出した。

10

【0626】

例31. ノザンプロット及びPCRを用いての組織パネルにおけるヒトzcytor17の組織分布

A. ノザンプロットを用いてのヒトzcytor17組織分布:

Human multiple Tissue Northern Blots(Human 12-lane MTN Blot I and II, 及びHuman Immune System MTN Blot II; Human Encocrine MTN, Human Fetal MTN Blot II, Human Multiple Tissue Array)(Clontech), 及び種々の組織を含む自家プロットを、プローブし、ヒトzcytor17発現の組織分布を決定した。自家調製されたプロットは、次の組織及び細胞系mRNAを含んだ: SK - Hep - 1細胞、THP1細胞、副腎(Clontech); 腎臓(Clontech)、肝臓(Clontech及びInvitrogen); 脊椎(Clontech)、精巣(Clontech)、ヒトCD4+T-細胞、ヒトCD8+T-細胞、ヒトCD19+T-細胞、ヒト混合されたリンパ球反応物(MLR)、THP1細胞系(ATCC No. TTB-202)、U937細胞系、p338D1マウスリンパ芽球細胞系(ATCC No. CCL-46)(イノマイシンにより刺激されているか又はされていない); 及びWI-38ヒト胚肺細胞系(ATCC No. CRL-2221)(イノマイシンにより刺激されているか又はされていない)。

20

【0627】

zcytor17(配列番号4)のための約500bpのPCR由来のプローブを、プライマーとしてオリゴヌクレオチドZC28,575(配列番号77)及びZC27,899(配列番号19)を用いて増幅した。PCR増幅を次の通りに行った: 94で1分、65で1分及び72で1分(30サイクル); 続いて72で7分(1サイクル)。PCR生成物をアガロースゲル電気泳動により可視化し、そして約500bpのPCR生成物を、本明細書に記載のようにしてゲル精製した。プローブを、PRIME IT II™ Random Primer Labeling Kit(Stratagene)を用いて、その製造業者の説明書に従って、放射性ラベルした。プローブを、NUCTRAP™ ブッシュカラム(Stratagene)を用いて精製した。EXPRESSHYB™(Clontech)溶液を、プレハイブリダイゼーションのために、及びノザンプロットのためのハイブリダイゼーション溶液として使用した。

30

【0628】

プレハイブリダイゼーションは、68で2時間、行われた。ハイブリダイゼーションは、約 1.5×10^6 cpm/mLのラベルされたプローブにより68で一晩を要した。プローブを、室温で2×SSC、0.05%のSDSにより3度、続いて、2×SSC、0.1%SDSにより50で10分間、1度、洗浄した。いくつかの薄いバンドが、数日の暴露の後、見られた。約9kbの転写体が、気管、骨格筋及び胸腺に見られ; 約2kbの転写体がPBL、HPV、U937及びTHP-1細胞に見られ; そして約1.2kbの転写体が胎盤、骨髄及び甲状腺、及びHPV及びU937細胞に見られた。上記列挙されるすべての組織においては、シグナルの強さは薄かった。ほとんどの正常な組織においては、ほとんど発現が出現せず、このことは、zcytor17の発現する細胞又は組織の活性化に依存することを示唆する。

40

【0629】

B. PCRを用いての組織パネルにおける組織分布:

ヒト組織からのcDNAのパネルを、PCRを用いて、zcytor17発現についてスクリーンした。パネルは自家製造され、そして種々の正常及び癌性ヒト組織からの94種のマラソンcDNA

50

及びcDNAサンプルを包含し、そして細胞系は下記表13及び表14に示される。前記cDNAは自家ライブラリーからであり、又はマラソンcDNAは自家RNA調製物、すなわちClontech RNA又はInvitrogen RNAからであった。マラソンcDNAは、マラソン - ReadyTM キット (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて製造され、そしてクラスリンプライマーZC21,195 (配列番号78) 及びZC21,196 (配列番号79) によりQC試験し、そして次に、クラスリンバンドの強さに基づいて希釈された。

【 0 6 3 0 】

パネルサンプルの性質を評価するために、品質管理 (QC) についての次の 3 種の試験を行った： (1) ライブラリーのために使用されるRNA品質を評価するために、自家cDNAを個々のcDNAライブラリーについてのベクター配列に対して特異的であるベクターオリゴによるPCRにより、平均挿入体について試験し； (2) パネルサンプルにおけるcDNAの濃度の標準化を、5' ベクターオリゴZC14,063 (配列番号48) 及び3' - チューブリン特異的オリゴプライマーZC17,574 (配列番号49) 又は3' G3PDH特異的オリゴプライマーZC17,600 (配列番号50) を用いて、十分な長さの チューブリン又はG3PDH cDNAを増幅するために、標準のPCR方法を用いて達成し；そして (3) サンプルを、可能なりボソーム又はミトコンドリアDNA汚染について調べるために配列決定に送った。

【 0 6 3 1 】

パネルを、ヒトゲノムのDNA (Clontech, Palo, Alto, CA) 陽性対照サンプルを含む96 - ウェル形式において組み立てた。個々のウェルは約0.2~100pg / μlのcDNAを含んだ。PCR反応を、オリゴZC26,358 (配列番号80) 及びZC26,359 (配列番号81) 、Takara Ex TaqTM (TAKARA Shuzo Co. LTD, Biomedicals Group, Japan), 及びRadiload 色素 (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) を用いて組み立てた。増幅を次の通りに行った：94で2分 (1 サイクル) 、94で30秒、66.3で30秒及び72で30秒 (35サイクル) 、続いて72で5分 (1 サイクル) 。約10μlのPCR反応生成物を、4%アガロースゲルを用いての標準のアガロースゲル電気泳動にゆだねた。正しい推定されるDNAフラグメントサイズを、リンパ節、前立腺、甲状腺、HPV (前立腺上皮) 、HPVS (選択された前立腺上皮) 、肺腫瘍、子宮腫瘍反応及びゲノムDNA反応において観察した。

【 0 6 3 2 】

前立腺組織 (2 種のサンプル) 、HPV (前立腺上皮) 、HPVS (選択された前立腺上皮) 及びゲノムについてのDNAフラグメントを切除し、そしてGel Extractionキット (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。フラグメントを、それらが実際、zcytor17であることを示すために、配列決定により確かめた。

【 0 6 3 3 】

【表13】

表13:

組織/細胞系	サンプル#	組織/細胞系	サンプル#
副腎	1	骨髓	3
膀胱	1	胎児脳	3
骨髓	1	ランゲルハンス島	2
脳	1	前立腺	3
頸部	1	RPMI#1788 (ATCC#CCL-156)	2
結腸	1	精巣	4
胎児脳	1	甲状腺	2
胎児心臓	1	WI38 (ATCC#CCL-75)	2
胎児腎臓	1	ARIP (ATCC#CRL-1674-rat)	1
胎児肝臓	1	HaCat-ヒトケラチノサイト	1
胎児肺	1	HPV (ATCC#CRL-2221)	1
胎児筋肉	1	副腎	1
胎児皮膚	1	前立腺SM	2
心臓	2	CD3+選択されたPBMC イノマイシン+PMA刺激された	1
K562 (ATCC#CCL-243)	1	HPVS (ATCC#CRL-2221)-選択された	1
腎臓	1	心臓	1
肝臓	1	下垂体	1
肺	1	胎盤	2
リンパ節	1	唾液腺	1
メラノーマ	1	HL60 (ATCC#CCL-240)	3
脾臓	1	血小板	1
下垂体	1	HBL-100	1
胎盤	1	腎糸球体間質	1
前立腺	1	T-細胞	1
直腸	1	好中球	1
唾液腺	1	MPC	1
骨格筋	1	Hut-102 (ATCC#TIB-162)	1
小腸	1	内皮	1
脊椎	1	HepG2 (ATCC#HB-8065)	1
脾臓	1	線維芽細胞	1
胃	1	E.Histo	1

10

20

30

40

【0634】

【表14】

表14:

組織/細胞系	サンプル#	組織/細胞系	サンプル#
精巣	2		
胸腺	1		
甲状腺	1		
気管	1		
子宮	1		
食道	1		
胃腫瘍	1		
腎臓腫瘍	1		
肝臓腫瘍	1		
肺腫瘍	1		
卵巣腫瘍	1		
直腸腫瘍	1		
子宮腫瘍	1		

10

20

30

【0635】

C. PCR及びノザンによるzcytor17の発現分析:

受容体の発現に影響を及ぼす細胞及び成長条件の注釈は、リガンド源のその機能を誘発し、そしてその源を予測する有用な手段である。このためには、本発明者は広範囲の種類の組織及び細胞型を調査した。熱安定性ポリメラーゼAdvantage II™ (Clontech, La Jolla, CA) を、オリゴヌクレオチドプライマーZC29,180 (配列番号22) 及びZC29,179 (配列番号82)、及び下記に列挙される1 ~ 10ngの種々のcDNA鑄型と共に、30の増幅サイクル(94 ℃で30秒; 66 ℃で20秒; 68 ℃で1.5分)の間、使用した。これに続いて、個々の反応20%を、0.8%アガロース、TAE/臭化工チジウムゲル上で行い、そしてUV光により可視化した。次に、サンプルを、バンドの強度に基づいて評点を付けた。下記表15を参照のこと。

【0636】

【表15】

表15：

細胞及び条件	評点0-5
PMAにより刺激されたHeI	0
U937	3
MCF-7	0
HuH7	1
ヒト小胞	0
HT-29	0
HEPG2	0
IL6により刺激されたHepG2	0
ヒト皮膚内皮	0
ヒト静脈内皮	0
ヒトCD4+	0
BEWO	0
ヒトCD19+	1
PHA、PMA、イノマイシン、IL2、IL4、TNF α により24時間刺激されたヒトPBMC	0
LPS、PWM、IFN γ 、TNF α により24時間刺激されたヒトPBMC	0
上記条件のすべてにより48時間刺激されたヒトPBMC	4
HUVECP.2	4
RPMI1788	0
TF1	0
PMA、イノマイシンにより刺激されたサル脾臓T細胞	0
形質転換されたヒト前立腺上皮HPV	5
炎症されたヒト扁桃	0
HACAT	0
ヒト軟骨細胞	1
ヒト滑液細胞	1
THP1	5
REH	0

10

20

30

40

50

【0637】

強い陽性のPCRシグナルのうち、2種は、ヒト単球細胞系U937及びTHP1からであった。

前立腺上皮系と共にそれらの2種の細胞系を、ノザンプロットによる分析のために選択した。種々の組織からのmRNAを用いてのノザン分析による転写体の可視化でのこれまでの試みは、強く且つ拡散性のシグナルを、7~10kbの驚くべき大きなサイズ範囲で生成し、これは、このデータを解釈するのに困難にしている。変性ホルムアルデヒド/MOPS/0.8%アガロースゲルを調製し(RNA Methodologies, Farrell, RE Academic Press)、そして2μgのポリA+mRNAを、RNAラダー(Life Technologies, Bethesda, MD)と共に、個々のサンプルについて試験した。

【 0 6 3 8 】

次に、ゲルを、Hybondナイロン (Amersham, Buckinghamshire, UK) に移し、UV架橋し、そしてオリゴZC28,575 (配列番号77) 及びZD27,899 (配列番号19) によるPCRにより生成され、そしてMegaprime ^{32}P キット (Amersham) によりラベルされたヒトzcytor17に、プローブを用いて68 で一晩、ExpressHyb溶液 (Diontech, LaJolla, CA) においてハイブリダイズした。ノザンプロットを、65 で15分間、 $0.2 \times \text{SSC}$ 及び 0.1% SDSにより連続的に洗浄し、そして強化スクリーンにより7日間、フィルムに照射した。卓越した8kbのバンドが、前立腺上皮及びU937系の両者において見出され、そしてより薄いバンドがTHP1レーンに存在した。

【 0 6 3 9 】

ハイブリダイゼーションとして使用されるcDNAを最適化するために、4種の異なった領域の十分な長さのヒトzcytor配列を、PCRにより増幅し、ラベルし、ゲノム及び増幅されたcDNAライブラリーDNAを含むサザンプロットに、上記のようにしてハイブリダイズした。本明細書においてプローブA-Dと命名された4種のプローブを、次のプライマー対を用いて増幅した：(A) ZC28,575 (配列番号77)、ZC27,899 (配列番号19)；(B) ZC27,895 (配列番号20)、ZC28,917 (配列番号83)；(C) ZC28,916 (配列番号84)、ZC28,918 (配列番号85)；及び(D) ZC28,916 (配列番号84)、ZC29,122 (配列番号21)。

【 0 6 4 0 】

PCRによりzcytor17を含むことが示されている、増幅されたcDNAライブラリーと共にゲノムDNAを、EcoRI及びXbaIにより消化し、挿入体を生成し、そして重複TAE/0.8%アガロースゲル上に負荷し、0.5MのNaOH、1.5MのNaClにより変性し、Hybondにプロットし、UV架橋し、そして明確なプローブによりそれぞれハイブリダイズした。プローブBは、最少の非特異的結合及び最強のシグナルを有することが見出された。従って、プローブBを、すべての続くハイブリダイゼーションのために使用した。

【 0 6 4 1 】

THP1細胞が循環性単球の卓越したモデルであり、そして低レベルでzcytor17を発現する場合、本発明者は、zcytor17の発現を高めるために、種々の化合物によりそれらを処理した。細胞を、 $2 \times 10^5/\text{ml}$ の密度に増殖し、種々の刺激培地により洗浄し、そしてそれに再懸濁し、4～30時間、増殖し、そしてRNA調製のために収穫した。個々の培地を、次の薬剤又はサイトカイン対の1つにより補充した：LPS 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (Sigma Chemicals, St Louis, MO)、hTNF 2ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hGM-CSF 2ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIFN 50ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hM-CSF 1ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIL6 1ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIL1 2ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIFN 50ng/ml + hIL4 0.4ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIFN 50ng/ml + hIL10 1ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、PMA 10ng/ml (Calbiochem, San Diego, CA) 及び未処理の対照。

【 0 6 4 2 】

培養期間の最後で、全RNAを、RNAeasy Mide - キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製した。ポリA+RNAを、MPGキット (CPG, Lincoln Park, NJ) を用いて、前記全RNAから選択した。個々の状態からのポリA+RNA 2 μg を、ホルムアルデヒド/MOPS/アガロースゲル上に負荷し、上記のようにして、ナイロンに移し、そしてUV照射した。次に、これらのノザンプロットを、上記のようにして、プローブBに対して、68 で一晩、ハイブリダイズし、65 で $0.2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDSにより高い緊縮性下で洗浄し、フィルムに一晩、照射し、次に、シグナル定量化のためにリン光体スクリーンに照射した（図2を参照のこと）。

【 0 6 4 3 】

卓越した8kbのmRNA及び比較的弱い2.8kbのバンドが、すべてのレーンに見られた。zcytor17 mRNAの20倍の上昇がhIFN により30時間、処理された細胞からのRNAに見られ、この効果は、IL4による同時処理によりわずかに弱められた。mRNAにおけるマイナーな3倍の上昇がLPS、TNF GM-CSFにより処理された細胞からのRNAに見出されたが、M-CSF、IL6

10

20

30

40

50

及びIL1_βはzcytor17 mRNAレベルに対して効果を有さなかった。一緒に考えると、このデータは、単球マクロファージ生物学において、及びそれらの細胞が関係するいずれかの数の疾病工程の延長により、zcytor17受容体及びそのリガンドについての役割を示唆する。

