

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 501033

(P2003 - 501033A)

(43)公表日 平成15年1月14日 (2003.1.14)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/52	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/52		16/24	4 B 0 2 4
16/24		19/00	4 B 0 6 3
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全135数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 500770(P2001 - 500770)

(86) (22)出願日 平成12年5月26日(2000.5.26)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月28日(2001.11.28)

(86)国際出願番号 PCT/US00/14795

(87)国際公開番号 W000/073458

(87)国際公開日 平成12年12月7日(2000.12.7)

(31)優先権主張番号 60/136,485

(32)優先日 平成11年5月28日(1999.5.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザイモジェネティクス, インコーポレイテ  
イド

アメリカ合衆国,ワシントン 98102,シアト  
ル,イーストレイク アベニュー イースト  
1201

(72)発明者 コンクリン, ダレル シー .

アメリカ合衆国,ワシントン 98102,シアト  
ル,イースト ルイーザ ストリート 117  
#421

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 分泌される -ヘリックスタンパク質 - 3 1

(57)【要約】

本発明は、哺乳類分泌された ヘリックスタンパク質 -  
31 ( zalpha 31 ) のポリヌクレオチド及びポリ  
ペプチドに関する。それらをコードするポリペプチド及  
びポリヌクレオチドは、新規の4 -ヘリックス束サイト  
カインであり、そして免疫系の機能を調節するために使  
用さえ得る。本発明はまた、zalpha 31ポリペプ  
チドに対する抗体も包含する。

**【特許請求の範囲】**

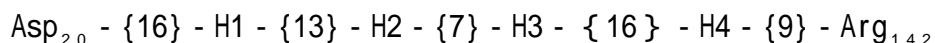
【請求項1】 (a) 配列番号2の残基番号37(Ile)～残基番号132(Leu)に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の残基番号20(Asp)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；及び

(c) 配列番号2の残基番号1(Met)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；

の群から選択されたアミノ酸残基の配列に対して少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】 前記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが、下記式：



[式中、 $\text{Asp}_{20}$ は、配列番号2に示される残基20(Asp)であり；

$\text{Arg}_{142}$ は、配列番号2に示される残基142(Arg)であり；

H1は、“ヘリックスA”(配列番号2のアミノ酸37(Ile)～51(Tyr)に対応する)であり；

H2は、“ヘリックスB”(配列番号2のアミノ酸65(Leu)～79(Glu)に対応する)であり；

H3は、“ヘリックスC”(配列番号2のアミノ酸87(Ile)～101(Leu)に対応する)であり；

H4は、“ヘリックスD”(配列番号2のアミノ酸118(Leu)～132(Leu)に対応する)であり；そして

{数}は、モチーフ間のアミノ酸残基のおおよその数(±2個の残基)を表す]により表される配置において、N-末端からC-末端の方に間隔をとって離れて存在する4個のヘリックスをさらに含む請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】 前記ポリヌクレオチドが、配列番号3のヌクレオチド1～ヌクレオチド426を含んで成る請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 (a) 配列番号2の残基番号37(Ile)～残基番号132(Leu)

)に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の残基番号20(Asp)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；及び

(c) 配列番号2の残基番号1(Met)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；

の群から選択されたアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドをコードする請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 次の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター；

請求項1記載のポリペプチドをコードするDNAをセグメント；及び

転写ターミネーター；

を含む発現ベクター。

【請求項6】 前記DNAセグメントに作用可能に連結された分泌シグナル配列をさらに含む請求項5記載の発現ベクター。

【請求項7】 請求項5記載の発現ベクターが導入されており、前記DNAセグメントによりコードされたポリペプチドを発現する培養された細胞。

【請求項8】 融合タンパク質をコードするDNA構造体であって、

(a) 配列番号2の残基番号1(Met)～残基番号19(Asp)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の残基番号87(Ile)～残基番号101(Leu)のアミノ酸配列

；

(c) 配列番号2の残基番号118(Leu)～残基番号132(Leu)のアミノ酸配列；

(d) 配列番号2の残基番号37(Ile)～残基番号132(Leu)のアミノ酸配列；及び

(e) 配列番号2の残基番号20(Tyr)～残基番号142(Leu)のアミノ酸配列

；

の群から選択されたアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドをコードする第1 DNAセグメント；並びに

追加のポリペプチドをコードする少なくとも1つの他のDNAセグメントを含ん

で成り、ここで前記第1及び他のDNAセグメントが読み取り柄を整合して連結されており；そして前記融合タンパク質をコードすることを特徴とするDNA構造体。

【請求項9】 次の作用可能に連結された要素：

- (a) 転写プロモーター；
  - (b) 請求項8記載の融合タンパク質をコードするDNA構造体；及び
  - (c) 転写ターミネーター；
- を含むベクターが導入されている宿主細胞を培養し；そして前記DNAセグメントによりコードされるタンパク質を回収する；ことを含んで成る方法により生成される融合タンパク質。

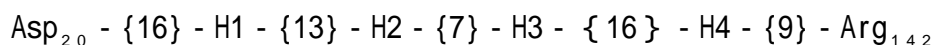
【請求項10】 (a) 配列番号2の残基番号37(Ile)～残基番号132(Leu)に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の残基番号20(Asp)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；及び

(c) 配列番号2の残基番号1(Met)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；

の群から選択されたアミノ酸残基の配列に対して少なくとも90%同一である、アミノ酸残基の配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項11】 前記ポリペプチドが、下記式：



[式中、 $\text{Asp}_{20}$ は、成熟ポリペプチドの開始残基(配列番号2に示される)であり；

$\text{Arg}_{142}$ は、成熟ポリペプチドの最終残基(配列番号2に示される)であり；

H1は、“ヘリックスA”(配列番号2のアミノ酸37(Ile)～51(Tyr)に対応する)であり；

H2は、“ヘリックスB”(配列番号2のアミノ酸65(Leu)～79(Glu)に対応する)であり；

H3は、“ヘリックスC”(配列番号2のアミノ酸87(Ile)～101(Leu)に対応する)であり；

H4は、“ヘリックスD”（配列番号2のアミノ酸118（Leu）～132（Leu）に対応する）であり；そして

{数}は、モチーフ間のアミノ酸残基のおおよその数（±2個の残基）を表す]により表される配置において、N-末端からC-末端の方に間隔をおいて離れて存在する4個のヘリックスをさらに含む請求項10記載の単離されたポリペプチド。

【請求項12】（a）配列番号2の残基番号37（Ile）～残基番号132（Leu）に示されるアミノ酸配列；

（b）配列番号2の残基番号20（Asp）～残基番号142（Arg）に示されるアミノ酸配列；及び

（c）配列番号2の残基番号1（Met）～残基番号142（Arg）に示されるアミノ酸配列；

の群から選択されたアミノ酸残基の配列を含む請求項10記載の単離されたポリペプチド。

【請求項13】 zalpha31ポリペプチドの生成方法であって、  
請求項7記載の細胞を培養し；そして  
前記細胞により生成されるzalpha31ポリペプチドを単離する；  
ことを含んで成る方法。

【請求項14】 試験サンプルにおけるzalpha31タンパク質のアンタゴニストの存在を検出するための方法であって、

zalpha31 - 刺激された細胞経路に対して応答性である細胞を培養し；

請求項13記載の方法によりzalpha31ポリペプチドを生成し；

試験サンプルの存在下及び不存在下で、前記細胞に前記zalpha31ポリペプチドを暴露し；

試験サンプルの存在下及び不存在下で、前記zalpha31ポリペプチドに対する応答性のレベルを、生物学的又は生化学的アッセイにより比較し；そして

前記比較から、試験サンプルにおけるzalpha31活性のアンタゴニストの存在を決定する；

ことを含んで成る方法。

【請求項15】 試験サンプルにおけるza1pha31タンパク質活性のアゴニストの存在を検出するための方法であって、

za1pha31 - 刺激された細胞経路に対して応答性である細胞を培養し；

試験サンプルを添加し；

試験サンプルの存在下及び不存在下で、応答性のレベルを、生物学的又は生化学的アッセイにより比較し；そして

前記比較から、試験サンプルにおけるza1pha31活性のアゴニストの存在を決定する；

ことを含んで成る方法。

【請求項16】 za1pha31ポリペプチドに対する抗体の生成方法であって、

(a) 請求項10又は12記載のポリペプチド；

(b) 配列番号2のアミノ酸番号87(Ile)～101(Leu)を含むポリペプチド

；

(c) 配列番号2のアミノ酸番号118(Leu)～132(Leu)を含むポリペプチド

；

(d) 配列番号2のアミノ酸番号14(Asp)～19(Asp)を含むポリペプチド；

(e) 配列番号2のアミノ酸番号26(Ala)～31(Glu)を含むポリペプチド；

(f) 配列番号2のアミノ酸番号27(Glu)～32(Pro)を含むポリペプチド；

(g) 配列番号2のアミノ酸番号136(Tyr)～141(Lys)を含むポリペプチド

；

(h) 配列番号2のアミノ酸番号137(Lys)～142(Arg)を含むポリペプチド

；

(i) 配列番号2のアミノ酸番号127(Ala)～135(Lys)を含むポリペプチド

；及び

(j) 配列番号2のアミノ酸番号127(Ala)～139(Leu)を含むポリペプチド

；

の群から選択されたポリペプチドを動物に接種し、ここで前記ポリペプチドが動物において免疫応答を誘発し、抗体を生成し；そして

前記動物から抗体を単離する；

段階を順に含んで成る方法。

【請求項17】  $\alpha$ 31ポリペプチドに対して特異的に結合する、請求項16記載の方法により生成される抗体。

【請求項18】 請求項10又は12記載のポリペプチドに対して特異的に結合する抗体。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

発明の背景：

ホルモン及びポリペプチド増殖因子は、多細胞生物の細胞の増殖、維持、生存性及び分化を制御する。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、及び器官の形成、そして損傷された組織の修復及び再性に関して作用する。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含む。

**【0002】**

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。

**【0003】**

サイトカイン、すなわち細胞の増殖、維持、生存性又は分化を促進する分子が、特に興味の対象である。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 тромбо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）を含む。これらのサイトカインは、貧血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を受容において有用である。こ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の莫大な臨床学的可能性及びそれらの必要性を示す。本発明は、新規ポリペプチド、及び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。本発明のそれらの及び他の観点は、本発明の次の特定の記載に基づいて明らかに成るであろう。

**【0004】**

発明の特定の記載：

本明細書に引用されるすべての文献の教示は、それらのすべてを引用により本明細書に組み込まれる。

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：

**【0005】**

“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ず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。

**【0006】**

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., EMBO 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Flag<sup>TM</sup> ペプチド (Hoppなど., Biotechnology 6: 1204-1210, 1988)、ストレプトタビジン結合ペプチド、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。

**【0007】**

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(例えばPharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Eastman Kodak, New Haven, CT; New England Biolabs, Beverly, MA)から入手できる。

**【0008】**

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ずれかを示すために、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。

#### 【0009】

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。その状況が可能である場合、それらの用語は、接近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。

#### 【0010】

“脈管形成”とは、単独で又は1又は複数の追加の化合物と共に作用する、存在する血管からの新規血管の形成を刺激する化合物の能力を示す。脈管形成活性は、内皮細胞活性化、内皮細胞によるプロテアーゼ分泌の刺激、内皮細胞移動、毛細管新芽形成及び内皮細胞増殖として測定できる。

#### 【0011】

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、ビオチン及びアビジン(又はストレプトアビジン)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(又はハプ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、 $< 10^9 \text{ M}^{-1}$ の結合親和性を有する。

#### 【0012】

用語“ポリヌクレオチド分子の相補体”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' ATGCAC GGG 3' は、5' CCCGTGCAT 3' に対して相補的である。

用語“contig”とは、他のポリヌクレオチドに対する一連の連続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。連続した配列とは、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'-ATGGAGCTT-3'に対する代表的なcontigとは、5'-AGCTTgagt-3'及び3'-tcgacTACC-5'である。

#### 【0013】

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と比較して）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）。

#### 【0014】

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作用可能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、プラスミド又はウィルスDNAから誘導され、又は両者の要素を含むことができる。

#### 【0015】

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、Dyanan and Tijan, Nature 316: 774-78, 1985を参照のこと)。

【0016】

“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。この状況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。

【0017】

“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。

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。

“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、 $\alpha$ -グロビン、 $\beta$ -グロビン及びミオグロビンは、お互いパラ体である。

【0018】

“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。

【 0 0 1 9 】

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对に成り得ない。

【 0 0 2 0 】

“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。

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。

【 0 0 2 1 】

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。

【 0 0 2 2 】

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、シグナルトランスダクションに關与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。

#### 【0023】

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、 $\beta$ -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。

#### 【0024】

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。

#### 【0025】

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、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。

#### 【0026】

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、おおよ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。

#### 【0027】

本発明は、新規サイトカインポリペプチド/タンパク質を提供する。“ヘリックスタンパク質-31”(この後、“ $\alpha$ 31”として言及される)と称する新規サイトカインが、発見され、そして4-ヘリックス-束のサイトカイン(例えば、エリトロポイエチン、トロンボポイエチン、G-CSF、IL-2、IL-2、レプチン及び成長ホルモン)の特徴的なポリペプチド及びポリヌクレオチド特徴の存在によりサイトカインであることが同定された。

#### 【0028】

$\alpha$ 31ポリペプチドの配列は、その対応するポリヌクレオチド配列を含むと思われる単一のクローンから得られた。そのような配列について調査され得るライブラリーは、心臓、脳、甲状腺、肝臓、脊髄、副腎、精巣、マクロファージ、リンパ球、活性化された免疫細胞及び同様のものを包含する。

#### 【0029】

代表的な $\alpha$ 31コードのDNAのヌクレオチド配列は、配列番号1に記載され、そしてその推定される142個のアミノ酸配列は、配列番号2に記載される。全体として、 $\alpha$ 31ポリペプチド(配列番号2)は、十分な長さのポリペプチドセグメント(配列番号2の残基1(Met)~残基142(Arg))を表す。 $\alpha$ 31のドメイン及び構造特徴はさらに下記に記載される。

#### 【0030】

配列番号1のDNA配列によりコードされる $\alpha$ 31ポリペプチドの分析は、19個のアミノ酸残基(配列番号2の残基1(Met)~残基19(Asp))の推定されるシグナルペプチド、及び122個のアミノ酸の成熟ポリペプチド(配列番号2の残基20(Asp)~残基142(Arg))を含んで成る142個のアミノ酸(配列番号2)をコードする読み取り枠を示した。

#### 【0031】

一般的に、サイトカインは4個の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メンバーの中で、それらがより高く保存される。zalpha 31におけるヘリックスA - Dは、配列番号2のアミノ酸37 (Ile) ~ 132 (Leu) を含んで成る生物学的活性の受容体 - 結合ドメインを定義する。成熟zalpha 31ポリペプチドは、約14,009ドルトンのグリコシル化されていない分子量を有する。配列番号2野さらなる分析は、4個の両親媒性 - ヘリックス領域、すなわち下記ヘリックスA, B, C及びDの存在を示す：

【0032】

- 1) “ヘリックスA” (配列番号2のアミノ酸37 (Ile) ~ 51 (Tyr) に対応する)；
- 2) “ヘリックスB” (配列番号2のアミノ酸65 (Leu) ~ 79 (Glu) に対応する)；
- 3) “ヘリックスC” (配列番号2のアミノ酸87 (Ile) ~ 101 (Leu) に対応する)；及び
- 4) “ヘリックスD” (配列番号2のアミノ酸118 (Leu) ~ 132 (Leu) に対応する)。

【0033】

他方では、ヘリックスAは、配列番号2のアミノ酸26 (Ala) ~ 40 (Leu) に対応し；そしてヘリックスBは、配列番号2のアミノ酸59 (Leu) ~ 73 (Thr) に対応することができる。zalpha 31におけるヘリックスA - Dは、配列番号2のアミノ酸26 (Ala) ~ 132 (Leu) を含んで成る延長された、生物学的活性の受容体 - 結合ドメインを定義することができる。

【0034】

個々のヘリックスは、一般的に親水性であるアミノ酸残基を有する外部領域、及び一般的に疎水性アミノ酸残基を含む内部に位置する領域を含む。ヘリックスの外部上に位置するアミノ酸残基は、受容体結合のために決定的であると思われる、そして電荷においてほとんど同一である1つの残基を除いて、他のアミノ酸残基に変更されるべきではない。ヘリックスの内部に位置するアミノ酸残基は、いずれかの疎水性アミノ酸残基に変更され得る。

## 【0035】

ヘリックスAにおいては、配列番号2のアミノ酸残基37, 40, 41, 44, 48及び51がヘリックスAの内部の方に位置し、そして配列番号2のアミノ酸残基38, 39, 42, 43, 45, 46, 49及び50はヘリックスAの外部部分上に位置する。

ヘリックスにおいては、配列番号2のアミノ酸残基65, 68, 69, 72, 75, 76及び79がヘリックスAの内部の方に位置し、そして配列番号2のアミノ酸残基66, 67, 70, 71, 73, 74, 77及び78はヘリックスBの外部部分上に位置する。

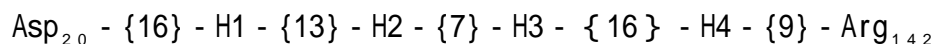
## 【0036】

ヘリックスCにおいては、配列番号2のアミノ酸残基87, 90, 91, 94, 97, 98及び101がヘリックスAの内部の方に位置し、そして配列番号2のアミノ酸残基88, 89, 92, 95, 96, 99及び100はヘリックスCの外部部分上に位置する。

ヘリックスDにおいては、配列番号2のアミノ酸残基118, 121, 122, 125, 128, 129及び132がヘリックスAの内部の方に位置し、そして配列番号2のアミノ酸残基119, 120, 123, 124, 126, 127, 130及び131はヘリックスDの外部部分上に位置する。

## 【0037】

ヘリックス1～4は、下記式：



[式中、 $\text{Asp}_{2_0}$ は、成熟ポリペプチドの開始残基（配列番号2に示されるような）であり；

$\text{Arg}_{1_{42}}$ は、成熟ポリペプチドの最終残基（配列番号2に示されるような）であり；

## 【0038】

H番号は、上記に開示される特定のヘリックスを示し（例えば、H1はヘリックスAであり、H2はヘリックスBであり、等）、そして

{数}は、モチーフ間のアミノ酸残基のおおよその数（±2個の残基）を表す]により表される配置において、N-末端からC-末端の方に一定の間隔離れて存在する。

上記に記載されるalpha 31ポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及

び配列は、配列番号1に示される。

【0039】

4 - ヘリックス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、繊毛好中球因子(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。Zalpha 31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CNTF - 結合性質を付与することを示した。

【0040】

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、zalpha 31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。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及びGM-CSFからのヘリカル及びループドメインを結合する融合タンパク質が特に興味の対象である。Zalpha 31II-2、IL-4、IL-15及びGM-CSFのためのA、B、C及びD、並びにループA/B、B/C及びC/Dを含んで成るアミノ酸残基が表1に示される。

【0041】

【表1】

表 1

	ヘリッ クスA	A/B ループ	ヘリッ クスB	B/C ループ	ヘリッ クスC	C/D ループ	ヘリッ クスD	配列番 号
Zalpha 31残基	37-51	52-64	65-79	80-86	87-101	102-117	118-132	配列番 号2
IL-2 残基	36-46	47-52	53-75	76-86	87-99	100-102	103-121	配列番 号14
IL-4 残基	29-43	44-64	65-83	84-94	95-118	119-133	134-151	配列番 号15
IL-15 残基	45-68	69-83	84-101	102-106	107-119	120-133	134-160	配列番 号16
GM-CSF 残基	30-44	45-71	72-81	82-90	91-102	103-119	120-131	配列番 号

