

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2000 - 336039

(P2000 - 336039A)

(43)公開日 平成12年12月5日(2000.12.5)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00			A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 3/10			A 6 1 P 3/10	
25/28			25/28	
29/00	101		29/00	101
37/02			37/02	
審査請求 有 請求項の数 90 L (全 34数) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2000 - 125898(P2000 - 125898)	(71)出願人	591123609
(62)分割の表示	特願平3 - 134463の分割		イミュネックス・コーポレーション
(22)出願日	平成3年6月5日(1991.6.5)		I M M U N E X C O R P O R A T I O N
(31)優先権主張番号	534193		アメリカ合衆国ワシントン州98101,シアトル,ユニバーシティ・ストリート 51
(32)優先日	平成2年6月5日(1990.6.5)	(72)発明者	ジョン・シムス
(33)優先権主張国	米国(US)		アメリカ合衆国ワシントン州98115,シアトル,ノース・イースト・エイティセカンド・ストリート 314
(31)優先権主張番号	573576	(74)代理人	100089705
(32)優先日	平成2年8月24日(1990.8.24)		弁理士 社本 一夫 (外 4 名)
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	627071		
(32)優先日	平成2年12月13日(1990.12.13)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 タイプ I I インターロイキン - 1 受容体

(57)【要約】

【構成】 タイプ I I I L - 1 受容体 (タイプ I I I L - 1 R) タンパク質、タイプ I I I L - 1 R をコードする DNA と発現ベクター、および組換え細胞培養の生成物としてタイプ I I I L - 1 R を生産する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】有効量のポリペプチド及び適当な希釈剤又は担体を含む、免疫反応制御のためのヒト患者への非経口適用に適した薬剤組成物であって、ここにおいて前記ポリペプチドは以下の：

- a) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ないし 333 を含むポリペプチドをコードする DNA ；
- b) 配列番号 2 のアミノ酸 - 13 ないし 333 を含むポリペプチドをコードする DNA ；
- c) 配列番号 2 のアミノ酸 - 13 ないし 385 を含むポリペプチドをコードする DNA ；
- d) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ないし 385 を含むポリペプチドをコードする DNA ；
- e) 配列番号 13 のアミノ酸 1 ないし 345 を含むポリペプチドをコードする DNA ；
- f) 配列番号 13 のアミノ酸 - 13 ないし 345 を含むポリペプチドをコードする DNA ；
- g) 配列番号 13 のアミノ酸 - 13 ないし 397 を含むポリペプチドをコードする DNA ；
- h) 配列番号 13 のアミノ酸 1 ないし 397 を含むポリペプチドをコードする DNA ；
- i) a) ないし h) の DNA に中程度にストリンジェントな条件下 (50 、 2 × SSC) でハイブリダイゼーションすることが可能な DNA の相補体であり、かつ生物学的に活性なポリペプチドをコードする DNA ；および
- j) a) ないし i) で定義された DNA に遺伝子コードの結果として縮重する DNA

からなるグループから選択される DNA によってコードされる、前記薬剤組成物。

【請求項 2】有効量のポリペプチド及び適当な希釈剤又は担体を含む、免疫反応制御のためのヒト患者への非経口適用に適した薬剤組成物であって、ここにおいて前記ポリペプチドは配列番号 2 の x ないし y の配列を含み、前記 x は配列番号 2 のアミノ酸 - 13 又は 1 であり、そして y はアミノ酸 330 ないし 333 のいずれかである、前記薬剤組成物。

【請求項 3】有効量のポリペプチド及び適当な希釈剤又は担体を含む、免疫反応制御のためのヒト患者への非経口適用に適した薬剤組成物であって、ここにおいて前記ポリペプチドは、以下の

- a) 配列番号 1 のヌクレオチド 154 ないし 1191
- b) 配列番号 1 のヌクレオチド 193 ないし 1191
- c) 配列番号 1 のヌクレオチド 154 ないし 1347
- d) 配列番号 1 のヌクレオチド 193 ないし 1347
- e) 配列番号 12 のヌクレオチド 124 ないし 1158
- f) a) ないし e) で定義された DNA に遺伝子コードの結果として縮重する DNA

からなるグループから選択される DNA によってコードされる、前記薬剤組成物。

*【請求項 4】配列番号 2 のアミノ酸 1 - 333 を含む、有効量のポリペプチド及び適当な希釈剤又は担体を含む、免疫反応制御のためのヒト患者への非経口適用に適した薬剤組成物。

【請求項 5】有効量のポリペプチド及び適当な希釈剤又は担体を含む、免疫反応制御のためのヒト患者への非経口適用に適した薬剤組成物であって、ここにおいて、前記ポリペプチドは配列番号 2 のアミノ酸 1 ないし y を含み、y は配列番号 2 のアミノ酸 330 ないし 333 のいずれかである、前記薬剤組成物。

【請求項 6】有効量のポリペプチド及び適当な希釈剤又は担体を含む、免疫反応制御のためのヒト患者への非経口適用に適した薬剤組成物であって、ここにおいて前記ポリペプチドは、配列番号 1 のヌクレオチド 154 ないし 1191 を含む DNA に中程度にストリンジェントな条件下 (50 、 2 × SSC) でハイブリダイゼーションすることが可能な DNA の相補体である DNA によってコードされ、かつ、IL - 1 に結合することが可能であるポリペプチドである、前記薬剤組成物。

【請求項 7】配列番号 2 のアミノ酸 1 - 333 を含む、有効量のポリペプチド及び適当な希釈剤又は担体を含む、リウマチ様関節炎治療のためのヒト患者への非経口適用に適した薬剤組成物。

【請求項 8】有効量のポリペプチド及び適当な希釈剤又は担体を含む、リウマチ様関節炎治療のためのヒト患者への非経口適用に適した薬剤組成物であって、ここにおいて、前記ポリペプチドは配列番号 2 のアミノ酸 1 ないし y を含み、y は配列番号 2 のアミノ酸 330 ないし 333 のいずれかである、前記薬剤組成物。

【請求項 9】有効量のポリペプチド及び適当な希釈剤又は担体を含む、リウマチ様関節炎治療のためのヒト患者への非経口適用に適した薬剤組成物であって、ここにおいて前記ポリペプチドは、配列番号 1 のヌクレオチド 154 ないし 1191 を含む DNA に中程度にストリンジェントな条件下 (50 、 2 × SSC) でハイブリダイゼーションすることが可能な DNA の相補体である DNA によってコードされ、かつ、IL - 1 に結合することが可能であるポリペプチドである、前記薬剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は一般的にサイトカイン受容体に関し、特にインターロイキン - 1 受容体に関する。

【0002】

【従来の技術】インターロイキン - 1α (IL - 1α) 及びインターロイキン - 1β (IL - 1β) は免疫制御及び、炎症反応において中心的役割を果たす、遠い関係にあるポリペプチド性ホルモンである。これら 2 つのタンパク質は各種の細胞に働き、複数の生物学的活性を持っている。IL - 1α 及び IL - 1β に帰する生物学的

活性の相違は、IL-1 α 及びIL-1 β の両方に結合する、特異的原形質膜受容体による。IL-1 α 及びIL-1 β による広範囲に及ぶ生物学的活性のために、IL-1受容体は様々な種の間で高度に保存され、多様な細胞で発現されているに違いないと元来信じられてきた。

【0003】リガンド親和性クロス-リンキング技術による構造評価の結果、配列上の顕著な相違にもかかわらず、IL-1 α 及びIL-1 β は、T細胞と繊維芽細胞の、同じ細胞表面受容体分子に結合することがわかった (Dower et al., Nature (London) 324:266, 1986; Bird et al., Nature (London) 324:263, 1986; Dower et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1060, 1986)。cDNA発現クローニング及び、IL-1 α 及びIL-1 β に結合し、80,000kDaの分子量を持つ膜内在性糖タンパク質としてのN端側配列分析から、ネズミとヒトのT細胞のIL-1受容体が同定された (シムズら (Sims et al.) Science 241:581, 1988; シムズら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8946, 1989)。

【0004】しかしながら、現在では、この80kDa IL-1受容体タンパク質がIL-1の種々の生物学的効力のすべてを伝達しているわけではないことが明らかになっている。更なる親和クロス-リンキング解析は、エプシュタインバーウイルス (Epstein Barr virus) (EBV)-形質転換ヒトB細胞系VDS-O及び3B6、EBV-陽性パーキット (Burkitt's) リンパ腫細胞系ラジ (Raji)、そしてネズミ前B細胞系70Z/3におけるIL-1受容体が60,000から68,000kDaの分子量であることを示唆している (マツシマら (Matsushima et al., J. Immunol. 136:4996, 1986; ベンシモンら (Bensimon et al., J. Immunol. 142:2290, 1989; ベンシモンら, J. Immunol. 143:1168, 1989; ホルークら (Horuk et al., J. Biol. Chem. 262:16275, 1987; チゾニッテ (Chizzonite) ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8029, 1989; ボムスツィックら (Bomsztyk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8034, 1989)。さらに、ラジB細胞系と、EL-4ネズミTリンパ腫細胞系のIL-1受容体の生物学的特性及び動的解析を比較したところ、ラジ細胞は、EL-4T細胞のサブクローンよりも、低い結合親和性を持つが、細胞あたり、より高密度に受容体を持つことが分かった (ホル

ク (Horuk) ら, J. Biol. Chem. 262:16275, 1987)。ラジ細胞はまた、IL-1を吸収することができず、IL-1類似物に対して異なった受容体結合親和力を示した (ホルークら, J. Biol. Chem. 262:16275, 1987)。これらのデータはB細胞上で発現されたIL-1受容体 (ここではタイプII IL-1受容体と呼ぶ) は、T細胞及びその他の細胞種で発見されたIL-1受容体 (ここではタイプI IL-1受容体と呼ぶ) と異なっていることを示唆している。

【0005】タイプII IL-1Rの構造的及び生物学的特性、そしてIL-1刺激に対する様々な細胞母集団の反応におけるタイプII IL-1Rの果たす役割を解析するために、あるいは、治療、診断、分析においてタイプII IL-1Rを有効に用いるために、均質な組成物が必要である。そのような組成物は、培養細胞で発現している受容体の精製によって、あるいは、受容体をコードしている遺伝子のクローニング及び発現によって理論的には得ることができる。しかしながら本発明以前には、いくつかの障害があり、目的は達成されなかった。

【0006】まず、タイプII IL-1Rを高いレベルで構成的に、連続的に発現する細胞系が以前には知られておらず、タイプII IL-1Rを発現するとして知られていた細胞系は少ない数 (500から2,000受容体/細胞) しか発現しなかったために、アミノ酸の配列情報を得たり、モノクローナル抗体を作製するのに十分な量の受容体の精製への努力が妨げられた。受容体の数が少ないために、また、実用的な転写分析に基づいたクローニング法も不可能であった。

【0007】次に、タイプI IL-RとタイプII IL-1RのDNA配列における顕著な相違のため、ネズミタイプIL-1R cDNAを用いたクロス-ハイブリダイゼーションも不可能であった (ボムスツィック (Bomsztyk) ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8034, 1989, 及びチゾニッテ (Chizzonite) ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8029, 1989)。

【0008】三番目として、仮に、N端側タンパク質配列決定を行うことができるほど十分に精製されたタンパク質組成物が得られたとしても、そこから得られる遺伝コードの退歩 (degeneracy) は、更にかんりの実験をしなければ、適切なプローブを決定できないであろう。cDNAライブラリーにおいてハイブリダイズする配列を決定するのに必要な特異性を持つプローブを決定するのに、多くの反復する試行が要求されるだろう。直接的発現クローニング技術は、未知の特異性を持つ異なったプローブを用いた反復したスクリーニングの必要を避けており、他の受容体 (例えばタイプI IL-

1 R) のクローニングにおいては有用であったが、少ない数のタイプII IL-1 Rを発現している細胞から得られたcDNAライブラリーから、タイプII IL-1 Rクローンを固定するために用いるのにふさわしいほどに十分に感度が高くない。

【0009】したがって、タイプII IL-1 Rを精製したり、タイプII IL-1 Rをコードする遺伝子をクローニングしたり発現したりする努力は、精製した受容体、受容体mRNAの適切な供給源が欠落していること、そして、十分に感度のあるクローニング技術の欠落によって著しく妨げられた。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、精製した、均質なタイプII IL-1 Rタンパク質及び、タイプII IL-1 Rタンパク質をコードする単離したDNA配列、特に、ヒトタイプII IL-1 R又はその類似物(analogs)を提供する。そのようなDNA配列は、好ましくは、(a)クローン75のように、天然タイプII IL-1 R遺伝子のコード部分に由来するヌクレオチド配列を持つcDNAクローン；(b)ゆるやかなストリンジェント条件下で(a)のcDNAクローンとハイブリダイズでき、生物学的活性のあるIL-1 R分子をコードするDNA配列；そして(c)(a)及び(b)で定義されたDNA配列の遺伝コードの結果として退歩し、かつ生物学的活性のあるIL-1 R分子をコードするDNA配列から成る群から選択される。本発明はまた、上に定義されたDNA配列を含む組換え発現ベクター、組換え発現ベクターを用いて産生された組換えタイプII IL-1 R分子、そして、発現ベクターを利用した組換えタイプII IL-1 R分子の産生方法を提供する。

【0011】本発明はまた、実質的に精製され、均質なタンパク質と、タイプII IL-1 Rを含む、タンパク質組成物を提供する。

【0012】本発明はまた、療法、診断、タイプII IL-1 Rの分析又は、タイプII IL-1 Rに対する抗体の作製において使用するための、上述の方法に従って調製された可溶性天然又は組換え受容体タンパク質の有効量を含む組成物を提供する。

【0013】本発明のこれらの、また他の側面は、以下の詳細な説明を参照すると明白になるであろう。

【0014】定義

“IL-1”は、IL-1 α 及びIL-1 β をあわせて指す。

【0015】“タイプII インターロイキン-1受容体”及び“タイプII IL-1 R”はインターロイキン-1(IL-1)分子を結合することができ、ホ乳類原形質膜タンパク質のような本来の構造をとるとき、IL-1から細胞への信号を伝達する役割を果たす分子を指す。成熟した全長ヒトタイプII IL-1 Rは、み

かけの分子量が約60-68kDaの糖タンパク質である。タイプII IL-1 Rタンパク質の具体例は、SEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:12に示されている。ここで用いられているように、上述の用語は、IL-1結合活性又は信号伝達活性を持つ天然タイプII IL-1 Rタンパク質の類似物又はサブユニットを含んでいる。特に、タイプII IL-1 Rタンパク質の先端を欠いた形や、可溶性の形状のものも、下記で定義するように、含まれている。種の指定がない場合は、タイプII IL-1 Rは、ヒト、ネズミ、ウシタイプII IL-1 Rを含むがそれらに限定されない、ホ乳類タイプII IL-1 Rを総称する。同様に、欠損変異に対する特別な指定がない場合、タイプII IL-1 Rという用語は、タイプII IL-1 Rの生物学的活性を持つ変異体又は類似物を含むすべての形態のタイプII IL-1 Rを意味する。“インターロイキン-1受容体”又は“IL-1 R”とは、タイプII IL-1受容体及びタイプII IL-1受容体をあわせて指す。

【0016】本発明の文脈で用いられている“可溶性タイプII IL-1 R”はタンパク質、又は、実質的に同等な類似物で、天然タイプII IL-1 Rの細胞外部分の全て又は一部と実質的に類似しており、細胞から分泌されるが、IL-1と結合する能力を持っているか、又は細胞表面に結合したIL-1 Rタンパク質を通じたIL-1の信号伝達を阻害する能力のあるものを指している。可溶性タイプII IL-1 Rタンパク質は、細胞から分泌されることができのなら、膜貫通領域の一部を含んでいるかもしれない。可溶性タイプII IL-1 Rタンパク質の具体例は、SEQ ID NO:1の1-330又は1-333アミノ酸配列を持つタンパク質、そして、SEQ ID NO:12の1-342及び1-345アミノ酸配列を持つタンパク質を含んでいる。IL-1信号伝達活性の阻害は、初代細胞又は、内在性IL-1 Rを発現し、IL-1に生物学的に反応するか、組換えIL-1 R DNAを導入するとIL-1に生物学的に反応するような細胞系を用いて決定することができる。細胞は、IL-1と接触を受け、それによって起きる代謝影響が解析される。もしリガンドの働きによる影響が出れば、組換え受容体は信号伝達活性を持つ。ポリペプチドが信号伝達活性を持つかどうかを決定するための典型的な手法は、イゼルダ(Idzerda)ら., J. Exp. Med. 171:861 (1990); カーチス(Curtis)ら., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3045 (1989); プリウエス(Prywes)ら., EMBO J. 5:2179 (1986) 及びコウ(Chou)ら., J. Biol. Chem. 262:1842 (1987) によって明らかになった。

【0017】“単離された”又は“精製された”という

用語は、本明細書の文脈中でタイプII IL-1Rタンパク質又はタンパク質組成物の純度を定義するために用いられている場合、タンパク質又はタンパク質組成物が、実質的に、他の、天然の、又は内在性由来のタンパク質の混入を受けておらず、生産過程の混入タンパク質残余が1%以下であることを意味する。このような組成物はしかし、安定剤、担体賦形剤または共治療剤として他のタンパク質を含むことがある。タイプII IL-1Rは、ポリアクリルアミドゲルを銀染色した時に、1本のバンドとして検出可能ならば“単離されて”いる。

