

(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 39/02	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		39/12	4 B 0 6 3
39/02		39/39	4 B 0 6 4
39/12		A 6 1 P 31/04 171	4 B 0 6 5
39/39		31/12 171	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 14数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2002 - 74776(P2002 - 74776)	(71)出願人	591281220 日本全薬工業株式会社 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1
(22)出願日	平成14年3月18日(2002.3.18)	(72)発明者	三宅 正志 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1 - 1 日 本全薬工業株式会社内
		(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外 2 名)
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 イヌインターロイキン 2 1

(57)【要約】 (修正有)
【課題】 イヌインターロイキン21、該イヌインターロイキン21をコードする遺伝子を提供する。
【解決手段】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。
(a) イヌ由来の特定なアミノ酸配列からなるタンパク質
(b) イヌ由来の特定なアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌインターロイキン21活性を有するタンパク質である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌインターロイキン21活性を有するタンパク質

【請求項 2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌインターロイキン21活性を有するタンパク質

【請求項 3】 以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子。

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列を含むDNA

(d) 配列番号 1 の塩基配列を含むDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつイヌインターロイキン21活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 4】 請求項 2 または 3 に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からイヌインターロイキン21を採取することを特徴とするイヌインターロイキン21の製造方法。

【請求項 7】 請求項 2 または 3 に記載の遺伝子の少なくとも一部の断片を含むイヌインターロイキン21の検出用試薬。

【請求項 8】 請求項 1 に記載の組換えイヌインターロイキン21を含む医薬組成物。

【請求項 9】 請求項 1 に記載の組換えイヌインターロイキン21を含むウイルスもしくは細菌感染症に対する免疫増強剤。

【請求項 10】 請求項 1 に記載の組換えイヌインターロイキン21を含む抗癌剤。

【請求項 11】 請求項 1 に記載の組換えイヌインターロイキン21を含むワクチン用アジュバント。

【請求項 12】 請求項 1 に記載の組換えイヌインターロイキン21に対するモノクローナル抗体。

【請求項 13】 イヌに請求項 1 に記載の組換えイヌインターロイキン21を投与することを含む、イヌのウイルスもしくは細菌感染症を治療する方法。

【請求項 14】 イヌに請求項 1 に記載の組換えイヌインターロイキン21を投与することを含む、イヌの癌を治療する方法。

【請求項 15】 イヌに請求項 1 に記載の組換えイヌイ

ンターロイキン21およびワクチンを投与することを含む、ウイルスまたは細菌感染症を予防または治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、イヌインターロイキン21(canine IL-21)、該イヌインターロイキン21をコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】インターロイキン21は、ヒトにおいて新規のサイトカインレセプターのリガンドとして発見された(Parrish-Novak, J. et al., Nature, 408:57, 2000)。ヒトインターロイキン21の前駆体は162個のアミノ酸残基からなり、シグナルペプチドがはずれて131個のアミノ酸残基からなる成熟型となる。成熟体の推定分子量は約15,000である。インターロイキン21は、他のサイトカインと同じように4個の α ヘリックス構造(A,B,C,D)とそれらをつなぐループからなる3次元構造を有する。ヒトインターロイキン21とマウスインターロイキン21の間では、アミノ酸配列で57%の相同性が認められている。インターロイキン21は活性化CD4⁺T細胞から産生される。

【0003】インターロイキン21は単独では静止期B細胞の増殖を誘導することはできないが、抗CD40抗体の共存下ではB細胞の増殖を促進する。しかし、抗IgM抗体とIL4によるB細胞増殖誘導に対しては逆に抑制的に働く。このように、インターロイキン21は共刺激物質によりB細胞の増殖を促進したり抑制したりする。インターロイキン21は、またT細胞に対しても増殖活性を示す。さらに、in vitroで、インターロイキン21はFlt3L(fms-related tyrosin kinase 3 Ligand)とIL15(Interleukin 15)の共存下で造血前駆細胞からのNK細胞の増殖・分化を促進することも示されている。

【0004】インターロイキン21は、T細胞の増殖促進、NK細胞の分化・成熟化の促進、B細胞増殖の促進あるいは抑制などの生物学的作用を介して、免疫反応の誘導や調節にかかわっている。しかし、ヒトインターロイキン21は非ヒト動物にとっては、異種抗原であり免疫反応を誘起する可能性があり、安定な治療を可能にするという点で同種抗原による治療が望ましい。イヌやネコのインターロイキン21はいまだ単離されておらず、イヌおよびネコを対象とした治療に対しては、より大きい治療効果が望まれる同種のインターロイキン21が望まれていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、イヌインターロイキン21、該イヌインターロイキン21をコードする遺伝子を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題

を解決するため鋭意検討を行った結果、イヌインターロイキン21遺伝子配列を決定することに成功し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質である。

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌインターロイキン21活性を有するタンパク質

【0007】さらに、本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である。

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌインターロイキン21活性を有するタンパク質

【0008】さらに、本発明は、以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子である。

(c) 配列番号1で表される塩基配列を含むDNA

(d) 配列番号1の塩基配列を含むDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつイヌインターロイキン21活性を有するタンパク質をコードするDNA