【0644】

例32. ノザンプロット及びPCRを用いての組織パネルにおけるヒトzcytor17の組織分布

ヒトzcytor17lig cDNAフラグメントを、遺伝子特異的プライマー：センスプライマー-ZC41438（配列番号93）及びアンチセンスプライマー-ZC41437（配列番号94）、及び鑄型ヒトzcytor17lig cDNA（配列番号90）によるPCRを用いて得た。このフラグメントを、標準の方法を用いて精製し、そして約25ngを、Prime-It RmTランダムラベリングキット（Staragene）を用いて、³²P-dCTPによりラベルし、そしてUltarahyb（Ambion）においてハイブリダイズし、そしてBiomaxフィルム/増強スクリーンを個々の場合、創造業者の推薦に従って暴露するために使用した。ClontechからのClontech Human 12レーンMTN II及びヒト脳MTNプロットIV、ヒト免疫系MTN II及びヒトMTEアレイIIを包含する。新規のこれまで未使用的プロットを、Ambion ultrahyb方法に従って、42[°]で一晩ハイブリダイズした。陽性プロットは、ヒト12レーンMTN（Clontech）を包含した。試験された12種の組織のうち、胎盤のみが約1.2kbの転写体に対して陽性であった。

【0645】

例33. ヒトzcytor17lig-CEEを発現する哺乳類発現ベクターの構成

A. zCytor17Lig-CEE/pZMP21の構成：

zCytor17Lig-CEE（配列番号95）をコードするポリヌクレオチドのすべて又は一部を含む発現プラスミドを、相同組換えにより構成した。プラスミドは、zCytor17Lig-CEE/pZMP21と呼ばれた。

【0646】

zCytor17Lig-CEE/pZMP21の構成を、PCR増幅を用いて、zCytor17Lig-CEEフラグメントを生成することによって達成した。zCytor17Lig-CEEフラグメントの生成のために使用されるDNA鑄型は、zCytor17Lig/pZP7nxであった。zCytor17Lig-CEEフラグメントの生成のために使用されるプライマーは、次のものであった：（1）5'から3'末端側に、28bpのベクターフランギング配列（挿入体の5'側）及びzCytor17Ligの5'配列に対応する21bpを含むZC41607（配列番号97）（センス配列）；及び5'から3'末端側に、37bpのベクターフランギング配列（挿入体3'側）、3bpの停止コドン、C-末端EE標識をコードする21bp、及びzCytor17Lig配列3'末端に対応する21bpを含むZC41605（配列番号98）（アンチセンス配列）。上記PCR増殖に起因するフラグメントは、C末端EE標識の追加を有する鑄型zCytor17Ligのコピーであり、zCytor17Lig-CEEの最終生成物を生成する。

【0647】

PCR反応を次の通りにして行った：100μlの最終体積に、次のものを添加した：15mMのMgCl₂を有する10×Taqポリメラーゼ反応緩衝液10μl、1μlのTaq DNAポリメラーゼ（5単位/μl、Gibco）、3μlの10mMのdNTP、78μlの蒸留水、プライマー-ZC41607（配列番号97）の20pモル/μlストック3μl、プライマー-ZC41605（配列番号98）の20pモル/μlストック3μl、及びzCytor17Lig鑄型DNAの0.13μg/μlストック2μl。50μlに等しい体積の鉛油を、前記混合物に添加した。反応を、94[°]への5分間の加熱；続いて94[°]で1分；55[°]で2分；72[°]で3分（35サイクル）；続いて、72[°]での10分の拡張、及び反応を集めるまで、4[°]での維持。

【0648】

プラスミドpZMP21を、BglIII酵素により制限消化し、超遠心分離プロトコールを用いて、QiaQuick PCR精製キット（Qiagen）により清浄し、そしてPCRフラグメントによる組換えのために使用した。プラスミドpZMP21を、pRS316（American Type Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託され、そしてNo. 77145として受託される）から取られた酵母遺伝子要素、ポリオウィルスからのIRES要素、及びトランスマンブルードメインのカルボキシル末端で切断された、CD8の細胞外ドメインから構成されたpZMP20から構成した。

10

20

30

40

50

【 0 6 4 9 】

pZMP21は、MPSVプロモーター、免疫グロブリンシグナルペプチドイントロン、コード配列の挿入のための複数の制限部位、停止コドン及びヒト成長ホルモンターミネーターを有する発現力セットを含む哺乳類発現ベクターである。プラスミドはまた、複製のE.コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、SV40ターミネーター、及びS.セレビシアエにおける選択及び複製のために必要とされるURA3及びCEN-ARS配列を有する。

【 0 6 5 0 】

50 μlのコンピテント酵母細胞(S.セレビシアエ)を、それぞれ約100ngの切断されたプラスミド、5 μlの前記PCR混合物と共に組合し、そして0.2cmのエレクトロポレーションキュベットに移した。酵母/DNA混合物を、0.75kV(5kV/cm)、“無限”、25 μFで、電気パルスした。個々のキュベットに、1.2Mのソルビトール600 μlを添加し、そして酵母を、2種のURA-Dプレート上の1つの100 μlのアリコート及び1つの300 μlアリコートにプレートし、そして30℃でインキュベートした。約72時間後、単一のプレートからのUra+酵母形質転換体を、1mlの水に再懸濁し、そして短時間、回転せしめ、酵母細胞をペレット化した。10

【 0 6 5 1 】

その細胞ペレットを、500 μlの溶融緩衝液(2% Triton X-100, 1% SDS, 100mMのNaCl、10mMのトリス、pH8.0, 1mMのEDTA)に再懸濁した。この溶融混合物500 μlを、300 μlの酸洗浄されたガラスピーズ及び300 μlのフェノール-クロロホルムを含むEppendorf管に添加し、1分間、2又は3度、かき混ぜ、続いて5分間、最大速度で、Eppendorf遠心分離機において回転せしめた。300 μlの水性相を、新しい管に移し、そしてDNAを600 μlの100%エタノール(EtOH)により沈殿せしめ、続いて、4℃で10分間、遠心分離した。次に、DNAペレットを、500 μlの70%エタノールにより洗浄し、続いて4℃で1分間、遠心分離した。DNAペレットを30 μlの水に再懸濁した。20

【 0 6 5 2 】

エレクトロコンピテントE.コリ細胞(MC1061)の形質転換を、5 μlの酵母DNA調製物及び50 μlのMC1061細胞により行った。細胞を、2.0kV, 25mF及び400オームで電気パルスした。エレクトロポレーションの後、600 μlのSOC(2% BuctoTM Trypton(Difco, Detroit, MI), 0.5%酵母抽出物(Difco)、10mMのNaCl、2.5mMのKCl、10mMのMgCl₂、10mMのMgSO₄、20mMのグルコース)を、添加した。エレクトロポレートされたE.コリ細胞を、250 μl及び50 μlのアリコートで、2個のLB AMPプレート(LBブイヨン(Lennox)、1.8% Bato A agar(Difco)、100mg/Lのアンピシリン)上にプレートした。プレートを、37℃で約24時間、逆にしてインキュベートした。3個のアンピシリン-耐性コロニーを、ランダムに選択し、そして挿入体の配列分析のために提出した。大規模プラスミドDNAを、Qiagen Maxiキット(Qiagen)を用いて、その製造業者の説明書に従って、配列確認されたクローンから単離した。30

【 0 6 5 3 】

B. zCytor17Lig (m)-CEE/pZMP21の構成：

ネズミzCytor17Lig-CEE(配列番号104及び105)をコードする完全なオリゴヌクレオチドを含む発現プラスミドをまた、上記例33Aに記載される方法を用いて、相同組換えにより構成した。使用されるプライマーは、次のものであった：(1)挿入点の28bpの5'側ベクター-オーバーラップ、zcytor17lig(m)の5'末端の21bpを有するZC41643(配列番号106)(逆方向、5'→3'アンチセンス)、及び(2)挿入点の3'の37bpベクター-オーバーラップ；3bpの停止コドン；21bpのC-末端EE標識；zCytor17Lig (m)-CEEの3'末端の24bpを有するZC41641(配列番号107)(逆方向、5'→3'アンチセンス)。プラスミドを、zcytor17lig (m)-CEE/pZMP21と命名した。zcytor17lig (m)-CEEのポリヌクレオチド配列は、配列番号104で示され、そして対応するポリペプチド配列は配列番号105で示される。40

【 0 6 5 4 】

例34. zcytor17lig-CEEポリペプチドのトランスフェクション及び発現

10

20

30

40

50

A. 293T細胞におけるヒトzCytor17Lig-CEE/pZMP21の発現：

Zcytor17Lig-CEEを、293T細胞（Stanford University School of Medicine, Stanford, CA; ATCC No. SD-3515）において一時的に発現し、初期精製されたタンパク質を生成した。トランスフェクションの前、293T細胞を、フラスコ当たり合計体積30mlの培養培地（SL7V4+5%FBS+1%Pen/Strep）を有する30のT162培養フラスコに、 6.5×10^4 個の細胞/cm²で接種した。細胞を、37℃で24時間インキュベートした。

【0655】

DNA/リポソーム混合物を次の通りに調製した。2つの50mlの円錐形管を、25mlのトランスフェクション培地（SL7V4 + 1%Pen/Strep）により満たしそして1.13mgのzCytor17Lig-CEE/pZMP21（例33）を、それぞれに添加した。別の組の2つの50mlの円錐形管を、22mlのトランスフェクション培地（上記）により満たし、そして3mlのリポソーム（Lipofectamine, Gibco）を個々に添加した。個々の組の管に関しては、1つの管のDNAを1つの管のリポソームに添加し、そしてDNA/リポソーム混合物を30分間インキュベートした。

10

【0656】

DNA/リポソーム混合物を含む、2つの50mlの円錐形管をプールし（約100ml）、そして300mlのトランスフェクション培地を添加した。293T細胞の30のフラスコをデカントし、約15mlのPBSにより1度、洗浄し、そして12.4mlの希釈されたDNA/リポソーム混合物を、個々のフラスコに添加した。フラスコを37℃で3時間インキュベートした。インキュベーション期間の後、25mlの培養培地（上記）を、個々のT162フラスコに添加した。トランスフェクション培地を、約96時間後、収穫し、そしてタンパク質精製のための使用した（例35）。

20

【0657】

B. 293T細胞におけるヒトzCytor17Lig-CEE(m)/pZMP21の発現：

マウスzCytor17Lig(m)-CEEを、例34Aに記載のようにして、293T細胞において1時的に発現し、そして培養された培地を、タンパク質精製のために使用した（例35）。

【0658】

例35. 293T細胞からのZcytor17lig-CEEの精製

特にことわらない限り、すべての操作は4で行われた。次の方法を、C-末端Glu-Glu(EE)標識（配列番号103）を含むマウス及びヒトZcytor17ligを精製するために使用した。Zcytor17lig-CEE（例34）を発現する293T細胞からのならし培地を、精製した。ならし培地の合計の標的物タンパク質濃度を、抗-EE抗体を用いて、SDS-PAGE及びウェスタンプロット分析により決定した。

30

【0659】

5.5mlのカラム体積の抗-EE Poros50A (PE BioSystems, Framingham, MA) (下記のようにして調製された)を、Waters AP-1, 1cm × 7cmのガラスカラム (Waters, Milford, MA)に注いだ。カラムを流動充填し、そしてリン酸緩衝溶液 (PBS) (pH7.4)により、BioCAD Sprint (PE BioSystems, Framingham, MA)上で平衡化した。ならし培地を、NaClにより0.3Mに調節し、そしてpHを7.2に調節した。次に、ならし培地を、約3ml/分の流速で一晩、カラム上に充填した。カラムを、10カラム体積(CV)のPVS (pH7.4)により洗浄し、そして再び、3CVの5×Sigma PBS (pH7.4)により洗浄した。それを、3ml/分で、0.5Mのアセトン、0.5MのNaCl (pH2.5)により段階的溶出した。

40

【0660】

画分管は、溶出液をすぐに中和するために、1mlのトリス塩基 (pH調節されていない)を含んだ。カラムを再び、中和するために、5×Sigma PBS (pH7.4)により洗浄し、そして次に、PBSにより平衡化した。2ml画分を、完全な溶出クロマトグラフィー上で集め、そして280及び215nmでの吸光度をモニターし；通過物及び洗浄プールをまた、保存し、そして分析した。5×PBS及び酸溶出ピーク画分を、一次抗体抗-EE及び二次抗体、接合されたマウス-HRPにより、SDS-PAGE銀染色及びウェスタンプロットを通して、標的タンパク質について分析した。興味ある酸溶出画分をプールし、そして5000ダルトン分子量カットオフ膜回転濃縮機 (Millipore, Bedford, MA) を用いて、その製造業者の説明書に従

50

って、38mlから0.8mlに濃縮した。

【0661】

凝集された材料及びいずれかの汚染性同時精製タンパク質からZcytor17lig-CEEを分離するために、プールされた濃縮画分を、PBSにより平衡化され、そしてBioCad Sprintを用いて、1.0ml/分の流速で充填される、1.6×60cm(120ml)のSephadex 75(Pharmacia, Piscataway, NJ)カラム上でのサイズ排除クロマトグラフィー処理にゆだねた。3mlの画分を、全クロマトグラフィーを通して集め、そして280及び215nmでの吸光度をモニターした。ピーク画分を、SDS-PAGE銀染色により特徴づけ、そして最も純粋な画分のみをプールした。この材料は、精製されたZcytor17lig-CEEタンパク質を提供した。

【0662】

ウェスタンプロットされた、クーマシープルー及び銀色されたSDS-PAGEゲル上で、Zcytor17lig-CEEは、1つの主要バンドであった。精製された材料のタンパク質濃度を、BCA分析(Pierce, Rockford, IL)により行い、そしてタンパク質を等分し、そして標準の方法に従って、-80°で貯蔵した。

【0663】

PorosA50抗-EEを調製するために、65mlの層体積のPorosA50(PE Biosystems)を、100mlの水及び次に、0.1Mのトリエタノールアミン、pH8.2(TEA, ICN, Aurora, Ohio)、1Mの硫酸ナトリウム(pH8.8)の0.02%アジ化ナトリウム含有溶液により、真空フラスコフィルターユニットを用いて洗浄した。300mlの体積中、2mg/mlの濃度でのEEモノクローナル抗体溶液を、250mlの体積の洗浄された樹脂と共に混合した。室温での一晩でのインキュベーションの後、結合されなかった抗体を、5体積の200mMのTEA、1Mの硫酸ナトリウム、pH8.8の0.02%アジ化ナトリウム含有溶液により樹脂を洗浄することによって除去した。樹脂を、2体積のTEA、1Mの硫酸ナトリウム(pH8.8)の0.02%アジ化ナトリウム含有溶液に再懸濁し、そして適切な容器に移した。

【0664】

3mlの25mg/ml(68mM)のジスクシンイミジルスペレート(Pierce, Rockford, ILにより供給されるDMSO中)を添加し、そしてその溶液を、室温で3時間インキュベートした。次に、樹脂上の非特異的部位を、真空フラスコフィルターユニットを用いて、200mMのTEA(pH8.8)中、20mMのエタノールアミン(Sigma, St. Louis, MO)5体積と共に室温で10分間インキュベートすることによりブロックした。樹脂を、PBS(pH7.4)、続いて0.1Mのグリシン(pH3)により洗浄し、そして10×PBSにより中和した。蒸留水による洗浄の後、最終のカップリングされた抗-EE Poros-A50樹脂を、20%エタノールにおいて、4°で貯蔵した。

【0665】

例36. ヒト及びマウスZcytor17ligのN-末端配列決定

A. ヒトZcytor17ligのN-末端配列決定：

標準の自動化されたN-末端ポリペプチド配列決定(エドマン分解)を、Applied Biosystemsからの試薬を用いて行った。N-末端配列分析を、Mode 1494 Protein Sequencer System(applied Biosystem, Inc., Foster City, CA)上で行った。データ分析を、Model 610A Data Analysis System for Protein Sequencing, バージョン2.1a(Applied Biosystems)により行った。

