

(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 - 501034

(P2003 - 501034A)

(43)公表日 平成15年1月14日(2003.1.14)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	T 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		48/00	4 B 0 6 3
39/395		A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 4
48/00		C 0 7 K 14/52	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00		16/24	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 (全145数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 500771(P2001 - 500771)

(86)(22)出願日 平成12年6月1日(2000.6.1)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月3日(2001.12.3)

(86)国際出願番号 PCT/US00/15002

(87)国際公開番号 W000/073459

(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 09/323,582

(32)優先日 平成11年6月1日(1999.6.1)

(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 ピディントン, クリストファー エス.
アメリカ合衆国,カリフォルニア 91362,サ
ウザント オークス,アイロンゲート プレ
イス 2838

(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】 4ヘリックス束タンパク質 z s i g 8 1

(57)【要約】

本発明は、ポリペプチドおよび4ヘリックス束サイトカインをコードするポリヌクレオチド分子に関する。このサイトカインを z s i g 8 1 と表示し、そしてこれは主として心臓、肺および肝臓における制限された発現を有する。 z s i g 8 1 は造血細胞の増殖を刺激することが示され、これらの細胞の拡大、ならびに造血細胞に関連する症状に有効であろう。その上、本発明は、抗体および z s i g 8 1 ポリペプチドを製造する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2の少なくとも9つの隣接アミノ酸残基を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項2】 少なくとも15のアミノ酸残基を含んでなる、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 (a) 配列番号2の残基30～44；

(b) 配列番号2の残基56～70；

(c) 配列番号2の残基86～94；および

(d) 配列番号2の残基135～149；

から成る群から選択されるアミノ酸残基の配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項4】 (c) が配列番号2の残基80～94または86～100を含んでなる、請求項3に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項5】 配列番号2のアミノ酸残基30～149に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸残基の配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項6】 アミノ酸残基の配列が配列番号2の残基5～156を含んでなる、請求項5に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項7】 アミノ酸残基の配列が配列番号2の残基1～156を含んでなる、請求項5に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項8】 アミノ酸残基の配列が配列番号2の残基17～156を含んでなる、請求項5に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項9】 少なくとも2つのポリペプチドを含んで成り、第1ポリペプチドが、

(a) 配列番号2の残基30～44；

(b) 配列番号2の残基56～70；

(c) 配列番号2の残基86～94；および

(d) 配列番号2の残基135～149；

から成る群から選択される、融合タンパク質。

【請求項10】 第2ポリペプチドが他のサイトカインのフラグメントまた

はトキシン複合体から選択される、請求項9に記載の融合タンパク質。

【請求項11】 ペプチド結合により結合された第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとを含んでなり、前記第1ポリペプチドがシグナル配列を含んでなり、そして第2ポリペプチドが配列番号2に示すアミノ酸残基30～149アミノ酸の配列を含んでなる、融合タンパク質。

【請求項12】 ペプチド結合により結合された第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとを含んでなり、前記第1ポリペプチドがマルトース結合性タンパク質であり、ペプチド結合が因子Xa切断部位、トロンビン切断部位またはエンテロキナーゼ切断部位から成る群から選択され、そして第2ポリペプチドが配列番号2に示すアミノ酸残基30～149アミノ酸の配列を含んでなる、融合タンパク質。

【請求項13】 (a) 配列番号2の残基30～44；

(b) 配列番号2の残基56～70；

(c) 配列番号2の残基86～94；および

(d) 配列番号2の残基135～149；

から成る群から選択されるアミノ酸残基の配列と、薬学上許容されるベヒクルとを含んでなる医薬組成物。

【請求項14】 (a) 配列番号2の残基30～44；

(b) 配列番号2の残基56～70；

(c) 配列番号2の残基86～94；または

(d) 配列番号2の残基135～149；

を含んでな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15】 (a) 配列番号1のヌクレオチド272～316；

(b) 配列番号1のヌクレオチド350～394；

(c) 配列番号1のヌクレオチド440～466；または

(d) 配列番号1のヌクレオチド587～631；

を含んでなる、請求項14に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項16】 (a) 配列番号5のヌクレオチド139～183；

(b) 配列番号5のヌクレオチド216～261；

(c) 配列番号5のヌクレオチド307～331；または

(d) 配列番号5のヌクレオチド454～499；

を含んでなる、請求項14に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項17】 配列番号2のアミノ酸残基30～149に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸残基の配列を含んでな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18】 配列番号1に示すヌクレオチド272～ヌクレオチド631のヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項19】 ヌクレオチド配列が配列番号1に示すヌクレオチド185～ヌクレオチド655のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項18に記載のポリヌクレオチド。

【請求項20】 ヌクレオチド配列が配列番号1に示すヌクレオチド134～ヌクレオチド655のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項18に記載のポリヌクレオチド。

【請求項21】 下記の作用可能に連鎖された因子を含んでなる発現ベクター：

転写プロモーター；

請求項14に記載のポリヌクレオチドをコードするDNAセグメント；および

転写ターミネーター。

【請求項22】 請求項21に記載の発現ベクターが導入されており、前記DNAセグメントを発現する培養された細胞。

【請求項23】 工程：

DNAセグメントが発現されかつポリペプチドが産生される条件下に、請求項25に記載の細胞を培養し；そして

ポリペプチドを単離する；

を含むポリペプチドを製造する方法。

【請求項24】 請求項1に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項25】 zsig81の非存在下に培養した骨髄または末梢血細胞に比較して骨髄または末梢血細胞中の造血細胞の数を増加させるために十分な量のzsig81ポリペプチドを含んでなる組成物とともに、骨髄または末梢血細胞を培養する

ことを含む、造血細胞および造血細胞子孫を拡大する方法。

【請求項26】 造血細胞および造血細胞子孫がリンパ系細胞である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 造血細胞および造血細胞子孫が樹枝状細胞である、請求項25に記載の方法。

【請求項28】 工程：

(1) 抗原特異的抗体のレベルを測定し；

(2) 薬学上許容されるベヒクルの中にzsig81ポリペプチドを含んでなる組成物を投与し；

(3) 抗原特異的抗体の投与後のレベルを測定し；

(4) 工程(1)における抗体レベルを工程(3)における抗体レベルと比較し、ここで抗体レベルの変化は免疫応答のモジュレーションを示す；

を含む、抗原に対して暴露された哺乳動物における免疫応答をモジュレートする方法。

【請求項29】 造血細胞および造血細胞子孫が骨髄性細胞である、請求項25に記載の方法。

【請求項30】 工程：

(a) ハイブリダイゼーション条件下にzsig81核酸プローブを(i)生物学的試料から単離された被験RNA分子、または(ii)単離されたRNA分子から合成された核酸分子と接触させ、ここで前記プローブは請求項20に記載の核酸分子のヌクレオチド配列、またはその補体を有し；そして

(b) 核酸プローブと被験RNA分子または合成された核酸分子とのハイブリッドの形成を検出し、ここでハイブリッドの存在は生物学的試料中のzsig81の存在を示す；

を含む、生物学的試料中のzsig81 RNAの存在を検出する方法。

【請求項31】 工程：

(a) 生物学的試料を請求項24に記載の抗体または抗体フラグメントと接触させ、ここで生物学的試料に対する抗体または抗体フラグメントの結合を可能とする条件下に、前記接触を実行し；そして

(b) 結合した抗体または結合した抗体フラグメントを検出する；
を含む、生物学的試料中のzsig81の存在を検出する方法。

【請求項32】 工程：

- (1) 哺乳動物から造血細胞を単離し；
 - (2) 単離された造血細胞を腫瘍抗原に対して暴露し；
 - (3) 配列番号2の少なくとも9つのアミノ酸残基の単離されたポリペプチド
ポリペプチドを含んでなる組成物中で前記暴露された細胞を培養し；そして
 - (4) 培養した細胞を哺乳動物に投与して戻す；
- を含む、腫瘍抗原に対する抗原応答を刺激する方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の背景**

多細胞生物の細胞分化はホルモンおよびポリペプチドの成長因子により制御される。これらの拡散可能な分子は細胞を互いに連絡させ、協力して組織および器官を形成し、損傷した組織を修復しかつ再生する。ホルモンおよび成長因子の例は、なかでも、ステロイドホルモン、副甲状腺ホルモン、卵胞刺激ホルモン、インターフェロン、インターロイキン、血小板由来成長因子、および顆粒球 - マクロファージ刺激因子を包含する。

【0002】

ホルモンおよび成長因子は、レセプタータンパク質に結合することによって、細胞代謝に影響を与える。ある種のレセプターは細胞膜内タンパク質であり、これらのタンパク質は、細胞外ホルモンまたは成長因子と結合し、かつ細胞内のシグナル発生経路、例えば、第2メッセンジャー系の連鎖している。レセプターの他のレセプターは可溶性細胞内分子である。

【0003】

一般に、2つのクラスに分類される、サイトカインレセプターの中に保存される。その上、これらのレセプターのサイトカインリガンドはいくつかの保存された構造的同一性を有するが、これらのリガンドの生物学的活性は多様である。1グループとして、リガンドのサイトカインファミリーは、多数の細胞型の成長および成熟を理解するための治療剤および試薬として極めて適当である。

【0004】

サイトカインにより影響を受ける細胞は、全能性幹細胞から、広いスペクトルの生きている系のホメオスタシスに対して決定的である、特殊化された機能を有する、末端的に分化した細胞の範囲である。こうして、タンパク質のサイトカインファミリーの活性に基づいて、新しいサイトカイン、サイトカインアゴニストおよびサイトカインアンタゴニスト、ならびに関係する化合物および方法が必要とされている。本発明は、これらの用途および本明細書における教示から当業者にとって明らかである、他の用途のための、このようなポリペプチドを提供する

。

【0005】

発明の詳細な説明

本発明を詳細に説明する前に、下記の用語を定義することは本発明の理解の助けとなるであろう：

用語「親和標識」は、本明細書において、ポリペプチドの精製または検出を提供するか、あるいは基質へのポリペプチドの結合部位を提供するために、ペプチドに結合させることができるポリペプチドのセグメントを表すために使用される。原理的には、抗体または他の特異的な結合因子が利用可能な任意のペプチドまたはタンパク質を親和標識として使用することができる。

【0006】

親和標識は下記のを包含する：ポリヒスチジントラクト、プロテインA (Nilsson他、EMBO J. 4:1075、1985; Nilsson他、Methods Enzymol. 198:3、1991)、グルタチオンSトランスフェラーゼ (SmithおよびJohnson、Gene 67:31、1988)、Glu - Glu親和標識 (Grussenmeyer他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 - 4、1985)、サブスタンスP、FlagTMペプチド (Hopp他、Biotechnology 6:1204 - 10、1988、Eastman Kodak Co.、コネチカット州ニューヘブレン、から入手可能である)、ストレプトアビジン結合性ペプチド、または他の抗原エピトープまたは結合ドメイン。一般に、Ford他、Protein Expression and Purification 2:95 - 107、1991、参照。親和標識をコードするDNAは、商業的供給会社から入手可能である (例えば、Pharmacia Biotech、ニュージャージー州ピスカタウェイ)。

【0007】

用語「対立遺伝子変異型」は、本明細書において、同一染色体遺伝子座を占有する遺伝子の2またはそれ以上のオールタネイト形態の任意のものを表すために使用される。対立遺伝子の変動は突然変異により天然に起こり、そして集団内に表現型の多形性を生じさせることがある。遺伝子の突然変異はサイレント (コードされたポリペプチドの非変化) であるか、あるい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。対立遺伝子変異型という用語は

、また、本明細書において遺伝子の対立遺伝子変異型によりコードされるタンパク質を表すために使用される。

【0008】

用語「アミノ末端」または「カルボキシル末端」は、本明細書において、ポリペプチド内の位置を表すために使用される。この関係が許す場合、これらの用語は近接性または相対的位置を表すためにポリペプチドの特定の配列または部分を参照して使用される。例えば、ペプチド内の参照配列に対してカルボキシル末端に位置するある種の配列は、参照配列のカルボキシル末端に対して近接して位置するが、完全なポリペプチドのカルボキシル末端に必ずしも存在しない。

【0009】

用語「相補体 / 抗相補体の対」は、適当な条件下に非共有結合的にアソシエートした安定な対を形成する、非同一部分を表す。例えば、ビオチンおよびアビジン（またはストレプトアビジン）は、相補体 / 抗相補体の対のプロトタイプのメンバーである。他の典型的な相補体 / 抗相補体の対は、レセプター / リガンドの対、抗体 / 抗原（またはハプテンまたはエピトープ）の対、センス / アンチセンスポリヌクレオチドの対、およびその他を包含する。相補体 / 抗相補体の対の引き続く解離を望む場合、相補体 / 抗相補体の対は好ましくは $< 10^9$ / M の結合アフィニティーを有する。

【0010】

用語「ポリヌクレオチド分子の相補体」は、相補的塩基配列を有しかつ参照配列に比較して逆の向きを有するポリヌクレオチド分子である。例えば、配列 5' ATGCACGGG 3' は 5' CCCGTGCAT 3' に対して相補的である。

用語「縮重ヌクレオチド配列」は、1またはそれ以上の縮重コドンを含むヌクレオチド配列（ポリペプチドをコードする参照ポリヌクレオチド分子に比較して）を表す。縮重コドンはヌクレオチドの異なるトリプレットを含有するが、同一アミノ酸残基をコードする（すなわち、GAUおよびGACのトリプレットの各々はAspをコードする）。

【0011】

用語「発現ベクター」は、その転写を提供する追加のセグメントに作用可能に

連鎖された、問題のポリペプチドをコードするセグメントからなる、線状または円形のDNA分子を表すために使用される。このような追加のセグメントは、プロモーターおよびターミネーターの配列を包含し、そして、また、1またはそれ以上の複製起点、1またはそれ以上の選択可能なマーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、およびその他を包含することができる。発現ベクターは、一般に、プラスミドまたはウイルスDNAから誘導されるか、あるいは双方の因子を含有することができる。

【0012】

用語「単離された」は、ポリヌクレオチドに適用されるとき、ポリヌクレオチドがその自然の遺伝的環境から取出され、こうして他の余分のまたは望ましくないコーディング配列を含まず、そして遺伝子操作されたタンパク質の産生系内で使用するために適当な形態であることを表す。このような単離された分子はそれらの自然の環境から分離されたものであり、そしてcDNAおよびゲノムのクローンを包含する。本発明の単離されたDNA分子は、それらが通常アソシエートされる他の遺伝子を含まないが、天然に存在する5'および3'の非翻訳領域、例えば、プロモーターおよびターミネーターを包むことができる。アソシエートされた領域の同定は当業者にとって明らかであろう（例えば、DyananおよびTijan、Nature 316 : 774 - 78、1985、参照）。

【0013】

「単離された」ポリペプチドまたはタンパク質は、その自然環境、例えば、血液および動物の組織、以外の条件において見出されるポリペプチドまたはタンパク質である。好ましい形態において、単離されたポリペプチドは他のポリペプチド、特に動物由来の他のポリペプチドを実質的に含まない。高度に精製された形態、すなわち、95%より大きい純度、より好ましくは99%より大きい純度のポリペプチドを提供することが好ましい。この関係において使用するとき、用語「単離された」は別の物理的形態、例えば、二量体、あるいはグリコシル化または誘導化された形態の同一のポリペプチドの存在を排除しない。

【0014】

用語「作用可能に連鎖された」は、DNAセグメントについて言及するとき、セ

グメントがそれらの意図する目的のために調和して機能するように、例えば、転写がプロモーターにおいて開始し、コーディングセグメントを通してターミネーターに進行するように、セグメントが配置されていることを示す。

用語「オーソログ」は、異なる種からのポリペプチドまたはタンパク質の機能的対応物である、1つの種から得られたポリペプチドまたはタンパク質を表す。オーソログ間の配列の差は種形成の結果である。

「パラログ」は、生物により作られた、明確な、構造的に関係するタンパク質である。パラログは遺伝子の重複を通して生ずると考えられる。例えば、 α -グロビン、 β -グロビン、およびミオグロビンは互いにパラログである。

【0015】

「ポリヌクレオチド」は、5' 3'末端の方向に読んだ、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖のポリマーである。ポリヌクレオチドはRNAおよびDNAを包含し、天然源から単離され、in vitroで合成されるか、あるいは天然の分子と合成の分子との組み合わせから製造することができる。ポリヌクレオチドのサイズは、塩基対(略号「bp」)、ヌクレオチド(「nt」)、またはキロ塩基(「kb」)として表される。この関係が許す場合、後者の2つの用語は一本鎖または二本鎖であるポリヌクレオチドを記載することができる。

【0016】

この用語を二本鎖の分子に適用するとき、それは全体の長さを表すために使用され、そして用語「塩基対」に等しいと理解されるであろう。当業者は認識するように、二本鎖ポリヌクレオチドの2つの鎖はわずかに長さが異なることがあり、そして酵素の切断の結果その末端は食い違うことがある；こうして、二本鎖ポリヌクレオチド内のすべてのヌクレオチドは対合していないことがある。このような不對末端は一般に20ヌクレオチド長さを越えない。

【0017】

「ポリペプチド」は、自然にまたは合成的に生産された、ペプチド結合により結合されたアミノ酸残基のポリマーである。約10アミノ酸残基より小さいポリペプチドは普通に「ペプチド」と呼ばれる。

用語「プロモーター」は、本明細書において、RNAポリメラーゼの結合を提供しかつ転写を開始させるDNA配列を含有する遺伝子の部分を表す、この分野において認識されている意味において使用される。プロモーター配列は普通に、しかし常にではないが、遺伝子の5'非コーディング領域の中に見出される。

【0018】

「タンパク質」は、1またはそれ以上のポリペプチド鎖を含んでなる高分子である。タンパク質は、また、非ペプチド成分、例えば、炭水化物基を含んでなることができる。炭水化物および他の非ペプチド置換基は、タンパク質が産生される細胞により、タンパク質に付加されることがあり、そして細胞の型とともに変化するであろう。タンパク質は、本明細書において、アミノ酸バックボーン構造により定義される；置換基、例えば、炭水化物基は一般に特定されないが、それにもかかわらず、存在することができる。

【0019】

用語「レセプター」は、生物活性分子（すなわち、リガンド）に結合し、細胞上のリガンドの作用を伝達する、細胞関連タンパク質を表す。膜に結合したレセプターは、細胞外リガンド結合性ドメインと、典型的にはシグナルトランスダクションに関係する細胞内エフェクタードメインとからなる、多ペプチド構造により特徴づけられる。レセプターへのリガンドの結合は、エフェクタードメインと、細胞中の1またはそれ以上の他の分子との間の相互作用を引き起こす、レセプターにおけるコンフォメーションの変化を生ずる。この相互作用は、引き続いて、細胞の代謝の変更に導く。レセプター - リガンドの相互作用に関係する代謝の事象は、遺伝子の転写、リン酸化、脱リン酸化、サイクリ的AMP産生の増加、細胞のカルシウムの移動化、膜脂質の移動化、細胞の接着、イノシトール脂質の加水分解、およびリン脂質の加水分解を包含する。

【0020】

大部分の核レセプターは、また、アミノ末端のトランス作用性ドメイン、DNA結合性ドメインおよびリガンド結合性ドメインを包含する、多ドメイン構造を示す。一般に、レセプターは、膜結合、細胞質ゾルまたは核レセプター；モノマーのレセプター（例えば、甲状腺刺激ホルモンのレセプター、ベータ - アドレナリ

ン作動性レセプター)またはマルチマーのレセプター(例えば、PDGFレセプター、成長ホルモンレセプター、IL-3レセプター、GM-CSFレセプター、G-CSFレセプター、エリトロポイエチンレセプターおよびIL-6レセプター)であることができる。

【0021】

用語「分泌シグナル配列」は、ポリペプチド(「分泌ペプチド」)をコードするDNA配列を表し、それは、より大きいポリペプチドの1成分として、より大きいポリペプチドが合成される細胞の分泌経路を通してそのポリペプチドを向ける。通常、より大きいポリペプチドは、分泌経路を通る移行の間に切断されて、分泌ペプチドを除去する。

【0022】

用語「スプライス変異型」は、本明細書において、遺伝子から転写されたRNAの別の形態を表すために使用される。スプライス変異型は転写されたRNA分子内の、あるいはそれ程普通ではないが別々に転写されたRNA分子の間の、オルタネイトスプライス部位の使用により自然に発生し、そして同一遺伝子から転写されたいくつかのmRNAを生ずることがある。スプライス変異型は、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。また、スプライス変異型という用語は、本明細書において、ある遺伝子から転写されたmRNAのスプライス変異型によりコードされるタンパク質を表すために使用される。

【0023】

不正確な分析法(例えば、ゲル電気泳動)により決定されたポリマーの分子量および長さは、近似値であると理解されるであろう。このような値を「約」Xまたは「ほぼ」Xとして表すとき、Xの記載する値は±10%の正確さであると理解されるであろう。

本明細書において引用するすべての参考文献は、それらの全体において引用することによって本明細書の一部とされる。

本発明は、一部分、4ヘリックス束(four-helical bundle)サイトカインをコードする新規なDNA配列の発見に基づく。4ヘリックス束サイトカインのファミリーを本明細書に開示し、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドはこのタ

ンパク質ファミリーを特性決定する成分のいくつかまたはすべてを含んでなるであろう。本発明のポリペプチドをzsig81と表示する。

【0024】

配列の分析により、N末端に17アミノ酸の分泌シグナルペプチドと156アミノ酸の成熟タンパク質とを有する、173アミノ酸のオープンリーディングフレームが明らかにされた。組換え的に発現されたヒトタンパク質のN末端の配列の分析に基づいて、残基4 (His) 後における切断は配列番号2に示す残基5 (Arg) ~ 残基156 (Pro) の151アミノ酸の生物学的に活性な分子を生ずる。一般に、4ヘリックスサイトカインポリペプチドは近接上流停止コドンをもつ強度シグナル配列を有する。

【0025】

本発明の分子において、ヒトzsig81は配列番号1に示すようにヌクレオチド約30において開始する停止コドンにコードする。zsig81のマウスオーソログ中の対応するヌクレオチドは配列番号3のヌクレオチド約27において見出すことができる。しかしながら、当業者は認識するように、いくつかのサイトカイン (例えば、内皮細胞増殖因子、塩基性FGF、およびIL-1) は普通の分泌ペプチドを含まず、理解されないメカニズムにより分泌される。また、cDNAは明瞭なポリアデニル化シグナル、ならびに3'非翻訳領域に2つのメッセージ不安定性モチーフ (ATT TA) を含む。これらのメッセージ不安定性モチーフはサイトカイン遺伝子の特徴を示す (ShawおよびKamen, Cell 46: 659 - 667, 1986)。

【0026】

一般に、4つのアルファヘリックス構造を有することが予測され、ヘリックスはA、CおよびDはリガンド-レセプター相互作用において最も重要であり、ファミリーのメンバーの中に保存されたモチーフを含有する。4ヘリックス、A、B、C、およびDと表示する、は、配列番号2に示すように、アミノ酸残基30~44 (ヘリックスA)、56~70 (ヘリックスB)、86~94 (ヘリックスC) および135~149 (ヘリックスD) をスパンすることが予測された。ヘリックスCは配列番号2の残基80~94または86~100をスパンすることが予測される。

【0027】

構造の分析により、zsig81のループ構造は、A/Bループは長く、B/Cループは短く、そしてC/Dループは長いことにおいて、サイトカインファミリーの他のメンバーと合致することが示される。このループ構造は、サイトカインにとって典型的である、アップ - アップ - ダウン - ダウンヘリックス体制化を生ずる。したがって、zsig81の予測されるヘリックス構造は、IL - 2、IL - 4、IL - 5、およびGM - CSFを有する短いヘリックス型のサイトカインのファミリーにおける分子を含む。CNTFおよびIL - 6を使用する研究において、CNTFヘリックスをIL - 6における同等のヘリックスで置換して、キメラにCNTF結合特性を付与できることが証明された。

【0028】

こうして、4ヘリックスサイトカインの機能的ドメインは、配列同一性に無関係に、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完全性を維持することができるように思われる (Kallen他、J. Biol. Chem. 274 : 11859 - 11867、1999)。したがって、zsig81のヘリックスドメインは、特に他の短いヘリックス型サイトカインとの、キメラ融合分子を製造して、レセプター結合特異性を決定しかつモジュレートするために有効であろう。

【0029】

ヘリックスAおよび/またはヘリックスDで操作した融合タンパク質、および他の短い形態のサイトカイン、例えば、IL - 2、IL - 4、IL - 15およびGM - CSFからのヘリックスおよびループドメイン組合わせて有する融合タンパク質は特に重要である。ヘリックスAに対してN末端でありかつ分泌シグナル配列に対してC末端であるアミノ酸配列において、アミノ酸配列は短いテイルスパニング残基150 ~ 156を形成する。ヘリックス領域内において、4ヘリックス束のコア内に横たわることが期待される残基は残基30、33、34、37、40、41、44、56、59、60、63、66、67、70、80、83、84、87、90、91、94、135、138、139、142、145、146、および149に存在する。

【0030】

zsig81は、ループA/Bに対してN末端である、残基3、およびB/Cループの中に位置する、残基76、に位置する2つのシステイン残基を有する。しかしながら、

バキュロウイルスにおいて発現されたタンパク質がN末端に配列決定されるとき、生物学的に活性な分子はHis4後に切断されたタンパク質の有意な部分との不均質混合物であり、これにより残基76に単一のシステインを有する分子を生ずる。

【0031】

成熟zsig81において、2つのシステインは分子内ジサルファイド結合を形成することができる、そしてN末端的にトランケートされた分子または成熟分子において、単一のシステインはホモダイマーまたは他の結合相手とヘテロダイマーを形成することができる。SDS - PAGE分析を使用して、zsig81タンパク質のホモダイマーの形態が検出された。アミノ酸変化の分析に基づいて、ヘリックスAは負に帯電され、そしてCヘリックスは正に帯電される。zsig81の予測される分子量は17,533ダルトンであり、そして見掛けのグリコシル化は存在しない。

【0032】

この新規なDNAに対応するヒトmRNAの組織分布の分析において、発現が心臓および肝臓に限定されることが示された。心臓組織内において、ヒトmRNAの最高の発現は大動脈の平滑筋に局在化された。cDNAはほぼ1.7kbのサイズであることが予測されるが、ノザン上で同定されたバンドはほぼ5.0kbであった。ほぼ2.5kbの3'非翻訳領域を含有するスプライス変異型は、ヒトzsig81mRNAを使用して同定され、そしてノザン分析により見られた5.0kbのバンドに対応すると考えられる。

また、マウスからのオーソログが同定され、zsig81mと表示された。DNA配列および対応する推定上のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号3および4に示す。

【0033】

配列番号5は、配列番号2のzsig81ポリペプチド（アミノ酸1または24～354）をコードすることができる、すべてのポリヌクレオチドを包含する縮重ポリヌクレオチド配列である。こうして、配列番号2のヌクレオチド134または185～ヌクレオチド655または配列番号5のヌクレオチド1または52～519の範囲のzsig81ポリペプチドエンコーディングポリヌクレオチドは本発明に包含される。

【0034】

また、配列番号1に関して本明細書に記載するフラグメントおよび融合物は本発明に包含され、これらは配列番号5の類似する領域から形成され、ここで、分

泌シグナル配列について、配列番号1のヌクレオチド134～184は配列番号5のヌクレオチド1～51に対応し、ヘリックスAについて、配列番号1のヌクレオチド272～316は配列番号5のヌクレオチド139～183に対応し、ヘリックスBについて、配列番号1のヌクレオチド350～394は配列番号5のヌクレオチド216～261に対応し、ヘリックスCについて、配列番号1のヌクレオチド440～466は配列番号5のヌクレオチド307～331に対応し、そしてヘリックスDについて、配列番号1のヌクレオチド587～ヌクレオチド631は配列番号5のヌクレオチド454～ヌクレオチド499に対応する。

【0035】

縮重ヌクレオチド位置を表すために配列番号5内で使用した1文字コードを表1に記載する。「解」はコード文字により表されるヌクレオチドである。「相補体」は1またはそれ以上の相補的ヌクレオチドのコードである。例えば、コードYはCまたはTを表し、そしてその相補体RはAまたはGを表し、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。

【0036】

【表1】

表 1

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

所定のアミノ酸についてすべての可能なコドンを含む、配列番号2および4において使用する縮重コドンを表2に記載する。

【0037】

【表2】

表 2

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	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
いずれか	X		NNN

【0038】

当業者は認識するように、各アミノ酸をコードするすべての可能なコドンを代表する縮重コドンを決定的するとき、多少の不明確さが導入される。例えば、セリンの縮重コドン (WSN) は、ある環境において、アルギニン (AGR) をコードする

ことができ、そしてアルギニンの縮重コドン(MGN)は、ある環境において、セリン(AGY)をコードすることができる。同様な関係がフェニルアラニンおよびロイシンをコードするコドンの間に存在する。したがって、縮重配列に包含される、いくつかのポリヌクレオチドは変異型アミノ酸配列をコードすることができるが、当業者は、配列番号2のアミノ酸配列を参照することによって、このような変異型配列を容易に同定することができる。変異型配列は、本明細書において記載するように、機能性について容易に試験することができる。

【0039】

また、当業者は認識するように、異なる種は「優先的コドンの使用」を示すことができる。一般に、下記の文献を参照のこと：Grantham他、Nucl. Acids Res. 8：1893 - 912、1980；Haas他、Curr. Biol. 6：315 - 24、1996；Wain-Hobson他、Gene 13：355 - 64、1981；GrosjeanおよびFiers、Gene 18：199 - 209、1982；Holm、Nucl. Acids Res. 14：3075 - 87、1986；Ikemura、J. Mol.