## 【0042】

ポリヌクレオチド：

本発明はまた、ポリヌクレオチド分子、例えば本明細書に開示されるzalpha 31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3は、配列番号2のalpha 31ポリペプチド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3の変性配列がUとTとを置換することによって、配列番号2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。

【0043】

従って、配列番号3のヌクレオチド1 - 426を含んで成るalpha 31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3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、そしてその相補体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。

【0044】

【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

## 【0045】

与えられたアミノ酸のためのすべての可能なコドンを含む配列番号3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	TGC TGT	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	AA Y
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

## 【0046】

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(AGY)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2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。

#### 【0047】

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らう。一般的には、Grantham, など., Nuc. Acids Res. 8: 1893 - 912, 1980; Haas, など., Curr. 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。

#### 【0048】

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)。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。

#### 【0049】

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

3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現について試験され、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。

#### 【0050】

本発明の好ましい態様においては、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号1又はそれに対して相補的な配列の類似するサイズの領域に対して、緊縮条件下でハイブリダイズするであろう。一般的に、緊縮条件は、定義されたイオン強度及びpHで、特定の配列のための熱溶融点( $T_m$ )よりも約5℃低くあるよう選択される。 $T_m$ は、標的配列の50%が好ましく適合されたプローブに対してハイブリダイズする温度(定義されたイオン強度及びpH下で)である。

#### 【0051】

$T_m$ を計算するための多くの等式は当業界において知られており、そして種々の長さのDNA、RNA及びDNA-RNAハイブリッド及びポリヌクレオチドプローブ配列に対して特異的である(例えば、Sambrook など., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Press 1988); Ausubel など., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger and Kimmel (eds.), Guide to Molecular Cloning Techniques, (Academic Press, Inc. 1987); 及びWetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227 (1990)を参照のこと)。

#### 【0052】

配列分析ソフトウェア、例えばOLIG6.0 (LSR; Long Lake, MN) 及びPrimer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), 並びにインターネット上のサイトが所定の配列を分析し、そして使用者の定義された基準に基づいて $T_m$ を計算するための手段を入手できる。そのようなプログラムはまた、定義された条件下で所定の配置を分析し、そして適切なプローブ配列を同定することができる。典型的には、50以上の塩基対の長いポリヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションは、計算された $T_m$ よりも約20~25℃低い温度で行われる。50以

下の塩基対の小さなプローブに関しては、ハイブリダイゼーションは典型的には、 $T_m$ 又はそれよりも5～10以下で行われる。

#### 【0053】

これは、DNA-DNA及びDNA-RNAハイブリッドに関して、最大速度のハイブリダイゼーションを可能にする。低い温度でのより高い程度の緊縮性は、緩衝溶液における個々の1%ホルムアミドに関して、約1ハイブリッドの $T_m$ を低めるホルムアミドの添加により達成され得る。適切な緊縮ハイブリダイゼーション条件は、約40～50%のホルムアミド、約6×までのSSC、約5×のDenhardt's溶液、0～約10%のデキストラン硫酸及び約10～20 $\mu$ g/mlの変性された市販のキャリアーDNAを含んで成る溶液において約42での5時間～一晩インキュベーションに等しい。

#### 【0054】

一般的に、そのような緊縮条件は、20～70の温度及び6×までのSSC及び0～50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液を包含し；次にハイブリダイゼーションに続いて、約2×までのSSCによるフィルター洗浄を伴う。例えば、適切な洗浄緊縮性は、0.1×のSSC～2×のSSC、0.1%のSDS、55～65の温度に等しい。異なった程度の緊縮性が、標的配列に対する最大の特異的結合を達成するためには、ハイブリダイゼーション及び洗浄の間に使用され得る。

#### 【0055】

典型的には、ハイブリダイゼーションに続く洗浄は、ハイブリダイズされた複合対からハイブリダイズされていないポリヌクレオチドプローブを除去するために、高い程度の緊縮性で行われる。緊縮ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、プローブの長さに依存し、 $T_m$ 、ハイブリダイゼーション及び使用される洗浄溶液において影響され、そして通常当業者により実験的に決定される。

#### 【0056】

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、多量のマウス $\alpha$ 31 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、そして下記に論じられる。

#### 【0057】

全RNAは、グアニジウムHCl抽出、続くCsClグラジエ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)。ポリ(A)<sup>+</sup> 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)<sup>+</sup> 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、 $\alpha$ 31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。

#### 【0058】

$\alpha$ 31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つのゲノムイントロンを含むよう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内であり、そしてライブラリーをプローブ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。発現ライブラリーは、 $\alpha$ 31、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ブされ得る。

#### 【0059】

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。化学的に合成された二本鎖DNAがDNA又はDNA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、当業界において知られているホスホラミジット方法により別々に製造される。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、より長い遺伝子 (300bp以上) の生成に関しては、特定の

工程が通常使用される。例えば、合成DNA（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。

#### 【0060】

合成DNAを構築するための1つの方法は、1組のオーバーラップする相補的オリゴヌクレオチドの生成を包含する。DNAの個々の内部部分は、隣接する部分を正確に有する塩基対に企画される相補的3'及び5'末端延長を有する。DNAがアセンブルされた後、その工程は、2本鎖の主鎖に沿ってニックを連結することによって完結される。タンパク質コード配列の他に、クローニングベクターの制限エンドヌクレアーゼ部位中への挿入を促進する末端配列を有する合成DNAが企画され得る。

#### 【0061】

十分な大きさのDNAを調製するためのもう1つの手段は、当業界において知られている。例えば、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. Sa. USA* 87: 633-7, 1990を参照のこと。

#### 【0062】

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、八虫類、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、例えばネズミ、ブタ、羊、ウシ、犬、ネコ、馬及び他の霊長類ポリペプチドからの $\alpha$ 31ポリペプチドである。ヒト $\alpha$ 31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。例えば、cDNAは、 $\alpha$ 31を発現する組織又は細胞型から得られるmRNAを用いてクローン化され得る。mRNA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。

#### 【0063】

次に、ライブラリーが陽性の組織又は細胞系のmRNAから調製される。次に、z

alpha 31 - コードの c DNA が種々の方法、例えば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 alpha 31 配列から企画されたプライマーを用いて、PCR (Mullis, アメ  
リカ特許第 4,683,202 号) 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 ライブラリーが宿主細胞を形質転換し、又はトランスフェクトする  
ために使用され、そして興味ある c DNA の発現がマウス alpha 31 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。

#### 【0064】

当業者は、配列番号 1 に開示される配列がヒト alpha 31 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  
ってクローン化され得る。配列番号 1 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 2 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。

#### 【0065】

Zalpha 31 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  
によってクローン化され得る。

#### 【0066】

本発明はまた、配列番号 2 のポリペプチド、及びそれらのオルト体に対して実  
質的に類似する単離された alpha 31 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 2 に示される配列又はそれらのオルト体に対して、少

なくとも70%、及びより好ましくは少なくとも80%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2、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。%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4（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：

【0067】

【数1】

[同一の適合するものの合計数]

---

× 100  
 [長い方の配列の長さ + 2種の配列を整合するために  
 長い方の配列中に導入されるギャップの数]

【0068】

【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	-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	-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	4

【0069】

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 $\alpha$ 31のアミノ酸配列により共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。

#### 【0070】

手短には、FASTAがまず、問題の配列（例えば、配列番号2）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”。

#### 【0071】

“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。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 Wunsch, 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。

#### 【0072】

FASTA分析のための例示的なパラメータは次のものである：ktup=1、ギャップ開始ペナルティ=10、ギャップ拡張ペナルティ=1及び置換マトリックス=BLOSUM62。それらのパラメータは、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。

#### 【0073】

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。

#### 【0074】

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の局所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。

#### 【0075】

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。

#### 【0076】

本発明は、配列番号3のアミノ酸配列に比較して、1又は複数の保存性アミノ酸変化を有するポリペプチドをコードする核酸配列を包含する。BLOSUM62表は、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の局所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。本明細書において使用される場合、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。

#### 【0077】

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。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。従って、本発明は、配列番号3に対して、少なくとも90%、好ましくは95%、及び最も好ましくは99%同一であり、そして哺乳類において抗体生成を刺激することができるそれらのポリペプチドを包含し、そして前記抗体は配列番号3の生来の配列を結合することができる。

【0078】

変異体 $\alpha$ 31ポリペプチド又は実質的に相同の $\alpha$ 31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。

【0079】

従って、本発明は、配列番号2のその対応する領域に対して、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、及びより好ましくは99%又はそれ以上の同一性を有する配列を含んで成る、約30~約175個のアミノ酸残基の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、 $\alpha$ 31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。

【0080】

【表5】

**表5**  
**保存性アミノ酸置換**

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
小さい：	グルシン アラニン セリン トレオニン メチオニン

## 【0081】

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、マウス $\alpha$ 31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。それに関するの好ましいダイマータンパク質は、免疫グロブリン不変領域ドメインを包含する。免疫グロブリン -  $\alpha$ 31ポリペプチド融合体は、種々のマルチマー $\alpha$ 31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 $\alpha$ 31ポリペプチドに融合され得る。

## 【0082】

例えば、 $\alpha$ 31ポリペプチド又はタンパク質は、標的細胞の表面上の受容体に対して特異的に結合するリガンドに $\alpha$ 31ポリペプチドを融合すること

によって、予定された細胞型に標的化される。この場合、ポリペプチド又はタンパク質は、治療又は診断目的のために標的化され得る。zalpha 31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。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。

#### 【0083】

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イン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、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。

#### 【0084】

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ル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。

#### 【0085】

アミノ酸を合成し、そしてtRNAをアミノアシル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。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., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10145 - 49, 1993を参照のこと。

と。

【0086】

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(Turcatti など., J. Biol. Chem. 271: 1991 - 98, 1996)。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。

【0087】

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せられ得る(Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395 - 403, 1993)。

【0088】

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、 $\alpha$ 31アミノ酸により置換され得る。

【0089】

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、生物学的活性について試験される。

## 【0090】

また、Hiltonなど., J. Biol. Chem. 271: 4699 - 5708, 1996を参照のこと。  
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。

## 【0091】

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、高いアミノ酸又はヌクレオチド同一性を有する複数配列の一系列整列、及び利用できるソフトウェア（例えば、the Insight II (商標) viewer and homology 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Corde s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。

## 【0092】

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 $\alpha$  31ポリペプチドにおいて行われる。例えば、 $\alpha$  31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)。

#### 【0093】

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)。

#### 【0094】

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)。

#### 【0095】

配列番号2に示されるような $\alpha$ 31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 11: 153-169, 1998)。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、 $\alpha$ 31においては、親水性領域は、(1)配列番号2のアミノ酸残基14(Asp)~19(Asp); (2)配列番号2のアミノ酸残基26(Ala)~31(Glu); (3)配列番号2のアミノ酸残基27(Glu)~32(Pro); (4)配列番号2のアミノ酸残基136(Tyr)~141(Lys)

); 及び(5)配列番号2のアミノ残基137(Lys)~142(Arg)を包含する。

#### 【0096】

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、zalpha 31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に示されるような残基を包含する。しかしながら、システイン残基は、置換に対して比較的耐性であろう。

#### 【0097】

必須アミノ酸の正体はまた、zalpha 31による、他のサイトカイン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zalpha 31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。

#### 【0098】

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。

【0099】

本発明はまた、 $\alpha$ 31ポリペプチドの機能的フラグメント、又は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。本明細書において定義される“機能的” $\alpha$ 31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- $\alpha$ 31抗体、又は $\alpha$ 31受容体のいずれかに特異的に結合するその能力により特徴づけられる。前に本明細書において記載されたように、 $\alpha$ 31は、配列番号2に示されるようなヘリックスA(アミノ酸残基37-51)、ヘリックスB(アミノ酸残基65-79)、ヘリックスC(アミノ酸残基87-101)、及びヘリックスD(アミノ酸残基118-132)を含んで成る4-ヘリックス-束構造により特徴づけられる。

【0100】

従って、本発明はさらに、(a)上記に記載される1又は複数のヘリックス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ヘリックス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、4-ヘリックス-束サイトカイン、例えばIL-15、IL-2、IL-4及びGM-CSFにより、又は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。

【0101】

核酸分子の通常の欠失分析は、 $\alpha$ 31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BaI31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 $\alpha$ 31活性について、又は抗- $\alpha$ 31抗体又は $\alpha$ 31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 $\alpha$ 31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、 $\alpha$  31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。

#### 【0102】

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

#### 【0103】

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。

## 【0104】

開示されるマウスzalpha 31 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ビ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。

## 【0105】

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せられ得る。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 - に基づくりガンド - 結合アッセイを包含する。活性ポリペプチド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。

## 【0106】

さらに、本発明のタンパク質（又はそのポリペプチドフラグメント）は、多機能分子を提供するために、他の生物活性分子、特に他のサイトカインに連結され得る。例えば、zalpha 31からの1又は複数のヘリックスは、それらの生物学的性質、又は生成の効率を増強するために他のサイトカインに連結され得る。

## 【0107】

従って、本発明は、zalpha 31の1又は複数のヘリックスを含んで成るセグメ

ントがもう1つのポリペプチドに融合されている一連の新規ハイブリッド分子を提供する。融合は好ましくは、組換え生成システムでの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って行われる。次に、その得られる分子は、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、及び薬物動力学のような性質についてアッセイされる。そのようなハイブリッド分子はさらに、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inker）を含むことができる。

#### 【0108】

本明細書において論じられる方法を用いて、当業者は、配列番号2, 4又は6の、又は野生型zalpha 31タンパク質の性質を保持する種々のポリペプチドフラグメント又は変異体を同定することができ、そして/又は調製することができる。いずれかのzalpha 31ポリペプチド、例えば変異体及び融合タンパク質に関して、当業者は、上記表2及び3に示される情報を用いて、その変異体をコードする十分に縮重したポリヌクレオチド配列を容易に生成することができる。

#### 【0109】

タンパク質生成：

本発明のzalpha 31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こ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。

#### 【0110】

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*, 2<sup>nd</sup> 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, Ins., NY, 1987。

【0111】

一般的に、本発明のzalpha 31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作用可能に連結される。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。

【0112】

Zalpa 31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、zalpa 31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。

【0113】

分泌シグナル配列は、zalpa 31 DNA配列に作用可能に連結され、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）。

【0114】

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2のアミノ酸1 (Met) ~ アミノ酸19 (Asp) のシグナルペプチドをコード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、ポリペプチドをコードするもう1つのDNAセグメントに作用可能に連結されている。

#### 【0115】

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、分泌路中い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。

#### 【0116】

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 )、及びリボソーム - 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。

#### 【0117】

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。

#### 【0118】

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。

#### 【0119】

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。

#### 【0120】

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。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。

#### 【0121】

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。

#### 【0122】

他の高等真核細胞、例えば植物細胞、昆虫細胞、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、Sin kar 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WIPO公開W094/06463号により公開される。昆虫細胞は、オートグラファ・カリホルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) に通常由来する組換えバキュロウイルスにより感染され得る。

#### 【0123】

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., Ed., *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology*, Totowa, NJ, Humana Press, 1995を参照のこと。組換えバキュロウイ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。このシステムは、Bac-to-Bac™キット (Life Technologies, Rockville, MD) として市販されている。

#### 【0124】

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イルスゲノム中に、 $\alpha$ 31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ベクター、pFastBac1™ (Life Technologies) を利用する。pFastBac1™ トランスファーベクターは、興味ある遺伝子、この場合、 $\alpha$ 31の発現を誘導するためにAcNPV

ポリヒドロリンプロモーターを使用する。

【0125】

しかしながら、pFastBacI™は相当の程度まで修飾され得る。前記ポリヒドロリンプロモーターは、除去され、そしてバキュロウィルス感染において早めに発現され、そして分泌されたタンパク質を発現するために好都合であることが知られているバキュロウィルス塩基性タンパク質プロモーター（また、Pcor, p6.9又はMPプロモーターとしても知られている）により置換され得る。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。

【0126】

そのようなトランスファーベクター構造体においては、塩基性タンパク質プロモーターの短い又は長いバージョンが使用され得る。さらに、昆虫タンパク質に由来する分泌シグナル配列により天然の $\alpha$ 31分泌シグナル配列を置換しているトランスファーベクターが構成され得る。例えば、エクジステロイド・グルコシルトランスフェラーゼ (EGT)、ミツバチMelittin (Invitrogen, Carlsbad, CA) 又はバキュロウィルスgp67 (PharMingen, San Diego, CA)は、生来の分泌シグナル配列を置換するために、構造体で使用され得る。

【0127】

さらに、トランスファーベクターは発現された $\alpha$ 31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: 7952 - 6, 1985)。当業界において知られている技法を用いて、 $\alpha$ 31を含むトランスファーベクターにより、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 a についてスクリーンされる。

【0128】

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、そしてスポドプテラ・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。Zalpha 31を発現する組換えウイルスが結果的に生成される。組換えウイルス 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。

#### 【0129】

組換えウイルスは、宿主細胞、典型的には、アワヨトウの幼虫、スポドプテラ・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 Prss, Washington, D.C., 1994を参照のこと。もう一つの適切な細胞系は、トリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni) に由来するHigh Five<sup>TM</sup>細胞系 (Invitrogen) である (アメリカ特許第5,300,435号)。市販の血清フリー培地は、細胞を増殖し、そして維持するために使用される。

#### 【0130】

適切な培地は、Sf9細胞のためには、SF900II<sup>TM</sup> (Life Technologies), 又はEST 921<sup>TM</sup> (Expression Systems); 及びT. ni 細胞のためには、Ex-Cell10405<sup>TM</sup> (JRH Biosciences, Lenza, KS) 又はExpress Five0<sup>TM</sup> (Life Technologies) である。細胞は、約  $2 \sim 5 \times 10^5$  個の細胞  $\sim 1 \sim 2 \times 10^6$  個の細胞の接種密度から増殖され、この時点で、組換えウイルスストックが、0.1~10, より典型的にはほぼ3の感染の多重度 (MCI) で添加される。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'Reilly, D. R. など., 前記; Richardson, C. D., 前記)。上清液からのZalpha 31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。

#### 【0131】

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・セレビスシアエ (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. セレビス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。

#### 【0132】

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。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POT 1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。

#### 【0133】

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。他の酵素、例えばハンセヌラ・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 guilliermondii*)、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。

#### 【0134】

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。ニューロスポラ (N

eurospora) 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。

#### 【0135】

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 (AUG 1 又はAUG 2) 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。

#### 【0136】

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。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ade2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。

#### 【0137】

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。

## 【0138】

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ン化される外来性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 $\alpha$ 31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。

## 【0139】

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。

## 【0140】

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ルにより補足され、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。

## 【0141】

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

において、約25 ~ 35 の温度で培養される。液体培養物は、従来手段、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.メタノリカのための好ましい培養培地は、YEPD (2%D-グルコース、2%のBacto™ペプトン (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1%のBacto™ 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。

#### 【0142】

本発明のもう1つの態様は、本発明の $\alpha$  31ポリペプチドのエピトープ - 担持部分を含んで成るペプチド又はポリペプチドを提供する。このポリペプチド部分のエピトープは、本発明のポリペプチドの免疫原性又は抗原性エピトープである。抗体が結合することができるタンパク質の領域は、“抗原性エピトープ”として定義される。例えば、Geysen, H. M. など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002 (1984) を参照のこと。

