

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4469935号
(P4469935)

(45) 発行日 平成22年6月2日(2010.6.2)

(24) 登録日 平成22年3月12日(2010.3.12)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C O 7 K	14/71	(2006.01)	C O 7 K	14/71	
C O 7 K	19/00	(2006.01)	C O 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 18 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-538000 (P2000-538000)
 (86) (22) 出願日 平成11年3月19日 (1999.3.19)
 (65) 公表番号 特表2002-507421 (P2002-507421A)
 (43) 公表日 平成14年3月12日 (2002.3.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/006098
 (87) 国際公開番号 W01999/049039
 (87) 国際公開日 平成11年9月30日 (1999.9.30)
 審査請求日 平成18年3月17日 (2006.3.17)
 (31) 優先権主張番号 60/079, 124
 (32) 優先日 平成10年3月23日 (1998.3.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/081, 569
 (32) 優先日 平成10年4月13日 (1998.4.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 デ ソウベージ, フレデリック ジェイ
 .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
 04, フォスター シティ, シューテ
 イング スター アイル 187

微生物の受託番号 ATCC 209751

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GFR α 3およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号17のアミノ酸27～369のアミノ酸配列又は前記アミノ酸配列において1～5アミノ酸が置換、欠失又は挿入されたアミノ酸配列を有するGFR α 3（グリア細胞株由来神経栄養因子ファミリーレセプター α -3）ポリペプチドをコードする単離された核酸又はその相補体であって、前記ポリペプチドはリガンド誘導ダイマー化の際のRseチロシンキナーゼレセプターによるリン酸化を活性化するのに有効である、核酸。

【請求項2】

配列番号17のアミノ酸1～369のアミノ酸配列又は前記アミノ酸配列において1～5アミノ酸が置換、欠失又は挿入されたアミノ酸配列を有するGFR α 3ポリペプチドをコードする、請求項1に記載の単離された核酸又はその相補体であって、前記ポリペプチドはリガンド誘導ダイマー化の際のRseチロシンキナーゼレセプターによるリン酸化を活性化するのに有効である、核酸。

【請求項3】

配列番号17のアミノ酸残基27～369を有するGFR α 3ポリペプチドをコードする、請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項4】

配列番号17のアミノ酸残基1～369を有するGFR α 3ポリペプチドをコードする、請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項5】

A T C C 受託番号 2 0 9 7 5 1 (名称 DNA 4 8 6 1 4 - 1 2 6 8) 中の c D N A の配列を有する、単離された核酸又はその相補体。

【請求項 6】

配列番号 1 7 のアミノ酸 8 4 ~ 3 2 9 の アミノ酸配列又は前記アミノ酸配列において 1 ~ 5 アミノ酸が置換、欠失又は挿入されたアミノ酸配列を有する G F R α 3 ポリペプチドをコードする、単離された核酸又はその相補体であって、前記ポリペプチドはリガンド誘導ダイマー化の際の R s e チロシンキナーゼレセプターによるリン酸化を活性化するのに有効である、核酸。

【請求項 7】

配列番号 1 6 の核酸 3 9 1 ~ 1 1 2 8 の配列を有する、単離された核酸又はその相補体 10

【請求項 8】

請求項 1、5、6 及び 7 の何れか一項に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 9】

前記ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識される制御配列に作動可能に連結された、請求項 8 に記載のベクター。

【請求項 10】

請求項 8 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

前記細胞が、C H O 細胞、E . c o l i、または酵母である、請求項 1 0 に記載の宿主細胞。 20

【請求項 12】

G F R α 3 の発現に適切な条件下で請求項 1 0 に記載の宿主細胞を培養する工程、および該細胞培養物から G F R α 3 を回収する工程、を包含する、G F R α 3 ポリペプチドを産生するための方法。

【請求項 13】

配列番号 1 7 のアミノ酸残基 8 4 ~ 3 2 9 の アミノ酸配列又は前記アミノ酸配列において 1 ~ 5 アミノ酸が置換、欠失又は挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、リガンド誘導ダイマー化の際の R s e チロシンキナーゼレセプターによるリン酸化を活性化するのに有効である ポリペプチド。 30

【請求項 14】

単離されたネイティブ配列 G F R α 3 ポリペプチドである、請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号 1 7 のアミノ酸残基 2 7 ~ 3 6 9 を含む、請求項 1 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

異種アミノ酸配列に融合された請求項 1 3 に記載の G F R α 3 ポリペプチドを含む、キメラ分子。

【請求項 17】

前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である、請求項 1 6 に記載のキメラ分子。 40

【請求項 18】

前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンの F c 領域である、請求項 1 6 に記載のキメラ分子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、一般に、新規な DNA の同定および単離、ならびに α-サブユニットレセプターである G F R α 3 配列の存在によって特徴付けられる新規なポリペプチドの組換え産生に関する。本発明はさらに、α-サブユニットレセプターのリガンド誘導活性化を測定するためのアッセイに関し、このアッセイは、キナーゼレセプター活性化、酵素結合イムノ 50

ソルベント検定法 (K I R A E L I S A) を使用する α レセプターのキナーゼドメイン-レセプタータンパク質チロシンキナーゼ (r P T K) 融合物の自己リン酸化の検出、または α -サブユニットホモ二量体化を検出する他の手段による。

【0002】

(序論)

(背景)

神経栄養因子 (例えば、インスリン様増殖因子、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4/5、およびニューロトロフィン-6、毛様体神経栄養因子、G D N F、ならびにニューツリン (n e u r t u r i n) は、特定のニューロン細胞の生存を増強するための潜在的な手段として、例えば、神経変性疾患 (例えば、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、発作、てんかん、ハンティングトン病、パーキンソン病、および末梢神経障害) のための処置として、提唱されている。この目的のためのさらなる治療を提供することが望ましい。タンパク質神経栄養因子、すなわちニューロトロフィンは、脊椎動物の神経系の成長および発達に影響を及ぼし、脳および末梢における異なる群のニューロンの分化、生存、および機能を促進することにおいて重要な役割を果たすと考えられる。神経栄養因子は、一部には、神経成長因子 (N G F) に関して確立された前例に基づいて、神経組織において重要なシグナル伝達機能を有すると考えられている。N G F は、インビトロおよびインビボの両方において、交感ニューロン、感覚ニューロン、および前脳脳幹ニューロン (b a s a l f o r e b r a i n n e u r o n) の生存を支持する。外因性N G F の投与は、発達間の細胞死からニューロンを救う。逆に、抗N G F 抗体の投与による内因性N G F の除去または隔離によって、そのような細胞死は促進される (H e u m a n n, J. E x p. B i o l., 132:133~150 (1987); H e f t i, J. N e u r o s c i., 6:2155~2162 (1986); T h o e n e n ら, A n n u. R e v. P h y s i o l., 60:284~335 (1980))。

【0003】

N G F に関連するさらなる神経栄養因子がその後に同定されている。これらには、以下が挙げられる: 脳由来神経栄養因子 (B D G F) (L e i b r o c k ら, N a t u r e, 341:149~152 (1989)、ニューロトロフィン-3 (N T - 3) (K a i s h o ら, F E B S L e t t., 266:187 (1990); M a i s o n p i e r r e ら, S c i e n c e, 247:1466 (1990); R o s e n t h a l ら, N e u r o n, 4:767 (1990))、およびニューロトロフィン4/5 (N T - 4 / 5) (B e r k m e i e r ら, N e u r o n, 7:857~866 (1991))。

【0004】

他のポリペプチド増殖因子と同様に、ニューロトロフィンは、細胞表面レセプターとの相互作用を介してそれらの標的細胞に影響を及ぼす。現在のところの理解に従って、2種の膜貫通糖タンパク質が、公知のニューロトロフィンについてのレセプターとして作用する。平衡結合研究によって、ニューロトロフィン応答性ニューロン細胞は、共通の低分子量 (65,000~80,000ダルトン)、代表的にはp75^{LNGFR}またはp75と呼ばれる低親和性レセプター、および高分子量 (130,000~150,000ダルトン) レセプターを有することが示されている。高親和性レセプターは、レセプターチロシンキナーゼのt r k ファミリーのメンバーである。