Biol. 158：573 - 97、1982。本発明において使用するとき、用語「優先的コドンの使用」または「優先的コドン」は、ある種の細胞において最も頻繁に使用され、こうして各アミノ酸をコードする可能なコドンの1つまたはわずかの代表的なものに好んで使用される、タンパク質翻訳コドンを言及する、この分野の用語である(表3参照)。

【0040】

例えば、アミノ酸のスレオニン(Thr)はACA、ACC、ACG、またはACTによりコードされることができ、哺乳動物細胞において、ACCは最も普通に使用されるコドンである；他の種、例えば、昆虫細胞、酵母、ウイルスまたは細菌において、異なるThrコドンは優先的であることができる。特定の種の優先的コドンを、この分野において知られている種々の技術により、本発明のポリヌクレオチドの中に導入することができる。組換えDNAの中への優先的コドンの導入は、例えば、特定の細胞の型または種内のタンパク質の翻訳を効率よくすることによって、タンパク質の産生を増強することができる。

【0041】

したがって、配列番号11に開示されている縮重コドンの配列は、この分野にお

いて普通に使用されかつ本明細書において開示する、種々の細胞の型および種におけるポリヌクレオチドの発現を最適化するための鋳型として働く。優先的コドンを含む配列を、本明細書において開示するように、種々の種における発現について試験し、発現のために最適化し、そして機能性について試験することができる。

【0042】

本発明は、さらに、他の種からの対応物を表すポリペプチドおよびポリヌクレオチド（オーソログ）を提供する。これらの種は下記のを包含するが、これらに限定されない：哺乳動物、トリ、両生類、爬虫類、魚類、昆虫および他の脊椎動物および無脊椎動物。特に興味あるものは、他の哺乳動物種、例えば、ネズミ、ブタ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコ、ウマ、および他の霊長類のポリペプチドからのzsig81ポリペプチドである。ヒトzsig81のオーソログは、本発明により提供される情報および組成物を慣用のクローニング技術と組み合わせて使用して、クローニングすることができる。

【0043】

例えば、本明細書において開示するように、zsig81を発現する組織および細胞型から得られるmRNAを使用して、cDNAをクローニングすることができる。本明細書において開示する配列から設計されたプローブでノザンロットをプロービングすることによって、mRNAの適当な源を同定することができる。次いで、陽性の組織または細胞系統のmRNAからライブラリーを調製することができる。マウス配列zsig81はヒトzsig81の代表的なオーソログであり、そして配列番号3および4に開示する。

【0044】

次いで、種々の方法、例えば、完全なまたは部分的ヒトcDNAで、または開示した配列をベースとする1またはそれ以上の組の縮重プローブでプロービングすることによって、zsig81をコードするcDNAを単離することができる。また、本明細書に開示する代表的ヒトzsig81配列から設計したプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応により、cDNAをクローニングすることができる。追加の方法において、cDNAライブラリーを使用して宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトす

ることができ、そしてzsig81ポリペプチドに対する抗体で問題のcDNAの発現を検出することができる。また、ゲノムのクローンの単離に同様な技術を適用することができる。

【0045】

本発明は、上に開示したzsig81ポリペプチドをコードするDNAおよびRNA分子を包含するポリヌクレオチド分子を提供する。

本明細書に開示するzsig81ポリヌクレオチド配列は、また、zsig81遺伝子の5'非コーディング領域をクローニングするためのプローブまたはプライマーとして使用することができる。ノザンプロットングによりzsig81について観測された組織特異的発現にかんがみて、この遺伝子領域は心臓および肝臓 - 特異的発現を提供することが期待される。こうして、zsig81遺伝子からのプロモーター因子を使用して、例えば、トランスジェニック動物または遺伝子治療で治療された患者において、異種遺伝子の組織特異的発現を指令することができる。

【0046】

5'フランキング配列のクローニングは、また、米国特許第5,641,670号に開示されているように、「遺伝子活性化」によりzsig81タンパク質の産生を促進する。簡単に述べると、細胞における内因的zsig81遺伝子の発現は、zsig81遺伝子座の中に、少なくともターゲティング配列、調節配列、エクソン、および不对スプライスドナー部位からなるDNA構築物を導入することによって、変更される。ターゲティング配列は、内因的zsig81遺伝子座を有する構築物の相対的組換えを可能とするzsig81の5'非コーディング配列であり、これにより構築物内の配列は内因的zsig81コーディング配列と作用可能に連鎖するようになる。このようにして、内因的zsig81プロモーターを他の調節配列で置換するか、あるいは補充して、発現を増強し、転写特異的にまたは他の方法で調節することができる。

【0047】

当業者は認識するように、配列番号1に記載する配列はヒトzsig81の単一の対立遺伝子を表し、そして対立遺伝子変異型およびオルタネイトスプライシングが起こることが期待される。この配列の対立遺伝子変異型は、標準的手順に従い、異なる個体からのcDNAまたはゲノムのライブラリーをプロービングすることに

よって、クローニングすることができる。配列番号1に示すヌクレオチド配列の対立遺伝子変異型は、サイレント突然変異体を含むものおよび突然変異がアミノ酸配列を変化させるものを包含し、配列番号2の対立遺伝子変異型であるタンパク質と同様に、本発明の範囲内に入る。

【0048】

交互にスプライスされたmRNAから発生するcDNAは、zsig81ポリペプチドの性質を保持し、このようなcDNAおよびmRNAをコードするポリペプチドと同様に、本発明の範囲内に入る。これらの配列の対立遺伝子変異型およびスプライス変異型は、この分野において知られている標準的手順に従い、異なる個体または組織からのcDNAまたはゲノムのライブラリーをプロービングすることによって、クローニングすることができる。

【0049】

遺伝子の位置についての正確な知識は、下記を含む、多数の目的のために有効である：1) 配列が存在するcontigの一部であるかどうかを決定し、そして追加の取り囲む遺伝子配列を種々の形態、例えば、YAC、BACまたはcDNAクローンで得る；2) 同一染色体領域に対する連鎖を示す、遺伝可能な疾患について可能な候補の遺伝子を提供する；および3) 特定の遺伝子がどんな機能を有することができるかの決定を促進することができる、モデル生物、例えば、マウスを相互参照する。

【0050】

zsig81ポリヌクレオチド配列を使用する染色体DNAの分析は、染色体7に局在化される異常性に疾患を関係づけるために有効である。zsig81遺伝子は染色体7q32-q33に局在化された。診断剤としての使用は、疾患の型および適当な関連する療法の決定において医師を助けるか、あるいは遺伝学的カウンセリング助けることができる。それ自体、本発明の抗zsig81抗体、ポリヌクレオチド、およびポリペプチドはzsig81ポリペプチド、mRNAまたは抗zsig81抗体の検出に使用し、こうしてマーカーとして働くことができ、そして、本明細書において記載するように、この分野において知られている方法および本明細書に記載する方法に従い、遺伝病または癌の検出に直接的に使用することができる。

【0051】

さらに、本明細書において記載するように、zsig81ポリヌクレオチドのプロープを使用して染色体7q32 - q33を包含する異常性を検出するために使用することができる。これらの異常性はヒト疾患、または腫瘍発生、自然流産または他の遺伝病に関係づけられる。こうして、zsig81ポリヌクレオチドのプロープを使用して、これらの欠陥に関係づけられる異常性または遺伝子型を検出することができる。

【0052】

前述したように、zsig81遺伝子それ自体中の欠陥は遺伝可能なヒト疾患状態を生ずることがある。本発明の分子、例えば、本発明のポリペプチド、アンタゴニスト、アゴニスト、ポリヌクレオチドおよび抗体は、zsig81遺伝子欠陥に関連する疾患の検出、診断、予防および治療を促進するであろう。さらに、zsig81ポリヌクレオチドのプロープを使用して、疾患をもつ個体またはもたない個体の間のzsig81染色体遺伝子座における対立遺伝子の差を検出することができる。それ自体、zsig81配列を法医学のDNAプロファイリングにおいて診断剤として使用することができる。

【0053】

一般に、患者における遺伝学的異常性または染色体異常を検出するために、遺伝学的連鎖の分析において使用される診断法はこの分野において知られている。大部分の診断法は下記の工程を含む：

(i) 潜在的に疾患をもつ患者、疾患をもつ患者または劣性疾患対立遺伝子の潜在的に非疾患キャリアーから遺伝学的試料を獲得し；

(ii) 遺伝学的試料をzsig81ポリヌクレオチドのプロープとインキュベートすることによって第1反応生成物を産生し、ここで、例えば、RFLPにおいて、ポリヌクレオチドは相補的ポリヌクレオチド配列に対してハイブリダイゼーションするか、あるいは適当なPCR反応条件下にPCR反応において遺伝学的試料をセンスおよびアンチセンスプライマーとインキュベートすることによって第1反応生成物を産生し；

【0054】

(iii) ゲル電気泳動および/または他の既知の方法、例えば、zsig81ポリヌクレオチドのプロープで第1反応生成物を可視化することによって、第1反応生成物を可視化し、ここで第1反応においてポリヌクレオチドは相補的ポリヌクレオチド配列に対してハイブリダイゼーションし；そして

(iv) 可視化した第1反応生成物を正常または対照の個体からの遺伝学的試料の第2対照反応生成物と比較する。

【0055】

第1反応生成物と対照反応生成物との間の差は、疾患をもつまたは潜在的に疾患をもつ患者における遺伝学的異常性、または非疾患の患者についてのヘテロ接合性劣性キャリアーの表現型の存在、または疾患をもつ患者からの腫瘍における遺伝学的欠陥の存在、または胎児または移植前の胚における遺伝学的異常性の存在を示す。例えば、制限フラグメントのパターン、PCR生成物の長さ、zsig81遺伝子座における反復配列の長さ、およびその他における差は、正常の対照に比較して遺伝学的異常性、遺伝学的染色体異常、または対立遺伝子の差を示す。対照は、試験および試料の入手可能性に依存して、影響を受けないファミリーのメンバー、または無関係の個体からのものであることができる。

【0056】

本発明において使用する遺伝学的試料は、患者からの任意の組織または他の生物学的試料から単離されたゲノムDNA、mRNA、およびcDNAを包含し、例えば、血液、唾液、精液、胚細胞、羊水、およびその他を包含するが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドのプロープまたはプライマーはRNAまたはDNAであることができ、そして配列番号1の一部分、配列番号1の補体、またはそのRNA同等物であることができる。ヒト疾患表現型に対して遺伝学的連鎖分析を示す、このような方法はこの分野においてよく知られている。

【0057】

診断におけるPCRをベースとする方法については、一般に、下記の文献を参照のこと：Mathew（編者）、Protocols in Human Genetics (Humana Press, Inc. 1991)、White（編者）、PCR Protocols: Current Methods and Applications (Humana Press, Inc. 1993)、Cotter（編者）、Molecular Diagnosis

s of Cancer (Humana Press, Inc. 1996)、HanausekおよびWalaszek (編者)、Tumor Marker Protocols (Humana Press, Inc. 1998)、Lo (編者)、Clinical Applications of PCR (Humana Press, Inc. 1998)、およびPCR in Bioanalysis (Humana Press, Inc. 1998)。

【0058】

直接的突然変異分析についての標準的方法、例えば、制限フラグメント長さの多形性分析、PCR技術による短い縦列反復分析、増幅 - 不応性突然変異系分析、一本鎖コンフォメーション多形性検出、RNアーゼ切断法、変性勾配ゲル電気泳動、蛍光補助ミスマッチ分析、およびこの分野において知られている他の遺伝学的分析技術に従い、本発明の核酸分子を使用して、zsig81遺伝子座として突然変異を検出することができる (例えば、下記の文献を参照のこと) :

【0059】

Mathew (編者)、Protocols in Human Genetics (Humana Press, Inc. 1991)、Marian、Chest 108:255 (1995)、ColemanおよびTsongalis、Molecular Diagnostics (Humana Press, Inc. 1996)、Elles (編者)、Molecular Diagnosis of Genetics Diseases (Humana Press, Inc. 1996)、Landegren (編者)、Laboratory Protocols for Mutation Detection (Oxford University Press 1996)、Birren他 (編者)、Genome Analysis, Vol. 2: Detecting Genes (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988)、Dracopoli他 (編者)、Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons 1998)、およびRichardsおよびWard、Molecular Diagnostic Testing、Principles of Molecular Medicine、pp. 83 - 88 (Humana Press, Inc. 1998)。

【0060】

突然変異についてzsig81遺伝子を直接的に分析する方法は、被検体のゲノムDNAを使用して実行することができる。例えば、末梢血リンパ球から得られたゲノムDNAを増幅する方法はこの分野においてよく知られている (例えば、下記の文献を参照のこと: Dracopoli他 (編者)、Current Protocols in Human Genetics、pp. 7.1.6 - 7.1.7 (John Wiley & Sons 1988))。

【0061】

マウスzsig81遺伝子中のイントロンの位置は、ゲノムクローンを同定し、次いでイントロン/エクソンの結合部を配列決定することによって決定された。zsig81分子についてのコーディング領域は3つのエクソンの中に含有されている。第1イントロンは配列番号4中のアミノ酸残基8 (Arg) と残基9 (Ala) との間に存在する。第2イントロンは配列番号4中のアミノ酸残基42 (Glu) と残基43 (Leu) との間に存在する。第3イントロンは、分子のC末端部分をコードする残りのDNA、ならびに3'非翻訳領域を含有する。

【0062】

本発明の態様において、単離された核酸分子は、ストリンジェント条件下に、配列番号1のヌクレオチド134または185～655のヌクレオチド配列、または全長の配列を有する核酸分子、配列番号1に対して相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子に対してハイブリダイゼーションすることができる。一般に、ストリンジェント条件は、規定されたイオン強度およびpHにおいて、特定の配列の熱的融点 (T_m) よりも約5 低いように選択される。 T_m は標的配列の50%が完全に合致するプローブにハイブリダイゼーションする温度 (規定されたイオン強度およびpHにおいて) である。

【0063】

1対の核酸分子、例えば、DNA - DNA、RNA - RNAおよびDNA - RNAは、ヌクレオチド配列がある程度の相補性を有する場合、ハイブリダイゼーションすることができる。ハイブリッドは二重ヘリックス中のミスマッチ塩基対を許容できるが、ハイブリッドの安定性はミスマッチの程度により影響される。ミスマッチのハイブリッドの T_m は1～1.5%の塩基対のミスマッチ毎に1 だけ低下する。ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシイを変化させると、ハイブリッドの中に存在するミスマッチの程度をコントロールすることができる。ハイブリダイゼーション温度が増加しかつハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度が減少するにつれて、ストリンジェンシイの程度は増加する。

【0064】

当業者は、特定のポリペプチドのハイブリッドとともに使用するためにこれら

の条件を適合させることができる。特定のターゲット配列の T_m は、ターゲット配列の50%が完全に合致したプローブ配列にハイブリダイゼーションする温度（規定された条件下に）である。 T_m に影響を及ぼす条件は、ポリヌクレオチドプローブのサイズおよび塩基対含量、ハイブリダイゼーション溶液のイオン強度、およびハイブリダイゼーション溶液中の脱安定化因子の存在を包含する。

【0065】

T_m を計算する多数の方程式はこの分野において知られており、そしてDNA、RNAおよびDNA-RNAハイブリッドおよび変化する長さのポリヌクレオチドプローブ配列について特異的である（例えば、下記の文献を参照のこと：Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版（Cold Spring Harbor Press 1989）；Ausubel他、編、Current Protocols in Molecular Biology（John Wiley & Sons, Inc. 1987）；BergerおよびKimmel（編）、Guide to Molecular Cloning Techniques（Academic Press, Inc. 1987）；およびWetmur、Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227（1990））。

【0066】

配列分析ソフトウェア、例えば、OLIGO 6.0（LSR；ミネソタ州ロングレイク）およびPrimer Premier 4.0（Premier Biosoft International；カリフォルニア州パロアルト）、ならびにインターネット上のサイトは、所定の配列を分析しかつユーザー規定基準に基づいて T_m を計算するための入手可能な道具である。また、このようなプログラムにより、規定された条件下に所定の配列を分析し、適当なプローブ配列を同定することができる。典型的には、>50塩基対の、より長いポリヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを計算した T_m よりも約20~25 だけ低い温度において実施する。<50塩基対の、より小さいプローブについて、ハイブリダイゼーションは典型的には T_m または5~10 だけ低い温度において実施される。これにより、DNA-DNAおよびDNA-RNAハイブリッドについてハイブリダイゼーション速度を最大にすることができる。

【0067】

ハイブリダイゼーション後、核酸分子をストリンジェント条件下または高度にストリンジェントな条件下に洗浄して非ハイブリダイゼーション核酸分子を除去

する。典型的なストリンジェント洗浄条件は、 $0.5\times\sim 2\times$ SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の溶液中の55~65 における洗浄を包含する。すなわち、変異型zsig81ポリペプチドをコードする核酸分子は配列番号1のヌクレオチド配列 (またはその相補体) を有する核酸分子とストリンジェント洗浄条件下にハイブリダイゼーションし、ここで洗浄ストリンジェンシイは55~65 において $0.5\times\sim 2\times$ SSC、0.1%SDSに等しく、 $0.5\times$ SSC、0.1%SDS、55 、または $2\times$ SSC、0.1%SDS、65 を包含する。当業者は、例えば、洗浄溶液中のSSCをSSPEで置換することによって、同等条件を容易に案出することができる。

【0068】

典型的な高度にストリンジェントの洗浄条件は、50~65 において $0.1\times\sim 0.2\times$ SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の溶液中の洗浄を包含する。換言すると、変異型zsig81ポリペプチドをコードする核酸分子は配列番号1のヌクレオチド配列 (またはその補体) を有する核酸分子と高度にストリンジェントな洗浄条件下にハイブリダイゼーションし、ここで洗浄ストリンジェントは55~65 において $0.1\times\sim 0.2\times$ SSC、0.1%SDSに等しく、 $0.1\times$ SSC、0.1%SDS、50 、または $0.2\times$ SSC、0.1%SDS、65 を包含する。

【0069】

本発明は、また、配列番号2のポリペプチドおよびそれらのオーソログに対して実質的に同様な配列の同一性を有する、単離されたzsig81ポリペプチドを提供する。用語「実質的に同様な配列の同一性」は、本明細書において、配列番号2に示す配列またはそれらのオーソログに対して少なくとも70%~80%、少なくとも90%~95%、または他の態様において95%より大きい配列の同一性を有するポリペプチドを表すために使用される。本発明は、また、配列番号2のアミノ酸残基1または24~354の配列に対して70%~80%、そしてある態様において少なくとも90%~95%、または他の態様において95%より大きい配列の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを包含する。さらに、本発明は、このようなポリペプチドをコードする核酸分子を包含する。同一性百分率を決定する方法を後述する。

【0070】

本発明は、また、下記の2つの基準を使用して同定できる、zsig81変異型の核酸分子を包含する：前述したように、配列番号2のアミノ酸配列をもつコードされたポリペプチド間の類似性の決定、および/またはハイブリダイゼーションアッセイ。このようなzsig81変異型は下記の核酸分子を包含する：(1) ストリンジェント洗浄条件下に配列番号1のヌクレオチド配列（またはその相補体）を有する核酸分子とハイブリダイゼーションする核酸分子、ここで洗浄ストリンジェンシイは $0.5 \times \sim 2 \times$ SSC、0.1% SDS、55~65 に等しい、または(2) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または95%より大きい配列の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子。

【0071】

あるいは、zsig81変異型は、(1) 高度にストリンジェントの洗浄条件下に配列番号1のヌクレオチド配列（またはその補体）を有する核酸分子とハイブリダイゼーションする核酸分子、ここで洗浄ストリンジェンシイは $0.1 \times \sim 0.2 \times$ SSC、0.1% SDS、50~65 に等しい、および(2) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%~80%、少なくとも90%~95%または95%より大きい配列の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、として特徴づけることができる。

【0072】

配列の同一性の百分率は慣用法により決定される。例えば、下記の文献を参照のこと：Altschul他、Bull. Math. Bio. 48:603(1986)、およびHenikoff およびHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915(1992)。簡単に述べると、表3（アミノ酸は標準的1文字コードにより示されている）に示すように10のギャップオープニングペナルティー、1のギャップエクステンションペナルティー、およびHenikoffおよびHenikoff (ibid.) の「ブロサム (BLOSUM) 62」スコアリングマトリックスを使用して、2つのアミノ酸配列を整列させて整列スコアを最適化する。

【0073】

【数1】

$$\frac{\text{【同一の整合 (match) の総数】}}{\text{【長い方の配列の長さ+2つの配列を整列させるために、長い方の配列中に導入されるギャップの数】}} \times 100$$

【0074】

【表3】

表 3

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

【0075】

当業者は認識するように、2つのアミノ酸配列を整列するために有効な多数のアルゴリズムが存在する。PearsonおよびLipmanの「FASTA」類似性の検索アルゴリズムは、本明細書に開示するアミノ酸配列および推定上の変異型zsig81のアミノ酸配列が共有する同一性のレベルを検査する、適当なタンパク質整列法である。FASTAアルゴリズムは下記の文献に記載されている：PearsonおよびLipman、Pr

oc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)、およびPearson、Meth. Enzymol. 183:63 (1990)。

【0076】

簡単に述べると、まず、保存的アミノ酸の置換、挿入、または欠失を考慮しないで、問題の配列（例えば、配列番号2）、および同一性の最高密度（ktup変数が1である場合）または同一性の対（ktup=2である場合）を有する試験配列が共有する領域を同定することによって、FASTAは配列の類似性を特性決定する。次いで、アミノ酸置換マトリックスを使用してすべての対合アミノ酸の類似性を比較することによって、同一性の最高密度をもつ10領域を再スコアリングし、そして最高スコアに寄与する残基のみを含むように、領域の末端を「トリミング」する。

【0077】

「カットオフ」値（配列の長さおよびktup値に基づいて前もって決定した式により計算される）より大きいスコアをもつ、いくつかの領域が存在する場合、トリミングした最初の領域を検査して、領域を結合してギャップをもつ近似整列を形成できるかどうかを決定する。最後に、アミノ酸配列の挿入または欠失を可能とする、Needleman - Wuncsch - Sellersアルゴリズムの変法（NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48:444 (1970) ; Sellers、SIAM J. Appl. Math.

26:787 (1974)) を使用して、2つのアミノ酸配列の最高のスコアリング領域を整列させる。

【0078】

FASTA分析のためのパラメーターの例は次の通りである：ktup=1、ギャップオープンペナルティー=10、ギャップエクステンションペナルティー=1、および置換マトリックス=ブロサム (BLOSUM) 62。Pearson、Meth. Enzymol. 183:63 (1990) の付録2に説明されているように、スコアリングマトリックスファイル（「SMATRIX」）を変更することによって、これらのパラメーターをFASTAプログラムの中に導入することができる。

また、上に開示した比を使用して核酸分子の配列の同一性を決定するために、FASTAを使用することができる。ヌクレオチド配列を比較するために、ktup値は1

~6、好ましくは4~6の範囲であることができる。

【0079】

変異型zsig81ポリペプチドまたは実質的に同様な配列の同一性をもつポリペプチドは、1またはそれ以上のアミノ酸の置換、欠失または付加を有するとして特性決定される。これらの変化は好ましくは小さい特質を有する、すなわち、保存的アミノ酸置換（表4参照）およびポリペプチドのフォルディングまたは活性に影響を実質的に与えない他の置換；小さい欠失、典型的には1~約30アミノ酸の欠失；およびアミノ末端およびカルボキシル末端のエクステンション、例えば、アミノ末端のメチオニン残基、約20~25残基までの小さいリンカーペプチド、または親和標識を有する。

【0080】

こうして、本発明は、配列番号2の対応する領域に対して少なくとも70%~90%、そしてある態様において少なくとも95%の同一性を有する配列を構成する、約28~354アミノ酸残基のポリペプチドを包含する。特に、配列番号2に示すようにzsig81分子の領域に対応するペプチドおよびポリペプチドは、ヘリックスA（残基30~44）、ヘリックスB（残基56~70）、ヘリックスC（残基86~94を含んでなる）およびヘリックスD（残基135~149）を包含し、これらは本発明の範囲内に入る。さらに、親和標識からなるポリペプチドはzsig81ポリペプチドと親和標識との間にタンパク質分解切断部位を含むことができる。好ましいこのような部位はトロンピン切断部位および因子Xa切断部位を包含する。

【0081】

【表4】

表4

	保存的アミノ酸置換
塩基性：	アルギニン リジン 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
小型：	グリシン アラニン セリン スレオニン メチオニン

【0082】

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むことができる。天然に存在しないアミノ酸は、限定されずに、下記のを包含する：トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、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-スレオニ

ン、メチルスレオニン、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- および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、および4- フルオロフェニルアラニン。

【0083】

天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質の中に組込む、いくつかの方法はこの分野において知られている。例えば、化学的にアミノアシル化されたサプレッサーtRNAを使用してナンセンス突然変異を抑制する、in vitro系を使用することができる。アミノ酸を合成し、tRNAをアミノアシル化する方法はこの分野において知られている。大腸菌(E. coli) S30抽出物および商業的に入手可能な酵素および他の試薬からなる、無細胞系において、ナンセンス突然変異を含有するプラスミドの転写および翻訳は実施される。

【0084】

タンパク質をクロマトグラフィーにより精製する。例えば、下記の文献を参照のこと：Robertson他、J. Am. Chem. Soc. 113：2722（1991）；Ellman他、Methods Enzymol. 202：301（1991）；Chung他、Science 259：806 - 809（1993）；およびChung他、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90：10145（1993）。

【0085】

第2の方法において、突然変異したmRNAおよび化学的にアミノアシル化されたサプレッサーtRNAのマイクロインジェクションにより、キセノプス・オオサイト(Xenopus oocytes) 中で翻訳を実施する(Turcatti他、J. Biol. Chem. 271：19991（1996）)。第3の方法において、置換すべき天然のアミノ酸(例えば、フェニルアラニン)の非存在においてかつ所望の天然に存在しない1またはそれ以上のアミノ酸(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または4-フルオロフェニルアラニン)の存在において、大腸菌(E. coli)細胞を培養する。

【0086】

天然に存在しないアミノ酸をその天然の対応物の代わりにタンパク質の中に組込む。Koide他、Biochem. 33:7470 (1994) 参照。in vitro化学的修飾により、天然に存在するアミノ酸残基を天然に存在しない種に変換することができる。化学的修飾を部位特異的突然変異誘発と組合わせて、置換の範囲をさらに拡張することができる (WynnおよびRichards、Protein Sci. 2:395 (1993))。

制限された数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号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、および非天然のアミノ酸をzsig81アミノ酸残基と置換することができる。

【0087】

既知の突然変異誘発およびスクリーニングの方法、例えば、下記の文献に記載されている方法により、多数のアミノ酸の置換を行い、試験することができる：Reidhaar - OlsonおよびSauer、Science 241:53 (1988) またはBowieおよびSauer、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:2152 (1989)。簡単に述べると、これらの著者らは、ポリペプチド中の2またはそれ以上の位置を同時にランダム化し、機能的ポリペプチドについて選択し、次いで突然変異したポリペプチドを配列決定して、各位置において許容可能な置換のスペクトルを決定する方法を開示している。使用できる他の方法は、ファージディスプレイ (例えば、Lowman他、Biochem. 30:10832 (1991)) ; Ladner他、米国特許第5,223,409号 ; Huse、国際公開No.WO 92/06204号) および領域特異的突然変異誘発 (Derbyshire他、Gene 46:145 (1986) ; Ner他、DNA 7:127 (1988)) を包含する。

【0088】

開示されたzsig81ヌクレオチドおよびポリペプチド配列の変異型は、下記の文献に開示されているように、DNAシャフリングにより発生させることができる：Stemmer、Nature 370:389 (1994) ; Stemmer、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91:10747 (1994) ; および国際公開No.WO 97/20078号。簡単に述べると、親DNAのランダムフラグメント化によるin vitro相同組換えおよび引き続くPCRを使用するリアセンブリーによって、ランダムに導入された点突然変異を生成することによって、変異型DNAを発生させる。

【0089】

1ファミリーの親DNA、例えば、異なる種からの対立遺伝子変異型またはDNAを使用して、追加の変動性をこのプロセスに導入することによって、この技術を変更することができる。所望の活性についての選択またはスクリーニング、および引き続く突然変異誘発の追加の反復およびアッセイは、所望の突然変異体についての選択および同時の有害な変化に対する選択により、配列の急速な「進化」を提供する。

【0090】

本明細書において開示するような突然変異誘発法を、高い処理量の、自動化されたスクリーニング法と組合わせて、宿主細胞においてクローニングされ、突然変異化されたポリペプチドの活性を検出することができる。生物学的に活性なポリペプチド、または抗zsig81抗体と結合するポリペプチドをコードする突然変異化DNA分子を宿主細胞から回収し、そして現代的装置により急速に配列決定することができる。これらの方法は問題のポリペプチド中の個々のアミノ酸残基の重要性の急速な決定を可能とし、そして未知の構造のポリペプチドに適用することができる。

【0091】

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸は、この分野において知られている手順、例えば、部位特異的突然変異誘発またはアラニン走査突然変異誘発に従い同定することができる (CunninghamおよびWells、*Science* 244 : 1081 (1989)) ; Bass他、*Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 88 : 4498 (1991) 、CoomsおよびCorey、*Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineerings , Proteins : Analysis and Design* , Angeletti (編) 、 p. 259 - 311 (Academic Press , Inc. 1998)) 。後者の技術において、単一のアラニンの突然変異を分子中のすべての残基において導入し、そして、後述するように、生ずる突然変異体分子を生物学的活性について試験して、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。また、下記の文献を参照のこと : Hilton他、*J. Biol. Chem.* 271 : 4699 (1996) 。また、必須アミノ酸の同一性はzsig81との相同性の分析から推定可能である。

【0092】

zsig81レセプター結合性ドメインの位置は、構造の物理的解析により、例えば、核磁気共鳴、結晶学、電子回折またはフォトアフィニティー標識化のような技術と、推定上の接触部位のアミノ酸の突然変異との組み合わせにより決定されるように、同定することができる。例えば、下記の文献を参照のこと：de Vos他、Science 255：306（1992）、Smith他、J. Mol. Biol. 224：899（1992）、およびWlodaver他、FEBS Lett. 309：59（1992）。そのうえ、ビオチンまたはFITCで標識化されたzsig81をzsig81レセプターの発現クローニングのために使用することができる。

【0093】

本発明は、また、zsig81ポリペプチドの「機能的フラグメント」およびこ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。前述したように、zsig81は4ヘリックス束により特徴づけられる。こうして、本発明は、さらに、(a) 1またはそれ以上の前述の領域を含んでなるポリペプチド分子、および(b) 1またはそれ以上のドメインの部分を含んでなる生物学的に活性なフラグメントを包含する、融合タンパク質を提供する。他方のポリペプチドは、融合タンパク質の分泌を促進するための、他のサイトカイン、非自然および/または無関係の分泌シグナルペプチドからの他の領域であることができる。

【0094】

こうして、本明細書において記載するように、zsig81の機能的ドメインは、他の短い形態のサイトカインからのヘリックスループドメインを組み合わせる、キメラ融合タンパク質を製造するために有効である。このようなキメラは、使用する成分の領域により決定される特異性を有するであろう（Kallen他、前掲、1999）。キメラ分子は、他のサイトカインからの対応する領域と組み合わせて、zsig81からの分泌シグナル配列の1またはそれ以上のヘリックスを使用して製造することができる。

【0095】

核酸分子の日常的欠失分析を実施して、zsig81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ことができる。例示として、配列番号1のヌク

レオチド配列を有するDNA分子をBal31ヌクレアーゼで消化して、1系列のネステッド欠失を得ることができる。次いでフラグメントをベクターの中に適切なリーディングフレームで挿入し、発現されたポリペプチドを単離し、zsig81について、または抗zsig81抗体に結合する能力について試験する。エクソヌクレアーゼ消化に対する1つの別法は、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発を使用して欠失または停止コドンを導入して、所望のフラグメントの産生を特定することである。あるいは、zsig81遺伝子の特定のフラグメントをポリメラーゼ連鎖反応により合成することができる。

【0096】

機能的ドメインを同定する標準的方法はこの分野においてよく知られている。例えば、インターフェロンの一方または双方の末端におけるトランケーションについての研究は、HorisbergerおよびDi Marco、Pharmac. Ther. 66:507 (1995)において要約されている。そのうえ、タンパク質機能の分析の標準的技術は、例えば、下記の文献に記載されている：

【0097】

Treuter他、Mol. Gen. Genet. 240:113 (1993)、Content他、Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by hman interferon, Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantelli (編者)、pp. 65-72 (Nijhoff 1987)、Herschman、The EGF Receptor, Control of Animal Cell Proliferation, Vol. 1, Boynton他、(編者)、pp. 169-199 (Academic Press 1985)、Coumilleau他、J. Biol. Chem. 270:29270 (1995) ; Fukunaga他、J. Biol. Chem. 270:25291 (1995) ; Yamaguchi他、Biochem. Pharmacol. 50:1295 (1995)、およびMeisel他、Plant Molec. Biol. 30:1 (1996)。

【0098】

本発明は、また、配列番号2のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸変化を有するzsig81遺伝子の機能的フラグメントを包含する。変異型zsig81遺伝子は、前述したように、配列番号1および2のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列との同一

性のレベルを決定することによって、構造に基づいて同定することができる。構造に基づいて変異型を同定する別のアプローチは、潜在変異型zsig81遺伝子をコードする核酸分子が、前述したように、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ゼーションすることができるかどうかを決定することである。

【0099】

zsig81ポリペプチドにおいてアミノ酸配列を変化させて、生物学的活性に対して必須である高次構造の崩壊を最小にする。例えば、zsig81ポリペプチドが1またはそれ以上のヘリックスを含んでなるとき、タンパク質ファミリーのループ長さおよびコンフォメーション特性を崩壊しないように、アミノ酸残基を変化させる。アミノ酸配列の変化の効果は、例えば、前述したようにコンピューターモデル化により予測するか、あるいは結晶構造の解析により決定することができる（例えば、Lapthorn他、前掲、参照）。

【0100】

変異型タンパク質またはポリペプチドのフォルディングに影響を与える構造的特徴を分析し、標準的分子と比較して、このような修飾が有意であるかどうか決定するために、独立にまたは組合わせて使用できる他の技術はこの分野においてよく知られている。例えば、変異型および標準的分子においてシステインパターンを比較することができる。質量分析および還元およびアルキル化を使用する化学的修飾は、ジサルファイド結合に関連するか、あるいはこのような関連を含まないシステイン残基を決定する方法を提供する（Bean他、Anal. Biochem. 201 : 216 - 226、1992 ; Gray、Protein Sci. 2 : 1732 - 1748、1993 ; およびPatterson他、Anal. Chem. 66 : 3727 - 3732、1994）。