【0009】さらに、本発明は、上記遺伝子を含有する組換えベクターである。さらに、本発明は、上記組換えベクターを含む形質転換体である。さらに、本発明は、上記形質転換体を培養し、得られる培養物からイヌインターロイキン21を採取することを特徴とするイヌインターロイキン21の製造方法である。

【0010】さらに、本発明は、上記遺伝子の少なくとも一部の断片を含むイヌインターロイキン21の検出用試薬である。さらに、本発明は、上記組換えイヌインターロイキン21を含有する医薬組成物である。さらに、本発明は、ウイルスもしくは細菌感染症に対する免疫増強剤、または抗癌剤である医薬組成物である。さらに、本発明は、前記組換えイヌインターロイキン21を含有するワクチン用アジュバントである。

【0011】さらに、本発明は、前記組換えイヌインターロイキン21に対するモノクローナル抗体である。さらに、本発明は、前記組換えイヌインターロイキン21を含有するウイルスもしくは細菌感染症に対する免疫増強剤である。さらに、本発明は、前記組換えイヌインターロイキン21を含有する抗癌剤である。

【0012】さらに、本発明は、前記組換えイヌインターロイキン21を含有するワクチン用アジュバントである。さらに、本発明は、前記組換えイヌインターロイキン21に対するモノクローナル抗体である。さらに、イヌに前記組換えイヌインターロイキン21を投与することを

含む、イヌのウイルスもしくは細菌感染症を治療する方法である。

【0013】さらに、イヌに前記組換えイヌインターロイキン21を投与することを含む、イヌの癌を治療する方法である。さらに、イヌに前記組換えイヌインターロイキン21およびワクチンを投与することを含む、ウイルスまたは細菌感染症を予防または治療する方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0014】

10 【発明の実施の形態】本発明は、イヌ、ネコ等のウイルス若しくは細菌感染症、癌等に対する治療効果があり、またワクチン用アジュバントとして使用できるイヌインターロイキン21をコードする遺伝子、組換えイヌインターロイキン21、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該イヌインターロイキン21の製造法、該イヌインターロイキン21の検出法、該イヌインターロイキン21を含有する医薬組成物および該イヌインターロイキン21に対するモノクローナル抗体および該イヌインターロイキン21を用いたイヌのウイルスまたは細菌感染症、および癌等の疾患の治療法に関するものである。さらに、本発明はイヌインターロイキン21をワクチンとともに投与することを含むウイルスまたは細菌感染症の予防法または治療法に関するものである。

20 【0015】本発明者らは、RNAを抽出・精製し、インターロイキン21に特異的と考えられるいくつかのプライマーを設計し、RT-PCRを行い、いくつかのDNA断片を得た。この得られた複数のDNA断片をプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列を決定した。決定された塩基配列をもとに、各DNA断片を重複する部分を除いた、目的のイヌインターロイキン21遺伝子配列を決定した。本発明の遺伝子は、この方法により目的の遺伝子配列を決定したものである。

【0016】1. 本発明の遺伝子のクローニング

(1) RT-PCRによるcDNAクローンの作製

mRNAの供給源としては、イヌの肝臓、腎臓、肺、脳、胸腺、白血球などの組織が挙げられる。mRNAの調製は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、上記組織又は細胞から、グアニジウムチオシアネート-フェノール法などにより全RNAを抽出した後、オリゴdT-セルロースやポリU-セファロース等を用いたアフィニティカラム法、あるいはバッチ法によりポリ(A)⁺RNA(mRNA)を得ることができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A)⁺RNAをさらに分画してもよい。

【0017】このようにして得られたmRNAを鋳型として、オリゴdTプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成する。目的のDNA配列を含むクローンを得るためには、例えば、既に取得されているインターロイキン21タンパク質ファミリーのアミノ酸配列に対応する縮重センスプライマー及び縮重アンチセンスプライマーを

合成し、これを用いてPCRを行い、得られた断片を適当なクローニングベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。そしてこの組換えベクターを用いて大腸菌等を形質転換し、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性等を指標として形質転換体を選択することにより、イヌインターロイキン21遺伝子の一部又は全長の配列を含むクローンを得ることができる。但し、本発明においてはこれらのプライマーに限定されるものではない。

【0018】ここで、大腸菌の形質転換は、Hanahanの方法[Hanahan, D.: J. Mol. Biol. 166: 557-580(1983)], すなわち塩化カルシウム、塩化マグネシウム又は塩化ルビジウムを共存させて調製したコンピテント細胞に、組換えベクターを加える方法等により行うことができる。なお、ベクターとしてプラスミドを用いる場合はテトラサイクリン、アンピシリン等の薬剤耐性遺伝子を含有することが必要である。また、プラスミド以外のクローニングベクター、例えばλファージ(λgt11等)を用いることもできる。

【0019】(2) DNA断片の塩基配列の決定
上記DNA断片を含む単一の又は複数の単離クローンについて、PCR産物をテンプレートにして塩基配列を決定する。塩基配列の決定はマキサム-ギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機(例えばApplied Biosystems社製Model 310蛍光シーケンサー等)を用いて配列決定が行われる。上記の方法によって得られた、単一又は複数のインターロイキン21由来のDNA断片の塩基配列情報をもとに、重複する部分を除くことで目的のインターロイキン21の塩基配列を決定する。