【0018】“実質的に類似”という用語が、アミノ酸もしくは核酸配列を定義する時に用いられる場合、特有の従属配列、例えば、変異型配列が、もとの配列から、1つ又はそれ以上の置換、欠失、付加を受けて変化しており、それらの全影響が、例えば、タイプII IL-1R結合分析において、実施例5で以下に記述したように、決定された、タイプII IL-1Rタンパク質の生物学的活性を保っていることを意味している。あるいは、核酸サブユニットまたは類似物は、もし、(a) DNA配列がSEQ ID NO:1又はSEQ ID NO:12のコード領域から得られたものなら、(b) DNA配列が、ゆるやかなストリジェントな条件下(25%ホルムアミド, 42°C, 2×SSC)で、もしくはその代わりに、よりストリジェントな条件下(50%ホルムアミド, 50°C, 2×SSC, 又は50%ホルムアミド42°C, 2×SSC)で(a)のDNA配列とハイブリダイズすることができ、生物学的活性のあるIL-1R分子をコードしているのなら、あるいは、(a)又は(b)で定義されたDNA配列に対する遺伝コードの結果生じたDNA配列で、生物学的活性のあるIL-1R分子をコードするものなら、ここで明らかにした特定のDNA配列に“実質的に類似”している。

【0019】ここで用いられる“組換え”とは、タンパク質が組換え(例えば微生物又はホ乳類の)発現系で得られることを意味する。“微生物の”とは、細菌または菌類(例えば酵母)の発現系で作製された組換えタンパク質を指す。産品として、“組換え微生物の”は、天然の内在性物質を本質的に含まず、天然の糖鎖付加のないタンパク質を定義する。ほとんどの細菌培養、例えばE. coliで発現されたタンパク質は、グリカンを含まない。酵母で発現されたタンパク質は、ホ乳類細胞で発現されたものとは異なるパターンの糖鎖付加を受ける可能性がある。

【0020】タイプII IL-1Rの特性として本明細書を通じて用いられている“生物学的活性”とは、測定可能な量のIL-1、できれば少なくともタイプII IL-1R1ナノモルあたり、0.01ナノモルのIL-1を結合できるだけの充分なアミノ酸配列類似性をSEQ ID NO:2又はSEQ ID NO:13との間に共有する特定の分子、又は、そのかわりに、例

えば、雑種受容体構造の一部のように、IL-1刺激を細胞へ伝達できるだけの充分なアミノ酸配列類似性を共有する特定の分子を意味する。さらに、できれば、本発明の範囲では生物学的に活性のあるタイプII IL-1Rは、受容体1ナノモルあたり、0.1ナノモル以上のIL-1を結合する能力があり、最も望ましくは、受容体1ナノモルあたり0.5ナノモルのIL-1を結合することができる。

【0021】“DNA配列”とは、DNA重合体を指し、1つの分離した断片状又は、より大きなDNA構造の一部であり、少なくとも1度は、実質的に純粋な形状として、すなわち、内在性物質の汚染がなく、そして、配列の同定、操作、回収が可能なだけの量を持った形状で単離されたDNA由来で、例えばクローニングベクターを用いた標準生物化学的手法で得たヌクレオチド配列の部分である。このような配列は、真核生物遺伝子に特徴的に存在する内在非翻訳領域すなわちイントロンに中断されないオープンリーディングフレームをもつ形状で供給されることが望ましい。しかし、適切な配列を含むゲノムDNAも使用され得ることは明らかである。非翻訳DNAの配列は、オープンリーディングフレームの5'又は3'側に存在し、そこでは、操作又は、コード領域の発現に干渉しない。

【0022】“ヌクレオチド配列”は、デオキシリボヌクレオチドのヘチロ重合体を指している。本発明で供給されたタンパク質をコードするDNA配列は、cDNA断片及び、短いオリゴヌクレオチドリンカー又は、組換え転写単位で発現され得る合成遺伝子を供給するための一連のオリゴヌクレオチドから集められた。

【0023】“組換え発現ベクター”は、(1)例えばプロモーター又はエンハンサーのような、遺伝子発現制御をになう単一又は複数の遺伝因子、(2)mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される、構造的あるいは、コード配列、(3)適当な転写および翻訳開始及び終止配列、の集まりを含む転写単位を含むプラスミドを指す。酵母発現系で用いるための構造因子は、宿主細胞によって翻訳されたタンパク質が細胞外へ分泌されるようになるリーダー配列を含むことが望ましい。かわりに、リーダー又は輸送配列を持たずに発現された組換えタンパク質は、N端メチオニン残基を含むかもしれない。この残基は、最終産物を供給するために、発現組換えタンパク質から任意に、さらに切断されるかもしれない。

【0024】“組換え微生物発現系”とは、例えばE. coliのような細菌や、S. cerevisiaeのような酵母といった、宿主微小有機体の実質的に均質な単一培養を意味し、それら宿主は、染色体DNA中に組換え転写単位を安定して組み込んでいるか、もしくは、常在性プラスミドの構成物の1つとして組換え転写単位を持っている。一般に、系を構成する細胞は、単独の組換え体の子孫である。ここで定義される組換え発現系

は、DNA配列又は、発現される合成遺伝子に連結した制御因子の誘導によってヘテロなタンパク質を発現する。

【0025】タイプII IL-1Rタンパク質と類似物

本発明は単離された組換えホ乳類タイプII IL-1Rポリペプチドを提供する。本発明におけるタイプII IL-1Rタンパク質は、例として、霊長類、ヒト、ネズミ、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ヤギ及びブタタイプII IL-1Rを含んでいる。タイプII IL-1Rは、ヒト又はマウスタイプII IL-1R DNA配列から得られた一本鎖cDNAを用いた、種間ハイブリダイゼーションによって、例えば、ホ乳類のcDNAライブラリーから、タイプII IL-1R cDNAを単離するために、ヒトクローン75を、ハイブリダイゼーションプローブとして用いて、得ることができる。多くのホ乳類遺伝子同様、ホ乳類タイプII IL-1Rは、おそらく複数のエキソンにコードされている。転写後の異なったmRNAスプライシングによって生じ得る、本特許請求の範囲中にあるcDNAと同一又は類似性のある広範囲を共有するオルタータティブmRNA構成物は、本発明の範囲に含まれるとみなされている。IL-1R-IIをコードするDNA配列はおそらく、別のスプライシング配置の形状にあるが、次の細胞及び組織から単離され得る：Bリンホプラストイド系(CB23、CB33、ラジ、RPMI1788、ARH77のようなもの)、休止状態及び特に活性化状態にある末梢血液T細胞、単球、単球細胞系THP1、好中球、骨髓、胎盤、内皮細胞、角化細胞(特に活性化状態)、及びHe pG2細胞。

【0026】本発明の範囲内のタイプII IL-1Rの誘導物もまた、生物学的活性のある本来のタンパク質の様々な構造物形状を含んでいる。例えば、イオン化可能なアミノ及びカルボキシル基のためタイプII IL-1Rタンパク質は、酸性又は塩基性の塩として、あるいは中性の形状をとる可能性がある。個々のアミノ酸残基も酸化あるいは還元によって修飾を受ける可能性がある。

【0027】アミノ酸の一次構造は糖鎖群、脂質、リン酸、アセチル群、および同様のものといった他の化学的部分と共有又は擬集結合を形成することで、あるいは変異型アミノ酸配列を作成することで修飾される可能性がある。共有誘導物は特に機能的な群をタイプII IL-1Rのアミノ酸側鎖又は、N端又はC端に結合することで調製される。本発明の範囲内でのタイプII IL-1Rの他の誘導体は、N端又はC端の融合のような組換え培養における合成によるような、タイプII IL-1R又はその断片と、他のタンパク質又はポリペプチドの共有又は擬集結合を含んでいる。例えば、結合したペプチドは、翻訳と同時に、あるいは翻訳後、タンパク

質を、その合成部位から機能部位へ、細胞膜又は壁の内側あるいは外側へ輸送するような、タンパク質のN端部分にあるシグナル(又はリーダー)ポリペプチド配列かもしれない(例えば酵母の α -因子リーダー)。タイプII IL-1Rタンパク質融合は、タイプII IL-1Rの精製と同定を促進するためのペプチド(例えばポリHis)を含むこともできる。タイプII IL-1Rのアミノ酸配列はまた、ペプチドAsp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(DYKDDDDK)(ホップ(Hopp)ら., Bio/Technology 6:1204, 1988)と結合されることも可能である。後者の配列は、高い抗原性があり、特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合する抗体認識部位を供給し、発現された組み換えタンパク質の素早い分析と、容易な精製を可能にした。この配列は、また、ウシムコサル エンテキローナーゼ(mucosal enterokinase)によって、Asp-Lys対の直後で特異的に切断される。この配列でキャップされた融合タンパク質は、E. coli内で細胞内消化に耐性になる可能性がある。

【0028】タイプII IL-1R誘導体は、また、免疫原、受容体に基づいた免疫分析の試薬、あるいは、IL-1又は他の結合リガンドの親和精製手法のための結合試薬としても、使用することができる。タイプII IL-1R誘導体はまた、M-マレイミドベンゾイルサクシニドエステル及びN-ヒドロキシサクシニドといったシステイン及びリジン残基に働くクロス-リンキング試薬を用いて得られる可能性もある。タイプII IL-1Rタンパク質は、また、シアノゲンブロマイド、ピソキシレン、カルボニルジイミダゾール、又は、トシルによって活性化されたアガロース構造といった、様々な不溶性基質と、反応側基を通じて、あるいは、ポリオレフィン表面(グルタルアルデヒド クロスリンキングの有無にかかわらず)に吸着することで、共有結合される可能性をもつ。いったん基質と結合するとタイプII IL-1Rは(分析又は精製の目的で)抗-タイプII IL-1R抗体又はIL-1に選択的に結合するために用いることができるかもしれない。

【0029】本発明は、また、天然型糖鎖付加のある、あるいはない、タイプII IL-1Rも含んでいる。酵母あるいは、例えばCOS-7細胞といったホ乳類発現系で発現されたタイプII IL-1Rは、その発現系に依存して、天然の分子とは、分子量及び糖鎖付加の型が類似するか、もしくはわずかに異なる可能性がある。E. coliのような細菌でタイプII IL-1R DNAを発現すると、糖鎖付加されない分子が作られる。Nグリコシル化部位が不活性化された、ホ乳類タイプII IL-1Rの機能変異類似物は、オリゴヌクレオチド合成及びライゲーション又は、部位特異的変異導入技術によって作製することができる。これらの類似タ

ンパク質は、酵母の発現系を用いて、よい収率で均質で炭水化物還元型で作製されることが可能である。真核生物タンパク質のN-グリコシル化部位は、3つのアミノ酸、Asn-A₁-Zで特徴づけられており、ここでA₁は、Proをのぞく任意のアミノ酸で、ZはSer又はThrである。この配列中に、炭水化物の共有付加用の側鎖アミノ酸を、アスパラギンが供給している。ヒトタイプII IL-1RのN-グリコシル化部位の例では、SEQ ID NO:1のアミノ酸66-68、72-74、112-114、219-221及び277-279である。このような部位は、Asn又はZ残基を別のアミノ酸に置換したり、Asn又はZを削除したり、A₁とZとの間にZでないアミノ酸を挿入したり、AsnとA₁の間にAsn以外のものを挿入することで減少されることができる。

【0030】タイプII IL-1R誘導体はタイプII IL-1R又はそのサブユニットを変異型にすることで得られる。ここで示されているように、タイプII IL-1R変異体は、タイプII IL-1Rとポリペプチドは類似しているが、天然タイプII IL-1Rとは欠失、挿入、置換のため、異なったアミノ酸配列を持っている。

【0031】タイプII IL-1Rタンパク質の生物学的に同等の類似物は、例えば、残基又は配列の様々な置換、又は、末端又は内部の生物学的活性に不要な残基又は配列の欠失、によって作成される可能性がある。例えば、システイン残基は、再生にあたって、不必要もしくは間違った分子内ジスルフィド架橋の形成を防ぐため、欠失又は他のアミノ酸と置換されうる。変異導入の他の手段は、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母の系での発現を強めるために、隣接した2価塩基性アミノ酸残基の修飾も含んでいる。一般的に、置換は保存的でなければならない。すなわち、最も好ましいアミノ酸置換は、物理化学的性質の似かよった残基を置き換えるものである。同様に欠失または挿入を行おうとすると、生物学的活性に対する欠失又は挿入の与え得る影響を考慮しなければならない。実質的に類似したポリペプチド配列は、上で定義したように、一般に、同じくらいの数のアミノ酸配列を含むが、可溶性タイプII IL-1Rを作成するためにC端を切断したものは、より少ないアミノ酸残基を含むことになる。タイプII IL-1Rの生物学的活性を保存するために、欠失と置換は類似した、あるいは保存した置換配列で行われること、すなわち、当該の残基が生物学的に類似した残基と置換されることが望ましい。保存した置換の例は、Ile, Val, Leu, 又はAlaを互換するといった、疎水性残基どうしの置換や、LysとArg, GluとAsn, GlnとAsnといった極性残基どうしの置換を含んでいる。例えば類似した疎水性を持つ領域全体の置換といった、その他の保存した置換もよく知られている。

さらに、ヒト、ネズミ、及びその他のホ乳類のタイプII IL-1Rの間で異なっている特定のアミノ酸は、タイプII IL-1Rの本質的な生物学的特性を変えることのない、更なる保存した置換を示唆している。

【0032】タイプII IL-1Rのサブユニットは、末端あるいは内部の残基又は配列を欠失させて作製できる。本発明は、例えば、タイプII IL-1Rの細胞外領域の全部又は一部に相当する可溶性タイプII IL-1Rを生じるC端欠失を意図している。生じるタンパク質はIL-1に結合能があることが望ましい。特に望ましい配列は、タイプII IL-1Rの膜貫通領域と細胞内領域が欠失しているか、親水性残基に置換しており、受容体の細胞培養液への分泌を促進する配列である。可溶性タイプII IL-1Rタンパク質は、細胞から可溶性タイプII IL-1Rタンパク質が分泌可能であるならば、膜貫通領域を一部含んでいる可能性がある。例えば、可溶性ヒトタイプII IL-1Rは、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列1-333又は1-330を含み、SEQ ID NO:12のアミノ酸配列1-345及び1-342を含んでいるかもしれない。かわりに可溶性タイプII IL-1Rタンパク質はIL-1結合に必要でない細胞外領域中のタイプII IL-1RのC端領域の欠失から得られたかもしれない。例えば、SEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:12の配列で、それぞれ313、及び325アミノ酸以降を持つようなタンパク質を作成するためにC端欠失が行われたかもしれない。これらのアミノ酸はシステインで、タイプII IL-1R分子の3次構造を保つのに必要であると信じられており、タイプII IL-1R分子がIL-1に結合するのを許している。可溶性タイプII IL-1R構造は、タイプII IL-1RをコードするDNAの3'領域を欠失させ、適当な発現ベクターにDNAを挿入し、発現させた。このような可溶性タンパク質の構築の典型的な方法は実施例2及び4に述べている。生じたタイプII IL-1Rタンパク質は、実施例5で述べるように、IL-1に結合する能力を測定される。このような、可溶性タイプII IL-1RをコードするDNA配列及びこのような構造から生じる生物学的活性のある可溶性タイプII IL-1Rタンパク質は、どちらも本発明の範囲内に含まれるよう意図されている。

【0033】タイプII IL-1R類似物の発現用に作製されたヌクレオチド配列中の変異は、当然、コード配列の読み枠の相を保存しており、受容体mRNAの翻訳に負に影響するような、ループ、ヘアピンといったmRNAの2次構造を生じないようにハイブリダイズ可能な相補領域を生じないことが望ましい。変異を導入する部位は前もって決定されるが、変異それ自体の性質が前もって決定される必要はない。例えばある部位の変異の最適な性質を選択するために、標的コドンに対するランダ

ムな変異導入が行われ、発現された変異型タイプII IL-1Rは望ましい活性を持つものがスクリーニングされる。

【0034】タイプII IL-1Rをコードするヌクレオチド配列中のすべての変異が、最終産物として発現されるわけではない。例えば、ヌクレオチドの置換は、発現を強め、基本的に、転写されたmRNA中のループ等の2次構造を避けるように起きる(EPA75, 444A参照、参考文献でここに含まれている)か、例えば有名なE. coliの発現用のE. coliが好むコドン10のような、選択された宿主によってより素早く翻訳されるようなコドンを提供するように、起きる。

【0035】変異は、本来の配列の断片とライゲーションでできるような制限酵素部位を横に持った、変異配列を含む合成オリゴヌクレオチドによって、意図した位置へ導入することができる。ライゲーション後、生じた再構築された配列は、目的のアミノ酸の挿入、置換、欠失を持った類似物をコードする。

【0036】そのかわりに、オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異導入法を用いて必要な置換、欠失、挿入を持つように変化させた特別のコドンを持つ、改変遺伝子を作製することもできる。上述した改変を作製する典型的方法は、ワルダー(Walder)ら、(Gene 42:133, (1986)); ボイヤ(Baue)ら、(Gene 37:73, 1985); クレイク(Craik)(Biotechniques, January 1985, 12-19); スミス(Smith)ら(Genetic Engineering: principles and Methods, Plenum Press, 1981); によって明らかにされ、そして米国特許4,518,584号及び4,737,462号は適切な技術を開示し、参考文献中に編入されている。30

【0037】タイプII IL-1Rの単価型及び多価型のどちらも、本発明における組成物及び方法の点で有用である。多価型はIL-1リガンドに対する複数のタイプII IL-1R結合部位を持っている。例えば2価の可溶性タイプII IL-1Rは、リンカー領域で分離された、タイプII IL-1Rの細胞外領域の2つの縦方向くり返し構造をとっている。その他の多価型40も、例えば臨床用として使用可能な担体一般、フィコール、ポリエチレングリコール、又はデキストランを含む群から選択した重合体に、従来のカップリング技術を用いて、タイプII IL-1Rを化学的に結合させたものも作製される可能性がある。かわりに、タイプII IL-1Rは、ビオチン化学的に結合されると、ビオチン-タイプII IL-1Rは次にアビジンと結合し、アビジン/ビオチン/タイプII IL-1R分子の4量体が生じる。タイプII IL-1Rは、またジニトロフェノール(DNP)又は、トリニトロフェノール(T 50