【0101】

一般に、修飾された分子が標準的分子と同一のシステインパターンをもたない場合、フォルディングに影響を受けると考えられる。フォルディングを測定する他のよく知られておりかつ受け入れられている方法は円偏光二色性（CD）である。修飾された分子および標準的分子が発生したCDスペクトルを測定し、比較することは日常的方法であろう（Johnson、Proteins 7 : 205 - 214、1990）。結晶学

はフォルディングおよび構造を分析する他のよく知られておりかつ受け入れられている方法である。核磁気共鳴 (NMR)、消化的ペプチドマッピングおよびエピトープマッピングは、タンパク質およびポリペプチド間のフォルディングおよび構造的類似性を分析する他の既知の方法である (Schaanan他、Science 257: 961 - 964、1992)。

【0102】

配列番号2に示すようなzsig81タンパク質配列のホップ/ウッズ (Hopp/Woods) 親水性プロファイルを発生させることができる (Hopp他、Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3824 - 3828、1981; Hopp、J. Immunol. Meth. 88: 1 - 18、1986、およびTriquier他、Protein Engineering 11: 153 - 169、1998)。このプロファイルは滑り6残基ウィンドウに基づく。埋もれたG、SおよびT残基および露出したH、YおよびW残基を無視する。親水性を使用して、最も抗原性の潜在的な能力を有する領域を決定する。例えば、zsig81において、親水性領域は配列番号2のアミノ酸残基101~107、配列番号2のアミノ酸残基57~62、配列番号2のアミノ酸残基17~22、配列番号2のアミノ酸残基16~21、および配列番号2のアミノ酸残基100~105を含む。

【0103】

zsig81ポリペプチドにおいてアミノ酸配列を変化させて、生物学的活性に対して必須である高次構造の崩壊を最小にする。例えば、タンパク質ファミリーのヘリックス束特性を崩壊しないように、アミノ酸残基を変化させる。二次および三次構造に対する一次配列における修飾の効果を分析する方法を本明細書に開示する。当業者は認識するように、全体のプロファイルを崩壊しないように、zsig81ポリペプチドのアミノ酸配列の変更を消化するとき、親水性を考慮する。

【0104】

4ヘリックス束のコア内の残基を配列番号6、7、8、および9に示す残基と置換することができる。Val、LeuおよびIleから成るグループまたはMet、Gly、Ser、Ala、TyrおよびTrpから成るグループから選択される疎水性残基は置換のために重要である。配列番号2の位置2および76におけるシステイン残基、および4ヘリックス束の暴露された表面上に存在することが予測される残基は、置換に比較的

不耐性であろう。

【0105】

本発明のポリペプチドは、配列番号2の少なくとも6、好ましくは少なくとも9、より好ましくは少なくとも15隣接アミノ酸残基を含んでなる。本発明のある態様において、ポリペプチドは配列番号2の20、30、40、50、100、または100、またはそれより多い隣接残基、成熟ポリペプチドの全体まで（配列番号2の残基1～156）または一次翻訳産物（配列番号2の残基 - 17～156）を含んでなる。下記においていっそう詳細に説明するように、これらのポリペプチドは1またはそれ以上の追加の、非zsig81ポリペプチド配列を含んでなることができる。

【0106】

配列番号2に示すタンパク質のエピトープ支持部分を含んでなるポリペプチドは、本発明のポリペプチドの範囲内に入る。「エピトープ」は抗体が結合できるタンパク質の領域である。例えば、下記の文献を参照のこと：Geysen他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81：3998 - 4002、1984。エピトープは線状またはコンフォメーション的であり、後者はタンパク質のフォルディングするときエピトープを形成するタンパク質の不連続領域から構成されている。線状エピトープは一般に少なくとも6アミノ酸残基長さである。

【0107】

タンパク質配列の一部を模擬する、比較的短い合成ペプチドは、部分的に模擬されたタンパク質と反応する抗血清を日常的に誘発するすることができる。Sutcliffe他、Science 219：660 - 666、1983参照。短い、線状エピトープを認識する抗体は、変性タンパク質を使用する分析および診断の応用、例えば、ウェスタンブロットティング（Tobin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76：4350 - 4356、1979）において、あるいは固定した細胞または組織の試料の分析において特に有効である。また、線状エピトープに対する抗体はzsig81のフラグメント、例えば、体液または細胞培養培地において存在するようなフラグメントを検出するために有効である。

【0108】

本発明の抗原性、エピトープ支持ポリペプチドは、zsig81タンパク質に特異的

に結合する抗体、例えば、モノクローナル抗体を発生させるために有効である。抗原性、エピトープ支持ポリペプチドは、zsig81タンパク質の少なくとも6、好ましくは少なくとも9、より好ましくは15～約30隣接アミノ酸残基の配列（例えば、配列番号2）を含有する。zsig81タンパク質の大きい部分、すなわち、30～50から全静止状態までの部分を含んでなるポリペプチドが包含される。エピトープ支持ポリペプチドのアミノ酸配列は水性溶媒中で実質的な溶解度を提供するように選択する、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実質的に回避される。好ましいこのような領域は配列番号2の残基16～21、17～22、57～62、100～105および101～107を含む。

【0109】

本明細書に論ずる方法を使用して、当業者は、配列番号2の残基 - 17～156または1～156、またはその機能的フラグメント、例えば、配列番号2残基5～156、およびそれらの融合物に対して実質的に同様な配列の同一性を有し、かつ野生型タンパク質の特性、例えば、増殖、分化を刺激しまたは特殊化した細胞機能を誘導する能力を保持する種々のポリペプチドを同定および/または製造することができる。

【0110】

変異型zsig81遺伝子の特定のヌクレオチド配列を無視して、この配列は増殖または分化活性、または特殊化された細胞機能を誘導する能力により、あるいはzsig81レセプターに結合する抗zsig81抗体またはアンタゴニストに特異的に結合する能力により、特性決定されるポリペプチドをコードする。さらに詳しくは、変異型zsig81遺伝子は、本明細書に記載するヒトzsig81遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性の少なくとも50%、好ましくは70、80または90%より大きい活性を示すポリペプチドをコードする。

【0111】

変異型および融合タンパク質を包含する、任意のzsig81ポリペプチドについて、当業者は、上記表1および2に記載する情報を使用して、その変異型をコードする、完全に縮重のポリヌクレオチド配列を容易に発生させることができる。本発明は、さらに、種々の他のポリペプチド融合物（および1またはそれ以上のポ

リペプチド融合物からなる関係するマルチマータンパク質)を提供する。例えば、zsig81ポリペプチドは、米国特許第5,155,027号および米国特許第5,567,584号に開示されているように、二量化性タンパク質に対する融合物として製造することができる。

【0112】

これに関して好ましい二量化性タンパク質は、免疫グロブリン定常領域ドメインを含む。遺伝子操作された細胞において免疫グロブリン-zsig81ポリペプチド融合物を発現させることができる(種々のマルチマーzsig81アナログを産生する)。補助的ドメインをzsig81ポリペプチドに融合させて、これらのポリペプチドを特異的細胞、組織、または高分子(例えば、コラーゲン)にターゲティングすることができる。例えば、zsig81ポリペプチドまたはタンパク質は、ターゲット細胞表面上のレセプターに特異的に結合するリガンドにzsig81ポリペプチドを融合させることによって、前もって決定した細胞にターゲティングすることができるか、あるいは特定のターゲット細胞型上で発現された抗原に対して向けられた抗体に融合させることができるであろう。

【0113】

このようにして、ポリペプチドおよびタンパク質を治療または診断の目的でターゲティングすることができる。zsig81ポリペプチドを2またはそれ以上の部分、例えば、精製のための親和標識およびターゲティングドメインに融合させることができる。ポリペプチド融合物は、また、1またはそれ以上の切断部位、特にドメインの間の切断部位を含むことができる。Tuan他、Connective Tissue Research 34:1-9、1996参照。

【0114】

全長のポリペプチド、それらの活性なフラグメントおよび融合タンパク質を包含する、本発明のポリペプチドを、慣用の技術に従い、遺伝子操作された宿主細胞において製造することができる。適当な宿主細胞は、外因的DNAで形質転換またはトランスフェクトすることができ、培養により増殖させることができる細胞の型であり、そして細菌、真菌細胞、および培養された高等真核細胞を包含する。真核細胞、特に多細胞の微生物の培養された細胞は好ましい。クローニングさ

れたDNA分子を操作し、外因的DNAを種々の宿主細胞の中に導入する技術は、下記の文献に記載されている：Sambrook他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989、およびAusubel他編、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons, Inc.、NY、1987。

【0115】

一般に、zsig81ポリペプチドをコードするDNA配列は、発現ベクター内に一般に転写プロモーターおよびターミネーターを包含する、その発現のための必要な他の遺伝因子に、作用可能に連鎖される。ベクターは、また、1またはそれ以上の選択可能なマーカーおよび1またはそれ以上の複製起点を普通に含有するが、当業者は認識するように、ある種の系内で選択可能なマーカーを別々のベクター上に提供し、そして宿主細胞のゲノムの中への組込みにより外因的DNAの複製を得ることができる。プロモーター、ターミネーター、選択可能なマーカー、ベクターおよび他の因子の選択は、当業者のレベル内の日常的設計事項である。多数のこのような因子は文献に記載されており、そして商業的供給会社から入手可能である。

【0116】

zsig81ポリペプチドを宿主細胞の分泌経路の中に向けるために、分泌シグナル配列（また、リーダー配列、プレプロ配列または前配列として知られている）を発現ベクターの中に準備する。分泌シグナル配列はzsig81のそれであることができるか、あるいは他の分泌されたタンパク質（例えば、t-PA）から誘導するか、あるいは新規に合成することができる。

【0117】

分泌シグナル配列をzsig81 DNA配列に作用可能に連鎖して、すなわち、2つの配列を正しいリーディングフレームで結合して、新しく合成されたポリペプチドを宿主細胞の分泌経路の中に向けるように位置させる。分泌シグナル配列は普通に問題のポリペプチドをコードするDNA配列に対して5'に配置されるが、ある種の分泌シグナル配列は問題のDNA配列の中のどこかに位置決定することができる（例えば、Welch他、米国特許第5,037,743号；Holland他、米国特許第5,143,830

号、参照)。

【0118】

また、本発明のポリペプチドの中に含有される分泌シグナル配列を使用して、他のポリペプチドを分泌経路の中に向けることができる。本発明は、このような融合ポリペプチドを提供する。配列番号2のアミノ酸残基 - 17~1から誘導された分泌シグナル配列が他のポリペプチドをコードするDNA配列に作用可能に連鎖された、シグナル融合ポリペプチドを、この分野において知られておりかつ本明細書に開示されている方法により、作ることができる。

【0119】

好ましくは、本発明の融合ポリペプチドの中に含有される分泌シグナル配列を追加のペプチドに対してアミノ末端的に融合させて、追加のペプチドを分泌経路の中に向ける。このような構築物はこの分野において知られている多数の用途を有する。例えば、これらの新規な分泌シグナル配列の融合構築物は、例えば、常態で分泌されないタンパク質の活性成分、例えば、レセプターの分泌を指令することができる。このような融合物を *in vivo* または *in vitro* において使用して、ペプチドを分泌経路を通して向けることができる。

【0120】

培養された哺乳動物細胞は、本発明において適当な宿主である。外因的DNAを哺乳動物の宿主細胞の中に導入する方法は下記の方法を包含する：リン酸カルシウム仲介トランスフェクション (Wigler他、Cell 14:725、1978; CorsaroおよびPearson、Somatic Cell Genetics 7:603、1981; GrahamおよびVan der Eb、Virology 52:456、1973)、エレクトロポレーション (Neumann他、EMBO J. 1:841-845、1982)、DEAE-デキストリン仲介トランスフェクション (Ausubel他、*ibid.*)、およびリポソーム仲介トランスフェクション (Hawley-Nelson他、Focus 15:73、1993; Ciccarone他、Focus 15:80、1993)、およびウイルスベクター (MillerおよびRosman、BioTechniques 7:980-90、1989; WangおよびFiner、Nature Med. 2:714-716、1996)。

【0121】

培養された哺乳動物細胞における組換えポリペプチドの産生は、例えば、下記

の特許文献に記載されている：Levinson他、米国特許第4,713,339号；Hagen他、米国特許第4,784,950号；Palmiter他、米国特許第4,579,821号；およびRingold、米国特許第4,656,134号。適当な培養された哺乳動物細胞は下記のを包含する：COS - 1 (ATCC No. CRL 1650)、COS - 7 (ATCC No. CRL 1651)、BHK (ATCC No. CRL 1632)、BHK570 (ATCC No. CRL 10314)、293 (ATCC No. CRL 1573；Graham他、J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) およびチャイニーズハムスター卵巣（例えば、CHO - K1；ATCC No. CRL 61）細胞系統。

【0122】

追加の適当な細胞系統はこの分野において知られており、そして公衆の寄託機関、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) (マリランド州ロックビル) から入手可能である。一般に、強い転写プロモーター、例えば、SV - 40またはサイトメガロウイルスからのプロモーターは好ましい。例えば、米国特許第4,956,288号参照。他の適当なプロモーターは、メタロチオネイン遺伝子からプロモーター (米国特許第4,579,821号および米国特許第4,601,978号) およびアデノウイルスの主要な後期プロモーターを包含する。

【0123】

薬剤選択を一般に使用して、外来DNAが挿入された、培養された哺乳動物細胞について選択する。このような細胞は普通に「トランスフェクタント」と呼ばれる。選択因子の存在において培養され、問題の遺伝子をそれらの子孫に移行させることができる細胞は、「安定なトランスフェクタント」と呼ばれる。好ましい選択可能なマーカーは、抗生物質のネオマイシンに対する耐性をコードする遺伝子である。選択はネオマイシン型薬剤、例えば、G - 418またはその他の存在において実施される。また、選択系を使用して、問題の遺伝子の発現レベルを増加することができる、「増幅」と呼ぶ方法。

【0124】

低いレベルの選択因子の存在においてトランスフェクタントを培養し、次いで選択因子の量を増加して、導入された遺伝子の産物を高いレベルで産生する細胞について選択することによって、増幅は実施される。好ましい増幅可能な選択可

能なマーカーは、メトトレキセートに対する耐性を付与する、ジヒドロフォレートリダクターゼである。他の薬剤耐性遺伝子（例えば、ヒグロマイシン耐性、多薬剤耐性、プロマイシンアセチルトランスフェラーゼ）を使用することもできる。FACSソーティングまたは磁気ビーズ分離技術のような手段により、変更された表現型を導入するオールタネイティブマーカー、例えば、緑色蛍光タンパク質、または細胞表面のタンパク質、例えば、CD4、CD8、クラスIのMHC、胎盤アルカリ性ホスファターゼを使用して、非トランスフェクト細胞からトランスフェクトされた細胞を選別することができる。

【0125】

植物細胞、昆虫細胞およびトリの細胞を包含する、他の高等真核細胞を宿主細胞として使用することもできる。植物細胞中で遺伝子を発現するためのベクターとしてアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) を使用することは、Sinkar他、J. Biosci. (Bangalore) 11: 47 - 58、1987、において概観されている。昆虫細胞の形質転換およびその中の外来ポリペプチドの産生は、Guarino他、米国特許第5,162,222号およびWIPO公開WO 94/06463号に記載されている。オートグラファト・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) から普通に誘導される、組換えバキュロウイルスで、昆虫細胞を感染させることができる。

【0126】

2つの方法の1つにより、zsig81ポリペプチドをコードするDNAをAcNPVポリヘドリン遺伝子のコーディング配列の代わりに、バキュロウイルスのゲノムの中に挿入する。第1は、野生型AcNPVとAcNPV配列によりフランクされたzsig81を含有する転移ベクターとの間の相動的DNA組換えの伝統的方法である。適当な昆虫細胞、例えば、SF9細胞を野生型AcNPVで感染させ、そしてAcNPVポリヘドリン遺伝子プロモーター、ターミネーター、およびフランキング配列に作用可能に連鎖されたzsig81ポリペプチドからなる転移ベクターでトランスフェクトする。

【0127】

下記の文献を参照のこと：King, L. A. およびPossee, R. D. The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, London, Chapman & Ha

II、O'Reilly、D. R.他、Baculovirus Expression Vectors : A Laboratory Manual、New York、Oxford University Press、1994 ; およびRichardson、C. D. 編、Baculovirus Expression Protocols、Methods in Molecular Biology、Totowa、NJ、Humana Press、1995。昆虫細胞内の自然の組換えは、ポリヘドリンプロモーターにより推進されたzsig81を含有する組換えバキュロウイルスを生ずるであろう。組換えウイルスの系統は、この分野において普通に使用されている方法により作られる。

【0128】

組換えバキュロウイルスを作る第2の方法は、Luckowが記載するトランスポゾンベースとする系を利用する(Luckow、V. A.、他、J. Virol. 67 : 4566 - 79、1993)。この系はBac - to - Bacキット(Life Technologies、マリイランド州ロックビレ)で販売されている。この系は転移ベクター、pFastBac1TM(Life Technologies)を利用し、ここでpFastBac1TMは「バクミド(bacmid)」と呼ばれる大きいプラスミドとして大腸菌(E. coli)の中に維持されたバキュロウイルスのゲノムの中にzsig81ポリペプチドをコードするDNAを動かすために、Tn7トランスポゾン含有する。

【0129】

pFastBac1TM転移ベクターは、AcNPVポリヘドリンプロモーターを利用して、問題の遺伝子、この場合においてzsig81、の発現を推進する。しかしながら、pFastBac1TMはかなりの程度に修飾可能である。ポリヘドリンプロモーターを除去し、バキュロウイルスをベースとするタンパク質プロモーター(また、Pcor、p6.9またはMPプロモーターとして知られている)で置換し、ここでこのプロモーターは以前にバキュロウイルスの感染において発現され、そして分泌されたタンパク質の発現に好都合であることが示されている。下記の文献を参照のこと : Hill - Perkins、M. S. およびPossee、R. D.、J. Gen. Virol. 71 : 971 - 6、1990 ; Bonning、B. C.、他、J. Gen. Virol. 75 : 1551 - 6、1994 ; および、Chazenbalk、G. D.、およびRapoport、B.、J. Biol. Chem. 270 : 1543 - 9、1995。

【0130】

このような転移ベクター構築物において、基本的タンパク質プロモーターの短いまたは長いバージョンを使用することができる。そのうえ、自然zsig81分泌シグナル配列を昆虫タンパク質から誘導された分泌シグナル配列で置換する、転移ベクターを構築することができる。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)、蜜蜂のメリチン (Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)、またはバキュロウイルスgp67 (PharMingen、カリフォルニア州サンディエゴ) からの分泌シグナル配列を構築物において使用して、自然zsig81分泌シグナル配列を置換することができる。

【0131】

さらに、転移ベクターは、発現されたzsig81ポリペプチドのC末端またはN末端におけるエピトープ標識、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物を含むことができる (Grussenmeyer、T.、他、Proc. Natl. Acad. Sci. 82 : 7952 - 4、1985)。

【0132】

この分野において知られている技術を使用して、zsig81を含有する転移ベクターを大腸菌 (*E. coli*) の中に形質転換し、そして組換えバキュロウイルスを示す中断されたlacZ遺伝子を含有するバクミドについてスクリーニングする。組換えバキュロウイルスのゲノムを含有するバクミドDNAを普通の技術に従い単離し、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。zsig81を発現する組換えベクターを引き続いて生成させる。この分野において普通に使用されている方法により、組換えウイルスの系統を作る。

【0133】

宿主細胞、典型的にはヨトウガ、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) から誘導された細胞系統を感染させるために、組換えウイルスを使用する。一般に、下記の文献を参照のこと : GlickおよびPasternak、Molecular Biotechnology : Principle and Applications of Recombinant DNA、ASM Press、Washington、D. C.、1994。他の適当な細胞系統は、トリコデルマ・ニ (*Trichoderma ni*) から誘導されたHigh FiveTM細胞系統 (Invitrogen) で

ある（米国特許第5,300,435号）。商業的に入手可能な無血清培地を使用して、細胞を増殖させかつ維持する。

【0134】

適当な培地はSf9細胞についてSf900 IITM (Life Technologies) またはESF 921TM (Expression System) ; およびトリコデルマ・ニ (T.ni) 細胞についてEx - cell10450TM (JRH Bioscience、カンサス州レネクサ) またはExpress Five0TM (Life Technologies) である。細胞をほぼ $2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞の接種密度から $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞の密度に増殖させ、この時組換えウイルスの系統を0.1~10、より典型的には約3の感染の多重度で添加する。組換えウイルスが感染した細胞は典型的には感染後12~72時間で組換えzsig81ポリペプチドを産生し、そしてそれを変化する効率で培地の中に分泌する。

【0135】

培養物を通常感染後48時間に収集する。遠心を使用して培地（上清）から細胞を分離する。zsig81ポリペプチドを含有する上清を、微小孔フィルター、通常0.45 μm の孔大きさのフィルターを通して濾過する。使用する手順は一般に入手可能な実験室のマニュアルに記載されている（King、L. A. およびPossee、R. D.、前掲；O'Reilly、D. R.、他、前掲；Richardson、C. D.、前掲）。本明細書に記載する方法に従い、上清からのzsig81ポリペプチドの引き続く精製を実施することができる。

【0136】

酵母細胞を包含する真菌細胞を本発明において使用することもできる。これに関して特に興味ある酵母種は、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae)、ピキア・パストリス (Pichia pastoris)、およびピキア・メタノリカ (Pichia metanolica) を包含する。外因的DNAでサッカロミセス・セレビスエ (S. cerevisiae) を形質転換し、それから組換えポリペプチドを生産する方法は、例えば、下記の特許文献に記載されている：Kawasaki、米国特許第4,599,311号；Kawasaki他、米国特許第4,931,373号；Brake、米国特許第4,870,008号；Welch他、米国特許第5,037,743号；およびMurry他、米国特許第4,845,075号。

。

【0137】

選択可能なマーカーにより決定された表現型、普通の薬剤耐性または特定の栄養（例えば、ロイシン）の非存在において増殖する能力により、形質転換された細胞を選択する。サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) において使用するために好ましいベクター系は、Kawasaki他（米国特許第4,931,373号）により開示されているPOT1ベクター系であり、これによりグルコースを含有する培地中の増殖により形質転換細胞を選択することができる。酵母において使用するために適当なプロモーターおよびターミネーターは、解糖酵素遺伝子（例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号；Ingsman他、米国特許第4,615,974号；およびBitter、米国特許第4,977,092号、参照）およ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。

【0138】

また、米国特許第4,990,446号；米国特許第5,063,154号；米国特許第5,139,936号および米国特許第4,661,454号、参照。ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロマイセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、クルイベロマイセス・フラギリス (*Kluyveromyces fragilis*)、ウスチラゴ・マイディス (*Ustilago maydis*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピキア・メタノリカ (*Pichia metanolica*)、ピキア・グイレルモンディイ (*Pichia guillermoidii*) およびカンジダ・マルトサ (*Candida maltosa*) を包含する、他の酵母のための形質転換系はこの分野において知られている。

【0139】

例えば、Gleeson他、J. Gen. Microbiol. 132:3459-3465、1986およびCregg、米国特許第4,882,279号、参照。McKnight他、米国特許第4,935,349号の方法に従い、アスペルギルス (*Aspergillus*) 細胞を利用することができる。アクレモニウム・クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum*) は、Sumino他、米国特許第5,162,228号に開示されている。ニューロスポラ (*Neurospora*) を形質転換する方法は、Lambowitz、米国特許第4,486,533号に開示されている。

【0140】

組換えタンパク質の生産のための宿主としてピキア・メタノリカ (*Pichia metanolica*) を使用することは、WIPO公開WO 97/17450号、WO 97/17451号、WO 98/02536号、およびWO98/02565号に開示されている。ピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) の形質転換において使用するDNA分子は二本鎖、円形のプラスミドとして普通に製造され、これらは好ましくは形質転換の前に線状化される。ピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) におけるタンパク質の生産のために、プラスミド中のプロモーターおよびターミネーターはピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) の遺伝子、例えば、ピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) のアルコール利用遺伝子 (AUG1またはAUG2) のそれであることが好ましい。

【0141】

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)、ホルメートデヒドロゲナーゼ (FMD)、およびカタラーゼ (CAT) 遺伝子のプロモーターを包含する。宿主染色体の中へのDNAの組込みを促進するために、宿主DNA配列により双方の末端においてフランクされたプラスミドの全体の発現セグメントを有することが好ましい。ピキア・メタノリカ (*Pichia metanolica*) において使用するために好ましい選択可能なマーカーはピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) のADE2遺伝子であり、これはホスホリボシル-5-アミノイミダゾールカルボキシラーゼ (AIRC; EC4.1.1.21) をコードし、これはアデニンの非存在においてade2宿主細胞を増殖させる。

【0142】

メタノールの使用を最小としようとする、大規模の工業的方法のために、双方のメタノール利用遺伝子 (AUG1およびAUG2) 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産のために、液胞プロテアーゼ遺伝子 (PEP4およびPRB1) を欠如する宿主細胞は好ましい。問題のポリペプチドをコードするDNAを含有するプラスミドをピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) 細胞の中に導入することを促進するために、エレクトロポレーションを使用する。2.5~4.5kV/cm、好ましくは約3.75kV/cmの電界強度を有する、指数的に減衰する、パルス電界、および1~40ミリセカント、最も好ましくは約20ミリセカントの時間定数 () を使用する、エレクトロポレーションにより、ピキア・メ

タノリカ (*P. metanolica*) 細胞を形質転換することが好ましい。

【0143】

細菌大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシラス (*Bacillus*) および他の属の株を包含する、原核宿主細胞は、また、本発明において有用である。これらの宿主を発現し、その中にクローニングされた外来DNA配列を発現する技術はこの分野においてよく知られている (例えば、Sambrook他、前掲、参照)。大腸菌 (*E. coli*) のような細菌においてzsig81ポリペプチドを発現させるとき、ポリペプチドを、典型的には不溶性粒子として、細胞質の中に保持させることができるか、あるいは細菌の分泌配列によりペリプラスミック空間の中に向けることができる。前者の場合において、細胞を溶解し、粒子を回収し、例えば、グアニジンイソチオシアネートまたは尿素を使用して、変性する。

【0144】

次いで変性されたポリペプチドをリフォルディングさせ、変性物の希釈により、例えば、尿素の溶液および還元されたグルタチオンおよび酸化されたグルタチオンとの組み合わせに対する透析、および引き続き緩衝化生理食塩水に対する透析により、二量体化させることができる。後者の場合において、細胞を崩壊させて (例えば、超音波処理または浸透圧ショックにより) ペリプラスミック空間の内容物を解放し、これにより変性およびリフォルディングの必要性を排除することによって、ポリペプチドをペリプラスミック空間から可溶性の、機能的形態で回収することができる。

【0145】

形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を、慣用手順に従い、栄養素および選択した宿主細胞の成長に必要な他の成分を含有する培地中で培養する。規定された培地および複合培地を包含する、種々の適当な培地は、この分野において知られており、そして一般に炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミンおよび無機質を含む。培地は、また、必要に応じて、成長因子または血清のような成分を含有することができる。一般に、外因的に添加されたDNAを含有する細胞について成長培地を選択する。この選択は、例えば、薬剤選択または必須栄養素の欠如により実施され、必須栄養素は発現ベクター上に担体されるか、あるいは宿

主細胞の中に共トランスフェクトされた選択可能なマーカーにより補足される。

【0146】

炭素、窒素および微量栄養素の適切な源を含む培地中で約25 ~ 35 の温度において、ピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) 細胞を培養する。慣用の手段、例えば、小さいフラスコの震盪または発酵槽のスパージにより、液体培地を十分にエアレーションする。ピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) のために好ましい培地は、YEPD (2%のD - グルコース、2%のBacto™ペプトン (Difco Laboratories、ミシガン州デトロイト)、1%のBacto™酵母エキス (Difco Laboratories)、0.004%のアデニンおよび0.006%のL - ロイシン) である。

【0147】

分画および/または慣用の精製方法および培地を使用して、発現された組換え zsig81ポリペプチド (またはキメラ zsig81ポリペプチド) を精製することができる。試料の分画のために、硫酸アンモニウム沈降および酸またはカオトロブ抽出を使用することができる。典型的な精製工程は、ヒドロキシアパタイト、サイズ排除クロマトグラフィー、FPLCおよび逆相高性能液体クロマトグラフィーを包含することができる。適当なクロマトグラフィーの媒質は、誘導化デキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特製のシリカ、およびその他を包含する。

【0148】

PEI、DEAE、QAEおよびQ誘導体は好ましい。典型的なクロマトグラフィー媒質は、フェニル、ブチル、またはオクチル基で誘導化された媒質、例えば、フェニル - セファローズFF (Pharmacia)、トヨパールブチル650 (Toso Haas、ペンシルベニア州モントゴメリヴィレ)、オクチル - セファローズ (Pharmacia) およびその他; またはポリアクリル樹脂、例えば、Amberchrom CG 71 (Toso Haas) およびその他を包含する。適当な固体支持体は、ガラスビーズ、シリカをベースとする樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、架橋アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋ポリアクリルアミド樹脂、およびその他を包含し、これらはこれらを使用する条件下に不溶性である。

【0149】

これらの支持体は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基および/または炭水化物部分によるタンパク質の結合を可能とする反応性基で修飾することができる。化学的カップリングの例は、臭化シアンの活性化、N-ヒドロキシスクシンイミドの活性化、エポキシドの活性化、スルフヒドリルの活性化、ヒドラジドの活性化、およびカーボジイミドの化学的カップリングのためのカルボキシルおよびアミノ誘導体を包含する。

【0150】

これらおよび他の固体の媒質はこの分野においてよく知られており、かつ広く使用されており、そして商業的供給会社から入手可能である。レセプターのポリペプチドを固体の媒質に結合する方法は、この分野においてよく知られている。特定の方法の選択は日常的設計事項であり、そして一部分選択した支持体の性質により決定される。例えば、Affinity Chromatography: Principle & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology、スイス国ウツサラ、1988、参照。

【0151】

本発明のポリペプチドは、特定の性質を利用することによって、単離することができる。例えば、固定化金属イオン吸着 (IMAC) クロマトグラフィーを使用して、ポリヒスチジン標識からなるものを包含する、ヒスチジンに富んだタンパク質を精製することができる。簡単に述べると、ゲルにまず2価の金属イオンを負荷してキレート化剤を形成する (Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1-7、1985)。他の精製法は、レクチンアフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによるグリコシル化タンパク質の精製を包含する (Methods in Enzymol., Vol.182, Guide to Protein Purification, M. Deutscher (編)、Academic Press、サンディエゴ、1990、pp. 529-39)。

【0152】

本発明の追加の態様の範囲内において、問題のポリペプチドと親和標識 (例えば、マルトース結合タンパク質、免疫グロブリンドメイン) との融合物を構築して、精製を促進することができる。zsig81はCTGFについて以前に記載されたヘパリン結合ドメインと相同性のドメインを有し、そしてこの性質はzsig81の精製に有効であることがある。概観については、下記の文献を参照のこと: Burgess他

、Ann.Rev. of Biochem. 58 : 575 - 606、1989。

【0153】

ヘパリン結合性ドメインをまた有する、FGFファミリーのメンバーは、ヘパリン - セファローズアフィニティークロマトグラフィー (Gospodarowicz他、Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 6963 - 6967、1984) およびNaClを使用する直線段階を使用する溶離により見掛けの均質性に精製することができる (Ron他、J. Biol. Chem. 268 (4) : 2984 - 2988、1993 ; Chromatography : Principles & Methods、pp. 77 - 80、Pharmacia LKB Biotechnology、Uppsala、Sweden、1993 ; Immobilized Affinity Ligand Techniques、Hermanson他、編、pp. 165 - 167、Academic Press、San Diego、1992 ; Kjellen他、Ann. Rev. Biochem. Ann. Rev. Biochem. 60 : 443 - 474、1991 ; およびKe他、Protein Expr. Purif. 3 (6) : 497 - 507、1992)。

【0154】

タンパク質のリフォルディング (および、必要に応じて、再酸化) 手順を好都合に使用することができる。タンパク質を > 80% の純度、より好ましくは > 90% の純度、なおより好ましくは > 95% の純度に精製することが好ましく、そして特に好ましくはタンパク質は薬学的に純粋な形態である、すなわち、汚染する高分子、特に他のタンパク質および核酸に関して99.9%より高い純度であり、そして感染因子または発熱因子を含有しない。好ましくは、精製されたタンパク質は他のタンパク質、特に動物由来の他のタンパク質を実質的に含まない。