【0005】

レセプターチロシンキナーゼは、細胞の増殖、分化、および生存を促進する種々のタンパク質因子のレセプターとして作用することが知られている。t r k レセプターに加えて、他のレセプターチロシンキナーゼの例には、上皮増殖因子 (E G F) のレセプター、線維芽細胞増殖因子 (F G F) のレセプター、および血小板由来増殖因子 (P D G F) のレセプターが挙げられる。代表的には、これらのレセプターは細胞膜を貫通し、レセプターの1つの部分は、細胞内に存在し細胞質と接触し、そしてレセプターの別の部分は細胞外に存在する。レセプターの細胞外部分へのリガンドの結合は、レセプターの細胞内部分にお

いてチロシンキナーゼ活性を誘導し、種々の細胞内タンパク質のリン酸化が細胞シグナル伝達経路に關与するのを確実にする。

【0006】

グリア細胞株由来神経栄養因子（「GDNF」）およびニューツリン（「NTN」）は、近年に同定された2つの構造的に関連のある、交感感覚ニューロンおよび中枢神経系ニューロンについての強力な生存因子である（Linら、Science 260:1130～1132（1993）；Hendersonら、Science 266:1062～1064（1994）；Buj-Belloら、Neuron 15:821～828（1995）；Kotzbauerら、Nature 384:467～470（1996））。近年、GDNFは、リガンド結合グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）結合タンパク質（GDNFR α と命名され；GFR- α -1としても命名される）および膜貫通レセプターチロシンキナーゼRetから構成される複数成分のレセプター系を通じてその作用を媒介することが示された（Treanorら、Nature 382:80～83（1996）；Jingら、Cell 85:1113～1124（1996）；Truppら、Nature 381:785～789（1996）；Durbecら、Nature 381:789～793（1996））。NTNシグナルは、GFR α 2（これはまた、Ret関連である）を通じて伝達される。

【0007】

膜結合タンパク質およびレセプターは、多細胞生物における形成、分化、および維持において重要な役割を果たし得る。多くの個々の細胞の運命（例えば、増殖、移動、分化、または他の細胞との相互作用）は、代表的には他の細胞から受けた情報および／または直接的な環境によって支配される。この情報は、頻繁に、分泌型ポリペプチド（例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞傷害性因子、分化因子、神経ペプチド、およびホルモン）によって伝達され、次いでこれらのポリペプチドは、多様な細胞レセプターまたは膜結合タンパク質によって受容され、そして妨げられる。そのような膜結合タンパク質および細胞レセプターには、以下が挙げられるがそれらに限定されない：サイトカインレセプター、レセプターキナーゼ、レセプターホスファターゼ、細胞-細胞相互作用に關与するレセプター、ならびにセレクトインおよびインテグリンのような細胞付着分子。例えば、細胞増殖および分化を調節するシグナル伝達は、一部には、種々の細胞タンパク質のリン酸化によって調節される。そのプロセスを触媒する酵素であるタンパク質チロシンキナーゼもまた、増殖因子レセプターとして作用し得る。例として、線維芽細胞増殖因子レセプターおよび神経成長因子レセプターが挙げられる。

【0008】

膜結合タンパク質およびレセプター分子は、製剤および診断剤を含む種々の産業上の適用を有する。例えば、レセプター免疫付着因子は、レセプター-リガンド相互作用をブロックするための治療剤として使用され得る。この膜結合タンパク質はまた、關連するレセプター-リガンド相互作用の潜在的なペプチドインヒビターまたは低分子インヒビターのスクリーニングのために使用され得る。

【0009】

これらのレセプターチロシンキナーゼのいずれか1つの異常な発現または制御されていない調節は、異なる悪性疾患および病理学的障害を生じ得る。従って、レセプターチロシンキナーゼ経路関連障害および細胞プロセスの診断および治療のための新規かつさらなる手段を提供するために、レセプターチロシンキナーゼ（「RTK」）、それらのリガンド、またはそれらが結合する α -サブユニットレセプター分子（例えば、GPI結合 α -サブユニットレセプター）を調節、制御、および操作する手段を同定する必要性が存在する。本願は、臨床医および研究者に、特定のレセプター遺伝子およびそれらの遺伝子産物との相互作用に特異的である新しい分子を提供することによってそのような手段を提供する。本明細書中において提供されるこれらの化合物およびその使用法は、非常に優れた治療的制御および特異性を可能にする。従って、本発明の目的の1つは、特定の神経栄養性シグナル伝達経路が役割を果たす神経学的状態および他の状態の予防および／または処置の

ための改良された治療を提供することである。

【0010】

(要旨)

本出願人らは、本出願において「GFR α 3」として命名される新規なヒトポリペプチドまたはそのホモログをコードするcDNAのファミリーを同定した。このGFR α 3は、 α -サブユニットレセプター、リガンド結合に応答して β サブユニットレセプターと複合体化するレセプターである。 α -サブユニットはリガンド結合成分を提供し、そして β サブユニットはチロシンキナーゼ活性のような触媒性シグナル伝達活性を提供する。GFR α 3レセプターファミリーメンバーは、Retと称される β サブユニットレセプターと複合体化する。このヘテロ複合体は、シグナル伝達を生じる。本発明は、一部には、 α -サブユニットがリガンド結合の際に二量体化し得、そしてさらにこの二量体化は、 α -サブユニットレセプターのリガンド結合ドメインに融合したキナーゼ触媒ドメインのキナーゼ活性を活性化し得るという知見に基づく。

【0011】

1つの実施態様において、本発明は、(a) 配列番号15のアミノ酸27～400、配列番号17のアミノ酸27～369、もしくは配列番号5のアミノ酸27～374の配列を含むGFR α 3ポリペプチドをコードする核酸配列、または(b) (a)の核酸分子の相補体、に対して少なくとも約65%の配列同一性を有する単離された核酸分子を提供する。別の実施態様において、上記の核酸配列は、配列番号15のアミノ酸84～360のGFR α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメイン、配列番号17のアミノ酸84～329のGFR α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメイン、もしくは配列番号20のアミノ酸110～386の配列のGFR α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメイン、またはそれらの相補的核酸を含む。この単離された核酸は、好ましくは、本発明のGFR α 3ポリペプチドをコードする核酸配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするGFR α 3コード配列を含む。この配列同一性は、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%である。1つの局面において、このコードされるポリペプチドは、少なくとも約75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を、配列番号15のアミノ酸残基27～400、配列番号17のアミノ酸27～369、配列番号5のアミノ酸27～374、または配列番号15のアミノ酸84～360のGFR α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメイン、配列番号17のアミノ酸84～329のGFR α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメイン、もしくは配列番号20のアミノ酸110～386の配列のGFR α 3ポリペプチドの配列に対して有する。好ましくは、この同一性は、配列番号15のアミノ酸残基27～400およびそれをコードするDNAに対しての同一性である。さらなる実施態様において、この単離された核酸分子は、配列番号15のアミノ酸残基27～400を有するGFR α 3ポリペプチドをコードするDNAを含むか、またはそのようなコード核酸配列に相補的であり、そして少なくとも適度な(moderate)ストリンジェンシー条件下、そして必要に応じて高いストリンジェンシー条件下でその核酸に安定に結合したままである。別の局面において、本発明は、クローンDNA48613、DNA48614、またはマウスGFR α 3(クローン13)の全長タンパク質の核酸を提供する。これらは、ATCCに、それぞれ受託番号ATCC209752(名称: DNA48613-1268)、ATCC209751(名称: DNA48614-1268)、およびATCC _____として1998年4月7日に寄託されている。

【0012】

なお別の実施態様において、本発明は、GFR α 3ポリペプチドをコードするDNAを含むベクターを提供する。そのようなベクターを含む宿主細胞もまた提供される。例として、この宿主細胞は、CHO細胞、E. coli、または酵母細胞であり得る。さらに、GFR α 3ポリペプチドを産生するためのプロセスが提供され、そしてこのプロセスは、GFR α 3の発現に適切な条件下で宿主細胞を培養する工程、およびこの細胞培養物からG