#### 【0143】

抗原性エピトープ (すなわち、抗体が結合できるタンパク質又は分子の領域を含む) を担持するペプチド又はポリペプチドの選択に関しては、タンパク質配列の一部を模倣する比較的短い合成ペプチドが部分的に模倣されたタンパク質と反応する抗血清を通常、誘発できることは、当業界において良く知られている。Sutcliffe, J. G. など., Science 219: 660-666 (1983) を参照のこと。

#### 【0144】

タンパク質反応性血清を誘発できるペプチドは、しばしばタンパク質の一次配列で表され、1組の単純な化学規則により特徴づけられ得、そして損なわれていないタンパク質の免疫優性領域 (すなわち、免疫原性エピトープ) にも、又はアミノ又はカルボキシル末端にも制限されない。極端に疎水性であるペプチド及び6個又はそれよりも少ない残基のペプチドは、一般的に、模倣されたタンパク質に結合する抗体の誘発において無効果であり; より長い可溶性ペプチド、特にプロリン残基を含むそれらのペプチドが通常、効果的である。

#### 【0145】

従って、本発明の抗原性エピトープ - 担持のペプチド及びポリペプチドは、本

発明のポリペプチドに対して特異的に結合する抗体、例えばモノクローナル抗体を生ぜしめるために有用である。本発明の抗原性エピトープ-担持のペプチド又はポリペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列内に含まれる、少なくとも9個、好ましくは15~約30個のアミノ酸配列を含む。しかしながら、本発明のポリペプチドの全アミノ酸配列の30~50個のアミノ酸、又は全アミノ酸までのいずれかの長さのアミノ酸を含む、本発明ののアミノ酸配列の大きな部分を含んで成るペプチド又はポリペプチドはまた、タンパク質と反応する抗体を誘発するためにも有用である。

#### 【0146】

好ましくは、エピトープ担持のペプチドのアミノ酸配列は、水性溶媒における実質的な溶解性を提供するように選択され(すなわち、配列は比較的親水性の残基を含み、そして疎水性残基は好ましくは回避される);そしてプロリン残基を含む配列が特に好ましい。配列列挙に示されるポリペプチドのすべては、本発明に従って使用されるべき抗原性エピトープを含むが、しかしながら特別に企画された抗原性エピトープは、例えば(1)配列番号2のアミノ酸残基11(Thr)~20(Asp);(2)配列番号2のアミノ酸残基60(Ser)~64(Lys);(3)配列番号2のアミノ酸残基88(Ser)~96(Gln);(4)配列番号2のアミノ酸残基127(Ala)~135(Lys);及び(5)配列番号2のアミノ酸残基127(Ala)~139(Leu)を含んで成る、Jameson-Wolfプロットから推定されるペプチドを包含する。

#### 【0147】

タンパク質単離:

本発明のポリペプチドを80%以上の純度、より好ましくは90%以上の純度、さらに好ましくは95%以上の純度に精製することが好ましく、そして汚染性高分子、特に他のタンパク質及び核酸に対して、99.9%以上の純度であり、そして感染性及び発熱性剤を有さない医薬的に純粋な状態が特に好ましい。好ましくは、精製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有さない。

#### 【0148】

発現された組換え $\alpha$ 31ポリペプチド（又はキメラ $\alpha$ 31ポリペプチド）は、分別及び/又は従来 of 精製方法及び媒体を用いて精製され得る。硫酸アンモニウム沈殿及び酸又はカオトロピック剤抽出は、サンプルの分別のために使用される。典型的な精製段階は、ヒドロキシアパタイト、サイズ排除、FPLC及び逆相高性能液体クロマトグラフィーを包含する。適切なクロマトグラフィー用媒体は、誘導体化されたデキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特別なシリカ及び同様のものを包含する。PEI、DEAE、QAE及びQ誘導体が好ましい。

#### 【0149】

典型的なクロマトグラフィー用媒体は、フェニル、ブチル又はオクチル基により誘導体化されたもの、例えばフェニル - Sepharose FF (pharmacia), Toyopearl ブチル650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA)、オクチル - Sepharose (Pharmacia)及び同様のもの；又はポリアクリル樹脂、例えばAmberchrom CG71 (Toso Haas)及び同様のものを包含する。適切な固体支持体は、ガラスビーズ、シリカ基材の樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、架橋されたアガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋されたポリアクリルアミド樹脂及びそれらが使用される条件下で不溶性である同様のものを包含する。それらの支持体は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基及び/又は炭水化物成分によるタンパク質の結合を可能にする反応性基より変性され得る。

#### 【0150】

カップリング化学物質の例は、臭化シアン活性化、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、ヒドラジド活性化及びカルボジイミド カップリング化学物質のためのカルボキシル及びアミノ誘導体を包含する。それらの及び他の固体媒体は当業界において良く知られており、そして広く使用されており、そして商業的供給者から入手できる。支持媒体にリガンド又は受容体ポリペプチドを結合するための方法は当業界において良く知られている。特定方法の選択は、通常のことであり、そして選択された支持体の性質により一部決定される。例えば、Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988を参照のこと。

## 【0151】

本発明のポリペプチドは、それらの構造及び生物学的性質の活用により単離され得る。例えば、固定された金属イオン吸着 (IMAC) クロマトグラフィーが、ヒスチジンに富んでいるタンパク質、及びポリヒスチジン標識を含んでなるそれらのタンパク質を精製するために使用され得る。手短に言及すれば、ゲルがまず、二価金属イオンにより荷電され、キレートが形成される (Sulkowski, Trends in Biochem. 3: 1 - 7, 1985)。ヒスチジンに富んでいるタンパク質が、使用される金属イオンに依存して、異なった親和性を有するこのマトリックスに吸着され、そして競争溶出、pHの低下、又は強いキレート化剤の使用により溶出されるであろう。

## 【0152】

他の精製方法は、レクチン親和性クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーによるグリコシル化されたタンパク質の精製を包含する (Methods in Enzymol., Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 529 - 39)。本発明のさらなる態様においては、興味あるポリペプチド、及び親和性標識 (例えばマルトース - 結合タンパク質、FLAG標識、Glu-Gku標識、免疫グロブリンドメイン) の融合体が、精製を促進するために構成され得る。

## 【0153】

さらに、当業界において記載される方法を用いて、ポリペプチド融合体又はハイブリッド $\alpha$ 31タンパク質が、本発明の $\alpha$ 31の領域又はドメインを用いて構成される (Sambrook など., 前記; Altschul など., 前記; Picard, Cur. Opin. Biology, 5: 511-5, 1994及びそれらにおける引例)。それらの方法は、興味あるポリペプチドにおける大きなドメイン又は領域の生物学的重要性の決定を可能にする。そのようなハイブリッドは、反応運動学、結合を変更し、基質特異性を抑制し、又は拡張し、又はポリペプチドの組織及び細胞局在性を変更し、そして未知の構造のポリペプチドに適用される。

## 【0154】

融合タンパク質は、その融合タンパク質の個々の成分を調製し、そしてそれら

を化学的に接合することによって、当業者に知られている方法により調製され得る。他方では、正しく読み取り枠を整合して融合タンパク質の両成分をコードするポリヌクレオチドは、既知の技法を用いて生成され、そして本明細書に記載される方法により発現され得る。例えば、生物学的機能を付与するドメインの一部又はすべてが、本発明の $\alpha$ 31と、もう1つのファミリーメンバー、例えばIL-2、IL-4、又はGM-CSF、又は他の4-ヘリックス束サイトカインファミリーメンバーからのその機能的に同等のドメインとの間で交換され得る。

#### 【0155】

そのようなドメイン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：分泌シグナル配列；ヘリックスA~D、保存され、そして有意なドメイン、又はこのファミリーにおける領域。そのような融合タンパク質は、構成される融合体に依存して、本発明のポリペプチド又は他の既知のファミリータンパク質と同じか又は類似する生物学的機能プロフィールを有することが予測される。さらに、そのような融合タンパク質は、本明細書に開示されるように、他の性質も示すことができる。

#### 【0156】

本明細書において論じられる方法を用いて、当業者は、配列番号2の残基1~142又は20~142に対して実質的に類似する配列同一性を有する種々のポリペプチド、又はそれらの機能的フラグメント及び融合体を同定し、そして/又は調製することができる。ここでそのようなポリペプチド、又はそのフラグメント又は融合体は、野生型タンパク質の性質、例えば、増殖、分化を刺激し、特殊化された細胞機能を誘発し、又は細胞又は $\alpha$ 31受容体又は抗- $\alpha$ 31抗体を結合する能力を保持する。

#### 【0157】

標準の分子生物学及びクローニング技法が、 $\alpha$ 31ポリペプチドと、それらが融合されるそれらのポリペプチドとの間の同等のドメインを交換するために使用され得る。一般的に、興味あるドメイン、例えば $\alpha$ 31ヘリックスA~D、又は本明細書に記載されるモチーフをコードするDNAセグメントが、追加のポリペプチドをコードする少なくとも1つの他のDNAセグメントに読み取り枠を接

合して作用可能に結合され、そして本明細書に記載されるように、適切な発現ベクター中に挿入される。

#### 【0158】

一般的に、DNA構造体は、ポリペプチドのその対応する領域をコードするいくつかのDNAセグメントが、完全な融合タンパク質又はその機能的部分をコードする単一の構造体を製造するために読み取り枠を整合して、作用可能に連結されるように、製造される。例えば、DNA構造体は、N-末端からC-末端側に、シグナルポリペプチド、続いて成熟ポリペプチドを含んで成る融合タンパク質をコードし；又は、DNA構造体は、N-末端からC-末端側に、シグナルポリペプチド、続いてヘリックスA、ヘリックスB、ヘリックスC、ヘリックスD、又はもう1つのタンパク質からの同等の領域により交換されるものを含んで成る融合タンパク質をコードする。そのような融合タンパク質は、本明細書に記載されるように、発現され、単離され、そして活性についてアッセイされ得る。

#### 【0159】

Zalpha 31ポリペプチド又はそのフラグメントはまた、化学的合成を通して調製され得る。Zalpha 31ポリペプチドはモノマー又はマルチマーであり得；グリコシル化されても又はグリコシル化されなくても良く；ペルギレ-ト化されても又はペルギレ-トされなくても良く；そして開始メチオニンアミノ酸残基を含んでも又は含まなくても良い。

#### 【0160】

本発明のポリペプチドはまた、排除固相合成、部分固相合成、フラグメント縮重又は従来の溶液合成により合成され得る。ポリペプチドを合成するための方法は、当業界において良く知られている。例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963; Kaiserなど., Anal. Biochem. 34: 585, 1970を参照のこと。固体支持体上での所望するペプチドの完全な合成の後、ペプチド-樹脂は、その樹脂からポリペプチドを分解する試薬と共に存在し、そしてほとんどの側鎖保護基を除去する。そのような方法は、当業界において十分に確立されている。本発明の分子の活性は、シグナルトランスダクション、Ig結合又はcAMPモジュレーションを側定する種々のアッセイを用いて測定され得る。そのようなアッセイは、

当業界において良く知られている。一般的な文献については、Nihei, Y., 前記 ; 及びRindisbacher, L., など., 前記を参照のこと。

#### 【0161】

アッセイ :

本発明の分子の活性は、種々のアッセイを用いて測定され得る。精巣におけるステロイド生成、精子形成、視床下部におけるLH及びFSH生成及びGnRHの変化が特に興味あることである。

#### 【0162】

本発明のタンパク質は、例えば、精子生成の上昇、甲状腺、副腎、リンパ、炎症、脾臓、血液又は骨疾患の処理において有用であり、そして培養された細胞を用いてインビトロで、又は適切な動物モデルに本発明の分子を投与することによってインビボで測定され得る。例えば、 $\alpha$ 31ポリペプチドの分泌された形を発現する宿主細胞は、アルギン酸塩環境下で包埋され、そして受容体動物中に注入（移植）され得る。アルギネート - ポリ - L - リシン微小封入、透過性膜封入及び拡散チャンバーは、トランスフェクトされた哺乳類細胞又は一次哺乳類細胞を捕獲するための手段として記載されている。

#### 【0163】

それらのタイプの非免疫原性“封入”は、微小環境への栄養物ノトランスファーを可能にしそして又は、捕獲された細胞により分泌され又は開放されるタンパク質及び他の高分子の受容体動物への拡散を可能にする。最も重要なことには、カプセル又は微小環境は、受容体動物の免疫応答から外来性の包埋された細胞をマスクし、そして遮断する。そのような微小環境は、注入される細胞の寿命を、数時間又は数日（裸細胞）から数週間（包埋された細胞）まで拡張することができる。アルギン酸塩系は、包埋された細胞を生成するための単純且つ迅速な手段を提供する。

#### 【0164】

アルギン酸塩系を生成するために必要とされる材料は、当業者に知られている。製造されると、そのアルギン酸塩系は、インビトロで、及びその系を用いて得られるデータに基づいて、インビボで、比較的強く且つ耐久性がある。そのアル

ギン酸塩系は容易に操作でき、そしてその方法論は多くの調製のために評価できる。典型的な方法においては、3%のアルギン酸塩が、無菌水において調製され、そして滅菌濾過される。アルギン酸塩系の調製の直前、アルギン酸塩溶液が再び濾過される。約50%の細胞懸濁液(1ml当たり約 $5 \times 10^5$ 個~約 $5 \times 10^7$ 個の細胞を含む)が3%アルギン酸塩溶液と共に混合される。

#### 【0165】

1mlのアルギン酸塩/細胞懸濁液が、約15分間にわたって、100mMの滅菌濾過されたCaCl<sub>2</sub>溶液中に押し出され、“糸(Thread)”が形成される。次に、押し出された糸は、50mMのCaCl<sub>2</sub>の溶液に移され、そして次に25mMのCaCl<sub>2</sub>の溶液に移される。次に、糸が、脱イオン水によりすすがれ、その後、ポリ-L-リシンの0.01%溶液においてインキュベートすることによって糸を被覆する。最後に、糸は乳酸塩化されたリンガー溶液によりすすがれ、そして注射器(針のない)中に溶液から抜き取られる。次に大きな孔の針がその注射器につけられ、そして糸が最少量の乳酸塩化されたリンガー溶液において受容体中の腹腔内注入される。

#### 【0166】

本発明のタンパク質をアッセイするための他のインビボアプローチは、ウィルス供給システムを包含する。この目的のための典型的なウィルスは、アデノウィルス、ヘルペスウィルス、ワクシニアウィルス及びアデノ関連ウィルス(AAV)を包含する。アデノウィルス、すなわち二本鎖DNAウィルスは現在、異種拡散の供給のための最も研究されている遺伝子トランスファーベクターである(T. C. Becker など., Meth. Cell Bio. 43: 161 - 89, 1994; 及びJ. T. Douglas and D. T. Curiel, Science & Medicine 4: 44 - 53, 1997 を参照のこと)。

#### 【0167】

アデノウィルスシステムは次のいくつかの利点を付与する:(i)アデノウィルスは比較的大きなDNA挿入体を適応せしめることができ;(ii)高い力価に増殖され得;(iii)広範囲の哺乳類細胞型を感染せしめ;そして(iv)多数の異なったプロモーター、例えば偏在する、組織特異的、及び調節可能なプロモーターと共に使用され得る。また、アデノウィルスは血流において安定して

いるので、それらは静脈内注射により投与され得る。

【0168】

アデノウィルスゲノムの一部が欠失されているアデノウィルスを用いて、直接的な結合により又は同時トランスフェクトされたプラスミドとの相同組換えにより、ウィルスDNA中に組み込まれ得る。典型的なシステムにおいては、必須E1遺伝子がウィルスベクターから欠失され、そしてウィルスは、E1遺伝子が宿主細胞（ヒト293細胞系が典型である）により供給されなければ、複製しないであろう。損なわれていない動物に静脈内投与される場合、アデノウィルスは主に、肝臓を標的化する。

【0169】

アデノウィルス供給システムがE1遺伝子欠失を有する場合、ウィルスは宿主細胞において複製することができない。しかしながら、宿主の組織（例えば、肝臓）は、異種タンパク質を発現し、そしてプロセッシングするのであろう（そして、分泌シグナル配列が存在する場合、分泌する）。分泌されたタンパク質は高く血管化された肝臓において循環に入り、そして感染された動物に対する効果が決定され得る。

【0170】

さらに、ウィルス遺伝子の種々の欠失を含むアデノウィルスベクターは、そのベクターに対する免疫応答を低めるか又は排除するために使用され得る。そのようなアデノウィルスは、E1 - 欠失され、そしてさらに、E2A又はE4の欠失を含む（Luskyなど., *J. Virol.* 72: 2022 (1998); Raper など., *Human Gene Therapy* 9: 671 (1998)）。さらに、E2bの欠失はまた、免疫応答を低めることが報告されている（Amalfitanoなど., *J. Virol.* 72:926 (1998)）。さらに、完全なアデノウィルスゲノムを欠失することによって、異種DNAの非常に大きな挿入体が収容され得る。すべてのウィルス遺伝子が欠失されている、いわゆる“不活性（gutless）”アデノウィルスの生成は、異種DNAの大きな挿入体の挿入のために特に好都合である（Yeh and Perricaudet, *FASEB J.* 11: 615 (1997) を参照のこと）。

【0171】

アデノウィルスシステムはまた、インビトロでのタンパク質生成のためにも使用され得る。アデノウィルス感染された非-293細胞を、その細胞が急速に分裂しないような条件下で培養することによって、前記細胞は長時間、タンパク質を生成することができる。例えば、BHK細胞は、細胞工場において集密性まで増殖され、次に興味ある分泌されたタンパク質をコードするアデノウィルスベクターに暴露される。次に、細胞が、有意な細胞分裂を伴わないで、感染された細胞の数週間の生存を可能にする血清フリー条件下で増殖せしめられる。

#### 【0172】

他方では、アデノウィルスベクター感染された293S細胞が、有意な量のタンパク質を生成するために、比較的高い細胞密度で、付着細胞として、又は懸濁培養において増殖せしめられ得る（Garnier など., Cytotechnol. 15: 145-55, 1994 を参照のこと）。いずれかのプロトコールにより、発現され、分泌された異種タンパク質が、細胞における発現されたタンパク質の素因に依存して、細胞培養物上清液、溶解物又は、膜画分から反復して単離され得る。感染された293S細胞生成プロトコールにおいては、分泌されていないタンパク質が効果的に得られる。

#### 【0173】

本発明の分子の活性は、細胞の増殖及び/又はその細胞への結合を側定する種々のアッセイを用いて測定され得る。Zalpha 31 - 依存性細胞における変化が特に興味の対象である。Zalpha 31 - 依存性である構築され得るべき適切な細胞系は、IL-3 - 依存性BaF3細胞系（Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot など., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986）、FDC - P1（Hapel など., Blood 64: 786-790, 1984）及びM07e（Kissなど., Leukemia 7: 235-240, 1993）を包含する。

#### 【0174】

しかしながら、他の成長因子 - 依存性細胞系、例えばFDC-P1（Hapel など., Blood 64: 786-790, 1984）及びM07e（Kissなど., Leukemia 7: 235-240, 1993）が、この目的のために適切である。成長因子 - 依存性細胞系は、公開された方法（例えば、Greenbergerなど., Leukemia Res. 8: 363-375, 1984; Dexterなど.,

in Baum など., Eds., Experimental Hematology Toda, 8<sup>th</sup> ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980) に従って確立され得る。

#### 【0175】

本発明のタンパク質は、造血機能及び免疫機能の関連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る。特に、 $\alpha$ 31ポリペプチドは、造血系の細胞、例えばT細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、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。造血細胞の増殖及び/又は分化は、培養された細胞を用いてインビトロで、又は本発明の分子を適切な動物モデル中に投与することによって、インビトロで測定され得る。細胞増殖又は分化を測定するアッセイは、当業者において良く知られている。