NP)と共有結合し、生じる複合体は抗DNP又は抗TNP-IGMで沈降され、タイプII IL-1R結合サイトが10個ある10個複合体を形成する。

【0038】タイプII IL-1R配列を免疫プロブリン分子の重鎖又は軽鎖のどちらか一方又は両方と置換し、修飾を受けない不変領域を持つことで、組換えキメラ抗体を作製可能である。例えば、タイプII IL-1R/IGG₁キメラは、2つのキメラ遺伝子-タイプII IL-1R/ヒトκ軽鎖キメラ(タイプII IL-1R/CK)及びタイプII IL-1R/ヒトγ1重鎖キメラ(タイプII IL-1R/CY₁)-から生じる。2つのキメラ遺伝子の転写及び翻訳の後、遺伝子産物は、タイプII IL-1Rを持つ1つキメラ抗体分子に集合し、2価を示す。このようなタイプII IL-1Rの多価型はIL-1リガンドに対して強められた結合親和性を持つであろう。このようなキメラ抗体分子の構築に関する更なる詳細は、WO89/09622及びEP315062に開示されている。

【0039】組換えタイプII IL-1Rの発現

本発明はタイプII IL-1RをコードするDNAを増幅、又は、発現させるための組換え発現ベクターを提供する。組換え発現ベクターはホ乳類タイプII IL-1R又はその生物学的類似物をコードする、合成又はcDNA由来のDNA断片を持ち、ホ乳類、微生物、ウイルス又は昆虫由来の適切な転写又は翻訳調節因子と、実行可能なように結合した、複製可能なDNA構造物である。転写単位は一般に、(1)例えば転写プロモーター又はエンハンサーのように、遺伝子発現制御になう、単一又は複数の遺伝因子、(2)mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される、構造的あるいは、コード配列、(3)適当な転写および翻訳開始および終止配列、の集まりを含むが、それについては以下で詳細に記述する。そのような制御因子は、転写を制御するオペレーター配列、すなわち、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列を含むかもしれない。通常複製開始点によって得られる宿主中での複製能、及び形質転換体の認識を促進するための選択遺伝子も付加的に含まれている。DNA領域は、機能的に互いに関連している場合は、実行可能に結合されている。例えば、シグナルペプチド(分泌リーダー)DNAは、もしポリペプチドの分泌を担う前駆体として発現されるなら、ポリペプチドのDNAに実行可能に結合されている。プロモーターは、もし、配列の転写を制御するなら、コード配列に、実行可能に結合されている。あるいは、リボソーム結合部位は、もし、翻訳を許すために加えられているなら、コード配列に実行可能に結合されている。一般的に、実行可能に結合されている、とは、連続的に、そして分泌リーダーの場合は、連続的かつ読み枠に合って結合していることを意味する。酵母発現系において用いようとする構造因子は、宿主細胞によって翻訳されたタンパク質

が細胞外に分泌されることを可能にするリーダー配列を含むことが望ましい。かわりに、組換えタンパク質がリーダー又は輸送配列なしで発現した場合、N端メチオニン部位を含むことになる。この残基は、最終産物を供給するために発現された組換えタンパク質から続いて任意に切断される。

【0040】微小有機体で発現されることになる、ホ乳類タイプII IL-1RをコードするDNA配列は、mRNAへのDNAの転写を未熟なうちに停止させ得る。しかし、転写の未熟な停止は、望ましい。例えば、細胞膜に結合しない可溶性受容体を得るために、例えば膜貫通部分を欠失した有利切断されたC端を持つ変異体

が得られる場合などである。コードが縮重しているため、同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にはかなりの変化が起こり得る。他の態様はゆるやかなストリンジェントな条件(50°C, 2×SSC)下でクローン75とハイブリダイズできる配列及び、生物学的に活性のあるタイプII IL-1Rポリペプチドをコードするものとハイブリダイズするか、あるいは、縮重している配列を含んでいる。

【0041】組換えタイプII IL-1RDNAは、染色体DNA中に組換え転写単位を(形質転換又は形質導入によって)安定して組み込んでいるか、もしくは、常在性プラスミドの構成物の1つとして組換え転写単位を持っているような、例えば、E.coliのような細菌や、S.cerevisiaeのような酵母といった、宿主微小有機体の実質的に均質な単一培養を含む組換え発現系の中で発現されるか、増幅される。一般に、系を構成する細胞は、単一の祖形質転換体の子孫である。ここで定義された組換え発現系は、発現されるべきDNA配列または、合成遺伝子に結合した制御因子の誘導によって異種タンパク質を発現するであろう。

【0042】形質転換された宿主細胞は、組換えDNA技術を用いて構築されたタイプII IL-1Rベクターで形質転換または形質導入された細胞である。形質転換された宿主細胞は通常、タイプII IL-1Rを発現するが、タイプII IL-1RDNAをクローニング又は増幅させるために形質転換された宿主細胞は、タイプII IL-1Rを発現する必要がない。発現されたタイプII IL-1Rは、選択されたタイプII IL-1RDNAに依存して、細胞膜に置かれるが、培養液上清に分泌される。ホ乳類タイプII IL-1Rの発現用にふさわしい宿主細胞には、適切なプロモーターの制御下にある原核生物、酵母あるいはより高等な真核細胞が含まれる。原核生物は、例えばE.coli又はバチルスといった、グラム陰性又はグラム陽性菌が含まれる。高等真核細胞は、下に記述するような、ホ乳類由来の確立された細胞系を含んでいる。本発明のDNA構成物から得られたRNAを用いて、無細胞系によってホ乳類タイプII IL-1Rを産生することも可能で

ある。細菌、菌類、酵母及びホ乳類宿主細胞は、ポウエルス(Pouwels)らによって記述されており(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985)、それに関連する開示はこの中で参考文献中に含まれている。

【0043】大規模なタンパク質分解及びジスルフィド反応を必要としないタイプII IL-1Rの発現のためには、原核生物の発現宿主細胞が使用される。原核細胞の発現ベクターは一般に、例えば、抗生物質耐性を賦与するタンパク質をコードする遺伝子や、栄養要求性を補う遺伝子、といった、1つまたはそれ以上の表現型を持つ選択マーカーと、宿主内での増幅を保証する、宿主が認識する複製開始点を含んでいる。形質転換にふさわしい原核宿主生物は、E.coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium及び、Pseudomonas, Streptomyces及びStaphylococcus属に含まれる様々な種が含まれるが、その他のものも選択の問題で用いられる。

【0044】細菌用の有用な発現ベクターは、よく知られたクローニングベクターpBR322(ATCC37017)の遺伝因子を含む市販の入手可能なプラスミド由来の、選択マーカーと細菌の転写開始点を含みうる。そのような市販されているベクターは例えば、pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)及びpGEM1(Promega Biotec, Madison, WI, USA)を含んでいる。これらpBR322を“背骨”とする種類は、適切なプロモーターと、発現されるべき構造遺伝子が組合わさっている。E.coliは、あるE.coli種から得られたプラスミドであるpBR322の誘導体を用いて典型的に形質転換される(ポリバー(Bolivar)ら, Gene 2:95, 1977)。pBR322はアンピシリン及びテトラサイクリン耐性遺伝子を含み、形質転換された細胞の同定が容易になっている。

【0045】組換え微生物発現ベクターで一般に用いられているプロモーターは、β-ラクタマ-ゼ(ペニシリナ-ゼ)及びラクロースプロモーター系(チャンら(Chang), Nature 275:615, 1978及びゴッデル(Goeddel)ら, Nature 281:544, 1979)トリプトファン(trp)プロモーター系(マニアティス(Maniatis), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p.412, 1982)を含んでいる。特に便利な細菌の発現系は、λファージP_Lプロモーター及びcI 857₁温度依存リプレッサーを利用している。λP_Lプロモーターの誘導体を

含む、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手可能なベクターは、*E. coli* JMB9 (ATCC 37092) 株に常在する pHUB2 プラスミド、及び *E. coli* RR1 株 (ATCC 53082) に常在する pPLc28 プラスミドを含んでいる。

【0046】組換えタイプ II IL-1R タンパク質は、酵母宿主細胞中、とりわけ、*S. cerevisiae* のような、*Saccharomyces* 種においても発現される。*Pichia* あるいは *Kluyveromyces* といった他の属の酵母もまた、利用される。10 酵母のベクターは一般に酵母 2 μ プラスミド由来又は、自律転写配列 (ASR) 由来の複製開始点、プロモーター、タイプ II IL-1R をコードする DNA、ポリアダニル化のための配列及び転写終結と、選択遺伝子を含んでいる。好適には、酵母のベクターは複製開始点を含み、酵母にも、*E. coli* にも、形質転写できるような、例えば、*E. coli* のアンピシリン耐性遺伝子及び、*S. cerevisiae* のトリプトファン中では生育できない酵母の変異株の選択マーカーになる、TRP1 あるいは URA3 遺伝子、そして、下流の構造遺伝子の転写を誘導するための、高発現の酵母の遺伝子由来のプロモーターを含むことが望ましい。したがって、酵母宿主細胞のゲノム中に TRP1 又は URA3 の損傷が存在すると、トリプトファンまたはウラシルの欠落した中での生育によって、形質転換を検出する効果的な環境を与えることになる。

【0047】酵母ベクター中の適切なプロモーター配列は、メタロチオネイン、3-ホスフォグリセレートキナーゼのプロモーター (ヒツエマン (Hitzeman) ら、*J. Biol. Chem.* 255:207 30 3, 1980) 又は、他のエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオセホスフェイトイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼといった解糖系酵素のプロモーター (ヘス (Hess) ら、*J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968; 及びホルランド (Holland) ら、*Biochem.* 1 40 7:4900, 1978) を含む。酵母発現系で用いるのに適切なベクター及びプロモーターについて、R. ヒツエマン (R. Hitzeman) ら、EPA 73, 657 に更に述べられている。

【0048】望ましい酵母のベクターは、*E. coli* における選択と複製のための (Amp^r 遺伝子及び複製開始点) pUC18 由来の DNA 配列と、グルコースで抑制できる ADH2 プロモーターと、 α -因子分泌リーダー配列を含む酵母 DNA から組み立てることができる。ADH2 プロモーターに関してはラッセル (Rus 50

sell) ら、(*J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982) 及びベイヤ (Beier) ら、(*Nature* 300:724, 1982) によって記述されている。異種タンパク質の分泌を促す酵母 α -因子のリーダー配列は、プロモーターと発現すべき構造遺伝子の間に挿入することができる。例えば、クルジャン (Kurjan) ら、*Cell* 30:933, 1982; 及びビットル (Bitter) ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330, 1984 を参照されたい。リーダー配列は、その 3' 端に、リーダー配列と外来遺伝子の融合を促進する 1 つかそれ以上の制限酵素部位を持つように改変されるかもしれない。適切な酵母形質転換法は、当業者に知られている; 典型的な技法は、ハイネン (Heinnen) ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978 に記述されており、Trp⁺ 形質転換体の選択に、0.67% イーストナイトロジェンベース、0.5% カザミノ酸、2% グルコース、10 μ g/ml アデニン及び 20 μ g/ml ウラシルを含む選択培地; 又は、URA⁺ 形質転換体用には、0.67% YNB と、シェルマン (Sherman) ら、*Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1986 に記述されているようにアミノ酸と塩基を加えた培地を用いている。

【0049】ADH2 プロモーターから成るベクターにより形質転換された宿主の株は、発現のために、80 μ g/ml アデニンと 80 μ g/ml ウラシルを補われた、1% 酵母エキストラクト、2% ペプトンそして 1% または 4% グルコースから成る富栄養培地で増殖されることもあるだろう。粗酵母の上清を濾過より回収し、更に精製するまで 4 日に保持しておく。

【0050】組換えタンパク質を発現させるために、様々な哺乳類あるいは昆虫の培養細胞系も有利に用いられる。哺乳類の細胞における組換えタンパク質の発現は、作られたタンパク質が一般的に正しく折りたたまれ、適切に修飾され完全に機能的であるということから、特に好まれる。適した哺乳類の細胞系の実施例は、グルツマン (Gluzman) により記述された (*Cell* 123:175, 1981)、サルの腎臓の細胞からの COS-7 系統、及び例えば L 細胞、C127, 3T3, チャイニーズ ハムスター オバリー (CHO), HeLa そして BHK 細胞系を含めた適当なベクターを発現することのできる他の細胞系を含んでいる。哺乳類の発現ベクターは、複製開始点、発現される遺伝子につながつた適当なプロモーター及びエンハンサー、そして 5' または 3' に隣接した非転写配列のような非転写要素とリボゾーム結合サイト、ポリアダニル化サイト、スプライ

シングドナー及びアクセプターサイト、そして転写終了配列のような5'または3'非翻訳配列を含むこともあるだろう。昆虫の細胞でヘテロなタンパク質を生産するためのバキュロウイルス(Baculovirus)の系についてはルカウ(Luckow)とサマーズ(Summers)によるレビューがある、Bio/Technology 6:47(1988)。

【0051】セキツイ動物の細胞を形質転換するのに用いられることになる発現ベクターでの転写及び翻訳制御の配列は、ウイルスのソースから提供されることもあるだろう。例えば、最もよく用いられるプロモーター及びエンハンサーは、ポリオーマ、アデノウイルス2、シミアンウイルス40(SV40)及びヒトサイトメガロウイルス由来である。SV40ウイルスゲノム由来のDNA配列、例えばSV40オリジン、初期及び後期プロモーター、エンハンサー、スプライシングそしてポリアデニル化サイトは、ヘテロなDNA配列の発現に要求される他の遺伝子要素を供給するために用いられることもあるだろう。初期及び後期プロモーターは、共にSV40ウイルス複製オリジンも含んだ断片としてウイルスから容易に得られるので、特に有用である(フィアーズ(Fiers)ら、Nature 273:113, 1978)。ウイルス複製開始点に位置しているHind3サイトからBgll1サイトへの約250bpの塩基配列を含んでいるならば、より小さなあるいはより大きなSV40断片も用いられることがあると思われる。更に、哺乳類のジェノミックタイプIIのIL-1Rプロモーター、コントロール、そして/またはシグナル配列が、そうしたコントロール配列が、選択された宿主の細胞とおりあうならば利用されることもあるだろう。組換えた哺乳類タイプII IL-1Rを生産する哺乳類高発現ベクターについての更なる詳細は、以下の実施例2で示される。典型的なベクターは、オカヤマ及びバーク(Berg)により発表されたようにして構築することができる(Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983)。

【0052】C127マウス乳腺上皮細胞において、哺乳類のレセプターcDNAを安定に高レベルで発現させるのに有用な系は、実質的にコスマン(Cosman)らにより記述されたようにして作製することができる(Mol. Immunol. 23:935, 1986)。

【0053】本発明の利点においては、タイプII IL-1R cDNAを含む組換え発現ベクターが安定に宿主細胞のDNAにインテグレートされることである。発現産物の上昇したレベルは、ベクターDNAの数が増幅された細胞系を選択することにより、達成される。ベクターDNAの数が増幅された細胞系は、例えば、既知の薬剤により阻害される酵素をコードしたDNA配列を含むベクターで宿主の細胞を形質転換することにより選択

される。ベクターは、また、目的とするタンパク質をコードしているDNA配列を含んでいてもよい。また、宿主細胞を、目的とするタンパク質をコードしているDNA配列を含む第2のベクターでコトランスフォーム(Cotransform)してもよい。トランスフォームあるいはコトランスフォームした宿主の細胞を、それから、既知の薬剤の濃度を増やしながら培養し、それにより、薬剤耐性の細胞を選択する。そのような薬剤耐性の細胞は、しばしば、酵素をコードしている遺伝子の増幅の結果として、薬剤により阻害される酵素の過剰生産により毒性の薬剤の濃度が増加しても生き残る。阻害される酵素をコードしているベクターDNAのコピー数の増加により薬剤耐性が生じている場合は、宿主細胞のDNAで目的とするタンパク質(例:タイプII IL-1R)をコードしているベクターDNAの随伴性の共増幅が存在している。

【0054】そのような共増幅のためのより好ましい系は、薬剤メトレキセート(MTX)により阻害されるジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)の遺伝子を用いている。共増幅を達成するため、DHFRをコードしている活性のある遺伝子を欠いている宿主細胞を、DHFR及び目的とするタンパク質をコードするDNA配列を含むベクターでトランスフォームするか、もしくは、DHFRをコードしているDNA配列を含むベクターと目的とするタンパク質をコードするDNA配列を含むベクターとでコトランスフォームする。トランスフォームまたはコトランスフォームした宿主細胞を、増加したレベルのMTXを含む培地で培養して、生き残った細胞系を選択する。

【0055】特に好ましい共増幅の系は、グルタミン酸とアンモニアから、ATPをADPとリン酸に加水分解して反応を進ませてグルタミンを合成するのにあずかっているグルタミン合成酵素(GS)の遺伝子を用いている。GSは様々な阻害剤、例えばメチオニンスルフォキシミン(MSX)により阻害を受ける。従って、タイプII IL-1Rは、GSと目的とするタンパク質のDNA配列から成るベクターでトランスフォーム、あるいはGSをコードしたDNA配列を含むベクターと目的とするタンパク質をコードしたDNA配列を含むベクターとでコトランスフォームした細胞を共増幅させ、増加したレベルのMSXを含む培地で宿主細胞を培養し、生き残った細胞を選択することにより高濃度で発現されることができる。GS共増幅システム、適当な組換え発現ベクター及び細胞系は以下のPCT出願に記述されている:WO87/04462, WO89/01036, WO89/10404及びWO86/05807。

【0056】組換えタンパク質は、チャイニーズハムスターオバリー(CHO)細胞のような哺乳類細胞系統、あるいはまたSP2/O-Ag14がNSOのようなマウスミエローマ細胞系もしくはYB2/3.0-Ag2

0のようなラットミエローマ細胞系（PCT出願WO/89/10404及びWO86/05807にて開示されている）でも、DHFRがGSの共増幅により好ましく発現されている。