【0666】

精製されたヒトzcytor17lig-CEEサンプル(例35)を適用した。サンプルを、N-末端配列決定のために、調製されたガラス纖維フィルター上に負荷した。ガラス纖維フィルターは、それをBiobreneTMと共に予備循環することによって調製された。

分泌されたヒトzcytor17ligポリペプチドのN-末端配列分析は、シグナル配列の予測される分解部位を確認しなかったが、しかしヒトzcytor17lig前駆体配列の配列番号2における残基27(Leu)での成熟開始をもたらした。

【0667】

B. ヒトZcytor17ligのN-末端配列決定：

10

20

30

30

40

50

標準の自動化されたN-末端ポリペプチド配列決定（エドマン分解）を、Applied Biosystemsからの試薬を用いて行った。N-末端配列分析を、Mode 1494 Protein Sequencer System (applied Biosystem, Inc., Foster City, CA) 上で行った。データ分析を、Model 610A Data Analysis System for Protein Sequencing, バージョン2.1a (Applied Biosystems) により行った。

【0668】

精製されたマウスzcyt17lig-CEEサンプルを、プロテインGセファロース/抗-EEビーズ（例35）上に捕獲されるように、供給した。ビーズを、Novex SDS PAGEシステム（4～12%のビス-トリスMES NuPAGE; Invitrogen）を用いて、その製造業者の説明書に従って、還元SDS-PAGEサンプル緩衝液に、及びSDS-PAGE上での走行の前、煮沸水浴上に配置した。ゲルを、Novex PVDF膜（Invitrogen）にエレクトロトランズファーし、そして標準方法を用いて、クーマシーブルー染色した（Sigma, St. Louis, MO）。対応する抗-EEウェスターんプロットを行い、N-末端タンパク質配列決定のためのzcyt17ligバンドを同定した。使用されるマウス抗-EE IgG HRP接合された抗体を自家製造した。

【0669】

分泌されたマウスzcyt17ligポリペプチドのN-末端配列分析は、マウスzcyt17lig前駆体配列の配列番号11及び91に関して、31 (Ala) での成熟開始をもたらすシグナル配列の予測される分解部位を確認した。

【0670】

例37. COS細胞結合アッセイ

結合アッセイを用いて、zcyt17受容体を含んで成る受容体、例えばzcyt17受容体を含んで成るzcyt17受容体又は受容体ヘテロダイマー及びトリマー（例えば、zcyt17/0SMR, zcyt17/WSX-1, 又はzcyt17/OSMR/WSX-1, 又は他のクラスIサイトカイン受容体サブユニット）へのzcyt17ligの結合を試験した。zcyt17受容体プラスミドDNAを、COS細胞中にトランスフェクトし、そしてトランスフェクトされたCOS細胞を用いて、下記のように、zcyt17受容体を含んで成る受容体へのzcyt17ligの結合を評価した。

【0671】

A. COS細胞トランスフェクション：

COS細胞トランスフェクションを次の通りに行った：次の組合せでの受容体プラスミドDNA800ng: pZp7pX/zcyt17のみ；pZp7pX/WSX-1のみ；pZp7pX/OSMRのみ；pZp7pX/zcyt17+ pZp7pX/OSMR；pZp7pX/zcyt17+ pZp7pX/WSX-1；pZp7pX/OSMR+ pZp7pX/WSX-1；pZp7pX/zcyt17+ pZp7pX/OSMR+ pZp7pX/WSX-1及び80 μlの血清フリーDMEM培地（550mlのDMEM中、55mgのピルビン酸ナトリウム、146mgのL-グルタミン、5mgのトランスフェリン、2.5mgのインスリン、1μgのセレンイウム及び5mgのフェチュイン）中、4μlのリポフェクタミン^Mを混合し、室温で30分間インキュベートし、そして次に、320 μlの血清フリーDMEM培地を添加する。12ウェル組織培養プレート（フィプロネクチン被覆された）上にプレートされた2 × 10⁵個のCOS細胞上に前記混合物400 μlを添加し、そして37℃で5時間インキュベートする。500 μlの20%FBS DMEM培地（500mlのDMEM中、100mlのFBS、55mgのピルビン酸ナトリウム及び146mgのL-グルタミン）を添加し、そして一晩インキュベートする。

【0672】

B. 結合アッセイ：

結合アッセイを次の通りに行った：培地を、PBS + 0.1% BSAによりすすぎ、細胞を除去し、そして次に、細胞を同じ溶液により60分間ブロックした。次に、細胞を、1.0 μg/mlのzcyt17ligCEE精製されたタンパク質と共に、PBS + 0.1% BSAにおいて1時間インキュベートする。次に、細胞を、PBS + 0.1% BSAにより洗浄し、そして1:1000に希釈されたマウス抗-Glu Glu抗体と共に、さらに1時間インキュベートした。再び、細胞を、PBS + 0.1% BSAにより洗浄し、次に1:200に希釈されたヤギ抗-マウス-HRP接合された抗体と共に1時間インキュベートした。

【0673】

陽性結合を、希釈緩衝液（NENキット）により1:50に希釈されたフルオレセインチラミ

10

20

30

40

50

ド試薬により検出し、そして4～6分間インキュベートし、そしPBS+0.1%BSAにより洗浄した。細胞をPBS中、1.8%ホルムアルデヒドにより15分間、固定し、次にPBS+0.1%BSAにより洗浄した。細胞を、PBSにより1：5に希釈されたVectashield Mounting Media (Vedtor Labs Burlingame, CA)により保存した。細胞を、蛍光顕微鏡上でのFITCフィルターを用いて可視化した。

【0674】

陽性結合を、zcyt17のみ、zcyt17+OSMR、zcyt17+WSX-1及びzcyt17+OSMR+WSX-1によりトランスフェクトされた細胞について検出した。結合は、WSX-1+OSMR、OSMRのみ又はWSX-1のみによりトランスフェクトされた細胞については検出されなかった。

【0675】

例38. マウスzcyt17ligはルシフェラーゼアッセイにおいてマウスzcyt17/OSMR受容体を活性化する

A. 十分な長さのマウスzcyt17及びマウスOSMRの発現のためのクローニング：

マウス精巣cDNAライブラリーを、マウスzcyt17の十分な長さのクローンについてスクリーンした。ライブラリーを、65,000cfu/プレートで24LB+Ampプレート上にプレートした。フィルターリフトを、合計約1.6百万のコロニーに対して、Hybond N (Amersham-Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ)を用いて調製した。フィルターを配向について熱針により印を付け、そして次に、0.5MのNaOH及び1.5Mのトリス-HCl、pH7.2において6分間、変性した。次に、フィルターを、1.5MのNaCl及び0.5Mのトリス-HCl、pH7.2において6分間、中和した。DNAを、1200ジユールでのUVクロスリンカー (Stratalinker (商標), Stratagene, La Jolla, CA)を用いてフィルターに固定した。次に、フィルターを、室温で一晩、持ち上げ、乾燥せしめた。

【0676】

次の日、フィルターを、0.25×SSC、0.25%SDS及び1mMのEDTAから成る予備洗浄緩衝液により65℃で予備洗浄した。細胞残骸を、Kimmwipes (商標) (Kimberly-Clark)を用いて手動的に除去し、そして溶液を、1時間にわたって3度、交換した。フィルターを空気乾燥し、そして、必要なまで室温で貯蔵した。次に、フィルターを、20mlのExpressHybTMハイブリダイゼーション溶液 (Clontech, Palo Alto, CA)において約3時間、プレハイブリダイズした。

【0677】

プローブB(例31)を、オリゴヌクレオチドプライマーZC27,895(配列番号20)及びZC28,917(配列番号83)を用いて、ヒトzcyt17鑄型からPCRにより生成し、そして市販のキット (Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を用いて、その製造業者の説明書に従って、³²Pにより放射性ラベルした。プローブを、StratageneTM プッシュカラム (NucTrap (商標) カラム; Stratagene, La Jolla, CA)を用いて精製した。プローブを、100℃で15分間、変性し、そしてExpressHybTMに添加した。フィルターを、1.6×10⁶cpm/mlのプローブを含むハイブリダイズ溶液15mlにおいて、63℃で一晩ハイブリダイズした。

【0678】

フィルターを、2×SSC、0.1%SDS及び1mMのEDTAに85℃で洗浄し、そしてX-線フィルムに-80℃で4.5日間、照射した。13個の陽性体を、プラグとしてプレートから採取し、そして1.7mlの管における31mlのLB+ampに配置した。管を4℃で一晩、維持した。それらの13個の陽性体を、さらに2回精製にゆだねた。第三プレートを37℃で増殖せしめ、この後、フィルターリストを取り、そして単一のコロニーを採取し、そして配列決定に送った。それらのうち3個は、zcyt17のマウスオルト体の配列を含むことが決定された。

【0679】

さらに、PCR生成物を、鑄型としてCTLL-2 cDNA及びプライマーとして、オリゴヌクレオチドZC38,239(配列番号123)及びZC38,245(配列番号124)を用いて生成した。CTLL-2はマウス細胞毒性Tリンパ球細胞系 (ATCC No. TIB-214)である。このPCR反応を次の通りに行った：95℃で1分(1サイクル)、95℃で15秒、68℃で3分、次に68℃で10分(30サイ

10

20

30

40

50

クル)、4 でのソーキング。PCR反応は、約0.5ngのcDNA、20pモルの個々のオリゴヌクレオチド、及び1μlのAdvantage IIポリメラーゼ混合物(Clontech)を使用した。

【0680】

約6%のPCR生成物を、上記のように、新規PCR反応において鑄型として使用し、但しオリゴヌクレオチドZC38,239(配列番号123)及びZC38,238(配列番号125)を除く。このPCR反応を次の通りに行った：94 で45秒、65 で45秒、72 1分、次に72 で7分(30サイクル)；10 でのソーキング。PCR反応のほとんどを、1.0%アガロースゲル上に負荷し、そして約360bpでの有力なバンドを切除し、DNAフラグメントを溶離し、そしてDNA配列決定を行った。

【0681】

マウスzcyt17ポリヌクレオチドの配列を、配列番号126で示し、そしてその対応するアミノ酸配列を配列番号127で示す。さらに、切断された可溶性形のマウスzcyt17ポリヌクレオチドを配列番号128で示し、そしてその反応するアミノ酸配列を配列番号129で示す。

【0682】

十分な長さのマウスOSMR cDNAを得るために、5' 及び3' PCR生成物を単離し、そして内部BamHI部位を用いて連結した。PCRプライマーを、ヌクレオチド配列(配列番号134)を用いて企画し、そしてクローニングのためのEcoRI及びXbaI制限部位を含む。ゲノムマウスOSMR 核酸配列は、配列番号134で示され、ここでコード配列は、配列番号135で示される、970個のアミノ酸ポリペプチドのマウスOSMR をコードする残基780～3692を包含する。配列番号135のポリペプチドをコードする変性核酸配列は、配列番号136で示される。

【0683】

5' PCR生成物を、鑄型として自家3T3-L1(分化されたマウス脂肪細胞)cDNAライブラリー及びプライマーとしてオリゴヌクレオチドZC41,764(配列番号130)及びZC41,598(配列番号131)を用いて生成した。この5' PCR反応を次の通りに行った：95 で45秒、55 で45秒、72 で1.5分、次に72 で7分(30サイクル)；4 でのソーキング。PCR反応は、約3 μgのcDNAライブラリーから調製されたプラスミド、20pモルの個々のオリゴヌクレオチド、及び5単位のPwo DNAポリメラーゼ(Roche)を使用した。約90%の5' PCR生成物を、EcoRI及びBamHIにより消化し、そして1.0%アガロースゲル上でゲル精製した。約1446bpのバンドを切除し、そして連結のために使用した(下記を参照のこと)。

【0684】

3' PCR生成物を、鑄型としてマウス胎盤自家cDNAライブラリー及びプライマーとしてオリゴヌクレオチドZC41,948(配列番号132)及びZC41,766(配列番号133)を用いて生成した。この3' PCR反応を次の通りに行った：95 で45秒、55 で45秒、72 で1.5分、次に72 で7分(30サイクル)；4 でのソーキング。PCR反応は、約3 μgのcDNAライブラリーから調製されたプラスミド、20pモルの個々のオリゴヌクレオチド、及び5単位のPwo DNAポリメラーゼ(Roche)を使用した。約90%の3' PCR生成物を、BamHI及びXbaIにより消化し、そして1.0%アガロースゲル上でゲル精製した。

【0685】

約2200bpのバンドを切除し、そしてEcoRI及びXbaIにより消化された発現ベクターpZP-5Zに、5' PCR生成物(上記に記載される)と共に、連結するために使用した。三部分連結を、上記5' EcoRI～BamHIフラグメント、3' BamHI～XbaIフラグメント、及びEcoRI及びXbaIにより消化された発現ベクターpZP-5Zにより行った。これは、pZP-5Z/OSMR を称する、マウスOSMR のための十分な長さのcDNA(配列番号134のヌクレオチド780～3692)を含むpZP-5Zプラスミドを生成した。pZP-5Z/OSMR における十分な長さのマウスOSMR cDNAは、配列番号135からの2つのアミノ酸挿入体を有する。

【0686】

位置370でのアミノ酸グリシンの重複及び位置526でのアミノ酸グルタミン酸の重複が存在する。プラスミドpZP-5Zは、CMVプロモーター、コード配列の挿入のための複数の制限部位、及びヒト成長ホルモンターミネーターを有する発現カセットを含む哺乳類発現ベク

10

20

30

40

50

ターである。プラスミドはまた、複製のE.コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現ユニット、ゼオシン耐性遺伝子及びSV40ターミネーターを有する。

得られる形質転換体を配列決定し、マウスOSMR cDNA配列を確めた。

【0687】

B. BaF3/KZ134/zcyt17m, BaF3/KZ134/zcyt17m/OSMR m, BHK/KZ134/zcyt17m. 及びBHK/KZ134/zcyt17m/OSMR m細胞系の構成：

安定したBaF3/KZ134及びBHK/KZ134細胞系（例20）を、十分な長さのマウスzcyt17, pZP-7P/zcyt17m（例38A）をコードする発現プラスミドによりトランスフェクトし、それぞれBaF3/KZ134/zcyt17m及びBHK/KZ134/zcyt17mを創造した。次に、マウスOSMR 発現プラスミド、すなわちpZP-5Z/OSMR（例38A）を、それらの細胞中にトランスフェクトし、それぞれBaF3/KZ134/zcyt17m/OSMR m及びBHK/KZ134/zcyt17m/OSMR mを創造した。方法は例4に記載の通りであり、但しBaF3/KZ134/zcyt17m及びBHK/KZ134/zcyt17mを、ゲネチシンの他に、2μg/mlのプロマイシンにより選択し、そしてBaF3/KZ134/zcyt17m/OSMR m及びBHK/KZ134/zcyt17m/OSMR mを、ゲネチシンの他に、2μg/mlのプロマイシン及び200μg/mlのゼオシンにより選択した。

【0688】

クローンを、標準技法を用いて希釈し、プレートし、そして選択した。クローンを、マウスzcyt17ligならし培地又は精製されたマウスzcyt17ligタンパク質（例35）を、インジューサーとして用いて、ルシフェラーゼアッセイ（上記例20を参照のこと）によりスクリーンした。最高のルシフェラーゼ応答（STATルシフェラーゼを通して）及び最低のバックグラウンドを有するクローンを選択した。安定したトランスフェクト細胞系を選択した。