#### 【0176】

たとえば、増殖を測定するアッセイは、次のようなアッセイを包含する：中性赤色素に対する化学感受性(Caranaugh など., Investigational New Drugs 8: 347-354, 1990; 引用により本明細書に組み込まれる)、放射性ラベルされたヌクレオチドの組み込み(Cook など., Analytical Biochem. 179: 1-7, 1989; 引用により本明細書に組み込まれる)、増殖する細胞のDNAへの5-ブromo-2'-デオキシウリジン(BrdU)の組み込み(Porstmann など., J. Immunol. Methods 82: 169-179, 1985; 引用により本明細書に組み込まれる)、及びテトラゾリウム塩の使用(Mosmann, J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983; Alley など., Cancer Res. 48: 589-601, 1988; Marshall など., Growth Reg. 5: 69-84, 1995; 及びScudiero など., Cancer Res. 48: 4827-4833, 1988; すべては引用により本明細書に組み込まれる)。

#### 【0177】

分化を測定するアッセイは、たとえば組織の段階 - 特異的発現に関連する細胞表面マーカー、酵素活性、官能的活性、又は形態変化の測定を包含する(Watt, FASEB 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 1: 161-171, 1989; すべては引

用により本明細書に組み込まれる)。

#### 【0178】

リガンドとして、zalpha 31ポリペプチドの活性が、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、珪素に基づくバイオセンサーの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 Devices, Sunnyvale, CAにより製造されるCytosensor™マイクロフィジオメーターである。種々の細胞応答、例えば細胞増殖、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: 1906-1912, 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を参照のこと。

#### 【0179】

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。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zalpha 31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、zalpha 31ポリペプチドに反応しない対照の真核細胞と比較して、zalpha 31 - 反応性真核細胞の反応を測定するために使用される。

#### 【0180】

Zalpha 31 - 反応性真核細胞は、zalpha 31に対して反応性である細胞を創造するか、又は天然においてzalpha 31に対して反応性である細胞、例えば小腸、PBL、又は骨髄組織に由来する細胞を創造する、zalpha 31がトランスフェクトされている細胞を包含する。zalpha 31に暴露されていない対照と比較して、zalpha 31に暴露されている細胞の反応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、zalpha 31 - 調節された細胞反応の直接的に測定である。さらに、そのようなzalpha 31 - 調節された反応は、種々の刺激下でアッセイされ得る。

。

## 【0181】

マイクロフィジオメーターを用いれば、zalpha 31ポリペプチドに対する応答性の細胞を供給し、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、zalpha 31ポリペプチドのアゴニストを同定するための方法が提供される。細胞応答の変化は、測定できる変化の細胞外酸性化割合として示される。さらに、zalpha 31ポリペプチドの存在及び試験化合物の不在下での前記細胞の第3部分の培養が、zalpha 31 - 応答性細胞のための陽性対照として、及びzalpha 31ポリペプチドのアゴニスト活性と試験化合物のその活性とを比較するための対照として使用され得る。

## 【0182】

さらに、マイクロフィジオメーターを用いれば、zalpha 31ポリペプチドに対する応答性の細胞を供給し、前記細胞の第1部分をzalpha 31の存在下で及び試験化合物の不在下で培養し、前記細胞の第2部分をzalpha 31の存在下で及び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、zalpha 31ポリペプチドのアンタゴニストを同定するための方法が提供される。細胞応答の変化は、測定できる変化の細胞外酸性化割合として示される。zalpha 31ポリペプチド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。

## 【0183】

さらに、zalpha 31は、zalpha 31により刺激された経路に対して応答する、細胞、組織又は細胞系を同定するために使用され得る。上記マイクロフィジオメーターは、リガンド - 応答細胞、例えば本発明のzalpha 31に対する応答性の細胞を同定するために使用され得る。細胞は、zalpha 31ポリペプチドの存在又は不在下で培養され得る。Zalphi 31の存在下で細胞外酸性化の測定できる変化を誘発するそれらの細胞は、zalphi 31に対して応答性である。そのような細胞系は、上記のようなzalphi 31ポリペプチドのアンタゴニスト及びアゴニストを同定

するために使用され得る。

【0184】

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。また、前立腺癌についての処理のためにも有用である。Zalpha 31活性のインヒビター (zalpha 31アンタゴニスト) は、抗 - zalpha 31抗体、及び可溶性zalpha 31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。

【0185】

zalpha 31はまた、その活性のインヒビター (アンタゴニスト) を同定するためにも使用され得る。試験化合物は、zalpha 31の活性を阻害する化合物を同定するために、本明細書に開示されるアッセイに添加される。本明細書に開示されるそれらのアッセイの他に、サンプルは、受容体結合を測定するよう企画された種々のアッセイ内のzalpha 31活性の阻害、又はzalpha 31 - 依存性細胞応答の刺激 / 阻害について試験され得る。例えばzalpha 31 - 応答性細胞系は、zalpha 31 - 刺激された細胞経路に応答するレポーター遺伝子構造体によりトランスフェクトされ得る。

【0186】

このタイプのレポーター遺伝子構造体は、当業界において知られており、そして一般的に、アッセイできるタンパク質、例えばルシフェラーゼをコードする遺伝子に作用可能に連結されるzalpha 31 - DNA応答要素を含むであろう。DNA応答要素は、サイクリックAMP応答要素 (CRE)、ホルモン応答要素 (HRE)、インスリン応答要素 (IRE) (Nasrin など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5273 - 7, 1990) 及び血清応答要素 (SRE) (Shaw など., Cell 56: 563 - 72, 1989) を包含するが、但しそれらだけには限定されない。サイクリックAMP応答要素は、Roestler など., J. Biol. Chem. 263 (19): 9063 - 6, 1988及びHabener, Molec. Endocrinol. 4 (8): 1087 - 94, 1990に再考される。

【0187】

ホルモン応答要素は、Beato, Cell 56: 335 - 441, 1989に再考される。候補体化合物、溶液、混合物又は抽出物は、レポーター遺伝子発現のzalpha 31刺激の

低下により明らかなように、標的細胞に対する $\alpha$ 31の活性を阻害する能力について試験される。このタイプのアッセイは、細胞 - 表面受容体に結合する $\alpha$ 31を直接的にブロックする化合物、及びこの受容体 - リガンド結合に続く細胞経路における工程をブロックする化合物を検出するであろう。

【0188】

他方では、化合物又は他のサンプルが、検出できるラベル（例えば $^{125}\text{I}$ 、ビオチン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、FITC、及び同様のもの）により標識される $\alpha$ 31を用いて、受容体への $\alpha$ 31結合の直接的なブロッキングについて試験され得る。このタイプのアッセイにおいては、受容体へのラベルされた $\alpha$ 31の結合を阻害する試験サンプルの能力は、二次アッセイを通して確かめられ得る阻害活性の表示である。結合アッセイ内に使用される受容体は、細胞受容体、又は単離され、固定された受容体であり得る。

【0189】

$\alpha$ 31ポリペプチドは、免疫グロブリンH鎖不変領域、典型的には2つの不変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5,155,027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、ここで前記分子においては、Fc部分はお互いに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に接近して配列されている。このタイプの融合体は、リガンドを精製するために使用され得る。アッセイへの使用のためには、キメラは、Fc領域を通して支持体に結合され、そしてELISA形に使用される。

【0190】

$\alpha$ 31リガンド - 結合ポリペプチドはまた、リガンドの精製のためにも使用される。 $\alpha$ 31ポリペプチドは、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。

【0191】

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。

#### 【0192】

リガンド-結合受容体(又は抗体、補体/抗補体対の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(BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ)を用いるアッセイシステムが、好都合には、使用され得る。そのような受容体、抗体、補体/抗補体対のメンバー、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。

#### 【0193】

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繊維に共有結合される。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こす。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。

#### 【0194】

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, 194

9) 及び熱量測定アッセイ (Cunningham など., Science 253: 545 - 48, 1991; Cunningham など., Science 245: 821 - 25, 1991) を包含する。

【0195】

Zalpha 31ポリペプチドはまた、zalpha 31エピトープ、ペプチド又は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。Zalpha 31ポリペプチド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剤(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zalpha 31ポリペプチド(例えば、配列番号2)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を含むことを認識するであろう。Zalpha 31ポリペプチドの大きな部分、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。

【0196】

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、アジュバンド及びキャリアーを含むことができる。適切な抗原は、配列番号2のアミノ酸番号1(Met)~アミノ酸番号142(Arg)によりコードされる成熟zalpha 31ポリペプチド、又は連続した9~122個のそのアミノ酸フラグメントを含む。他の適切な抗原は、本明細書に開示されるように、ヘリックスドメイン、細胞外ドメイン、モチーフ、領域、エピトープ、等を包含する。抗原として使用するための好ましいペプチドは、親水性ペプチド、例えば疎水性プロットから、当業者により推定されるそれらのペプチドである。Zalpha 31親水性ペプチドは、例えば埋もれたG、S及びT、及び暴露されたH、Y及びW残基が無視される、スライド性6-残基鏡に基づいて、Hopp/Woods親水性プロフィールから決定される、それらの予測される6個のアミノ酸抗原性エピトープから成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るペプチドを包含する。

【0197】

例えば、zalpha 31においては、適切な親水性領域は、

- (1) 配列番号2のアミノ酸残基14(Asp)~19(Asp);
- (2) 配列番号2のアミノ酸残基26(Ala)~31(Glu);

- (3) 配列番号2のアミノ酸残基27 (Glu) ~ 32 (Pro) ;
- (4) 配列番号2のアミノ酸残基136 (Tyr) ~ 141 (Lys) ; 及び
- (5) 配列番号2のアミノ酸残基137 (Lys) ~ 142 (Arg) を包含する。

**【0198】**

適切な親水性ペプチドはまた、Jameson-Wolfプロットから推定されるそれらの抗原性エピトープも包含し、そして

- (1) 配列番号2のアミノ酸残基11 (Thr) ~ 20 (Asp) ;
- (2) 配列番号2のアミノ酸残基60 (Ser) ~ 64 (Lys) ;
- (3) 配列番号2のアミノ酸残基88 (Ser) ~ 96 (Gln) ;
- (4) 配列番号2のアミノ酸残基127 (Ala) ~ 135 (Lys) ; 及び
- (5) 配列番号2のアミノ酸残基127 (Ala) ~ 139 (Leu) を包含する。

**【0199】**

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。

**【0200】**

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、 $\alpha$ 31ポリペプチド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。 $\alpha$ 31ポリペプチドの免疫性は、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。

**【0201】**

免疫化のために有用なポリペプチドはまた、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 $\alpha$ 31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、高分子キャリアー（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。

#### 【0202】

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、ヒト骨格及び不変領域上に非ヒト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。

#### 【0203】

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。

#### 【0204】

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 - zalpha 31抗体が対照（非 - zalpha 31）ポリペプチド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、zalpha 31ポリペプチド、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、 $10^6\text{M}^{-1}$ 又はそれ以上、好ましくは $10^7\text{M}^{-1}$ 又はそれ以上、より好ましくは $10^8\text{M}^{-1}$ 又はそれ以上、及び最も好ましくは $10^9\text{M}^{-1}$ 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。

#### 【0205】

抗 - zalpha 31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、標準のウェスタンブロット分析を用いて、zalpha 31ポリペプチドであるが、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（例えば、他の4 - ヘリックス束サイトカイン）である。スクリーニングはまた、非ヒトzalpha 31及びzalpha 31変異体ポチペプチドを用いて行われ得る。さらに、抗体は、zalpha 31ポリペプチド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”。

#### 【0206】

例えば、zalpha 31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；zalpha 31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）。

## 【0207】

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-zalpha 31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。

## 【0208】

当業者に知られている種々のアッセイがzalpha 31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 Spring 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ンブロットアッセイ、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zalpha 31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。

## 【0209】

本明細書において有用な抗体を生成するか又は選択するための他の技法は、インビトロで、zalpha 31タンパク質又はペプチドにリンパ球を暴露し、そしてファージ又は類似するベクターにおける抗体表示ライブラリーを選択すること(例えば、固定された又はラベルされたzalpha 31タンパク質又はペプチドの作用を通して)を包含する。可能性あるzalpha 31ポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ(ファージ表示)又は細菌、例えばE. コリ上に表示されるランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。

## 【0210】

前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多くの手段、例えばラン

ダム突然変異誘発及びランダムポリヌクレオチド合成を通して得られる。それらのランダムペプチド表示ライブラリーは、タンパク質又はポリペプチドであり得る既知の標的物、例えばリガンド又は受容体、生物学的又は合成高分子、又は有機又は無機物質と相互作用するペプチドについてスクリーンするために使用され得る。

#### 【0211】

そのようなランダム ペプチド表示ライブラリーを創造し、そしてスクリーニングするための技法は、当業界において知られており (Ladner など., アメリカ特許第5,223,409号; Ladner など., アメリカ特許第4,946,778号; Ladner など., アメリカ特許第5,403,484号及びLadner など., アメリカ特許第5,571,698号、及びKayなど., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996) )、そしてランダムペプチド表示ライブラリー及びそのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、例えばClontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 及びPharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ) から市販されている。

#### 【0212】

ランダムペプチド表示ライブラリーは、 $\alpha$ 31に結合するタンパク質を同定するために、本明細書に開示される $\alpha$ 31配列を用いてスクリーンされ得る。 $\alpha$ 31ポリペプチドと相互作用するそれらの“結合ポリペプチド”は、細胞を標識するために; 親和性精製により相同体ポリペプチドを単離するために使用され得る; それらは薬物、トキシン、放射性核種及び同様のものに直接的にまたは間接的に接合され得る。それらの結合ポリペプチドはまた、分析方法に、例えば発現ライブラリーをスクリーニングし、そして活性を中和するために、例えばリガンドと受容体又は受容体に結合するウイルスとの間の相互作用を阻止するためにも使用され得る。

#### 【0213】

結合ポリペプチドはまた、 $\alpha$ 31ポリペプチドの循環レベルを決定するために; 根本的な病理学又は疾病のマーカーとして可溶性 $\alpha$ 31ポリペプチド

を検出し又は定量化するために、診断アッセイにも使用され得る。それらの結合ポリペプチドはまた、zalpha 31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、zalpha 31 “アンタゴニス”として使用することができる。それらの抗-zalphi 31結合ポリペプチドは、zalphi 31活性又はタンパク質を阻害するために有用である。

#### 【0214】

Zalphi 31に対する抗体は、zalphi 31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zalphi 31を単離するために；zalphi 31ポリペプチドの循環レベルを決定するための診断アッセイのために；根本的な病理学のマーカーとして可溶性zalphi 31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；及びインビトロ及びインビボでzalphi 31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。

#### 【0215】

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、zalphi 31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ブロット又は他のアッセイにおいて、変性されたzalphi 31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。

#### 【0216】

生物活性接合体：

本明細書における抗体又はポリペプチドはまた、薬剤、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る。例えば、本発明のポリペプチド

又は抗体は、対応する抗 - 相補的分子（例えば、それぞれ受容体又は抗原）を発現する組織又は器官を同定し、又は処理するために使用され得る。より特定には、 $\alpha$  31ポリペプチド又は抗 -  $\alpha$  31抗体、又はその生物活性フラグメント又は一部が、検出可能な又は細胞毒性の分子に連結され、そして抗 相補性分子を発現する細胞、組織又は器官を有する哺乳類に供給され得る。

#### 【0217】

適切な検出可能分子は、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、ジフテリア毒素、プソイドモナス内毒素、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又はイットリウム - 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。

#### 【0218】

ポリペプチド又は抗体はまた、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、ピオチン/ストレプタビジンが典型的な相補的/抗相補的対である。

#### 【0219】

もう一つの態様においては、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クルを表す。

#### 【0220】

もう1つの態様においては、 $\alpha$ 31 - サイトカイン融合タンパク質又は抗体 - サイトカイン融合タンパク質は、 $\alpha$ 31ポリペプチド又は抗 -  $\alpha$ 31抗体が過剰増殖性血液、又は骨髄細胞を標的化する場合、標的組織（例えば、血液、骨髄癌）のインビボ殺害を増強するために使用され得る（一般的には、Hornickなど., Blood 89: 4437-4447, 1997を参照のこと）。記載される融合タンパク質は、作用の所望する部位へのサイトカインの標的化を可能にし、それにより、サイトカインの高められた局部濃度を提供する。

#### 【0221】

適切な $\alpha$ 31ポリペプチド又は抗 -  $\alpha$ 31抗体は、所望しない細胞又は組織（例えば、腫瘍又は白血病）を標的化し、そして融合されたサイトカインはエフェクター細胞による改良された標的細胞溶解を仲介する。例えば、この目的のための適切なサイトカインは、インターロイキン - 2及び顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子（GM - CSF）を包含する。

#### 【0222】

さらにもう1つの態様においては、 $\alpha$ 31ポリペプチド又は抗 -  $\alpha$ 31抗体が血管細胞又は組織を標的化する場合、そのようなポリペプチド又は抗体は、再狭窄を低めるために、放射性核種、及び特に 線発光放射性核種により接合され得る。そのような治療アプローチは、放射性治療を管理する臨床医にほとんど危険性を与えない。例えば、必要とされる放射線用量が供給されるまで、患者のステント管中に配置されるイリジウム - 192含浸されたりボンは、管における低められた組織増殖、及びプラシーボリボンを受けた対照グループよりも大きな管腔直径を示した。さらに、再血管形成及びステント血栓症は、処理グループにおいて有意に低かった。類似する結果が、本明細書に記載されるように、放射性核種を含む生物活性接合体の標的化により予測される。

#### 【0223】

本明細書に記載される生物活性ポリペプチド又は抗体接合体は、静脈内、動脈

内又は管内供給され得、又は作用の意図された部位に局部的に導入され得る。

本発明の分子は、精子形成、ステロイド形成、精巣分化、及び視床下部 - 下垂体 - 生殖腺軸、甲状腺、心臓及び副腎機能の調節に關与する受容体を同定し、そして単離するために使用され得る。例えば、本発明のタンパク質及びペプチドがカラム上に固定され、そして膜調製物がそのカラム上に通される (Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson など., eds., Academic Press, San Diego, CA, 1992, pp.195-202)。

#### 【0224】

タンパク質及びペプチドがまた、放射性ラベルされ (Methods in Enzymol., vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, ed., Acad. Press, San Diego, 1990, 721-737)、又は光親和性ラベルされ (Brunner など., Ann. Rev. Biochem. 62: 483-514, 1993及びFedan など., Biochem. Pharmacol. 33: 1176-1180, 1984)、そして特定の細胞 - 表面タンパク質が同定され得る。

#### 【0225】

本発明の分子は、生殖システム、甲状腺、副腎、心臓及び免疫系の障害を試験するために有用であろう。

zalpha 31は、推定上のシグナルペプチドリーダー配列及びヘリックス構造を有する新規ポリペプチドを表す。従って、この遺伝子は、それが4 - ヘリックス束サイトカインファミリーのメンバーであることを示す二次構造を有する、分泌されたポリペプチドをコードすることができる。他方では、このポリペプチドは、他の生物学的機能に關連する他の活性、例えば酵素活性、細胞膜との会合、又はキャリアータンパク質としての機能を有することができる。

#### 【0226】

ほとんどの4 - ヘリックス束サイトカイン、及び活性化されたTリンパ球により生成される他のタンパク質は、細胞分化、活性化、レクルートメント及び身体を通しての細胞のホメオスタシスにおいて重要な生物学的役割を演じる。治療的利用性は、免疫調節を必要とする疾病、例えば自己免疫疾患、例えばリウマチ様関節炎、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス及び及び糖尿病の処理を包含する。