【0020】配列番号1に本発明のイヌインターロイキン21遺伝子の塩基配列を、配列番号2に本発明のイヌインターロイキン21のアミノ酸配列を例示するが、このアミノ酸配列からなるタンパク質がイヌインターロイキン21活性を有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも1個、好ましくは1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。

【0021】例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1又は数個(例えば1~10個、さらに好ましくは1~5個)のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号2で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1又は数個(例えば1~10個、さらに好ましくは1~5個)のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1又は数個(例えば1~10個、さらに好ましくは1~5個)のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

【0022】このような配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列として、配列番号2のアミノ酸配

列と、BLAST等(例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて)を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有しているものが挙げられる。

【0023】相同性を検定する方法およびアルゴリズムは、他にも例えば、BLASTプログラム(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information(米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール))、ALIGN、AMAS(Analysis of Multiply Aligned Sequences)、AMPS(Protein Multiple Sequence Alignment(タンパク質多重配列アラインメント))、ASSET(Aligned Segment Statistical Evaluation Tool(アラインしたセグメントの統計学的計算ツール))、BANDS、BESTSCOR、BIOSCAN(Biological Sequence Comparative Analysis Node)、BLIMPS(BLOCKS IMPROVED Searcher(ブロック改良サーチャー))、FASTA、Intervals & Points、BMB、CLUSTAL V、CLUSTAL W、CONSENSUS、LCONSENSUS、WCONSENSUS、Smith-Watermanアルゴリズム、DARWIN、Las Vegasアルゴリズム、FNAT(Forced Nucleotide Alignment Tool(強制ヌクレオチドアラインメントツール))、Framealign、Framesearch、DYNAMIC、FILTER、FSAP(Fristensky Sequence Analysis Package(フリステンスキー配列解析パッケージ))、GAP(Global Alignment Program(グローバルアラインメントプログラム))、GENAL、GIBBS、GenQuest、ISSC(Sensitive Sequence Comparison(感受性配列比較))、LALIGN(Local Sequence Alignment(ローカル配列アラインメント))、LCP(Local Content Program(ローカルコンテンツプログラム))、MACAW(Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench(多重アラインメント構築および解析ワークベンチ))、MAP(Multiple Alignment Program(多重アラインメントプログラム))、MBLKP、MBLKN、PIMA(Pattern-Induced Multi-sequence Alignment(パターン誘導多重配列アラインメント))、SAGA(Sequence Alignment by Genetic Algorithm(遺伝的アルゴリズムによる配列アラインメント))およびWHAT-IF等が挙げられる。

【0024】このような配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質は配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同一である。

【0025】また、上記遺伝子と相補的な配列からなるDNAと下記の条件下でハイブリダイズすることができるDNAであってイヌインターロイキン21活性を有するタンパク質をコードするDNAも本発明の遺伝子に含まれる。すなわち、DNAを固定したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、68℃でハイブリダイゼーションを行った

後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSCとは150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウムからなる）を用い、68で洗浄することにより同定することができる条件をいう。

【0026】さらに、上記DNAに対するRNA、又は該RNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるRNAであってイヌインターロイキン21活性を有するタンパク質をコードするRNAも本発明に含まれる。

【0027】ここで、インターロイキン21活性とは、T細胞の増殖促進、NK細胞の分化・成熟化の促進、B細胞増殖の促進あるいは抑制などの生物学的作用をいい、このような作用により免疫反応の誘導や調節に働く。

【0028】インターロイキン21活性は、例えばT細胞またはB細胞をインターロイキンの存在下で培養したときの増殖を指標に測定することができる。なお、遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法や Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K(TAKARA社製）やMutant-G(TAKARA社製））などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて行うことができる。

【0029】本発明の遺伝子は、イヌインターロイキン21のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有している。一旦本発明の遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はcDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

【0030】2. 組換えベクター及び形質転換体の作製 (1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の遺伝子を連結(挿入)することにより得ることができる。本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA等が挙げられる。

【0031】プラスミド DNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えばpBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110、pTP5等）、酵母由来のプラスミド（例えばYEpl3、YEpl24、YCp50等）などが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ（Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP等）が挙げられる。さらに、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス(HIV)等のDNAウイルスまたはRNAウイルス、pCl-neo、pCDNA3、pZeoSV等の動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

【0032】ベクターに本発明の遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

【0033】本発明の遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、本発明の遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、イントロンの5'末端側に存在するスプライス供与部位およびイントロンの3'末端側に存在するスプライス受容部位からなるスプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列(SD配列)などを含有するものを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【0034】(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)等のエッシャーリヒア属、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属に属する細菌が挙げられ、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等の酵母が挙げられ、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞が挙げられ、あるいはS121等の昆虫細胞が挙げられる。

【0035】大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0036】大腸菌としては、例えばエッシャーリヒア・コリ(*Escherichia coli*) DH1などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0037】プロモーターは、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、P_Lプロモーター、P_Rプロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。tacプロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。