【0155】

zsig81ポリペプチドまたはそのフラグメントを、また、化学的合成により製造することができる (Merrifield、J. Amer. Chem. Soc. 85 : 2149、1963) 。 zsig81ポリペプチドは、モノマーまたはマルチマーであり、グリコシル化されているか、あるいはされていないことができ、ペキル化 (pegylate) されているか、あるいはされていないことができ、そして初期のメチオニンアミノ酸残基を含むか、あるいは含まないことができる。

【0156】

本発明の分子の活性は、細胞の増殖、分化、化学走性または特殊化された細胞

機能の誘導を測定する種々のアッセイにより測定することができる。細胞、特に心臓または肝臓の組織から単離された細胞の増殖または分化は特に重要である。増殖または分化は、in vitroにおいて培養した細胞を使用するか、あるいはin vivoにおいて請求の範囲に記載する本発明の分子を適当な動物モデルに投与することによって、測定することができる。細胞の増殖または分化を測定するアッセイはこの分野においてよく知られている。

【0157】

例えば、増殖を測定するアッセイは下記のアッセイを包含する：中性赤色素に対する化学的感受性（Cavanaugh他、Investigation New Drug 8：347 - 354、1990、引用することによって本明細書の一部とされる）、放射能標識化ヌクレオチドの組み込み（Cook他、Analyt. Biochem. 179：1 - 7、1989、引用することによって本明細書の一部とされる）、増殖する細胞のDNAの中への5 - ブロモ - 2' - デオキシウリジン（BrdU）の組み込み（Porstmann他、J. Immunol. Methods 82：169 - 179、1985、引用することによって本明細書の一部とされる）、およびテトラゾリウム塩の使用（Mosmann、J. Immunol. Methods 65：55 - 63、1983；Alley他、Cancer Res. 48：589 - 601、1988；Marchall他、Growth Reg. 5：69 - 84、1995；およびScudiero他、Cancer Res. 48：4827 - 4833、1988；すべては引用することによって本明細書の一部とされる）。

【0158】

分化を測定するアッセイは、例えば、組織の段階特異的発現に関連する表面マーカー、酵素活性、機能的活性または形態学的変化を測定することを包含する（Watt、FASEB、5：281 - 284、1991；Francis、Differentiation 57：63 - 75、1994；Raes、Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses、161 - 171、1989；すべては引用することによって本明細書の一部とされる）。特殊化された細胞機能の誘導を測定するアッセイの例は次の通りである：細胞外基質タンパク質mRNA誘導アッセイ（Frazier他、J. Invest. Dermatol. 107：404 - 411、1996）；基質タンパク質合成の刺激を測定する35Sメチオニンパルスチェイスアッセイ（Frazier他、前掲、1996）；マウスへの成長因子の皮下投与（Roberts他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83：4167 - 4171、1986）；およびmRNA発現の

変化を測定するためのin situ ハイブリダイゼーション (Fava他、Blood 76 : 1946 - 1955、1990)。

【0159】

細胞移動を本質的に下記の文献に開示されているようにしてアッセイする : K hler他、Arteriosclerosis , Thrombosis , and Vascular Biology 17 : 932 - 939、1997。タンパク質が低いタンパク質濃度の領域から高いタンパク質濃度の領域への細胞の移動を誘導する場合、タンパク質は化学走性であると考えられる。

【0160】

細胞接着活性を本質的に下記の文献に開示されているようにアッセイする : La Fleur他、J. Biol. Chem. 272 : 32798 - 32803、1997)。簡単に述べると、マイクロタイタープレートに被験タンパク質で被覆し、非特異的部局をBSAでブロックし、細胞 (例えば、平滑筋細胞、白血球、または内皮細胞) をほぼ $10^4 \sim 10^5$ 細胞/ウェルの密度でプレートする。細胞を37 °Cにおいてインキュベートし (典型的には約60分間)、次いで非接着性細胞をおだやかな洗浄により除去する。接着した細胞を慣用法 (例えば、クリスタルバイオレットを使用する染色、細胞の溶解、およびライゼイトの光学密度の測定) により定量する。対照ウェルを既知の接着性タンパク質、例えば、フィブロネクチンまたはビトロネクチンで被覆する。

【0161】

血管形成活性についてのアッセイもまたこの分野において知られている。例えば、血管形成における始原内皮細胞に対するzsig81に対する作用は、ヒヨコ尿漿膜血管形成アッセイにおいてアッセイすることができる (Leung、Science 246 : 1306 - 1309、1989 ; Ferrara、Ann. NY Acad. Sci. 752 : 246 - 256、1995)。他の適当なアッセイは下記のアッセイを包含する : 初期段階のウズラ (Coturnix coturnix japonica) 胚のマイクロインジェクション (Drake他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 7657 - 7661、1995) ; 角膜血管新生の齧歯類モデル (MuthukkaruppanおよびAuerbach、Science 205 : 1416 - 1418、1979)、ここで同系交配マウスの角膜中のポケットの中に被験物質を挿入する ; およびハムス

ターの類袋アッセイ (Hockett他、Arch. Surg. 128:423-429、1993)。

【0162】

zsig81タンパク質の生物学的活性は、非ヒト動物において、外因的タンパク質の投与により、zsig81をコードするポリヌクレオチドの発現により、そしてアンチセンスまたはノックアウト技術を使用する内因的zsig81の発現の抑制により、研究することができる。zsig81タンパク質を、個々に、他のzsig81タンパク質と組み合わせて、または他の成長因子(例えば、VEGF、PIGF、またはPDGF)を包含する、非veg3タンパク質と組み合わせて、投与するか、あるいは発現させることができる。試験動物を臨床的徴候、体重、血球計数、臨床化学、組織病理学、およびその他のようなパラメーターの変化についてモニターする。

【0163】

末梢四肢虚血および後足虚血のウサギモデルおよび慢性心筋虚血のブタモデルを包含する、既知の動物モデルにおいて、冠状側副成長の刺激を測定することができる(Ferrara他、Endocrine Reviews 18:4-25、1997)。zsig81タンパク質をVEGF、アンギオポイエチン、および塩基性FGFの存在および非存在下にアッセイして組合わせの作用について試験する。これらのモデルは、下記においていっそう詳細に開示するように、遺伝子デリバリーのためにアデノウイルスまたは裸DNAを使用して修飾し、1またはそれ以上の被験タンパク質を局所的に発現させることができる。

【0164】

創傷治癒の促進におけるzsig81ポリペプチドの効能を動物モデルにおいてアッセイすることができる。1つのこのようなモデルは、Mustoe他(Science 237:1333、1987)の線状皮膚切開モデルである。創傷治癒の初期段階において作用する化合物を評価するために、皮下移植片を使用することができる(Broadley他、Lab. Invest. 61:571、1985; Sprugel他、Am. J. Pathol. 129:601、1987)。

【0165】

動物におけるzsig81タンパク質の発現は、in vivoにおけるタンパク質活性の過剰生産または阻害の生物学的作用の研究のためのモデルを提供する。ウイルス

ベクターまたは裸DNAを使用してzsig81をコードするポリヌクレオチドを試験動物、例えば、マウス、の中に導入することができるか、あるいはトランスジェニック動物を産生することができる。一般に、分泌ペプチドを使用してzsig81タンパク質を発現させることが好ましい。適当な分泌ペプチドは、zsig81分泌ペプチド（例えば、配列番号2の残基 - 17~1）および異種分泌ペプチドを包含する。好ましい異種分泌ペプチドは、ヒト組織プラスミノゲンアクチベーター（t - PA）のそれである。米国特許第5,641,655号に開示されているように、望ましくないタンパク質分解的切断を減少するようにt - PA分泌ペプチドを修飾することができる。

【0166】

本発明のタンパク質をアッセイする1つのin vivoアプローチはウイルスデリバリー系を利用する。典型的なウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、およびアデノ関連ウイルス（AAV）を包含する。アデノウイルス、二本鎖DNAウイルスは、現在異種核酸のデリバリーのための最もよく研究されている遺伝子転移ベクターである。概観については、下記の文献を参照のこと：Becker他、Mol. Cell. Biol. 43 : 161 - 89、1994；およびDouglasおよびCuriel、Science and Medicine 4 : 44 - 53、1997。アデノウイルスはいくつかの利点を提供する。アデノウイルスは（i）比較的大きいDNAインサートを収容し、（ii）高い力価に増殖し、（iii）広い範囲の哺乳動物細胞型を感染し、そして（iv）多数の異なるプロモーター、例えば、偏在的、組織特異的、および調節可能なプロモーターとともに使用することができる。

【0167】

アデノウイルスは血流中で安定であるので、静脈内注射により投与することができる。アデノウイルスのゲノムが欠失されているアデノウイルスベクターを使用して、直接的結合により、または共トランスフェクトされたプラスミドとの相同的組換えにより、インサートをウイルスDNAの中に導入する。典型的な系において、必須E1遺伝子はウイルスベクターから欠失されており、E1遺伝子が宿主細胞（ヒト293細胞系統は典型的である）により提供されないかぎり、ウイルスは複製しなであろう。無傷の動物に静脈内投与されるとき、アデノウイルスは肝

臓を主としてターゲットとする。アデノウイルスデリバリー系がE1遺伝子欠失を有する場合、ウイルスは宿主細胞中で複製することができない。

【0168】

しかしながら、宿主組織（例えば、肝臓）は異種タンパク質を発現し、プロセスする（そして、分泌シグナル配列が存在する場合、分泌する）であろう。分泌されたタンパク質は高度に血管化した肝臓中の循環の中に入り、感染した動物に対する作用を測定することができる。ベクターに対する免疫応答を減少または排除するために、ウイルス遺伝子の種々の欠失を含有するアデノウイルスベクターを使用することができる。

【0169】

このようなアクチベーターはE1欠失されており、さらにE2AまたはE4の欠失を含有する（Lusky他、*J. Virol.* 72:2022-2032、1998；Raper他、*Human Gene Therapy* 9:671-679、1998）。さらに、E2bの欠失は免疫応答を減少させることが報告されている（Amalfitano他、*J. Virol.* 72:926-933、1998）。すべての転写単位が欠失されている、いわゆる「グートレス（gutless）」アデノウイルスの発生は、異種DNAの大きいインサートの挿入のために特に有利である。概観については、下記の文献を参照のこと：YenおよびPerricaudet、*FASEB J.* 11:615-623、1997。

【0170】

他の態様において、zsig81遺伝子を、例えば、下記の文献に開示されているレトロウイルスのベクターの中に導入することができる：Anderson他、米国特許第5,399,346号；Mann他、*Cell* 33:153、1983；Temin他、米国特許第4,650,764号；Temin他、米国特許第4,980,289号；Markowitz他、*J. Virol.* 62:1120、1988；Temin他、米国特許第5,124,263号；Dougherty他、WIPO公開WO 95/07358；およびKuo他、*Blood* 82:845、1993。

【0171】

別の方法において、リポソームを使用するin vivo「リポフェクション」によりベクターを導入することができる。マーカートをコードする遺伝子のin vivo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、合成カチオン性脂質

を使用することができる (Felgner他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7、1987; Mackey他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31、1988)。in vivoにおいて特定の器官の中に外因的遺伝子を導入するためにリポフェクションを使用することは、ある種の利点を有する。

【0172】

特定の細胞に対するリポソームの分子ターゲティングは利益の1つの領域を表す。例えば、特定の細胞型にトランスフェクションを向けることは、細胞の不均質性を有する組織、例えば、膵臓、肝臓、腎臓、および脳において特に有利である。ターゲティングの目的で、脂質を他の分子に化学的にカップリングすることができる。ターゲッテッドペプチド (例えば、ホルモンまたは神経伝達物質)、タンパク質、例えば、抗体、または非ペプチド分子をリポソームに化学的にカップリングすることができる。

【0173】

他の態様において、ターゲット細胞を動物から取出し、DNAを裸DNAプラスミドとして導入する。次いで形質転換された細胞を動物の体の中に再移植する。この分野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澱法、遺伝子ガンの使用またはDNAベクタートランスポーターの使用により、裸DNAベクターを所望の宿主細胞の中に導入することができる。例えば、下記の文献を参照のこと: Wu他、J. Biol. Chem. 267:963-7、1992; Wu他、J. Biol. Chem. 263:14621-4、1988。

【0174】

また、zsig81遺伝子を発現するように操作されたマウス (「トランスジェニックマウス」と呼ぶ)、およびzsig81遺伝子機能の完全な非存在を示すマウス (「ノックアウトマウス」と呼ぶ) を発生させることができる (Snouwaert他、Science 257:1083、1992; Lowell他、Nature 366:740-42、1993; Capecchi、Science 244:1288-1292、1989; Palmiter他、Annu. Rev. Genet. 20:465-499、1986)。正常マウスまたは遺伝病または他の変更された表現型を有するマウスを使用して、トランスジェネシス実験を実行することができる。偏在的にまた

は組織特異的または組織制限的プロモーター下に、*zsig81*を過剰に発現するトランスジェニックマウスを使用して、過剰発現が表現型の変化を引き起こすか否かを決定することができる。

【0175】

好ましいプロモーターは、メタロチオネインおよびアルブミンのプロモーターを包含する。メタロチオネイン-1 (MT-1) プロモーターは肝臓および他の組織における発現を提供し、しばしば高いレベルの循環タンパク質に導く。野生型*zsig81*ポリペプチド、ポリペプチドのフラグメントまたはその突然変異体の過剰発現は正常細胞プロセスを変更し、*zsig81*の発現が機能的に関係し、*zsig81*、そのアゴニストまたはアンタゴニストの療法上のターゲットを示すことができる組織を同定する、表現型を生ずることができる。例えば、好ましいトランスジェニックマウスは全長の*zsig81*配列を過剰に発現するものである。このような過剰発現はヒト疾患との類似性を示す表現型を生ずることがある。

【0176】

同様に、ノックアウト*zsig81*マウスを使用して、*zsig81*が*in vivo*において絶対的に必要であるかどうかを決定することができる。ノックアウトマウスの表現型は*zsig81*アンタゴニストの*in vivo*作用を予測する。また、例えば、癌、アテローム性動脈硬化症、慢性関節リウマチ、虚血、および心臓血管系疾患を包含する疾患のモデルにおける*zsig81*タンパク質の作用を研究するために、ノックアウトマウスを使用することができる。ヒト*zsig81* cDNAを使用して上に開示したネズミ*zsig81* mRNA、cDNAおよびゲノムDNAを単離することができ、引き続いてこれらを使用してノックアウトマウスを発生させる。

【0177】

これらのマウスは*zsig81*遺伝子およびそれによりコードされたタンパク質を*in vivo*系において研究するために使用することができ、対応するヒト疾患の*in vivo*モデルとして使用することができる。そのうえ、本明細書に記載する*zsig81*に対して向けられた*zsig81*アンチセンスポリヌクレオチドまたはリボザイムを発現するトランスジェニックマウスは、前述のマウスをノックアウトするために同様に使用することができる。

【0178】

アンチセンス法を使用してzsig81遺伝子の転写を阻害して、in vivoにおけるこのような阻害作用を検査することができる。zsig81をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号1に記載するポリヌクレオチド）のセグメントに対して相補的であるポリヌクレオチドは、zsig81をコードするmRNAに結合しかつこのようなmRNAの転写を阻害するように設計される。また、細胞培養においてzsig81ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害するために、このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することができる。

【0179】

本発明のタンパク質は、一次細胞および培養した細胞系統を包含する、応答性細胞型の増殖、分化、移動、または突然変異をモジュレートするために有効である。これに関して、造血細胞（幹細胞、成熟骨髄性細胞およびリンパ系細胞を包含する）、上皮細胞、および間葉細胞（繊維芽細胞、癌細胞および平滑筋細胞を包含する）は特に重要である。zsig81ポリペプチドをこれらの細胞型の組織培養培地に約10pg/ml～約1000ng/mlの濃度で添加する。当業者は認識するように、zsig81タンパク質を培地中の他の増殖因子と好都合に組み合わせることができる。

【0180】

樹枝状細胞は免疫系において最も効力のある抗原提示細胞（APC）である。樹枝状細胞はin vivoにおいて自然CD4+T細胞に対して抗原を提示しかつそれらの細胞を活性化する唯一の細胞である（Levin他、J. Immunol. 151:6742-6750、1993）。樹枝状細胞は一次および二次リンパ系器官（例えば、胸腺、リンパ節、扁桃腺、パイエル板、および脾臓）において、ならびに非リンパ系器官および組織（例えば、心臓、肝臓、肺、消化管、および皮膚、例えば、表皮ランゲルハンス細胞）において見出される。また、樹枝状細胞は輸入リンパ管において優勢であるが、血液中で稀である。概観については、下記の文献を参照のこと：Steinman、Ann. Rev. Immunol. 9:271-296、1991およびKnight他、J. Invest. Dermatol. 99:33S-38S、1992。

【0181】

樹枝状細胞は単一の造血子孫細胞に由来すると考えられる。子孫細胞は分化プ

ロセスを開始するので、それらは選択された組織および/または器官に移動し、ここでそれらはさらに分化する。組織から単離される場合、樹枝状細胞は未熟である；すなわち、細胞は完全には分化せず、抗原提示において非効率的であり、低いレベルのMHCクラスII分子を発現し、同種異系混合白血球反応（MLR）においてT細胞の増殖を刺激しない。しかしながら、未熟樹枝状細胞を外來タンパク質に対して暴露するとき、それらは新しく合成されたMHCクラスII分子を介して可溶性抗原を取り上げ、提示し、同時にそれらの組織滞留から去り、リンパ節および脾臓に移動する。

【0182】

由来組織から移動した後、樹枝状細胞は成熟する；すなわち、それらは高いレベルのMHCクラスII、アクセサリーおよび共刺激分子、ならびに完全なAPC機能を示す（Steinman、前掲、1990およびIbrahim他、*Immunology Today* 16:181-186、1995）。最近、永久分裂能化された樹枝状細胞の入手可能性は樹枝状細胞およびそれらの前駆体細胞による抗原の吸収およびプロセッシングを研究する科学者の能力を拡張した（例えば、下記の文献を参照のこと：米国特許第5,648,219号）。

【0183】

樹枝状細胞は、接触感受性、腫瘍免疫性、HIV-1感染および自己免疫性（例えば、I型糖尿病、多発性硬化症および慢性関節リウマチ）を包含する、免疫応答を包含する多数の異なる疾患における原因となる細胞型として関係づけられた。これらの細胞は移植片拒絶においてある役割を演ずると考えられ、ここで同種移植片からの細胞はレシピエントのリンパ系器官の中に移動し、有害な免疫応答を開始する。

【0184】

最近の研究は、サイトカインが樹枝状細胞の成熟および抗原を提示する能力においてある役割を演ずることを証明した。GM-CSFは、ランゲルハンス細胞によるin vivo抗原提示および他の樹枝状細胞中でin vitro腫瘍免疫性を増強することが見出された（Grabbe他、*Immunology Today* 16:117-121、1995）。樹枝状細胞機能および分化においてある役割を演ずると考えられる他のサイトカイ

ンは下記のを包含する：FLT3リガンド、IL - 12、KITリガンド、TNT - およびIL - 4とGM - CSFとの組み合わせ (Shurin他、Cytokine & Growth Factor Reviews 9 : 37 - 48、1998) ; 幹細胞因子、TGF - 、IL - 6およびIL - 3 (Brugger他、Ann. N. Y. Acad. Sci. 872 : 363 - 371、1999)。

【0185】

本発明の分子は、樹枝状系列の細胞に関連するマーカーを発現する細胞の増殖を刺激することが示された。ネズミzsig81のcDNAでトランスフェクトしたヒト胚性腎細胞からコンディショニングした培地は、骨髄培養物の増殖を刺激した。骨髄培養物は、種々の分化段階における、多数の細胞系譜を含有し、そして培養物からのアウトグロースはCD80+、CD86+、MHC IIおよびCD11c+である細胞を有意に増加させた。これらの細胞は可能なリンパ系由来または骨髄由来の樹枝状細胞のためのマーカーである。

【0186】

胸腺リンパ系関係樹枝状細胞の同定は、骨髄関係樹枝状細胞から表現型的に区別される。リンパ系由来または骨髄由来の樹枝状細胞間の種々の機能的差は完全には解明されてきていないが、リンパ系関係樹枝状細胞は自己抗原耐性に関係づけることができるが、骨髄関係樹枝状細胞は外来抗原のエンドサイトーシスに関係づけることができる (de St. Groth、Immunology Today 19 : 448 - 454、1998)。

【0187】

樹枝状細胞は、細胞の成熟度、すなわち、その分化した状態に特異的に関連する活性を有する。細胞の成熟度を同定するために、確立された細胞の集団をアッセイし、分化経路における細胞の段階の特徴を示す、1組の分化マーカーについて分析する。好ましくは、それは細胞の少なくとも一部分を単離し、この下位集団をこのような分析に付すことによって実施される。

【0188】

1組の分化マーカーは1またはそれ以上の表現型の特性として規定され、これらの特性は同定可能であり、そして特定の細胞型および成熟段階に対して特異的である。分化マーカーは、最終の分化に向かう細胞の漸進性の種々の段階において

一時的に示される。特異的細胞系譜に対して拘束されないで再生することができる多能性幹細胞は1組の分化マーカーを発現し、これらのマーカーは特定の細胞系譜に対して拘束されるとき減少する。

【0189】

前駆体細胞は、細胞が細胞系譜の経路をたどって成熟に進行するとき、発現され続けるか、あるいは続けることができない、1組の分化マーカーを発現する。成熟細胞によりもっぱら発現される分化マーカーは、通常、機能的特性、例えば、細胞産物、細胞産物を産生する酵素、およびレセプターを表示する。適当な因子に暴露させると、本発明の細胞系統は単球細胞系譜の他の細胞に分化し、成熟することができる。樹枝状細胞の同定に使用する分化マーカーは下記のものを含む：Mac - 1、F4 / 80、Fc RII / IIIレセプター (FcR)、MHCクラスI、MHCクラスII、B7 - 1、B7 - 2、ICAM - 1、CD44、N418、およびNLDC - 145。

【0190】

未熟樹枝状細胞において、F4 / 80 (Lee他、J. Exp. Med. 161 : 475、1985) およびFcR (Unkeless, J. Exp. Med. 150 : 580、1979) は検出可能であるが、F4 / 80 (Caltag、カリフォルニア州サンフランシスコ) に結合するモノクローナル抗体およびFcR結合について2.4G2 (PharMingen、カリフォルニア州サンディエゴ) を使用してマクロファージにおいて見られるレベルよりも低いレベルにおいて検出可能である；MHCクラスIはモノクローナル抗体EH144.3を使用して検出可能である (Geier他、J. Immunol. 137 : 1239、1986) ；MHCクラスIIはモノクローナル抗体AF6 - 120.1 (PharMingen) を使用して低いレベルにおいてのみ検出可能である；B7 - 1およびB7 - 2はモノクローナル抗体IG10 (PharMingen) およびGL1 (PharMingen) を使用して低いレベルにおいて検出可能である (Nabavi他、Nature 360 : 266、1992およびHathcock他、Science 262 : 905、1993、それぞれ) ；

【0191】

ICAM - 1 (Rothlein他、J. Immunol. 137 : 1270、1986) はモノクローナル抗体3E2 (PharMingen) を使用して、そしてCD44 (Lesley他、Immunogenetics 15 : 313、1982) はモノクローナル抗体IM7 (PharMingen) を使用して、高いレベル

において検出可能である；そして樹枝状細胞のマーカーCD11cの少なくとも1つ（Metaly他、J. Exp. Med. 171：1753、1990）はモノクローナル抗体N418を使用して、またはDC - 205（Kraal他、J. Exp. Med. 163：981、1986）はモノクローナル抗体NLDC - 145（Accurate Chem. and Scientific、ニューヨーク州ウェストバリイ）および33D1（Nussenzweig他、Proc. Natl. Acad. Sci. US A 79：161、1982）を使用して検出可能であろう。

【0192】

これらのマーカーのすべてが存在するわけではないこと、そして発現レベルは変化することを熟練した実施者は認識するであろう。活性化された樹枝状細胞において、高いレベルのMHCクラスIIは検出可能である；未熟樹枝状細胞において見られるよりも、B7 - 2およびICAM - 1は高いレベルで、そしてF4 / 80は低いレベルで発現される。

【0193】

フローサイトメーターを用いて、モノクローナル抗体を使用する細胞表面の分析を実施する、例えば、下記の文献を参照のこと：Fink他、J. Exp. Med. 176：1733、1992およびCrowley他、Cell Immunol. 118：108 - 125、1989。簡単に述べると、細胞を蛍光色素に直接的に結合されたモノクローナル抗体と組み合わせるか、あるいは非結合一次抗体と組み合わせ、次いで商業的に入手可能な蛍光色素に結合された二次抗体と組み合わせる。染色された細胞を、FACScan（Becton Dickinson、カリフォルニア州マウンテンビュー）により、LYSYS IIまたはCell Questソフトウェア（Becton Dickinson）に従い分析する。

【0194】

MLRにおいて同種異系T細胞の増殖を刺激する細胞の能力により、活性化された樹枝状細胞の同定を確証する。簡単に述べると、96ウェルのマイクロタイターディッシュ（American Scientific Products、イリノイ州シカゴ）中で、活性化された樹枝状細胞を同種異系T細胞をインキュベートする。3H - チミジンの組込みにより、T細胞を増殖させる刺激を測定する。本発明の樹枝状細胞を照射に対して暴露して、樹枝状細胞の増殖を遅延させ、かつ樹枝状細胞による3H - チミジンの組込みにより引き起こされる、アッセイにおけるバックグラウンドを減少

させることが好ましい。

【0195】

樹枝状細胞を活性化して細胞表面上のMHCクラスII分子の発現を誘導し、抗原プロセッシングおよび提示についてこれらの成熟樹枝状細胞をコンピテントとする。次いで、抗原提示のために十分な時間の間、これらの活性化された細胞（すなわち、刺激因子）を抗原に対して暴露する。当業者は認識するように、抗原のエンドサイトーシス、プロセッシングおよび提示に必要な時間はこの目的に使用するタンパク質の抗原に依存する。抗原の吸収および提示を測定する方法はこの分野において知られている。例えば、樹枝状細胞を可溶性タンパク質抗原（例えば、オバルブミンまたはコンアルブミン）と3~24時間インキュベートし、次いで洗浄して外因的抗原を除去する。

【0196】

次いで、これらの抗原提示刺激因子の細胞を応答因子の細胞、好ましくは自然または抗原プライムドTリンパ球と混合する。ほぼ72時間のインキュベーション（プライムドTリンパ球について）またはほぼ4~7日間インキュベーション後、プロセッシングされかつ提示された抗原に応答したT細胞の活性化を測定する。好ましい態様において、³H-チミジン吸収を使用してT細胞の増殖を測定することによって、T細胞の活性化を測定する（Crowley他、J. Immunol. Meth. 133 : 55 - 66、1990）。

【0197】

これに関して応答因子の細胞は、PBMN細胞、培養したT細胞、確立されたT細胞系統またはハイブリドーマであることができる。サイトカイン、例えば、IL-2の産生によるか、あるいはT細胞特異的活性化マーカーの決定により、応答因子の細胞の活性化を測定することができる。サイトカイン依存性細胞の成長を刺激する刺激因子+応答因子細胞の培養上清の能力を試験することによって、サイトカイン産生をアッセイすることができる。T細胞特異的活性化マーカーは、このようなマーカーに対して特異的な抗体を使用して検出可能である。

【0198】

T細胞増殖アッセイのために、T応答因子細胞と混合する前に樹枝状細胞の増殖

を阻害することが好ましい。ガンマ照射または抗有糸分裂因子、例えば、ミトマイシンCに対する暴露により、この阻害を達成することができる。

あるいは、活性化された樹枝状細胞を使用して、Tリンパ球における非応答性を誘導することができる。MHCクラスII認識に加えて、T細胞の活性化は、共同刺激分子で刺激された抗原提示細胞（APC；例えば、樹枝状細胞）上のコレセプターを必要とする。

【0199】

このようなコレセプターの刺激をブロックまたは排除することによって（例えば、抗レセプターまたは抗リガンド抗体を使用するブロッキングによるか、あるいはこのようなレセプターをコードする1またはそれ以上の遺伝子を「ノックアウト」することによって）、コレセプター依存性樹枝状細胞による抗原の提示を使用して、Tリンパ球を抗原に対して非応答性することができる。

【0200】

zsig81タンパク質を単独でまたは他の造血因子、例えば、IL-3、G-CSF、GM-CSF、IL-4、M-CSF、IL-12または幹細胞因子と組み合わせて使用して、前駆体幹細胞を包含する、造血または間葉幹細胞の拡大または移動化を増強することができる。この方法において拡大することができる細胞は、骨髄から単離された細胞、血液、新生児の心臓または肝臓から単離された細胞を包含する。また、zsig81タンパク質を個体に直接的に与えて、処置された個体内の幹細胞の産生および分化を増強することができる。特に、zsig81を樹枝状細胞および樹枝状細胞の前駆体の集団の拡大に使用することができる。

【0201】

また、zsig81タンパク質は、それらの活性のインヒビターを同定するために使用することができる。被験化合物を上を開示したアッセイに添加して、zsig81タンパク質の活性を阻害する化合物を同定する。上を開示したアッセイに加えて、レセプターの結合またはzsig81依存的細胞の応答の刺激/阻害を測定するように設計された種々のアッセイにおいて、試料をzsig81活性の阻害について試験することができる。例えば、zsig81刺激細胞経路に対して応答性であるリポーター遺伝子構築物で、zsig81応答性細胞システムをトランスフェクトすることができる。こ

の型のリポーター遺伝子構築物はこの分野において知られており、そして一般にアッセイ可能なタンパク質、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鎖された、zsig81活性化血清応答因子 (SRE) を含んでなるであろう。

【0202】

リポーター遺伝子の発現のzsig81刺激の減少により証明されるように、ターゲット細胞に対するzsig81活性を阻害する能力について、候補の化合物、溶液、混合物または抽出物を試験する。この型のアッセイは、細胞表面レセプターに対するzsig81の結合を直接的にブロックする化合物、ならびにリポーター - リガンドの結合に引き続く細胞経路におけるプロセスをブロックする化合物を検出する。別法において、検出可能な標識 (例えば、125I、ビオチン、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、FITC、およびその他) で標識化したzsig81を使用して、レセプターに対するzsig81の結合を直接的にブロックする能力について、化合物または他の試料を試験することができる。

【0203】

この型のアッセイにおいて、レセプターに対する標識化zsig81の結合を阻害する被験試料の能力は阻害活性を示し、これは二次アッセイにより確認することができる。結合アッセイにおいて使用するレセプターは細胞のレセプターまたは単離され、固定化されたレセプターであることができる。zsig81タンパク質の活性は、ケイ素をベースとするバイオセンサーのマイクロフィジオメーターで測定することができる。このマイクロフィジオメーターは、レセプターの結合に関連する細胞外酸性化速度またはプロトン外分泌および引き続く生理学的細胞応答を測定する。

【0204】

典型的なこのような装置は、CytosensorTM Microphysiometer (Molecular Devices、カリフォルニア州サニーベイル) である。種々の細胞の応答、例えば、増殖、イオン輸送、エネルギー産生、炎症性応答、調節およびレセプターの活性化、およびその他をこの方法により測定することができる。例えば、下記の文献を参照のこと: McConnel他、Science 257:1906-1912、1992; Pitchford他、Meth. Enzymol. 228:84-108、1997; Arimilli他、J. Immunol. Meth. 212

: 49 - 59、1998 ; およびVan Liefde他、Eur. J. Pharmacol. 346 : 87 - 95、1998。

【0205】

マイクロフィジオメーターは、付着性または非付着性真核細胞または原核細胞をアッセイするために使用することができる。細胞培地における細胞外酸性化の経時的变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、zsig81タンパク質、それらのアゴニスト、およびアンタゴニストを包含する、種々の刺激に対する細胞の応答を直接測定する。好ましくは、マイクロフィジオメーターを使用してzsig81応答性真核細胞の応答を測定し、zsig81ポリペプチドに対して応答しない対照真核細胞と比較する。zsig81応答性真核細胞は、zsig81のレセプターをその中にトランスフェクトしてzsig81に対して応答性の細胞をつくる細胞、ならびにzsig81に対して自然に応答性の細胞、例えば、血管、心臓、造血、または肝臓の組織に由来する細胞を含んでなる。