## 【0227】

zalpha 31は、炎症の調節において重要であり、そして従って、リウマチ様関節炎、ぜん息及びセプシスの処理において有用である。腫瘍形成に介在することにzalpha 31の役割が存在し、そして従って、癌の処理において有用である。zalpha 31は、移植片拒絶を低めるために重要である免疫系の抑制において可能性ある治療剤であり得る。他方では、zalpha 31は、感染性疾病に対する免疫性を高めることにおいて又はワクチンを改良することにおいて重要である免疫系を活性化することができる。

## 【0228】

甲状腺機能不全及びいくつかの現在関連する治療は、インビボで骨に対する有害な効果を誘発する。従って、本発明の甲状腺及び下垂体局在化が与えられる場合、骨形成及び/又は吸収を測定するアッセイは、zalpha 31活性を評価するために重要なアッセイである。1つの例は、カルシトニン受容体を発現する細胞上に選択的カルシトニン受容体活性を有する物質の急速な同定を可能にするアッセイシステムである。

## 【0229】

カルシトニン受容体は、G-タンパク質受容体ファミリーのメンバーであり、そしてアデニル酸シクラーゼの活性化を通してシグナルを形成導入し、細胞cAMPレベルの上昇を導く(Linなど., Science 254: 1022-24, 1911)。このアッセイシステムは、カルシトニン受容体を刺激し、そしてシグナルトランスダクションを開始できる他の分子を検出するための手段としてcAMPレベルを上昇する受容体の能力を利用する。骨形成及び吸収を測定する他のアッセイは、頭蓋冠アッセイ、QCT、及び骨芽細胞サイズおよび数を測定するアッセイを包含する。そのようなアッセイは、当業界において知られており、そして下記に論じられる。

## 【0230】

受容体活性化は、(1) アデニル酸シクラーゼ活性化の測定により(Salomonなど., Anal. Biochem. 58: 541-48, 1974; Alvarez and Daniels, Anal. Biochem. 187: 98-103, 1990); (2) 従来のラジオイムノアッセイ方法を用いての細胞内cAMPレベルの変化の測定により(Steinerなど., J. Biol. Chem. 247; 1

106-13, 1972; Harper and Brooker, J. Cyclic Nucl. Res. 1: 206-18, 1975);  
又は(3) cAMPシンチレーション近似アッセイ (SPA) 方法 (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) の使用を通して検出され得る。それらの方法は、感  
敏性及び正確性を提供するが、それらは、アッセイの前、相当のサンプル処理を包含し、時間の浪費であり、放射性同位体の使用を包含し、そして大規模なスクリーニングアッセイのためには厄介である。

#### 【0231】

他のアッセイシステムは、アメリカ特許第5,622,839号、第5,674,689号、及び第5,674,981号に記載のように、カルシトニン受容体を発現する細胞において高められたcAMPレベルの結果としてcAMP応答要素 (CRE) - ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を誘発できるポリペプチドの選択を包含するが、しかしカルシトニン受容体発現を欠いている細胞においてはそうではない。

#### 【0232】

十分に確立された動物モデルが、カルシトニン受容体と相互作用する $\alpha$ 31ポリペプチド、アゴニスト又はアンタゴニストのインビボ効能を試験するために利用できる。さらに、それらのモデルは、カルシトニン受容体を通してよりも他の骨に対する $\alpha$ 31の効果を試験するために使用され得る。例えば、低カルシウム血症のラットモデルが、血清カルシウムに対する効果を決定するために使用され得、そして卵巣摘出されたラット又はマウスはオステオポロシスのためのモデル系として使用され得る。

#### 【0233】

それらのモデル及びヒトにおいて、エストロゲン欠失の初期段階の間、見出される骨の変化は性質的に類似する。カルシトニンは、卵巣摘出された女性及びラットにおいて骨の欠失の防止のための効果的剤であることが示されている (Mazzuoliなど., Calcif. Tissue Int. 47: 209-14, 1990; Wronskなど., Endocrinology 129: 2246-50, 1991)。高い用量のエストロゲンは、卵巣摘出されたマウスモデルにおいて骨吸収を阻害し、そして骨形成を刺激することが示されている (Bainなど., J. Bone Miner. Res. 8:435-42, 1993)。

#### 【0234】

従って、カルシトニン受容体と相互作用し又は骨に対して他の効果を付与する本発明の生物学的活性の $\alpha$ 31ポリペプチド、アゴニスト又はアンタゴニストは、カルシトニンが有用である治療用途への使用のために好都合であるよう企画される。そのような用途は、オステオポロシス、Paget病、上皮小体亢進症、骨軟化症、幼児の特発性低カルシウム血症及び他の状態においてである。追加の用途は、急性膵炎及び胃腸障害の処理における胃分泌を阻害するためであり、そして特に、骨の見た目の鎮痛剤としての使用である。

#### 【0235】

骨形成速度の変化を測定するためのインビボアッセイは、骨組織学 (Recker, R. eds. Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation Boca Raton: CRC Press, Inc., 1983を参照のこと) 及び定量的に計算された断層撮影法 (QC T; Ferretti, J. Bone 17: 353S-364S, 1995; Orphanoludakis など., Investig. Radiol. Radiol. 14: 122-130, 1979; 及びDurandなど., Medical Physics 19: 569-573, 1992) の実施を包含する。骨形成における変化を測定するための典型的なエクソビボアッセイは、頭蓋冠アッセイ (Gowenなど., J. Immunol. 136: 2478-2482, 1986)、又は吸収頭蓋冠アッセイ (Linkhart, T. A. and Mohan, S., Endocrinology 125: 1484-1491, 1989) である。

#### 【0236】

さらに、本発明のポリペプチドは、炎症を改善するそれらの能力についてアッセイされ、そして使用され得る。 $\alpha$ 31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、そして本明細書において論じられる。例えば、cAMP生成の抑制は、抗-炎症効果の表示である (Nihei, Y., など., Arch. Dermatol. Res., 287: 546-552, 1995)。cAMPの抑制、及びケラチノサイトにおけるIFN- $\gamma$ により誘発されるICAM及びHLA-Drの阻害が、炎症の阻害を評価するために使用され得る。他方では、cAMP生成の増強、及びこのシステムにおけるICAM及びHLA-Drの誘発は、タンパク質の前炎症性効果の測定であり得る。

#### 【0237】

$\alpha$ 31は同様に、インビボで示されるように(例8)、類似する炎症効果

を示すことができ、そしてそれが発現される組織、及び他の組織においてそれらの効果を発揮する。例えば、 $\alpha$  31は、結腸において発現され、この組織における治癒の促進において有用であり、又は抗 - 細菌又は抗 - ウィルス効果を示す。さらに、 $\alpha$  31又はそのアンタゴニストは、炎症性腸疾患、憩室炎、腸の手術の間及び後で炎症及び同様のものの処理において有用である。

#### 【0238】

さらに、甲状腺において発現される $\alpha$  31は、甲状腺の外部の組織、例えば心臓、脳、肝臓、腎臓及び同様のものにおける創傷 - 治癒又は抗微生物又は抗ウィルス作用を有することができる。さらに、 $\alpha$  31ポリペプチド及び $\alpha$  31抗体は、メラノーマ、炎症性腸疾患、憩室炎、ぜん息、骨髄炎症疾患 (PID)、乾癬、関節炎、再灌流虚血症、及び他の炎症性疾患の診断において有用である。さらに、 $\alpha$  31又はそのアンタゴニストは、心筋炎、アテローム硬化症、骨髄炎症疾患 (PID)、乾癬、関節炎、湿疹、硬皮症及び他の炎症性疾患の処理において有用である。

#### 【0239】

$\alpha$  31ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストは、炎症性疾患、例えば喘息及び関節炎に使用され得る。例えば、 $\alpha$  31が前炎症性アンタゴニストである場合、それは、リンパ球の移動が損傷を及ぼす、ぜん息の治療又は他の抗 - 炎症性治療において価値がある。さらに、 $\alpha$  31は、肺機能、例えば気管支拡張、組織弾性、肺感染及び損傷におけるリンパ球の回復において重要な役割を演じることができる。

#### 【0240】

肺細胞における $\alpha$  31の活性を評価するためのアッセイは、次の文献に論じられている：Laberge, S. など., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17: 193-202, 1997; Rumsaeny, V. など., *J. Immunol.*, 159: 2940-2910, 1997; 及びSchluesener, H.J. など., *J. Neurosci. Res.* 44: 606-611, 1996。  $\alpha$  31又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの前炎症性及び抗炎症性性質を決定するための方法は当業界において知られている。さらに、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他の分子生物、免疫学及び生化学的技法が、 $\alpha$

31活性を決定し、そしてアゴニスト及びアンタゴニストを単離するために使用され得る。

#### 【0241】

zalpha 31についてのノザンブロック（例2）は遺伝子の相対的偏在分布を示すが、電子ノザンは非常に有益である。入手できるESTデータベースの大きなサイズは、データにおける遺伝子、例えばzalpha 31の発生率がそれぞれのライブラリーに見出される発現レベルを示唆するよう存在する（すなわち、まれに調節された遺伝子はほとんどのライブラリーにおいて過少表示され、ところが非常に豊富な又は誘発性遺伝子は高いコピー数を有する）。

#### 【0242】

zalpha 31についてのデータは、B-細胞（扁桃）、及び単球/マクロファージ/樹状突起系のそれらの細胞において（“正常な”誘発されていない状態における偏在性分布と一致する）及び特に前炎症性刺激、例えばPMA、TNF又はLPSによる処理に続いて有力である高い誘発性の遺伝子を示す。この結論は、次の組織における予測される頻度よりも高い頻度でのその存在に基づかれる：胚中央のB細胞（扁桃）ライブラリー、他発性硬化症病変；刺激されたTHP-1細胞（前-単球系）；及び末梢血液樹状突起細胞（刺激されている）。前記遺伝子はまた、T-細胞系（刺激されている）及び末梢血液単核細胞（刺激されている）、胎児肝臓CD34<sup>+</sup>前駆体細胞、及び炎症現象に関連する傾向を示す変形性関節症患者からの軟膏つにも見出された。

#### 【0243】

さらに、神経起源の組織（正常及び疾病）及び分化された細胞系（ニューロン）のライブラリーに見出されるお有意な数のESTが存在した。疾病関連性は、多発性硬化症、ハンチントン病、グリオーシス、多星状細胞腫、脳腫瘍（例えば、副腎腫）、及び脊髄/リンパ腫に関して明らかにされ、ここでそれらのzalpha 31がそれらの疾病に関連する活性化された免疫応答に関連している。

#### 【0244】

他の前炎症性サイトカインは、脳腫瘍により生成され、MS損傷に見出され、そして他の神経障害を示す（Fontana, A. など., J. Immunol. 132: 1837-1844, 1

984; Suarez, GA, など., Neurology 46: 559-561, 1996)。さらに、単一のサイトカインにおける異常性が、神経学的組織への免疫細胞浸潤を誘発することによって、神経学的疾病 (Hanisch, UK. など., Synapse 24: 104-114, 1996; Sugita, Y など., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 58: 480-488, 1999); 又は神経学的及び免疫疾患 (Zhu, J. など., J. Neurol. Sci. 125: 132-137, 1994; Zhu, J. など., J. Neurosci. Res. 54: 373-381, 1998) を誘導することができる。

#### 【0245】

さらに、 $\alpha 31$ のアンタゴニストは、抗 - 炎症剤であることが予測される。アゴニスト及びアンタゴニストは、広範囲の神経疾患、例えばMS又はハンチントン病に対して有用であり、サイトカイン - 放射性核種 (又は類似物) は神経腫瘍に対して有用である。さらに、 $\alpha 31$ は、その効果を発揮することにおいて、間接的に又は他のサイトカインと組合して作用することができる。例えば、インターフェロン、IL - 1又はIL - 2は、炎症成分が存在する疾病を悪化される。種々のサイトカインの組合された効果を解離するか又は阻止する $\alpha 31$ アンタゴニストもまた有用である。

#### 【0246】

さらに、下記で論じられるように、 $\alpha 31$ について染色体局在化部位で存在する“神経学的疾病クラスター”であることが明白である。これは、 $\alpha 31$ ポリペプチド、ポリヌクレオチド又は抗体は、神経疾患のための診断薬として、又はそのような疾病に対する遺伝子感受性を決定するために使用され得る。

#### 【0247】

本発明の分子は、心組織細胞、例えば心筋細胞又は筋芽細胞; 骨格筋又は筋芽細胞及び平滑筋; クロンドロサイト (chondrocytes); 内皮細胞; 脂肪細胞及び骨芽細胞のインビトロ増殖のために有用である。例えば、本明細書の分子は、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。本発明の分子は、培養物における筋細胞の増殖及び/又は進化を特異的に促進することにおいて特に有用であり、そしてまた心筋細胞過形成及

び再生の研究において有用であることがわかっている。

【0248】

本発明のポリペプチド、核酸及び/又は抗体は、心筋梗塞、うっ血性心不全、肥大型心筋症及び拡張型心筋症に関連する障害の処理に使用され得る。本発明の分子はまた、心臓発作に続く梗塞サイズの制限、心臓移植後の回復の助力、冠状側副循環を進行するために血管形成又は動脈内膜切除に続いての脈管形成及び創傷治療の促進、眼における再血管形成、不良な循環、例えば糖尿病性の足の潰瘍に関連する合併症、薬理学的方法を用いての冠状再灌流に続く発作、及び脈管形成が有益である他の微候のために有用である。本発明の分子は、心筋新生及び/又は過形成を誘発することによって、冠状側副進行を誘発することによって、又は壊死性心筋部分の再造系を誘発することによって、心臓機能を改良するために有用である。本発明のための他の治療用途は、骨格筋新生及び/又は過形成、腎臓再生の誘発、及び/又は全身性及び肺高血圧症の処理を包含する。

【0249】

Zalpha 31により誘発された冠状側副進行は、慢性冠状閉塞のモデルを用いて、ウサギ、イヌ又はブタにおいて測定される (Landauなど., Amer. Heart. J. 29: 924-931, 1994; Sellike など., Surgery 120 (2): 182-188, 1996; 及びLazarousなど., 1996, 前記)。発作を処理するためのzalpha 31の効能は、左右の頸動脈閉塞を用いて、及び組織学的変化及び迷路パフォーマンスを測定することによって、ラットにおいてインビボで試験される (Gageなど., Neurobiol. Aging 9: 645-655, 1988)。高血圧におけるzalpha 31の効能が、全身性高血圧に関する自発的高血圧ラット (SHR) を用いて、インビボで試験される (Marcheなど., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl. 1: S114-116, 1995)。

【0250】

さらに、甲状腺における高い発現に基づけば、zalpha 31ポリペプチドは、宿主細胞 (例えば、T-細胞) 上のその受容体を通して特定のシグナル化によりウイルス複製を阻害することによって抗ウイルス機能を示すことができる。Zalpha 31は、本明細書に開示されるように、免疫細胞増殖活性 (例8を参照のこと) を示すことができ、本明細書に開示されるように、この活性についてアッセイす

ることができ、そしてウイルス感染を攻撃するために、免疫系を刺激することができる。さらに、zalpha 31は、CD4又はもう1つのリンパ球受容体を結合することができ、そして例えば、ヒト免疫欠損ウイルス(HIV)又はヒトT-細胞リンパ向性ウイルス(HTLV)に対して抗ウイルス効果を示すことができる。

#### 【0251】

他方では、zalpha 31ポリペプチドは、ウイルス感染を阻止するために、ウイルス受容体又は補助受容体と競争することができる。zalpha 31は、ウイルス感染を防げるために、又は進行中のウイルス複製及び再感染を低めるために後天的に与えられ得る(Gayowski, T. など., Transplantation 64; 422-426, 1997)。従って、zalpha 31は、例えばウイルス性白血球(HTLV)、AIDS(HIV)、又は例えば、ロタウイルス、カリチウイルス(例えば、Horwalk Agent)及び病原性アデノウイルスの一定株により引き起こされる胃腸ウイルス感染のための抗ウイルス治療剤として使用され得る。

#### 【0252】

zalpha 31調節された直接的及び間接的炎症は、当業界における方法によりアッセイされ得る。例えば、Hamada, T. など., J. Exp. Med. 188: 539-548, 1998; 及びLiu, L. など., J. Immunol. 161: 3064-3070, 1998を参照のこと。例えば、zalpha 31ポリペプチドの前炎症効果は、Transwell™ (Costar) を用いて、アッセイにおいて間接的に試験され得、ここで内皮細胞が半透膜上にプレートされ、そしてzalpha 31ポリペプチドがトランスウェルの下方チャンバーに存在し、そしてCr<sup>51</sup>又は蛍光ラベルされた好中球(PMN)、リンパ球、HL60細胞、K562細胞又は同様のものがトランスウェルの上方チャンバー上に添加される。

#### 【0253】

zalpha 31ポリペプチドの存在下でのトランスウェルの下方チャンバーへのPMN及び同様のもの移動(但し、その不在下(負の対照)では移動は存在しない)が、PMNの直接的化学誘発物のzalpha 31ポリペプチドを示す。さらに、IL-8は、正の対照としてこのアッセイにおいて使用される。炎症応答の間接的刺激物としてのzalpha 31を試験するために、類似する方法が使用され得る。例えば、実験は上記のようにして設定され得、ここでトランスウェルの下方チャンバー上での

zalpha 31の存在の他に、線維芽細胞又は脂肪細胞がそこにプレートされる。

【0254】

この場合、PMNの移動を増強する因子を分泌するそれらの細胞の誘発におけるzalpha 31ポリペプチドの効果、すなわち炎症が測定され得る。bFGFが間接的アッセイのための正の対照として使用され得る。zalpha 31ポリペプチドの抗-炎症効果がまた、当業界において知られている類似するトランスウェルアッセイを用いて、PMNの存在下で上方チャンバー上に添加される場合、測定され得る。

【0255】

本発明の分子の活性は、zalpha 31の甲状腺外活性の可能性ある効果に基づいて、心臓細胞の再生又は過形成（すなわち、増殖）を測定する種々のアッセイを用いて、測定され得る。本発明のポリペプチドにたぶん関連する追加の活性は、直接的又は間接的に他の成長因子を通しての内皮細胞、心筋細胞、線維芽細胞、骨格筋の増殖；内皮細胞、線維芽及び/又は食細胞のための走化性因子としての作用；骨形成因子；及び間葉幹細胞及び前駆体集団を拡張するための因子を包含する。

【0256】

増殖は、培養された心臓細胞を用いて、又は適切な動物モデルへの本発明の分子の投与によりインビボで測定され得る。一般的に、増殖効果は、細胞数の上昇として見られ、そしてアポトーシスの阻害及び有糸分裂誘発の刺激を包含する。それらのアッセイへの使用のための培養された細胞は、一次培養物からの心臓線維芽細胞、心筋細胞、骨格筋細胞及びヒト臍静脈内皮細胞を包含する。適切な確立された細胞系は次のものを包含する：NIH 3T3線維芽細胞（ATCC No. CRL-1658）、CHH-1サケ心臓細胞（ATCC No. CRL-1680）、H9c2ラット心臓筋芽細胞（ATCC No. CRL-1446）、Shionogi乳癌細胞（Tanakaなど., Proc. Natl. Acad. Sci 89: 8928-8932, 1992）、及びLNCap. FGC腺癌細胞（ATCC No. CRL-1740）。細胞増殖を測定するアッセイは、当業者において良く知られている。

【0257】

たとえば、増殖を測定するアッセイは、次のようなアッセイを包含する：中性赤色素に対する化学感受性（Caranaugh など., Investigational New Drugs 8:

347-354, 1990)、放射性ラベルされたヌクレオチドの組み込み (Cook など., Analytical Biochem. 179: 1-7, 1989)、増殖する細胞のDNAへの5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) の組み込み (Porstmann など., J. Immunol. Methods 82: 169-179, 1985)、及びテトラゾリウム塩の使用 (Mosmann, J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983; Alley など., Cancer Res. 48: 589-601, 1988; Marshall など., Growth Reg. 5: 69-84, 1995; 及びScudiero など., Cancer Res. 48: 4827-4833, 1988)。

#### 【0258】

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。

#### 【0259】

筋細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、クロンドロサイト、腺維芽細胞及び網様細胞は、通常の間葉幹細胞に起因すると思われる (Owen など., Ciba Fdn. Symp. 136: 42-46, 1988)。間葉幹細胞のためのマーカーはまだ十分には同定されておらず (Owen など., J. of Cell Sci. 87: 731-738, 1987)、その結果、同定は、通常、前駆体及び成熟細胞段階で行われる。初期段階心筋細胞前駆体細胞 (しばしば、心筋細胞幹細胞として言及される) の存在は、成人心臓組織において、推定されているが、しかしまだ示されてはいない。本発明の新規ポリペプチドは、間葉幹細胞及び心筋細胞前駆体細胞を、インビボ及びエクスピボの両方で単離するための研究のために有用である。

#### 【0260】

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。従って、本発明は、筋細胞、平滑筋細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、クロンドロサイト、及び内皮細胞の増殖の刺激または阻害を包含する。本発明の分子は、心筋細胞の増殖又は分化を刺激すると共に、脂肪細胞の増殖又は分化を、通常の前駆体/幹細胞に対するそれらの効果により阻害することができる。従って、本発明の分子は、軟骨肉腫、アテローム硬化症、再狭窄及び肥満症の阻害に使用できる。

#### 【0261】

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変化の段階 - 特異的発現に関連する細胞 - 表面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)。

#### 【0262】

心臓再生又は過形成を評価するためのインビボアッセイは、本発明の分子による新生児及び成熟ラットの処理を包含する。その動物の心臓機能は、心拍数、血圧及び左心室機能を決定するための心臓出力として測定される。心臓機能低下又は改良点を評価するための検死方法は次のものを包含する：高められた又は低められた心臓重量、核/細胞質体積、及び増殖する細胞核抗原 (PCNA) 対細胞質アクチンレベルを決定するための心臓組織学的切片の染色 (Quainiなど., Circulation Res. 75: 1050-1063, 1994 及びReissなど., Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 8630-8635, 1996)。

#### 【0263】

本発明のタンパク質は、造血機能及び免疫機能の関連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る。特に、 $\alpha$ 31ポリペプチドは、造血系の細胞、例えばT細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、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。造血細胞の増殖及び/又は分化は、

培養された細胞を用いてインビトロで、又は本発明の分子を適切な動物モデル中に投与することによって、インビトロで測定され得る。

#### 【0264】

細胞増殖又は分化を測定するアッセイは、当業者において良く知られている。たとえば、増殖を測定するアッセイは、次のようなアッセイを包含する：中性赤色素に対する化学感受性 (Caranaugh など., *Investigational New Drugs* 8: 347-354, 1990; 引用により本明細書に組み込まれる)、放射性ラベルされたヌクレオチドの組み込み (Cook など., *Analytical Biochem.* 179: 1-7, 1989; 引用により本明細書に組み込まれる)、増殖する細胞のDNAへの5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) の組み込み (Porstmann など., *J. Immunol. Methods* 82: 169-179, 1985; 引用により本明細書に組み込まれる)、及びテトラゾリウム塩の使用 (Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65: 55-63, 1983; Alley など., *Cancer Res.* 48: 589-601, 1988; Marshall など., *Growth Reg.* 5: 69-84, 1995; 及びScudiero など., *Cancer Res.* 48: 4827-4833, 1988; すべては引用により本明細書に組み込まれる)。

#### 【0265】

分化を測定するアッセイは、たとえば組織の段階 - 特異的発現に関連する細胞表面マーカー、酵素活性、官能的活性、又は形態変化の測定を包含する (Watt, *FASEB* 5: 281-284, 1991; Francis, *Differentiation* 57: 63-75, 1994; Raes, *Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses*, 1161-171, 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、 $\alpha$ 31ポリペプチド自体は、組織の段階 - 特異的発現に関係する追加の細胞 - 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。 $\alpha$ 31ポリペプチドの直接的な測定、又はそれが分化する場合、組織における発現のその損失は、組織の分かのためのマーカーとして作用することができる。

#### 【0266】

同様に、 $\alpha$ 31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 $\alpha$ 31

1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。

【0267】

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za lpha 31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za lpha 31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。

【0268】

さらに、腫瘍進行及び転移に対するza lpha 31の活性及び効果が、インビボで測定され得る。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来た。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. CrI-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。

【0269】

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。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、組換えアデノウイルス、例えばzalpha 31を発現するアデノウイ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。

#### 【0270】

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。殺害の時点で、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zalpha 31の影響が評価され得る。

#### 【0271】

さらに、アデノウイルスとは別に、移植された細胞がzalpha 31により一時的にトランスフェクトされ得る。安定したzalpha 31トランスフェクトの使用、及びインビボでのzalpha 31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zalpha 31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zalpha 31又はzalpha 31ならし培地が、このマウスモデルに直接的に注入され、そして従って、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 79: 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。

#### 【0272】

ヒト血液学的悪性に由来する腫瘍細胞の増殖及び散在に対するzalpha 31及びその誘導体（接合体）の活性がまた、マウスの異種移植モデルにおいてインビボ

で測定され得る。ヒト腫瘍細胞が、集合的には、異種移植モデルとして言及される、ヒト腫瘍細胞が免疫欠損マウス中に移植されているいくつかのマウスモデルが開発されている。Cattan, AR and Douglas, E Leuk. Res. 18: 513-22, 1994; 及びFlavell, DJ. Hematological Oncology 14: 67-82, 1996を参照のこと。疾病モデルの特徴は、マウスに供給される細胞の型及び量により変化する。

#### 【0273】

典型的には、腫瘍細胞は、急速に増殖し、そして血液において循環し、そして多くの器官系に存在することが見出され得る。そのようなモデルにおいて試験するための適切な治療方法は、抗体誘発性毒性、リガンド - 毒素接合体又は細胞い基づく治療を包含する。養子免疫療法として通常言及される後者の方法は、ヒト免疫系の成分（すなわち、リンパ球、NK細胞）による動物の処理を包含し、そしてzalpha 31又は他の免疫調節剤と細胞とのエクスピボインキュベーションを包含することができる。

#### 【0274】

Zalphi 31ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、zalphi 31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。哺乳類が突然変異誘発されたzalphi 31遺伝子を有するか、又はそれを欠いている場合、zalphi 31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、zalphi 31ポリペプチド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。

#### 【0275】

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)。

#### 【0276】

もう1つの態様においては、 $\alpha$  31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 W095/07358号 ; 及びkuo など., Blood 82: 845-52, 1993。

#### 【0277】

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。合成カチオン脂質が、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)。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。

#### 【0278】

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。特定細胞へのトランスフェクションの方向づけが1つの領域の利点を表すことは明白である。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、例えば膵臓、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。

## 【0279】

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、トランスダクション、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ベクタートランスポーター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）。

## 【0280】

アンチセンス方法論は、zalpha 31遺伝子転写を阻害するために、例えば細胞増殖をインビボで阻害するために使用され得る。Zalpha 31 - コードポリヌクレオチドのセグメント（例えば、配列番号1に示されるようなポリヌクレオチド）に対して相補的であるポリヌクレオチドは、zalpha 31 - コードのmRNAに結合し、そしてそのようなmRNAの翻訳を企画される。そのようなアンチ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zalpha 31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。

## 【0281】

本発明はまた、診断に使用できるであろう試薬を提供する。例えば、zalpha 31 DNA又はRNAを含んで成るプローブ、又はその副配列は、zalpha 31遺伝子が染色体10上に依存するかどうか、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。Zalpha 31は、染色体10の10q23-q24領域に位置する（例3を参照のこと）。Zalpha 31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、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。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）。

## 【0282】

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失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。

## 【0283】

配列標識された部位 (STS) はまた、染色体位置決定のために独立的に使用される。STSは、ヒトゲノムにおいてユニークであるDNA配列であり、そして特定の染色体又は染色体の領域のための参照点として使用され得る。STSは、すべての他のゲノム配列の存在下でこの部位を特異的に検出するためにポリメラーゼ鎖反応に使用される一対のオリゴヌクレオチドプライマーにより定義される。

## 【0284】

STSは、DNA配列に単独で基づかれていますので、それらは電子データベース、例えばDatabase of Sequence Tagged Sites (dbSTS)、GenBank (National Center for Biological Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)内に完全に記載され得、そしてそれらの短いゲノムランドマークSTS配列内に含まれるマッピングデータにより、興味ある遺伝子配列を調べられ得る。

## 【0285】

zalpha 31遺伝子は、染色体の10q23-q24領域に位置する。いくつかの疾病が、ニューロン障害、脳腫瘍及び他の神経効果に関連するこの領域におけるクラスターでの遺伝子に関連する。例えば、ホスファターゼ及びテンシン相同体 (PTEN；脳腫瘍に連結される欠失；10q23.3)、Bannayan-Riley-Ruvalcaba症候群 (10q23)、グリオーム - 不活性化されたロイシンに富んでいる遺伝子 (LGI 1；10q24)；大頭症 (10q23.3)；部分癲癇 (10q23.3 - q24.1)；幼児開始の旧小脳運動失調 (IOSCA；10q24)；ウロフェイシャル (urofacial) 症候群 (Ochoa症候群) (10q23 - q24)；及び常染色体優性痙性対麻痺 9 (10q23.3 - q24.1) はすべて、染

染色体10のこの領域に位置する。

【0286】

さらに、それらの疾病のいくつかは、大きな染色体転位、例えば染色体10の10q23 - q24領域における染色体欠失又は異質性の欠失に連結される。さらに、染色体10の1つのコピーの欠失は、高い悪性のグリオームにおいて最も共通する遺伝子現象であり、ここで特に10q23 - 26領域における染色体の第2コピーの少なくともいくつかの部分転位又は欠失が、約80%のグリア芽腫において示される (Bigner, S, and Vogelstein. B. Brain Path. 1: 12-18, 1990)。さらに、10q23での異質性の欠失が、グリア芽腫の約70%に及び進行した前率腺癌の60%に (Li, J. など., Science 275: 1943-1946, 1997)、並びに他の癌に存在する。

【0287】

さらに、有意な% (例えば、70%) の小児性T - 細胞急性白血病が、10q24遺伝子座内のトランスロケーションを付随する (Dube, ID. など., Blood 78: 2996-3003, 1991)。zalpha 31遺伝子はまた、10q23 - q24領域zalpha 31に位置するので、ポリヌクレオチドプローブが、ヒト疾病、例えばグリア芽腫、大脳症及びT - 細胞白血病、又は他の癌、神経又は免疫疾患に関連する染色体10q23 - q24欠失又はトランスロケーションを検出するために使用され得る。

【0288】

さらに、zalpha 31ポリヌクレオチドプローブは、染色体10の三染色体性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。例えば、スプリット手/足奇形タイプ3 (SHFM3) は、10q24 - q25での三染色体性の結果であると思われる (Nunes, ME. など., Hum. Molec. Genet. 4: 2165-2170, 1995)。zalpha 31遺伝子また、10q23 - q24領域zalpha 31に位置するので、ポリヌクレオチドプローブが、染色体10q23 - q24獲得、又はそのようなヒト疾病に関連する三染色体性を検出するために使用され得る。

【0289】

さらに、他の遺伝子座の中で、拡張型心筋症 (10q21 - q23)、10q24.1に位置するFASリガンドに関連する自己免疫疾患、網膜G - タンパク質結合受容体に関連する網膜炎色素沈着 (10q23)、チトクロームP450-2C9 (CYP2C9) (10q24) のす

べては、ヒト疾病状態において出現し、そしてヒトゲノムのこの領域に位置する。公的に入手できるWWWサーバー (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmap?chromosome=10q23-q24>) に基づいて染色体10のこの領域について、Online Mendellian Inheritance of Man (OMIM) 遺伝子地図及びそこにおける文献を参照のこと。それらのすべては、zalpha 31遺伝子と同じ染色体領域への連鎖を示す遺伝性疾患についての可能な候補体遺伝子として作用する。

#### 【0290】

同様に、zalpha 31遺伝子座自体における欠陥又は過剰発現が、遺伝性ヒト疾病状態をもたらすことができる。例えば、zalpha 31は、神経及び脳連坐、並びにいくつかの腫瘍に関連する染色体領域に位置する。本明細書において論じられるように、zalpha 31についての有意な数のESTが、多発性硬化症、ハンチントン病、グリオーシス、多星状細胞腫、脳腫瘍（例えば、副腎腫）及び脊髄W/リンパ腫との疾病関連性を伴って、神経起源のライブラリーに見出される。さらに、前炎症性サイトカインが、脳腫瘍により生成され、MS病変に見出され、そして他の神経障害を示す。

#### 【0291】

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、zalpha 31遺伝子欠失に関連する検出、診断予防及び処理を助けるであろう。

#### 【0292】

診断は、疾病の型及び適切な関連する治療の決定、又は遺伝的カウンセリングにおける助力において医者を助けることができる。本発明の抗-zalphi 31抗体、ポリヌクレオチド及びポリペプチドは、zalphi 31ポリペプチド、mRNA又は抗-zalphi 31抗体の検出のために使用され、従って、マーカーとして作用し、そして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、本明細書に記載のようにして、遺伝病又は癌の検出のために直接的に使用され得る。

#### 【0293】

さらに、zalphi 31ポリヌクレオチドプローブは、染色体10q23-q24欠失及びヒ

ト疾病に関連するトランスロケーション、腫瘍の悪性進行に關与する他のトランスロケーション、又は悪性、又は他の癌、又は自然流産における染色体転位に關与することが予測される他の10q23-q24突然変異に關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、za1pha 31ポリヌクレオチドプローブは、ヒト疾病又は自然流産に關連する染色体10q23 - q24三染色体性及び染色体欠失に關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、za1pha 31ポリヌクレオチドプローブは、それらの欠陥に關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。

#### 【0294】

上記で論じられたように、za1pha 31遺伝子自体における欠陥が、遺伝性ヒト疾病状態をもたらすことができる。本発明の分子は、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、za1pha 31遺伝子欠陥に關連する検出、診断予防及び処理を助ける。さらに、za1pha 31ポリヌクレオチドプローブは、za1pha 31染色体遺伝子座での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。za1pha 31配列は、DNAプロフィールにおける診断剤として使用され得る。

#### 【0295】

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。ほとんどの診断方法は、

( i ) 潜在的に疾病の患者、疾病の患者又は劣性疾病対立遺伝子の可能性ある非疾病キャリアーから遺伝子サンプルを得；

( ii ) ZSMF16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；

#### 【0296】

( 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、ZSMF16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。

#### 【0297】

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の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アー表現型の存在の、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、 $\alpha$ 31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。

#### 【0298】

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、患者からのいず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。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。ヒト疾病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。

#### 【0299】

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), *PCR Protocols; Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc, 1993), Cotter (ed), *molecular Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek and Walaszek (eds.), *Tumor Marker Protocols*. (Humana Press, Inc. 1998). Lo (ed), *Clinical Application of PC*

R (Humana Press, Inc. 1998), 及びMeltzer (ed), PCR in Bioanalysis (Human a Press. Inc. 1998))。

【0300】

Zalpha 31遺伝子座に関連する突然変異は、直接的な突然変異分析のための標準方法、例えば制限フラグメント長さ多型現象分析、RCR技法を用いての短いタンドム反復体分析、増幅 無反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アーゼ分解方法、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技法を用いることにより、本発明の核酸分子を用いて検出され得る（例えば、次の文献を参照のこと

【0301】

: 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.) Molecular Diagnosis of Genetic Diseases (Humana Press. Inc. 1996), Landegren (ed.) Laboratory Protocols for Mutation Detection (Oxford University Press 1996), Birren など. (eds.) Genome Analysis Vol. 2: Detecting Genes (Cold Spring Harbor 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 Preineiples of Molecular Medicine, pages 83-88 (Humana Press , Inc. 1998)。

【0302】

突然変異についてのzalpha 31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。例えば、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（例えば、Dracopoliなど. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, p7.1.6-7.1.6 (John Wiley & Sons 1998) ) を参照のこと。

【0303】

“トランスジェニックマウス”として言及される、zalpha 31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、*zalpha 31*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 *zalpha 31* 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え得る。

#### 【0304】

例えば、野生型 *zalpha 31* 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、*zalpha 31* 発現が機能的に適切であり、そして *zalpha 31*、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、成熟 *zsig zalpha 31* 成熟ポリペプチド(配列番号2のアミノ酸残基20 (Asp) - 残基142 (Arg)) を過剰発現するものである。さらに、そのような過剰発現は、ヒト疾病との類似性を示す表現型をもたらすことができる。

#### 【0305】

同様に、ノックアウト *zalpha 31* マウスは、*zalpha 31* 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。ノックアウトマウスの表現型は *zalpha 31* アンタゴニスト、例えば本明細書に記載されるそれらのもののインビボ効果を予測することができる。ヒト *zalpha 31* cDNA は、ノックアウトマウスを生成するために使用される、ネズミ *zalpha 31* mRNA、cDNA 及びゲノムDNA を単離するためにしようされ得る。

#### 【0306】

それらのマウスは *zalpha 31* 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病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、*zalpha 31* に対して向けられた、*zalpha 31* 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。

【0307】

医薬使用のためには、本発明のタンパク質は、従来の方法に従って、非経口、特に静脈内又は皮下供給のために配合される。静脈内投与は、1～数時間の典型的な期間、ボラス注射又は注入により行われるであろう。一般的に、医薬製剤は、 $\alpha$ 31タンパク質を、医薬的に許容できるビークル、例えば塩溶液、緩衝溶液、水中、5%デキストロース、又は同様のものと共にを含むであろう。製剤はさらに、1又は複数の賦形剤、保存剤、溶解剤、緩衝剤、バイアル表面上のタンパク質損失を妨げるためのアルブミン、等を含むことができる。

【0308】

配合方法は、当業界において良く知られており、そして例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19<sup>th</sup> ed., 1995に開示される。治療用量は、一般的に、0.1～100  $\mu$ g/kg患者の体重/日、好ましくは0.5～20mg/kg/日の範囲であり、そして正確な用量は処理される病状の性質及び重症度、患者の特徴、等を考慮して、許容できる標準に従って、臨床医により決定される。用量の決定は、当業者のレベル内である。タンパク質は、急性処理のために、1週間又はそれ以下にわたって、しばしば1～3日間にわたって投与され得、又は慢性処理のためには、数ヶ月～数年にわたって使用され得る。

【0309】

本発明は、次の非制限的な例によりさらに例示される。

実施例

例1. 十分な長さの $\alpha$ 31を得るためにEST配列を用いての $\alpha$ 31の同定

シグナル配列及びヘリックスを用いての予測される十分な長さのアセンブリーの翻訳されたDNAデータベースの走査は、5' EST配列 (EST362610; Image Consortium) を有するアセンブリーの同定をもたらした。

【0310】

EST配列の確認を、ESTに起因するcDNAの配列分析により行った。このcDNAはプ

ラスミドに含まれ、そしてこのクローンの完全な二本鎖配列を生成するために次のプライマーを用いて配列決定された：ZC694（配列番号4）、ZC7625（配列番号5）、ZC22487（配列番号6）、ZC22488（配列番号7）、ZC22249（配列番号8）。EST362610配列（配列番号1）は、本明細書及び配列番号2に記載されるように、十分な長さのタンパク質により企画された $\alpha$ 31をコードした。