【0038】細菌への組換えベクターの導入方法は、細

菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法[Cohen, S.N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 2110 (1972)], エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0039】酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ピヒア・パストリス(*Pichia pastoris*)などが用いられる。この場合、プロモーターは酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばgal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等を用いることができる。

【0040】酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法[Becker, D.M. et al.: Methods. Enzymol., 194: 182(1990)], スフェロプラスト法[Hinnen, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1929(1978)], 酢酸リチウム法[Itoh, H.: J. Bacteriol., 153: 163(1983)]等が挙げられる。

【0041】動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。プロモーターとしてSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。昆虫細胞を宿主とする場合は、S121細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0042】(3) 本発明のタンパク質の生産
本発明のタンパク質は、本発明のイヌインターロイキン21遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有するもの、または該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に前記変異が導入されたアミノ酸配列を有し、かつイヌインターロイキン21活性を有するものである。なお、本発明のタンパク質をイヌインターロイキン21タンパク質ともいう。

【0043】本発明のイヌインターロイキン21タンパク質は、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清、あるいは培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。

【0044】本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換

体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0045】炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が挙げられる。

【0046】窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が挙げられる。

【0047】無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が挙げられる。培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で行う。なお、培地のpHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。

【0048】培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドール酢酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0049】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地として、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1~30日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0050】培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することによりイヌインターロイキン21タンパク質を抽出する。また、本発明のタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることで、前記培養物中から本発明のタンパク質を単離精製することができる。

【0051】3. 本発明の遺伝子を用いたイヌインター

ロイキン21の検出方法及び検出用試薬

(1)本発明の遺伝子又はその断片のプロープとしての利用

本発明においては、上記のDNA又はRNAとハイブリダイズし、該DNA又はRNAを特異的に検出するプロープもイヌインターロイキン21の検出用試薬として提供される。該プロープは、通常使用される放射性同位元素（例えば、³²P、³⁵S）、酵素（例えば、ディゴキシゲニン、フルオロレッセイン）、などにより標識され、通常のプロットティング分析、In situハイブリダイゼーションなどにより該DNA又はRNAと特異的にハイブリダイズし、検出させる。

【0052】本発明においてプロープとして使用するDNA又はRNAは、配列番号1に記載したDNA又はこれに対応するRNAの塩基配列のうち少なくとも一部を有するものである。プロープの長さは200～300塩基であるが、配列の全部を有するものであってもよく、特に限定されるものではない。

【0053】4．本発明の組換えイヌインターロイキン21を含有する医薬組成物

本発明の組換えイヌインターロイキン21は、抽出精製された組換えイヌインターロイキン21または、プラスミド等に挿入され、イヌの体内で翻訳させる組換えイヌインターロイキン21であり、ウイルス、細菌もしくはマイコプラズマ感染症、癌等の疾患の治療用医薬組成物として使用される。犬のウイルス疾患としては、イヌジステンパー、イヌ伝染性肝炎、イヌ伝染性喉頭気管炎、イヌパルボウイルス感染症、イヌヘルペスウイルス病、イヌコロナウイルス感染症、イヌパラインフルエンザウイルス感染症、イヌのパピローマ等が例示でき、犬の細菌疾患としては、イヌのレプトスピラ症、イヌのライム病、イヌのブルセラ病、イヌのカンピロバクター症、イヌのボルデテラ症、破傷風、イヌの嫌気性細菌症、イヌの歯周病が例示できる。さらにイヌのマイコプラズマ疾患としては、イヌのエールリッヒア病が例示できる。本発明のイヌインターロイキン21はこれらの総ての感染症に有効である。

【0054】さらに、本発明の組換えイヌインターロイキン21は、ワクチン用アジュバントとして使用できる。本発明の医薬組成物は、イヌに投与した場合であっても、抗原性の問題がなく長期間使用することができる。

【0055】本発明の医薬組成物は、イヌインターロイキン21もしくはその塩またはプラスミド等にインターロイキン21遺伝子を結合させイヌの体内で翻訳させることを目的とした組換えDNAと薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤を含む。本発明の医薬組成物は、種々の形態で投与することができる。このような投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。かか

る組成物は、公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射剤は、イヌインターロイキン21またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。

【0056】その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常経口投与では、1日約0.001mg～100mgであり、1回または数回に分けて投与される。また、非経口投与では、1回あたり、0.001mg～100mgを皮下注射、筋肉注射、または静脈注射によって投与される。また、イヌの体内で翻訳させるプラスミド等に挿入された組換えインターロイキン21は、数日または数週間または数ヶ月おきに1回あたり、0.001mg～100mgを皮下注射、筋肉注射、または静脈注射によって投与される。

【0057】さらに、本発明のイヌインターロイキン21をワクチン用アジュバントとして用いることができる。インターロイキン21は、T細胞の増殖促進、NK細胞の分化・成熟化の促進、B細胞増殖の促進あるいは抑制などの生物学的作用を介して、免疫賦活作用を発揮し得る。ウイルス、細菌に対するワクチンと本発明のインターロイキン21を動物に経口的に、または皮下、皮内、静脈内、筋肉に投与することにより免疫反応を賦活しワクチン効果を増強させることができる。本発明のインターロイキン21は、ワクチン用アジュバントとして動物にワクチンと別々に投与してもよいが、混合して同時に投与することが好ましい。この場合、ワクチンと本発明のインターロイキン21を含むワクチン組成物として投与し得る。該組成物は、さらに製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。例えば、注射剤の場合、イヌインターロイキン21またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。