【0206】

zsig81に対して暴露されない対照に関して、zsig81ポリペプチドに対して暴露された細胞の応答の変化、例えば、細胞外酸性化の増加または減少、により測定した差は、zsig81モジュレーテッド細胞応答の直接的測定である。そのうえ、このようなzsig81モジュレーテッド応答を種々の刺激下にアッセイすることができる。こうして、本発明は、zsig81タンパク質のアゴニストおよびアンタゴニストを同定する方法を提供する。この方法は、zsig81ポリペプチドに対して応答性の細胞を準備し、被検化合物の非存在下に細胞の第1部分を培養し、被検化合物の存在下に細胞の第2部分を培養し、そして細胞の第1部分に比較して、細胞の第2部分の細胞応答の変化、例えば、増加または減少を検出することを含んでなる。

【0207】

細胞応答の変化は、細胞外酸性化速度の測定可能な変化として示される。zsig81タンパク質の存在下にかつ被検化合物の非存在下に細胞の第3部分を培養すると、zsig81応答性細胞の陽性対照、および被検化合物のアゴニスト活性をzsig81ポリペプチドのそれと比較する対照が得られる。被検化合物の存在および非存在下にzsig81タンパク質に対して細胞を暴露することによって、zsig81のアンタゴ

ニストを同定することができ、ここでzsig81刺激活性における減少は被検化合物のアゴニスト活性を示す。

【0208】

また、zsig81刺激経路に対して応答する細胞、組織、または細胞系統を同定するために、zsig81タンパク質を使用することができる。リガンド応答性細胞、例えば、zsig81タンパク質に対して応答性の細胞を急速同定するために、前述のマイクロフィジオメーターを使用することができる。細胞をzsig81ポリペプチドの存在または非存在下に培養する。zsig81の存在下に細胞外酸性化の測定可能な変化を誘発する細胞は、zsig81に対して応答性である。次いで応答性細胞を使用して、前述したzsig81ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定することができる。

【0209】

zsig81活性のインヒビター（zsig81アンタゴニスト）は、抗zsig81抗体および可溶性zsig81レセプター、ならびに他のペプチドおよび非ペプチドの因子、例えば、リボザイム、小さい分子のインヒビター、およびzsig81ポリペプチドの血管形成的または有糸分裂誘発的に不活性であるレセプター結合性フラグメントを包含する。このようなアンタゴニストを使用して、zsig81の生物学的活性、例えば、有糸分裂誘発、走化、または血管形成作用をブロックすることができる。

本発明のポリペプチド、核酸、および抗体は、細胞喪失または異常な細胞増殖（癌を包含する）に関連する疾患、例えば、損傷したまたは過剰の脈管形成または血管形成および自己免疫病の診断または治療において使用することができる。標識化zsig81ポリペプチドを腫瘍または異常な細胞増殖の他の部位の映像法に使用することができる。

【0210】

当業者にとって容易に明らかなように、種々の温血動物、例えば、ウマ、雌牛、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ニワトリ、ウサギ、マウス、およびラットにzsig81ポリペプチドまたはそのフラグメントを接種することによって、ポリクローナル抗体を発生させることができる。

【0211】

アジュバント、例えば、明礬（水酸化アルミニウム）またはフロインド完全アジュバントまたはフロインド不完全アジュバントを使用して、zsig81ポリペプチドの免疫原性を増加させることができる。免疫化に有用なポリペプチドは、また、融合ポリペプチド、例えば、zsig81またはその一部分と免疫グロブリンポリペプチドまたはマルトース結合性タンパク質との融合物を包含する。ポリペプチドの免疫原は全長の分子またはその一部分であることができる。ポリペプチドの一部が「ハプテン様」である場合、このような一部分は好都合には免疫化のために高分子の担体（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）または破傷風トキソイド）に結合させることができる。

【0212】

本明細書において使用するとき、用語「抗体」はポリクローナル抗体、アフィニティー精製されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および抗原結合性フラグメント、例えば、F(ab')₂およびFabタンパク質分解フラグメントを包含する。遺伝子操作された無傷の抗体またはフラグメント、例えば、キメラ抗体、Fvフラグメント、一本鎖抗体およびその他、ならびに合成抗原結合性ペプチドおよびポリペプチドもまた包含される。非ヒトCDRをヒトフレームワークおよび定常領域の上にグラフト化するか、あるいは全体の非ヒト可変ドメインを組み込む（必要に応じて暴露した残基を置換することによって、前記ドメインをヒト様表面で「クローキング（cloaking）」する、ここで「ベニヤ化された」抗体が生ずる）ことによって、非ヒト抗体をヒト化することができる。

【0213】

いくつかの例において、ヒト化抗体はヒト可変領域のフレームワーク内に非ヒト残基を保持して、適切な結合特性を増強することができる。抗体をヒト化することによって、生物学的半減期を増加することができ、そしてヒトへの投与のときの悪い免疫反応の可能性が減少する。そのうえ、WIPO公開WO 98/24893号に開示されているように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含有するように操作された、トランスジェニック、非ヒト動物において、ヒト抗体を産生することができる。これらの動物における内因的免疫グロブリン遺伝子を、例えば、相同的組換えにより、不活性化するか、あるいは排除することが好ましい。

【0214】

抗体は、1) それらが限界のレベルの結合活性を示す場合、および/または2) それらが関係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慮される。本発明における抗zsig81抗体がzsig81ポリペプチド、ペプチドまたはエピトープと対照(非zsig81)ポリペプチドに対する結合アフィニティーよりも少なくとも10倍大きいアフィニティーで結合する場合、結合の限界レベルが決定される。抗体は 10^6 /Mまたはそれより大きい、好ましくは 10^7 /Mまたはそれより大きい、より好ましくは 10^8 /Mまたはそれより大きい、最も好ましくは 10^9 /Mまたはそれより大きい、結合アフィニティー(Ka)を示すことが好ましい。抗体の結合アフィニティーは、当業者により、例えば、スキャッチャード分析(Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949)により容易に測定することができる。

【0215】

例えば、標準的ウェスタンブロット分析を使用して、抗zsig81抗体が関係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示される(Ausubel他、前掲)。既知の関係するポリペプチドの例は、先行技術において開示されているもの、例えば、オーソログ、およびパラログである。また、非ヒトzsig81、およびzsig81突然変異体ポリペプチドを使用して、スクリーニングを実施することができる。そのうえ、抗体を既知の関係するポリペプチド「に対してスクリーニング」して、本発明のポリペプチドに特異的に結合する集団を単離することができる。例えば、zsig81に対して発生させた抗体は不溶性マトリックスに付着した関係するポリペプチドに吸着される；zsig81に対して特異的な抗体は適切な緩衝条件下にマトリックスを通して流れるであろう。

【0216】

スクリーニングは、密接に関係するポリペプチドに対して非交差反応性のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の単離を可能とする(Antibodies: A Laboratory Manual, HarlowおよびLane(編)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, 他(編)、National Institutes of Health, John Wiley & Sons, Inc., 1995)

。特異的抗体のスクリーニングおよび単離は、この分野においてよく知られている。

【0217】

下記の文献を参照のこと：Fundamental Immunology、Paul（編）、Raven Press、1993；Getzoff他、Adv. in Immunol.、43：1-98、1988；Monoclonal Antibodies：Principle and Practice、Goding、J. W.（編）、Academic Press Ltd.、1996；Benjamin他、Ann. Rev. Immunol. 2：67-101、1984。特異的に結合性の抗zsig81抗体は、後述するように、この分野において知られている多数の方法により検出可能である。

【0218】

この分野において知られている種々のアッセイを利用して、zsig81タンパク質またはペプチドに特異的に結合する抗体を検出することができる。典型的なアッセイは、Antibodies：A Laboratory Manual、HarlowおよびLane（編）、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988、に詳細に記載されている。このようなアッセイの代表的な例は下記のを包含する：並流免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ、放射線免疫沈降、酵素結合イムノアッセイ（ELISA）、ドットプロットまたはウェスタンブロットアッセイ、阻害または競合アッセイ、およびサンドイッチアッセイ。さらに、抗体を野生型/突然変異のzsig81ポリペプチドに対する結合についてスクリーニングすることができる。

【0219】

本発明において有用な抗体を発生させるか、あるいは選択する別の技術は、zsig81タンパク質またはペプチドに対するリンパ球のin vitro暴露、およびファージまたは同様なベクター中の抗体ディスプレイライブラリーの選択（例えば、固定化または標識化されたzsig81タンパク質またはペプチドの使用による）を包含する。ファージ上にディスプレイされた（ファージディスプレイ）、あるいは細菌、例えば、大腸菌（E. coli）上にディスプレイされた、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、潜在的zsig81ポリペプチド結合性ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子を得ることができる。ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多数の方法、例えば、ランダム突

然変異誘発およびランダムポリヌクレオチド合成により、得ることができる。

【0220】

これらのランダムペプチドディスプレイライブラリーを使用して、ペプチドまたはポリペプチドであることができる既知の標的、例えば、リガンドまたはレセプター、生物学的または合成的高分子、または有機または無機の物質と相互作用するペプチドをスクリーニングすることができる。

【0221】

このようなランダムペプチドディスプレイライブラリーをつくり、スクリーニングする技術はこの分野において知られており（Ladner他、米国特許第5,223,409号；Ladner他、米国特許第4,946,778号；Ladner他、米国特許第5,403,484号およびLadner他、米国特許第5,571,698号）そしてランダムペプチドディスプレイライブラリーおよびこのようなライブラリーをスクリーニングするキットは、例えば、クロンテク（Clontech）（カリフォルニア州パロアルト）、インビトロゲン・インコーポレーテッド（Invitrogen Inc.）（カリフォルニア州サンディエゴ）、ニュー・イングランド・バイラプス・インコーポレーテッド（New England Biolabs Inc.）（マサチューセッツ州ベバーリイ）およびファーマシア（Pharmacia LKB Biotechnology Inc.）（ニュージャージー州ピスカタウェイ）から商業的に入手可能である。

【0222】

本明細書に開示するzsig81配列を使用して、ランダムペプチドディスプレイライブラリーをスクリーニングして、zsig81に結合するタンパク質を同定することができる。これらの「結合性タンパク質」は、zsig81ポリペプチドと相互作用し、細胞の標識化、アフィニティー精製による相同体ポリペプチドの単離に使用することができる；それらを直接的または間接的に薬剤、トキシン、放射性核種およびその他に結合させることができる。これらの結合性タンパク質は、また、分析方法において、例えば、発現ライブラリーのスクリーニングおよび活性の中和に使用することができる。

【0223】

また、結合性タンパク質は、組織中のポリペプチドの循環レベルを測定し、そ

して根元的な病理学または疾患のマーカーとしてポリペプチドを検出または定量する診断アッセイに使用することができる。これらの結合性タンパク質は、また、zsig81「アンタゴニスト」として作用して、in vitroおよびin vivoにおいてzsig81の結合およびシグナルトランスダクションをブロックすることができる。これらの抗zsig81結合性ポリペプチドは活性またはタンパク質結合性を阻害するために有用である。

【0224】

zsig81を発現する細胞の標識化；アフィニティー精製によるzsig81の単離；zsig81ポリペプチドの循環レベルを測定する診断アッセイ；根元的な病理学または疾患のマーカーとしての可溶性zsig81タンパク質の検出または定量；FACSを使用する分析方法；発現ライブラリーのスクリーニング；抗イディオタイプ抗体の発生；のために、そして中和性抗体；またはin vitroおよびin vivoにおいてzsig81をブロックするアンタゴニスト；として、zsig81に対する抗体を使用することができる。

【0225】

本発明における抗体またはポリペプチドは、また、薬剤、トキシン、放射性核種およびその他と直接的または間接的に複合化することができ、そしてこれらの複合体はin vivoの診断または療法の用途において使用することができる。そのうえ、zsig81に対する抗体またはそのフラグメントをin vitroにおいて使用して、アッセイ、例えば、ウェスタンブロットまたはこの分野において知られている他のアッセイにおいて変性したzsig81またはそのフラグメントを検出することができる。

【0226】

本発明における抗体またはポリペプチドは、また、薬剤、トキシン、放射性核種およびその他と直接的または間接的に複合化することができ、そしてこれらの複合体はin vivoの診断または療法の用途において使用することができる。例えば、本発明のポリペプチドまたは抗体を使用して、対応する抗相補的分子（例えば、それぞれ、レセプターまたは抗原）を発現する組織または器官を同定または治療することができる。さらに詳しくは、zsig81ポリペプチドまたは抗zsig81抗

体、またはそれらの生物活性フラグメントまたは部分を検出可能なまたは細胞障害性分子にカップリングさせ、そして抗相補的分子を発現する細胞、組織または器官を有する哺乳動物に送達することができる。

【0227】

適当な検出可能な分子をポリペプチドまたは抗体に直接的または間接的に結合させることができ、そしてこのような分子は放射性核種、酵素、基質、コファクター、インヒビター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子、およびその他を包含する。適当な細胞障害分子をポリペプチドまたは抗体に直接的または間接的に結合させることができ、そしてこのような分子は細菌または植物のトキシン（例えば、ジフテリアトキシン、シュードモナス・エキソトキシン（*Pseudomonas exotoxin*）、リシン、アブリンおよびその他）、ならびに治療用放射性核種、例えば、ヨウ素 - 131、レニウム - 188またはイットリウム - 90（ポリペプチドまたは抗体に直接的に結合されているか、あるいは、例えば、キレート化部分の手段により間接的に結合されている）を包含する。

【0228】

また、ポリペプチドまたは抗体を細胞障害性薬剤、例えば、アドリアマイシンに結合させることができる。検出可能なまたは細胞障害性分子の間接的結合のために、検出可能なまたは細胞障害性分子を補体 / 抗補体の対の1メンバーに結合させることができ、ここで他方のメンバーをポリペプチドまたは抗体の部分に結合させる。これらの目的に対して、ビオチン / ストレプトアビジンは典型的な補体 / 抗補体の対である。

【0229】

他の態様において、ポリペプチド - トキシン融合タンパク質または抗体 - トキシン融合タンパク質を、ターゲット細胞または組織の阻害または切除のために（例えば、癌細胞または組織を処置するために）使用することができる。したがって、このようなドメイン - 相補的分子の融合タンパク質は、遺伝的抗相補的 - 検出可能な / 細胞障害性分子の複合体の細胞 / 組織特異的送達のための、遺伝的ターゲティングビヒクルを表す。

【0230】

本発明の分子は、zsig81応答性細胞の成長および分化に係るレセプターの同定および単離において使用することができる。例えば、本発明のタンパク質およびペプチドをカラム上に固定化し、そして膜調製物をカラムの上に展開させることができる (Immobilized Affinity Ligand Techniques、Hermanson他、編、Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ、1992、pp. 195 - 202)。タンパク質およびペプチドを、また、放射能標識化する (Methods in Enzymol., vol. 182、Guide to Protein Purification、M. Deutscher、編、Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ、1990、721 - 737) か、あるいはフォトアフィニティー標識化し (Brunner他、Ann. Rev. Biochem. 62 : 483 - 514、1993およびFedan他、Biochem. Pharmacol. 33 : 1167 - 1180、1984) そして特異的細胞表面のタンパク質を同定することができる。

【0231】

zsig81ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、zsig81活性を増加させようとする遺伝子療法において有用である。哺乳動物が突然変異したzsig81遺伝子をもつか、あるいはzsig81遺伝子をもたない場合、zsig81遺伝子を哺乳動物の細胞の中に導入することができる。1つの態様において、zsig81ポリペプチドをコードする遺伝子をin vivoにおいてウイルスのベクターの中に導入する。このようなベクターは、弱毒化または欠陥DNAウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV)、肺炎ウイルス、EBウイルス (EBV)、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス (AAV)、およびその他を包含するが、これらに限定されない。欠陥ウイルスは、ウイルス遺伝子を完全にまたはほとんど完全に欠如し、このようなウイルスは好ましい。

【0232】

欠陥ウイルスは、細胞の中に導入された後、感染性ではない。欠陥ウイルスのベクターを使用すると、ベクターが他の細胞を感染することができるということを見逃して、特定の局在化区域における細胞への投与が可能となる。特定のベクターの例は下記のものを含むが、これらに限定されない：欠陥単純ヘルペスウイルス1 (HSV1) のベクター (Kaplitte他、Molec. Cell. Neurosci. 2 : 320 - 30、1991) ; 弱毒化アデノウイルス、例えば、Stratford - Perricaudet

他、J. Clin. Invest. 90:626-30、1992、に記載されているベクター；および欠陥アデノ関連ウイルスのベクター（Samulski他、J. Virol. 61:3096-101、1987；Samulski他、J. Virol. 63:3822-28、1989）。

【0233】

他の態様において、zsig81遺伝子を、例えば、下記の文献に記載されているように、レトロウイルスのベクターの中に導入することができる：Anderson他、米国特許第5,399,346号；Mann他、Cell 33:153、1983；Temin他、米国特許第4,650,764号；Temin他、米国特許第4,980,289号；Markowitz他、J. Virol. 62:1120、1988；Temin他、米国特許第5,124,263号；Dougherty他、国際特許公開No.WO 95/07358号、公開、1995年3月16日；およびKuo他、Blood 82:845、1993。あるいは、ベクターはリポソームを使用するin vivoにおけるリポフェクションにより導入することができる。

【0234】

合成カチオン性脂質を使用して、マーカーをコードする遺伝子のin vivoトランスフェクションのためのリポソームを調製することができる（Felgner他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-17、1987；Mackey他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31、1988）。外因的遺伝子を特定の器官の中にin vivoにおいて導入するリポフェクションを使用すると、ある種の実際的利点を得られる。特定の細胞に対するリポソームの分子のターゲティングは、1つの領域の利益を表す。

【0235】

さらに詳しくは、トランスフェクションを特定の細胞に向けることは、1つの領域の利益を表す。例えば、特定の細胞の型にトランスフェクションを向けることは、細胞の異種性を有する組織、例えば、脾臓、肝臓、腎臓、および脳において特に好都合である。脂質をターゲティングの目的で他の分子に化学的にカップリングさせることができる。ターゲッテッドペプチド（例えば、ホルモンまたは神経伝達物質）、タンパク質、例えば、抗体、または非ペプチド分子をリポソームの化学的にカップリングすることができる。

【0236】

標的細胞を体から取出し、裸のDNAプラスミドとしてベクターを導入し、次いで形質転換された細胞を体の中に再移植することができる。遺伝子治療のための裸DNAベクターを、この分野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デキストリン、リン酸カルシウム沈澱法、遺伝子ガンの使用またはDNAベクターのトランスポーターの使用により、所望の宿主細胞の中に導入することができる。例えば、下記の文献を参照のこと：Wu他、J. Biol. Chem. 267 : 963 - 67、1992 ; Wu他、J. Biol. Chem. 263 : 14621 - 24、1988。

【0237】

アンチセンスの方法を使用して、zsig81遺伝子の転写を阻害すること、例えば、in vivoにおいて細胞の増殖を阻害することができる。zsig81をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列識別NO : 1に記載するポリヌクレオチド）のセグメントに対して相補的であるポリヌクレオチドを設計して、zsig81をコードするmRNAに結合させ、かつこのようなmRNAの翻訳を阻害する。細胞培養において、または被検者において、このようなアンチセンスのポリヌクレオチドを使用して、zsig81ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害する。

【0238】

薬学的に使用するために、本発明のタンパク質は、慣用法に従い、非経口的、特に静脈内または皮下の送達のために処方される。静脈内投与は、1～数時間の典型的な期間にわたる、ボーラス注射または注入によるであろう。一般に、医薬処方物はzsig81タンパク質と、薬学上許容されるビヒクル、例えば、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、水中の5%デキストロースまたはその他との組合わせを包含するであろう。処方物は、さらに、1または2以上の賦形剤、保存剤、可溶化剤、緩衝化剤、バイアル表面上のタンパク質の損失を防止するためのアルブミン、およびその他を含むことができる。処方法はこの分野においてよく知られており、そして、例えば、下記の文献に開示されている：The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro、編、Mack Publishing Company、ペンシルベニア州イーストン、第19版、1995。

【0239】

治療的投与量は一般に0.1～100 μg/kgの患者体重/日、好ましくは0.5～20 μg/kg/日の範囲であり、正確な投与量は、承認された標準に従い、治療すべき症状の特質および苛酷性、患者の体質、およびその他を考慮して、臨床医により決定される。投与量の決定は当業者のレベルの範囲内である。タンパク質は、急性治療のために、1週またはそれより短い期間にわたって、しばしば1～3日の期間にわたって投与することができるか、あるいは慢性的治療において、数カ月または数年間にわたって使用することができる。下記の非限定的実施例により、本発明をさらに例示する。

【0240】

こうして、要約すると、本発明のある態様は、配列番号2の少なくとも9つの隣接アミノ酸残基を含んでなる単離されたポリペプチド；(a) 配列番号2の残基30～44；(b) 配列番号2の残基56～70；(c) 配列番号2の残基86～94；および(d) 配列番号2の残基135～149；から成る群から選択されるアミノ酸残基の配列を含んでなる単離されたポリペプチドを包含する。さらに、ポリペプチドは配列番号2の配列番号2の残基80～94または86～100を含んでなることができる。

【0241】

本発明の単離されたポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基30～149に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸残基の配列を含んでなることができるが、また、配列番号2の残基5～156を含んでなるアミノ酸残基の配列トランケート分子を包含する。他の態様は配列番号2の残基1～156を含んでなるアミノ酸残基の配列を含んでなる成熟ポリペプチドおよび配列番号2の残基17～156を含んでなる一次翻訳産物を包含する。

【0242】

他の態様において、本発明は、少なくとも2つのポリペプチドを含んでなる融合タンパク質を包含し、ここで第1ポリペプチドは、(a) 配列番号2の残基30～44；(b) 配列番号2の残基56～70；(c) 配列番号2の残基86～94；および(d) 配列番号2の残基135～149；から成る群から選択される。他の面において、融合タンパク質の第2ポリペプチドは他のサイトカインの機能的フラグメント、抗体、

またはトキシン複合体から選択される。

【0243】

他の面において、ペプチド結合により結合された第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとを含んでなり、前記第1ポリペプチドがシグナル配列を含んでなり、そして第2ポリペプチドが配列番号2に示すアミノ酸残基30～149アミノ酸の配列を含んでなる、融合タンパク質が提供される。他の態様は、ペプチド結合により結合された第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとを含んでなる融合タンパク質を包含し、ここで前記第1ポリペプチドはマルトース結合性タンパク質であり、ペプチド結合は因子Xa切断部位、トロンビン切断部位またはエンテロキナーゼ切断部位から成る群から選択され、そして第2ポリペプチドは配列番号2に示すアミノ酸残基30～149アミノ酸の配列を含んでなる。

【0244】

他の態様において、本発明は、

- (a) 配列番号2の残基30～44；
- (b) 配列番号2の残基56～70；
- (c) 配列番号2の残基86～94；および
- (d) 配列番号2の残基135～149；

から成る群から選択されるアミノ酸残基の配列と、薬学上許容されるベヒクルとを含んでなる医薬組成物を包含する。

【0245】

また、本発明において、

- (a) 配列番号2の残基30～44；
- (b) 配列番号2の残基56～70；
- (c) 配列番号2の残基86～94；または
- (d) 配列番号2の残基135～149；を含んでな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に関する態様が提供される。

【0246】

他の面において、本発明は、

- (a) 配列番号1のヌクレオチド272～316；

- (b) 配列番号1のヌクレオチド350～394；
 - (c) 配列番号1のヌクレオチド440～466；または
 - (d) 配列番号1のヌクレオチド587～631；を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、および
- (a) 配列番号5のヌクレオチド139～183；
 - (b) 配列番号5のヌクレオチド216～261；
 - (c) 配列番号5のヌクレオチド307～331；または
 - (d) 配列番号5のヌクレオチド454～499；を含んでなるポリヌクレオチドを包含する。

【0247】

本発明の他の態様は、配列番号2のアミノ酸残基30～149に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸残基の配列を含んでな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を包含する。

他の態様において、本発明は、本明細書に記載するzsig81ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター、およびそれらの発現ベクターを含有する培養された細胞を包含する。

【0248】

また、DNAセグメントが発現されかつポリペプチドが産生される条件下に、zsig81を発現する細胞を培養し；そしてポリペプチドを単離する；工程を含むポリペプチドを製造する方法が包含される。

【0249】

他の態様は、zsig81ポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含する。

本発明の他の態様は、zsig81の非存在下に培養した骨髄または末梢血細胞に比較して骨髄または末梢血細胞中の造血細胞の数を増加させるために十分な量のzsig81ポリペプチドを含んでなる組成物とともに、骨髄または末梢血細胞を培養することを含む、造血細胞および造血細胞子孫を拡大する方法を包含する。さらに、造血細胞および造血細胞子孫はリンパ系細胞または骨髄性細胞であることができる。造血細胞および造血細胞子孫が樹枝状細胞であることが特に重要である。

【0250】

他の態様において、本発明は、

- (1) 抗原特異的抗体のレベルを測定し；
- (2) 薬学上許容されるベヒクルの中にzsig81ポリペプチドを含んでなる組成物を投与し；
- (3) 抗原特異的抗体の投与後のレベルを測定し；
- (4) 工程(1)における抗体レベルを工程(3)における抗体レベルと比較することを含んでなり、ここで抗体レベルの変化は免疫応答のモジュレーションを示す；抗原に対して暴露された哺乳動物における免疫応答をモジュレートする方法を包含する。

【0251】

他の態様は、工程：(a)ハイブリダイゼーション条件下にzsig81核酸プローブを(i)生物学的試料から単離された被験RNA分子、または(ii)単離されたRNA分子から合成された核酸分子と接触させ、ここで前記プローブは請求項20に記載の核酸分子のヌクレオチド配列、またはその補体を有し；そして(b)核酸プローブと被験RNA分子または合成された核酸分子とのハイブリッドの形成を検出し、ここでハイブリッドの存在は生物学的試料中のzsig81の存在を示す；を含む、生物学的試料中のzsig81 RNAの存在を検出する方法を包含する。

【0252】

本発明の他の態様は、工程：

- (a) 生物学的試料を請求項24に記載の抗体または抗体フラグメントと接触させ、ここで生物学的試料に対する抗体または抗体フラグメントの結合を可能とする条件下に、前記接触を実行し；そして
- (b) 結合した抗体または結合した抗体フラグメントを検出する；を含む、生物学的試料中のzsig81の存在を検出する方法を包含する。

【0253】

他の態様において、本発明は、工程：

- (1) 哺乳動物から造血細胞を単離し；
- (2) 単離された造血細胞を腫瘍抗原に対して暴露し；
- (3) 配列番号2の少なくとも9つのアミノ酸残基の単離されたポリペプチドポ

リペプチドを含んでなる組成物中で前記暴露された細胞を培養し；そして

(4) 培養した細胞を哺乳動物に投与して戻す；

を含む、腫瘍抗原に対する抗原応答を刺激する方法を包含する。

下記の非限定的実施例により、本発明をさらに例示する。

【0254】

実施例

実施例1. zsig81のノザン分析

ヒト多重組織プロット (Human Multiple Tissue Blots) I、IIIおよびIV (Clontech、カリフォルニア州パロアルト) を使用してノザン分析を実行した。製造業者の示唆に従いREDIPRIMETM標識化キット (Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ) を使用して放射能標識化された、プライマーとしてZC21621およびZC21622 (それぞれ配列番号10および11) および鋳型としてzsig81から作られたゲル精製PCR生成物から、プローブを発生させた。NUCTRAPプッシュカラム (Stratagene) を使用して、プローブを精製した。EXPRESSHYBTM (Clontech) 溶液をプレハイブリダイゼーションのために使用し、そして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。

【0255】

ハイブリダイゼーションを65 °Cにおいて一夜実施し、次いでプロットを室温において2×SSCおよび0.05%SDS中で洗浄し、次いで50 °Cにおいて0.1×SSCおよび0.1%SDS中で洗浄した。1つの主要な転写物がほぼ5.0kbおよび1.7kbのサイズにおいて観測された。より大きいメッセージは3'非翻訳領域のほぼ2.5kbを含有することが測定された。シグナルは心臓および肝臓の中に存在し、肺、腎臓、胃、甲状腺、脊髄、気管、子宮、小腸および結腸の組織における発現は減少した。また、前述したヒトRNAマスタープロット (Clontech) を使用して、zsig81の発現を検査した。心臓組織内において、クロンテク・カージオバスクラー (Clontech Cardiovascular) MTNプロットを使用すると、zsig81は平滑筋大動脈に局在化し、そしてmRNAを一次培養細胞から単離した。

【0256】

実施例2. ヒトzsig81染色体位置のマッピング

商業的に入手可能な ジーンブリッジ4放射線ハイブリッドパネル (GeneBridge 4 Radiation Hybrid Panel) (Research Genetics, Inc., アラバマ州ハンツヴィレ) を使用して、zsig81は染色体7にマッピングされた。ジーンブリッジ4放射線ハイブリッドパネルは、93のラディエーション・ハイブリッド・クローンの各々からのDNAと、2つの対照DNA (HFLドナーおよびA23レシピエント) を含有した。公衆に入手可能なWWWサーバー (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) は、ジーンブリッジ4放射線ハイブリッドパネルを使用して構築されたヒトゲノムのゲノム・リサーチの放射線ハイブリッド地図 (WICGR 放射線ハイブリッド地図) についてのホワイトヘッド・インスティテュート/MITセンターに関してマッピングを可能とした。

【0257】

ジーンブリッジ4RHハイブリッドパネル を使用するzsig81のマッピングのために、20 μ lの反応物を96ウェルのマイクロタイタープレート (Stratagene、カリフォルニア州ラジョラ) 中で構成し、 ロボサイクラー・グラディエント (RoboCycler Gradient) 96 サーマルサイクラー (Stratagene) 中で使用した。

【0258】

95のPCR反応物の各々は、2 μ lの10 \times KlenTaqPCR反応緩衝液 (CLONTECH Laboratories, Inc., カリフォルニア州パロアルト)、1.6 μ lのdNTP混合物 (2.5mMの各々、PERKIN - ELMER、フォスターシティー、カリフォルニア州)、1 μ lのセンスプライマー、ZC22801 (配列番号12)、1 μ lのアンチセンス、ZC22802 (配列番号13)、2 μ lの レディロード (RrediLoad) (Research Genetics, Inc., アラバマ州ハンツヴィレ)、0.4 μ lの50 \times アドバンテージ・クレンタク・ポリメラーゼ混合物 (Advantage KlenTaq Polymerase Mix) (Clontech Laboratories, Inc.)、25ngの個々のハイブリッドクローンまたは対照からのDNAおよび全体積を20 μ lとするddH₂Oから成っていた。

【0259】

反応物に等モル量の鉱油をオーバーレイし、シールした。PCRサイクラー条件は次の通りであった：初期の95 における5分の変性、35サイクルの95 における1分の変性、56 における1分のアニーリングおよび72 における1.5分のエク

ステンション、および引き続く最後の72 における7分のエクステンション。2%アガロースゲル (GIBCO BRL Life Technology、マリアランド州ガイサースバーグ) 上のクロマトグラフィーにより、反応物を分離した。

【0260】

結果により、zsig81はWICGR染色体7WICGR放射線ハイブリッド地図上のフレームワークマーカ-D7S12から8.12cR_3000にマッピングされることが示された。近接および遠位のフレームワークマーカは、それぞれ、D7S512およびWI - 5478であった。取り囲むマーカを使用すると、zsig81を統合されたLDB染色体7地図上の7q32 - q33領域の中に位置決定する (The Genetic Location Database、University of Southampton、WWWサーバー : http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/)。

【0261】

実施例3. マウスzsig81についての組織分布

プローブをマウスzsig81の全長のポリヌクレオチド配列から構築し、マウス多重組織ノザン、マウス分布およびマウス胚ノザン (Clontech) 上でmRNA組織分布を同定した。製造業者の示唆に従いREDIPRIMETM標識化キット (Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ) を使用して、プローブを放射能標識化した。NUCTRAPプッシュカラム (Stratagene) を使用して、プローブを精製した。EXPRESSHYB^TM (Clontech) 溶液をプレハイブリダイゼーションのために使用し、そして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。