#### 【0311】

##### 例2．組織分布

ノザンプロット分析を、Human Multiple Tissue Blots (MTN1, MTN2及びMTN3)及びMaster Dotプロット (Clontech, Palo Alto, CA)を用いて行った。cDNAプローブを、PCRを用いて調製した。オリゴヌクレオチドZC22,230（配列番号9）及びZC22,249（配列番号8）を、プライマーとして使用し、EST INC515639H2 (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を企画した。鋳型は、製造業者の説明書に従って実験室で製造されたヒト脳Marathon cDNA (Clontech)であった。

#### 【0312】

PCRサーモサイクラー条件は次の通りであった：94 で1.5分（1サイクル）；94 で10秒、62 で20秒、72 で30秒（35サイクル）；72 で10分（1サイクル）；続いて4 での維持。約500bpのプローブを、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。プローブを、Rediprime II DNAラベリングキット (Amersham, Arlington Heights, IL)を用いて、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 プッシュカラム (Statagene Cloning Systems, La Jolla, CA)を用いて精製した。

#### 【0313】

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。ハイブリダイゼーションは、 $1.5 \times 10^6$  cpm/mlのラベルされたプローブを用いて、55 で一晩、行われた。プロットを、 $2 \times$  SSC及び0.1%のSDSにより室温で、次に $2 \times$  SSC及び0.1%のSDSにより65 、続いて $0.1 \times$  SSC及び0.1%SDSにより65 で洗浄した。2つの転写体サイズを、心臓、甲状腺、脊髄、副腎、脳及び精巣において最強

の発現を有する組織において、約1.35kb及び約2 kbでプロット上で観察した。

#### 【0314】

ドットプロットをまた、Human RNA Master Blots™ (Clontech)を用いて行った。ドットプロットのためのお方法及び条件は、上記に開示されるMultiple Tissue Blotsのためのもと同じである。ドットプロットは、すべての組織においてシグナルを示し、そして脳、肝臓及び心臓において最強であった。zalpha 31についてのEST電子ノザンプロットデータは、それが、B - 細胞（扁桃）及び単球/マクロファージ/樹状突起系のこれらの細胞において（“正常”な誘発されていない状態での遍在性分布と一致する）、及び特に、前炎症性刺激、例えばPMA、TNF又はLPSによる処理に続いて有力である高い誘発性遺伝子であることを示す。

#### 【0315】

この結論は、次の組織における予測される頻度よりも高い頻度でのその存在に基づかれる：胚中央のB細胞（扁桃）ライブラリー、他発性硬化症病変；刺激されたTHP - 1細胞（前 - 単球系）；及び末梢血液樹状突起細胞（刺激されている）。前記遺伝子はまた、T - 細胞系（刺激されている）及び末梢血液単核細胞（刺激されている）、胎児肝臓CD34<sup>+</sup>前駆体細胞、及び炎症現象に関連する傾向を示す変形性関節症患者からの軟膏つにも見出された。さらに、神経起源の組織（正常及び疾病）及び分化された細胞系（ニューロン）のライブラリーに見出されるお有意な数のESTが存在した。

#### 【0316】

##### 例3 . zalpha 31の染色体割り当て及び配置

zalpha 31を、市販の“Genebridge 4 Radiation Hybrid Hybrid(RH) Mapping Panel” (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL)を用いて、染色体10にマッピングした。そのGeneBridge 4 RH Panelは、93の放射線ハイブリッドクローンの個々からのDNA、及び2種の対照DNA（HFL ドナー及びA23受容体）を含む。公開されているWWWサーバー（<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>）は、GeneBridge 4 Radiation Hybrid Panelにより構成されたヒトゲノムのWhitehead Institute/MT Center for Genome Research's放射線ハイブリッド地図（“WICGR”放射線ハイブリッド地図）に関するマッピングを可能

にする。

#### 【0317】

GeneBridge 4RH Panelによるzalpha 31のマッピングのために、20  $\mu$ lの反応体をPCRのために適合する96 - ウェルマイクロタイタープレート (Stratagene, La Jolla, CA) に提供し、そして "RoboCycler Gradient 96" 熱サイクラー (Stratagene) において使用した。個々の95のPCR反応は、2  $\mu$ lの10 $\times$ KlenTaq PCR反応緩衝液 (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)、1.6  $\mu$ lのdNTP混合物 (それぞれ2.5mM、PERKIN-ELMER, Foster City, CA)、1  $\mu$ lのセンスプライマー、ZC23,469 (配列番号10)、11  $\mu$ lのアンチセンスプライマー、ZC23,470 (配列番号11)、2  $\mu$ lのRediLoad (Research Genetics, Inc.)、0.4  $\mu$ lの50 $\times$  Advantage KlenTaq ポリメラーゼ混合物 (Clontech Laboratories, Inc.)、25ng の個々のハイブリッドクローン又は対照からのDNA、及び20  $\mu$ lの合計体積のための蒸留水から構成された。

#### 【0318】

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：94 で5分間の変性、初期の1サイクル、94 で45秒間の変性、58 で45秒間のアニーリング及び72 で15秒間の延長、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)、そして臭化エチジウムによる染色により可視化した。

その結果は、zalpha 31が染色体10 WICGR放射線ハイブリッド地図上で骨格マーカーWI - 8488から0.90cR\_3000に位置することを示した。周囲遺伝子/マーカーの使用は、10q23 - q24染色体領域におけるzalpha 31を位置決定する。

#### 【0319】

##### 例4 . 標識されていないzalpha 31組換えアデノウィルスの生成

##### A. アデノウィルス発現のための発現ベクター構造体の生成：

ヒトzalpha 31のタンパク質コード領域を、それぞれ5' 及び3' 末端でFseI及びAscI制限部位を付加するプライマーを用いて、PCRにより増幅した。PCRプライマーZC23457 (配列番号に) 及びZC23458 (配列番号13) を、次の通りに、PCR反

応において、十分な長さのヒト $\alpha$ 31 cDNAを含む鑄型pT7T3Dと共に使用した：95 で5分、1サイクル；続いて95 で0.5分、58 で0.5分、及び72 で0.5分、15サイクル；続いて72 で7分；続いて24 でのソーキング。

#### 【0320】

$\alpha$ 31 PCR生成物を、ゲルから切除し、65 で溶解し、2度フェノール抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。次に、PCR生成物を、FseI - AscIにより消化し、フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿せしめ、そしてTE (トリス/EDTA、pH8) において再水和化した。次に、429bpの $\alpha$ 31フラグメントを、修飾されたpAdTrack CMV (He, T-C. など., PNAS 95: 2509-2514, 1998) のFseI - AscI部位中に連結した。この構造体はまた、GFPマーカ遺伝子を含む。GFP発現を駆動するCMVプロモーターを、SV40プロモーターにより置換し、そしてSV40ポリアデニル化シグナルを、ヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナルにより置換した。

#### 【0321】

さらに、生来のポリリンカーを、FseI, EcoRV及びAscI部位により置換した。pAdTrack CMVのこの修飾された形を、pZyTrackと命名した。連結を、Fast-Link™ DNA連結及びスクリーニングキット (Epicentre Technologies, Madison, WI) を用いて行った。 $\alpha$ 31 cDNAを含むクローンを、標準のminiprep方法により同定した。プラスミドを線状化するために、約5  $\mu$ gのpZyTrack  $\alpha$ 31プラスミドを、PmeIにより消化した。約1  $\mu$ gの線状化されたプラスミド及び200ngのスーパーコイルpAdEasy (He など., 前記) により、BJ5183細胞を同時形質転換した。

#### 【0322】

その同時形質転換は、Bio-Rad Gene Pulserを用いて、2.5kV、200オーム及び25mFaで行われた。全同時形質転換体を、25  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含む4LBプレート上にプレートした。最小のコロニーを採取し、そしてLB/カナマイシンにおいて拡張し、そして組換えアデノウィルスDNAを標準のDNA miniprep方法により同定した。FseI - AscIによる組換えアデノウィルスDNAの消化が、 $\alpha$ 31の存在を確認した。組換えアデノウィルスminiprep DNAを用いて、DH10Bコンピテン

ト細胞を形質転換し、そしてDNAを、Qiagen maxi prepキットを用いて、そのキットの説明書に従って調製した。

【0323】

B. 組換えDNAによる293a細胞のトランスフェクション：

約5 µgの組換えアデノウイルスDNAを、20~30UのPacIを含む反応体積100 µlにおいて、37 °Cで3時間、PacI酵素 (New England Biolabs) により消化した。消化されたDNAを、等体積のフェノール/クロロホルムにより2度、抽出し、そしてエタノールにより沈殿した。DNAペレットを、5 µlの蒸留水に再懸濁した。早めに接種された、及び60 - 70%の集密性まで増殖されたQBI - 293A細胞 (Quantum Biotechnologies, Inc. Montreal, Qc. Canada) のT25フラスコを、PacI消化されたDNAによりトランスフェクトした。

【0324】

PacI - 消化されたDNAを、無菌HBS (150mMのNaCl, 20mMのHEPES) により、50 µlの合計体積まで希釈した。別々の管において、25 µlのDOTAP (Boehringer Mannheim, 1mg/ml) を、HBSにより100 µlの合計体積まで希釈した。DNAをDOTAPに添加し、ピペットにより上下することに軽く混合し、そして室温で15分間、放置した。培地を293A細胞から除去し、そして1 mMのピルビン酸ナトリウム (GibcoBRL)、0.1mMのMEM非必須アミノ酸 (GibcoBRL) 及び25mMのHEPES緩衝液 (GibcoBRL) を含む血清フリーのMEMalpha (GibcoBRL) 5mlにより洗浄した。

【0325】

5mlの血清フリーのMEMを、293A細胞に添加し、そして37 °Cで維持した。DNA/脂肪混合物を、293A細胞のT25フラスコに添加し、軽く混合し、そして37 °Cで4時間インキュベートした。4時間後、DNA/脂質混合物を含む培地を吸引し、そして5%ウシ胎児血清を含む完全MEM 5mlにより置換した。トランスフェクトされた細胞をフォーカス、すなわちウィルスプラークのGreen Fluorescent Protein (GFP) 発現及び形成についてモニターした。

【0326】

組換えアデノウイルスDNAによる293A細胞のトランスフェクションの7日後、細胞はGFPタンパク質を発現し、そしてフォーカスを形成し始めた。それらのフ

オーカスは、ウィルス“ブラク”であり、そして粗ウィルス溶解物を、細胞スクラッパーを用いて、293A細胞のすべてを集めた。その溶解物を、50mlの円錐形管に移した。細胞からウィルス粒子のほとんどを開放するために、凍結/融解（3サイクル）を、ドライアイス/エタノール浴及び37℃の水浴において行った。

【0327】

C. 組換えアデノウィルス（rAdV）の増幅：

粗溶解物を、増殖し（一次（1°）増殖）、zalpha 31 rAdV溶解物の研究用“原液”を得た。ほぼ集密性（80～90%）の293A細胞の10個の10cmプレートを、前もって20時間前に設定し、200mlの粗rAdV溶解物を個々の10cmプレートに添加し、そして48～72時間モニターし、顕微鏡下でCPE及び蛍光顕微鏡下でGFPの発現を調べた。すべての293A細胞がCPE（細胞変性効果）を示す場合、この一次原液溶解物を集め、そして凍結/融解サイクルを、粗rAdV溶解物下に記載のようにして行った。

【0328】

zalpha 31 rAdVの二次（2°）増殖を次の通りにして得た：293A細胞の20個の15cm組織培養皿を調製し、80～90%の集密性の細胞を得た。20mlの5%MEM培地を除く他のすべてを除去し、そして個々の皿を、300～500mlの一次増幅されたrAdV溶解物により接種した。48時間後、293A細胞をウィルス生成物から溶解し、そしてこの溶解物を250mlのポリプロピレン遠心分離ボトル中に集め、そしてrAdVを精製した。

【0329】

D. 組換えアデノウィルスの精製：

NP-40界面活性剤を、すべての細胞を溶解するために粗溶解物のボトルに添加し、0.5%の最終濃度にした。ボトルを回転プラットフォーム上に10分間、配置し、ボトルが落ちないようできるだけ早く撹拌した。残骸を20,000×Gでの15分間の遠心分離によりペレット化した。上清液を250mlのポリカーボネート遠心分離ボトルに移し、そして0.5体積の20%PEG8000/2.5MのNaCl溶液を添加した。ボトルを氷上で一晩、振盪した。ボトルを20,000×Gで15分間、遠心分離し、そして上清液を漂白溶液中に捨てた。回転マークのいずれか側のボトルの壁にそって

2本の垂直な線としての白色沈殿物は、沈殿されたウィルス/PEGである。

#### 【0330】

滅菌された細胞スクラッパーを用いて、2本のボトルからの沈殿物を、2.5mlのPBSに再懸濁した。ウィルス溶液を、2mlのマイクロ遠心分離管に配置し、そしてマイクロ遠心分離器により14,000×Gで10分間、遠心分離し、追加の細胞残骸を除去した。2mlのマイクロ遠心分離管からの上清液を、15mlのポリプロピレンスナップキャップ管に移し、そして塩化セシウム(CsCl)により1.34g/mlの密度に調節した。ウィルス溶液の体積を推定し、そして0.55g/mlのCsClを添加した。CsClを溶解し、そしてこの溶液1mlを計量し、それは1.34gであった。

#### 【0331】

その溶液を3.2mlのポリカーボネート厚壁遠心分離管(Beckman No. 362305)に移し、そしてTLA-100.4ローターを備えたBeckman Optima TIXマイクロウルトラ遠心分離機により80,000rpm (348,000×G)で3～4時間、25℃で回転せしめた。ウィルスは白色バンドを形成した。広口径ピペットチップを用いて、ウィルスバンドを集めた。

グラジエントからのウィルスは、それが細胞に対して使用され得る前、除去されるべきである多量のCsClを有する。Sephadex G-25M (Pharmacia)により前もって充填されたPharmacia PD-10カラムを用いて、ウィルス調製物を脱塩した。

#### 【0332】

カラムを20mlのPBSにより平衡化した。ウィルスを付加し、そしてカラム中に通した。5mlのPBSをカラムに添加し、そして8～10滴の画分を集めた。個々の画分の1:50希釈溶液の光学密度を、分光計上で260nmで測定した。明白な吸光度ピーク画分7～12間に存在した。それらの画分をプールし、そして1:25希釈溶液の光学密度(OD)を測定した。次の式を用いて、ODをウィルス濃度に転換した： $(260\text{nmでのOD}) (25) (1.1 \times 10^{12}) = \text{ビリオン/ml}$ 。zalpha 31 rAdVの1:25希釈溶液のODは、0.059であり、これは $3.0 \times 10^{12}$ 個のビリオン/mlのウィルス濃度を付与する。

#### 【0333】

ウィルスを貯蔵するために、グリセロールを、15%の最終濃度になるまで、精

製されたウィルスに添加し、軽くではあるが、しかし効果的に混合し、そして - 80 でアリコートで貯蔵した。

【0334】

E.50% CPE (TCID<sub>50</sub>) ウィルス滴定アッセイの組織培養感染用量：

Quantum Biotechnologies, Inc. (Montreal, Qc. Canada) により開発されたプロトコールに従って、組換えウィルスの感染性を測定した。手短には、2個の96-ウェル組織培養プレートを、アッセイされるべき個々の組換えウィルスのための2%ウシ胎児血清を含むMEMにおいてウェル当たり  $1 \times 10^4$  個の293A細胞により接種した。24時間後、 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-14}$  の個々のウィルスの10倍希釈溶液を、2%ウシ胎児血清を含むMEMにおいて製造した。100  $\mu$ l の個々の希釈溶液を、個々の20のウェルに配置した。37 で5日後、ウェルを、細胞変性効果 (CPE) について、正又は負のいずれかで出読み取り、そして“プラーク形成単位/ml” (PFU) についての値を計算する。

【0335】

使用されるTCID<sub>50</sub>の式は、上記Quantum Biotechnologies, Inc. による。力価 (T) を、使用されるウィルスが $10^{-2} \sim 10^{-14}$  に希釈されているプレートから決定し、そして感染の5日後に読み取った。個々の希釈度で、ウェルの合計数当たりのCPEについての陽性ウェルの比 (R) を決定する。

【0336】

希釈されていないウィルスサンプルの力価を計算するために、因子“F” =  $1 + d(S - 0.5)$  (ここで、“S”は比(R)の合計であり；そして“d”は希釈シリーズのLog10であり、例えば、“d”は10倍の希釈シリーズで1に等しい) を用いた。希釈されていないサンプルの力価は、 $T = 10^{(1+F)} = \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  である。TCID<sub>50</sub>/mlをpfu/mlに転換するために、0.7を、力価(T)についての計算において指数から引き算する。

zalpha 31アデノウィルスは、 $1.3 \times 10_{10}$  pfu/mlの力価を有した。

【0337】

例5. ヒトzalpha 31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zalpha 31を発現するための構造体：

zalpha 31コード領域(例4)を確認された配列を含む約10 $\mu$ gのZytrackベクターを、FseI及びAscIにより消化した。次に、ベクターをエタノール沈殿し、そしてペレットをTEに再懸濁した。開放された429bpのzalpha 31フラグメントを、1.2%のSeaPlaqueゲル上に前記消化されたベクターを付加し、そしてフラグメントを切除することによって単離した。DNAを、QiaQuick(Qiagen)ゲル抽出キットを用いて精製した。

#### 【0338】

次に、zalpha 31フラグメントを、FseI及びAscIにより前もって消化された本発明の標準のトランスジェニックベクターpTG12-8中に連結した。トランスジェニックマウスにおける興味ある遺伝子の発現のために消化されたpTG12-8プラスミドは、10kbのMT-1 5' DNA及び7kbのMT-1 3' DNAを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ポリA配列を含んで成る。

#### 【0339】

約1 $\mu$ lの連結反応物を、製造業者の説明書に従って、DH10B ElectroMax(商標)コンピテント細胞(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)中にエレクトロポレートし、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンをLBプレート上にプレートし、そして37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。コロニーを採取し、そして100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地において増殖した。Miniprep DNAを、前記採取されたクローンから調製し、そしてEcoRI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zalpha 31挿入体についてスクリーンした。正しいpTG12-8 zalpha 31構造体のMaxiprepを行った。

#### 【0340】

5'及び3'フランキング配列、MTプロモーター、ラットインスリンIIイントロン、zalpha 31cDNA及びヒト成長ホルモンポリA配列を含むSalIフラグメントを、本明細書に記載される標準の技法を用いて調製し、そして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。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., Manipulating

the Mouse Embryo, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1994  
に記載される通りに行われた。

【0341】

B. リンパ球 - 特異的EuLCKプロモーターからヒト $\alpha$  31を発現するために構造  
体：

FseI及びAscIにより消化された $\alpha$  31 DNAフラグメント（例5A）を、上記のように、FseI及びAscIにより前もって消化されたpKF051、すなわちリンパ球 - 特異的トランスジェニックベクター中にクローン化した。pKF051トランスジェニックベクターは、p1026X（Iritani, B. M., など., EMBO J. 16: 7017-31, 1997）に由来し、そしてT細胞 - 特異的Ick近位プロモーター、B/T細胞 - 特異的免疫グロブリン $\mu$ H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。

【0342】

約1  $\mu$ lの個々の連結反応物をエレクトロポレートし、プレートし、クローンを採取し、そして上記のようにして、制限消化によりヒト $\alpha$  31挿入体についてスクリーンした。pKF051 -  $\alpha$  31の正しいクローンを、配列決定により確認し、そしてこのクローンのmaxiprepを行った。Ick近位プロモーター及び免疫グロブリン $\mu$ エンハンサー（E $\mu$ LCK）、 $\alpha$  31cDNA、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する。

【0343】

前述から、本発明の特定の態様が例示目的のために本明細書において記載されて来たが、種々の修飾が本発明の範囲内で行われ得ることは、当業者に理解されるであろう。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics. Inc.