【0058】5．イヌインターロイキン21に対するモノ

クローナル抗体の作製

本発明の組換えイヌインターロイキン21に対するモノクローナル抗体は、公知の方法を用いて作製できる。モノクローナル抗体産生細胞を作製するためには、まず本発明の組換えイヌインターロイキン21は、サル、ウサギ、イヌ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等の温血動物に対する投与により抗体が産生可能な部位に必要な応じて担体、希釈剤とともに投与される。抗体産生能を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与することもできる。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。抗原で免疫されたマウス等の温血動物から抗体価の認められた個体を選抜し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得ることができる。抗血清中の抗体価の測定は、標識化組換えイヌインターロイキン21と抗血清とを反応させ、抗体に結合した標識の活性を測定することにより行われる。融合操作は、例えば、ケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495(1975))に基づいて実施できる。抗体産生細胞と骨髓腫細胞との融合促進剤としては、ポリエチレングリコールやセンダイウイルス等を使用できる。骨髓腫細胞としては、SP2/0、NS-1などが使用される。融合に使用される抗体産生脾臓細胞の数と骨髓腫細胞の数との比は、1:1～20:1程度であり、ポリエチレングリコールは、10～80%程度の濃度で使用され、細胞融合は、20～40%程度の温度で、約1～10分インキュベーションすることにより行われる。

【0059】モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには、組換えイヌインターロイキン21を直接あるいは担体とともに吸着させた困相にハイブリドーマ培養上清を加え、次いで放射標識または酵素標識した抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを加え、固相に結合した抗組換えイヌインターロイキン21モノクローナル抗体を検出する方法等を用いて行われる。モノクローナル抗体の選別は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを添加した動物細胞用培地(HAT)でハイブリドーマを培養し、ハイブリドーマ培養上清の抗体価を測定することにより行われる。

【0060】得られるモノクローナル抗体は、脱吸着法、超遠心法、ゲルろ過法等公知の方法により精製される。本発明の組換えイヌインターロイキン21に対するモノクローナル抗体は、ネフロメトリー、競合法、サンドイッチ法等により、本発明の組換えイヌインターロイキン21の定量に使用できる。

【0061】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕イヌインターロイキン21遺伝子の単離

(a) イヌインターロイキン21由来のDNA断片の取得
既に報告されているヒトおよびマウスのタンパク質翻訳領域内において、動物種を越えて比較的良く保存されている塩基配列を指標とし、翻訳領域内にセンスプライマーを設定した。アンチセンスプライマーも同様にして翻訳領域内に設定する。イヌ脾臓からTrizol reagent (Invitrogen社製)を用いて総RNAを抽出した。抽出した総RNAから、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)によりcDNAを合成し、Reverse Transcription (RT)- Polymerase Chain Reaction (PCR)反応に供した。一度のPCR反応では、目的断片を増幅することが困難であったため、一度目のPCR産物を鋳型として、ネステッドPCR反応を行い、目的のサイズのPCR産物を得た。PCR反応は以下の組成を有する反応液を用い、94℃ 2分反応させた後、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとし、これを30回繰り返した後に、72℃ 5分反応後、4℃ に保存するサイクルで行った。

【0062】反応液の組成: 1×PCR Buffer、0.2 mM dNTP、0.005 units/μl EX Taq polymerase (TaKaRa社製)、0.5 μM 各primer

センスプライマー: 5'-GTCTGATGGTCATCTTCTGGGGAC3' (配列番号3)

アンチセンスプライマー: 5'-TGGTCCACAAATCAAGCTCCCAAGG3' (配列番号4)

ネステッドセンスプライマー: 5'-AGGACAGATGCTGATGAATCATC3' (配列番号5)

ネステッドアンチセンスプライマー: 5'-TCTTTCTAGGAATCTTTGGGTG3' (配列番号6)

【0063】得られたPCR産物は、エチジウムブロマイド存在下アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするPCR産物のサイズを確認した。予測されるサイズの産物を、アガロースゲルより回収し(TaKaRa社製RECOCHIP)、pGEM-T Easy Vector (Promega社製)のクローニングサイトにT4 DNAリガーゼを用いて結合させ、宿主大腸菌JM109 (Promega社製)を形質転換した。すなわち、大腸菌コンピテントセルとプラスミドを混和後、氷上で30分、42℃で1分、氷上で5分の温度処理を行い、SOC培地(2% Trypton、0.5% yeast extract、0.05% NaCl、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄、20 mM Glucose)に浮遊して37℃で1時間インキュベートした。その後50 μg/mlアンピシリンを添加したLB寒天培地上(1% yeast extract、0.5% trypton、1% NaCl)に形質転換した大腸菌を37℃、一晚培養後に大腸菌コロニーを得た。Insert Check Ready (TOYOBO社製)キットにより目的の挿入断片を含むクローンを選択し、一晚50 μg/mlアンピシリンを添加したLB培地で培養後、プラスミドDNAをWizard SV Minipreps DNA purification system (Promega社製)により精製した。アマシャム社製のダイプライマーサイクルシークエンスキットを用いてシークエンス反応を行