【0262】

ハイブリダイゼーションを65 において一夜実施し、次いでプロットを室温において2×SSCおよび0.05%SDS中で洗浄し、次いで65 において0.1×SSCおよび0.1%SDS中で洗浄した。1つの主要な転写物がほぼ5.0kbおよび1.7kbのサイズにおいて観測された。シグナルは成体組織において肝臓、脳および肺の中に存在した。胚性組織において、mRNAの発現は第15日に最高であり、次いで第17日に発現は減少した。

【0263】

実施例4. マウスzsig81の染色体マッピング

商業的に入手可能なT31全ゲノム放射線ハイブリッド(WGRH)パネル(Research Genetics, Inc., アラバマ州ハンツヴィレ)およびマップ・マネージャー(Map Manager)QT連鎖分析プログラムを使用して、ネズミzsig81をマウスにおいてマッピングした。P=0.0001において、ネズミZsig81は13.3のLODスコアでマーカーD12Mit201に連鎖した。これは、zsig81のヒト型がマッピングされた染色体7の領域とともに、シンテニーまたは連鎖保存の既知の領域のより低いボーターに存在する。

【0264】

T31 WGRHパネルは、100の放射線ハイブリッドクローンおよび2つの対照DNA(129aaドナーおよびA23レシピエント)の各々からのDNAを含有する。T31 WGRHパネルを使用するマウスzsig81のマッピングのために、の対照DNA(129aaドナーおよびA23レシピエント)の各々からのDNAを含有する。20 μ lの反応物を96ウェルのマイクロタイタープレート(Stratagene、カリフォルニア州ラジョラ)中で構成し、ロボサイクラー・グラディエント96 サーマルサイクラー(Stratagene)中で使用した。

【0265】

102のPCR反応物の各々は、2 μ lの10 \times KlenTaqPCR反応緩衝液(CLONTECH Laboratories, Inc., カリフォルニア州パロアルト)、1.6 μ lのdNTP混合物(2.5mMの各々、PERKIN-ELMER、フォスターシティー、カリフォルニア州)、1 μ lのセンスプライマー、ZC21229(配列番号18)、1 μ lのアンチセンス、ZC21711(配列番号19)、2 μ lのレディロード(Research Genetics, Inc., アラバマ州ハンツヴィレ)、0.4 μ lの50 \times アドバンテージ・クレンタク・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または対照からのDNAおよび全体積を20 μ lとするddH₂Oから成っていた。

【0266】

反応物に等モル量の鉱油をオーバーレイし、シールした。PCRサイクラー条件は次の通りであった：初期の94における5分の変性、35サイクルの94における45秒の変性、62における45秒のアニーリングおよび72における1分15秒のエクステンション、および引き続く最後の72における7分のエクステンション

。2%アガロースゲル (GIBCO BRL Life Technology、マリイランド州ガイサーバーグ) 上のクロマトグラフィーにより、反応物を分離した。

【0267】

実施例5. zsig81の発現構築物

A. 哺乳動物の発現構築物

zsig81をコードするポリヌクレオチドのすべてまたは一部分を含有する発現プラスミドを相動的組換えにより構築する。zsig81 cDNAのフラグメントは配列番号1のヌクレオチド1~ヌクレオチド472のポリヌクレオチド配列を含み、5'および3'末端におけるフランキング領域はzsig81挿入点をフランキングするベクター配列に対応する。PCRプライマーの各々は5'から3'末端に向かって40bpのベクターからのフランキング配列およびzsig81のオープンリーディングフレームからのアミノおよびカルボキシル末端に対応する17bpを含む。

【0268】

100 μ lのPCR反応物の10 μ lを分析用1 \times TBE緩衝液 (Seaplaque GTG) で0.8%LMPアガロースゲル上に展開する。PCR反応物の残りの90 μ lを5 μ lの1M NaClおよび250 μ lの無水エタノールの添加により沈殿させる。プラスミドpCZR199をSmaIで切断した。pRS316 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、バージニア州20110 - 2209マナッサス、ユニバーシティ・ブールバード10801に受託され、No. 77145と表示された) から取った酵母遺伝学的因子を使用してpZP9 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、バージニア州20110 - 2209マナッサス、ユニバーシティ・ブールバード10801に受託され、No. 98668と表示された) から、プラスミドpCZR199を構築した。

【0269】

pCZR199は哺乳動物の発現ベクターであり、マウスメタロチオネイン - 1プロモーター、コーディング配列を挿入するための多重制限部位、停止コドンおよびヒト成長ホルモントーミネーターを有する発現カセットを含有する。また、このプラスミドは大腸菌 (*E. coli*) 複製起点、SV40プロモーター、エンハンサーおよび複製起点を有する哺乳動物の選択可能なマーカー発現ユニット、DHFR遺伝子、SV40ターミネーター、ならびにサッカロマイセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*

)における選択および複製に必要なURA3およびCEN - ARS配列を有する。

【0270】

100 μ lのコンピテント酵母細胞 (*S. cerevisiae*) を独立的に上記からの10 μ lの種々のDNA混合物と組合わせ、0.2cmのエレクトロポレーションキュベットに移す。酵母/DNA混合物を0.75kV (5kV/cm)、オーム、24 μ Fにおいてエレクトロポレートする。各キュベットに600 μ lの1.2Mソルビトールを添加し、酵母を2 \times 300 μ lのアリコートで2つのURA - Dプレート上にプレートし、30 においてインキュベートする。約48時間後、単一プレートからのUra+酵母形質転換体を1mlのH₂Oの中に再懸濁させ、短時間回転して酵母細胞をペレット化する。

【0271】

細胞ペレットを2mlの溶解緩衝液 (2%トリトンX - 100、1%SDS、100mM NaCl、10mM Tris、pH8.0、1mM EDTA) の中に再懸濁させる。300 μ lの酸洗浄したガラスビーズおよび200 μ lのフェノール - クロロホルムを含有するエッペンドルフ管に500 μ lの溶解混合物を添加し、1分の間隔で2または3回渦形成し、次いでエッペンドルフ遠心機中で最大速度で5分間回転する。300 μ lの水性相を新鮮な管に移し、600 μ lのエタノール (EtOH) でDNAを沈殿させ、次いで4 において10分間遠心する。DNAペレットを10 μ lのH₂Oの中に再懸濁させる。

【0272】

0.5~2mlの酵母DNAプレプおよび40 μ lのDH10B細胞を使用して、エレクトロコンピテント大腸菌 (*E. coli*) 細胞 (DH10B、GibcoBRL) の形質転換を実施する。細胞を1.7kVおよび400オームにおいてエレクトロポレートする。エレクトロポレーション後、1mlのSOC (2%Bacto Tryptone (Difco、ミシガン州デトロイト)、0.5%酵母エキス (Difco)、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、20mM グルコース) を250 μ lのアリコートで4LB AMPプレート (LBブロス (Lennox)、1.8%バクト寒天 (Difco)、100mg/l アンピシリン) 上にプレートする。

【0273】

zsig81の正しい発現構築物を収容する個々のクローンを制限消化により同定して、zsig81インサートの存在を確認し、種々のDNA配列が互いに正しく結合され

たことを確認する。陽性クローンのインサートを配列分析する。クイアゲン・マクシ (Qiagen Maxi) キット (Qiagen) を製造業者のインストラクションに従いを使用して、より大きい規模のプラスミドを単離する。

【0274】

B. バキュロウイルスの発現構築物

pzBV / zSig81.CF (バキュロウイルスの発現ベクター) の構築

発現ベクターpZBVhzSig81を調製して、昆虫細胞中でヒトzsig81ポリペプチドを発現させた。プライマーzc26461 (配列番号21) およびzc26475 (配列番号22) を使用してヒトzSig81 cDNA (pcDNA3d2 hzsig81 - CF) を含有するプラスミドからPCR増幅により、ヒトzsig81のための配列およびC末端のFLAGタグ (配列番号20) のコーディング配列およびそれぞれ5'および3'末端上のコード化BspE1およびXbaI制限部位を含有する483bpのフラグメントを発生させた。PCR反応条件は次の通りであった: 25サイクルの94 における1分間、58 における1分間、および72 における2分間; 1サイクルの72 における10分間; 次いで4 のソーキング。

【0275】

消化したベクターをゲル電気泳動、0.8%アガロース (EM Science、ニュージャージー州ギップスタウン) により可視化し、クイアクイック (Qiaquick) ゲル抽出キット (Qiagen、カリフォルニア州バレンシア) を使用して精製した。約20 ngの精製したヒトzSig81フラグメントを室温において一夜約5ngの精製したpzBV3 Lベクターに結合させた。1 μ lの結合混合物をエレクトロコンピテントDH10B細胞 (Life Technologies、マリイランド州ガイサースバーグ) の中に形質転換した。8つのクローンを取り上げ、LB / Ampブロス中で一夜成長させた。

【0276】

クローンからのプラスミドをクイアプレブ (Qiaprep) (Qiagen、カリフォルニア州バレンシア) ミニプレブキットにより精製した。5'プライマーZC2359 (配列番号23) および3'プライマーZC12581 (配列番号24) を使用するPCRにより、クローンをインサートについて分析した。各ミニプレブを蒸留した無菌の水で1:100に希釈し、1 μ lを50 μ lの反応に使用した (試薬; Life Technologies、マリ

イランド州ガイサースバーグ)。20 μ lの各反応物をゲル電気泳動、1%アガロースにより可視化した。クローン#1を細胞DH10Bacの中に形質転換して「バクミド (Bacmid)」を産生した。

【0277】

ネズミzSig81ceeのパキキュロウイルスの発現構築物

イクスパンド・ハイ・ファイデリティ (Expand High Fidelity) PCRシステム (Boehringer Mannheim、インジアナ州インジアナポリス) を製造業者の使用説明書に従い利用して、プライマーZC23433 (配列番号25) およびZC23434 (配列番号26) を使用して、ネズミzSig81 cDNA (前述) を含有するプラスミドから、PCR増幅により、ネズミzSig81の配列およびそれぞれ5'および3'末端上のコード化BamHIおよびXbaIを含有する549bpのフラグメントを発生させた。

【0278】

PCR反応条件は次の通りであった：1サイクルの94^oにおける4分間、次いで25サイクルの94^oにおける45秒間、50^oにおける45秒間、および72^oにおける2分間；1サイクルの72^oにおける10分間；次いで10^oのソーキング。PCR生成物をゲル電気泳動 (1%NuSieveアガロース) により可視化した。フラグメントの残部を沈殿させ、5 μ lのH₂Oの中に再懸濁させた。次いでフラグメントを50 μ lの体積において37^oにおいてBamHIおよびXbaI制限酵素で3時間消化し、次いで前述したようにアガロースゲル上で展開した。約17.5ngの制限消化したzSig81Mインサートおよび53.8ngの対応するベクターを16^oにおいて一夜結合した。

【0279】

発現ベクターpZBV37L hzSig81の構築

発現ベクターpZBV37L hzSig81を調製して、昆虫細胞中でヒトzSig81を発現させた。プライマーZC26461 (配列番号21) およびZC26462 (配列番号22) を使用して、ヒトzSig81 cDNA (pcDNA3d2 hzSig81 - CF) からPCR増幅により、ヒトzSig81の配列およびC末端のglu - gluタグのコーディング配列およびそれぞれ5'および3'末端上のBspE1およびXbaI制限部位を含有する483bpのフラグメントを発生させた。

【0280】

PCR反応条件は次の通りであった：25サイクルの94 における1分間、58 における1分間、および72 における2分間；1サイクルの72 における10分間；次いで4 のソーキング。フラグメントを1%ゲル電気泳動により可視化した。バンドを切除し、QIAquickゲル抽出キット（Qiagen）を使用して精製し、BspE1 / XbaI 消化バキュロウイルスの発現ベクターpZBV37Lの中に結合した。pZBV37LベクターはpFastBacITM（Life Technologies）発現ベクターの修飾物であり、ここでポリヘドロンプロモーターは除去され、後期活性化塩基性タンパク質プロモーターおよびEGTリーダーと置換した。hzSig81制限消化フラグメントおよびpZBV37Lベクターを4：1の比で室温において一夜結合させた。クローンを前述したように調製した。

【0281】

バクミドの産生

5 μ lの前述の発現ベクターを製造業者の使用説明書に従い50 μ lのDH10Bac Max効率コンピテント細胞（GIBCO - BRL、マリイランド州ガイサースバーグ）の中に形質転換した。色選択を使用して、プラスミド（「バクミド」と呼ぶ）の中に組込まれたヒトzsig81エンコーディングドナーインサートを有する細胞を同定した。白色であるクローンを分析のために取り上げた。QiaVacミニプレブ8システム（Qiagen、カリフォルニア州バレンシア）を製造業者の指示に従い使用して、バクミドDNAを陽性コロニーから単離した。

【0282】

プライマーZC447（配列番号27）およびZC976（配列番号28）を使用するPCRにより、バクミド中の転位可能な因子に対するプライマーを使用してDNAを増幅することによって、クローンを正しいインサートについてスクリーニングした。PCR反応条件は次の通りであった：35サイクルの94 における45秒間、50 における45秒間、および72 における5分間；1サイクルの72 における10分間；次いで4 のソーキング。PCR生成物を1%アガロースゲル上で展開してインサートのサイズを検査した。正しいインサートを有するものを使用して、スポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）（Sf9）細胞をトランスフェクトした。

【0283】

製造業者の使用説明書に従い42 の水浴中で45秒間熱ショックすることによって、1 μ lの陽性クローンを20 μ lのDH10Bac Max効率コンピテント細胞 (GIBCO - BRL、マリイランド州ガイサースバーグ) の中に形質転換した。次いで形質転換された細胞を980 μ lのSOC培地 (2%BactoTMTryptone、0.5%BactoTM酵母エキス、10mlの1M NaCl、1.5mM KCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、および20mM グルコース) 中で希釈し、震盪インキュベーター中で37 °Cにおいて4時間成長させ、50 μ g/mlのカナマイシン、7 μ g/mlのゲンタマイシン (Life Technologies)、10 μ g/mlのテトラサイクリン、IPTG (Pharmacia Biotech) およびBluo - Gal (Life Technologies) を含有するLuria Agarプレート上にプレートした。プレートした細胞を37 °Cにおいて48時間インキュベートした。

【0284】

色選択を使用して、プラスミド (「バクミド」と呼ぶ) の中に組み込まれたヒト zsig81エンコーディングドナーインサートを有する細胞を同定した。白色であるクローンを分析のために取り上げ、プライマーZC447 (配列番号27) およびZC976 (配列番号28) を使用するPCRにより、バクミド中の転位可能な因子に対するプライマーを使用して分析した。PCR反応条件は次の通りであった: 35サイクルの94 °Cにおける45秒間、50 °Cにおける45秒間、および72 °Cにおける5分間; 1サイクルの72 °Cにおける10分間; 次いで4 °Cのソーキング。PCR生成物を1%アガロースゲル上で展開してインサートのサイズを検査した。正しいインサートを有するクローンを使用して、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 細胞をトランスフェクトした。

【0285】

C. 大腸菌 (*E. coli*) 中のヒト zsig81の発現

zsig81 - MBP融合発現ベクターPTAP98 / zsig81の構築

N末端においてマルトース結合性タンパク質 (MBP) に融合したヒト zsig81のポリヌクレオチドのエンコーディング部分を含有する発現プラスミドを相動的組換えにより構築した。PCRを使用して、ヒト zsig81 cDNA (配列番号29) のフラグメントを単離した。

【0286】

PCR反応によりヒトzsig81フラグメントの製造において、2つのプライマーを使用した：(1)プライマーZC22990(配列番号30)、40bpのベクターフランキンゲ配列およびヒトzsig81のアミノ末端に対応する24bpを含有する、および(2)プライマーZC22991(配列番号31)、40bpのフランキンゲベクター配列に対応する3'末端およびヒトzsig81のカルボキシル末端に対応する21bpを含有する。

【0287】

PCR反応条件は次の通りであった：25サイクルの94℃における30秒間、55℃における30秒間、および72℃における2分間；次いで4℃のソーキング、二重反復試験において実験した。100μlのPCR反応物の2μlを分析のために1.0%アガロースゲル上で展開し、1×TBE緩衝液を使用し、ほぼ500bpのフラグメントの期待されるバンドが見られた。PCR反応物の残りの90μlを400μlの無水エタノールで沈殿させた第2PCR管と組み合わせ、後述するように、SmaI切断したレシピエントベクターpTAP98の中に組換えて、MBP-zsig81融合物をコードする構築物を産生した。

【0288】

プラスミドpRS316およびpMAL-c2から、プラスミドpTAP98を誘導した。プラスミドpRS316は、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)シャトルベクター(Hieter P.およびSikorski, R., *Genetics* 122:19-27, 1989)である。pMAL-C2は大腸菌(*E. coli*)の発現ベクターである。それはMalE(MBPをコードする遺伝子)を推進するtacプロモーターおよび引き続くHisタグ、トロンピン切断部位、クローニング部位、およびrrnBターミネーターを担持する。酵母相同的組換えを使用して、pTAP98を構築した。

【0289】

100ngのEcoRI切断pMAL-c2を1μgのPvuI切断pRS316、1μgのリンカー、および1μgのSmaI/EcoRI切断pRS316で組換えた。リンカーはPCR反応において組合わされた100pmoleのZC19372(配列番号32)；1pmoleのZC19351(配列番号33)；1pmoleのZC19352(配列番号34)；および100pmoleのZC19371(配列番号35)から成っていた。条件は次の通りであった：10サイクルの94℃における30秒間、50℃における30秒間、および72℃における30秒間；次いで4℃のソーキング。100%エタノ

ール沈殿により、PCR生成物を濃縮した。

【0290】

ほぼ1 μ gのヒトzsig81インサート、および100ngのSmaI消化pTAP98ベクターを含有する10 μ lの混合物と100 μ lのコンピテント酵母細胞サッカロマイセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) を組合わせ、0.2cmのエレクトロポレートキュベットに移した。酵母/DNA混合物を0.75kV (5kV/cm)、無限オーム、25 μ Fにおいてエレクトロパルスした。各キュベットに600 μ lの1.2Mのソルビトールを添加した。次いで酵母を2つの300 μ lのアリコートで2つのURA⁻Dプレート上にプレートし、30^oCにおいてインキュベートした。

【0291】

約48時間後、単一プレートからのUra⁺酵母形質転換体を1mlのH₂Oの中に再懸濁させ、短時間回転して酵母細胞をペレット化する。細胞ペレットを1mlの溶解緩衝液 (2%トリトンX-100、1%SDS、100mM NaCl、10mM Tris、pH8.0、1mM EDTA) の中に再懸濁させる。300 μ lの酸洗浄したガラスビーズおよび200 μ lのフェノール-クロロホルムを含有するエッペンドルフ管に500 μ lの溶解混合物を添加し、1分の間隔で2または3回渦形成し、次いでエッペンドルフ遠心機中で最大速度で5分間回転した。300 μ lの水性相を新鮮な管に移し、600 μ lのエタノール (EtOH) でDNAを沈殿させ、次いで4^oCにおいて10分間遠心した。DNAペレットを100 μ lのH₂Oの中に再懸濁させた。

【0292】

1 μ lの酵母DNAプレップおよび40 μ lのMC1061細胞を使用して、エレクトロコンピテント大腸菌 (*E. coli*) 細胞 (MC1061、Casadaban他、*J. Mol. Biol.* 138 : 179 - 207) の形質転換を実施した。細胞を2.0kV、25 μ Fおよび400オームにおいてエレクトロパルスした。エレクトロポレーション後、0.6mlのSOC (2%Bacto Tryptone (Difco、ミシガン州デトロイト)、0.5%酵母エキス (Difco)、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、20mM グルコース) を1つのアリコートでLB AMPプレート (LBプロス (Lennox)、1.8%BactoTM寒天 (Difco)、100mg/l アンピシリン) 上にプレートした。

【0293】

オリゴヌクレオチドZC22990 (配列番号30) およびZC22991 (配列番号31) を使用するPCRスクリーニングにより、ヒトzsig81の正しい発現構築物を収容する個々のクローンを同定した。反応条件は次の通りであった: 35サイクルの94 における30秒間; 50 における30秒間; 72 における1分間; 次いで4 のソーキング。アガロースゲル電気泳動を使用して見られる約500bpのバンドを産生する陽性クローンのうちで、4つを発現によりさらにスクリーニングした。100 µg/mlのアンピシリンを含むスーパーブロス (Superbroth) II中で細胞を成長させた。50 µlの一夜の培養物を使用して、2mlの新鮮なスーパーブロスII + 100 µg/mlのアンピシリンを接種した。

【0294】

培養物を37 において成長させ、2時間震盪させた。1mlの培養物を1mMのIPTGで誘導した。2~4時間後、250 µlの各培養物を250 µlの酸洗浄ガラスビーズおよび250 µlのトナー (Thorner) 緩衝液および5%BMEおよび色素 (8M 尿素、100 mM Tris pH7.0、10%グリセロール、2mM EDTA、5%SDS) と混合した。試料を1分間渦形成し、65 に10分間加熱した。20 µl / レーンを4%~12%PAGEゲル (NOVEX) 上に負荷した。ゲルを1×MES緩衝液中で展開した。陽性クローンを配列分析した。正しいクローンをpTAP139と表示した。

【0295】

実施例6. zsig81の発現

A. zsig81の哺乳動物の発現

CHO DG44 (Chasin他、Somat. Cell Mol. Genet. 12:555-666, 1986) を10cmの培養皿の中に入れ、37 、5%CO₂においてハムF12/FBS培地 (Ham's F12培地 (Gibco BRL、マリイランド州ガイサースバーグ)、5%胎仔ウシ血清 (Hyclone、ユタ州ローガン)、1%L-グルタミン (JRH Biosciences、カンサス州レネクサ)、1%ピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL)) 中で一夜ほぼ50~70%のコンフルエンスに成長させる。

【0296】

次いで無血清 (SF) 培地処方物 (Ham's F12、10mg/mlのトランスフェリン、5mg/mlのインスリン、2mg/mlのフェツイン、1%L-グルタミンおよび1%ピル

ビン酸ナトリウム) 中でLipofectamine™ (Gibco BRL) を使用して、細胞をプラスミドzsig81 / pCZR199でトランスフェクトする。z lipo3 / pCZR199をSF培地で640 μ lの全最終体積に15mlの管の中に希釈する。35 μ lのLipofectamine™ (Gibco BRL) を605 μ lのSF培地と混合する。Lipofectamine™混合物をDNA混合物に添加し、室温においてほぼ30分間インキュベートする。5mlのSF培地をDNA : Lipofectamine™混合物に添加する。

【0297】

細胞を1回5mlのSF培地でリンスし、吸引し、DNA : Lipofectamine™混合物を添加する。細胞を37 °Cにおいて5時間インキュベートし、次いで6.4mlのHam's F12 / 10%FBS、1%PSN培地を各プレートに添加する。プレートを37 °Cにおいて一夜インキュベートし、次の日にDNA : Lipofectamine™混合物を新鮮なFBS / ハム培地で置換する。トランスフェクション後第2日に、細胞を150mmのプレート中で1 : 10、1 : 20および1 : 50において選択培地 (50nMのメトトレキサート (Sigma Chemical Co.、ミズリー州セントルイス) を添加した無ヌクレオチドアルファMEM / 透析したFBS培地) の中に分割する。

【0298】

細胞にトランスフェクション後第5日に新鮮な培地を再供給する。トランスフェクション後ほぼ第10日に、各トランスフェクションからのメトトレキサート耐性コロニーの2 \times 150mmの培養皿をトリプシン処理し、細胞をプールし、T - 162フラスコの中にプレートし、大規模化および希釈クローニングのために大規模の培養に移行させる。

【0299】

細胞をサブクローニングのために96ウェルの皿において選択培地中で0.5、1および5細胞 / ウェルの密度でプレートし、ほぼ2週間成長させる。ウェルを培地の蒸発について検査し、このプロセスの間において必要に応じて200 μ l / ウェルに戻す。プレート中のコロニーの大きい百分率がコンフルエンスー近くになったとき、100 μ lの培地を各ウェルからドットプロット分析について収集し、次いで新鮮な培地を供給する。上清を分布装置中のニトロセルロースフィルターに適用し、f l tを真空炉中で100 °Cにおいて処理してタンパク質を変性する。

【0300】

フィルターを625mM トリスグリシン、pH9.1、5mM メルカプトエタノール中で65 において10分間インキュベートし、次いで2.5%非脂肪ドライミルクWestern A緩衝液(0.25%ゼラチン、50mM TrisHCl、pH7.4、150mM NaCl、5mM EDTA、0.05%lgopal CA - 630)中で一夜4 において回転式震盪培養機上でインキュベートした。

【0301】

フィルターを2.5%非脂肪ドライミルクWestern A緩衝液中で抗体 - HRP複合体と室温において回転式震盪培養機上でインキュベートした。フィルターを3回室温においてPBS + 0.01%Tween - 20中で15分 / 洗浄で洗浄した。フィルターをECL試薬で製造業者(Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ)の指示に従い現像し、フィルム(Hyperfilm ECL、(Amersham))にほぼ5分間露出した。陽性クローンを96ウェルの皿からトリプシン処理し、大規模化およびウェスタンブロット分析のために選択培地中で6ウェルの皿に移す。

【0302】

B. 酵母の発現

ピキア・メタノリカ(*Pichia metanolica*)中のzsig81の発現のために、普通に譲渡されたWIP0公開WO 97/17450に記載されている発現系を利用する。zsig81をコードするポリヌクレオチドのすべてまたは一部分を含有する発現プラスミドを相動的組換えにより構築する。

【0303】

発現ベクターをpCZR190から構築して、N末端のタグドzsig81ポリペプチドを発現する。pCZR190ベクターはAUG1プロモーター、次いでaFppリーダー配列およびアミノ末端のペプチドタグ(FLAG; 配列番号20)、次いで平滑末端のSmaI制限部位、翻訳STOPコドン、次いでAUG1ターミネーター、ADE2選択可能なマーカー、および最後にAUG1 3'非翻訳領域を含有する。また、このベクターの中には、サッカロマイセス・セレビスエ(*S. cerevisiae*)中の選択および複製に必要なUR A3およびCEN - ARS配列、および大腸菌(*E. coli*)中の選択および複製に必要なAmpRおよびcolEi ori配列が含まれる。各構築物のために、2つのリンカーを調

製し、zsig81と一緒に、本明細書に記載する酵母発現ベクターの中に相同的に組換える。

【0304】

100 μ lのコンピテント酵母細胞 (*S. cerevisiae*) を上記からの10 μ lの種々のDNA混合物と独立的に組合わせ、0.2cmのエレクトロポレートキュベットに移す。酵母/DNA混合物を0.75kV (5kV/cm)、オーム、25 μ Fにおいてエレクトロパルスする。各キュベットに、600 μ lの1.2Mのソルビトールを添加し、酵母を2 \times 300 μ lのアリコートで2つのURA-Dプレート上にプレートし、30 においてインキュベートする。

【0305】

約48時間後、単一プレートからのUra+酵母形質転換体を1mlのH₂Oの中に再懸濁させ、短時間回転して酵母細胞をペレット化する。細胞ペレットを1mlの溶解緩衝液 (2%トリトンX-100、1%SDS、100mM NaCl、10mM Tris、pH8.0、1mM EDTA) の中に再懸濁させる。300 μ lの酸洗浄したガラスビーズおよび200 μ lのフェノール-クロロホルムを含有するエッペンドルフ管に500 μ lの溶解混合物を添加し、1分の間隔で2または3回渦形成し、次いでエッペンドルフ遠心機中で最大速度で5分間回転する。300 μ lの水性相を新鮮な管に移し、600 μ lのエタノール (EtOH) でDNAを沈殿させ、次いで4 において10分間遠心する。DNAペレットを10 μ lのH₂Oの中に再懸濁させた。

【0306】

0.5~2 μ lの酵母DNAプレプおよび40 μ lのDH10B細胞を使用して、エレクトロコンピテント大腸菌 (*E. coli*) 細胞 (DH10B、GibcoBRL) の形質転換を実施する。細胞を2.0kV、25 μ Fおよび400オームにおいてエレクトロパルスする。エレクトロポレーション後、1mlのSOC (2%Bacto' Tryptone (Difco、ミシガン州デトロイト)、0.5%酵母エキス (Difco)、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、20mM グルコース) を250 μ lのアリコートで4 \times LB AMPプレート (LBプロス (Lennox)、1.8%Bacto'寒天 (Difco)、100mg/l アンピシリン) 上にプレートする。

【0307】

zsig81の正しい発現構築物を収容する個々のクローンをPCR分析または制限消化により同定して、zsig81インサートの存在を確認し、互いに正しく結合された種々のDNA配列を確認する。陽性クローンのインサートを配列分析する。より大きい規模のプラスミドDNAをクイアゲン・マクシ (Qiagen Maxi) キット (Qiagen) を製造業者の使用説明書に従いを使用して単離し、DNAをNotIで消化してPichia - zsig81発現カセットをベクターのバックボーンから遊離させる。次いでNotI制限消化DNAフラグメントをピキア・メタノリカ (Pichia metanolica) 発現宿主、PMAD16の中に形質転換する。

【0308】

これは100mlの調製したコンピテントPMAD16細胞を10 µgのNotI制限消化zsig81と混合し、0.2cmのエレクトロポレートキュベットに移すことによって実施する。酵母/DNA混合物を0.75kV (5kV/cm)、オーム、25 µFにおいてエレクトロパルスする。各キュベットに、1mlの1×酵母窒素塩基を添加し、選択のために500mlのアリコートをした2つのADE DS (0.056% - Ade - Trp - Thr粉末、アミノ酸を含まない0.62%酵母窒素塩基、2%D - グルコース、0.5%200×トリプトファン、トレオニン溶液、および18.22%D - ソルビトール) プレート上にプレートし、30においてインキュベートする。クローンを取り上げ、ウェスタンブロットにより高いレベルのzsig81発現についてスクリーニングし、発酵する。

【0309】

C. zsig81のバキュロウイルス発現

pZBV / zSig81.CF (バキュロウイルスの発現ベクター) の発現

発現ベクター、pZBVhzSig81を調製して、実施例2Bに記載されているように昆虫細胞中でヒトzSig81ポリペプチドを発現させた。Sf9細胞を 1×10^6 細胞 / 35mmのプレートで播種し、27 において1時間結合させた。5 µlのバクミドDNAを100 µlのSf - 900 II SFM (Life Technologies) で希釈した。25 µlのCellFECTIN™ (Life Technologies) を100 µlのSf - 900 II SFMで希釈した。

【0310】

バクミドDNAおよび脂質溶液をおだやかに混合し、室温において30~45分間インキュベートした。細胞の1つのプレートからの培地を吸引し、細胞を1回2mlの

新鮮なSf - 900 II SFM培地で洗浄した。800 μ lのSf - 900 II SFMを脂質 - DNA混合物に添加した。洗浄培地を吸引し、DNA - 脂質混合物を細胞に添加した。細胞を27 °Cにおいて24時間インキュベートした。L - を吸引し、2mlのSf - 900 II培地を各プレートに添加した。プレートを27 °C、90%湿度において5日間インキュベートし、次いでウイルスを収集した。

【0311】

Sf9を前述したように播種し、200 μ lのトランスフェクション後の上清を添加し、培養を72時間進行させ、次いでウイルスを収集した。

Sf9を前述したように播種し、20 μ lの一次ウイルス系統を添加した。培養物を27 °Cにおいて9日間インキュベートし、次いでこの分野において知られている標準的方法に従いウイルスを収集した。

【0312】

20 μ lの二次増幅ウイルス系統をSf9上に500,000細胞/ウェルで50mlのSF900II中で250mlの体積の震盪フラスコ内で96時間プレートし、前述したようにウイルスを収集した。

抗FLAG一次モノクローナル抗体およびヤギ抗マウスHRP二次を使用するウェスタン分析により、細胞ライゼイト中の予測された分子量のタンパク質の存在を決定した。また、セファローズに複合化した抗EE抗体を使用して材料を免疫沈降させ、N末端のシグナルペプチダーゼ切断点分析に付した。