10

20

30

40

50

FR α 3を回収する工程を包含する。

【0013】

なお別の実施態様において、本発明は、単離されたGF α 3ポリペプチドを提供する。詳細には、本発明は、単離されたネイティブ配列GF α 3ポリペプチドを提供し、1つの実施態様においてこのポリペプチドは、配列番号15の残基27～400を含むアミノ酸配列を含む。特に、配列番号15中のネイティブシグナル配列（アミノ酸1～26）を含むかまたは含まず、そして開始メチオニンを含むかまたは含まない、ネイティブGF α 3ポリペプチドが含まれる。なお別の実施態様において、配列番号15のアミノ酸残基27～400、配列番号17のアミノ酸27～369、配列番号5のアミノ酸27～374、または配列番号15のアミノ酸84～360のGF α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメイン、配列番号17のアミノ酸84～329のGF α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメイン、もしくは配列番号20のアミノ酸110～386の配列のGF α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメインを含むポリペプチドが提供される。あるいは、本発明は、上記の受託番号の下に寄託された核酸によってコードされるGF α 3ポリペプチドを提供する。このポリペプチドは、必要に応じて、GPIアンカーと関連する疎水性配列を欠いている。

10

【0014】

なお別の実施態様において、本発明は、異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合されたGF α 3ポリペプチドを含むキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例には、エピトープタグ配列または免疫グロブリンのFc領域に融合した、GF α 3ポリペプチドが挙げられる。このキメラ分子は、 α -サブユニットレセプターのリガンド結合ドメイン、チロシンキナーゼレセプターの細胞内触媒ドメイン、およびフラッグエピトープを含み得る。

20

【0015】

なお別の実施態様において、本発明は、GF α 3ポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。必要に応じて、この抗体はモノクローナル抗体である。

【0016】

本明細書中の、 α -サブユニットレセプターがリガンド結合の際に二量体化し得、さらにそのような二量体化が、 α -サブユニットレセプターに融合したキナーゼドメインを活性化し得るという驚くべき知見を考慮して、リガンド誘導 α サブユニットレセプター活性化（すなわち、ホモ二量体化またはホモオリゴマー化）を測定するための方法が本明細書中で提供される。1つの実施態様において、好ましくは α -サブユニットレセプターのリガンド結合ドメインおよびレセプタータンパク質チロシンキナーゼの細胞内触媒ドメインを含むポリペプチド融合物のレセプタータンパク質チロシンキナーゼ（rPTK）自己リン酸化を測定することによって、アゴニストまたはリガンドによって誘導される α サブユニットレセプター活性化（すなわち、ホモ二量体化またはホモオリゴマー化）を測定する、感度の良い信頼性のあるアッセイが提供される。この構築物はさらに、必要に応じて活性化（例えば、二量体化、リン酸化）された α -サブユニットレセプターの捕捉および検出を促進するフラッグエピトープを含み得る。このアッセイは、 α -サブユニットレセプター活性化を定性的または定量的に測定するため、ならびに選択された α -サブユニットレセプターについての潜在的なアゴニストおよびアンタゴニストの同定および特徴付けを促進するために望ましく有用である。本発明のさらなる目的は、リガンド-レセプター相互作用が、任意の選択された α -サブユニットレセプター、好ましくはGF α サブユニットレセプターについて研究されるのを可能にするアッセイを提供することである。

30

40

【0017】

このアッセイは、高処理能力、すなわち比較的短い時間（例えば、1日）に多数のサンプルを確実に評価する能力を有なさなくてはならない。このアッセイは、理想的には、放射活性物質を使用せず、そしてまた自動化を受け易い。

【0018】

本発明の少なくとも1つの実施態様において、所望の特徴を有するレセプター特異的捕捉

50

薬剤が利用可能であるか否かにかかわらず、目的の α -サブユニットレセプターが研究されるのを可能にする一般的アッセイが提供される。さらに、本発明の目的は、インサイチュで α -サブユニットレセプターのリガンド結合活性を実質的に示すアッセイを提供することである。このことは、このレセプターとこのリガンドとの間の相互作用の変化が、このレセプターが膜に結合していない結果として生じ得るという可能性を低減する限り、望ましい。このアッセイの1つの実施態様において、セリントレオニンキナーゼリン酸化、細胞内キナーゼのリン酸化、および α -サブユニットレセプターに融合した触媒ドメインのホスファターゼ活性を検出することによる、リガンド結合を測定するための方法が提供される。従って、本発明は、ホモ二量体化またはホモオリゴマー化を検出し、次いで目的の α -サブユニットレセプターのリガンド結合ドメインに融合している触媒ドメインのキナーゼまたはホスファターゼ活性（すなわち、自己リン酸化による）を測定することによる、 α -サブユニットレセプター構築物キメラの活性化またはリガンド結合を測定するためのアッセイを提供する。

10

【0019】

このアッセイは、2つの主要な段階に分けられ得、一般にその各々は、別々のアッセイプレートにおいて行われる。このアッセイの第1段階は、好ましくはアッセイのK I R A段階において α -サブユニット構築物を活性化する工程を包含する。アッセイの第2段階は、レセプター構築物の活性化を測定する工程を包含する。簡便には、これは、酵素結合イムノソルベント検定法（E L I S A）を使用して、レセプター構築物活性化を測定して達成する。

20

【0020】

このアッセイのK I R A段階は、 α -サブユニットレセプターの細胞外ドメインが細胞の外部環境に面し、膜貫通ドメインが細胞膜に位置し、そして触媒性キナーゼドメインが細胞内に位置するように、真核生物細胞の細胞膜に位置する α -サブユニットレセプターキナーゼレセプター融合構築物を活性化する工程を包含する。アッセイ全体のこの段階は、以下の（a）～（c）の工程を包含する：

（a）細胞（通常には、哺乳動物細胞株）が、第1の固相（例えば、第1のアッセイプレートのウェル）に付着するように、この細胞の実質的に均一の集団でこの固相をコートする。頻繁に、この細胞は付着性であり、それによってこの第1の固相に自然に付着する。本発明の1つの実施態様において、この細胞は、触媒性キナーゼドメインに融合された α -サブユニットレセプターリガンド結合ドメインを含むポリペプチドレセプター構築物をコードするDNA、または以下にさらに規定される「レセプター構築物」をコードするDNAで形質転換されており、このDNAは、このレセプターまたはレセプター構築物がその細胞膜に適切に位置するように、この細胞によって発現される。

30

【0021】

このレセプター構築物はさらに、好ましくはフラッグポリペプチドとの融合を含む。このフラッグポリペプチドは、このアッセイのE L I S A部分において、捕捉薬剤（頻繁には、捕捉抗体）によって認識される。本明細書中において開示されるレセプター構築物の使用は、特に有利である。なぜなら、この使用は、必要とされる特徴を有するレセプター特異的捕捉薬剤が利用可能であるか否かにかかわらず、任意のキナーゼレセプタードメインの自己リン酸化が測定され得る「一般的」アッセイを提供するからである。頻繁には、このレセプター構築物は、選択された α -サブユニットレセプターのE C D、別の十分に特徴付けられたチロシンキナーゼ（例えば、R s eレセプター）の触媒性I C D（および可能性としては、膜貫通ドメイン）を含む融合タンパク質である。

40

【0022】

（b）次いで、このレセプター構築物がこの分析物に曝露（または接触）されるように、この付着している細胞を有するウェルに分析物を添加する。このアッセイは、目的の α -サブユニットアッセイについてのアゴニストリガンドおよびアンタゴニストリガンドの同定を可能にする。アゴニストリガンドによるこのレセプターの結合および／または活性化をブロックするアンタゴニストリガンドの存在を検出するために、この付着している細胞