い、蛍光DNAシーケンサー（島津製作所社製）により塩基配列の解析を行った。なお、最終的な塩基配列の決定は、3クローンの塩基配列解析を行い、各クローンの塩基配列の完全一致をもって決定とした。

【0064】全長のイヌインターロイキン21遺伝子のクローニングは、上記で得られたイヌインターロイキン21遺伝子断片の塩基配列を基に設計したプライマーを用いてRapid Amplification cDNA Ends (RACE) 法により行った。RACE反応は、CLONTECH社製SMART RACE Amplification kitを用い、添付のマニュアルに従い行った。一度10のRACE反応では目的の増幅産物が得られなかったため、ネステッドPCR反応を行いイヌインターロイキン21産物が得られた。

【0065】

F1: 5'TGACTTGACCTGAATCTCTGCCAGC3' (配列番号7)

F2: 5'CAGAAGATGTAAGAGGCATTGTGAGC3' (配列番号8)

R1: 5'GCTCACAATGCCTCTTTACATCTTCTG3' (配列番号9)

R2: 5'AGCTGGCAGAGATTCAGGGTCCAAGTC3' (配列番号10)

【0066】F1およびF2プライマーは、3'-RACE反応、そしてR1およびR2プライマーは5'-RACE反応に用いた。なお、F2、R2はネステッドPCR反応に用いた。増幅産物は、先に述べたようにアガロースゲル電気泳動による分離、回収の後、pGEM-T Easyベクターに連結し、塩基配列解析に供された。

【0067】(b) 挿入断片の塩基配列

(a) で得られたイヌインターロイキン21 cDNA断片及びRACE産物の塩基配列を、Genetyx-win ver.4ソフトウェア（ソフトウェア開発社製）を用いて組み合わせ、イヌインターロイキン21遺伝子タンパク質翻訳領域の全塩基配列を得た。その配列は配列番号1に記載した。配列番号1は441 bpからなっており、GENBANK / EMBL DNA Data Baseを使用し、配列番号1に記載した塩基配列を検索したが、同一の配列は存在しなかった。従って、この塩基配列を有するDNAは全く新規なものであることが認められた。オンライン相同性検索プログラムであるBLAST、ならびにGenetyx-win ver.4ソフトウェアを用いて相同性検索を行ったところ、配列番号1の塩基配列は、ヒト及びマウスのインターロイキン21遺伝子塩基配列との間に高い相同性がみられた。

【0068】配列番号1の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、配列番号2に記載した。塩基配列の場合と同様にアミノ酸配列について相同性検索を行ったところ、配列番号2のアミノ酸配列は、ヒト及びマウスのインターロイキン21アミノ酸配列との間に高い相同性が認められた。これらのことから、配列番号1の塩基配列はイヌインターロイキン21遺伝子であることが強く示唆された。

【0069】(c) イヌインターロイキン21タンパク質翻訳領域全長の増幅およびクローニング

(b) で得られたイヌインターロイキン21遺伝子の塩基配列を基に、タンパク質翻訳領域全長を増幅するプライマーを設計し、イヌ脾臓由来cDNAを鋳型とし、以下の組成を有する反応液を用いてPCR反応を行った。94 2分反応させた後、94 15秒、60 30秒、68 2分を1サイクルとし、このサイクルを18回繰り返した後に、72 5分反応後、4 に保存した。ネステッドPCR反応は、94 2分反応させた後、94 30秒、55 30秒、68 30秒を1サイクルとし、このサイクルを30回繰り返した後に、68 5分反応後、4 に保存するサイクルでPCR反応を行なった。

【0070】反応液の組成：1×PCR Buffer、1 mM MgSO₄、0.2 mM dNTP、0.005 units/μl KOD plus DNA polymerase (TOYOBO社製)、0.5 μM 各primer

センスプライマー：5'ACTGGCACTTAGAAGATCCAGTGC3' (配列番号11)

アンチセンスプライマー：5'GATCCTCAGGAACCTTCATATCTC3' (配列番号12)

得られたPCR産物は、エチジウムブロマイド存在下アガロースゲル電気泳動を行い、PCR断片のサイズを確認した。予測されるサイズのPCR断片をアガロースゲルより回収し、EcoRV消化したpBluescript II KS(+)プラスミドベクター (STRATAGENE社製) にDNA ligation kit ver.2 (TaKaRa社製) を用い結合させた。そして(a)で記したように、宿主大腸菌の形質転換を行い、大腸菌コロニーを得た。Insert Check Readyキットにより目的の挿入断片を含むクローンを選択し、一晚LB培地 (50 μg/mlアンピシリン含) で培養後、プラスミドDNAを精製し、塩基配列の確認を行った。