【0313】

ネズミzSig81ceeのバキュロウイルスの発現

発現ベクターを調製して、実施例5に記載されているように昆虫細胞中でネズミzSig81ポリペプチドを発現させた。トリコデルマ・ニ (*Trichoderma ni*) (Hi5) 細胞の50mlの培養物を 2.2×10^6 細胞/mlにおいて22mlの一次増幅上清で感染した。感染培養を48時間進行させ、細胞を遠心によりペレット化し、-20 °Cにおいて凍結させた。

【0314】

ペレットの低張溶解を次のようにして実施した：ペレットを融解し、2.5mlの溶解緩衝液 (0.02M Tris - HCl、pH8.3、0.001M EDTA、0.001M DTT、1mM Pef

abloc、500nM アプロチニン、4 μ M ロイペプチン、4 μ M E-64、1%NP-40)を使用して細胞を再懸濁させた。溶解を4において15分間進行させた。細胞破片を回転除去し、上清を収集し、セファローズビーズw/複合化抗EE抗体とインキュベートした。ビーズを洗浄し、シグナルペプチダーゼ切断点測定に付した。

【0315】

試料の調製：ネズミzsig81CEE試料を抗EEビーズ上に供給した。ビーズを還元性SDS PAGE試料緩衝液の中に入れ、沸騰する水浴上に配置した後、SDS PAGE上に展開した。(Novex SDS PAGE系およびサブライズ、4~12%ビス-トリスMES NuPAGE)。これらをNovex PVDF膜に電気転移させ、次いでクーマッシュブルー染色した。対応する抗EEウェスタンを実施して、どのバンドをN末端のタンパク質配列決定のために切除するかを同定した。

【0316】

ヒトzsig81CF試料を抗FLAGビーズ上に供給した。ビーズを両方の還元性および非還元性SDS PAGE試料緩衝液の中に入れ、沸騰する水浴上に配置した後、SDS PAGE上に展開した。(Novex SDS PAGE系および供給物、4~12%ビス-トリスMES NuPAGE)。これらをNovex PVDF膜に電気転移させ、次いでクーマッシュブルー染色した。対応する抗EEウェスタンを実施して、どのバンドをN末端のタンパク質配列決定のために切除するかを同定した。

【0317】

476A型および494型タンパク質配列決定システム(Perkin Elmer Applied Biosystems Division、フォスターシティー、カリフォルニア州)により、N末端の配列分析を実施した。タンパク質配列決定、バージョン2.1a(Applied Biosystems, Inc.、フォスターシティー、カリフォルニア州)のApplied Biosystems 610A型データ解析システムを使用して、データ解析を実施した。使用した大部分の供給物および試薬はアプライド・バイオシステムス・インコーポレーテッド(Applied Biosystems, Inc.)から入手した。

【0318】

予測された成熟開始はSer18のヒト前駆体型およびSer18の成熟前駆体型である

。 C末端のEEタグ（配列番号36）を有するBVからのネズミについて、1つの実験的成熟開始はSer20の前駆体型である。Arg22における他の実験的成熟開始が存在するという指示が存在する。この第2よび出しは汚染性ヒストン試料のために不明瞭である。

BVからのヒトzsig81CFは、前駆体配列のSer18における実験的成熟開始を生じ、これはまた予測された成熟開始である。この試料内において、また、少量のHis21およびMstIにおいて開始する前駆体配列が存在した。

【0319】

Arg22ヒトzsig81の発現

これらの結果およびヒトおよびネズミzSig81の相同性が開始するメチオニンから分岐し、次いでアルギニン22において収束するという観測に基づいて、我々はエクジステロイドUDP - グルカシルトランスフェラーゼ（EGT）リーダー配列を両方のヒトおよびネズミzSig81のアルギニン22に融合するバキュロウイルスの発現ベクターを調製した。

【0320】

ヒトzSig81.CEEの配列分析により、zSig81タンパク質のすべては予測されたようにプロセシングされて、成熟ペプチドのアミノ末端のアミノ酸としてArg22を残すことが明らかにされた。PAGEおよびウェスタン分析は、成熟zSig81.CEEが、単離されたとき、ほぼ50%のジサルファイド結合の二量体および50%のモノマーであることを示す。

【0321】

ヒトzsig81の細菌の実験

1 μ lのpTAP139配列決定DNAを使用して、W3110株（ATCC No. 27325）を形質転換した。細胞を2.0kV、25 μ Fおよび400オームにおいてエレクトロパルスした。エレクトロポレーション後、0.6mlのSOC（2%Bacto Tryptone（Difco、ミシガン州デトロイト）、0.5%酵母エキス（Difco）、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、20mM グルコース）を1つのアリコートでLB AMPプレート（LBプラス（Lennox）、1.8%Bacto™寒天（Difco）、100mg/l アンピシリン）上にプレートした。

【0322】

個々のコロニーを発現した。100 µg/mlのアンピシリンを含むスーパーブロス (Superbroth) II (Becton Dickinson) 中で細胞を一夜成長させた。50 µlの一夜の培養物を使用して、2mlの新鮮なスーパーブロスII + 100 µg/mlのアンピシリンを接種した。培養物を37 °Cにおいて成長させ、2時間震盪させた。1mlの培養物を1mMのIPTGで誘導した。2~4時間後、250 µlの各培養物を250 µlの酸洗浄ガラスビーズおよび250 µlのトナー (Thorner) 緩衝液および5%BMEおよび色素 (8M 尿素、100mM Tris pH7.0、10%グリセロール、2mM EDTA、5%SDS) と混合した。試料を1分間渦形成し、65 °Cに10分間加熱した。20 µl/レーンを4%~12%PAGEゲル (NOVEX) 上に負荷した。ゲルを1×MES緩衝液中で展開した。

【0323】

実施例7. zsig81のタンパク質の精製

特記しない限り、すべての操作は4 °Cにおいて実施した。引き続いて、4インチ、0.2mM ミリポア (Millipore) (マサチューセッツ州ベッドフォード) OptiCapカプセルフィルターおよび0.2mMのゲルマン (Gelman) (ミシガン州アンアーバー) Supercap 50を通して、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはベイビーハムスター腎細胞 (BHK) からの合計25リットルのコンディショニングした培地を滅菌濾過する。

【0324】

次いで3000kDaのカットオフのアミコン (Amicon) (マサチューセッツ州ベッドフォード) S10Y3膜を装備したミリポアProFlux A30接線流れ濃縮装置を使用して、この材料を約1.3リットルに濃縮した。濃縮された物質を前述したようにゲルマンフィルターで再び滅菌濾過する。プロテアーゼインヒビターの混合物を濃縮しコンディショニングした培地に2.5mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA、Sigma Chemical Co.、ミズリー州セントルイス)、0.001mM ロイペプチン (Boehringer - Mannheim、インジアナ州インジアナポリス)、0.001mM ペプスタチン (Boehringer - Mannheim) および0.4mM Pefabloc (Boehringer - Mannheim) の最終濃度に添加する。

【0325】

製造業者の使用説明書に従いカラムスクリーニングモジュールを使用するBioC ad 700E、Sprint、またはVisionワークステーション(PE Biosystems、マサチューセッツ州ファーミングム)により、タンパク質捕捉について遺伝学的スクリーニングを実施する。スクリーニング緩衝液(後述するように適当なpHに調節した25mM Tris、25mM MOPS、25mM MES、および25mM 酢酸塩)でインライン希釈することによって、濃縮したCHOのコンディショニングした培地の50mlの試料を適当なpHに調節し、順次に2~5ml/分の流速でpH4.0、5.0、および6.0において平衡化した1.7mlのPoros HS(PE Biosystems)カラム上に、pH7.0、8.0、および9.0において平衡化した1.7mlのPoros HQ(PE Biosystems)カラム上に、pH7.4において平衡化した1.7mlのPoros HE(PE Biosystems)カラム上に、そしてpH7.4および1.0~4.0MのHClにおいて平衡化した1.7mlのPoros HP2(PE Biosystems)カラム上にポンプ輸送する。

【0326】

試料を適用した後、各カラムを適当な平衡化緩衝液で洗浄し、流出液の280nmにおける吸収が0.05の下になったとき、Poros HS、HQ、およびHEカラムを段階的に1.0~2.0M NaClで溶離する。Poros HP2カラムを段階的に水で溶離する。1.0mlの画分を収集し、各カラム溶出液中のターゲットタンパク質を後述する自動化タンパク質分解的質量分析手順により同定する。この分野において知られている標準的手順に従い各溶出液画分のSDS-PAGE分析により、陽性同定物を確認する。

【0327】

いったん結合条件が特定のタンパク質について確立されると、これらの条件をその大きいバッチの精製に使用する。ターゲットタンパク質のMBP-融合物に対して向けられた抗zsig81抗体を使用するSDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングにより、精製の各工程における純度を評価する。

ウェスタンブロットまたは他の抗体に関係する方法に対して独立に、前述したように溶離されたタンパク質を検出する。所望のタンパク質の存在は、カラムの溶出液の分析により単一成分または複雑な混合物として決定し、いくつかの画分にわたって収集し、各画分の中に存在するzsig81タンパク質の量を相対的に定量

する。

【0328】

このシステムにおいて、タンパク質試料のタンパク質分解的消化（モジュール1）、クロマトグラフィーによる分離（モジュール2）および質量分析（モジュール3）の段階的組合わせを使用する。このプロセスの3つのモジュールをマニュアル的にタンパク質試料の分析に個々に使用し、最大のデータの出力を獲得するか、あるいは完全に自動化された構成において3モジュールの段階的プロセスにおいて使用して、最大の高い処理量を獲得する。

【0329】

自動化された構成において、モジュール3にオンラインで接続されたINTEGRALワークステーション（PE Biosystems、マサチューセッツ州ファーミングム）において、モジュール1および2を組合わせる。モジュール3はエレクトロスプレー源を装備したLCQイオン - トラップ質量分析器（Finnigan、カリフォルニア州サンジョーズ）である。

【0330】

データの出力を最大するために、モジュール1および2を分離し、試料のタンパク質分解的消化を自動化手順から除去する。MAGIC HPLCシステム（Michrom BioResources, Inc.、カリフォルニア州アウバーン）をモジュール3として使用する。試料をマニュアル的にまたはオートインジェクターにより注入する。モジュール3はエレクトロスプレー源を装備したLCQイオン - トラップ質量分析器である。モジュール3はモジュール2にオンラインで接続されている。

【0331】

モジュール1：タンパク質分解的消化

典型的には、試料をトリプシンでタンパク質分解的に消化するが、定められた特異性を有する他のプロテアーゼを利用することができる。必要に応じて、試料を濾過するか、あるいは遠心して、凝集物または他のタンパク質の特定の物質を除去する。ある場合において、試料を分析前に濾過によりサイズ排除工程に適用して、生ずる消化混合物を簡素化し、所望のタンパク質に関するペプチドの同定を容易にする。すべての必要な緩衝液の調節はタンパク質分解的消化前に d d o

する。

【0332】

自動化構成において、試料を固定化されたトリプシン細胞 (PE Biosystems) 上でオンラインで消化する。カラム上への注入はINTEGRALオートインジェクターにより実施し、生ずるペプチドをモジュール2でクロマトグラフィーにより分離する。

マニュアルアプローチにおいて、試料を溶液中で一夜消化し、手によるか、あるいはオートインジェクターによりモジュール2上に注入する。

【0333】

モジュール2：クロマトグラフィー的分離

ペプチドのクロマトグラフィーによる分離を1mmのID逆相 (POROS、PE Biosystems) カラム (LC - Pakings、カリフォルニア州サンフランシスコ) 上で実施する。典型的には、カラムをトリフルオロ酢酸 (TFA) / 水、TFA / アセトニトリルの勾配で溶離し、ペプチドの溶離を紫外線によりモニターする。自動化アプローチ、ならびにマニュアルアプローチにおいて、ペプチドがカラムから溶出される時、それらをモジュール3でオンラインで分析する。

【0334】

モジュール3：質量分析

「トリプルプレイ」アプローチにより、ペプチドの質量分析を実施する。第1に、カラムの溶出液が質量分析装置源の中に噴霧される時、完全な範囲の走査を実施する。前もって決定した強度限界値より上のシグナルが検出される場合、高い分解能の質量測定を提供する設定に計器をスイッチし、次いでMS / MS走査を行う。

【0335】

MS / MS走査はフラグメント化パターンを提供し、これを使用してペプチドの一次配列を誘導する。次いでペプチド配列を使用してタンパク質を同定する。典型的には、タンパク質の一次配列および特質を検索アルゴリズムSEQUEST (Finnigan) により決定する。質量分析の試料およびデータの解析を自動的に実施する。必要に応じて、ペプチド配列を誘導するデータの解釈はマニュアル的に実施し、

種々の標準的データベース検索アルゴリズムを使用してタンパク質を同定する。

1つのタンパク質について検出されたイオン強度およびペプチドの数を使用して、異なる画分中のこのタンパク質の相対的存在量を決定する。

【0336】

質量分析を観測されたすべてのイオンについて実施する場合、消化混合物中のすべての成分が分析される。分析を簡素化するために、典型的には所望のタンパク質のタンパク質分解後に期待することができるイオンのみを分析するように、質量分析は設定される。このフィルターを通して、潜在的に所望のタンパク質を少量の成分のみとして含有する、非常に複雑な混合物について分析を実施することができる。

【0337】

昆虫細胞Sf9の精製

150mM NaCl、50mM Tris (pH8.0)、1%NP-40、COMPLETETMプロテアーゼインヒビターカクテル (Roche、インジアナ州インディアナポリス) 中で4 において1時間インキュベートすることによって、ヒトzSig81.CEEを発現する、1リットルの培養物からの、発現ウイルスpZBV37LhzSig81で感染したSf9細胞を溶解した。ライゼイトを550×gで4 において遠心することによって、細胞破片を除去した。

【0338】

上清を4mlの抗EEモノクローナル抗体 / セファローズ樹脂と組み合わせ、4 において一夜インキュベートした。抗体 - 樹脂を収集し、20カラム体積の氷冷PBSで洗浄し、ヒトzsig81.CEEを1mlの100mM グリシンpH2.0で溶離した。グリシン溶出液を100mlのTris pH8.8で中和し、次いで8リットルのPBSに対して透析した。透析した溶出液は500mg / mlのタンパク質を含有し、PAGEおよびウェスタン分析によると、それらのうちのほぼ70%はヒトzsig81.CEEであった (zsig81濃度はほぼ350mg / mlであった)。

【0339】

ヒトzSig81.CEEの配列分析により、予測されるように、zSig81タンパク質のすべてはプロセッシングされ、成熟ペプチドのアミノ末端としてArg22が残ることが

明らかにされた。PAGEおよびウェスタン分析により、単離された成熟zSig81.CEEはほぼ50%のジサルファイド結合の二量体および50%のモノマーであることが示される。

【0340】

実施例8. zsig81のアデノウイルスの発現

それぞれそれぞれ5'および3'末端にFseIおよびAscIを付加するプライマーを使用するPCRにより、zsig81のタンパク質コーディング領域を増幅する。次のようなPCR反応において全長のzsig81 cDNAを含有する鋳型とともにPCRプライマーを使用する：1サイクルの95 °Cにおいて5分間；次いで15サイクルの95 °Cにおいて1分間、58 °Cにおいて1分間、および72 °Cにおいて1.5分間；次いで72 °Cにおいて7分間；次いで4 °Cのソーキング。PCR反応生成物を1.2%（低い融点）SeaPlaque GTG（FMC、メイン州ロックランド）ゲル上にTAE緩衝液中の負荷する。

【0341】

zsig81 PCR生成物をゲルから切除し、QIAquick™精製キットゲルクリーンアップキットを製造業者（Qiagen）の使用説明書に従い使用して精製する。次いでPCR生成物を消化し、フェノール/クロロホルム抽出し、EtOH沈殿させ、20mlのTE（Tris/EDTA pH8）中で再水和する。次いでzsig81フラグメントをトランスジェニックベクターpTG12-8（参照：本明細書に記載されている）のクローニング部位の中に結合し、エレクトロポレーションによりDH10Bコンピテント細胞の中に形質転換する。zsig81を含有するクローンをプラスミドDNAミニプレブおよび引き続き消化により同定する。

【0342】

zsig81 cDNAをFseIおよびAscI酵素によりpTG12-8から解放させる。cDNAを1%低い融点のSeaPlaque GTG™（FMC、メイン州ロックランド）ゲル上で単離し、次いでゲルから切除する。ゲルスライスを70 °Cにおいて溶融し、等しい体積のTris緩衝化フェノールで2回抽出し、EtOH沈殿させる。DNAを10 μlのH₂Oの中に再懸濁させる。

【0343】

zsig81 cDNAを修飾されたpAdTrack CMVのFseI - AscI部位の中にクローニン

グする (He他、PNAS 95: 2509 - 2514、1998)。この構築物はGFPマーカー遺伝子を含む。GFP発現を推進するCMVプロモーターはSV40プロモーターで置換され、SV40ポリアデニル化シグナルはヒト成長ホルモンのポリアデニル化シグナルで置換された。さらに、自然ポリリンカーをFseI、EcoRV、およびAscI部位で置換した。この修飾された形態のpAdTrack CMVをpZyTrackと命名した。Fast-Link™ DNA結合およびスクリーニングキット (Epicentre Technologies、ウイシコンシン州マディソン) を使用して、結合を実施する。プラスミドを線状化するために、ほぼ5 µgのpZyTrack zsig81プラスミドをPmeIで消化する。ほぼ1 µgの線状化プラスミドを200ngのスーパーコイルドpAdEasy (He他、前掲) とともにBJ5183細胞の中に共形質転換する。

【0344】

Bio-Radジーン・パルサー (Gene Pulser) を2.5kV、200オームおよび25mFaにおいて使用して、共形質転換体を実施する。全体の共形質転換を4枚の5 µg/mlのカナマイシンを含むLPプレート上にプレートする。最小コロニーを取り上げ、LB/カナマイシン中で拡大し、標準的DNAミニプレブ手順により組換えアデノウイルスDNAを同定する。組換えアデノウイルスDNAをFseI - AscIで消化して、zsig81の存在を確認する。組換えアデノウイルスミニプレブDNAをDH10Bコンピテント細胞の中に形質転換し、Qiagenマクシプレブキットを製造業者の使用説明書に従い使用してDNAを調製する。

【0345】

20~30UのPacIを含む100 µlの反応体積中でほぼ5 µgの組換えアデノウイルスDNAをPacI酵素 (New England Biolabs) で37 °Cにおいて3時間消化する。消化したDNAを等しい体積のフェノール/クロロホルムで2回抽出し、エタノールで沈殿させる。DNAペレットを10 µlの蒸留水の中に再懸濁させる。前日に接種し、60~70%のコンフルエンスに成長させたQBI-293A細胞 (Quantum Biotechnologies, Inc.、カナダ国Qc. モントリオール) のT25フラスコをPacI消化DNAでトランスフェクトする。PacI消化DNAを無菌HBS (150mM NaCl、20mM HEPES) で50 µlの全体積まで希釈する。別々の管において、20 µlのDOTAP (Boehringer Mannheim、1mg/ml) をHBSで100 µlの全体積まで希釈する。

【0346】

DNAをDOTAPに添加し、上下しておだやかに混合し、室温において15分間放置する。培地を293A細胞から除去し、1mM ピルビン酸ナトリウム (GibcoBRL)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸 (GibcoBRL) および25mM HEPES緩衝液 (GibcoBRL) を含有する5mlの無血清MEM - アルファ (GibcoBRL) で洗浄する。5mlの無血清MEMを293A細胞に添加し、37℃ に保持する。DNA / 脂質混合物を293A細胞のT25フラスコに滴下し、おだやかに混合し、37℃ において4時間インキュベートする。4時間後、DNA / 脂質混合物を含有する培地を吸引除去し、5%胎仔ウシ血清を含有する5mlの完全MEMと置換する。トランスフェクトされた細胞を緑蛍光タンパク質 (GFP) 発現およびフォーカス、すなわち、ウイルスプラークの形成についてモニターする。

【0347】

組換えアデノウイルスDNAで293A細胞をトランスフェクトした後数日に、GFPタンパク質を発現する細胞はフォーカスを形成し始める。これらのフォーカスはウイルス「プラーク」であり、細胞スクレーパーにより粗製ウイルスライゼイトを収集して、293A細胞のすべてを収集する。ライゼイトを50mlの円錐形管に移す。細胞からウイルス粒子の大部分を解放するために、3回の凍結 / 融解サイクルをドライアイス / エタノール浴および37℃ 水浴中で実施する。

【0348】

粗製ライゼイトを増幅して (一次 (1°) 増幅) して、zsig81 rAdVライゼイトの使用「系統」を得る。ほとんどコンフルエント (80~90%) の293A細胞の10cmのプレートを20時間前に構成し、200 μ lの粗製rAdVライゼイトを各10cmのプレートに添加し、白色光下にCPEおよび蛍光顕微鏡下にGFPの発現について48~72時間モニターして検査する。293A細胞のすべてはCPE (細胞変性効果) を示すとき、この1°の系統ライゼイトを収集し、粗製rAdVライゼイトについて記載したように凍結 / 融解サイクルを実行する。

【0349】

zsig81 rAdVの二次 (2°) 増幅を次のようにして得る：細胞が80~90%のコンフルエントであるように、293A細胞の20 x 15cmの組織培養皿を調製する。すべ

てではなが20mlの5%MEM培地を除去し、各皿を300~500 μ lの1°の増幅したrAdVライゼイトで接種する。48時間後、293A細胞をウイルス産生から溶解し、このライゼイトを250mlのポリプロピレン遠心びんの中に収集し、rAdVを精製する。

【0350】

NP-40洗剤を粗製ライゼイトのびんに0.5%の濃度に添加して、すべての細胞を溶解する。びんを回転プラットフォーム上に配置して、できるだけ速く10分間回転する。20,000 \times gにおいて15分間遠心することによって破片をペレット化する。上清を250mlのポリカーボネート遠心びんに移し、0.5体積の20%PEG8000/2.5M NaCl溶液を添加する。びんを氷上で一夜震盪する。びんを20,000 \times gにおいて15分間遠心し、上清を漂白溶液の中に廃棄する。回転マークの各側のびんの壁に沿った2本の垂直線で、白色沈殿が形成し、これは沈殿したウイルス/PEGである。無菌細胞スクレーパーを使用して、2本のびんからの沈殿を2.5mlのPBSの中に再懸濁させる。

【0351】

ウイルス溶液を2mlのマикроフージ管の中に入れ、14,000 \times gでマイクロフージ中で10分間遠心して追加の細胞破片を除去する。2mlのマикроフージ管からの上清を15mlのポリプロピレンスナップカップ管の中に移し、塩化セシウム(CsCl)で1.34g/mlの密度に調節する。ウイルス溶液の体積を推定し、0.55g/mlのCsClを添加する。CsClは溶解し、1mlのこの溶液を秤量する。この溶液をポリカーボネートの厚い壁の遠心管3.2ml(Beckman)に移し、TLA-100.4ドナーを有するベックマン・オプチマ(Beckman Optima)TLXマイクロウルトラ遠心機中で25において80,000rpm(348,000 \times g)で回転する。ウイルスは白色バンドを形成する。大きい孔のピペット先端を使用して、ウイルスバンドを収集する。

【0352】

勾配からのウイルスは大量のCsClを有し、これを除去した後、ウイルスを細胞上で使用することができる。Sephadex G-75M(Pharmacia)を前以て詰めたファーマシア(Pharmacia)PD-10カラムを使用して、ウイルス調製物を脱塩する。カラムを20mlのPBSと平衡化する。ウイルスを負荷し、カラムの中に展開させる。5mlのPBSをカラムに添加し、8~10滴の画分を収集する。各画分の1:50の希

積物の光学密度を分光光度計で260nmにおいて測定し、明瞭な吸収ピークを同定する。これらの画分をプールし、1:25希釈物の光学密度(OD)を測定する。式を使用してODをウイルス濃度に変換する： $(260\text{nmにおけるOD}) \times (25) \times (1.1 \times 10^{12}) = \text{ビリオン/ml}$ 。zsig81 rAdVの1:25希釈物のODは0.221であり、 6×10^{12} ビリオン/mlのウイルス濃度を与えた。

【0353】

ウイルスを貯蔵するために、グリセロールを精製したウイルスに15%の最終濃度に添加し、おだやかに混合し、アリコートで-80において貯蔵する。

コンタム・バイオテクノロジー・インコーポレーテッド(Quantum Biotechnologies, Inc.、カナダ国Qc.モントリオール)により開発されたプロトコルに従い、組換えウイルスの感染性を測定する。簡単に述べると、2%の胎仔ウシ血清を含有するMEM中で、アッセイすべき各組換えウイルスについて2×96ウェルの組織培養プレートに 1×10^4 の293A細胞/ウェルを播種する。24時間後、2%の胎仔ウシ血清を含有するMEM中で $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-14}$ の各ウイルスの10倍希釈を行う。100µlの各希釈物を20ウェルの各々に入れる。37において5日後、ウェルを細胞変性効果(CPE)について陽性または陰性について読み、そして「プラーク形成単位/ml」(PFU)についての値を計算する。

【0354】

使用するTICD50処方物は上記のコンタム・バイオテクノロジー・インコーポレーテッド(Quantum Biotechnologies, Inc.)に従う。使用するウイルスを 10^{-2} から 10^{-14} に希釈するプレートから力価(T)を決定し、感染後6日に読む。各希釈において、CPEについて陽性のウェル/ウェルの総数の比(R)を決定する。

【0355】

未希釈試料の力価を計算するために：ファクター、「F」 $= 1 + d(S - 0.5)$ ；ここで「S」は比(R)の合計である；そして「d」は希釈系列のLog10である、例えば、「d」は10倍希釈系列について1に等しい。未希釈試料の力価は $T = 10^{(1+F)}$ = TICD₅₀/mlである。TICD50/mlをpfu/mlに変換するために、力価(T)を計算するために0.7を指数関数から減ずる。zsig81アデノウイルスは 7.1×10^{10} pfu/mlの力価を有した。

【0356】

実施例9. トランスジェニック発現

成体(2~8月齢、(C57BL/6×C3H/N f1 Taconi Farms))、青春前期の受精雌(ドナー)(C57BL/6×C3H/N f1、4~5週齢、(Taconi Farms))、および成体受精雌(C57BL/6×C3H/N f1、2~4月齢、(Taconi Farms))を親として使用して、zsig81遺伝子を発現するトランスジェニック動物をつくる。

ドナーにほぼ8IU/マウスの妊娠した雌ウマ血清コナドトロピン(Sigma、ミゾリー州セントルイス)I.P.を注射し、46~47時間後、8IU/マウスのヒト慢性コナドトロピン(hCG(Sigma))をI.P.投与して過剰排卵を誘導する。受精卵を収集し、37 / 5%CO₂のインキュベーター中でマイクロインジェクションまで貯蔵する。

【0357】

10~20 µgのzsig81遺伝子のcDNAを含有するプラスミドDNAを線状化し、ゲル精製し、10mM Tris pH7.4、0.25mM EDTA pH8.0の中に5~10ng/µlの最終濃度にマイクロインジェクションのために再懸濁させる。プラスミドDNAを収集した卵の中にマイクロインジェクトし、注射針を一倍体前核の一方または両方の中に貫通させる。

次の日に、2細胞の胚を偽妊娠レシピエントの中に移す。レシピエントを対でカゴに戻し、19~21日間妊娠させる。出産後、分娩後19~21日経過させた後離乳させる。25匹の離乳子を雌雄鑑別し、別々の性別カゴに入れ、0.5cmのバイオプシー(遺伝子型別のために使用する)をきれいなハサミで尾から切り取る。

【0358】

製造業者の使用説明書に従いクイアゲン・ドネージイ(Qiagen Dneasy)キットを使用して、テイルの切り取り片からゲノムDNAを調製する。トランスジェニックベクターのヒト成長ホルモン(hGH)3'UTR部分に対して設計されたプライマーを使用するPCRにより、ゲノムDNAを分析する。ヒトおよびマウス成長ホルモン3'UTR DNA配列の整列から、ヒト配列に対してユニークな領域を同定して、PCR反応がマウス配列を増幅しないことを確実にする。

【0359】

プライマーZC17251 (配列番号14) およびZC17252 (配列番号15) は、hGHの368塩基対のフラグメントを増幅する。さらに、プライマーZC17156 (配列番号16) およびZC17157 (配列番号17) は、ベクター配列に対してハイブリダイゼーションし、cDNAインサートを増幅し、hGHプライマーとともにしばしば使用される。実験において、トランスジェニックについて陽性に示す動物からのDNAは2つのバンドを発生させる、hGH 3'UTRフラグメントに対応する368塩基対のバンドおよびcDNAインサートに対応する可変サイズのバンド。

【0360】

いったん動物がトランスジェニック (TG) であることが確認されると、それらをC57B1/6野生型交配相手と交配し戻す。子供が生まれ、離乳するとき、性別で分離し、それらの尾を遺伝子型別のために切り取る。

生きている動物におけるトランスジーンが発現を検査するために、小さい部分的肝臓のバイオプシーを収集する。収集した肝臓のバイオプシーを14mlのポリプロピレン丸底管に移し、液体窒素中の短時間凍結させ、次いでドライアイス上で貯蔵する。

RNA溶液ハイブリダイゼーションアッセイにより、各トランスジーンのみRNA発現レベルの分析を実施する。

【0361】

実施例10. zsig81の骨髄アッセイ

A. 非付着性低い密度骨髄細胞の単離

6~10週齢の雄Balb/CマウスまたはC57BL/6マウスから、新鮮なマウス大腿部吸引液を得た。次いで骨髄をRPMI + 10%FBS (JRH、Lenexa KS; Hyclone、ユタ州ローガン) で洗浄し、全骨髄細胞懸濁液としてRPMI + 10%FBSの中に懸濁させた。

【0362】

次いで、次のようにして、全骨髄細胞懸濁液を密度勾配 (Nycoprep、1.077、Animal; Gibco BRL) に暴露して低い密度の大部分単核細胞について濃縮した: 全骨髄細胞懸濁液 (抗体8ml) を15mlの円錐管内で約5mlのNycoprep勾配溶液の上部で注意してピペットで取り、次いで600 x gで20分間遠心した。低い密度の単核

細胞を含有する界面層を取出し、過剰のRPMI + 10%FBSで洗浄し、400×gにおいて5～10分間遠心することによってペレット化した。このペレットをRPMI + 10%FBSの中に再懸濁させ、ほぼ 10^6 細胞/mlにおいてT-75フラスコの中に入れ、37.5%CO₂においてほぼ2時間インキュベートした。生ずる細胞懸濁液は非付着性低密度 (NA LD) 骨髄細胞であった。

【0363】

B. 96ウェルのアッセイ

RPMI + 10%FBS + 1ng/mlのマウス幹細胞因子 (mSCF) (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス)、+5%の下記の1つからのコンディショニングした培地中で96ウェルの組織培養プレートにおいて25,000～45,000細胞/ウェルで、NA LDマウス骨髄細胞をプレートした：(1) アデノウイルスzsig81を発現する293細胞、または(2) zsig81を発現しないアデノウイルス感染293細胞。次いでこれらの細胞を種々のサイトカイン処理に付して、骨髄からの造血細胞の拡大または分化について試験した。

【0364】

試験するために、プレートしたNA LDマウス骨髄細胞をマウスインターロイキン4 (mIL-4)、マウスマクロファージ-コロニー刺激因子 (mM-CSF) (R&D Systems)、または他のサイトカインのパネル (R&D Systems) に対して暴露した。mIL-4、mM-CSF、または他のサイトカインの連続希釈物を約50ng/mlから約6.25ng/mlの濃度までの2倍の連続希釈物で試験した。8～12日後、96ウェルのアッセイをアルマー (Almaar) ブルーアッセイ (Accumed、イリノイ州シカゴ) により細胞増殖について等級づけた。

【0365】

C. バキュロウイルスから単離したヒトzsig81.CEEを使用してマウス骨髄アッセイ

NALDマウス骨髄細胞を200,000細胞/ウェルで24ウェルの組織培養皿の中にプレートした。培地に2ng/ml幹細胞因子 (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス)、+ 下記の一つを補充した：1) 15ng/mlのネズミIL-4 (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス)、2) 15ng/mlのネズミGM-CSF、3) 50ng/mlのヒトzsi

g81.CEE、4) なし、5) 15ng/mlのネズミIL - 4 (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス) および50ng/mlのヒトzsig81.CEE、6) 15ng/mlのネズミGM - CSF (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス) および50ng/mlのヒトzsig81.CEE。