50

を、最初にアンタゴニストリガンドである疑いのあるもの、次いでアゴニストリガンド（または、アゴニストおよびアンタゴニストの混合物）に曝露し、レセプター結合および活性化の競合的阻害を測定し得る。また、このアッセイは、アゴニストリガンドに結合しそれによってキナーゼドメインに結合してそれを活性化する能力を低減または排除する、アンタゴニストを同定し得る。そのようなアンタゴニストを検出するために、レセプターについてのアンタゴニストと疑われるものおよびアゴニストとともにインキュベートし、次いで付着している細胞を、このリガンド混合物に曝露する。

【0023】

（c）この分析物への曝露後に、この付着している細胞を、溶解緩衝液（これは、その中に溶解化界面活性剤を有する）および緩やかな攪拌を使用して溶解し、それによって細胞溶解物を遊離させ、この細胞溶解物を、この細胞溶解物の濃縮または浄化の必要なく、このアッセイのELISA部分に直接的に供し得る。従って、このアッセイは、驚くべきことにELISAの前にこの細胞溶解物を濃縮することを必要としない限り、KnutsenおよびBuck（前出）、Kleinら（前出）、およびHaginoら（前出）によって記載されるアッセイに対して顕著な改変を提供する。さらに、本アッセイにおいて、他のアッセイとは異なり、細胞は、細胞のホモジナイズ、遠心分離、または浄化の必要なく、緩やかな攪拌を用いて溶解緩衝液中に溶解され得る。次いで、このように調製された細胞溶解物は、アッセイのELISA段階に供される準備をされる。驚くべきことに、この第1のアッセイプレートは、このアッセイのELISA段階の前に有意な時間（少なくとも6ヶ月）、凍結温度（すなわち、約-20℃〜-70℃）にて保存され得ることが発見された。これは、このアッセイのKIRAおよびELISA段階が別々の日に実施され得る限り、有意な知見である。

【0024】

このアッセイのELISA構成は、以下に記載される工程（d）〜（h）を含む。

【0025】

（d）第1の工程として、この第2の固相（通常には、ELISAマイクロタイタープレートのウェル）を、このレセプター構築物、好ましくは必要に応じて存在するフラッグポリペプチドに特異的に結合する捕捉薬剤（頻繁には、捕捉抗体）でコートする。この第2の固相のコーティングを、この捕捉薬剤がこの第2の固相に付着するように行う。この捕捉薬剤は、一般にモノクローナル抗体であるが、本明細書中の実施例において記載されるように、ポリクローナル抗体もまた使用され得る。

【0026】

（e）このアッセイの上述のKIRA段階の工程（c）において得られる細胞溶解物を、このレセプター構築物がこの第2の固相に付着する（または、捕捉される）ように、この付着している捕捉薬剤に曝露するか、または接触させる。本発明のアッセイは、Kleinらのアッセイとは異なり、このレセプターまたはレセプター構築物のこの第2の固相への適切な固定を達成するために、レセプターに対するリガンドならびにキナーゼインヒターが存在していることを必要としない。

【0027】

（f）次いで、結合していない細胞溶解物を除去し、この捕捉されたレセプターまたはレセプター構築物を残すように、洗浄工程を行う。

【0028】

（g）次いで、付着しているかまたは捕捉されたレセプター構築物を、チロシンキナーゼレセプタードメイン中のリン酸化チロシン残基を同定する抗ホスホチロシン抗体に曝露またはそれと接触させる。好ましい実施態様において、この抗ホスホチロシン抗体は、非放射活性発色試薬の発色変化を触媒する酵素に（直接的または間接的に）結合している。従って、このレセプターのリン酸化は、この試薬のその後の発色変化によって測定され得る。この酵素は、抗ホスホチロシン抗体に直接的に結合され得るか、または結合している分子（例えば、ビオチン）が、抗ホスホチロシン抗体に結合され得、続いて、この酵素は、この結合している分子を通じてこの抗ホスホチロシン抗体に結合され得る。

【0029】

(h) 最終的に、この捕捉されたレセプター構築物へのこの抗ホスホチロシン抗体への結合は、例えば発色試薬における発色変化によって測定され得る。

【0030】

本発明はまた、K I R A E L I S A アッセイにおける使用のために特に有用である R s e フラッグ試薬に関する。この R s e フラッグ試薬は、R s e r P T K の細胞内ドメインのカルボキシル末端へのフラッグポリペプチド（通常は、本明細書中に記載される g D フラッグ）の融合を含むポリペプチドである。一般には、R s e の膜貫通ドメインおよび目的の別の r P T K の細胞外ドメインもまた、この融合ポリペプチド試薬中に存在する。この試薬をコードする核酸およびそれで形質転換された細胞もまた本願発明である。

10

【0031】

なおさらなる局面において、本発明は、上記に開示される K I R A E L I S A において使用され得るキットに関し、このキットは、抗フラッグポリペプチド捕捉薬剤（例えば、捕捉抗体）（これは、通常、本明細書中に記載されるような第2の固相に結合している）、およびレセプター構築物を含む。従って、このキットは、一般に、抗フラッグポリペプチド捕捉抗体がそのウェルに付着している E L I S A マイクロタイタープレートを提供する。必要に応じて、このキットが、頻繁には標識されている抗ホスホチロシン抗体も提供するか、または抗ホスホチロシン抗体を標識するための試薬が、このキットに供給される。時に、本明細書中に記載されるレセプター構築物で形質転換された細胞の均一の集団もまた、このキットとともに提供される。このキットはまた、K I R A E L I S A を実施するための指示書を含み得る。

20

【0032】

（好ましい実施態様の詳細な説明）

（I. 定義）

本明細書中で使用される用語「G F R α 3」、「G F R α 3 ポリペプチド」および「G F R α 3 ホモログ」は、ネイティブ配列 G F R α 3 および G F R α 3 改変体（これは、さらに本明細書中以下で定義される）を含む。この G F R α 3 は、種々の供給源から（例えば、ヒト組織型から、または別の供給源から）単離され得るか、または組換え方法もしくはは合成方法によって調製され得る。「ネイティブ配列 G F R α 3」は、天然由来の G F R α 3 と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。そのようなネイティブ配列 G F R α 3 は、天然から単離され得るか、または組換え手段もしくはは合成手段によって生成され得る。用語「ネイティブ配列 G F R α 3」は、特に、G F R α 3 の天然に存在する短縮形態または分泌形態（例えば、細胞外ドメイン配列）、G F R α 3 の天然に存在する改変体形態（例えば、選択的スプライシング形態）および G F R α 3 の天然に存在する対立遺伝子変異体を含む。本発明の1つの実施態様において、このネイティブ配列 G F R α 3 は、N末端シグナル配列を含むかまたは含まず、そして1位の開始メチオニンを含むかまたは含まない、配列番号15のアミノ酸1～400を含む、成熟または全長のネイティブ配列 G F R α 3 である。

30

【0033】

「G F R α 3 改変体」は、（a）そのネイティブシグナル配列を含むかもしくは含まない、G F R α 3 ポリペプチドをコードする DNA 分子、または（b）（a）の DNA 分子の相補体、に対して少なくとも約75%のアミノ酸配列同一性を有する、以下に定義されるような活性な G F R α 3 を意味する。特定の実施態様において、この G F R α 3 改変体は、全長ネイティブ配列 G F R α 3 についての配列番号15に示される推定アミノ酸配列を有する G F R α 3 と少なくとも約80%アミノ酸配列同一性を有する。このような G F R α 3 改変体は、例えば、配列番号15の配列のN末端またはC末端に1つ以上のアミノ酸残基が付加または欠失している G F R α 3 ポリペプチドを含む。好ましくは、この核酸配列同一性またはアミノ酸配列同一性は、少なくとも約75%であり、より好ましくは少なくとも約80%であり、そしてさらにより好ましくは少なくとも約90%であり、そしてなおさらにより好ましくは少なくとも約95%である。

40

50

【0034】

本明細書中において同定されるGFRα3配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、最大の配列同一性パーセントを達成するために、配列を整列させ、そして必要な場合にはギャップを導入した後に、GFRα3配列におけるアミノ酸残基と同一である(任意の保存的置換は配列同一性の部分として考えない)候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当業者の範囲内の種々の方法において、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公けに利用可能なコンピュータソフトウェアを用いて達成され得る。当業者は、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定し得る。