【0071】〔実施例2〕哺乳動物細胞による組換えイヌインターロイキン21タンパク質の作出

(a) イヌインターロイキン21をコードするDNAを含む動物細胞発現用組換えプラスミドの作製

実施例1(c) で得られたイヌインターロイキン21のタンパク質翻訳領域を全長を含むプラスミドDNAを鋳型とし、制限酵素BamHI切断部位を付加した、センスおよびアンチセンスプライマーを用いてPCR法によりBamHI切断部位を付加したイヌインターロイキン21タンパクをコードするDNA断片を調製した。このDNA断片をBamHI消化し、哺乳動物細胞用発現ベクターであるpCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega社製) のBamHI切断部位に連結した。前述の方法により大腸菌の形質転換を行い、イヌインターロイキン21遺伝子が含まれる大腸菌クローンを選択、プラスミドDNAを精製した。これらクローンを発現ベクター由来シーケンスプライマーであるT7-EEV (Promega社製) を用いて塩基配列の解析を行い、設計どおりにイヌインターロイキン21のDNA断片が挿入されていることを確認した。

【0072】(b) COS-7細胞での組換えイヌインターロイキン21タンパク質の生産

COS-7 (サル腎由来)細胞は、10 %ウシ胎児血清 (Moregate社製)、0.3 % Tryptose Phosphate broth (DIFCO社製)を含むE-MEM (日水製薬社製)培地中で、37 °C、5 % CO₂存在下で継代を行った。形質転換の前日、飽和細胞密度まで増殖させたCOS-7細胞をPBS緩衝液で洗浄した後、トリプシン-EDTA溶液を加え、室温で約2分間静置した。上記の増殖用培地を加え、細胞を良く懸濁した後、1,200 rpm、4 °C、5分間遠心した。上清を除き、再度増殖用培地に懸濁した後、常法に従い細胞数をカウントした。5 mlの培地中に8×10⁵個になるように細胞数を調整後、直径60 mmのシャーレ (FALCON社製)に播き、37 °C、5 % CO₂存在下で一晩培養した。(a)で得られたイヌインターロイキン21発現用プラスミドDNAをWizard SV Minipreps DNA purification systemにより精製し、蒸留水中に1 µg/µlの濃度になるように調整した。COS-7細胞への遺伝子導入は、TransFast Transfection Reagent (Promega社製)を用いて行い、遺伝子導入操作は説明書に従い行なった。遺伝子導入後、37 °C、5 % CO₂存在下で48時間培養し、組換えイヌインターロイキン21が生産された培養上清を得た。この培養上清を回収し、実施例3に記載のとおり生物活性を測定した。

【0073】(c)組換えイヌインターロイキン21タンパク質を安定的に発現する細胞株の作出
CHO-K1 (チャイニーズハムスター卵巣由来)細胞を用い、組換えイヌインターロイキン21タンパク質を安定的に発現する細胞株を得た。CHO-K1細胞は、上記と同様に10 %ウシ胎児血清、0.3 % Tryptose Phosphate brothを*

*含むE-MEM培地中で、37 °C、5 % CO₂存在下で継代を行なった。遺伝子導入の前日、飽和細胞密度まで増殖させたCHO-K1細胞を、前記の方法のとおりプレートより剥離、培地中に浮遊させ、細胞数をカウントした。そして500 µlの培地中に1.2×10⁵個となるように細胞数を調整し、24穴シャーレ (FALCON社製)に播き、37 °C、5 % CO₂存在下で一晩培養した。そして、実施例2 (b)と同様の方法でイヌインターロイキン21発現プラスミドをCHO-K1細胞に導入した。遺伝子導入後、37 °C、5 % CO₂存在下で一晩培養を行った後に細胞を剥離させ、500 µg/mlのG-418 (Promega社製)を含む上記の増殖培地12 mlに再懸濁し、24穴組織培養用フラスコ (FALCON社製)に500 µlずつ分注した。その後3日毎に培地を交換し、約1ヶ月間継続して培養を行い安定発現株を得た。得られた細胞株から、培養上清中のイヌインターロイキン21活性の高い細胞株を限界希釈法によりスクリーニングし、組換えイヌインターロイキン21タンパク質生産株を得た。

【0074】

【発明の効果】本発明により、組換えイヌインターロイキン21、該イヌインターロイキン21をコードする遺伝子が提供される。本発明の組換えイヌインターロイキン21は、NK細胞を増殖する作用を有し、イヌのウイルス若しくは細菌感染症、癌等の疾患等の治療に有用であり、またワクチン用アジュバントとして使用できる。