【0366】

開始後6日に、ネズミzSig81、14、またはGM - CSFを単独で、または組合わせで含有培養物において、有意なアウトグロースが存在した。さらに、zSig81の存在下に培養した細胞は、zSig81を含有しない培養の中に存在しない形態を表示した。他の実験において、NALDマウス骨髄細胞を24ウェルの組織培養皿中で200,000細胞/ウェルでプレートした。

【0367】

培地に2ng/ml幹細胞因子 (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス)、+下記の1つを補充した：(1) 15ng/mlのネズミIL - 4 (R&D Systems)、(2) mzSig81を発現する293細胞からの2%のコンディショニングした培地 (CM)、(3) zsig81を発現しないアデノウイルス感染293細胞からの2%のCM、(4) なし、(5) 15ng/mlのネズミIL - 4 (R&D Systems) + mzSig81を発現する293細胞からの2%のCM、(6) 15ng/mlのネズミIL - 4 (R&D Systems) + アデノウイルス感染293細胞からの2%のCM。培養4日および6日において、zsig81またはIL - 4を含有する培養物はCSFまたは対照CMを含有する培養物よりも非常に密であった。

【0368】

さらに、mzsig81の存在下に培養した細胞はmzsig81の非存在下に培養した細胞と異なる形態を有した。培養物(2)、(4)、(5)および(6)からの細胞を取出し、B220に対する抗体 (Pharmingen、カリフォルニア州サンディエゴ) またはCD - 80 (Pharmingen) で染色した。培養物のいずれにおいてもB220陽性細胞は観測されなかった。mzsig81に対して暴露した細胞はCD - 80について陽性であり、そしてmzsig81に対して暴露しなかった細胞はCD - 80について陰性であった。これらのデータが示唆するように、zsig81の存在下に増殖する細胞は樹枝状細胞系譜を有する。

【0369】

ヒト骨髄細胞を2.5mg/mlのFLT - 3 (R&D Systems) および下記を含む培地を

含有する12ウェルの培養皿中で800,00細胞/ウェルにおいてプレートした：(1)なし、(2)hIL-4(R&D Systems)、(3)hzig81を含有するBHK CM、(4)BHK CM、(5)hIL-4(R&D Systems)およびBHK CM。培養の12日において、IL-4、hzig81、およびhzig81+IL-4の存在下に培養した細胞のすべては、hzig81またはIL-4に対して暴露しなかった培養物において見られない、同様な形態を表示した。さらに、hzig81を含有する培養物はより多い細胞を含有した。

【0370】

第12日に、細胞を取出し、CD80(Pharminen)、CD11c(Pharminen)、またはHLA-DR(Pharminen)に対する抗体で染色した。hzig81の存在下に培養した細胞は、CD-80、CD11c、およびHLA-DRについて増加した染色を示した。この増加はhIL-4の存在下に培養した細胞について見られた増加に等しかったが、zig81またはIL-4を含まないBHK CMを含有する対照培養物において見られなかった。データが示唆するように、これらのマーカーは成熟樹枝状細胞上に見出されるので、増殖する細胞は樹枝状細胞系譜である。

【0371】

ヨウ素化zig81が未熟樹枝状細胞系統(JAWS II、ATCC No. CRL-1194)に結合することが見出されたとき、zig81が樹枝状細胞をターゲットとするという追加の証拠が見られた。この結合は非標識化hzig81により投与量依存的方法で阻害されたが、他のサイトカインにより阻害されなかった。

【0372】

実施例11. 混合リンパ球反応(MLR)

A. 刺激因子細胞(樹枝状細胞)の調製

- MEM(最小必須培地、アルファ-修飾、10%胎仔ウシ血清(FBS)、1mMピルビン酸ナトリウム、4mM グルタミンを含有する)+5ng/mlのネズミGM-CSF中で、マウス樹枝状細胞系統、JAWS II(CRL-1194; American Type Culture Collection、バージニア州20110-2209、マッサ、ユニバーシティ・プールバード10801)を高い密度($1\sim 2\times 10^6$ 細胞/ml)に成長させる。

【0373】

細胞を活性化するために使用した追加のサイトカインは、インターフェロン - (100U/ml)、腫瘍壊死因子 - (10ng/ml)、およびインターロイキン - 4 (10ng/ml) を包含する。非付着性細胞を含有する培養上清をプールし、付着性細胞をベルセン (Versene) で洗浄し、細胞を 3×10^5 細胞/ml で RPMI - 1640 培地 (10% FBS、10mM HEPES、4mM グルタミン、 5.7×10^{-5} M 2 -メルカプトエタノール、50 μ g/ml のゲンタマイシン、100U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含有する) の中に再懸濁させる。

【0374】

Swiggard 他 (Curr. Protocols Immunol. 3.7.1 - 3.7.11, 1992) の方法により、C57BL/6 および BALB/c マウスの脾臓から、脾臓樹枝状細胞を単離する。簡単に述べると、コラゲナーゼを使用する消化および低密度の分画により脾細胞の単細胞懸濁液を発生させる。リン酸塩緩衝液 (PBS) 中のウシ血清アルブミン (BSA) の低密度溶液 (ほぼ 1.364 の屈折率) を通して PBS 中の BSA の高密度のクッション (ほぼ 1.385 の屈折率) 上に細胞を遠心することによって、低密度の画分を獲得し、これは主として樹枝状細胞、マクロファージ、および多少の B 細胞を含有する。細胞を 37 °C において 1×10^7 細胞/ml で RPMI 培地の中に再懸濁させ、60 mm の組織培養プレート当たり 4ml の上清をプレートする。

【0375】

37 °C において 90 分間 インキュベートした後、非付着性細胞をおだやかに除去し、付着性細胞を RPMI で洗浄し、RPMI 中でさらに 30 ~ 60 分間 インキュベートする。非付着性細胞を再び除去し、付着性細胞を RPMI でおだやかに洗浄し、37 °C において RPMI 中で 12 ~ 20 時間 インキュベートする。脾臓樹枝状細胞を最後の インキュベーションの間に分離し、非付着性細胞として単離する。非付着性樹枝状細胞を RPMI の中に 3×10^5 細胞/ml で再懸濁させる。

JAWS II および脾臓の樹枝状の同様な細胞を、 ^{137}Ca 照射装置 (Gammacell 40、Nordion International Inc.、カナダ国オンタリオ州カナタ) 中で 550 ラド / 分で 40 分間照射した後、MLR において使用する。

【0376】

B. 応答因子細胞 (T 細胞) の調製

脾臓およびリンパ節をC57BL/6またはBALB/cマウス (Jackson Labs、メイン州バルハーバー) から取出す。ガラススライド間の脾臓の機械的崩壊により、BSS - BSA緩衝液中の脾細胞懸濁液を調製する。0.9mlのdH₂O中で脾細胞ペレットを再懸濁させ、次いで直後に0.1mlの10×HBSSを添加することによって、赤血球を溶解する。無菌のメスでリンパ節を細断することによってBSS中のリンパ節細胞懸濁液を調製し、オートロガス脾細胞懸濁液でプールし、ナイロンクロスフィルターを通して濾過して破片を除去する。

【0377】

37 においてBSS + 5%FBSで前もって平衡化したナイロンウールのカラム上に、脾臓およびリンパ節の細胞の単細胞懸濁液を負荷する。37 において45分間インキュベートした後、37 のBSS + 5%FBS (12ml / ほぼ 1.5×10^8 全脾臓 + リンパ節細胞を負荷した1.5gのナイロンウールのカラム) でT細胞を溶離する。T細胞 (通常80~90%の純度) をRPMIの中に 3×10^6 細胞/mlで再懸濁させる。

【0378】

C. MLRのインキュベーション条件

二重反復試験において200 μ lの最終体積で、 3×10^5 の応答因子細胞/ウェル (96ウェルのプレート) を増加する数の照射した刺激因子細胞 (通常 3×10^3 、 1×10^4 、 3×10^4 細胞) と混合する。対照は応答因子因子の単独および刺激因子細胞の単独を包含する。同系MLRは、同一マウス系統 (例えば、C57BL/6またはBALB/cマウス) からの応答因子および刺激因子の細胞を包含するが、同種異系MLRは異なる系統 (例えば、C57BL/6またはJAWS II刺激因子細胞およびBALB/c応答因子細胞) からの応答因子細胞とインキュベートした刺激因子細胞を包含する。

【0379】

MLR培養物を37 においてほぼ72~76時間インキュベートした後、1 μ Ci/ウェルの3H - チミジンを追加して、応答因子細胞の増殖をアッセイする。培養物を16~20時間後にスカトロン (Skatron) 細胞収集装置 (Skatron、バージニア州スターリング) で収集し、組込まれた3H - チミジンをワラック・ベータプレート (Wallac Betaplate) シンチレーションカウンター (Pharmacia) で測定する。

【0380】

同種異系T細胞を刺激する因子の組合わせでJAWS II細胞を誘導するとき、JAWS II細胞は増殖する。JAWS II細胞TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSFおよびIL-4で誘導する。さらに、JAWS II細胞系統は同系T細胞において増殖を刺激しない。

以上から、理解されるように、本発明の特定の態様を例示の目的で記載したが、本発明の精神および範囲から逸脱しないで種々の変化および変更が可能である。したがって、本発明は特許請求の範囲による以外限定されない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> FOUR-HELICAL BUNDLE PROTEIN ZSIG81

<130> 99-13PC

<150> US 09/323,582

<151> 1999-06-01

<160> 36

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1600

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (134)...(655)

<221> sig_peptide

<222> (134)...(184)

<400> 1

gaattcggct cgaggcaaaa ggaaggagg gaagcactcc atcatctcac tgggaagaac	60
ggcacgggca tacctgcagc tactggggtt cactgggct tgagggtcga ttttcacct	120
tttgaaggac aag atg cat tgg aag atg ttg ctg ctt ctg ctg ttg tat	169
Met His Trp Lys Met Leu Leu Leu Leu Leu Tyr	
-15 -10	
tac aat gct gag gct tct atg tgc cac agg tgg agc agg gct gtg ctc	217
Tyr Asn Ala Glu Ala Ser Met Cys His Arg Trp Ser Arg Ala Val Leu	
-5 1 5 10	
ttc cct gcc gcc cac cgg cca aag agg tcc tca tca ctg cca ttg aac	265
Phe Pro Ala Ala His Arg Pro Lys Arg Ser Ser Ser Leu Pro Leu Asn	
15 20 25	

cca gtc ctg cag acc tcc ctg gag gag gtg gag ctg ctc tac gag ttc Pro Val Leu Gln Thr Ser Leu Glu Glu Val Glu Leu Leu Tyr Glu Phe 30 35 40	313
ctg ctg gcc gaa ctt gag atc agc cct gac ctg cag atc tcc atc aag Leu Leu Ala Glu Leu Glu Ile Ser Pro Asp Leu Gln Ile Ser Ile Lys 45 50 55	361
gac gag gag ctg gcc tcc ttg cgg aag gcc tca gac ttc cgc acc gtc Asp Glu Glu Leu Ala Ser Leu Arg Lys Ala Ser Asp Phe Arg Thr Val 60 65 70 75	409
tgc aac aac gtc atc ccc aag agc atc cca gac atc cgc cgg ctc agc Cys Asn Asn Val Ile Pro Lys Ser Ile Pro Asp Ile Arg Arg Leu Ser 80 85 90	457
gcc agc ctc tcc agc cac cct gcc atc ctc aag aaa gaa gac ttt gaa Ala Ser Leu Ser Ser His Pro Gly Ile Leu Lys Lys Glu Asp Phe Glu 95 100 105	505
agg aca gtg ctg acc ctg gcc tac aca gcc tac cgc aca gcc ctg tcc Arg Thr Val Leu Thr Leu Ala Tyr Thr Ala Tyr Arg Thr Ala Leu Ser 110 115 120	553
cac gcc cat cag aag gac atc tgg gcg cag tcc ctc gtt agc ctc ttc His Gly His Gln Lys Asp Ile Trp Ala Gln Ser Leu Val Ser Leu Phe 125 130 135	601
cag gcc ctg agg cac gac ttg atg cgc tcc tca cag ccg gga gta cct Gln Ala Leu Arg His Asp Leu Met Arg Ser Ser Gln Pro Gly Val Pro 140 145 150 155	649
ccc tga gagactggcc cacaccagga cctcagagca gggaccagca cagtaatcca Pro *	705
gaaagtcttc attctctact ccatttacag agaccagcaa caaaacactt accgctgaca cagagcagca gagatcaaac agtaaccccg atgctctttt ctccttgtag tttcctggaa gacacatctg attcatgcca tcatgtgacc tgggctggaa gaaagggctg gaatggtcat tcaagacgcc tccatggcca gaatggtttg cctatggcag gcagaattct gatatgcttc aaccagagc agtggccaca cactcaagag tgagaacagg cgtgagccac cgtgcctggc ccaggatcta aaaactttct aagtttctc catcgttggc atcctcagag ctatctccaa tgtcactcaa gagacatcaa cagacattta actgctgcag acttcattgc tctgtcacct	765 825 885 945 1005 1065 1125

```

caccttgaat ctaacaaatc aaagtatttc tgcagggtcca atggtctaaa atcaaagtct 1185
tgttaaatga ctttttacia caccocctac tttcctaate catttcaate ttattttttt 1245
tattgttgta aaaaacacat cacgtaaaat gtaccatcct aaccattttt aagcatatgg 1305
tacagcagtg ttaactccat gcatgttggt aaacagaccc ccggaacttt ctcacattgt 1365
aattctgaag ttctataccc accgaacaac tcctcttttc cccttcccc tgctgcccc 1425
agctcttggc accattatcc tgctttctgt ttttgagagt ctgactactt aagatacctc 1485
atacaagcgg gatctggctt acatttcttg agcattgtat tctggaaaag tgtttccttc 1545
ctctgaaaaa tgggtagagt tctgaaggag aactactggt cttattgtac acttg 1600

```

```

<210> 2
<211> 173
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(17)

```

```

<400> 2
Met His Trp Lys Met Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Tyr Asn Ala Glu
-15 -10 -5
Ala Ser Met Cys His Arg Trp Ser Arg Ala Val Leu Phe Pro Ala Ala
1 5 10 15
His Arg Pro Lys Arg Ser Ser Ser Leu Pro Leu Asn Pro Val Leu Gln
20 25 30
Thr Ser Leu Glu Val Glu Leu Leu Tyr Glu Phe Leu Leu Ala Glu
35 40 45
Leu Glu Ile Ser Pro Asp Leu Gln Ile Ser Ile Lys Asp Glu Glu Leu
50 55 60
Ala Ser Leu Arg Lys Ala Ser Asp Phe Arg Thr Val Cys Asn Asn Val
65 70 75
Ile Pro Lys Ser Ile Pro Asp Ile Arg Arg Leu Ser Ala Ser Leu Ser
80 85 90 95
Ser His Pro Gly Ile Leu Lys Lys Glu Asp Phe Glu Arg Thr Val Leu
100 105 110
Thr Leu Ala Tyr Thr Ala Tyr Arg Thr Ala Leu Ser His Gly His Gln
115 120 125
Lys Asp Ile Trp Ala Gln Ser Leu Val Ser Leu Phe Gln Ala Leu Arg
130 135 140
His Asp Leu Met Arg Ser Ser Gln Pro Gly Val Pro Pro
145 150 155

```

```

<210> 3

```

<211> 1547
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (212)...(733)

<221> sig_peptide
 <222> (212)...(262)

<400> 3

```

ggattcggca cgagggagag gtaccaactt ctgtcccacc caagaggctg catcgcctc      60
catcctgttg agccagggag aggcccttgc tttccttata gacaagaaag ggcagtaaga    120
actctgtcct ctgcctgaga agagcagggg tccacctgca gcccttgggg tcccgcagga    180
atagaaggtc agcttgtctc cctcctggaa g atg tcc tgg aag gcg ctg acg      232
                               Met Ser Trp Lys Ala Leu Thr
                               -15
  
```

```

att ctg ctg gta ttc tcc agc acc cag gcc act gcg tcc tgc agg tgg      280
Ile Leu Leu Val Phe Ser Ser Thr Gln Ala Thr Ala Ser Cys Arg Trp
-10                               -5                               1                               5
  
```

```

agc agg gcc gca ctg ttc cca gct gcc cat cgg cca aag agg tcc ttg      328
Ser Arg Ala Ala Leu Phe Pro Ala Ala His Arg Pro Lys Arg Ser Leu
                               10                               15                               20
  
```

```

tca ctg cca ttg aat cca gtc ctg cag acc tcc ctg gag gag gtg gaa      376
Ser Leu Pro Leu Asn Pro Val Leu Gln Thr Ser Leu Glu Glu Val Glu
                               25                               30                               35
  
```

```

ctg ctg tat gag ctc ttg cta gct gaa att gag atc agc cca gac ctg      424
Leu Leu Tyr Glu Leu Leu Leu Ala Glu Ile Glu Ile Ser Pro Asp Leu
                               40                               45                               50
  
```

```

gag atc tcc atc aag gac gag gag cta gct tcc ctg cgg aag gcc ttg      472
Glu Ile Ser Ile Lys Asp Glu Glu Leu Ala Ser Leu Arg Lys Ala Leu
                               55                               60                               65                               70
  
```

```

agt ttc cac tca atc tgc aat aac ata atc ccc aag cgt atc cca gat      520
Ser Phe His Ser Ile Cys Asn Asn Ile Ile Pro Lys Arg Ile Pro Asp
                               75                               80                               85
  
```

atc cga agg ctg agt gcc aac ctg gca aac cac cct gga atc ctc aag	568
Ile Arg Arg Leu Ser Ala Asn Leu Ala Asn His Pro Gly Ile Leu Lys	
90 95 100	
aaa gaa gac ttt gag agg ata aca tta acc ctg gcg tac aca gcc tat	616
Lys Glu Asp Phe Glu Arg Ile Thr Leu Thr Leu Ala Tyr Thr Ala Tyr	
105 110 115	
cgg aca gcc tta tct gaa ggg cat cag aag gac atc tgg gct cag tcc	664
Arg Thr Ala Leu Ser Glu Gly His Gln Lys Asp Ile Trp Ala Gln Ser	
120 125 130	
ctc atc agc cta ttc cag gcc ctg agg cat gac ttg atg cgg tcc tcg	712
Leu Ile Ser Leu Phe Gln Ala Leu Arg His Asp Leu Met Arg Ser Ser	
135 140 145 150	
agc cct gct gtg tca tcc tga gagaatggct catgctagaa ctttgaagca	763
Ser Pro Ala Val Ser *	
155	
ggaacaggca cacacagtct tctagaactt tcctcctcta ctgcactttc agagaaaagt	823
atatacttcc cacacagaat agcaaagata aatgagtcac cccaatattt tttgtccctt	883
gttgcttcca gacagacata tccgacctat gttataatgt tacctgagaa aaggctagac	943
tggactttca agatgcctcc agaggccaac tggctctacct ggtaatgagc agacttctga	1003
gatatactta cacacatacc caagagttag gactgaggat ggagtctgag catggcagga	1063
ggatggtggg cagattcctt tggttctaag ggatctgtgt tgaatgaata ttttctggca	1123
ggttctatgg taaatataaa aaaggcagag atgcattcaa attaatatgc tattagccaa	1183
gaaggatata cttggcttgc cccaaagcca tgaagaagac tctgtatttt ggtgacctac	1243
ttgacttggg gaaaatgcta gcagtcacc catgccctat catttcaatg tagaagccag	1303
gctaaagcat agtgccttcc taatgaaaga ggtaacacca ctatgcgtgt ttttctaaa	1363
ataccatagc actgtcagcg acttgggtgc tcttaaaaaa attgccttcc agatgacaga	1423
ttgtttacct ttcaaatgct gatttttttt ctttcaaaat gttagtttga tatctgttca	1483
ttatttatat taaatactgg ttgatattta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa accattgcgg	1543
ccgc	1547

<210> 4
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)...(17)

<400> 4

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

<210> 5

<211> 519

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate sequence derived from human zsig81
 protein sequence

<221> misc_feature

<222> (1)...(519)

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

<400> 5

atgcaytgga aratgytnyt nytnytnytn yntntaytaya aygcngargc nwsnatgtgy 60
 caymgntggw snmgngcngt nynttyccn gcngcncaym gncnaarmg nwsnwsnwsn 120
 ytnccrytna ayccngtnyt ncaracnwsn ytnngargarg tngarytnyt ntaygartty 180
 ytnyngcng arytnngarat hwsnccngay ytnrcarathw snathaarga ygargarytn 240

```

gcwswytnm gnaargcnws ngayttymgn acngtntgya ayaaygtnat hccnaarwsn 300
athccngaya thmgmngnyt nwsngcnwsn ytnwsnwsnc ayccnggnat hytnaaraar 360
gargayttyg armgnacngt nytnacnytn gcntayacng cntaymgnac ngcnynwsn 420
cayggncayc araargayat htgggcncar wsnytngtnw snytnntyca rgnynmgn 480
caygayttna tgmgrwsnws ncarccngn gtnccnccn 519

```

```

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> variant derived from human helix A

```

```

<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa = Ala, Ile or Leu

```

```

<221> VARIANT
<222> (4)...(4)
<223> Xaa = Met, Gly, Ala, Thr or Ser

```

```

<221> VARIANT
<222> (5)...(11)
<223> Xaa = Val, Ile or Leu

```

```

<221> VARIANT
<222> (12)...(12)
<223> Xaa = Tyr, Phe or Trp

```

```

<221> VARIANT
<222> (15)...(15)
<223> Xaa = Leu, Ile or Val

```

```

<400> 6
Xaa Gln Thr Xaa Xaa Glu Glu Xaa Glu Leu Xaa Xaa Glu Phe Xaa
1           5           10           15

```

```

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

<220>
<223> variant derived from human helix B

<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa = Val, Leu or Ile

<221> VARIANT
<222> (4)...(4)
<223> Xaa = Arg, His or Lys

<221> VARIANT
<222> (5)...(5)
<223> Xaa = Glu or Asp

<221> VARIANT
<222> (8)...(11)
<223> Xaa = Val, Ile or Leu

<221> VARIANT
<222> (12)...(12)
<223> Xaa = Arg, Lys or His

<221> VARIANT
<222> (15)...(15)
<223> Xaa = Ser, Gly, Ala, Thr or Met

<400> 7
Xaa Ser Ile Xaa Xaa Glu Glu Xaa Ala Ser Xaa Xaa Lys Ala Xaa
1 5 10 15

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variant derived from human helix C

<221> VARIANT
<222> (2)...(5)
<223> Xaa = Val, Ile or Leu

<221> VARIANT
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Ser, Met, Gly, Ala or Thr

<221> VARIANT
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Leu, Val or Ile

<400> 8
 Asp Xaa Arg Arg Xaa Xaa Ala Ser Xaa
 1 5

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> variant derived from human helix D

<221> VARIANT
 <222> (1)...(4)
 <223> Xaa = Val, Ile or Leu

<221> VARIANT
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Tyr, Trp or Phe

<221> VARIANT
 <222> (8)...(8)
 <223> Xaa = Val, Ile or Leu

<221> VARIANT
 <222> (11)...(11)
 <223> Xaa = Asp or Glu

<221> VARIANT
 <222> (12)...(12)
 <223> Xaa = Leu, Val or Ile

<221> VARIANT
 <222> (15)...(15)
 <223> Xaa = Ser, Gly, Met, Ala or Thr

<400> 9
 Xaa Val Ser Xaa Xaa Gln Ala Xaa Arg His Xaa Xaa Met Arg Xaa
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ZC21621

<400> 10
 gggctgtgcg gtaggctgtg ta 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ZC21622

<400> 11
 aagaacggca cgggcatacc tg 22

<210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ZC22801

<400> 12
 aacggcacgg gcatacct 18

<210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ZC22802

 <400> 13
 gaagcctcag cattgtaa 18

 <210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC17251

 <400> 14
 tctggacgtc ctctgctgg tatag 25

 <210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC17252

 <400> 15
 ggtatggagc aaggggcaag ttggg 25

 <210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC17156

 <400> 16
 gagtggcaac ttccagggcc aggagag 27

 <210> 17
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ZC17157

 <400> 17
 cttttgctag cctcaaccct gactatc 27

 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC21229

 <400> 18
 ggccagcaga acgaagca 18

 <210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC21711

 <400> 19
 cctgcctgcc gtttcttc 18

 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> FLAG peptide tag

 <400> 20
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

 <210> 21
 <211> 31

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC26461

 <400> 21
 tcagtcgtcc ggaaggtgga gcagggtgt g 31

 <210> 22
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC26475

 <400> 22
 cgactgatct agactagtcc atcgcatgt attcgggagg tactcccggc tg 52

 <210> 23
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC2359

 <400> 23
 agggacctga gcgagtc 17

 <210> 24
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC12581

 <400> 24
 tcgagctact tatcgtcatc gtccttatag tcg 33

 <210> 25

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC23433

 <400> 25
 ctccgcatcc atgtcctgga aggcgct 27

 <210> 26
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC23432

 <400> 26
 gcatgagcca tctagacagg atgacacagc a 31

 <210> 27
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC447

 <400> 27
 taacaatttc acacagg 17

 <210> 28
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide primer ZC976

 <400> 28
 cgttgtaaaa cgacggcc 18

<210> 29
 <211> 1635
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29

```

atgaaaatcg aagaaggtaa actggtaatc tggattaacg gcgataaagg ctataacggt      60
ctcgctgaag tggtaagaa attcgagaaa gataccggaa ttaaagtcac cgttgagcat      120
ccggataaac tggaaagaaa attcccacag gttgcggcaa ctggcgatgg ccctgacatt      180
aicttctggg cacacgaccg ctttggtggc tacgctcaat ctggcctggt ggctgaaatc      240
accccggaca aagcgttcca ggacaagctg tatccgttta cctgggatgc cgtacgttac      300
aacgcaagc  tgattgctta cccgatcgtt gttgaagcgt tatcgtgat  ttataacaaa      360
gatctgctgc cgaacccgcc aaaaacctgg gaagagatcc cggcgtgga  taaagaactg      420
aaagcgaaag gtaagagcgc gctgatgttc aacctgcaag aaccgtactt cacctggccg      480
ctgattgctg ctgacggggg ttatgcgttc aagtatgaaa acggcaagta cgacattaaa      540
gacgtgggcg tggataacgc tggcgcgaaa gcgggtctga ccttcctggt tgacctgatt      600
aaaaacaaac acatgaatgc agacaccgat tactccatcg cagaagctgc ctttaataaa      660
ggcgaaacag cgatgaccat caacggcccg tgggcatggt ccaacatcga caccagcaaa      720
gtgaattatg gtgtaacggt actgccgacc ttcaagggtc aaccatccaa accgttcgtt      780
ggcgtgctga ggcaggtat taacgccgcc agtccgaaca aagagctggc aaaagagttc      840
ctcgaaaact atctgctgac tgatgaaggt ctggaagcgg ttaataaaga caaacccgtg      900
ggtgccgtag cgtgaaagtc ttacgaggaa gagtggcga aagatccacg tattgccgcc      960
accatggaaa acgcccagaa aggtgaaatc atgccgaaca tcccgcagat gtccgctttc     1020
tggatagccg tgcgtaactgc ggtgatcaac gccgccagcg gtcgtcagac tgcgatgaa     1080
gccctgaaag acgcccagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cgcaattcg     1140
gtaccgctgg ttccgctgg atcctctatg tgccacaggt ggagcagggc tgtgctcttc     1200
cctgccgcc accggcctca gaggtcctca tcactgccat tgaaccagt cctgcagacc     1260
tcccaggagg aggtggagct gctctacgag ttctgctgg ccgaactga gatcagccct     1320
gacctgcaga tetccatcaa ggacgaggag ctggcctcct tgcggaaggc ctcagacttc     1380
cgcaccgtet geaacaacgt catcccacag agcatcccag acatccgcgg gctcagcggc     1440
agcctctcca gccaccctgg catcctcaag aaagaagact ttgaaaggac agtgctgacc     1500
ctggcctaca cagcctaccg cacagccctg tcccacygcc atcagaagga catctgggcg     1560
cagtcctctg ttagcctctt ccaggccctg aggcacgact tgatgcgctc ctcacagccg     1620
ggagtacctc cctga
  
```

<210> 30
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ZC22990

<400> 30
 tcaccacgcg aattcggtag cgctggtcc gcgtggtacc tctatgtgcc acaggtggag 60
 cagg 64

<210> 31
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ZC22991

<400> 31
 tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca tcagggaggt actcccggct 60
 g 61

<210> 32
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ZC19372

<400> 32
 tgtcgatgaa gccctgaaag acgcgagac taattcgagc 40

<210> 33
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide primer ZC19351

<400> 33
 acgcgagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cgcgattcg gtaccgctgg 60

<210> 34
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer ZC19352

<400> 34

actcactata ggcgaattg cccgggggat ccacgcgga ccagcggtag cgaattcgcg 60

<210> 35

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer ZC19371

<400> 35

acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tg 42

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Glu Glu peptide tag

<400> 36

Glu Tyr Pro Met Glu

1

5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/15002
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/19 A61K38/19 C12N5/06	C07K14/52 C12N5/10 C12N1/21
	C12Q1/68	C07K16/24 C12N1/19
		C12N15/62 G01N33/68
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) EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EMBL 'Online! MM1297226, accession number AA501097, 4 July 1997 (1997-07-04) M. MARRA ET AL: "The WashU-HHMI mouse EST project" XP002151138 * 75,87% identity in 518 nt overlap (17-534:100-610) and 93% identity in 43 bp overlap with fragment 350-394 from sequence ID no.1 * abstract & UNPUBLISHED,</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
<p>"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</p>		<p>"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</p>
Date of the actual completion of the international search 26 October 2000		Date of mailing of the international search report 08/11/2000
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

I

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
C 0 7 K	14/52	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 5
	16/24	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
	19/00	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N	5/06	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P	21/02		M
C 1 2 Q	1/68		
G 0 1 N	33/53		
		33/566	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	E
	33/566	A 6 1 K 37/02	

(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

(72)発明者 ウエスト, ジェームズ アール.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98115, シ
 アトル, ナインティーンズ ノースイース
 ト 7539

(72)発明者 ホリー, リチャード ディー.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98177, シ
 アトル, テンス アベニュー ノースウエス
 ト 12539

(72)発明者 バークヘッド, スティーブン ケイ.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98155, シ
 アトル, フィフティーンズ アベニュー ノ
 ースイースト 20007

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 CA01 CA04
CA07 CA11 DA02 DA03 EA02
EA04 FA02 GA11 HA01 HA11
4B063 QA01 QA19 QQ01 QQ42 QQ52
QR08 QR42 QR56 QR62 QR82
QS25 QS34 QS36 QX02
4B064 AG02 CA01 CA19 CC24 DA01
DA13
4B065 AA90X AA93Y AB01 BA01
CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 AA13
BA02 BA21 CA53 NA14 ZB262
4C085 AA14 BB01 CC03 CC04 DD23
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA01 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	4螺旋束蛋白zsig81		
公开(公告)号	JP2003501034A	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2001500771	申请日	2000-06-01
[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	ピディントンクリストファーエス ウエストジェームズアール ホリーリチャードディー バークヘッドスティーブンケイ		
发明人	ピディントン,クリストファー エス. ウエスト,ジェームズ アール. ホリー,リチャード ディー. バークヘッド,スティーブン ケイ.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/52 C07K16/24 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N15/09 C12N15/19 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/52 A61K38/00 C07K2319/00 C07K2319/02 C12N2799/026		
FI分类号	A61K39/395.T A61K48/00 A61P35/00 C07K14/52 C07K16/24 C07K19/00 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.E A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG02 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA02 4C084/BA21 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/CC04 4C085/DD23 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	09/323582 1999-06-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及编码多肽和4-螺旋束细胞因子的多核苷酸分子。该细胞因子被命名为zsig81, 主要在心脏, 肺和肝脏中表达受到限制。已经显示Zsig81刺激造血细胞的增殖, 并且可能在这些细胞的扩增以及造血细胞相关病症中有效。而且, 本发明涉及制备抗体和zsig81多肽的方法。

表 1

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