10

【0035】

本明細書中において同定されるGFRα3配列に関する「核酸配列同一性パーセント(%)」は、最大の配列同一性パーセントを達成するために、配列を整列させ、そして必要な場合にはギャップを導入した後に、GFRα3配列におけるヌクレオチドと同一である候補配列におけるヌクレオチドのパーセンテージとして定義される。核酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当業者の範囲内の種々の方法において、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公けに利用可能なコンピュータソフトウェアを用いて達成され得る。当業者は、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定し得る。

20

【0036】

本明細書中において開示される種々のポリペプチドを記載するために使用される「単離された」は、その天然の環境の成分から同定され、そして分離および／または回収されたポリペプチドを意味する。その天然の環境の夾雑成分は、ポリペプチドについての診断的使用または治療的使用を代表的に阻害する物質であり、そして酵素、ホルモン、および他のタンパク質様溶質または非タンパク質様溶質を含み得る。好ましい実施態様において、このポリペプチドは、(1)回転カップ配列決定機(spinning cup sequenator)の使用によってN末端アミノ酸配列または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るために十分な程度まで、または(2)クマシーブルー、または好ましくは銀染色を使用して、非還元条件下または還元条件下で、SDS-PAGEによって均質になるまで精製される。単離されたポリペプチドは、組換え細胞内にインサイチュでポリペプチドを含む。なぜなら、GFRα3天然環境のうちの少なくとも1つの成分は存在しないからである。しかし、通常、単離されたポリペプチドは、少なくとも1つの精製工程によって調製される。

30

【0037】

「単離された」DNA48613核酸分子は、DNA48613核酸の天然の供給源中で通常結合されている少なくとも1つの夾雑核酸分子から同定および単離された核酸分子である。単離されたDNA48613核酸分子は、天然において見出される形態または様式以外である。従って、単離されたd48613核酸分子は、天然細胞中に存在する場合に、DNA48613核酸分子と区別される。しかし、単離されたDNA48613核酸分子は、例えば、その核酸分子が天然の細胞の染色体位置とは異なる染色体位置にある場合に通常にDNA48613を発現する細胞に含まれるDNA48613核酸分子を含む。

40

【0038】

用語「制御配列」は、特定の宿主生物における作動可能に連結したコード配列の発現に必要なDNA配列をいう。原核生物に適切である制御配列は、例えば、プロモーター、必要に応じてオペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核生物細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが知られている。

50

【0039】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれている場合、「作動可能に連結」されている。例えば、プレ配列または分泌リーダーについてのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、そのポリペプチドのDNAに作動可能に連結されており；プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列の転写に影響を及ぼす場合にそのコード配列に作動可能に連結されており；またはリボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように配置されている場合にコード配列に作動可能に連結されている。一般に、「作動可能に連結されている」は、連結されているDNA配列が連続的であり、そして分泌リーダーの場合に連続的かつ読み取り相中にある。しかし、エンハンサーは、連続的である必要はない。連結は、便利な制限部位での連結によって達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の実施に従って使用される。

10

【0040】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして一般にプローブ長、洗浄温度、および塩濃度に依存する実験計算値である。一般に、プローブが長いほど適切なアニーリングのためにより高い温度が必要であるが、プローブが短いほどより低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般に、相補鎖がそれらの融解温度より下の環境に存在する場合、変性されたDNAが再アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望の相同性の程度が高いほど、使用され得る相対温度はより高い。結果として、より高い相対温度は反応条件をよりストリンジェントにする傾向にあるが、より低い温度はより低いストリンジェントにするといえることができる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細および説明について、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995)を参照のこと。

20

【0041】

本明細書中で定義される「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」は、以下によって同定され得る：（１）洗浄のために、低イオン強度および高温を使用する条件（例えば、50℃での0.015M塩化ナトリウム／0.0015Mクエン酸ナトリウム／0.1%ドデシル硫酸ナトリウム）；（２）ハイブリダイゼーション間に、ホルムアミドのような変性剤を使用する条件（例えば、42℃にて50%（v/v）ホルムアミドおよび0.1%ウシ血清アルブミン／0.1% Ficoll／0.1%ポリビニルピロリドン／pH6.5の50mMリン酸ナトリウム緩衝液、750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム）；または（３）42℃で、50%ホルムアミド、5×SSC（0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH6.8）、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハート溶液、超音波処理したサケ精子DNA（50μg/ml）、0.1%SDS、および10%硫酸デキストランを使用し、0.2×SSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）および0.1%SDS中42℃で洗浄する条件；または（４）55℃にて10%硫酸デキストラン、2×SSC、および50%ホルムアミドの緩衝液を使用し、続いてEDTAを含む0.1×SSCからなる高ストリンジェンシー洗浄を55℃にて行う条件。

30

40

【0042】

「適度にストリンジェントな条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989によって記載されるように同定され得、そして上記のストリンジェントより低いストリンジェントの洗浄液およびハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度、および%SDS）の使用を含む。適度にストリンジェントな条件の例は、20%ホルムアミド、5×SSC（150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハート溶液、10%硫酸デキストラン、および20mg/mLの変性剪断サケ精子D

50

NAを含む溶液中での37℃での一晚のインキュベーション、続く約37～50℃での1×SSC中でのフィルターの洗浄である。当業者は、プローブ長などのような因子を適合させるのに必要な温度、イオン強度などを調整する方法を理解する。

【0043】

「rPTK」は、レセプタータンパク質チロシンキナーゼを意味する。

【0044】

「ECD」、「TMドメイン」、および「ICD」は、それぞれ、rPTKの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインをいう。

【0045】

本出願を通して使用される場合、「キナーゼレセプター活性化」または「KIRA」は、細胞結合レセプター構築物（代表的には、rPTK ICDドメインを有する）が、このレセプター構築物のrPTK部分の細胞内ドメイン中のチロシン残基のリン酸化を誘導し得る（または誘導し得ない）可能性のあるアゴニスト／アンタゴニストリガンドに曝露される、本願のアッセイの第1の段階をいう。KIRAは、一般に、本明細書中において定義される「第1のアッセイプレート」において実施される。米国特許第5,766,863号およびその対応WO公開（題「Kinase receptor activation assay」）が、レセプター細胞外ドメインおよび置換酵素ドメイン（例えば、チロシンキナーゼドメイン）の組換え発現されたタンパク質融合物を使用するKIRAアッセイを教示するためにその全体が本明細書によって本明細書中に援用される。

【0046】

「酵素結合イムノソルベント検定法」または「ELISA」は、本願アッセイの第2段階をいい、そしてレセプター構築物のキナーゼドメインのチロシンリン酸化を測定する工程を包含する。ELISAは、通常、本出願において開示されるような「第2のアッセイプレート」中で行われる。ELISAは、第2の固相（通常には、ELISAマイクロタイタープレートのウェル）にレセプター構築物を捕捉する工程を包含する限り、「サンドウィッチELISA」である。ELISAアッセイは、一般に、酵素－抗体結合体の調製を含む。この結合された酵素は、基質を切断し、分光測定法によって検出され得る発色性反応生成物を生じる。このアッセイにおいて、個々のマイクロタイターウェル中の発色した溶液の吸光度は、ホスホチロシンの量に比例する。ELISAの概説は、Current Protocols in Molecular Biology、第2巻、第11章（1991）に見出される。用語「ELISA」は、本願のアッセイの第2段階を記載するために使用されるが、これは、本発明の好ましい実施態様であるのみである。なぜなら、本明細書中に開示されるように、酵素検出以外の技術が、活性化されたレセプターへの抗ホスホチロシン抗体の結合を測定するために利用可能であるからである。