【0057】タイプII IL-1R DNAの発現のためのより好ましい真核細胞のベクターは以下の実施例2で開示される。このベクターはpDC406と名づけられているが、哺乳類の高発現ベクターpDC201由来で、SV40、HIV及びEBVからの制御配列を含んでいる。

【0058】組換え体タイプII IL-1Rの精製
本発明のDNAの翻訳産物を発現する適当な宿主/ベクター系を培養し、その培地又は細胞抽出液から精製を行うことにより、精製哺乳類タイプII IL-1R又はそのアナログが調製される。

【0059】例えば、組換え体可溶性タイプII IL-1Rタンパク質を培地中に分泌する系での上澄は、初めに商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えば、アミコン（Amicon）又はミリポア ペリコン（Millipore Pellicon）限外濾過ユニットを用いて濃縮され得る。濃縮に続き、濃縮液は適当な精製担体にアブライされる。例えば、適当なアフィニティー担体は、IL-1又はレクチンあるいは抗体分子を適当な支持体に結合させたものから成る。別法として、例えば、ジエチルアミノエチル（DEAE）付加を有する担体又は基質のような陰イオン交換樹脂も用いられ得る。担体としては、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースあるいはタンパク質精製に一般に用いられる他のタイプのものを使用できる。適当な陽イオン交換体は、スルホプロピル基又はカルボキシメチル基を含む多様な不溶性担体を含む。スルホプロピル基がより好ましい。

【0060】最終的に、疎水性逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）担体、例えば、メチル基あるいは他の脂肪族基の付加を有するシリカゲル、を用いた1回あるいはそれ以上のRP-HPLCを行って、さらに、タイプII IL-1R構成物を精製でき得る。上述の精製操作のいくつか又はすべては、多様な組合せにより、同種の組換えタンパク質の調製にも用いられ得る。

【0061】バクテリアの培養で作られた組換えタンパク質は通常、初めに細胞ペレットからの抽出により分離され、1回又はそれ以上の濃縮、塩析、水相イオン交換あるいはサイズ排除クロマトグラフィー操作が行われる。最後に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が最終精製操作として行われ得る。組換え哺乳類タイプII IL-1Rの発現に用いた微生物の細胞は、凍結-融解サイクリング、ソニケーション、機械的破壊、又は細胞溶菌試薬の利用を含むいかなる簡便な方法によっても破壊され得る。

【0062】分泌タンパク質として可溶性哺乳類タイプII IL-1Rを発現する酵母の発酵は精製を著しく簡便化する。ラージスケールの発酵から生じた分泌組換えタンパク質はアーダル（Urdal et al.）（J. Chromatog. 296:171, 1984）により開示されたのと類似の手法により精製され得る。この引用文献は、調製用HPLCカラムで、組換えヒトGM-CSFの精製を行うための、連続した2回の逆相HPLC操作を記述している。

10 【0063】組換え体培養中で合成されたヒトタイプII IL-1Rは、培養中からヒトタイプII IL-1Rを回収するための精製操作に依存する、タンパク質を含む非ヒト細胞成分の量や性質によって格付けされる。これらの成分は通常、酵母、原核生物又は非ヒト高等真核生物起源のもので、重量にして約1%未満の程度で、存在が無害な夾雑物質量であることが望ましい。さらに、組換え体細胞培養は、例えば細胞内、細胞滲出液又は体液中のような天然起源では通常タイプII IL-1Rと結合しているタンパク質を含まない、タイプII IL-1Rの製造を可能にする。

【0064】組換え体可溶性タイプII IL-1Rの
治療投与

本発明は、有効量の可溶性タイプII IL-1Rタンパク質と適当な希釈液及びキャリアー（担体）から成る治療用構成品を使用する方法、並びに有効量の可溶性タイプII IL-1Rタンパク質の投与によって、ヒトのIL-1依存免疫反応で抑制する方法で提供する。

【0065】治療用には、患者、望ましくはヒトに、精製可溶液タイプII IL-1Rタンパク質を徴候に応じた適切な処理により投与する。従って、可溶性タイプII IL-1Rタンパク質構成品は丸薬注入、連続的点滴、インプラントからの持続的放出又は他の適切な技法により投与され得る。典型的には、可溶性タイプII IL-1R治療薬は生理的に受容可能なキャリアー、賦形剤又は希釈液と結合させた精製タンパク質から成る構成品の形で投与される。このようなキャリアーは使用量及び濃度で受容者に対し毒性の無いものである。一般に、このような構成品の調製は、タイプII IL-1Rをバッファー、アスコルビン酸のような酸化防止剤、
40 低分子量（約10残基以下）のポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、ブドウ糖、ショ糖又はデキストリンを含む炭水化物、EDTAのようなキレート剤、グルタチオン並びに他の安定剤及び賦形剤との組み合わせを伴う。中性の緩衝塩水又は同種の血清アルブミンを混合させた塩水が典型的な、適当な希釈液である。好ましくは、製品は希釈液として適当な賦形剤液（例えばショ糖）を用いた凍結乾燥品として定型化されるのが良い。適切な投与量は試験により決定され得る。一般に、shuIL-1R投与量は約1mg/kg/日から約10mg/kg
50 /日で、好ましくは約500µg/kg/日から約5mg/kg/日である。

g / k g / 日で生理作用を誘導することが期待される。
 【0066】IL-1R-1とタイプII IL-1Rタンパク質は双方ともIL-1Rに結合するため、可溶性タイプII IL-1Rタンパク質は同一ではないにしても、同様の治療上の活性が期待される。例えば、可溶性ヒトタイプII IL-1Rは例えばヒトの免疫反応で抑制する目的に投与され得る。同種移植拒絶及び移植片対被植者間の反応を含め、多様な病気及び症状がアロ抗原に対する免疫反応に起因する。アロ抗原で誘導される免疫反応では、shuIL-1RはT細胞活性化を引き起こすリンパ球増殖及び炎症を抑制する。従ってshuIL-1Rは、例えば同種移植（皮膚、腎臓、心臓移植のようなもの）並びに骨髓移植を受けた患者の移植片-被植者間の反応などの臨床処置において、アロ抗原によって誘導される免疫反応を有効に抑制するのに用いられる。

【0067】可溶性ヒトタイプII IL-1Rは、自己固有のものとして認識されない抗原に対するT細胞の活性化に依存するリウマチ様関節炎、糖尿病及び多発性硬化症などの自己免疫機能不全の臨床処置にも用いられ得る。

【0068】以下の実施例は例証として示され、制限的なものではない。

【0069】

【実施例1】CV-1/EBNA-1細胞内での活性タンパク質の直接的発現によるヒトタイプII IL-1RをコードするcDNAの単離

A. rIL-1βのラジオリベル 組換えヒトIL-1βを、クローンハイムら(Kronheim et al.)により記載されたように、大腸菌(E. coli)で発現し同室になるように精製して、調製した。(Bio/Technology 4:1078, 1986) IL-1βをジ-ヨード(¹²⁵I)ボルトン-ハンター(Bolton-hunter)試薬(New England Nuclear, Glenolden, PA)でラベルした。10μlのリン酸(0.015mol/L)緩衝塩溶液(PBS:0.15mol/L), pH7.2に懸濁した10マイクログラム(0.57nmol)のタンパク質をホウ酸ナトリウム(0.1mol/L)-緩衝塩溶液(0.15mol/L)、pH 8.5, 10μLと混合し、ボルトン-ハンター試薬1mCi(0.23nmol)と製造業者の指示に従い、8で12時間反応した。次に、2%ゼラチン30μLと1mol/Lグリシン エチル エステルを加え、タンパク質を1mL容量Biogel™P6カラム(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)にかけて未反応のボルトン-ハンター試薬から分離した。常に50%から60%のラベルの結合がみられた。ヨードラベルは1×10¹⁵から5×10¹⁵cpm/mmol-1(0.4から2原子Iタンパク質分

子あたり)の範囲の比活性を生じ、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により、17.5kDの一種のラベルされたポリペプチドが検出され、その分子量はIL-1の既に報告されている値と一致した。ラベルしたタンパク質は98%以上TCA沈殿可能であり、これによりI¹²⁵はタンパク質に共有結合していることが示唆された。

【0070】B. CB23cDNAライブラリーの作成とスクリーニング SV40、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)及びエプシュタイン-バー(Epstein-Barr)ウイルス(EBV)の調節配列を含む哺乳類発現ベクター(pDC406)を使用して、集めていたcDNAクローンのサル腎臓細胞系CV-1/EBNA-1(以下に示すようにCV-1細胞系をEBNA-1をコードする遺伝子で形質転換したものに由来する)での直接的発現により、CB23ライブラリーを作成及びスクリーニングした。CV-1/EBNA-1細胞系は、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)の直接初期からきくエンハンサー/プロモーターによって制御を受けてEBV核抗原-1を構造的に発現しており、従ってEBV複製起源を含むpDC406のような発現ベクターの自律複製を可能にする。使用した発現ベクターはpDC406で、HAV-EO由来でドーワーら(Dower et al., J. Immunol, 142:4314, 1989)に記載されており、それは今度はpDC201由来で、CV-1/EBNA-1細胞系中で高レベル発現が可能である。pDC406はHAV-EO(ドーワーら、前出)とはHAV-EO中の2型アデノウイルスの3部リーダー配列中のイントロンがないという点が異なる。

【0071】CB23cDNAライブラリーは、大体は、アウスベルら(Ausubel et al.), eds., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, 1987に記載してあるようにして、B細胞リンパ胸腺系CB23から抽出した全RNAより分離してポリ(A)⁺mRNAを逆転写して作成した(ベンジャミンとドーワー(Benjamin & Dower), Blood 75:2017, 1990)。CB23細胞系はEBV感染索状血球(CB)リンパ細胞系であり、ベンジャミンら(Benjamin et al.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3547, 1984記載の方法を用いて派生された。ポリ(A)⁺mRNAをオリゴdTセルロースクロマトグラフィーにより分離し、大体、グブラーとホフマン(Gubler and Hoffman), Gene 25:263, 1983の記述に従い、二重鎖cDNAを作成した。簡単に言うと、ポリ(A)⁺mRNAを、ランダム 6ヌクレチドをプライマーとして利用して逆転写酵素により、RNA-cDNAハイブリッドに変えた。その後D

25

NAポリメラーゼIと共同でRNAアーゼHを使用し、RNA-cDNAハイブリッドを二重鎖cDNAに変えた。その結果生じた二重鎖cDNAをT4DNAポリメラーゼで平滑端にした。逆の2重のリン酸化していないオリゴヌクレオチドをアニールし、生じた平滑端cDNAの末端とDNAリガーゼで平滑端ライゲーションをハ*

SEQ ID NO:3

5'-TCG ACT GGA ACG AGA CGA CCT GCT -3'

SEQ ID NO:4

3'-GA CCT TGC TCT GCT GGA CGA -5'
<SalI>

【0073】この場合24マーのオリゴしかcDNAにライゲーションしないと予測される。ライゲーションしていないオリゴを68でゲル濾過クロマトグラフィーにより除去し、cDNA上に24ヌクレオチド非自己相補の突出部分を残した。同様の方法を用いて、哺乳類発現ベクターpDC406SalI切断5'端をcDNAに付加したものと相補的な24ヌクレオチド突出部分に変えた。アダプター付ベクターとcDNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼ存在下で最適比率でライゲーションした。ライゲーション混合物を透析しE.coli株D20H5αにエレクトロポレーションした。約 3.9×10^6 クローンが生じ、約3000個ずつの集団プレートした。各集団のサンプルを凍結グリセロール保存用に使用し、プラスミドDNAの集団を得るためにも使用した。集められたDNAをその後、DEAE-デキストランを使用したサルCV1/EBNA-1細胞擬集密的細胞層にトランスフェクションし、ルースマンら(Luthman et al., Nucl. Acids Res. 11:1295(1983)及びマックカッチャンら(McCutchan et al., J. Natl. 30 Cancer Inst, 41:351(1986)に記載されているものに類似した、クロロキン(Chloroquine)処理を行った。CV-1/EBNA-*

SEQ ID NO:5

5'-CTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGT-3'

SEQ ID NO:6

3'-GACAACCCGAGCGCCAACCTCTGTTTGAGAAGCGCCAGAAAGGTCA-5'

【0075】次に、エプシュタイン-バーウィルス核抗原I(EBNA-1)をコードし、EBV地図の107,932から109,894から本来なるHindIII-AhaII制限断片(バウルら(Baer et 40 al.), Nature 310:207, 1984)をその後pDC303のマルチプルクローニングサイトに挿入し、プラスミドpDC303/EBNA-1をつくった。標準的方法(オスベルら., 前出; マリガンとパーク前出)に従い、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン、キサンチン及びマイコフェノリン酸の存在下でトランスフェクションした細胞を増殖し、トランスフェクトしたプラスミドを安定に混入した細胞を選別した。得られた薬剤耐性コロニーを分離し、解析のため各々細胞系に拡大した。細胞系を機能するEBNA-1 50

26

*イメルら(Haymerle et al.) Nucl. eic Acids Research, 14:8615, 1986の記述に従い行った。

【0072】

【化1】

*1細胞は以下のようにして、派生した。CV-1/EBNA-1細胞系は構造的に、CHVの即時初期のエンハンサー/プロモーターにより制御されているEBV核抗原-1を発現している。アフリカミドリザル腎臓細胞系CV-1(ATCC CCL70)に、5μgのpSVgpt[マリガンとバーク(Mulligan & Berg), Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 78:2072, 1981]と25μgのpDC303/EBNA-1をリン酸カルシウム共沈技術(アウス-ベルら. eds., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, 1987)をコトランスフェクションした。pDC303/EBNA-1はpDC302[モーズレイら(Mosley et al.), Cell 59:335, 1989]から2段落で作成された。はじめにアテツウィルス3部リーダー配列に存在するイントロンを、以下の合成オリゴヌクレオチドの一对で、イントロンをまたぐPvuIIからScaIの断片を入れかえることにより除去しプラスミドpDC303をつくった。

【0074】

【化2】

の発現によりスクリーニングした。1つの細胞系クローン68がこのアッセイを用いて、EBNA-1を発現していることがわかりCV-1/EBNA-1と選定された。

【0076】CV-1/EBNA-1細胞にcDNAライブラリーをトランスフェクトするため、細胞を完全培地(ダルベッコ(Dulbecco)改良イーグル(Eagle)培地(DMEM)10%(v/v)胎盤ウシ血清(FCS), 50U/mlペニシリン、50U/mlストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを含む)で維持し、 2×10^5 細胞/ウェルの密度で6ウェル皿(Falcon)又は1ウェルチェンバーつきスライド(Lab-Tek)にプレートした。皿及びスライドとも、1mlヒトフィブロネクチン(10μg/ml P

B S 中) で30分前処理した後P B Sで1回洗った。培地を接着細胞層から除去し、66.6 μ Mクロロキン硫酸を含む1.5 ml完全培地にかえた。0.2 mlのDNA溶液(クロロキン入り完全培地中2 μ g DNA, 0.5 mg/ml DEAE-デキストラン)をその後細胞に加え5時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を除き、細胞を10% DMSOを含む完全培地を2.5から20分加えてショックを与え、次に、新たな完全培地により溶液をとりかえた。細胞は培養中一時的に挿入した配列が発現できるように増殖するようにした。これらの条件では生き残るCV-1/EBNA-1細胞の80%のトランスフェクション効率を得た。

【0077】48から72時間後、トランスフェクトしたCV-1/EBNA細胞単層を、前述のように調製したラジオヨード化したIL-1 β の結合を、スライドオートラジオグラフィーによりみることでIL-1結合タンパク質の発現についてアッセイした。トランスフェクトされたCV-1/EBNA-1細胞を結合培地(RPMI培地1640、25 mg/mlウシ血清アルブミン、2 mg/mlアジ化ナトリウム、20 mM HEPES, pH 7.2と50 mg/ml無脂肪ドライミルク(NFDM)を含む)で1回洗い、 3×10^{-9} M 125 I-IL-1 β を含む1 ml結合培地+NFDMと4で2時間インキュベートした。インキュベーション後チェンバー付スライド中の細胞を結合バッファー+NFDMで3回洗い次にPBS, pH 7.3で2回洗い、非結合 125 I-IL-1 β を除いた。細胞をPBS, pH 7.3 10%グルタルアルデヒド中室温で30分インキュベートして固定し、PBSで2回洗い、風乾した。スライドをコダックGTNB-2写真用乳剤(水で6倍希釈)にひたし、遮光箱中で48時間から7日暗所で露光した。スライドをその後、コダックD19現像液(40 g/500 ml水で約5分現像し、水でリンスし、Agfa G433C定着液で固定した。スライドを各々顕微鏡で25-40 $\times$ 倍率で観察し、タイプII IL-1Rを発現している陽性細胞を明るいバックグラウンドの中のオートラジオグラフィー銀粒子の存在により固定した。

【0078】6ウェル皿中の細胞を1度結合バッファー+NFDM中で洗い次にPBS pH 7.3で3回洗い非結合 125 I-IL-1 β を除いた。結合した細胞をその後トリプシン分解してプレートから除き、結合した 125 I-IL-1 β を抽出し、 125 I-IL-1 β の放射能を測定した。