【0689】

C. マウスZcyt17ligはBaF3/KZ134/zcyt17m/OSMR m及びBHK/KZ134/zcyt17m/OSMR mルシフェラーゼアッセイにおいてマウスzcyt17受容体を活性化する：

細胞系を、例20に記載のようにして、ルシフェラーゼアッセイのためにプレートした。BaF3/KZ134/zcyt17m, BaF3/KZ134/zcyt17m/OSMR m, BHK/KZ134/zcyt17m, 及びBHK/KZ134/zcyt17m/OSMR m細胞のSTAT活性を、次のものも用いてアッセイした：（1）ヒトzcyt17ligによりトランスフェクトされたBHK570細胞からのならし培地（例7）、（2）マウスzcyt17ligによりトランスフェクトされたBHK570細胞からのならし培地（例18）、（3）精製されたマウス及びヒトzcyt17lig（例35）、及び（4）培地のみの対照応答を測定するためのmIL-3フリー培地。ルシフェラーゼアッセイを、例20に記載のようにして行った。

【0690】

このアッセイの結果は、BaF3/KZ134/zcyt17m細胞、BHK/KZ134/zcyt17m細胞又はトランスフェクトされていないBaF3/KZ134又はBHK/KZ134対照細胞に比較して、マウスzcyt17ligに対する、BaF3/KZ134/zcyt17m/OSMR m及びBHK/KZ134/zcyt17m/OSMR m細胞のSTATレポーター応答を確かめ、そして前記応答がマウスzcyt17/OSMR 受容体を通して介在することを示す。この結果はまた、ヒトzcyt17ligが、マウス受容体複合体を通してSTATレポーターアッセイを活性化しないことを示す。

【0691】

例39. 流動細胞計測法によるzcyt17及びzcyt17/OSMR に結合するヒトzcyt17リガンド

ヒトzcyt17Lのビオチニル化を次の通りにして行った：5.26mg/mlでのzcyt17（100μl）を、蒸留水に溶解された10mg/mlのEZ-リンクSulfo-NHS-LC-ビオチン（Pierce, Rockford, IL）30μlと共に組合した。この溶液を、室温で30分間、ロッカー上でインキュベートした。ビオチニル化の後、溶液を、Slide-A-Lyzer透析カセットを用いて、PBSにおいて透析した。

【0692】

10

20

30

40

50

異なった受容体組合せへのヒトzcytor17リガンドの結合性質を試験するために、BHK及びBAF3の両細胞を、当業界において良く知られている標準技法を用いて、発現プラスミドによりトランスフェクトした。それらのプラスミド次の組合せで両細胞系中にトランスフェクトした：zcytor17のみ、OSMR のみ、及びzcytor17及びOSMR 両者。トランスフェクションは、上記に詳細されるようにして行われた。トランスフェクトされていないBHK及びBAF3細胞を対照として使用した。

【 0 6 9 3 】

細胞を次の通りにしてFACSにより染色した：2E5細胞を次のいずれかにより染色し：2.0 μ g/ml、100ng/ml、10ng/ml、1.0ng/ml、100pg/ml、10pg/ml、1.0pg/mlのビオチニル化されたzcytor17L、又はFACS緩衝液（PBS + 2%BSA + 2%NHS（Gemini）+ 2%NGS）において氷上で30分間、染色しないで放置した。細胞を洗浄し、そして次に、細胞をFACS緩衝液により1.5回、洗浄し、そしてFACS緩衝液に再懸濁し、そしてCellQuestソフトウェア（Bacton Dickinson, Mountain View, CA）を用いて、BD FACSCaliber上でFACSにより分析した。
10

【 0 6 9 4 】

BHK及びBAF3細胞の両者は、zcytor17リガンドがzcytor17のみ、及びOSMRとの組合しての両者に結合し、そしてzcytor17/OSMR ヘテロダイマーがわずかに強いことを示した。結合は、OSMRのみを発現するいずれの細胞系においても見出されなかった。zcytor17リガンドは、濃度依存性態様で結合した。BHK結合に関する平均蛍光強度（MFI）が、下記表16に示される。

【 0 6 9 5 】

【表16】

表16：

zcytor17 μg/ml	2.0	0.100	0.010	0.001	0.00001	0.000001	0.0
BHK C17+OSMR β	3780	2126	328	53	17	15	14
BHK-C17	3032	1600	244	39	16	15	14
BHK-OSMR β	13	X	X	X	X	X	X
BHK-WT	15	14	13	X	X	X	X

zcytor17 μg/ml	10.0	3.33	1.11	0.37	0.12	0.04	0.00
BAF3-C17+OSMR β	531	508	489	441	364	247	7
BAF3-OSMR β	6	5	5	5	5	5	11
BAF3-WT	13	13	12	12	12	12	13

zcytor17ng/ml	100.0	10.0	1.0	0.0
BAF3-C17	347	72	17	7

【0696】

例40. ヒトZcytor17lig処理された細胞の遺伝子発現アレイ分析

RNAを、ヒトzcytor17lig処理されたA549細胞、zcytor17lig処理されたSK-LU-1細胞、及び処理されていない対照細胞から、Rneasy Midiキット(Aiagen, Valencia, CA)を用い

て、その製造業者の説明書に従って単離した。

【0697】

zcytor17ligにより処理された細胞及びそれぞれの対照細胞の遺伝子発現プロフィールを、 GEArray Q Series cDNA発現アレイ (SuperArrey Inc., Bethesda, MD) を用いて行った。Q Series cDNA発現アレイは、特定の生物学的経路に関連する96までのcDNAフラグメント、又は類似する機能又は構造特性を有する遺伝子を含む。処理された及び対照の細胞のアレイの比較は、特定遺伝子のアップ及びダウンレギュレーションの決定を可能にする。プローブラベリング、ハイブリダイゼーション及び検出を、製造業者の説明書に従って行った。化学ルミネセンスシグナル検出及びデータ獲得は、 Lumi-Imagerワーカステーション (Roche, Indianapolis, IN) 上で行われた。得られるイメージデータを、 ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ) 及びGEArray Analyzer 1.2 (SuperArray Inc., Bethesda, MD) ソフトウェアを用いて分析した。
10

【0698】

ヒトインターロイキン及び受容体QシリーズHS-014Nアレイからの結果の分析は、標準化の後、 zcytor17lig処理されたヒトSK-LU-1細胞におけるIL13RA2の約4.7倍の上昇、及びzcytor17lig処理されたヒトA549細胞におけるIL13RA2の約2.2倍の上昇を示した。

それらの結果は、 zcytor17ligがSK-LU-1及びA549細胞においてIL13RA2を、有意にアップレギュレートすることを示す。それらの両者は、ヒト肺癌に由来する細胞系を確立される (Blobelなど., Virchows Arch B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol., 1984; 45(4): 407-29) 。より特定には、 A549は、ヒト肺上皮細胞系として特徴づけられる (Linなど., J. Pharm. Pharmacol., 2002 Sep; 54(9): 1271-8; Martinezなど., Toxicol. Sci., 2002 Oct; 69(2): 409-23) 。
20

【0699】

インターロイキン-13 (IL-13) 、すなわち活性化されたTリンパ球により分析されるサイトカインは、アレルギー性喘息の抑制、及び気道過応答性、好酸球レклートメント及び粘液過剰生成を包含する喘息の実験モデルへの使用のために必要且つ十分であることを示されている (Wills-Karpなど., Science, 1998; 282: 2258-2261) 。 IL-13の選択的中和は喘息表現型を改善することが示されている (Grunigなど., Science, 1998; 282: 2261-2263) 。 IL-13は、ヒト鼻ポリップ上皮及び培養された鼻上皮におけるムチン遺伝子MUC8発現のアップレギュレーションに関与することもまた報告されている (Kimmなど., Acta Otolaryngol., 2002; Sep; 122(6): 638-643; Seongなど; Acta Otolaryngol., 2002; Jun; 122(4): 401-407) 。 MUC8、すなわち主要気道ムチン糖タンパク質は、ポリップを有する慢性静脈洞炎の粘液過分泌の病因において役割を演じるものとして包含される (Seungなど., Acta Otolaryngol., 2002; Jun; 122(4): 401-407) 。
30

【0700】

機能的に、 IL-13は、インターロイキン-13受容体 - 1鎖 (IL13RA1) 及びIL-4受容体 (IL4RA) から成る受容体複合体を通してシグナル化する (Daines and Hershey, J. Biol. Chem., 2002; 22(12): 10387-10393) 。インターロイキン-13受容体 - 12 (IL13RA2) は高い親和性を伴って、但し単独でIL13を結合することもまた示されている (Daines and Hershey, J. Biol. Chem., 2002; 22(12): 10387-10393) 。しかしながら、この受容体はシグナル化のために必要な細胞質ドメインを欠いており、そして従って、おとりの受容体であると思われる。 IL13RA2は、インターフェロン (IFN) - による細胞処理に従って発現される細胞内貯蔵所及び表面からすばやく移動され得る細胞内分子であることが示されている。 IFN- 処理後の IL13RA2の表面発現は、タンパク質合成に関与せず、そして低められたIL-13シグナル化をもたらす (Daines and Hershey, J. Biol. Chem., 2002; 22(12): 10387-10393) 。
40

【0701】

zcytor17ligについての遺伝子発現アレイ分析の結果は、肺上皮由来の細胞系のzcytor17lig処理がIL13RA2遺伝子発現の有意な上昇をもたらしたことにおいて、 IFN- の作用に対して新規であるzcytor17ligの作用を示す。従って、 zcytor17lig処理が、 IL13RA2発現
50

の長期アップレギュレーション及びIL13のダウンレギュレーションが所望される疾病、例えば喘息、気道機能亢進（AHR）及びムチン調節、例えばポリプを伴う慢性静脈洞炎において有益であることが想定され得る。

【0702】

例41. ネズミzcytor17ligトランスジェニックマウス

zcytor17lig過剰発現を評価するために、次の2種の異なったプロモーターにより駆動される遺伝子のネズミ形を発現するトランスジェニックマウスの複数候補体を生成した：リンパ球 - 特異的プロモーターE μ /Iak及び遍在するプロモーターEF1（例22）。血清タンパク質レベルは、約20~300ng/mlの範囲である。E μ /Ickプロモータは、EF1 - zcytor17ligトランスジェニックマウスにおけるレベルよりも高いレベルの血清のタンパク質を有するマウスを生成した。10

【0703】

zcytor17ligトランスジェニックマウスは、生後4~8週で皮膚表現型を進行せしめた。トランスジェニックマウスの柔毛は、明らかな起毛、及びそれらのマウスの背部、胴部の両側、及びそれらの眼のまわりでの軽い程度~重度の程度の脱毛を伴って、しわくちゃ（ruffled）に成了た。この表現型は、それらの血清に検出できるレベルのzcytor17ligタンパク質を有するマウスに一定して見出された。候補体の中で、E μ /Ick駆動の遺伝子を発現するマウス間での100%の発生率、及びEF1 - zcytor17ligトランスジェニックマウスにおける50%の発生率が注目され、これは、それらの血清において検出される相対レベルのzcytor17ligと十分に相互関係する。20

【0704】

トランスジェニック皮膚は、通常、感染されるようになる（少なくとも、スタフィロコーカス・アウレウスによる）、皮膚の表皮剥離及び損傷を時々、誘発するのに十分な、マウスのひっかき行動により明らかのように、そう痒性であるように思えた。マウスは本来、金属の耳標識により同定されるが、しかしほんどの場合、その耳標識は、マウス自体により強制的に除去された。これはしばしば、外耳への重度の損失をもたらした。それらの傷つけられた耳はしばしば、多くの動物において、それらの耳の後部及び耳の間で進行する、長期継続するプステル及びかさぶた、及び漏出性の拡張創傷の存在下で考えられるように、適切に治療しなかった。トランスジェニックマウスの何匹かはまた、それらの肩及び首上に疥癬性創傷を進行せしめた。皮膚損傷は、動物亜集団において観察され、脱毛がすでに明らかであり、そしてマウスの引っ掻き行動によりしばしば悪化される、皮膚の領域上に一般的に発生する。30

【0705】

同時定量的RT-PCRを、トランスジェニック（但し、非トランスジェニックではない）皮膚サンプルにおけるzcytor17lig RNA転写体を検出するために使用し、そしてE μ /Ickトランスジェニック皮膚は、EF1 - zcytor17ligトランスジェニックマウスからの皮膚よりも一層、zcytor17lig RNAを発現する。zcytor17受容体サブユニット、すなわちzcytor17及びOSM-Rをコードする遺伝子は、非トランスジェニック及びzcytor17litトランスジェニックマウスの両者の皮膚において発現された。

【0706】

流動細胞計測法によるE μ /Ickトランスジェニック候補体の亜集団からのリンパ組織の試験は、それらのマウスの脾臓及びリンパ節における活性化されたT細胞の割合の有意な上昇を示した。分析された4匹のマウスのうち2匹は、たぶん、それらの首上での損傷の存在のために、重度に拡大された頸部リンパ節を有した。トランスジェニックマウスにおける脾臓重量のわずかな上昇、及びその血液において循環する单球及び好中球におけるわずかな上昇が、観察された。試験される種々のサイトカインの上昇も、又はそれらのマウスにおける循環性血清アミロイドAレベルの変化も存在しなかった。トランスジェニックマウスにおける免疫細胞に対する効果は、zcytor17ligの直接的又は関節的結果であるか、又は皮膚損傷の二次効果である。40

【0707】

10

20

30

40

50

組織病理学が、皮膚以外の多くの組織、例えば肝臓、胸腺、脾臓、腎臓及び精巣に対して行われ、そしてそれらの器官に有意な異常性は示されなかった。しかしながら、トランスジェニックの皮膚の分析は、皮膚の源及び位置に依存して高く変化する多くの変更（例えば、正常、無毛又は損傷）を示した。多くの場合、トランスジェニックマウスの耳は、非トランスジェニック対照に比較して、肥厚化された表皮（例えば、約4層対2層）を有し、そしてその下部組織は、時々の好中球を伴って、主に単核である、少数～中位の数の炎症性細胞を含んだ。腹部上の表皮は、トランスジェニック動物において多病巣性のわずかな肥厚部分が出現したが、しかし、下部の皮膚又は皮下部分に炎症性細胞の明らかな上昇は存在しなかった。

【0708】

10

マウスからの皮膚の無毛部分においては、いくらかの残骸を含むが、しかし毛幹を有さない（根から倒れた毛）、膨張した毛包が存在した。損傷された領域においては、表皮の重度の肥厚化（表皮肥厚）、皮膚の表面上での高められたケラチン（角質増殖）、皮膚における種々のサイズ及び有意な数の炎症性細胞の分散した潰瘍（主に好中球、及び種々の数のマクロファージ及びリンパ球）が存在した。皮膚はまた、損傷を縁取る多くの肥満細胞を含んだ。トランスジェニック皮膚の損傷領域における毛幹のいくつかは、活性段階（発育相）にあり、対照的に、“正常な”領域における毛幹の多くは、退縮（退行期）～不活性（休止期）段階にあった。

【0709】

20

*zcytor17lig*トランスジェニックマウスの表現型は、アトピー性皮膚炎（AD）患者、及びADのマウスマルクのその表現型に強く類似する。ADは、ヘルパーT細胞サブセット2（Th2）の過剰活性化されたサイトカインにより特徴づけられる通常の慢性炎症疾患である。*zcytor17lig*は、Th2対Th1細胞により選択的に発現され、これは、この比較にさらなる信用を付与する。ADの正確な病因は未知であるが、複数の因子、例えば過活性Th2免疫応答、自己免疫性、アレルゲン及び遺伝子素因が、包含されて来た。疾病的腫瘍特徴は、乾皮症（皮膚の乾燥）、そう痒（皮膚のかゆみ）、結膜炎、炎症性皮膚損傷、スタフィロコーカス・アウレウス感染、好酸球増加、血清IgE及びIgG1の上昇、及びT細胞、肥満細胞、マクロファージ及び好酸球浸潤による慢性皮膚炎を包含する。S. オウレウスによるコロニー形成又は感染は、ADを悪化し、そしてこの皮膚疾患の慢性度を維持することが認識されている。