【0047】

用語「チロシンキナーゼ」、「チロシンキナーゼレセプター」、「レセプタータンパク質チロシンキナーゼ」、および「rPTK」は、本明細書中において交換可能に使用され、そしてそのICDにおいてフェノール基を受容する少なくとも1つのリン酸を有するタンパク質をいう。このタンパク質は、通常には、リガンド結合ECD、TMドメイン、およびICDを有する限り、レセプターである。このICDは、通常、触媒キナーゼドメインを含み、そしてチロシン残基を受容する1つ以上のリン酸を有する。チロシンキナーゼレセプターの例には、以下が挙げられる：インスリンレセプター、インスリン関連レセプター、上皮増殖因子レセプター（EGF-R）、血小板由来増殖因子レセプターAおよびB（PDGF-R-AおよびPDGF-R-B）、インスリン様増殖因子1レセプター（IGF-1-R）、マクロファージコロニー刺激性因子レセプター（M-CSF-R）、HER2/neu/c-erbB-2レセプター、HER3/c-erbB-3レセプター、Xmrkレセプター、IRRレセプター、線維芽細胞増殖因子（FGF）レセプターであるbekおよびflg、ckitレセプター、Flk/kDRレセプター、Rseレセプター、Eph、Elk、Eck、Eek、Erk、Cek4/Mek4/HEK、およびCek5レセプター、Ax1レセプター、肝細胞増殖因子レセプター（HGF-R）

、Flt1 VEGFレセプター、SAL-S1レセプター、HPTK 5レセプター、trkAレセプター、trkBレセプター、およびtrkCレセプター。例えば、UlrichおよびSchlessinger、Cell 81:203~212 (1990) ; Fantlら、Annu. Rev. Biochem. 62:453~481 (1993) ; Markら、Journal of Biological Chemistry 269 (14):10720~10728 (1994) ; およびWO93/15201を参照のこと。

【0048】

上述の用語は、少なくとも、選択されたα-サブユニットレセプターの細胞外ドメインおよびキナーゼレセプター（好ましくは、rPTK）の細胞内ドメイン、そして必要に応じて同じまたは別のチロシンキナーゼの膜貫通ドメイン、そしてさらに必要に応じてフラッグエピトープを含む、キメラ「レセプター」分子、または「レセプター構築物」、または「α-サブユニットレセプター構築物」を含む。当然のことながら、目的のα-レセプターは、それが1つを有する場合、膜貫通ドメインを提供し得る。これらの用語はまた、種々のα-サブユニットレセプターのアミノ酸配列改変体および共有結合誘導体を含み、これらがなおKIRA ELISAにおいてキナーゼリン酸化活性を示すという条件の下で、これらが融合するrPTKキナーゼドメインを含む。従って、この改変体は、一般に、保存的アミノ酸改変を有する。α-サブユニットレセプターキナーゼの個々のドメインは、関連するファミリーおよび疎水性プロットにおける公知のレセプターに対する配列相同性に基いて表現され得る。例えば、疎水性膜貫通ドメインは、容易に決定され得、そしてECDおよびICDは、存在する場合、通常、膜貫通ドメインまたはGPIアンカーに対して、それぞれ、アミノ末端およびカルボキシル末端である。簡便には、Rseレセプターの膜貫通ドメインおよびICDは、代表的にはGPI-アンカー配列とともに、目的のα-サブユニットレセプターのECDに融合され、それによって本明細書中で言及されるようなレセプター構築物を示す用語に含まれるキメラレセプターを形成し得る。

【0049】

好ましい実施態様において、このα-サブユニットレセプターは、GFRA1、GFRA2、GFRA3、およびGFRA4からなる群から選択される。

【0050】

「自己リン酸化」は、このレセプター構築物のrPTK部分の触媒性キナーゼドメインの活性化（この活性化によって、少なくとも1つの固有のチロシン残基がリン酸化される）を意味する。一般に、自己リン酸化は、アゴニスト分子がα-サブユニットレセプターの細胞外ドメインに結合する場合に生じる。任意の特定の作用機構に限定されることなく、アゴニスト分子の結合は、触媒性キナーゼドメインの活性化を生じるレセプター構築物のオリゴマー化を生じる。

【0051】

「固相」は、細胞（このアッセイのKIRA段階において）または捕捉薬剤が（このアッセイのELISA段階において）付着し得る非水性マトリクスを意味する。通常には、この固相は、アッセイプレートのウェルを含むが、本発明は決してこの実施態様に限定されない。例えば、この固相は、別個の粒子の不連続な固相を含み得る。この粒子は、多孔性であり、そして多くの異なる物質（例えば、ポリサッカリド（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール、シリコーン、およびガラス）から形成され得る。適切な特定の固相の例について、米国特許第4,275,149号を参照のこと。

【0052】

「ウェル」は、水性サンプルが置かれ得るくぼみまたは保持空間を意味する。このウェルは、「アッセイプレート」中に提供される。本発明は、通常には、「第1のアッセイプレート」を使用し、このアッセイプレートは、それに対する細胞（レセプターまたはレセプター構築物を有する）の付着を至適化する物質（例えば、ポリスチレン）から形成される。一般に、第1のアッセイプレートの個々のウェルは、容量に対する表面積の高い比を有

し、従って、適切な形状は、平底ウェル（ここに、細胞は付着する）である。「第2のアッセイプレート」は、一般に、それに対する捕捉薬剤の付着を至適化する物質（例えば、ポリスチレン）から形成される。第2のアッセイプレートは、第1のアッセイプレートと同じ一般的構造および／または特徴を有し得る。しかし、このアッセイのK I R A段階およびこのアッセイのE L I S A段階について別々のプレートが使用される。

【0053】

本発明の好ましい実施態様において、第1のアッセイプレートおよび第2のアッセイプレートは両方とも「マイクロタイター」プレートである。本明細書中で使用される場合、用語「マイクロタイター」プレートは、約30～200の間の個々のウェル（通常には、96ウェル）を有するアッセイプレートをいう。頻繁には、このマイクロタイタープレートの個々のウェルは、約250 μ lの最大容量を保持する。簡便には、第1のアッセイプレートは、自動化を可能にする、96ウェルのポリスチレンまたはプラスチック性の細胞培養マイクロタイタープレート（例えば、Becton Dickinson Labware、Lincoln Park、NJにより販売される）である。頻繁には、細胞培養培地とそこに懸濁された細胞を含む水性サンプルの約50 μ l～300 μ l、より好ましくは100 μ l～200 μ lを、このアッセイのK I R A段階における第1のアッセイプレートの各ウェルに添加する。1ウェルあたり $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ の間の細胞を播種することが望ましい。より好ましくは、1ウェルあたり $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 細胞を播種する。通常には、第2のアッセイプレートは、ポリスチレンマイクロタイターE L I S Aプレート（例えば、Nunc Maxisorp, Inter Med、Denmark 20 によって販売されるプレート）を含む。

【0054】

用語「細胞の均一の集団」は、その集団における細胞の少なくとも約80%、そして好ましくは約90%が同じ細胞型である、細胞の実質的に均一の集団をいう。従って、細胞株を使用することが簡便である。細胞株は、真核生物細胞株、通常には動物細胞株、そして望ましくは哺乳動物細胞株である。

【0055】

この細胞は、選択されたレセプター構築物を有するか、またはそれを産生するように形質転換される。従って、この細胞は、このレセプター構築物をコードする核酸で形質転換され、そしてこの核酸は、レセプターのE C Dが細胞の外部環境に面し、そして膜貫通ドメインが細胞膜内に位置し、そしてキナーゼドメインが細胞内に位置するように発現される。一般的な提案として、最小数約 1×10^4 レセプター／細胞が必要とされる。

【0056】

細胞を記載するために本明細書中で使用される用語「付着性」は、第1の固相（頻繁には、第1のアッセイプレートのウェル）に自然に付着し、それによってウェルの内側表面に細胞の一定のコートニングを形成する細胞をいう。細胞の一定のコートニングは、一般には、第1のアッセイプレートのウェルにおける細胞の約8～16時間のインキュベーション後に形成する。インキュベーションの後、非付着性細胞および細胞培養培地を、第1のアッセイプレートから廃棄する。インキュベーションは、通常、細胞増殖について至適な温度（すなわち、約37℃）にて実施される。付着性細胞株の例には、CHO細胞（Ur 40 laubおよびChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)）、MCF-7細胞（ATCC HB22）、293細胞（Grahamら、J. Gen Virol. 36: 59 (1977)）、Swiss albino 3T3線維芽細胞株（ATCC受託番号CCL92）、およびU937マクロファージ細胞株（ATCC受託番号CRL 1593）が挙げられる。