SEQ ID NO:8

5'-GCGCGGCCGCTCAGGAGGAGGCTTCCTTGACTG-3'
<-NotI->End\1191

【0082】5'プライマーはヒトタイプII IL-1Rクローン75(SEQ ID NO:1)の非翻訳領域の31-51ヌクレオチドに5'にSalI制限酵素

*I-IL-1 β をベータ計数計により計数した。

【0079】スライドオートラジオグラフィー法を使用したところ、約3000 cDNAの集団ずつ250,000 cDNAスクリーニングして初めてトランスフェクタント集団のアッセイが明らかにIL-1 β 結合陽性の多くの細胞を示した。この集団をその後500集団ずつに分け、再びスライドオートラジオグラフィーによりスクリーニングしたところ、陽性集団1つが同定された。この集団をさらに75ずつの集団に分け、6ウェルプレートにプレートし、結合した 125 I-IL-1 β の定量により解析するプレート結合アッセイによりスクリーニングした。細胞をプレートから削りとりどの75の集団が陽性が決めるため計数した。この75の集団の個々のコロニーをスクリーニングして、1つのクローン(クローン75)が、IL-1 β 結合アッセイで検出可能なタンパク質の合成を行っていることを同定した。このクローンを単離し、その挿入部分をシークエンスしてヒトタイプII IL-1R cDNAクローン75の配列を決定した。ヒトタイプII IL-1R cDNAクローン75をもつpDC406クローニングベクターはpHuIL-1R-II 75と名付けられアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(Rockville MD, USA)に1990年6月5日寄託番号CRL10478として寄託された。クローン75の核酸(SEQ ID NO:1)及び予想アミノ酸配列(SEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:2)及び関連情報を発表した配列表は本明細書の後半部を示している。

【0080】

【実施例2】ヒト溶性タイプII IL-1RをコードするcDNAの作成と発現

ベクターpDC406中の全長タイプII IL-1R cDNAクローン75(SEQ ID NO:1)を鋳型として使い、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)増幅により、溶性ヒトタイプII IL-1RをコードするcDNA(SEQ ID NO:1のアミノ酸13-333の配列をもつ)を作成した。次の5'オリゴヌクレオチドプライマー(SEQ ID NO:7)及び3'オリゴヌクレオチドプライマー(SEQ ID NO:8)を最初に作成した。

【0081】

【化3】

5'-GCGTCGACCTAGTGACGCTCATACAAATC-3'
<SalI>

SEQ ID NO:8

5'-GCGCGGCCGCTCAGGAGGAGGCTTCCTTGACTG-3'
<-NotI->End\1191

部位を付したものに相当しているので、このヌクレオチド配列は、ヒトクローン75ヌクレオチド31-51に相補的な(-)鎖にアニールすることができる。3'プ

ライマーはヌクレオチド1191-1172(ヒトタイプII IL-1Rクローン75(SEQ ID NO:1)の3アミノ酸をコードするアンチ-センスヌクレオチドからなる)に相補的で、NotI制限酵素部位を5'に付加し終止コドンを持つ。

【0083】次のPCR試薬を1.5mlエペンドルフ微量遠心チューブに加えた: 10×PCRバッファー(500mMKCl, 100mMTris-HCl, pH8.3, 25で15mM MgCl₂及び1mg/mlゼラチン)(パーキン-エルマーシートス; Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CN) 10μl, 各dNTPを含む2mM溶液(2mMdATP, 2mMdCTP, 2mMdGTP及び2mMdTTP) 10μl, Taq DNAポリメラーゼ2.5ユニット(500ユニット1ml溶液0.5μl)(パーキン-エルマーシートス)、鋳型DNA50ng及び各上記オリゴヌクレオチドプライマー20μM溶液5μlに74.5μlの水を加え最終量100μlとし、そして最終混合物に100μlのパラフィンオイルを上からのせた。最初94 90秒で鋳型を変性し、5 20 5°、75秒で再アニールし、72 150秒でcDNAを伸長させて、DNA温度循環器(エリコンプ(Ericomp)サン ディエゴCA)を使用し、PCRを行った。ステッププログラム(94°、25秒変性、55°、45秒アニーリング、72°150秒伸長)を使用した増幅をさらに20サイクルPCRを行い、次に72°、5分間伸長した。

【0084】試料を、フェノール-クロロホルム抽出及びG-50(ベーリンガー・マンハイム)でのスパンカラムクロマトグラフィーによりパラフィンオイルを除きDNAを抽出した。抽出DNA10μl画分を1%SeaKemTMアガロース(FMCBioProducts, Rockland, ME)上で電気泳動で分離し、臭化エチジウムで染色し、DNA断片サイズが予測された産物と同一であることを確認した。

【0085】そこで、20μlのPCR-増幅cDNA産物を標準的方法を用いてSalI及びNotI制限酵素で消化した。SalI/NotI制限酵素断片をその後1.2% Sea plaqueTM低温溶解(LGT)アガロース上で分離し、断片をあらわしているバンドを単離した。断片を標準的なゲル内ライゲーション法によりpDC406にライゲーションし、ベクターをCV1-EBNA細胞にトランスフェクトして実施例1に前述したように発現させた。

【0086】

【実施例3】マウスタイプII IL-1RをコードするcDNAの単離

マウスタイプII IL-1RcDNAsをマウス前駆

B細胞系統70Z/3(ATCCTIB158)より作成されたcDNAライブラリーから、ヒトタイプII IL-1Rプローブを用いた種間ハイブリダイゼーションにより単離した。cDNAライブラリーは製造業者の指示に従ってλgt10アームを使用して、試験管内パッケージ(登録商標ギガバック、ストラタジーン、サンディエゴ)を行ってλファージベクター中に作成した。2本鎖ヒトタイプII IL-1RプローブはヒトタイプII IL-1Rクローン75の約1.35kb SalI制限酵素フラグメントを切りだして、ランダムプライマー(ベーリンガー・マンハイム)を使用してcDNAを³²Pラベルして作成した。マウスcDNAライブラリーは1回増幅し、全部で5×10⁵プラークをヒトプローブで35%ホルムアミド(5×SSC, 42)中でスクリーニングした。いくつかのマウスタイプII IL-1RcDNAクローン(クローンλ2を含む)を単離したが、どのクローンも全長のもではないであった。部分的クローンから得たヌクレオチド配列情報を用いて、以下のように全長のマウスタイプII IL-1RcDNAをクローン化した。

【0087】マウスタイプII IL-1Rをコードする全長cDNAクローンを、フロマンら(Frohm et al.)Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:8998に記載されているcDNA端の迅速増幅(RACE)法によりマウス前駆B細胞系統70Z/3を用いて単離した。簡単にいうとRACE法はPCRを使用して、cDNA転写物の既知点(上記で得られた核酸配列より決定)から3端の間の領域のcDNAのコピーを増幅するものである。17dT塩基対を含む配列と、3つのエンドヌクレアーゼ認識部位を含むアダプター配列(便利な制限酵素部位をcDNAの3端につける)をもつアダプタープライマーを、mRNA集団の逆転写及び(-)鎖cDNAの生成に使用する。上記のマウスタイプII IL-1Rクローン2cDNAの5'非翻訳領域の配列の既知のストレッチに相補的で3'方向を向いているプライマーを(-)鎖cDNAとアニールし、伸長して相補(+)鎖cDNAを生成する。結果生じた二本鎖cDNAを本来のままの5'端と合成3'端ポリ(A)尾部にアニールするプライマーを使用してPCRにより増幅する。RACE法の詳細は以下のとおりである。

【0088】下記のPCRオリゴヌクレオチドプライマー(それぞれd(T)₁₇アダプター・プライマー、5'増幅プライマーと3'増幅プライマーである)を最初に作成した。

【0089】

【化4】

SEQ ID NO:9 5'-CTGCAGGCGGCCGCGGATCC (T)₁₇-3'
<PstI><-NotI-><BamHI>

SEQ ID NO:10 5'-GCGTCGACGCGCAAGAAGCAGCAAGGTAC-3'
<SalI>\15 \34

SEQ ID NO:11 5'-CTGCAGGCGGCCGCGGATCC-3'
<PstI><-NotI-><BamHI>

【0090】簡単に言うと、d(T)₁₇アダプタープライマー (SEQ ID NO:9) は集団のmRNA転写物のポリ(A)⁺領域にアニールする核酸配列を含み、mRNAから(-)鎖cDNA逆転写物を生成するために使用される。またPCRにより増幅されたDNAに導入されるPstI, NotI及びBamHIに対するエンドヌクレアーゼ制限酵素部位を含む。5'増幅プライマー (SEQ ID NO:10) はマウスタイプII IL-1Rクローンλ2の5'非翻訳領域のヌクレオチド15-34にSalI制限酵素部位を5'付加したものに相当し、この塩基配列はd(T)₁₇アダプタープライマーによる逆転写により生じた(-)鎖cDNAにアニールし、伸長して(+)鎖cDNAを生成する。3'プライマー (SEQ ID NO:11) は上記エンドヌクレアーゼ制限部位をもつ(+)鎖DNAとアニールし、伸長してマウスタイプII IL-1Rをコードする二本鎖全長cDNAを生成し、それをそこで通常のPCR反応で増幅することが可能である。PCR法の詳細は以下のとおりである。

【0091】マニアティスら (Maniatis et al.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab., NY, 1982) に記載されている標準的方法を用いて70Z/3細胞から抽出した全RNAからオリゴdTセルロースクロマトグラフィーによりポリ(A)⁺mRNAを単離し、以下のように逆転写した。16.5μl水中の約1μgのポリ(A)⁺mRNAを68℃で3分間熱してのち氷上で冷まし、2μlの10×RTCバッファー(500mM Tris-HCl 22℃で、pH8.7 60mM MgCl₂ 400mM KCl 10mM DTT, 各dNTP 10mM)を10ユニットのRNasin (プロメガバイオテック; Promega Biotech) 0.5μgのd(T)₁₇-アダプタープライマー及び、10ユニットのAMV逆転写酵素(ライフサイエンス; Life Sciences)を全量20μlに加え、2時間で42℃インキュベートしてmRNAを逆転写し、cDNA集団を合成した。反応混合物はTEバッファー(10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mMEDTA)で希釈し、4℃で一晩置いた。

【0092】約1又は5μlのcDNA集団を5μlのマウスタイプII IL-1Rクローンλ2のヌクレオ

チド15-34配列に相当する配列を含む5'増幅プライマーの20μM溶液、3'増幅プライマー20μM溶液の5μl; 10μlの10×PCRバッファー(500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH8.4, 20℃), 14mM MgCl₂と1mg/mlゼラチン)、4μlの5mM各dNTP(5mMdATP, 5mMdCTP, 5mMdGTP 5mMdTTPを含む)、2.5ユニット(標準の5000ユニット/ml溶液0.5μl)、TaqDNAポリメラーゼ(パーキナーエルマーシートスインストルメント(Instrument))と100μlの容量になるように希釈して混合した。最終混合物は100μlパラフィンオイルを上からのせた。最初94℃90秒で鋳型を変性し、64℃、75秒で再アニールし、72℃、150秒でcDNAを伸長させてDNA温度循環器(パーキナーエルマー/シートス)を使用しPCRを行った。ステッププログラム(94℃、25秒変性、55℃、45秒アニーリング、72℃、150秒伸長)を使用した増幅をさらに25サイクル分、PCRを行い、次に72℃で7分最終伸長をした。

【0093】試料をフェノールクロロホルム抽出及びG-50(ベーリンガー・マンハイム)でのスパンカラムクロマトグラフィーによりパラフィンオイルを除きDNAを抽出した。抽出DNA10μl画分を1%SeaKemTMアガロース(FMCバイオプロダクト ロックランド、ME)上で電気泳動により分離し、臭化エチジウムで染色し、DNA断片サイズが予測された産物と同一であることを確認した。ゲルをその後プロットし、上記のマウスタイプII IL-1Rクローンλ2の5610bpEcoRI断片をプローブにしてみ、マウスタイプII IL-1RをコードするDNAをそのバンドが含むことを確認した。

【0094】PCR増幅cDNA産物をその後エッペンドルフ微量遠心で最高速度で20分遠心して濃縮し、その後1/10容酢酸ナトリウム(3M)と2.5容量エタノール中でエタノール沈澱を行った。30μlの濃縮物をSalIとNotI制限酵素で標準的方法を使用して消化した。SalI/NotI制限酵素断片をその後、1.2%LGTアガロースゲルで分離し、断片にあたるバンドを単離した。制限酵素断片はその後アガロースからGene CleanTM(Bio-101, La Jolla, CA)から精製した。得られた精製制限酵素

33

34

断片を、pDC406ベクターにライゲーションしそれをCV-1EBNA細胞にトランスフェクトして、実施例1中に前述されているように発現させた。拡散(SEQ ID NO:12)及び予想アミノ酸配列(SEQ ID NO:12及びSEQ ID NO:13)と関連情報を発表した配列表は本明細書の後半部分に示してある。

【0095】

【実施例4】マウス溶性タイプII IL-1RをコードするcDNAの作成と発現

70Z/3ポリ(A)*mRNAを鋳型としたPCR増*
SEQ ID NO:9 5'-CTGCAGGCGGCCGCGGATCC(T)₁₇-3'
<PstI><-NotI><BamHI>

SEQ ID NO:10 5'-GCGTCGACGGCAAGAAGCAGCAAGGTAC-3'
<SalI>\15 \34

SEQ ID NO:14 5'-GCGCGGCCGCGCTAGGAAGAGACTTCTTTGACTGTGG-3'
<---NotI--->EndSerSerValGluLysValThrThr

【0097】d(T)₁₇アダプタープライマーと5'増幅プライマーは実施例5に記述されていて、SEQ ID NO:9とSEQ ID NO:10と同一である。SEQ ID NO:12の3'端はSEQ ID NO:12のヌクレオチド1145-1166と相補的であり、NotI制限酵素部位の5'付加と終止コードをもつ。

【0098】実施例3に記述したようにd(T)₁₇アダプタープライマーを用いてポリ(A)*mRNAからcDNA集団を合成した。1.5mlのエッペンドルフ微量遠心チューブに、約1µlのcDNA集団、5µlの5'増幅プライマー20µM溶液、5µlの3'増幅プライマー20µM溶液、10µlの10×PCRバッファー(500mM KCl, 100mM Tris-HCl(pH8.4 20で)、14mM MgCl₂と1mg/mlゼラチン)10µl 5mM各dNTP(5mM dATP, 5mM dCTP, 5mM dGTP及び5mM dTTPを含む)4µl 2.5ユニット(標準500ユニット/ml 溶液を0.5µl)のTaq DNAポリメラーゼ(パーキナーエルマーシートシステム)を混ぜて水75.4µlで希釈して容量100µlにした。最終混合物に100µlパラフィンオイルを上からのせた。最初94 90秒鋳型を変性し、55°、75秒で再アニーリングし、72°、150秒でcDNAを伸長させてDNA温度循環器(エリコップ)を使用しPCRを行った。ステッププログラム(94°、25秒変性、55°、45秒アニーリング、72°、150秒伸長)を使用した増幅をさらに25サイクル分PCRを行い、次に72°で7分最終伸長をした。

【0099】試料をフェノールクロロホルム抽出及びG-50(ペーリンガーマンハイム)でのスパンカラム

*幅及びマウスタイプII IL-1Rをコードする全長クローンに対して記述されている以下の方法により、溶性マウスタイプII IL-1RをコードするcDNA(SEQ ID NO:12のアミノ酸13-345の配列をもつ)を作成した。以下のPCRオリゴヌクレオチドプライマー(各々d(T)₁₇アダプタープライマー、5'増幅プライマー及び3'増幅プライマー)を作成した。

【0096】

10 【化5】

クロマトグラフィーによりパラフィンオイルを除きDNAを抽出した。抽出DNA10µl画分を1% SeaKemTMアガロース(FMCバイオプロダクト ロックランド、ME)上で電気泳動により分離し、臭化エチウムで染色し、DNA断片サイズが予測された産物と同一であることを確認した。

【0100】PCR増幅cDNA産物をその後エッペンドルフ微量遠心で、最高速度で20分遠心して濃縮し、その後1/10容酢酸ナトリウム(3M)と2.5容量エタノール中でエタノール沈澱を行った。50µlの濃縮物をSalIとNotI制限酵素で標準的方法を使用して消化した。SalI/NotI制限酵素断片をその後、1.2% LGAアガロースゲルで分離し、断片にあたるバンドを単離した。制限酵素断片はその後単離したバンドから以下の凍結融解法を用いて精製した。ゲルからのバンドを2つの175µlの断片に分けて1.5mlエッペンドルフ微量遠心チューブにいた。500µlの分離バンド(0.15M NaCl 10mM Tris, pH8.0 1mM EDTA)を各チューブに加え68 でゲルが溶けるまでチューブを熱した。そしてドライアイスで10分ゲルを凍結し、室温で融解し、4で30分遠心した。次に上清をとって新しいチューブに移し、2mLエタノールに懸濁し、4でさらに30分遠心してDNA沈澱を生じさせた。DNA沈澱を70%エタノールで洗い5分遠心チューブからエタノールを除き、20µl TEバッファーに再び懸濁した。

【0101】得られた精製制限酵素断片をその後pDC406ベクターにライゲーションした。ライゲーション試料をDH5αに形質転換し、コロニーを正しいプラスミドであるかチェックするために解析した。ベクターはCOS-7細胞にトランスフェクトし、実施例1に前