30

【0710】

ADはしばしば、喘息及びアレルギー鼻炎を有する患者に見出され、そして時折り、アレルギー性疾患の初期出現である。西欧諸国における人口の約20%が、それらのアレルギー性疾患に悩んでおり、そして発展途上国におけるADの発生率は未知の理由のために上昇している。ADは典型的には、子供において始まり、そして青年を通して成人に存続する。ADに関する現在の処理は、局部コルチコステロイド、経口シクロスボリンA、非コルチコステロイド免疫抑制剤、例えばタクロリマス（tacrolimus）（軟膏形でのFK506）、及びインターフェロン- γ を包含する。ADについての種々の処理にかかわらず、多くの患者の症状は改善されず、又はそれらは医薬への逆の反応を有し、他のより効果的な治療剤についての研究を必要とする。

40

【0711】

*zcytor17lig*のためのヘテロダイマー受容体（*zcytoR17*及び OSM-R ）を発現する上皮細胞は、身体中のアレルゲン侵入の部位（例えば、皮膚、腸、肺、等）で位置し、そして樹状突起細胞（選択的抗原提供細胞）と密着して相互作用する。樹状突起細胞は、アレルギー性疾患の病因において重要な役割を演じ、そして*zcytor17lig*が皮膚及び肺における上皮細胞上のその受容体と相互作用し、そしてそれらの器官における免疫応答に影響を与えることが可能である。従って、*zcytor17lig*及びその受容体は、アレルギー性疾患、例えばAD及び喘息の病因に寄与することができる。さらに、*zcytor17lig*トランスジェニックマウスの表現型は、このリガンドが、マウスはそれらの耳への損傷を修復することができず、そしてしばしば、それらの背部及び側面で長期続く損傷を担持するので、創傷治

50

療において役割を演じることができることを示唆する。従って zcytor17lig のアンタゴニストは、それらの及び他の徵候のための生存性治療剤を提供することができる。

【 0 7 1 2 】

例42. アデノウィルスSTAT/SRE受容体遺伝子による一時的感染を通してのヒト形質転換された上皮細胞系のルシフェラーゼアッセイ

広範囲の種類のヒト形質転換された上皮細胞系（下記表16を参照のこと）を、個々の細胞型について特定されるように、通常の増殖培地に10,000細胞/ウェルで96ウェル平底プレートに接種した。次の日、細胞を、アデノウィルスレポーター構造体KZ136により、500の感染の多重度で感染せしめた。KZ136レポーターは、血清応答要素の他に、STAT要素を含む。合計体積は、2mMのL-グルタミン（GibcoBRL）、1mMのピルビン酸ナトリウム（GibcoBRL）及び1×インスリン・セレニウムサプリメント（GibcoBRL）により補充されたDNE M（この後、血清フリー培地として言及する）を用いて、ウェル当たり100μlであった。細胞は一晩、培養された。

【 0 7 1 3 】

次の日、培地を除去し、そして100μlの誘発培地により交換した。誘発培地は、100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 3.125ng/ml及び1.56ng/mlで、血清フリー培地により希釈されたヒト zcytor17リガンドであった。20% FBSの陽性対照を用いて、アッセイを確認し、そしてアデノウィルスによる感染が成功したことを確かにした。細胞を、5時間、誘発し、この時点で、培地を吸引した。次に、細胞を、50μl/ウェルのPBSにより洗浄し、そして続いて、30μl/ウェルの1×細胞溶解緩衝液（Promega）に溶解した。室温で96-ウェルプレートに移した。次に、プレートを、40μl/ウェルのルシフェラーゼ基質（Promega）の注入を伴って、5秒の調整を用いて、Luminometer上で読み取った。

その結果は、下記表17及び表18に示されるように、 zcytor17リガンドに対する複数の上皮細胞系の応答能力を示した。

【 0 7 1 4 】

【表17】

表17:

細胞種	組織	形態学	疾病	誘発倍率
A549	ヒト 肺	上皮	癌	2×
Sk-Lu-1	ヒト 肺	上皮	腺癌	6×
WI-38	ヒト 胚性肺	線維芽細胞		陰性
MRC-5	ヒト 肺	線維芽細胞		陰性
Du145	ヒト 前立腺	上皮	癌	10×
PA-HPV-7	ヒト 前立腺	上皮	HPVにより形質転換された	5×
PC-3	ヒト 前立腺	上皮	腺癌	陰性
U2OS	ヒト 骨	上皮	骨肉腫	15.5×
SaOS2	ヒト 骨	上皮	骨肉腫	22×
MG-63	ヒト 骨	線維芽細胞	骨肉腫	陰性
143B	ヒト 骨	線維芽細胞	骨肉腫	3.5×
HOS	ヒト 骨	線維芽細胞及び上皮		8×
TRBMeC	ヒト 血管骨髓	上皮		2×
HT144	ヒト 皮膚	線維芽細胞	メラノーマ	5×
C32	ヒト 皮膚		メラノーマ	陰性
Sk-Mel-2	ヒト 皮膚	ポリゴナル	メラノーマ	2.7×
WM-115	ヒト 皮膚	上皮	メラノーマ	2×
HCT-116	ヒト 結腸	上皮	癌	陰性

【0715】

40

【表18】

表18:

細胞	種	組織	形態学	疾病	誘発倍率
HT-29	ヒト	結腸	上皮	癌	陰性
CaCo2	ヒト	結腸	上皮	腺癌	3× 10
HBL-100	ヒト	乳房	上皮		1.5×
ME-180	ヒト	頸部	上皮	癌	陰性
HeLa299	ヒト	頸部	上皮	腺癌	陰性
SK-N-SH	ヒト	脳	上皮	神経芽腫	陰性
U138MG	ヒト	脳	ポリゴナル	グリア芽腫	陰性
HepG2	ヒト	肝臓	上皮	癌	陰性 20
Chang肝臓	ヒト	肝臓	上皮		陰性
Sk-Hep-1	ヒト	肝臓	上皮	腺癌	4×
Int407	ヒト	腸	上皮		陰性
3a-SubE	ヒト	胎盤			陰性

【0716】

30

例43. ヒトzcytor17リガンドと共に培養されたヒト上皮細胞系によるサイトカイン生成

ヒト疾病状態の上皮細胞系（A549、ヒト肺上皮癌；SkLu1、ヒト肺上皮腺癌；DU145、ヒト前立腺上皮癌；PZ-HPV-7、形質転換されたヒト前立腺上皮HPV；U20S、ヒト骨上皮骨肉腫）を、インビトロでのzcytor17リガンドに対する応答において、サイトカイン生成についてスクリーンした。それらの細胞系は、RT-PCRにより同定されるzcytor17及びOSMR-の両者を有し、そしてアデノウィルスシフェラーゼレポーター構造体KZ136（例42）によりアッセイされる場合、ヒトzcytor17リガンドに対して応答する。それらの細胞系によるサイトカイン生成は、一連の3回の実験におけるヒトzcytor17リガンドに応答して決定された。

【0717】

40

A. ヒトzcytor17ligと共に培養されたヒト疾病状態上皮細胞系によるサイトカイン生成：

細胞を、6ウェルプレート（Costar）に、 4.5×10^5 細胞/ウェルの密度でプレートし、そしてそれぞれの成長培地において培養した。細胞を、次の試験試薬と共に培養した：10ng/mlのzcytor17リガンド、10ng/mlのインターフェロン（IFN）（R&D Systems, Minneapolis, MN）、10ng/mlの腫瘍壞死因子（TNF）（R&D Systems, Minneapolis, MN）、10ng/mlのIL-1（R&D Systems, Minneapolis, MN）、又は100μg/mlのリポポリ多糖（LPS）（Sigma）。

【0718】

上清液を、24及び48時間で収穫し、そして次のサイトカインについてアッセイした：GM 50

-CSF(顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子)、IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1(マクロファージ化学誘引タンパク質 - 1)及びTNFa。 BioSource International (Camarillo, CA) 過らの複合抗体ビーズキットを用いて、サンプル中のサイトカインを測定した。アッセイを、Luminex-100装置 (Luminex, Austin, TX) 上で読み取り、そしてデータを、Master Plexソフトウェア (Miraibio, Slamed CA) を用いて分析した。24時間サンプルにおける個々の細胞系についてのサイトカイン生成 (pg/ml) が、下記表19及び表20に示される。

【 0 7 1 9 】

【表19】

表19：

GM-CSF pg/mL:

	A549	SkLu1	Du145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytoker17L	18.80	10.26	16.19	13.26	14.10
IFN-g	16.19	13.36	11.56	16.26	11.81
IL-1b	104.60	126.44	76.77	338.25	27.32
TNFa	106.67	33.20	58.50	107.09	33.79
LPS	17.64	10.62	11.81	25.47	18.34
对照	14.81	8.56	13.26	21.67	13.96

10

IL-1b pg/mL:

	A549	SkLu1	Du145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytoker17L	26.90	30.17	28.77	29.07	28.00
IFN-g	29.07	35.33	21.96	26.90	26.73
IL-1b	1332.88	1256.17	979.02	1107.35	998.60
TNFa	31.11	33.28	35.33	31.24	25.66
LPS	33.28	28.77	29.07	31.11	31.24
对照	28.77	28.77	26.73	31.24	29.07

20

IL-6 pg/mL:

	A549	SkLu1	Du145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytoker17L	20.09	26.89	193.05	19.37	17.30
IFN-g	17.52	33.64	217.58	27.02	17.63
IL-1b	175.44	5920.19	2375.29	304.08	18.44
TNFa	354.16	1002.51	1612.17	103.58	18.33
LPS	18.06	35.65	162.18	22.42	17.30
对照	17.63	27.80	71.23	19.32	17.19

30

40

【0720】

【表20】

表20：

IL-8 pg/mL:

	A549	SkLu1	Du145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	86.33	150.81	150.61	45.92	6.81
IFN-g	24.07	72.82	163.31	81.78	1.35
IL-1b	1726.24	4083.12	4407.79	5308.83	124.17
TNFa	3068.68	3811.75	2539.39	3324.02	69.65
LPS	20.28	167.13	230.39	115.08	7.95
対照	14.92	109.78	107.27	93.44	9.49

10

MCP-1 pg/mL:

	A549	SkLu1	Du145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	8.97	187.29	26.84	105.15	7.20
IFN-g	7.30	267.99	17.05	88.68	7.71
IL-1b	8.11	8039.84	88.78	3723.81	4.70
TNFa	8.50	7100.37	153.26	3826.80	2.80
LPS	9.40	185.83	22.65	61.62	5.61
対照	8.16	167.93	13.68	47.78	5.61

20

TNFa pg/mL:

	A549	SkLu1	Du145	U2OS	PZ-HPV-7
zcytor17L	16.23	17.52	16.67	15.80	17.09
IFN-g	15.80	17.09	15.80	16.65	15.80
IL-1b	16.66	17.09	15.80	17.95	16.23
TNFa	1639.92	1648.83	2975.07	1348.33	3554.82
LPS	16.87	15.80	15.37	17.09	17.52
対照	16.23	15.80	15.80	17.09	16.66

30

【0721】

試験されたすべての細胞系は、対照サイトカインIL-1b及びTNFaによる刺激に応答してGM-CSF及びIL-8を生成した。ほとんどの細胞系は、IL-1b及びTNFa刺激に応答してIL-6及びMCP-1を生成した。zcytor17リガンドは、対照に比較して、DU145細胞系においてIL-6生成を刺激した(193pg/ml対71pg/ml)。zcytor17リガンドは、A549細胞に見られる最大効果(5倍)を伴って、IL-8を生成するために、5種の細胞系のうち3種を刺激し、そしてU2OS細胞においてIL-8生成を2倍、低めた。zcytorリガンドと共に培養される場合

40

、DU145及びU20S細胞によるMCP-1生成に対してわずかな効果が存在した。

【0722】

B. ヒトzcytor17ligと共に培養された正常ヒト上皮細胞系によるサイトカイン生成：

ヒト上皮細胞系の他に、正常ヒト気管支上皮細胞（NHBE, Clonetics）をまた試験した。細胞を、24ウェルプレートに、 1×10^5 細胞/ウェルの密度でプレートし、そして次の試験試薬と共に培養した：1000ng/ml, 100ng/ml及び10ng/mlのzcytor17リガンド（A760F）、10ng/mlのTNFa、10ng/mlのOSM、10ng/mlのIFNa、10ng/mlのTGFb又は10ng/mlのLymphotactin。上清液を、24及び48時間で収穫し、そして次のサイトカインについてアッセイした：IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1a, RANTES及びEotaxin。サイトカインを、前に記載のようにしてアッセイした。48時間サンプルにおける個々の細胞系についてのサイトカイン生成（pg/ml）が、下記表21に示される。

【0723】

【表21】

表21：

IL-6pg/ml :

	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000ng/ml	24.5	56.3	32.1	25.2	64.5
r17IL 100ng/ml	25.0	65.0	31.0	25.4	50.2
r17L 10ng/ml	24.8	51.8	30.2	25.3	54.3
TNF α	272.9	355.4	437.5	36.1	299.3
OSM	26.4	73.5	112.4	25.6	80.4
IFN α	24.6	109.3	33.7	26.4	52.4
TGF β	24.4	102.6	42.7	27.8	268.9
対照	24.5	36.3	29.9	25.2	47.9

10

IL-8pg/ml :

	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000ng/ml	35.0	243.3	45.6	18.6	402.0
r17IL 100ng/ml	31.0	290.7	40.1	21.3	296.0
r17L 10ng/ml	30.4	240.4	33.4	18.9	361.8
TNF α	2809.3	2520.9	1385.2	784.9	1486.3
OSM	37.8	60.6	68.0	22.5	494.6
IFN α	18.9	315.3	39.5	33.1	231.6
TGF β	9.9	77.5	19.6	88.9	246.9
対照	10.9	238.0	38.0	39.7	315.8

20

MCP-1pg/ml :

	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000ng/ml	nd	nd	149.1	81.0	nd
r17IL 100ng/ml	nd	nd	130.6	81.9	nd
r17L 10ng/ml	nd	nd	111.7	49.1	nd
TNF α	nd	22.1	2862.6	1104.7	nd
OSM	nd	17.2	448.2	85.8	nd
IFN α	nd	nd	131.7	10.5	nd
TGF β	nd	1.7	54.5	27.6	nd
対照	nd	nd	113.0	1.7	nd

40

nd = 検出されなかった。

【0724】

DU145細胞は、zcytor17リガンドに応答して、IL-6を生成し、結果は、例43Aを反復した。しかしながら、A549及びU2OSのみは、例43Aに見出されるのと類似するIL-8応答を有した。SkLu1及びU2OS細胞の両者は、zcytor17リガンドに応答して、MCP-1を生成した。NHBE細胞によるサイトカイン生成は、対照に比較して、低かった。

50

【0725】

c. ヒトzcytor17lig及びIFNと共に培養されたヒト疾病状態上皮細胞系によるサイトカイン生成：

細胞を、24ウェルプレートに、 2×10^5 細胞/ウェルの密度でプレートし、そして100ng/ml, 10ng/ml又は1ng/mlで、10ng/mlのIFN + / - zcytor17リガンドと共に同時培養した。上清液を、24及び48時間で集め、そして上記のようにして、IL-8及びMCP-1について分析した。24時間サンプルにおける個々の細胞系についてのサイトカイン生成(pg/ml)が下記表22に示されている。