【0057】

「フラッグポリペプチド」は、エピトープ（それに対して、「捕捉薬剤」が作製され得る）（好ましくは、線状エピトープ）を提供するに十分な残基を有し、なおそれが、キナーゼドメインまたはリガンド結合ドメインの活性を妨害しないほど十分に短い、短いポリペプチドを含む。このフラッグポリペプチドはまた、それに対する捕捉薬剤がこのアッセイ 50

中の他の試薬に結合しないように、十分に独特である。「独特の」フラッグポリペプチド配列の選択は、例えばGenbankまたはEMBL中の他の公知の配列に対して提案されたフラッグポリペプチドの配列を比較することによって達成され得る。適切なフラッグポリペプチドは、一般に少なくとも6アミノ酸残基を有し、そして通常には約8～80アミノ酸残基（好ましくは約9～30の間のアミノ酸残基）を有する。

【0058】

「レセプター構築物」は、 α -サブユニットレセプターリガンド結合ドメインとキナーゼレセプター触媒性ドメイン、そして必要に応じて先に定義されるフラッグポリペプチドとの融合物を含むポリペプチドを意味する。このフラッグポリペプチドは、以下のようなレセプター構築物における位置に提供される：a) このフラッグポリペプチドがこのレセプターに対するリガンド結合を妨害しない；b) このフラッグポリペプチドが、このレセプターの自己リン酸化を妨害しない；c) このフラッグポリペプチドが、このアッセイのELISA段階において捕捉薬剤に結合し得るような適切な配置で提示される。頻繁には、このポリペプチドフラッグは、このレセプター構築物のN末端に存在する。あるいは、このフラッグポリペプチドは、このレセプター構築物のC末端に存在し得る。Rse. gD構築物が好ましい。本明細書中に開示されるRse構築物は、特に有用である。なぜなら、そのICD（および必要に応じて、膜貫通ドメイン）は、目的のレセプターのECDに融合され、それによってこのフラッグポリペプチドが目的のレセプターに関して位置すべきである場所を確立する必要を排除し得るからである。

【0059】

「Rse. gD」は、Rseレセプタータンパク質チロシンキナーゼICDドメインを有するレセプター構築物であって、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D（gD）フラッグポリペプチドがそのCOOH末端に融合されているレセプター構築物をいう。

【0060】

「Rse. フラッグ試薬」は、そのCOOH末端でフラッグポリペプチド（通常、gDフラッグポリペプチド）に融合されるRseレセプターのICDを含むポリペプチドをいう。時に、目的の α -サブユニットレセプターのECDとRseのTMドメインもまた、Rse. gD試薬中に存在する。「レセプターECD/Rse. gDキメラ」は、gDフラッグポリペプチドにCOOH末端に融合されるRseのTMドメインおよびICDドメインへの、目的の α -サブユニットレセプターリガンド結合ドメインのECDの融合物をいう。

【0061】

「捕捉薬剤」は、本明細書中で規定されるように第2の固相に付着し得、そしてレセプター構築物について選択性である化合物または薬剤を意味する。従って、この捕捉薬剤は、第2のアッセイプレートのウェルにレセプター構築物を捕捉する。通常には、この捕捉薬剤は、目的のレセプターに融合されているフラッグポリペプチドに選択的に結合する。この捕捉薬剤の結合は、レセプターに結合したリガンドの存在または非存在によって影響を及ぼされず、そして捕捉の際にレセプター活性化を誘導しない。さらに、この捕捉薬剤は、抗ホスホチロシン抗体によってリン酸化チロシンへの接近を立体的にブロックしない。適切な捕捉薬剤を選択するための手段を本明細書中に記載する。一般に、捕捉薬剤は、抗体（例えば、アフィニティー精製したポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体）を含むが、「streptag」ポリペプチドに選択的に結合するストレプトアビジンのような他の選択性薬剤もまた使用され得る（Schmidtら、Protein Engineering 6（1）：109～122（1993）を参照のこと）。ストレプトアビジンは、例えば、Zymed Laboratories、S. San Francisco、CAから商業的に購入され得る。あるいは、この捕捉薬剤は、プロテインA（これは、免疫グロブリンに特異的に結合する）を含み得る。本発明のこの実施態様において、細胞溶解物中に存在する活性化されたレセプター構築物は、それに特異的に結合する抗体とともにインキュベートされ、それによってレセプター-抗体複合体を形成する。この複合体は、その複合体中に存在する抗体への特異的な結合によって、プロテインAによ

て捕捉され得る。プロテインAは、例えば、Pharmacia Biotech, Inc.、Piscataway, New Jerseyから商業的に購入され得る。

【0062】

最も好ましい実施態様において、この捕捉薬剤は、フラッグポリペプチド（これは、レセプター構築物中に存在する）に特異的に結合するモノクローナル抗体である。適切なフラッグポリペプチドおよびそれらのそれぞれの捕捉抗体の例には、flu HAフラッグおよびその抗体12CA5（Fieldら、Mol. Cell. Biol. 8:2159～2165（1988））；c-mycフラッグおよびそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7、および9E10抗体（Evanら、Molecular and Cellular Biology 5（12）：3610～3616（1985））；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D（gD）フラッグおよびそれに対する5B6抗体（Paborskyら、Protein Engineering 3（6）：547～553（1990））およびMarkら、Journal of Biological Chemistry 269（14）：10720～10728（1994））が挙げられる。他のフラッグポリペプチドが開示されている。例には、Flag-ペプチド（Hoppら、BioTechnology 6:1204～1210（1988））；KT3エピトープペプチド（Martinら、Science 255:192～194（1992））； α -チューブリンエピトープペプチド（Skinnerら、J. Biol. Chem. 266:15163～15166（1991））；およびT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ（Lutz-Freyermuthら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6393～6397（1990））が挙げられる。一旦このフラッグポリペプチドが上記のように選択されると、それに対する捕捉抗体は、本明細書中に開示される技術を用いて生成され得る。

【0063】

用語「分析物」は、通常には、目的の α -サブユニットレセプターを活性化する（または、その活性化を妨害する）能力を調査するために、研究されるべき化合物または組成物をいう。この分析物は、チロシンキナーゼレセプターについてのリガンドを含むことが知られているか、または含むことが疑われる体液（例えば、血漿または羊水）または組成物を含み得る。この分析物はまた、目的の α -サブユニットレセプターに対するリガンドを有する細胞を含み得る。

【0064】

本明細書中で使用される「リガンド」は、目的の細胞外 α -サブユニットレセプターまたはその公知のアゴニストに結合し得る分子をいう。このリガンドは、通常、レセプターについてのアゴニストまたはアンタゴニストである。

【0065】

「アゴニスト」は、細胞外 α -サブユニットレセプター部分への結合の際にレセプター構築物の細胞内キナーゼドメインを活性化し得る分子を意味する。頻繁には、このアゴニストは、増殖因子（すなわち、細胞分裂を刺激し得るポリペプチド）を含む。例示的な増殖因子は、アルテミン、ニューツリン、GDNF、およびペルセフィンを含む。あるいは、このアゴニストは、実施例において本明細書中において示されるレセプターまたはさらにそのフラッグ配列に対する抗体であり得る。しかし、他の非タンパク質アゴニスト（例えば、有機低分子）もまた、本発明に含まれる。