述したように発現された。

【0102】

【実施例5】タイプII IL-1R 結合研究

上の実施例1で述べたように発現、及び精製された組換えヒトタイプII IL-1Rの結合阻害定数は、様々な濃度の競合物質 (IL-1 β 又はIL-1 α)を一定量のラジオリベルしたIL-1 β 又はIL-1 α とタイプII IL-1Rを発現している細胞とインキュベートする阻害結合アッセイによって決定された。競合物質は受容体に結合し、ラジオリベルしたリガンドが受容体に結合するのを阻害する。結合アッセイは、大体ドーハーら (Dower et al.), J. Immunol. 132:751, 1984とパークら (Park et al.) J. Biol. Chem. 261:4177, 1986に記載されているようにフタル酸油分離法により行われた。簡単にいうと、CV1/EBNA細胞を6ウェル皿 (コスター (Costar) ケンブリッジ, MA) で4 $\times$ 2時間¹²⁵I-IL-1 β と1mL・結合培地 (ローズウェル パーク メモリアル インスティテュート (RPMI) 1640培地で、2% BSA, 20mM HEPES バッファー 0.2% アジ化ナトリウム pH7.2を含む) 中でインキュベートした。アジ化ナトリウムは37 $^{\circ}$ Cで¹²⁵I-IL-1が細胞により取り込まれて分解されることを阻害するために含まれる。プレートを回転振とう機で37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。そしてインキュベーションした混合物の複数の画分をジブチルフタル酸1.5, ビス (S-エチルヘキサール) フタル酸1の割合からなるフタル酸油性混合物を含むポリエチレン遠心チューブに移した。100 $\times$ 過剰モルの未ラベルIL-1 β を含むコントロールチューブも、非特異的結合を決めるために含めた。結合¹²⁵I-IL-1のある細胞をエッペンドルフ微量遠心で15000 $\times$ gで5分遠心し結合していない¹²⁵I-IL-1から分離した。細胞に結合した放射活性をガンマ計数計で決定した。このアッセイ (タイプII IL-1Rへの¹²⁵I-IL-1 β の結合をラベルしないヒトIL-1 β を競合物として使用して阻害する) は、全長ヒトタイプII IL-1Rは K_{i1} は約 $1.9 \pm 8 \times 10^{-9}$ 、 K_{i2} は約 $0.2 \pm 0.002 \times 10^{-9}$ という2相的なIL-1 β への結合を示すことを示唆した。¹²⁵I-IL-1 α のタイプII IL-1Rへの結合を阻害するのにラベルしていないヒトIL-1 β を使用すると、全長ヒトタイプII IL-1Rは K_{i1} は約 $2.0 \pm 1 \times 10^{-9}$ および K_{i2} は約 $0.013 \pm 0.003 \times 10^{-9}$ という2相的なIL-1 β への結合を示した。

【0103】上の実施例2で述べたように発現及び精製された溶解性ヒトタイプII IL-1Rの結合阻害定数は、様々な濃度のIL-1 β 競合物を一定量のラジオリベルしたIL-1 β とタイプII IL-1Rを発現しているCB23細胞 (エプシュタイン バーウィ

ルス トランスフォームド・コード・血球Bリンパ細胞系統) とインキュベートする阻害結合アッセイによって決定された。結合アッセイもまたドーハーら, J. Immunol. 132:751, 1984及びパークら J. Biol. Chem. 261:4177に記載されているようにフタル酸油性分離法により行われた。簡単にいうと、COS-7細胞を上記の溶解性ヒトタイプII IL-1RをコードするcDNAを含むpDC406発現ベクターでトランスフェクトした。COS細胞からの上清をトランスフェクション後3日培養し、続けて結合培地 (ローズウェル パーク メモリアル インスティテュート (RPMI) 1640培地で2% BSA, 20mM HEPES バッファーと0.2% アジ化ナトリウム pH7.2を含む) で、6ウェル皿内で50 μ L/ウェルの容量になるように希釈した。上清を50 μ Lの9 $\times 10^{-10}$ M¹²⁵I-IL-1 β と 2.5×10^{-6} CB23細胞と共に、8 $^{\circ}$ Cで2時間振とうしながらインキュベートした。インキュベーション混合物の2つずつとった60 μ L画分を、ジブチルフタル酸1.5, ビス (S-エチルヘキサール) フタル酸1の割合からなるフタル酸油性混合物を含むポリエチレン遠心チューブに移した。3 $\times 10^{-6}$ Mの未ラベルIL-1 β を含む陰性コントロールチューブも非特異的結合を決めるために含め (100%阻害) ラジオリベルしたIL-1 β のみと共に50mL結合培地を含む陽性コントロールチューブは、最大限の結合を決めるために含めた。結合¹²⁵I-IL-1のある細胞をエッペンドルフ微量遠心で15,000 $\times$ gで5分遠心し結合していない¹²⁵I-IL-1から分離した。結合していない¹²⁵I-IL-1 β を含む上清を捨て、細胞を注意深く、氷冷した結合培地でリンスした。細胞をその後トリプシン-EDTA 1mL中で37 $^{\circ}$ C 15分インキュベートし、細胞を培養した。細胞の放射活性はガンマ計数計で決定した。このアッセイ (¹²⁵I-IL-1 β の結合を溶解性ヒトタイプII IL-1Rを使って阻害する) は、溶解性ヒトタイプII IL-1Rは約 3.5×10^{-9} M⁻¹の K_i をもつことを示した。同様の方法を用いて溶解性ヒトタイプII IL-1RによるIL-1 α の結合の阻害により、溶解性ヒトタイプII IL-1Rは 1.4×10^{-8} M⁻¹の K_i をもつことが示された。

【0104】マウスタイプII IL-1Rは K_{i1} 0.8 $\times 10^{-9}$ および K_{i2} 0.01 $\times 10^{-9}$ 未満の2相的IL-1 β への結合を示した。

【0105】

【実施例6】タイプII IL-1R アフィニティークロスリンク研究

アフィニティークロスリンク研究を、パークら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1669-1987に記載してあるように行った。このアッセインに用いられている組換えヒトIL-1 α 及び

IL-1 β は既に記載されているように発現精製し、ラベルを行った。(ドーワーら, J. Exp. Med. 162:501, 1985; ドーワーら, Nature 324:266, 1986), 組換えヒトIL-1受容体アンタゴニスト(IL-1ra)を、アイゼンバークら(Eisenberg et al.) Nature 343:341, 1990)に公表されているcDNA配列を用いてクローン化し、COS細胞に一時的にトランス・フェクションをして発現させ、ドーワーら, J. Immunol. 143:4314, 1989に記載されているように、親和ゲルに結合した溶解性ヒトタイプI IL-1Rのカラムでのアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、低pHで溶出した。

【0106】簡単にいうと、組換えタイプII IL-1Rを発現しているCV1/EBNA細胞(4×10^7 /ml)を 125 I-IL-1 α 又は 125 I-IL-1 β (1nM)と4で、特異性コントロールとして1 μ Mの過剰のラベルしていないIL-1存在及び非存在下で、2時間インキュベートした。細胞をその後洗って、ビス(スルフォサキシニミジル)スベラートを最終濃度0.1mg/mlになるように加えた。30分25に置いた後、細胞を洗い、2mMロイペプチン、2mM0-フェナントロリン、及び2mMEGTAをタンパク分解を防ぐために含む100 μ lのリン酸緩衝塩溶液(PBS)/1%トライトンに再び懸濁した。等量(CPM)の 125 I-IL-1と等容の特異性コントロールを含む抽出上清画分を標準的技術を用いて10%ゲルでSDS/PAGEにより解析した。

【0107】第4図は、ラジオリベルしたIL-1 α 及びIL-1 β を用いて、上記されているように行われた、天然の対照物に対する、天然及び組換え型マウス及びヒトタイプII IL-1受容体と、組換えマウス及びヒトタイプII IL-1受容体タンパク質の大きさ比較のためのアフィニティークロスリンク研究の結果を示している。通常、組換えタンパク質は恐らくCV1/EBNA細胞で過剰発現したときの糖鎖型の違いの結果として少し速く、少し広いバンドとして移動するが一時的に発現した組換え受容体の大きさは天然の受容体に類似している。この結果から、タイプII IL-1受容体はタイプI IL-1受容体より小さいことも示された。特定の組合せ(IL-1 β と天然ヒトタイプI受容体)は特異的クロスリンク産物を生じることがなかった。約等量のラベルを各々の実験レーンにのせているので、ゲルの底部の未結合のリガンドバンドの強度によって示されているように、この組合せは比較的弱くクロスリンクしていると強く予想される。 125 I-IL-1 α とクロスリンクした天然型ヒトタイプII IL-1受容体発現細胞を示しているレーンは、天然型と組換えタイプI受容体との複合体のサイズ範囲(Mr=100,000)に構成成分があらわれている。このような

複合体は、組換えタイプII IL-1受容体を含むレーンでは検出されないが、恐らく、CB23細胞は微量のタイプI IL-1受容体mRNAを含んでいるので、タイプI IL-1受容体がCB23細胞で低いレベルに発現している結果であると思われる。

【0108】

【実施例7】タイプII IL-1Rのモノクローナル抗体の調製

精製した組換えタイプII IL-1R、例えばヒトタイプII IL-1Rあるいは、タイプII IL-1Rを高レベル発現するトランスフェクトしたCOS細胞の調製を行い、通例の技術、例えば米国特許4,411,993号明細書に開示されているような技術を用いて、タイプII IL-1Rに対するモノクローナル抗体を作成する。この抗体は、IL-1がタイプII IL-1Rに結合するのを妨害する点、例えばIL-1の毒性や他の望ましくない効果を改良するという点、IL-1又は溶解性タイプII IL-1Rの診断及び研究用アッセイの成分として、有用であると予測される。

【0109】マウスを免疫するため、タイプII IL-1R免疫源を完全フロイント(Freund's)アジュバント(Adjuvant)に懸濁し、10~100 μ gの幅の量を皮下に腹膜間にBalb/cマウスに注射した。10~12日後、免疫された動物に不完全フロイントアジュバントに懸濁した追加免疫源であると押ししその後一週から2週の免疫化スケジュールで周期的に、あと押しした。血清試料を周期的に、後方眼窩の出血あるいは尾端切開によって採取し、ドットプロットアッセイ(抗体サンドイッチ)又はELISA(酵素リンク免疫ソルベントアッセイ)又は受容体結合阻害により検査する。他のアッセイ法も適用できる。適当な抗体価の検出に続き、陽性動物に塩水中の抗原の静脈注射をする。3~4日後、動物を犠牲にし、ヒ臓細胞を培養し、マウスミエローマ細胞系統NS1又はAg8.653と融合する。この方法により得たハイブリドーマ細胞系統をHAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)の複数マイクロタイタープレートにプレートし、非融合細胞、ミエローマハイブリッド、ヒ臓細胞ハイブリッドの増殖を阻止する。

【0110】このように作られたハイブリドーマクローンを、タイプII IL-1Rへの反応性を、例えばエンバルら(Engvall et al.) Immunochem. 8:871(1971)及び米国特許4,703,004号明細書に開示されている技術の適用によりELISAでスクリーンすることが可能である。陽性クローンをそして同系Balb/cマウスの腹腔に注射して高濃度(>1mg/ml)の抗タイプII IL-1Rモノクローナル抗体を含む腹水を作成したり、フラスコや、回転ボトルで増殖させる。生じたモノクローナル抗体は、硫酸沈澱後ゲルろ過クロマトグラフィー、

及び/又は、スタフィロコッカスアウレウス (*Staphylococcus aureus*) のプロテインA又はストレプトコッカス属のプロテインGへの抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。

【0111】

【配列表の簡単な説明】SEQ ID NO:1とSEQ ID NO:2はヒトタイプII IL-1Rのヌクレオチド配列と予想アミノ酸配列を示す。この配列にコードされている成熟ペプチドはアミノ酸1-385と定められた。予想されるシグナルペプチドはアミノ酸13から-1と定められている。予想される膜貫通領域はアミノ酸331から335と示されている。

【0112】SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:6は全長ヒトタイプII IL-1Rをクローン化するのに用いた様々なオリゴヌクレオチドである。

【0113】SEQ ID NO:7からSEQ ID NO:8は溶解性ヒトタイプII IL-1Rをポリメラーゼ鎖反応(PCR)により作成するのに用いたオリゴヌクレオチドプライマーである。

【0114】SEQ ID NO:9-SEQ ID NO:11は全長の及び溶解性マウスタイプII IL-1Rsをクローン化するのに用いたオリゴヌクレオチドプライマーである。

【0115】SEQ ID NO:12及びSEQ ID NO:13は、全長マウスタイプII IL-1Rのヌクレオチド配列と予想アミノ酸配列を示す。この配列にコードされている成熟ペプチドは、アミノ酸1-397と定められた。予想されるシグナルペプチドはアミノ酸13から-1と定められた。予想される膜貫通領域はアミノ酸343-368と示されている。

【0116】SEQ ID NO:14は溶解性マウスタイプII IL-1Rを作成するのに使用したオリゴヌクレオチドプライマーである。

*【0117】

【配列表】(1)SEQ ID NO:1の情報

(i) 配列の性質

(A) 長さ: 1357塩基対

(B) タイプ: 核酸

(C) 鎖: 2本

(D) 形態: 線状

(ii) 分子タイプ: mRNAに対するcDNA

(iii) 仮定: N

(iv) アンチセンス: N

(vi) 根源的起源

(A) 生物: ホモ サピエンス

(G) 細胞タイプ: ヒトB細胞リンパ胸線

(H) 細胞系統: CB23

(vii) 直接的起源

(A) ライブラリー: CB23 cDNA

(B) クローン: pHuIL-1RII75

(ix) 特徴

(A) 名前/キー: CDS

(B) 位置: 154...1350

(D) 他の情報:

(ix) 特徴:

(A) 名前/キー: mat ペプチド

(B) 位置: 193...1347

(D) 他の情報:

(ix) 特徴:

(A) 名前/キー: sig ペプチド

(B) 位置: 154...192

(D) 他の情報:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO:1: 配列

【0118】

【化6】

```

CTGGAAATA CATCTGCTA CTCCTAAAAA CTAGTGACGC TCATACAAAT CAACAGAAAG      60
AGCTTCTGAA GGAAGACTTT AAAGCTGCTT CTGCCACGTG CTGCTGGGTC TCAGTCTCTCC      120
ACTTCCCGTG TCCTCTGGAA GTTGTACAGGA GCA ATG TTG CGC TTG TAC GTG TTG      174
Met Leu Arg Leu Tyr Val Leu
-13 -10

GTA ATG GGA GTT TCT GCC TTC ACC CTT CAG CCT GCG GCA CAC ACA GGG      222
Val Met Gly Val Ser Ala Phe Thr Leu Gln Pro Ala Ala His Thr Gly
-5 1 5 10

GCT GCC AGA AGC TGC CGG TTT CGT GGG AGG CAT TAC AAG CGG GAG TTC      270
Ala Ala Arg Ser Cys Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Arg Glu Phe
15 20 25

AGG CTG GAA GGG GAG CCT GTA GCC CTG AGG TGC CCC CAG GTG CCC TAC      318
Arg Leu Glu Gly Glu Pro Val Ala Leu Arg Cys Pro Gln Val Pro Tyr
30 35 40

TGG TTG TGG GCC TCT GTC AGC CCC CGC ATC AAC CTG ACA TGG CAT AAA      366
Trp Leu Trp Ala Ser Val Ser Pro Arg Ile Asn Leu Thr Trp His Lys
45 50 55

```

【0119】

50 【化7】

AAT GAC TCT GCT AGG ACG GTC CCA GGA GAA ⁴² GAA GAG ACA CGG ATG TGG	414
Asn Asp Ser Ala Arg Thr Val Pro Gly Glu Glu Thr Arg Met Trp	
60 65 70	
GCC CAG GAC GGT GCT CTG TGG CTT CTG CCA GCC TTG CAG GAG GAC TCT	462
Ala Gln Asp Gly Ala Leu Trp Leu Leu Pro Ala Leu Gln Glu Asp Ser	
75 80 85 90	
GGC ACC TAC GTC TGC ACT ACT AGA AAT GCT TCT TAC TGT GAC AAA ATG	510
Gly Thr Tyr Val Cys Thr Thr Arg Asn Ala Ser Tyr Cys Asp Lys Met	
95 100 105	
TCC ATT GAG CTC AGA GTT TTT GAG AAT ACA GAT GCT TTC CTG CCG TTC	558
Ser Ile Glu Leu Arg Val Phe Glu Asn Thr Asp Ala Phe Leu Pro Phe	
110 115 120	
ATC TCA TAC CCG CAA ATT TTA ACC TTG TCA ACC TCT GGG GTA TTA GTA	606
Ile Ser Tyr Pro Gln Ile Leu Thr Leu Ser Thr Ser Gly Val Leu Val	
125 130 135	
TGC CCT GAC CTG AGT GAA TTC ACC CGT GAC AAA ACT GAC GTG AAG ATT	654
Cys Pro Asp Leu Ser Glu Phe Thr Arg Asp Lys Thr Asp Val Lys Ile	
140 145 150	
CAA TGG TAC AAG GAT TCT CTT CTT TTG GAT AAA GAC AAT GAG AAA TTT	702
Gln Trp Tyr Lys Asp Ser Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asn Glu Lys Phe	
155 160 165 170	
CTA AGT GTG AGG GGG ACC ACT CAC TTA CTC GTA CAC GAT GTG GCC CTG	750
Leu Ser Val Arg Gly Thr Thr His Leu Leu Val His Asp Val Ala Leu	
175 180 185	
GAA GAT GCT GGC TAT TAC CGC TGT GTC CTG ACA TTT GCC CAT GAA GGC	798
Glu Asp Ala Gly Tyr Tyr Arg Cys Val Leu Thr Phe Ala His Glu Gly	
190 195 200	
CAG CAA TAC AAC ATC ACT AGG AGT ATT GAG CTA CGC ATC AAG AAA AAA	846
Gln Gln Tyr Asn Ile Thr Arg Ser Ile Glu Leu Arg Ile Lys Lys Lys	
205 210 215	
AAA GAA GAG ACC ATT CCT GTG ATC ATT TCC CCC CTC AAG ACC ATA TCA	894
Lys Glu Glu Thr Ile Pro Val Ile Ile Ser Pro Leu Lys Thr Ile Ser	
220 225 230	
GCT TCT CTG GGG TCA AGA CTG ACA ATC CCG TGT AAG GTG TTT CTG GGA	942
Ala Ser Leu Gly Ser Arg Leu Thr Ile Pro Cys Lys Val Phe Leu Gly	
235 240 245 250	
ACC GGC ACA CCC TTA ACC ACC ATG CTG TGG TGG ACG GCC AAT GAC ACC	990
Thr Gly Thr Pro Leu Thr Thr Met Leu Trp Trp Thr Ala Asn Asp Thr	
255 260 265	
CAC ATA GAG AGC GCC TAC CCG GGA GGC CGC GTG ACC GAG GGG CCA CGC	1038
His Ile Glu Ser Ala Tyr Pro Gly Gly Arg Val Thr Glu Gly Pro Arg	
270 275 280	
CAG GAA TAT TCA GAA AAT AAT GAG AAC TAC ATT GAA GTG CCA TTG ATT	1086
Gln Glu Tyr Ser Glu Asn Asn Glu Asn Tyr Ile Glu Val Pro Leu Ile	
285 290 295	