【0726】

【表22】

10

表22：

				IL-8 pg/ml	MCP-1 pg/ml
A549	10ng/mL	IFNg+100ng/mL	r17L	86.7	nd
	10ng/mL	IFNg+10ng/mL	r17L	75.1	nd
	10ng/mL	IFNg+1ng/mL	r17L	63.6	nd
		10ng/ml	IFNg	35.4	nd
		対照		36.6	nd
DU145	10ng/mL	IFNg+100ng/mL	r17L	102.3	nd
	10ng/mL	IFNg+10ng/mL	r17L	92.9	nd
	10ng/mL	IFNg+1ng/mL	r17L	79.9	nd
		10ng/ml	IFNg	70.7	nd
		対照		79.4	nd
SkLu1	10ng/mL	IFNg+100ng/mL	r17L	152.2	604.9
	10ng/mL	IFNg+10ng/mL	r17L	194.4	870.7
	10ng/mL	IFNg+1ng/mL	r17L	138.7	585.4
		10ng/ml	IFNg	170.8	652.6
		対照		203.0	292.3
U2OS	10ng/mL	IFNg+100ng/mL	r17L	106.8	357.0
	10ng/mL	IFNg+10ng/mL	r17L	108.2	347.7
	10ng/mL	IFNg+1ng/mL	r17L	109.9	293.3
		10ng/ml	IFNg	118.8	159.8
		対照		146.8	7.0

20

30

40

【0727】

A549細胞は、zcytor17リガンドに応答してIL-8を生成したが、しかしながら、IFNの添加を伴って同時培養細胞の効果は存在しなかった。U2OS細胞は、IFNgと共に培養される場合、20倍以上、MCP-1を製造し、そしてIFN + zcytor17リガンドと共に培養される場合、50倍以上、MCP-1を製造した。

【0728】

例44. DU145前立腺上皮細胞における³H-TdR組込みに対するzcytor17lig効果

細胞を、グルタミン、ピルベート、非必須アミノ酸(Life Technologies)及び10%ウシ胎児血清(Hyclone)により補充されたMEM(Life Technologies)増殖培地を含む96-ウェル組織クラスター(Falcon)に、25,000/ウェルの密度で接種した。集密性(24時間

50

後)で、0.1%BSA (Life Technologies)を血清により置換することによって、細胞を、増殖組織培地に交換した。細胞同調を達成するために48時間後、増殖阻止培地を、新鮮な培地により交換した。次に、組換えzcytor17lig (試験試薬)を、種々の濃度 (0.24~60ng/ml)で添加し(下記表16を参照のこと)、基礎DNA複製に対するタンパク質の効果について試験した。いくつかのウェルは、高いレベルのTdR組込みに対するタンパク質の効果を試験するために、zcytor17リガンドの他に、2.5%FBS (Hyclone)を受けた。10%FBS及び20ng/mlの血小板由来の成長因子-BB (PDGF-BB) (R&D)を、正の対照として使用した。

【0729】

zcytor17リガンド及び試験試薬の残りの添加の18時間後、細胞を、250nCi/mlの³H-チミジン (NEN)により4時間パルスした。4時間のパルスに続いて、培地を捨て、そして100μlのトリプシン溶液 (Life Technologies)を、個々のウェルに添加し、細胞を除いた。DU145により組込まれる放射能を、細胞をPackard Filtermate 196細胞ハーベスターにより収穫し、そしてPackard TopCount NXT μプレートシンチレーションカウンターを用いて、組込まれたラベルを計数することによって決定した。

【0730】

下記表23に見出されるように、zcytor17ligは、濃度依存性態様で、静止細胞 (0.1%BSAにおける)におけるチミジン組込みを誘発した。この効果は、使用される最高濃度60ng/mlで、BSA対照の2.5倍に達した。さらに、zcytor17ligのこの効果はまた、基線組込みが2.5%FBS (このシリーズにおいては、10%FBSと同じ能力のミトゲン)の添加により高められる場合、検出できる。従って、それらの結果は、基礎及び刺激された条件の両者下で、zcytor17ligがDU145癌細胞のためのミドゲン因子として作用することができる。

表23は、DU145細胞によるチミジン組込みに対するzcytor17ligの効果を示す。結果はcpm/ウェルで示され、そして数値は、三重反復ウェルの平均±標準偏差である。

【0731】

【表23】

表23:

	0.1%BSA	2.5%FBS
BSA対照	1139±336	4228±600
Zcytor17lig (0.24ng/mL)	1430±136	4894±1037
Zcytor17lig (0.74ng/mL)	1657±32	5038±810
Zcytor17lig (2.22ng/mL)	1646±57	5162±808
Zcytor17lig (6.67ng/mL)	2226±189	6385±1613
Zcytor17lig (20ng/mL)	2168±108	5880±1085
Zcytor17lig (60ng/mL)	2512±111	6165±417
PDGF-BB (20ng/mL)	4094±202	5927±360

10

20

30

40

【0732】

例45.E. コリにおけるhuzcytor17リガンドの発現

A. huzcytor17Lig/MBP-6H融合ポリペプチドを発現する発現ベクターpRPS01の構成:

マルトース結合タンパク質 (MBP) にC-末端で融合されるhuzcytor17ligをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、相同組換えにより構成する。融合ポリペプチドは、本明細書に記載されるhuzcytor17ligに融合される約388個のN-末端アミノ酸MBP部分

50

を含む。huzcytor17lig cDNAのフラグメントを、本明細書に記載のようなPCRを用いて単離する。

【0733】

次の2種のプライマーを、標準のPCR反応におけるzcytor17ligフラグメントの生成に使用する：(1) 1つは、約40bpのベクターフランキング配列及びhuzcytor17ligの約20bpのアミノ末端に対する配列を含み、及び(2)もう1つは、前記フランキングベクター配列に対応する3'末端約40bp及びhuzcytor17ligのカルボキシル末端に応答する配列約25bpを含む。100μlのPCR反応物2μlを、分析するために、1×TBE緩衝液中、1.0%アガロースゲル上で試験し、そして予測される分子量フラグメントが観察された。残るPCR反応物を、第2のPCR管において組合し、そして無水エタノール400μlにより沈殿せしめる。沈殿されたDNAを、下記のようにして、SmaI切断された受容体ベクターpTAP98中の組換えのために使用し、MBP-huzcytor17lig融合体をコードする構造体を生成する。10

【0734】

ベクターpTAP98を、酵母相同組換えを用いて構成する。100ngのEcoRI切断された、pMAL-c2を、1μgのPvuI切断されたpRS316、1μgのリンカーと共に組合し、そして1μgのScaI/EcoRI切断されたpRS316を、PCR反応において組合す。PCR生成物を、100%エタノール沈殿により濃縮する。コンピテント酵母細胞(S.セレビシアエ)株、SF838-9Dを、約1μgの上記huzcytor17lig PCR生成物及び100ngのSmaI消化されたpTAP98ベクターを含む混合物数10μLと共に組合し、そして0.75kV、25μF及びオームでエレクトロポレートした。得られる反応混合物を、URA-Dプレート上にプレートし、そして30でインキュベートした。20

【0735】

約48時間後、單一プレートからUra⁺酵母形質転換体を採取し、DNAを単離し、そしてエレクトロコンピテントE.コリ細胞(例えば、MC1061, Casadabanなど., J. Mol. Biol. 138, 179-207)を形質転換した。得られるE.コリ細胞を、標準方法を用いて、MM/CA+AMP 100mg/lプレート(Pryor and Leiting, Protein Expression and Purification. 10:309-319, 1997)上にプレートする。4個の個々のクローンをプレートから収穫し、そして、100μg/mlのアンピシリンと共に、MM/CA中に、2時間、37で、接種した。その個々の培養物1mlを、1mMのIPTGにより誘発する。30

【0736】

約2~4時間後、個々の誘発された培養物250μlを、酸により洗浄されたガラスビーズ250μ、及び5%ME及び色素を含むThamer緩衝液(8Mの尿酸、100mMトリス、pH7.0, 10%グリセロール、2mMのEDTA, 5%SDS)250μlと共に混合する。サンプルを1分間、振盪し、そして65に10分間、加熱する。その20μlの個々のサンプルを、4%~12%PAGEゲル(NOVEX)上のライン当たりに負荷する。ゲルを、1×MES緩衝液において試験する。陽性クローンを、pRPS01と命名し、そして配列決定分析にゆだねる。30

【0737】

1μlの配列決定DNAを用いて、エレクトロコンピテントE.コリ株MC1061を形質転換する。細胞を、2.0kV, 25μF及び400オームで電気パルスする。エレクトロポレーションに続いて、0.6mlのSOCに救済し、そして100mg/lのアンピシリンを含むLB+Ampプレート上で37で増殖した。4種の培養物を、ITPGにより誘発し、そして上記のようにして、陽性クローンをスクリーンした。陽性クローンを、Huzcytor 17Lig/MBP-6H融合タンパク質のタンパク質の精製のために、標準技法により増殖する。40

【0738】

B. E. コリ発酵からのhuzcytor17Lig/MBP-6Hの精製：

特にことわらない限り、すべての操作は4で行われた。次の方法を、組換えhuzcytor17Lig/MBP-6Hポリペプチドを精製するために使用した。pRPS01構造体を含み、そしてhuzcytor17Lig/MBP-6Hを発現するE.コリ細胞を、標準の分子生物学的方法を用いて構成し、そして50.0g/lのSuperBroth II(12g/lのカゼイン、24g/lの酵母抽出物、11.4g/lのリン酸二カリウム、1.7g/lのリン酸一カリウム; Becton Dickinson, Cockeysville, MD)、550

g/lのグリセロール及び5mI/lの硫酸マグネシウムにおいて培養した。20gの細胞を収穫し、そしてタンパク質精製のために使用した。

【0739】

融解された細胞を、500mIのアミロース平衡化緩衝液(20mMのトリス、100mMのNaCl, pH 8.0)に再懸濁した。-7 ~ -10 の温度設定及び30K PSIを有するFrenck Press細胞分解システム(Constant Systems Ltd., Warwick, UK)を用いて、細胞を溶解した。再懸濁された細胞を、Franch Pressを用いてのサイクリングの前及び後、A₆₀₀読み取りにより破壊について調べた。上清液を、タンパク質精製のために、残核ペレットから収穫した。

【0740】

アミロース樹脂の25mIカラム(New England Biolabs, Beverly, MA)(下記のようにして調製された)を、Bio-Rad, 2.5cm D × 10cm Hのガラスカラムに入れた。カラムを充填し、そして10カラム体積(CV)のアミロース平衡化緩衝液(20mMのトリス、100mMのNaCl、pH8.0)により平衡化した。処理された細胞上清液を、一晩、振り動かしながら、アミロース樹脂にバッチ負荷した。前記樹脂を、Bio-Radカラムに戻し、10CVのアミロース平衡化緩衝液により洗浄し、そして約2CVのアミロース溶出緩衝液(アミロース平衡化緩衝液、10mMのマルトース、Fluka Biochemical, Swizerland)により重力により溶出した。10の5mIの画分を、溶出プロフィールにわたって集め、そして280及び320nmで吸光度についてアッセイした。アミロース樹脂を、1CVの蒸留水、5CVの0.1% (w/v)のSDS(Sigma)、5CVの蒸留水、5CVのアミロース平衡化緩衝液、及び最終的に1CVのアミロース貯蔵緩衝液(アミロース平衡化緩衝液、0.02% (w/v)のアジ化ナトリウム)により再生した。再生された樹脂を4 で貯蔵した。

【0741】

興味ある溶出プロフィール画分をプールし、そして4LのPBS(pH7.4)(Sigma)(4回の交換を伴って)に対して、8時間にわたって、10K透析チャンバー(Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical)において透析し、低分子量汚染物を除去し、緩衝液を交換し、そして脱塩した。透析に続いて、収穫された材料は、精製されたhuzcytor17Lig/MBP-6Hポリペプチドを表した。精製されたhuzcytor17Lig/MBP-6Hポリペプチドをフィルター殺菌し、そして適切な分子量の生成物について、SDS-PAGEクーマシー染色により分析した。huzcytor17Lig/MBP-6Hポリペプチドの濃度を、BCA分析により、1.28mg/mlであるものとして決定した。

【0742】

例46. ヒトzcytor17Ligポリクローナル抗体

A. 調製及び精製:

ポリクローナル抗体を、精製された組換えhuzcytor17L/MBP-6Hポリペプチド(例45)により、2匹の雌New zealand白色ウサギを免疫化することによって、調製する。ウサギは、完全フロイントアジュvant中、精製されたタンパク質200mgの初期腹腔内(IP)注射、続いて、不完全フロイトアジュvant中、精製されたタンパク質100μgの追加免疫IP注射を、3週ごとに与えられる。第2の追加免疫注射(合計3回の注射)の投与後7~10日で、動物は放血され、そして血清が集められる。次に、動物を、追加免疫し、そして3週ごとに放血する。

【0743】

huzcytor17L/MBP-6H特異的ウサギ血清を、CNBr-SEPHAROSE 1g当たり約10mgの非-特異的精製された組換えMBP-融合タンパク質を用いて調製されるCNBr-SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム(Pharmacia LKB)を用いて、抗-MBP抗体を予備吸着した。huzcytor17L/MBP-6H-特異的ポリクローナル抗体を、10mgの特異的抗原精製された組換えタンパク質huzcytor17L/MBP-6Hを用いて調製されたCNBr-SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム(Pharmacia LKB)を用いて、予備吸着されたウサギ血清から親和性精製した。精製に続いて、ポリクローナル抗体を、少なくとも8時間にわたって、抗体体積のPBSにより20回(4回の交換を伴って)、透析した。

【0744】

10

20

30

40

50

ヒトzcytor17-リガンド - 特異的抗体を、抗体標的物として、500ng/mlの精製された組換えタンパク質huzcytor17L/LMBP-6H又はバキュロウイルス発現システムにおいて生成されたhuzcytor17L - CEEを用いて、ELISAにより特徴づけた。ウサギ抗 - huzcytor17L/LMBP-6H親和性精製された抗体の検出の下限 (LLD) は、その特異的精製された組換え組換え抗原huzcytor17L/LMBP-6Hに基づいて100pg/mlであり、そしてバキュロウイルス発現システムにおいて生成された、精製された組換えhuzcytor17L - CEEに基づいて500pg/mlである。

【0745】

B. ウサギ抗 - ヒトZcytoR17lig MBP - 6 H抗体のSDS - PAGE及びウェスターんプロット：

ウサギ抗 - ヒトZcytoR17lig MBP - 6 H抗体を、クーマシー染色方法を用いてのSDS - PAGE (Nupage4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA) 及びヤギ抗 - IgG - HRPを用いてのウェスターんプロットにより試験した。ヒト及びマウスzcytor17lig精製されたタンパク質 (200~25ng) を、Invitrogen Novex's Xcell II mini-cellを用いて電気泳動し、そして装置のマニュアルに提供される指針に従って、Novex's Xcell IIプロットモデルを用いて室温でニトロセルロース (0.2mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) に、攪拌しながらトランスファーした。トランスファーを、25mMのトリス塩基、200mMのグリシン及び20%メタノールを含む緩衝液において、300mAで1時間、行った。

【0746】

次に、フィルターを、Western A緩衝液(50mMのトリス、pH7.4、5mMのEDTA、pH8.0、0.05%のIgepal CA-630、150mMのNaCl及び0.25%のゼラチン)により、4度で一晩、軽く振り動かしながらブロックした。ニトロセルロースをすばやくすすぎ、次にウサギ抗 - ヒトzcytoR17lig MBP - 6 H (1:1000)を、Western A緩衝液に添加した。プロットを、軽く振盪しながら、室温で1.5時間、室温でインキュベートした。プロットを、Western Aによりそれぞれ5分間、3度すすぎ、次に、ヤギ抗 - ウサギIgG HRP抗体 (1:5000)を、Western A緩衝液に添加した。プロットを、軽く振り動かしながら、室温で1時間インキュベートした。プロットを、Western Aによりそれぞれ5分間、3度すすぎ、次に水によりすばやく、すすぐ。プロットを市販の化学ルミネセント基質試薬 (1:1に混合されたEC-LWesternプロット検出試薬1及び2: Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, Englandから得られた試薬) を用いて展開し、そしてプロットをX-線フィルムに5分までの間、照射した。