【0075】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```
<110> NIPPON ZENYAKU KOGYO CO., LTD
<120> canine IL21
<130> P02-0117
<140>
<141>
<160> 12
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 441
<212> DNA
<213> Canis familiaris
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(441)
<400> 1
atg gag aag ata gtc atc tgc ctg atg gtc
atc ttc ttg ggg aca gtc 48
Met Glu Lys Ile Val Ile Cys Leu Met Val
Ile Phe Leu Gly Thr Val
1 5 10
gcc cat aaa tca agc ttc caa gag caa gat
ctt ctc ttg att aga atg 96
```

cgt caa ctt ata gat att gtt gat cag ctt
 aaa aat tat gtg aat gac 144
 Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln Leu
 Lys Asn Tyr Val Asn Asp
 35 40 45
 ttg gac cct gaa tct ctg cca gct cca gaa
 gat gta aag agg cat tgt 192
 Leu Asp Pro Glu Ser Leu Pro Ala Pro Glu
 Asp Val Lys Arg His Cys
 50 55 60
 gag cgg tca gct ttt tca tgt ttt cag aag
 gtc caa cta aag gca gca 240
 Glu Arg Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys
 Val Gln Leu Lys Ala Ala
 65 70 75 80
 aac aca gga ggc aat gaa cag ata atc aat
 gta tta act aaa cag ctg 288
 Asn Thr Gly Gly Asn Glu Gln Ile Ile Asn
 Val Leu Thr Lys Gln Leu
 85 90 95
 aag agg aaa cta cct ccc aca aat gca ggc
 aga aga cag aaa cac aga 336
 Lys Arg Lys Leu Pro Pro Thr Asn Ala Gly
 Arg Arg Gln Lys His Arg
 100 105 110
 cca gca tgc ccc tca tgt gat tct tat gag
 aaa gca cca ccc aaa gaa 384
 Pro Ala Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu
 Lys Ala Pro Pro Lys Glu
 115 120 125
 ttc cta gaa aga ctg aaa tca ctc atc caa
 aag atg att cat caa cat 432
 Phe Leu Glu Arg Leu Lys Ser Leu Ile Gln
 Lys Met Ile His Gln His
 130 135 140
 ctc tcc tag
 441
 Leu Ser
 145
 <210> 2
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris
 <400> 2
 Met Glu Lys Ile Val Ile Cys Leu Met Val
 Ile Phe Leu Gly Thr Val
 1 5 10 15
 Ala His Lys Ser Ser Phe Gln Glu Gln Asp
 Leu Leu Leu Ile Arg Met
 20 25 30

19

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Synthetic
<400> 3
gtctgatggt catcttcttg gggac
25

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Synthetic
<400> 4
tggtccacaa atcaagctcc caagg
25

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Synthetic
<400> 5
aggacagatg ctgatgaatc atc
23

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Synthetic
<400> 6
tctttctagg aattctttgg gtg
23

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:Synthetic
<400> 7

tgacttggac cctgaatctc tgccagc
20 27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:Synthetic

<400> 8

cagaagatgt aaagaggcat tgtgagc
27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:Synthetic

<400> 9

gctcacaatg cctctttaca tcttctg
27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:Synthetic

<400> 10

agctggcaga gattcagggt ccaagtc
27

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:Synthetic

<400> 11

actggcactt agaagatcca gtgc
24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:Synthetic

<400> 12

gatcctcagc aaccttcata tctc

22

【 0 0 7 6 】

24

* * 【配列表フリーテキスト】配列番号 3 ~ 1 2 : 合成

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターム(参考)
A 6 1 P 31/04	1 7 1	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
31/12	1 7 1	37/04	4 H 0 4 5
35/00		C 0 7 K 14/54	
37/04		16/24	
C 0 7 K 14/54		C 1 2 N 1/15	
16/24		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	C
1/21		C 1 2 Q 1/68	A
5/10		G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 P 21/02		33/566	
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566		5/00	A
// C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA26 CA04 DA02 EA04
GA11 HA12
4B063 QA18 QA19 QQ42 QR55 QS34
QX07
4B064 AG03 AG27 CA10 CA19 CC24
DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA43
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08
BA21 CA53 DA12 MA17 MA23
MA31 MA35 MA37 MA41 MA43
MA52 MA60 MA66 ZB332
ZB352
4C085 AA03 AA38 BA07 BA17 BA20
BA51 BA60 BA71 BA75 BA78
BA82 BA87 CC07 CC08 DD86
EE06 FF13 FF18
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA02 DA76 EA22 FA74

专利名称(译)	犬白细胞介素21		
公开(公告)号	JP2003265185A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	JP2002074776	申请日	2002-03-18
申请(专利权)人(译)	Nihonzen'yakukogyo有限公司		
[标]发明人	三宅正志		
发明人	三宅 正志		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K39/39 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/54 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/566		
FI分类号	A61K39/02 A61K39/12 A61K39/39 A61P31/04.171 A61P31/12.171 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/54 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 A61K38/20 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA26 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR55 4B063/QS34 4B063/QX07 4B064/AG03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/CA53 4C084/DA12 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BA07 4C085/BA17 4C085/BA20 4C085/BA51 4C085/BA60 4C085/BA71 4C085/BA75 4C085/BA78 4C085/BA82 4C085/BA87 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/DD86 4C085/EE06 4C085/FF13 4C085/FF18 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题: 提供犬白介素21和编码所述犬白介素21的基因。 解决方案: 以下(a)或(b)的重组蛋白。(a)由狗衍生的特定氨基酸序列组成的蛋白质(b)从狗衍生的特定氨基酸序列,其包含其中一个或几个氨基酸已被缺失,取代或添加的氨基酸序列,并且具有狗白介素21活性 是一种蛋白质,具有