<120> SECRETED ALPHA-HELICAL PROTEIN - 31

<130> 99-41

<150> US 60136,485

<151> 1999-05-28

<160> 17

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1208

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (15)...(440)

<400> 1

```

gcgcgggggtc cgct atg gcg gcg gca gcc gag ggc gta ctg gcg acc cgg      50
      Met Ala Ala Ala Ala Glu Gly Val Leu Ala Thr Arg
              1              5              10

```

agt gat gag ccc gcc cga gac gat gcc gcc gtg gag aca gct gag gaa	98
Ser Asp Glu Pro Ala Arg Asp Asp Ala Ala Val Glu Thr Ala Glu Glu	
15 20 25	
gca aag gag cct gct gaa gct gac atc act gag ctc tgc cgg gac atg	146
Ala Lys Glu Pro Ala Glu Ala Asp Ile Thr Glu Leu Cys Arg Asp Met	
30 35 40	
ttc tcc aaa atg gcc act tac ctg act ggg gaa ctg acg gcc acc agt	194
Phe Ser Lys Met Ala Thr Tyr Leu Thr Gly Glu Leu Thr Ala Thr Ser	
45 50 55 60	
gaa gac tat aag ctc ctg gaa aat atg aat aaa ctc acc agc ttg aag	242
Glu Asp Tyr Lys Leu Leu Glu Asn Met Asn Lys Leu Thr Ser Leu Lys	
65 70 75	
tat ctt gaa atg aaa gat att gct ata aac att agt agg aac tta aag	290
Tyr Leu Glu Met Lys Asp Ile Ala Ile Asn Ile Ser Arg Asn Leu Lys	
80 85 90	
gac tta aac cag aaa tat gct gga ctg cag cct tat ctg gat cag atc	338
Asp Leu Asn Gln Lys Tyr Ala Gly Leu Gln Pro Tyr Leu Asp Gln Ile	
95 100 105	
aat gtc att gaa gag cag gta gca gct ctt gag cag gca gct tac aag	386
Asn Val Ile Glu Glu Gln Val Ala Ala Leu Glu Gln Ala Ala Tyr Lys	
110 115 120	
ttg gat gca tat tca aaa aaa ctg gaa gcc aag tac aag aag ctg gag	434
Leu Asp Ala Tyr Ser Lys Lys Leu Glu Ala Lys Tyr Lys Lys Leu Glu	



35                      40                      45  
 Ala Thr Tyr Leu Thr Gly Glu Leu Thr Ala Thr Ser Glu Asp Tyr Lys  
 50                      55                      60  
 Leu Leu Glu Asn Met Asn Lys Leu Thr Ser Leu Lys Tyr Leu Glu Met  
 65                      70                      75                      80  
 Lys Asp Ile Ala Ile Asn Ile Ser Arg Asn Leu Lys Asp Leu Asn Gln  
                                  85                      90                      95  
 Lys Tyr Ala Gly Leu Gln Pro Tyr Leu Asp Gln Ile Asn Val Ile Glu  
                                  100                      105                      110  
 Glu Gln Val Ala Ala Leu Glu Gln Ala Ala Tyr Lys Leu Asp Ala Tyr  
                                  115                      120                      125  
 Ser Lys Lys Leu Glu Ala Lys Tyr Lys Lys Leu Glu Lys Arg  
 130                      135                      140

<210> 3

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate polynucleotide sequence of za1pha31

<221> misc\_feature

<222> (1)...(426)

<223> n = A,T,C or G

<400> 3

atggcngcng cngcngargg ngtnytngcn acnmgnwsng aygarccngc nmngngaygay      60  
 gcngcngtng aracngcnga rgargcnaar garccngcng argcngayat hacngarytn      120  
 tgyngngaya tgttysnaa ratggcnacn tayytnacng gngarytnac ngcnacnwsn      180

gargaytaya arytnytnga raayatgaay aarytnacnw snytnaarta yytngaratg	240
aargayathg cnathaayat hwsnmgnaay ytnaargayy tnaaycaraa rtaygcnggn	300
ytnarccont ayytngayca rathaaygtm athgargarc argtngcngc nytngarcac	360
gcngcntaya arytngaygc ntaywsnaar aarytngarg cnaartayaa raarytngar	420
aarmgn	426

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC694

<400> 4

taatacgact cactataggg	20
-----------------------	----

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC7625

<400> 5

cgttgtaaaa cgacggccag	20
-----------------------	----

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC22487

<400> 6

cctgaggctg atgaattgtg

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC22488

<400> 7

gttctttgca gcttatcacc

20

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC22249

<400> 8

cgttgagatg ttctgtgat gacc

24

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC22230

<400> 9

gacttgatgg aatgaaggca agt

23

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC23469

<400> 10

aatggtcgtt tttctggt

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC23470

<400> 11	
aagctgcaaa gaacaagt	18
<210> 12	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Oligonucleotide primer ZC23457	
<400> 12	
cacacaggcc ggccaccatg gcggcggcag ccgagggcg	39
<210> 13	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Oligonucleotide primer ZC23458	
<400> 13	
cacacagggc cgcttcatc gcttctccag cttcttg	37
<210> 14	
<211> 153	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	

&lt;400&gt; 14

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu  
                   20                    25                    30  
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile  
                   35                    40                    45  
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe  
                   50                    55                    60  
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys  
                   85                    90                    95  
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile  
                   100                    105                    110  
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala  
                   115                    120                    125  
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe  
                   130                    135                    140  
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr  
 145                    150

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 153

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala

1                    5                    10                    15  
 Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln  
                          20                    25                    30  
 Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys  
                          35                    40                    45  
 Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr  
                          50                    55                    60  
 Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln  
                          85                    90                    95  
 Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg  
                          100                    105                    110  
 Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala  
                          115                    120                    125  
 Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met  
                          130                    135                    140  
 Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser  
 145                    150

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 162

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His  
                          20                    25                    30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala  
           35                          40                          45  
 Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile  
           50                          55                          60  
 Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His  
 65                          70                          75                          80  
 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln  
                           85                          90                          95  
 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu  
                           100                          105                          110  
 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val  
           115                          120                          125  
 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile  
           130                          135                          140  
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn  
 145                          150                          155                          160  
 Thr Ser

<210> 17

<211> 144

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile  
   1                          5                          10                          15  
 Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His  
           20                          25                          30  
 Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年5月21日(2001.5.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号2の残基番号37(Ile)～残基番号132(Leu)に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の残基番号20(Asp)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；及び

(c) 配列番号2の残基番号1(Met)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；

の群から選択されたアミノ酸残基の配列に対して少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】 前記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが、下記式：

$$\text{Asp}_{2_0} - \{16\} - \text{H1} - \{13\} - \text{H2} - \{7\} - \text{H3} - \{16\} - \text{H4} - \{9\} - \text{Arg}_{1_{42}}$$

[式中、 $\text{Asp}_{2_0}$ は、配列番号2に示される残基20(Asp)であり；

$\text{Arg}_{1_{42}}$ は、配列番号2に示される残基142(Arg)であり；

H1は、“ヘリックスA”(配列番号2のアミノ酸37(Ile)～51(Tyr)に対応する)であり；

H2は、“ヘリックスB”(配列番号2のアミノ酸65(Leu)～79(Glu)に対応する)であり；

H3は、“ヘリックスC”(配列番号2のアミノ酸87(Ile)～101(Leu)に対応する)であり；

H4は、“ヘリックスD”(配列番号2のアミノ酸118(Leu)～132(Leu)に対応する)であり；そして

{数}は、モチーフ間のアミノ酸残基のおおよその数(±2個の残基)を表す]により表される配置において、N-末端からC-末端の方に間隔をとって離れて存在する4個のヘリックスをさらに含む請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】 前記ポリヌクレオチドが、配列番号3のヌクレオチド1～ヌクレオチド426を含んで成る請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 (a) 配列番号2の残基番号37(Ile)～残基番号132(Leu)に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の残基番号20(Asp)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；及び

(c) 配列番号2の残基番号1(Met)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；

の群から選択されたアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドをコードする請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 次の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター；

請求項1記載のポリペプチドをコードするDNAをセグメント；及び

転写ターミネーター；

を含む発現ベクター。

【請求項6】 前記DNAセグメントに作用可能に連結された分泌シグナル配列をさらに含む請求項5記載の発現ベクター。

【請求項7】 請求項5記載の発現ベクターが導入されており、前記DNAセグメントによりコードされたポリペプチドを発現する培養された細胞。

【請求項8】 融合タンパク質をコードするDNA構造体であって、

(a) 配列番号2の残基番号1(Met)～残基番号19(Asp)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の残基番号18(Leu)～残基番号132(Leu)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2の残基番号37(Ile)～残基番号132(Leu)のアミノ酸配列；及び

(d) 配列番号2の残基番号20 (Tyr) ~ 残基番号142 (Leu) のアミノ酸配列の群から選択されたアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドをコードする第1 DNAセグメント; 並びに

追加のポリペプチドをコードする少なくとも1つの他のDNAセグメントを含んで成り、ここで前記第1及び他のDNAセグメントが読み取り柄を整合して連結されており; そして前記融合タンパク質をコードすることを特徴とするDNA構造体

。

【請求項9】 次の作用可能に連結された要素:

(a) 転写プロモーター;

(b) 請求項8記載の融合タンパク質をコードするDNA構造体; 及び

(c) 転写ターミネーター;

を含むベクターを導入されている宿主細胞を培養し; そして

前記DNAセグメントによりコードされるタンパク質を回収する;

ことを含んで成る方法により生成される融合タンパク質。

【請求項10】 (a) 配列番号2の残基番号37 (Ile) ~ 残基番号132 (Leu) に示されるアミノ酸配列;

(b) 配列番号2の残基番号20 (Asp) ~ 残基番号142 (Arg) に示されるアミノ酸配列; 及び

(c) 配列番号2の残基番号1 (Met) ~ 残基番号142 (Arg) に示されるアミノ酸配列;

の群から選択されたアミノ酸残基の配列に対して少なくとも90%同一である、アミノ酸残基の配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項11】 前記ポリペプチドが、下記式:

$$\text{Asp}_{2_0} - \{16\} - \text{H1} - \{13\} - \text{H2} - \{7\} - \text{H3} - \{16\} - \text{H4} - \{9\} - \text{Arg}_{1_4_2}$$

[式中、 $\text{Asp}_{2_0}$ は、成熟ポリペプチドの開始残基(配列番号2に示される)であり;

$\text{Arg}_{1_4_2}$ は、成熟ポリペプチドの最終残基(配列番号2に示される)であり;

H1は、“ヘリックスA”(配列番号2のアミノ酸37 (Ile) ~ 51 (Tyr) に対応する)であり;

H2は、“ヘリックスB”（配列番号2のアミノ酸65（Leu）～79（Glu）に対応する）であり；

H3は、“ヘリックスC”（配列番号2のアミノ酸87（Ile）～101（Leu）に対応する）であり；

H4は、“ヘリックスD”（配列番号2のアミノ酸118（Leu）～132（Leu）に対応する）であり；そして

{数}は、モチーフ間のアミノ酸残基のおおよその数（±2個の残基）を表す]により表される配置において、N-末端からC-末端の方に間隔をとって離れて存在する4個のヘリックスをさらに含む請求項10記載の単離されたポリペプチド。

【請求項12】（a）配列番号2の残基番号37（Ile）～残基番号132（Leu）に示されるアミノ酸配列；

（b）配列番号2の残基番号20（Asp）～残基番号142（Arg）に示されるアミノ酸配列；及び

（c）配列番号2の残基番号1（Met）～残基番号142（Arg）に示されるアミノ酸配列；

の群から選択されたアミノ酸残基の配列を含む請求項10記載の単離されたポリペプチド。

【請求項13】ポリペプチドの生成方法であって、  
請求項7記載の細胞を培養し；そして  
前記細胞により生成されるポリペプチドを単離する；  
ことを含んで成る方法。

【請求項14】試験サンプルにおけるタンパク質活性のアンタゴニストの存在を検出するための方法であって、

配列番号2のアミノ酸20（Asp）～142（Arg）の単離されたポリペプチド対して応答性である細胞を培養し；

請求項13記載の方法によりポリペプチドを生成し；

試験サンプルの存在下及び不存在下で、前記細胞に前記ポリペプチドを暴露し；

試験サンプルの存在下及び不存在下で、前記ポリペプチドに対する応答性のレベルを、生物学的又は生化学的アッセイにより比較し；そして

前記比較から、試験サンプルにおけるタンパク質活性のアンタゴニストの存在を決定することを含んで成る方法。

【請求項15】 試験サンプルにおけるタンパク質活性のアゴニストの存在を検出するための方法であって、

配列番号2のアミノ酸20(Asp)～142(Arg)の単離されたポリペプチド対して応答性である細胞を培養し；

試験サンプルを添加し；

試験サンプルの存在下及び不存在下で、応答性のレベルを、生物学的又は生化学的アッセイにより比較し；そして

前記比較から、試験サンプルにおけるタンパク質活性のアゴニストの存在を決定することを含んで成る方法。

【請求項16】 ポリペプチドに対する抗体の生成方法であって、

(a) 請求項10又は12記載のポリペプチド；

(b) 配列番号2のアミノ酸番号118(Leu)～132(Leu)を含むポリペプチド

；

(c) 配列番号2のアミノ酸番号14(Asp)～19(Asp)を含むポリペプチド；

(d) 配列番号2のアミノ酸番号26(Ala)～31(Glu)を含むポリペプチド；

(e) 配列番号2のアミノ酸番号27(Glu)～32(Pro)を含むポリペプチド；

(f) 配列番号2のアミノ酸番号136(Tyr)～141(Lys)を含むポリペプチド

；

(g) 配列番号2のアミノ酸番号137(Lys)～142(Arg)を含むポリペプチド

；

(h) 配列番号2のアミノ酸番号127(Ala)～135(Lys)を含むポリペプチド

；及び

(i) 配列番号2のアミノ酸番号127(Ala)～139(Leu)を含むポリペプチド

；

の群から選択されたポリペプチドを動物に接種し、ここで前記ポリペプチドが

動物において免疫応答を誘発し、抗体を生成し；そして

前記動物から抗体を単離する段階を順に含んで成る方法。

【請求項17】 ポリペプチドに対して特異的に結合する、請求項16記載の方法により生成される抗体。

【請求項18】 (a) 配列番号2の残基番号37(Ile)～残基番号132(Leu)に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の残基番号20(Asp)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；

(c) 配列番号2の残基番号1(Met)～残基番号142(Arg)に示されるアミノ酸配列；及び

(d) 上記(a)、(b)又は(c)に対して90%同一であるアミノ酸配列の群から選択されたアミノ酸配列；

から成るポリペプチドに対して特異的に結合する抗体。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/14795
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C12N15/19 C07K14/52 C07K16/24 C12N15/62 G01N33/68 C12N5/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 39122 A (MURO PHARMACEUTICAL INC ;THEOHARIDES THEOHARIS C (US)) 23 October 1997 (1997-10-23) Sequences ID no.1 and no.2 page 75. *94,69% identity in 490 nt overlap with seq ID no.1 (1-482:16-505) and 97,26% identity in 73 aa iverlap with seq ID no.2 (34-106:21-93)* page 47, line 18 - line 34 claims	8,16
A	page 31, line 10 - line 30 page 70, line 14 - line 28 page 72, line 25 - line 32 --- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 October 2000		Date of mailing of the international search report 18. 10. 00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Cornec, N

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
/US 00/14795

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 98 45435 A (GENETICS INST) 15 October 1998 (1998-10-15) Sequence ID no.326 page 203-204. * 98,73% identity in 475 nt overlap with seq ID no.1 (17-491:22-496) *</p> <p>---</p>	1,4
A	<p>DATABASE EMBL [Online] HS1226264, accession number AA426234, 24 May 1997 (1997-05-24) L. HILLIER ET AL: "zv83c12.r1 Soares-total fetus Nb2HF8.9w Homo sapiens cDNA clone "WashU-Merck EST project 1997" XP002149686 abstract *98,15% identity with seq ID no.1 in 433 nt overlap (1-432:11-441)* &amp; UNPUBLISHED,</p> <p>---</p>	1
A	<p>DATABASE EMBL [Online] HSAA22483, accession number AA021403, 27 November 1996 (1996-11-27) L. HILLIER ET AL: "ze66d05.r1 Soares retina N2b4HR Homo sapiens cDNA clone Image:363945 5', mRNA sequence" XP002149687 abstract * 96,38% identity in 415 nt overlap with sequence ID no.1 (1-414:1-413)* -&amp; L. HILLIER ET AL: "Generation and Analysis of 280,000 human expressed sequence Tags" GENOME RESEARCH, vol. 6, no. 9, 1996, pages 807-828, XP000914615</p> <p>-----</p>	1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

information on patent family members

International Application No

US 00/14795

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9739122 A	23-10-1997	AU 2456397 A	07-11-1997
WO 9845435 A	15-10-1998	AU 6956698 A	30-10-1998
		EP 0973898 A	26-01-2000

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト(参考)	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50			M
	33/53		33/566	
		C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/566		5/00	A

(81)指定国 E P ( A T , B E , C H , C Y ,  
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I  
 T , L U , M C , N L , P T , S E ) , O A ( B F , B J  
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,  
 M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K  
 E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G  
 , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,  
 R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M , A T ,  
 A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C  
 H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z  
 , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M ,  
 H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K  
 G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T  
 , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W ,  
 M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S  
 E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T  
 , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 DA12 DA13 DA14  
 DA36 DA77 FB02 FB03 FB07  
 4B024 AA01 AA11 BA21 CA04 EA02  
 FA02 HA12  
 4B063 QA18 QQ79 QR80  
 4B064 AG02 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40  
 DA01 EA22 EA24 EA50 FA74

专利名称(译)	分泌的 $\alpha$ -螺旋蛋白-31		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003501033A</a>	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2001500770	申请日	2000-05-26
[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	コンクリンダレルシー		
发明人	コンクリン,ダレル シー.		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/52 C07K16/24 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/19 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/52 A01K2217/05 C07K2319/00 C12N2799/022		
FI分类号	C07K14/52 C07K16/24 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33 /15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045 /FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QR80 4B064/AG02 4B064/CA19 4B064 /CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/EA22 4H045 /EA24 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/136485 1999-05-28 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及哺乳动物分泌的 $\alpha$ -螺旋蛋白31 ( zalpha 31 ) 多核苷酸和多肽。多肽和编码它们的多核苷酸是新型的4-螺旋束细胞因子, 甚至可以用来调节免疫系统的功能。本发明还包括针对zalpha 31多肽的抗体。

		配列番号2	配列番号4	配列番号5	配列番号6	配列番号
ヘリッ	クソD	118-132	103-121	134-151	134-180	120-131
C/D	ループ	102-117	100-102	119-133	120-133	103-119
ヘリッ	クソC	87-101	87-99	95-118	107-119	91-102
B/C	ループ	80-86	76-86	84-94	102-106	82-90
ヘリッ	クソB	65-79	53-75	65-83	84-101	72-81
A/B	ループ	52-64	47-52	44-64	89-93	45-71
ヘリッ	クソA	37-51	36-46	29-43	45-68	30-44
Zalpha	31多肽	11-2	11-4	11-5	6H-65F	多肽