【0747】

精製されたヒトzcytor17ligは、約30kDaで大きなバンドとして、及び還元された条件下で約20kDaで小さなバンドとして出現した。マウスzcytor17ligは、ウサギ抗 - ヒトzcytor17lig抗体により検出されなかった。

【0748】

例47. 形質転換された骨髄内皮細胞 (TRBMEC) 単層へのU937単離付着に対するZcytor17ligの効果

形質転換された骨髄内皮細胞 (TRBMEC) を、Microvascular Growth Supplement (MVGS) (Cascade Biologics) により補充された培地M131 (Cascade Biologics) を含む96ウェル組織クラスター (Falcon) に、25,000/ウェルの密度で接種した。集密性 (24時間後) で、細胞を、1%胎児ウシ血清 (Hyclone) により補充されたM199 (Gibco-Life Technologies) に交換した。ヒト組換えzcytor17lig (試験試薬) を、付着をもたらす免疫細胞 - 内皮細胞相互作用に対するタンパク質の効果について試験するために、種々の濃度 (0.4~10ng/ml) で添加した。

【0749】

いくつかのウェルは、炎症条件下で内皮細胞に対するタンパク質の効果を試験するため、zcytor17ligの他に、0.3ng/mlの腫瘍壊死因子 (TNF R&D Systems)、すなわち既知の前炎症性サイトカインを受けた。0.3ng/mlでのTNF 効果の約70%を表し、すなわちそれは内皮へのU937細胞 (ヒト単離 - 様細胞系) の最大付着を誘発しない。この理由のために、この設定は、TNF 効果のアップレギュレーション及びダウンレギュレーションの両者を検出できる。TNF を伴って及びそれを伴わないでの付着の基礎レベルを、試験試薬

10

20

30

40

50

の効果を評価するために基線として使用した。

【0750】

試験試薬 (zcytor17リガンド ± TNF) と共に内皮細胞を一晩インキュベートした後、
5 μMのCalcein-AM蛍光マーカー (Molecular Probes) により染色されたU937細胞を、1
% FBSにより補充されたRPMI 1640 (フェノール・レッドを有さない)に懸濁し、そしてす
すがれたTRBMEC単層上に100,000細胞/ウェルでプレートした。485/538nmの励起/発光波長
での蛍光レベル (Molecular Devicesマイクロプレートリーダー、CytoFluor Application
) を、非付着性U937を除去するために、温RPMI1640 (フェノール・レッドを有さない)により3
度、十分にすすぐ前、及びすすいだ後、30分後に測定した。前 - すぎ (合計) 及び後 -
すぎ (付着特異的) 蛍光レベルを用いて、%付着性 (正味付着/正味合計 × 100 = %付着
性) を決定した。
10

【0751】

下記表24に見出されるように、zcytor17ligは、単独で添加される場合、使用される濃
度範囲で内皮単層へのU937細胞の基礎付着性に影響を及ぼした (2倍以下の上昇、ANOVA
試験によりp<0.01)。単独で、陽性クロン、すなわち0.3ng/mlのTNFは、U937細胞の付
着性を、基礎5.8%から35% (6倍) に高めた。TNFの存在下で、zcytor17ligはTNFの
活性を助け、そしてさらに、0.4~10ng/mlの濃度 - 依存性態様でU937付着性を増強する
(ANOVA試験によりp<0.01)。10ng/mlで、zcytor17ligは、TNFの効果を62%増強した。そ
れらの結果は、zcytor17ligが単独で前炎症剤であり得ることを示す。zcytor17ligは、内
皮細胞への単球付着を高めるために、亞最大濃度のTNFの活性を助けることができる。
20

【0752】

それらの結果はまた、内皮細胞が、特に、前炎症性サイトカイン、例えばTNFに暴露
される場合、zcytor17lig作用の標的組織であることを示す。内皮細胞に対するzcytor17
リガンドの効果は、前炎症性活性の部分への単球又はマクロファージ付着を強化すること
であり得る。活性化された単球及びマクロファージは、多くの炎症性疾患において重要で
ある。従って、単球/マクロファージ付着の阻害は、zcytor17リガンドアンタゴニストの
ための基本原理を提供することができる。このデータは、肺疾患、血管疾患、自己免疫、
腫瘍転移、アレルギー性反応を包含する疾病、接触、アレルギー性又は非アレルギー性皮
膚炎又は乾癬を包含する皮膚の創傷治療及び疾患、及び炎症性陽疾患を処理するためへの
zcytor17リガンドアンタゴニストの使用を支持する。表24は、TRBMEC内皮単層へのU937単
球付着に対するzcytor17ligの効果を示す。結果は、%付着率で表され、そして数値は三
重反復ウェルの平均 ± 平均標準偏差である。
30

【0753】

【表24】

表24:

	基礎	0.3ng/mL TNF α
基礎	5.8±1.2	35±5.5
zcytor17lig 0.4ng/mL	9±0.7	44.7±2.5
zcytor17lig 1.1ng/mL	10.4±0.8	45.2±0.6
zcytor17lig 3.3ng/mL	7.9±1.7	51.1±4
zcytor17lig 10ng/mL	9.5±0.5	56.6±3.9

【0754】

前述から、本発明の特定の態様が例示の目的のために本明細書において記載されて来た
50

が、種々の修飾が本発明の範囲内で行われ得ることが理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0755】

【図1】図1は、ヒトzcytor17lig(配列番号2)(zcytor17lig)及びマウスzcytor17lig(配列番号11)(mzcytor17lig)、マウスIL-3(mIL-3)(配列番号100)、及びヒトIL-3(hIL-3)(配列番号102)の複数一列整列の例示である。

【図2】図2は、ヒトzcytor17lig(配列番号2)(zcytor17lig)及びマウスzcytor17lig(配列番号11)(mzcytor17lig)の複数一列整列の例示である。

【図3】図3は、ヒトzcytor17lig(配列番号2)のHopp/Woods親水性プロットである。

【図4】図4は、zcytor17ポリヌクレオチド配列(配列番号109, 113, 5, 111及び115)の複数一列整列である。

【図5】図5は、ヒトzcytor17(ZCYTOR)(配列番号5)及びマウスzcytor17(M17R-0)(配列番号117)の一列整列である。それらの2種の配列間で、同一の残基(：)、保存された残基(.)及びギャップ(-)が示される。

【図1】

1 zcytor17lig	1	15 16	30 31	45	
2 mzcytor17lig	---	ASHTLPPVRLRP SDDVKIVEELOSLS KMILLKD--VEEKGV	40		
2 mzcytor17lig	---	ATCSLSFGAPIS KEDLRTTIDLLKGES QDLYNNYSIKQASGM	42		
3 mIL-3	---	ATSGROTHRLTRTL NCS-SIVKEIJIGKL--PEP---ELKT--	35		
4 hIL-3	APMTQTTPPLTSW-V	NCS-NMIDEIJITHLK QPPLP--LLDFNMLN	41		
1 zcytor17lig	46	60 61	75 76	90	
1 zcytor17lig	LVSQNYTLPCLSPDA OPPNNIHSPAIRAYL KTIROLDNKSVIDEI	85			
2 mzcytor17lig	SADES1QLPCFSLDR EALTNISVIIAHLEK YKVLSF-NTYDTSW	86			
3 mIL-3	DDEGPSSLRNS-----FRRVNLSKFV ESQGEVOPEDRYVIK	71			
4 hIL-3	GEDQDILMENN-----LRRPNLFAN RAVKSL-.QNASAIE	75			
1 zcytor17lig	91	105 106	120 121	135	
1 zcytor17lig	IEHLDKLIFODAPEI NISVPTDTHE---CK RFILITISQQFSECD	127			
2 mzcytor17lig	IRWLTNISCFNPNLN NISVPGNITDESYDCK VFVLTVLKOFSCMA	131			
3 mIL-3	SNLQLKNCLPLTSAN DSALPGVFIIRDQ- DFRKKLRFYMH-LN	113			
4 hIL-3	SILKNLLCPLPLATA APTRHPIHKDGDN EFRRKLTFY---LK	116			
1 zcytor17lig	136	150 151	165 166	180	
1 zcytor17lig	LALKSLTSGAQOATT	142			
2 mzcytor17lig	ELOAKONTTC	141			
3 mIL-3	OLETVLTSRPPQPS GSVPSPNRGTVEC	140			
4 hIL-3	TLENA----QAQOTT LSLAIF	133			

【図2】

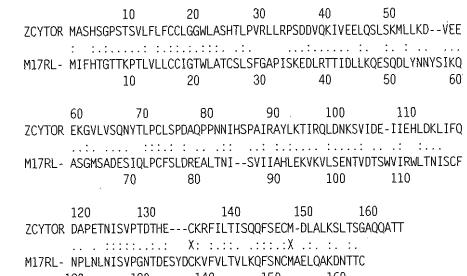


FIG. 2

FIG. 1

【図3A】

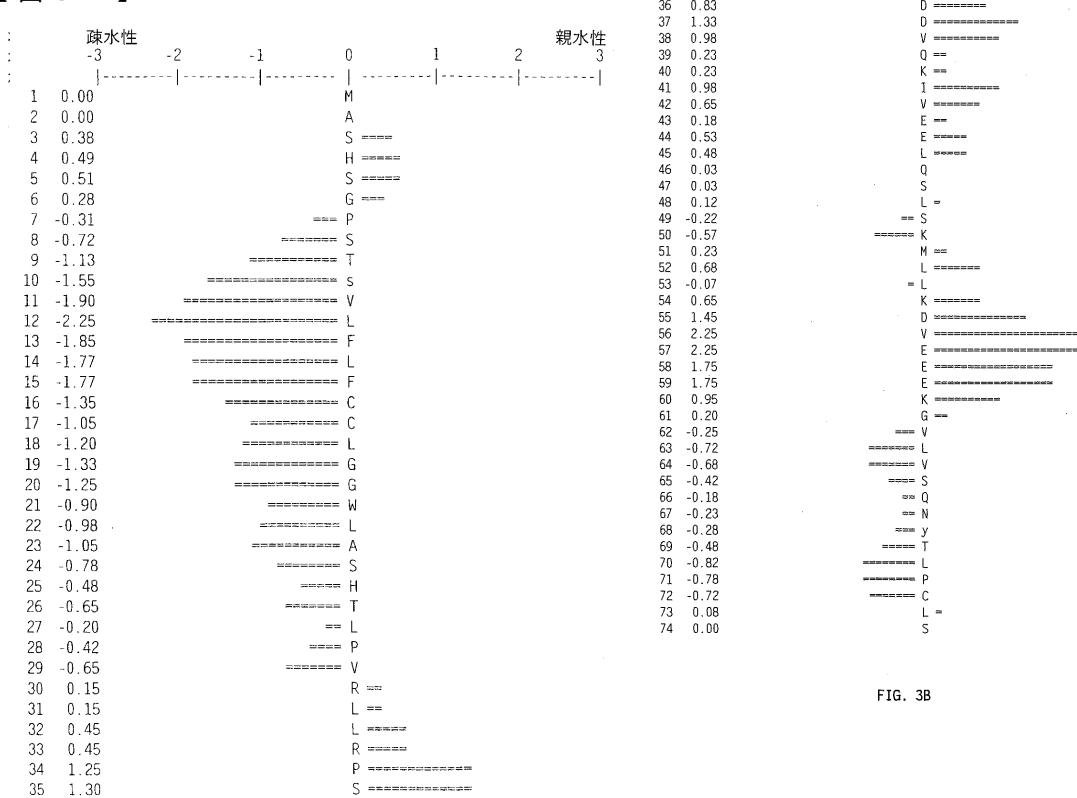
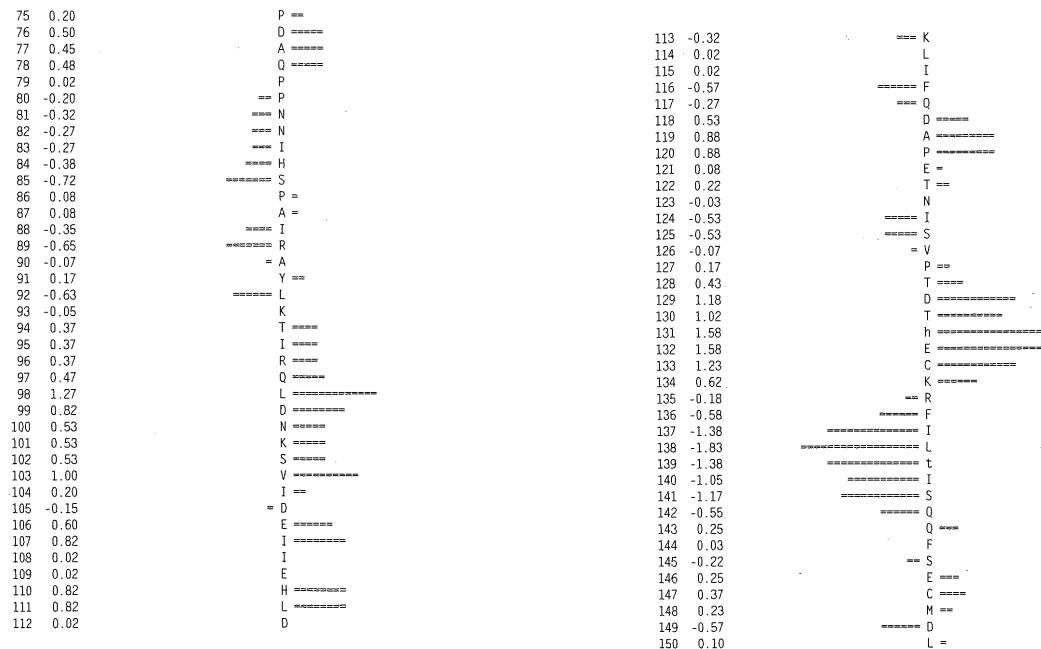


FIG. 3A

FIG. 3B



【図3E】

151	0.37	A	====
152	-0.43	==== L	
153	-0.20	== K	
154	-0.68	===== S	
155	-0.38	==== L	
156	-0.97	===== T	
157	-0.87	===== s	
158	-0.43	==== G	
159	-0.33	==== A	
160	0.28	Q	====
161	0.32	Q	====
162	0.52	A	=====
163	0.00	T	
164	0.00	T	
165	0.00		
:		----- ----- ----- ----- ----- -----	
:		-3 -2 -1 0 1 2 3	親水性

FIG. 3E

【図4A】

1
配列番号:109 MMWYWALWML PSLCKFSLAA LPAPENISC VYYYRKNLTC TWSPGKETSY
配列番号:113 MMWYWALWML PSLCKFSLAA LPAPENISC VYYYRKNLTC TWSPGKETSY
配列番号:111 MMWYWALWML PSLCKFSLAA LPAPENISC VYYYRKNLTC TWSPGKETSY
配列番号:115 MMWYWALWML PSLCKFSLAA LPAPENISC VYYYRKNLTC TWSPGKETSY

51
配列番号:109 TQYTVKRKYA FGEKHDNCTT NSSTSENRA CSFFLPRITI PDNYTIEVEA
配列番号:113 TQYTVKRKYA FGEKHDNCTT NSSTSENRA CSFFLPRITI PDNYTIEVEA
配列番号:111 TQYTVKRKYA FGEKHDNCTT NSSTSENRA CSFFLPRITI PDNYTIEVEA
配列番号:115 TQYTVKRKYA FGEKHDNCTT NSSTSENRA CSFFLPRITI PDNYTIEVEA