42

```

TTT GAT CCT GTC ACA AGA GAG GAT TTG CAC ATG GAT TTT AAA TGT GTT      1134
Phe Asp Pro Val Thr Arg Glu Asp Leu His Met Asp Phe Lys Cys Val
300                               305                               310

GTC CAT AAT ACC CTG AGT TTT CAG ACA CTA CGC ACC ACA GTC AAG GAA      1182
Val His Asn Thr Leu Ser Phe Gln Thr Leu Arg Thr Thr Val Lys Glu
315                               320                               325                               330

GCC TCC TCC ACG TTC TCC TGG GGC ATT GTG CTG GCC CCA CTT TCA CTG      1230
Ala Ser Ser Thr Phe Ser Trp Gly Ile Val Leu Ala Pro Leu Ser Leu
                               335                               340                               345

GCC TTC TTG GTT TTG GGG GGA ATA TGG ATG CAC AGA CGG TGC AAA CAC      1278
Ala Phe Leu Val Leu Gly Gly Ile Trp Met His Arg Arg Cys Lys His
                               350                               355                               360

AGA ACT GGA AAA GCA GAT GGT CTG ACT GTG CTA TGG CCT CAT CAT CAA      1326
Arg Thr Gly Lys Ala Asp Gly Leu Thr Val Leu Trp Pro His His Gln
                               365                               370                               375

GAC TTT CAA TCC TAT CCC AAG TGA AATAAAT      1357
Asp Phe Gln Ser Tyr Pro Lys
380                               385

```

【0121】(1) SEQ ID NO: 2の情報

* (ii) 分子タイプ: タンパク質

(i) 配列の性質:

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 2:

(A) 長さ: 398アミノ酸

配列

(B) タイプ: アミノ酸

【0122】

(D) 形態: 線状

【化9】

```

Met Leu Arg Leu Tyr Val Leu Val Met Gly Val Ser Ala Phe Thr Leu
-13          -10          -5          1

Gln Pro Ala Ala His Thr Gly Ala Ala Arg Ser Cys Arg Phe Arg Gly
5          10          15

Arg His Tyr Lys Arg Glu Phe Arg Leu Glu Gly Glu Pro Val Ala Leu
20          25          30          35

Arg Cys Pro Gln Val Pro Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Val Ser Pro Arg
40          45          50

Ile Asn Leu Thr Trp His Lys Asn Asp Ser Ala Arg Thr Val Pro Gly
55          60          65

Glu Glu Glu Thr Arg Met Trp Ala Gln Asp Gly Ala Leu Trp Leu Leu
70          75          80

Pro Ala Leu Gln Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys Thr Thr Arg Asn
85          90          95

Ala Ser Tyr Cys Asp Lys Met Ser Ile Glu Leu Arg Val Phe Glu Asn
100         105         110         115

```

【0123】

【化10】

Thr Asp Ala Phe Leu Pro Phe Ile Ser⁴⁵ Tyr Pro Gln Ile Leu Thr Leu
 120 125 130
 Ser Thr Ser Gly Val Leu Val Cys Pro Asp Leu Ser Glu Phe Thr Arg
 135 140 145
 Asp Lys Thr Asp Val Lys Ile Gln Trp Tyr Lys Asp Ser Leu Leu Leu
 150 155 160
 Asp Lys Asp Asn Glu Lys Phe Leu Ser Val Arg Gly Thr Thr His Leu
 165 170 175
 Leu Val His Asp Val Ala Leu Glu Asp Ala Gly Tyr Tyr Arg Cys Val
 180 185 190 195
 Leu Thr Phe Ala His Glu Gly Gln Gln Tyr Asn Ile Thr Arg Ser Ile
 200 205 210
 Glu Leu Arg Ile Lys Lys Lys Lys Glu Glu Thr Ile Pro Val Ile Ile
 215 220 225
 Ser Pro Leu Lys Thr Ile Ser Ala Ser Leu Gly Ser Arg Leu Thr Ile
 230 235 240
 Pro Cys Lys Val Phe Leu Gly Thr Gly Thr Pro Leu Thr Thr Met Leu
 245 250 255
 Trp Trp Thr Ala Asn Asp Thr His Ile Glu Ser Ala Tyr Pro Gly Gly
 260 265 270 275
 Arg Val Thr Glu Gly Pro Arg Gln Glu Tyr Ser Glu Asn Asn Glu Asn
 280 285 290
 Tyr Ile Glu Val Pro Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Arg Glu Asp Leu
 295 300 305
 His Met Asp Phe Lys Cys Val Val His Asn Thr Leu Ser Phe Gln Thr
 310 315 320
 Leu Arg Thr Thr Val Lys Glu Ala Ser Ser Thr Phe Ser Trp Gly Ile
 325 330 335
 Val Leu Ala Pro Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Gly Gly Ile Trp
 340 345 350 355
 Met His Arg Arg Cys Lys His Arg Thr Gly Lys Ala Asp Gly Leu Thr
 360 365 370
 Val Leu Trp Pro His His Gln Asp Phe Gln Ser Tyr Pro Lys
 375 380 385

【0124】

(1) SEQ ID NO: 3の情報

(i) 配列の性質:

(A) 長さ: 24塩基対

(B) タイプ: 核酸

(C) 鎖: 1本

(D) 形態: 線状

(ii) 分子タイプ: DNA (ゲノム)

(iii) ハイボセティカル: N

(iv) アンチセンス: N

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 3:

配列

TCGACTGGAA CGAGACGACC TGCT 24

(1) SEQ ID NO: 4の情報

(i) 配列の性質:

(A) 長さ: 20塩基対

(B) タイプ: 核酸

(C) 鎖: 1本

(D) 形態: 線状

- (ii) 分子タイプ: DNA (ゲノム)
- (iii) ハイボセティカル: N
- (iv) アンチセンス: Y
- (xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 4:

配列

GACCTTGCTC TGCTGGACGA 20

- (1) SEQ ID NO: 5の情報

- (i) 配列の性質:
 - (A) 長さ: 46塩基対
 - (B) タイプ: 核酸
 - (C) 鎖: 1本
 - (D) 形態: 線状
- (ii) 分子タイプ: DNA (ゲノム)
- (iii) ハイボセティカル: N
- (iv) アンチセンス: N
- (xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 5:

配列

CTGTTGGGCT CGCGGTTGAG GACAACTCT

TCGCGGTCTT TCCAGT 46

- (1) SEQ ID NO: 6の情報

- (i) 配列の性質:
 - (A) 長さ: 46塩基対
 - (B) タイプ: 核酸
 - (C) 鎖: 1本
 - (D) 形態: 線状
- (ii) 分子タイプ: DNA (ゲノム)
- (iii) ハイボセティカル: N
- (iv) アンチセンス: Y
- (xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 6:

配列

GACAACCCGA GCGCCAACTC CTGTTTGAGA

AGCGCCAGAA AGGTCA 46

- (1) SEQ ID NO: 7の情報

- (i) 配列の性質:
 - (A) 長さ: 29塩基対
 - (B) タイプ: 核酸
 - (C) 鎖: 1本
 - (D) 形態: 線状
- (ii) 分子タイプ: DNA (ゲノム)
- (iii) 仮定: N
- (iv) アンチセンス: N
- (xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 7:

配列

GCGTCGACCT AGTGACGCTC ATACAAATC

29

- (1) SEQ ID NO: 8の情報

- (i) 配列の性質:
 - (A) 長さ: 33塩基対
 - (B) タイプ: 核酸
 - (C) 鎖: 1本

- (D) 形態：線状
- (ii) 分子タイプ：DNA (ゲノム)
- (iii) ハイポセティカル：N
- (iv) アンチセンス：N
- (xi) 配列の記載：SEQ ID NO：8：

配列

GCGCGGCCGC TCAGGAGGAG GCTTCCTTGA

CTG 33

- (1) SEQ ID NO：9の情報

- (i) 配列の性質：
 - (A) 長さ：37塩基対
 - (B) タイプ：核酸
 - (C) 鎖：1本
 - (D) 形態：線状
- (ii) 分子タイプ：DNA (ゲノム)
- (iii) ハイポセティカル：N
- (iv) アンチセンス：N
- (xi) 配列の記載：SEQ ID NO：9：

配列

CTGCAGGCGG CCGCGGATCC TTTTTTTTTT

TTTTTTTT 37

- (1) SEQ ID NO：10の情報

- (i) 配列の性質：
 - (A) 長さ：28塩基対
 - (B) タイプ：核酸
 - (C) 鎖：1本
 - (D) 形態：線状
- (ii) 分子タイプ：DNA (ゲノム)
- (iii) ハイポセティカル：N
- (iv) アンチセンス：N
- (xi) 配列の記載：SEQ ID NO：10：

配列

GCGTCGACGG CAAGAAGCAG CAAGGTAC

28

- (1) SEQ ID NO：11の情報

- (i) 配列の性質：
 - (A) 長さ：20塩基対
 - (B) タイプ：核酸
 - (C) 鎖：1本
 - (D) 形態：線状
- (ii) 分子タイプ：DNA (ゲノム)
- (iii) ハイポセティカル：N
- (iv) アンチセンス：N
- (xi) 配列の記載：SEQ ID NO：11：

配列

CTGCAGGCGG CCGCGGATCC 20

- (1) SEQ ID NO：12の情報

- (i) 配列の性質：
 - (A) 長さ：1366塩基対
 - (B) タイプ：核酸

- (C) 鎖: 2本
 (D) 形態: 線状
 (ii) 分子タイプ: mRNAに対するcDNA
 (iii) ハイポセティカル: N
 (iv) アンチセンス: N
 (vi) 根源的起源
 (A) 生物: マウス
 (H) 細胞系統: 70Z/3
 (vii) 直接的起源
 (A) ライブラリー: 70Z/3
 (B) クローン: 12
 (ix) 特徴:
 (A) 名前/キー: CDS
 (B) 位置: 85...1317
 (D) 他の情報:
 (ix) 特徴:
 (A) 名前/キー: mat ペプチド
 (B) 位置: 124...1314
 (D) 他の情報:
 (ix) 特徴:
 (A) 名前/キー: sig ペプチド
 (B) 位置: 85...123
 (D) 他の情報:
 (xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 12:

47

配列

【0125】

*
*【化11】

```

GTCGACGGCA AGAAGCAGCA AGGTACAAGA ATACACAGCT CCAGGCTCCA AGGGTCTCTGT      60
GCGCTCAGGA AGTTGGTGCG GACA ATG TTC ATC TTG CTT GTG TTA GTA ACT      111
                               Met Phe Ile Leu Leu Val Leu Val Thr
                               -13          -10          -5

GGA GTT TCT GCT TTC ACC ACT CCA ACA GTG GTG CAC ACA GGA AAG GTT      159
Gly Val Ser Ala Phe Thr Thr Pro Thr Val Val His Thr Gly Lys Val
                        1              5              10

TCT GAA TCC CCC ATT ACA TCG GAG AAG CCC ACA GTC CAT GGA GAC AAC      207
Ser Glu Ser Pro Ile Thr Ser Glu Lys Pro Thr Val His Gly Asp Asn
                        15              20              25

TGT CAG TTT CGT GGC AGA GAG TTC AAA TCT GAA TTG AGG CTG GAA GGT      255
Cys Gln Phe Arg Gly Arg Glu Phe Lys Ser Glu Leu Arg Leu Glu Gly
                        30              35              40

GAA CCT GTG GTT CTG AGG TGC CCC TTG GCA CCT CAC TCC GAC ATC TCC      303
Glu Pro Val Val Leu Arg Cys Pro Leu Ala Pro His Ser Asp Ile Ser
                        45              50              55              60

AGC AGT TCC CAT AGT TTT CTG ACC TGG AGT AAA TTG GAC TCT TCT CAG      351
Ser Ser Ser His Ser Phe Leu Thr Trp Ser Lys Leu Asp Ser Ser Gln
                        65              70              75

CTG ATC CCA AGA GAT GAG CCA AGG ATG TGG GTG AAG GGT AAC ATA CTC      399
Leu Ile Pro Arg Asp Glu Pro Arg Met Trp Val Lys Gly Asn Ile Leu
                        80              85              90

TGG ATT CTG CCA GCA GTG CAG CAA GAC TCT GGT ACC TAC ATT TGC ACA      447
Trp Ile Leu Pro Ala Val Gln Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ile Cys Thr
                        95              100             105

TTC AGA AAC GCA TCC CAC TGT GAG CAA ATG TCT GTG GAA CTC AAG GTC      495
Phe Arg Asn Ala Ser His Cys Glu Gln Met Ser Val Glu Leu Lys Val
                        110             115             120
  
```

【0126】

【化12】

TTT AAG AAT ACT GAA GCA TCT CTG CCT CAT GTC TCC TAC TTG CAA ATC Phe Lys Asn Thr Glu Ala Ser Leu Pro His Val Ser Tyr Leu Gln Ile 125 130 135 140	543
TCA GCT CTC TCC ACC ACC GGG TTA CTA GTG TGC CCT GAC CTG AAA GAA Ser Ala Leu Ser Thr Thr Gly Leu Leu Val Cys Pro Asp Leu Lys Glu 145 150 155	591
TTC ATC TCC AGC AAC GCT GAT GGA AAG ATA CAG TGG TAT AAG GGC GCC Phe Ile Ser Ser Asn Ala Asp Gly Lys Ile Gln Trp Tyr Lys Gly Ala 160 165 170	639
ATA CTC TTG GAT AAA GGC AAT AAG GAA TTT CTG AGT GCA GGA GAC CCC Ile Leu Leu Asp Lys Gly Asn Lys Glu Phe Leu Ser Ala Gly Asp Pro 175 180 185	687
ACA CGC CTA TTG ATA TCC AAC ACG TCC ATG GAC GAT GCA GGC TAT TAC Thr Arg Leu Leu Ile Ser Asn Thr Ser Met Asp Asp Ala Gly Tyr Tyr 190 195 200	735
AGA TGT GTT ATG ACA TTT ACC TAC AAT GGC CAG GAA TAC AAC ATC ACT Arg Cys Val Met Thr Phe Thr Tyr Asn Gly Gln Glu Tyr Asn Ile Thr 205 210 215 220	783
AGG AAT ATT GAA CTC CGG GTC AAA GGA GCA ACC ACG GAA CCC ATC CCT Arg Asn Ile Glu Leu Arg Val Lys Gly Ala Thr Thr Glu Pro Ile Pro 225 230 235	831
GTG ATC ATT TCT CCC CTG GAG ACA ATA CCA GCA TCA TTG GGG TCA AGA Val Ile Ile Ser Pro Leu Glu Thr Ile Pro Ala Ser Leu Gly Ser Arg 240 245 250	879
CTG ATA GTC CCG TGC AAA GTG TTT CTG GGA ACT GGT ACA TCT TCC AAC Leu Ile Val Pro Cys Lys Val Thr Leu Gly Thr Gly Thr Ser Ser Asn 255 260 265	927
ACC ATT GTG TGG TGG TTG GCT AAC AGC ACG TTT ATC TCG GCT GCT TAC Thr Ile Val Trp Trp Leu Ala Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ala Ala Tyr 270 275 280	975
CCA AGA GGC CGT GTG ACC GAG GGG CTA CAC CAC CAG TAC TCA GAG AAT Pro Arg Gly Arg Val Thr Glu Gly Leu His His Gln Tyr Ser Glu Asn 285 290 295 300	1023
GAT GAA AAC TAT GTG GAA GTG TCG CTG ATT TTT GAT CCA GTC ACA AGG Asp Glu Asn Tyr Val Glu Val Ser Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Arg 305 310 315	1071
GAG GAT CTG CAT ACA GAT TTT AAA TGT GTT GCC TCG AAT CCA CGG AGT Glu Asp Leu His Thr Asp Phe Lys Cys Val Ala Ser Asn Pro Arg Ser 320 325 330	1119
TCT CAG TCA CTC CAT ACC ACA GTC AAA GAA GTC TCT TCC ACG TTC TCC Ser Gln Ser Leu His Thr Thr Val Lys Glu Val Ser Ser Thr Phe Ser 335 340 345	1167
TGG AGC ATT GCG CTG GCA CCT CTG TCT CTG ATC ATC TTG GTT GTG GGG Trp Ser Ile Ala Leu Ala Pro Leu Ser Leu Ile Ile Leu Val Val Gly 350 355 360	1215

【0127】

【化13】

GCA ATA TGG ATG CGC AGA CGG TGT AAA CGC AGG GCT GGA AAG ACA TAT Ala Ile Trp Met Arg Arg Arg Cys Lys Arg Arg Ala Gly Lys Thr Tyr 365 370 375 380	1263
GGA CTG ACC AAG CTA CGG ACT GAC AAC CAG GAC TTC CCT TCC AGC CCA Gly Leu Thr Lys Leu Arg Thr Asp Asn Gln Asp Phe Pro Ser Ser Pro 385 390 395	1311
AAC TAA ATAAAGGAAA TGAAATAAAA AAAAAAAAAA AAAAAGGATC CGCGGCCGC Asn .	1366

【0128】(1) SEQ ID NO: 13の情報

(ii) 分子タイプ: タンパク質

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 13:

(i) 配列の性質:

10 配列

(A) 長さ: 410アミノ酸

【0129】

(B) タイプ: アミノ酸

【化14】

(D) 形態: 線状

Met Phe Ile Leu Leu Val Leu Val Thr Gly Val Ser Ala Phe Thr Thr
 -13 -10 -5 1
 Pro Thr Val Val His Thr Gly Lys Val Ser Glu Ser Pro Ile Thr Ser
 5 10 15
 Glu Lys Pro Thr Val His Gly Asp Asn Cys Gln Phe Arg Gly Arg Glu
 20 25 30 35
 Phe Lys Ser Glu Leu Arg Leu Glu Gly Glu Pro Val Val Leu Arg Cys
 40 45 50
 Pro Leu Ala Pro His Ser Asp Ile Ser Ser Ser Ser His Ser Phe Leu
 55 60 65
 Thr Trp Ser Lys Leu Asp Ser Ser Gln Leu Ile Pro Arg Asp Glu Pro
 70 75 80
 Arg Met Trp Val Lys Gly Asn Ile Leu Trp Ile Leu Pro Ala Val Gln
 85 90 95
 Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ile Cys Thr Phe Arg Asn Ala Ser His Cys
 100 105 110 115
 Glu Gln Met Ser Val Glu Leu Lys Val Phe Lys Asn Thr Glu Ala Ser
 120 125 130
 Leu Pro His Val Ser Tyr Leu Gln Ile Ser Ala Leu Ser Thr Thr Gly
 135 140 145
 Leu Leu Val Cys Pro Asp Leu Lys Glu Phe Ile Ser Ser Asn Ala Asp
 150 155 160
 Gly Lys Ile Gln Trp Tyr Lys Gly Ala Ile Leu Leu Asp Lys Gly Asn
 165 170 175

【0130】

Lys Glu Phe Leu Ser Ala Gly Asp Pro Thr Arg Leu Leu Ile Ser Asn
 180 185 190 195
 Thr Ser Met Asp Asp Ala Gly Tyr Tyr Arg Cys Val Met Thr Phe Thr
 200 205 210
 Tyr Asn Gly Gln Glu Tyr Asn Ile Thr Arg Asn Ile Glu Leu Arg Val
 215 220 225
 Lys Gly Ala Thr Thr Glu Pro Ile Pro Val Ile Ile Ser Pro Leu Glu
 230 235 240
 Thr Ile Pro Ala Ser Leu Gly Ser Arg Leu Ile Val Pro Cys Lys Val
 245 250 255
 Phe Leu Gly Thr Gly Thr Ser Ser Asn Thr Ile Val Trp Trp Leu Ala
 260 265 270 275
 Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ala Ala Tyr Pro Arg Gly Arg Val Thr Glu
 280 285 290
 Gly Leu His His Gln Tyr Ser Glu Asn Asp Glu Asn Tyr Val Glu Val
 295 300 305
 Ser Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Arg Glu Asp Leu His Thr Asp Phe
 310 315 320
 Lys Cys Val Ala Ser Asn Pro Arg Ser Ser Gln Ser Leu His Thr Thr
 325 330 335
 Val Lys Glu Val Ser Ser Thr Phe Ser Trp Ser Ile Ala Leu Ala Pro
 340 345 350 355
 Leu Ser Leu Ile Ile Leu Val Val Gly Ala Ile Trp Met Arg Arg Arg
 360 365 370
 Cys Lys Arg Arg Ala Gly Lys Thr Tyr Gly Leu Thr Lys Leu Arg Thr
 375 380 385
 Asp Asn Gln Asp Phe Pro Ser Ser Pro Asn
 390 395

【0131】

(1) SEQ ID NO: 14の情報

(i) 配列の性質:

(A) 長さ: 39塩基対

(B) タイプ: 核酸

(C) 鎖: 1本

(D) 形態: 線状

(ii) 分子タイプ: DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセチカル: N

(iv) アンチセンス: N

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 14:

配列

G C G C G G C C G C C T A G G A A G A G A C T T C T T T G A

52

53

【図面の簡単な説明】 T G T G G 36

【図1】図1は、発現プラスミドpDC406の概要図である。Sal部位に挿入されたcDNA分子は、HIV及びアデノウイルスから得られた制御因子を用いて転写、翻訳される。pDC406はSV40, エプシュタインバー(Epstein-Barr)ウイルス及びpBR322由来の複製開始点を含む。

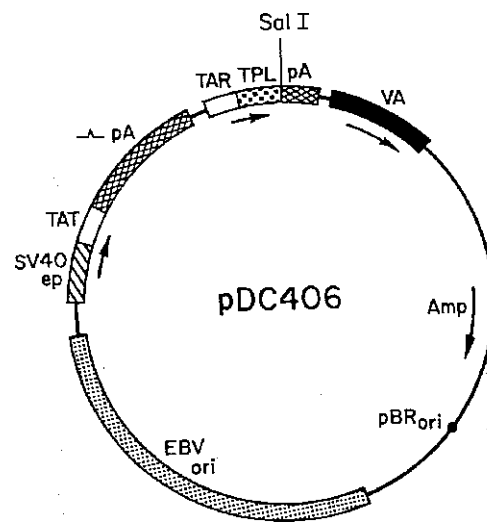
【図2】図2は、ヒト及びマウスタイプII IL-1受容体と、配列決定に用いた様々なヒト及びマウスのクローンの概要図である。細い線は、非翻訳領域を示し、コード領域は四角で描かれている。シグナルペプチドをコードする部分は塗りつぶしてある。膜貫通部分は交差斜線で網かけしてある。そして、細胞内タンパク質は点描している。N結合糖鎖付加サイトの可能性がある部分は、逆向き三角形で示している。イムノグロブリン様のジスルフィド結合は、2つのイオウ分子をつなぐ点線で示している(S S)。

【図3】図3は、ヒト及びマウスタイプII IL-1受容体のアミノ酸配列(cDNAクローンから得られたもの)を、ヒト及びマウスタイプII IL-1受容体のアミノ酸配列(シムス(Sims)ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8946, 1989; シムスら, Science 241:585, 1988)およびST2細胞遺伝子のアミノ酸配列(トミナガ, FEBS Lett. 258; 301, 1989)及びヴァシニアウイルスのB15Rオープンリーディングフレーム(スミスとチャン(Smith and Chan), J. Gen. Virology 72:511, 1991)と比較した図である。番号は開始メチオニンからつけている。各配列中のシグナルペプチド切断予想位置は、フォンハイネ(von Heijne), Nucl. Acids. Res. 14:4683, 1986)で述べられた方法に従って決定されており、シグナルペプチドと予想される部分と、タンパク質の本体の間の空白で示している。タイプII IL-1受容体の予想される膜貫通領域と細胞内領域は、最下段に示しており、間に空白を入れて分離している。すべて

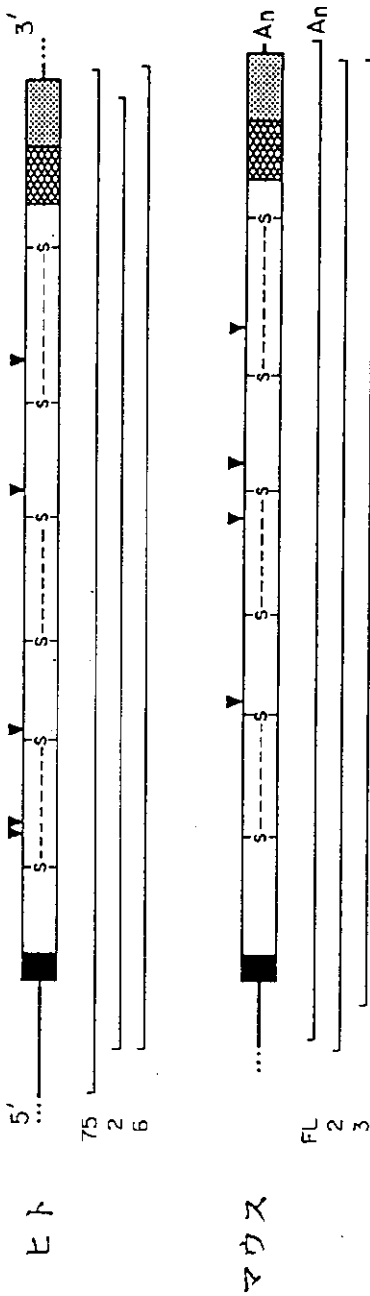
の4つのIL-1受容体配列に保存されている残基は黒地に白ヌキで示している。互いのタイプII IL-1受容体で保存されている残基は影がつけてあり、互いのタイプII IL-1受容体で保存されている残基は四角でかこんでいる。イムノグロブリン構造に特徴的なジスルフィド結合を形成すシステイン残基には、黒丸で印をつけており、タイプII IL-1受容体における2つの余分のシステインの組と、他の配列のいくつかのシステインは星印で示している。ドメイン1、2及び3の適当な境界は各行の上に示してある。タイプII IL-1受容体において予想されるシグナルペプチド切断はAla13の後ろであり、通常みられない短いシグナルペプチドを生じ、切断後のヒトあるいはマウスタイプII IL-1受容体のN端の相当する位置よりも、12(ヒト)又は23(マウス)アミノ酸だけ長いN端が生じる。マウスタイプII IL-1受容体の、他の、より好ましくないが起こりうる切断部位は、Thr15又はPro17の後ろである。この配列のならばは手で行っており、配列の客観的に最適のならばは示していない。ヒト及びマウスタイプII IL-1受容体cDNAの全長と可溶性のヌクレオチドとアミノ酸配列もまた、この中で、配列表に示している。

【図4】図4は、クロスリンクしたIL-1受容体のSDS/PAGEゲルのオートラジオグラフである。IL-1受容体を発現している細胞は、同種のラベルされていないIL-1競合物の非存在下、又は存在下で¹²⁵I-IL-1とクロスリンクされ、抽出、電気泳動され、実施例6で述べたようにオートラジオグラフが行われた。組換え受容体はCV1/EBNA細胞で一時的に発現された。天然の受容体とのクロスリンクのために用いた細胞系は、KB(ATCC CCL1717)(ヒトタイプII IL-1R用)、CB23(ヒトタイプII IL-1R用)、EL4(ATCC TIB39)(ネズミタイプII IL-1R用)及び70Z/3(ATCC TIB158)(ネズミタイプII IL-1R用)である。

【図1】



【図2】



【図3】

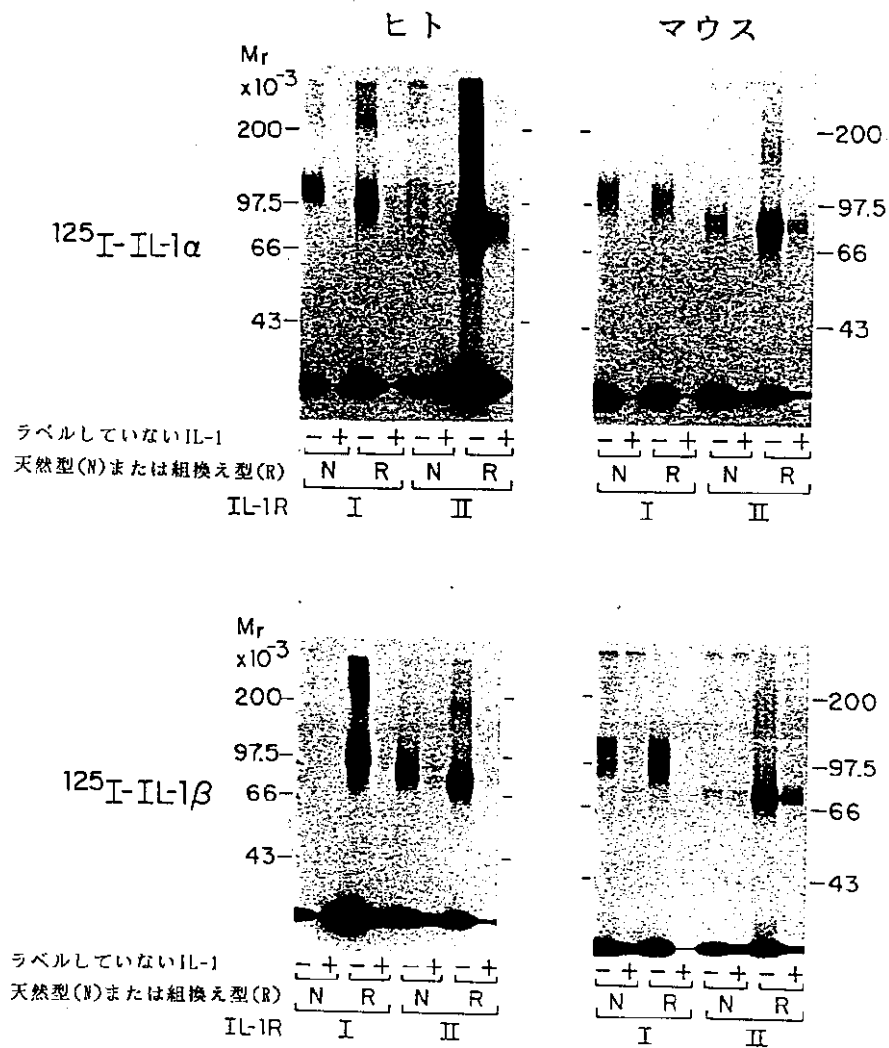
Uaccinia	NSI...FLS...FFYSFVUT	66
ST2	NSI...FLS...FFYSFVUT	55
Hu type I	NSI...FLS...FFYSFVUT	70
Hu type II	NSI...FLS...FFYSFVUT	58
Hu type III	NSI...FLS...FFYSFVUT	61
Uaccinia	NSI...FLS...FFYSFVUT	155
ST2	NSI...FLS...FFYSFVUT	146
Hu type I	NSI...FLS...FFYSFVUT	177
Hu type II	NSI...FLS...FFYSFVUT	164
Hu type III	NSI...FLS...FFYSFVUT	154
Uaccinia	NSI...FLS...FFYSFVUT	242
ST2	NSI...FLS...FFYSFVUT	240
Hu type I	NSI...FLS...FFYSFVUT	271
Hu type II	NSI...FLS...FFYSFVUT	258
Hu type III	NSI...FLS...FFYSFVUT	248
Uaccinia	NSI...FLS...FFYSFVUT	326
ST2	NSI...FLS...FFYSFVUT	337
Hu type I	NSI...FLS...FFYSFVUT	356
Hu type II	NSI...FLS...FFYSFVUT	343
Hu type III	NSI...FLS...FFYSFVUT	336
Uaccinia	NSI...FLS...FFYSFVUT	336
ST2	NSI...FLS...FFYSFVUT	336
Hu type I	NSI...FLS...FFYSFVUT	336
Hu type II	NSI...FLS...FFYSFVUT	336
Hu type III	NSI...FLS...FFYSFVUT	336

411
398

Uaccinia USSTFSWSIALAPLSLIIILUUGAIIH ARACKARAGKTYGLTKLATONQOFPSSPN*
Hu type I ASSTFSWSIALAPLSLIIILUUGAIIH ARACKARAGKTYGLTKLATONQOFPSSPN*

【図4】

クロスリンキングによる天然型と組換え型
IL-1受容体の比較



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
A 6 1 P 37/06		A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 14/715		C 0 7 K 14/715	
16/28		16/28	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	
15/02	Z N A	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08		15/00	Z N A C
(C 1 2 N 5/10			
C 1 2 R 1:91)			

(C 1 2 N 15/02 Z N A
C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 デービッド・ジョン・コスマン
アメリカ合衆国ワシントン州98110, バイ
ンブリッジ・アイランド, ノース・イース
ト・エウイング・ストリート 10129
(72)発明者 スティーブン・ディー・ラプトン
アメリカ合衆国ワシントン州98115, シア
トル, サンドポイント・ウェイ・ノース・
イースト 7323, ナンバー 211

(72)発明者 ブルース・モスレイ
アメリカ合衆国ワシントン州98125, シア
トル, サーティシックス・アベニュー・
ノース・イースト 11311
(72)発明者 スティーブン・ケイ・ドゥワー
アメリカ合衆国ワシントン州98052, レッ
ドモント, イースト・レイク・サマミッシ
ュ・パークウェイ・ノース・イースト
2620

专利名称(译)	II型白细胞介素-1受体		
公开(公告)号	JP2000336039A	公开(公告)日	2000-12-05
申请号	JP2000125898	申请日	2000-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	CORP Immunex公司 株式会社Immunex公司		
申请(专利权)人(译)	NEX了Immunex公司		
[标]发明人	ジョンシムス デービッドジョンコスマン スティーブンディーラプトン ブルースモスレイ スティーブンケイドウワー		
发明人	ジョン・シムス デービッド・ジョン・コスマン スティーブン・ディー・ラプトン ブルース・モスレイ スティーブン・ケイ・ドゥワー		
IPC分类号	C12N15/02 A61K38/00 A61P3/10 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K1/20 C07K1/22 C07K14/705 C07K14/715 C07K16/00 C07K16/28 C07K19/00 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P3/10 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K14/7155		
FI分类号	A61K37/02 A61P3/10 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P37/06 C07K14/715 C07K16/28 C12P21/08 C12N5/00.B C12N15/00.ZNA.C A61K38/00 A61K38/01 A61K38/16 C12N15/00.C C12N15 /00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024 /GA01 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA11 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE04 4B064/CE07 4B064 /CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065 /AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB01 4B065/BC01 4B065/BD14 4B065/BD50 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084 /BA22 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DA47 4C084/MA17 4C084/MA44 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/ZA022 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA06 4H045/GA22 4H045/GA26		
优先权	07/534193 1990-06-05 US 07/573576 1990-08-24 US 07/627071 1990-12-13 US		
其他公开文献	JP3652582B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[结构] II型IL-1受体蛋白 (II型IL-1R) , 编码II型IL-1R的DNA和表达载体 , 以及作为重组细胞培养产物生产II型IL-1R的方法 。

Met	Leu	Arg	Leu	Tyr	Val	Leu	Val	Met	Gly	Val	Leu	His	Pro	Thr	Leu
-13			-10					-5					3		
								1							I
								1							
								1							
								1							
Val	Leu	Tyr	Glu	His	His	Glu	Asp	Phe	Gln	Ser	Tyr	Pro	Leu		
			375					380					385		

Met	Phe	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Thr	Gly	Val	Ser	His	Phe	His	Thr
-13			-10					-5					1		
								1							II
								1							
								1							
								1							
Asp	His	Gln	Asp	Phe	Pro	Thr	Met	Pro	Asn						
			390					395							