101
配列番号:109 ENGDGVIKSH MTYWRLENIA KTEPPKIFRV KPVLGIKRMI QIEWIKPELA
配列番号:113 ENGDGVIKSH MTYWRLENIA KTEPPKIFRV KPVLGIKRMI QIEWIKPELA
配列番号:111 ENGDGVIKSH MTYWRLENIA KTEPPKIFRV KPVLGIKRMI QIEWIKPELA
配列番号:115 ENGDGVIKSH MTYWRLENIA KTEPPKIFRV KPVLGIKRMI QIEWIKPELA

150
配列番号:109 PVSSDLKYTL RFRFTVNSTSW MEVNFAKNRK DKNQTYNLTG LQPFTYEVIA
配列番号:113 PVSSDLKYTL RFRFTVNSTSW MEVNFAKNRK DKNQTYNLTG LQPFTYEVIA
配列番号:111 PVSSDLKYTL RFRFTVNSTSW MEVNFAKNRK DKNQTYNLTG LQPFTYEVIA
配列番号:115 PVSSDLKYTL RFRFTVNSTSW MEVNFAKNRK DKNQTYNLTG LQPFTYEVIA

200
配列番号:109 LRCAVKESKF WSDWSQEKG MTEEEAPCGL ELWRLVKPAA ADGRRPVRLL
配列番号:113 LRCAVKESKF WSDWSQEKG MTEEEAPCGL ELWRLVKPAA ADGRRPVRLL
配列番号:111 LRCAVKESKF WSDWSQEKG MTEEEAPCGL ELWRLVKPAA ADGRRPVRLL
配列番号:115 LRCAVKESKF WSDWSQEKG MTEEEGKL.L PAIPVLSALV

250
配列番号:109 WKKARGAPVL EKTLGYNIWY YPESNTNLTE TMNTTNOQUE LHLGESFWV
配列番号:113 WKKARGAPVL EKTLGYNIWY YPESNTNLTE TMNTTNOQUE LHLGESFWV
配列番号:111 WKKARGAPVL EKTLGYNIWY YPESNTNLTE TMNTTNOQUE LHLGESFWV
配列番号:115

300
配列番号:109 SMISYNSLGK SPVATLRIPA IQEKSFCOCIE VMQACVAEDQ LVVKWQSSAL
配列番号:113 SMISYNSLGK SPVATLRIPA IQEKSFCOCIE VMQACVAEDQ LVVKWQSSAL
配列番号:111 SMISYNSLGK SPVATLRIPA IQEKSFCOCIE VMQACVAEDQ LVVKWQSSAL
配列番号:115

350
配列番号:109
配列番号:113
配列番号:111
配列番号:115

FIG. 4A

【図4B】

351	400
配列番号:109 DVNTWMIEWF PDVDSEPTTL SWESVSQATN WT1QQDKLKP FWCYNISVYP	
配列番号:113	
配列番号:111 DVNTWMIEWF PDVDSEPTTL SWESVSQATN WT1QQDKLKP FWCYNISVYP	
配列番号:115	
401	450
配列番号:109 MLHDKVGEPY SIQAYAKEGV PSEGPETKVE NIGVKTVTIT WKEIPKSERK	
配列番号:113	
配列番号:111 MLHDKVGEPY SIQAYAKEGV PSEGPETKVE NIGVKTVTIT WKEIPKSERK	
配列番号:115	
451	500
配列番号:109 GIICNYTIFY QAEGGKGFSK TVNSSILQYG LESLKRKTSY IVQVMASTSA	
配列番号:113	
配列番号:111 GIICNYTIFY QAEGGKGFSK TVNSSILQYG LESLKRKTSY IVQVMASTSA	
配列番号:115	
501	550
配列番号:109 GTGNTGSINF KTLSFSVFEI ILITSLIGGG LLLILILTV A YGLKKPNKLT	
配列番号:113	
配列番号:111 GTGNTGSINF KTLSFSVFEI ILITSLIGGG LLLILILTV A YGLKKPNKLT	
配列番号:115	
551	600
配列番号:109 HLCWPPTVPNP AESSIONTWIG DDFKDQLNLK ESDDSVNTED RILKPCSTPS	
配列番号:113	
配列番号:111 HLCWPPTVPNP AESSIONTWIG DDFKDQLNLK ESDDSVNTED RILKPCSTPS	
配列番号:115	
601	650
配列番号:109 DKLVIDKLVV NFGNVLQEIF TDEARTGQEN NLGGEKNGTR ILSSCPTSI-	
配列番号:113	
配列番号:111 DKLVIDKLVV NFGNVLQEIF TDEARTGQEN NLGGEKNGYV TCPFRPDCL	
配列番号:115	
651	700
配列番号:109	
配列番号:113	
配列番号:111 GKSFEELPVS PEIPPRRSQY LSRSMPEGTR PEAKEQLLFS GOSLVPDHL	
配列番号:115	

FIG. 4B

【図4C】

701	733
配列番号:109	
配列番号:113	
配列番号:111 EEGAPNPYLK NSVTAREFLV SEKLPEHTKG EV-	
配列番号:115	

FIG. 4C

10 20 30 40
 ZCYTOR MKLSPQSCVNLGMWWTALWMLPSLCKFSLAALPAKENISCVYYY
 M17R-O MLSSOKGCSQEPGAHNPQLGVNAGIMWTLAWAFSFLCKFSLAVLPTKOPENISCVYF
 10 20 30 40 50 60
 50 60 70 80 90 100
 ZCYTOR RKNLTCWSPGKETSYTQTVKRTYAFGEKHNCTNTNSSENPRACSFPLPRITIPDNY
 M17R-O DRNLTCWPRPEKETNDTYSIVTYLTSYKG-----SNVSONATEASYSFPRSCAMPDIC
 70 80 90 100 110
 110 120 130 140 150 160
 ZCYTOR TIEVEAENGDDGVIKSHMTWRLENIAKTEPKIFRKVKPVLGIRKRMIOIEWKPELAPVSS
 M17R-O SVEVOAQNGDGKVKSDTYWHLISTAKTEPIIILSVNPICN--RMFOIQW-KPREKTRGF
 120 130 140 150 160 170
 170 180 190 200 210 220
 ZCYTOR DLKYTLRFRTVNSTSWMEVNFAKNRKDKNOTYNLTGLOPFTEVIALRCAVESKFWSW
 M17R-O PLVCLMRFRTVNSSRWTEVNF-ENCK--QVCNLTLQAFTEVLAURFRFINDSRYWSK
 180 190 200 210 220
 230 240 250 260 270 280
 ZCYTOR SOEKMGTEEEAPCGLELRVLPKAEGDRPRVRLLWKARGAPVLEKTLGYNIWYPES
 M17R-O SKEETRVNTEEVPHVLDLWRILEPADMNGDKVRLLWKARGAPVLEKTFGYNHQYAF
 230 240 250 260 270 280
 290 300 310 320 330 340
 ZCYTOR NTNLTEHTNTNQELHLGGESFWMSMISYNSLGKSPVATLRIPADEKSFCEWMO
 M17R-O STNLTEINNITQQYELLUMSQAHVSIVTSFNLSLGSQETILRIPDHEKTOYIKSMQA
 290 300 310 320 330 340
 350 360 370 380 390 400
 ZCYTOR CVAEDOLVVKHOSSALDNTWMIENIFPDVD-SEPTTLSWESVSOATNWITIQQDKLKPFMC
 M17R-O YIAEPLLVNVNMOSSIPAVDTWIVEWLPEAAWSKFPALSWEVSQVTWITIQQDKLKPF
 350 360 370 380 390 400

410 420 430 440 450 460
 ZCYTOR YNISVYPMILHKVGEPEPSIQAYAKEGVPSSEGPPETKVENIGVKTITWKEIPKSERKGII
 M17R-O YNISVYPMILHKVGEPEPSIQAYAKEGTPLKGPETRVENIGLRTATITWKEIPKSARNGFI
 410 420 430 440 450 460
 470 480 490 500 510 520
 ZCYTOR CNYTIFYQAEKGKGFSKTVNSLILQYGLLESLRKRTSYIVOMASTSAGGTGTSINFKTL
 M17R-O NNYTVFYQAEKGKELSKTVNSHALOCLESLTTRTSYTVVMASTRAGGTGVRINFKTL
 470 480 490 500 510 520
 530 540 550 560 570 580
 ZCYTOR SFVSEIILITSLIGGGLLILILTAVGLKKPKNLTHLCMPVNPNAESSLATWHDGF
 M17R-O SISVFEIVLLTSLVGGGLLSSIKTVFGLRKPNRLTPLCCPVNPNAESSLATWLGDF
 530 540 550 560 570 580
 590 600 610 620 630 640
 ZCYTOR DKDLNLKESDOSVNTEDRILKPCSTPSDKLVTDOKLVVNFGNVLQEIFTDEARTGOENNLG
 M17R-O K-KSNMKETGNSGNTEDVVLKPCPVPADE-LDOKLVVNENFLEVLTTEEAGKGOASILG
 590 600 610 620 630 640
 650 660
 ZCYTOR GEKNGTRILLSSCPTSI
 M17R-O GEAN-EYILSQEPSCPGHC
 650 660

Fig 5B

【配列表】

2006500919000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/01983
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/16, 38/17; C07K 14/705, 14/715, 16/28; C12N 5/10, 15/12 US CL : 530/350, 387.1, 387.9, 536/23.1, 23.5; 435/69.1, 320.1, 325, 471, 71.1, 71.2, 7.1; 514/2; According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350, 387.1, 387.9, 536/23.1, 23.5; 435/69.1, 320.1, 325, 471, 71.1, 71.2, 7.1; 514/2;		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched none		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/75314 A1 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.).	1-88
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 06 May 2004 (06.05.2004)	Date of mailing of the international search report 18 MAR 2005	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer <i>John L. Shalala Jr.</i> Prema Mertz Telephone No. (571) 272-0876	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/01983

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
CAS ONLINE, MEDLINE, CAPLUS, USPATFULL
search terms: zcytor17 multimers, polynucleotides,DNA, nucleic acid, recombinant, antibody, treat, administer, therapy, detect, assay

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 39/02 (2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 14/715	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 15/00	C

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

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 シュプレッヒャー,シンディ エー.

アメリカ合衆国,アリゾナ 85624,パタゴニア,ブルー ヘブン ロード 150,ピオ
ー ボックス 292

(72)発明者 ガオ,ゼレン

アメリカ合衆国,ワシントン 98053,レッドモンド,トゥーハンドレッドアンドトゥエンテ
イーナインス レーン ノース イースト 9816

(72)発明者 クイパー,ジョセフ エル.

アメリカ合衆国,ワシントン 98028,ケンモア,ノースイースト ワンハンドレッドアンド
ナインティセカンド ブレイスス 6524

(72)発明者 ダソビッチ,マリア エム.

アメリカ合衆国,ワシントン 98144,シアトル,トウェンティーファースト アベニュー サ
ウス 2517

(72)発明者 グラント,フランシス ジェイ.

アメリカ合衆国，ワシントン 98115，シアトル サーティーセブンス アベニュー ノースイースト 7714

(72)発明者 プレスネル，スコット アール．

アメリカ合衆国，ワシントン 98407，タコマ，ノース ピュージェット サウンド アベニュ 2902

(72)発明者 ウィトモア，セオドア イー．

アメリカ合衆国，ワシントン 98052，レットモンド，ワンハンドレッドアンドフィフティーセカンド アベニュー ノースイースト 6916

(72)発明者 ハモンド，アンジェラ ケー．

アメリカ合衆国，ワシントン 98033，カーカランド，ノースイースト ワンハンドレッドアンドイレブンス プレイスス 13123

(72)発明者 ノバック，ジュリア イー．

アメリカ合衆国，ワシントン 98392，スクアミッシュ，アンジェリン アベニュー 18892

(72)発明者 グロス，ジェーン エー．

アメリカ合衆国，ワシントン 98115，シアトル，ノースイースト セブンティーフォースストリート 4258

(72)発明者 ディロン，ステイシー アール．

アメリカ合衆国，ワシントン 98115，シアトル，トゥエンティーエイス アベニュー ノースイースト 8057

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA61 BA63 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11
EA04 GA03 GA11 HA11
4B063 QA19 QQ08 QQ79 QR77
4B064 AG20 AG26 AG27 CA01 CA19 CA20 CC24 CE06 CE07 CE10
DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA31 BA38 CA18 CA53 DA45
NA14 ZA59 ZA66 ZA67 ZA81 ZA89 ZA96 ZB02 ZB08 ZB11
ZB13 ZB21 ZB26 ZB32 ZB35 ZC37 ZC42
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA51 DA75 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74 GA21 GA22

专利名称(译)	细胞因子受体zcytor17多聚体		
公开(公告)号	JP2006500919A	公开(公告)日	2006-01-12
申请号	JP2004517500	申请日	2003-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	津莫吉尼蒂克斯公司		
申请(专利权)人(译)	ZymoGenetics公司，股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	シュプレッヒヤーシンディエー ガオゼレン クイパージョセフエル ダソビッチマリアエム グラントフランシスジェイ プレスネルスコットアール ウィトモアセオドアイ ハモンドアンジェラケー ノバックジュリアイー ^{ノバック} グロスジェーンエー ^{グロス} ディロンステイシーアール ^{ディロン}		
发明人	シュプレッヒヤー,シンディ エー. ガオ,ゼレン クイパー,ジョセフ エル. ダソビッチ,マリア エム. グラント,フランシス ジェイ. プレスネル,スコット アール. ウィトモア,セオドア イー. ハモンド,アンジェラ ケー. ノバック,ジュリア イー. グロス,ジェーン エー. ディロン,ステイシー アール.		
IPC分类号	C12N15/09 A61P1/02 A61P1/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P15/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/02 A61P43/00 C07K14/715 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/53 A61K38/00 C12N5/10 C12N15/02 C07K14/52		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/08 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/02 A61P43/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/02 A61P43/00 C07K14/52 C07K14/715 C07K16/2866 C07K2317/24 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P1/02 A61P1/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P15/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/02 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/715 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/53.D A61K37/02 C12N5/00.A C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR77 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE06 4B064/CE07 4B064/CE10 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA31 4C084/BA38 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DA45 4C084/NA14 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA67		

4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB02 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084
/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZB32 4C084/ZB35 4C084/ZC37 4C084/ZC42 4H045/AA10 4H045/AA11
4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045
/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA21 4H045/GA22

代理人(译)	青木 笃 石田 敬 西山雅也
优先权	60/350325 2002-01-18 US 60/389108 2002-06-14 US 60/435361 2002-12-19 US
其他公开文献	JP4511349B2 JP2006500919A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

含有zcytorl7的多聚体或异二聚体细胞因子受体，可用作新型细胞因子拮抗剂，用于检测在体外和体内刺激造血，淋巴和骨髓细胞增殖和/或生长的配体的方法，公开了编码所述多肽的多核苷酸，以及相关的组合物和方法。本发明还包括制备所述多聚体或异二聚体细胞因子受体的方法，所述受体的用途和针对所述受体的抗体。

表1：

	ヘリックスA	ヘリックスB	ヘリックスC	ヘリックスD	
zcytorl7 lig	38-52	83-98	104-117	137-152	配列番号2の
IL-3	35-45	73-86	91-103	123-141	配列番号102の
IL-2	27-48	73-92	102-116	134-149	配列番号177の、又は配列番号183に記載されるようなヘリックスB
IL-4	30-42	65-83	94-118	133-151	配列番号179の
GM-CSF	30-44	72-81	85-103	120-131	配列番号181の