【0066】

「アンタゴニスト」は、アゴニスト作用をブロックする分子を意味する。通常には、このアンタゴニストは、以下のいずれかである：（a） α -サブユニットレセプター部分に結合し、それによってレセプターに対するアゴニストによるレセプターの結合および／もしくは活性をブロックする（アンタゴニストは、レセプターのECDに結合し得るが、このことは、必ずしも絶対ではない）；または（b）アゴニストに結合し、これによりアゴニストによるレセプターの活性化を妨害する。このアッセイは、アンタゴニストの両方の型の検出を容易にする。アンタゴニストは、例えば、レセプターについての内因性アゴニス

トリガンドのレセプター結合ドメインを含むペプチドフラグメントを含み得る。アンタゴニストはまた、レセプターのECDに対して、またはレセプターの公知のアゴニストに対して指向される抗体であり得る。しかし、他の非タンパク質分子もまた、この用語に含まれる。

【0067】

用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、そしてより詳細には、単一の抗GFR α 3モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、および中和抗体を含む）、およびポリエピトープ特異性を有する抗GFR α 3抗体組成物を含み得る。本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一の抗体の集団から得られる抗体をいい、すなわちこの集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能性のある天然に存在する変異を除いては同一である。

10

【0068】

本明細書中で目的のための「活性な」または「活性」は、文脈が示すように、ネイティブもしくは天然に存在するGFR α 3、またはレセプターの生物学的活性および／あるいは免疫学的活性を保持する、GFR α 3または α -サブユニットレセプターの形態をいう。好ましい活性は、アゴニストまたは天然のリガンドに結合し影響を及ぼす（例えば、その活性をブロックまたは他の様式で調節する）能力である。この活性は、好ましくは、ニューロン機能の調節を含む。

【0069】

「GFR α 3リガンド」は、ネイティブ配列GFR α 3に結合し、そして好ましくはそれを活性化する分子である。GFR α 3に結合する分子の能力は、例えば、アッセイプレートにコートされたGFR α 3免疫付着因子に結合する推定リガンドの能力によって決定され得る。結合の特異性は、GFR α 1または2への結合を比較することによって決定され得る。

20

【0070】

用語「抗ホスホチロシン抗体」とは、rPTKのキナーゼドメイン中のリン酸化チロシン残基に選択的に結合する分子（通常、抗体）をいう。この抗体は、ポリクローナルであり得るが、望ましくは、モノクローナル抗体である。抗ホスホチロシンポリクローナル抗体は、WhiteおよびBacker、Methods in Enzymology 201:65-67 (1991)において開示される技術を用いて作製され得、そしてモノクローナル抗ホスホチロシン抗体は、例えば、Upstate Biologicals, Inc. (UBI, Lake Placid, NY) から商業的に得られ得る。

30

【0071】

本明細書中で使用される場合、用語「標識」とは、分子（例えば、抗ホスホチロシン抗体）と直接的または間接的に結合体化される、検出可能な化合物または組成物をいう。この標識は、それ自体が検出可能であり得る（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）か、または酵素標識の場合、検出可能である基質化合物または組成物の化学的変化を触媒し得る。好ましい標識は、非放射性発色試薬の変色を触媒する酵素標識である。

【0072】

「洗浄する」とは、固相を、非結合材料（例えば、非付着細胞、非付着捕捉薬剤、非結合リガンド、レセプター、レセプター構築物、細胞溶解物、または抗ホスホチロシン抗体）がそこから除去されるように、水溶液（通常、緩衝液または細胞培養培地）に曝露することを意味する。バックグラウンドノイズを低下させるために、洗浄溶液中に界面活性剤（例えば、Triton X）を含むことが好都合である。通常、水性洗浄溶液は、洗浄後にアッセイプレートのウェルからデカントされる。簡便には、洗浄は、自動化洗浄デバイスを使用して達成され得る。時に、数回の洗浄工程（例えば、約1～10洗浄工程の間）が必要とされ得る。

40

【0073】

「ブロック緩衝液」とは、捕捉薬剤でコートされない第二の固相の曝露された表面に結合し得る少なくとも1つのブロッキング化合物を含む、水性のpH緩衝溶液を意味する。こ

50

のブロッキング化合物は、通常、ウシ血清アルブミン（BSA）、ゼラチン、カゼイン、または粉乳のようなタンパク質であり、そしてアッセイにおける試薬（例えば、抗ホスチロシン抗体および検出試薬）のいずれとも交差反応しない。ブロック緩衝液は、一般に、約7〜7.5の間のpHで提供され、そして適切な緩衝化剤としては、リン酸緩衝液およびTRIS緩衝液が挙げられる。

【0074】

「溶解緩衝液」とは、可溶化界面活性剤、1つ以上のプロテアーゼインヒビター、および少なくとも1つのホスファターゼインヒビター（例えば、オルトバナジウム酸ナトリウム）を含む水性のpH緩衝溶液を意味する。用語「可溶化界面活性剤」とは、真核生物細胞の細胞膜を溶解するが、レセプター構築物を変性または活性化しない、水混和性の非イオン性の界面活性剤をいう。適切な非イオン性界面活性剤の例は、Triton-X 100、Tween 20、CHAPS、およびNonidet P-40（NP40）（例えば、Calbiochem、La Jolla、Californiaから入手可能）を含む。多くの他の非イオン性界面活性剤は、当該分野で利用可能である。適切なプロテアーゼインヒビターの例は、フェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）、ロイペプチン、ペプスタチン、アプロチニン、4-（2-アミノエチル）-ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸-ベスタチン、キモスタチン、およびベンズアミジンを含む。保存剤（例えば、チメロサル）および溶液の等張性を維持する1つ以上の化合物（例えば、塩化ナトリウム（NaCl）またはスクロース）、および緩衝液（例えば、TrisまたはPBS）もまた、通常、存在する。一般的に、溶解緩衝液のpHは、約7〜7.5の範囲である。

【0075】

通常、溶解緩衝液を第一のアッセイプレートに添加した後、この第一のアッセイプレートを「穏やかに攪拌」し、そしてこの表現は、第一のアッセイプレートはかなり低い速度で（通常、円運動を用いて）物理的に振盪させる動作をいう。「穏やかな攪拌」とは、細胞を機械的に破壊する（例えば、この細胞をホモジナイズまたは遠心分離することにより）ことを包含しない。模範的な振盪速度は、例えば、Bellico回転振盪器において、200〜500 rpm、好ましくは、300〜400 rpmの大きさである。

【0076】

（II. 本発明の組成物および方法）

（A. 全長GFR α 3）

本発明は、本願においてGFR α 3と呼ばれるポリペプチドをコードする、新規に同定および単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、出願人は、GFR α 3ポリペプチドをコードするcDNAを同定し、そして単離した。このことは、以下、実施例においてさらに詳細に開示する。BLAST、BLAST-2およびFastA配列整列コンピュータープログラムを用いて、出願人は、全長ネイティブ配列GFR α 3（配列番号15）が、GFR α 1およびGFR α 2と34%アミノ酸配列同一性を有することを見出した。従って、現時点では、本願に開示されたGFR α 3は、GFRタンパク質ファミリーにおいて新規に同定されたメンバーであり、そしてGFRタンパク質ファミリーに代表的なニューロン細胞活性化機能を有し得ると考えられる。しかし、GFR α 1およびGFR α 2に比べてGFR α 3の分布が限定されていることは、GFR α 3およびそのアゴニストを、投与されるときに望ましくない副作用を避けるのに好ましい分子とする。

【0077】

グリア細胞株由来神経栄養因子（「GDNF」）およびニューツリン（Neurturin）（「NTN」）は、交感神経感覚神経ニューロンおよび中枢神経系ニューロンの2つの構造的に関連した強力な生存因子である（Linら、Science 260:1130-1132（1993）；Hendersonら、Science 266:1062-1064（1994）；Buj-Bellorら、Neuron 15:821-828（1995）；Kotzbauerら、Nature 384:467-470（1996））。GDNFは、その作用を、リガンド結合グリコシル-ホスファチジルイノシトール

ル (GPI) 連結タンパク質 (GDNFR α または GFR α 1 と称される) および膜貫通チロシンキナーゼ Ret で構成される多成分レセプター系によって媒介することが示された (Treasonor ら、Nature 382:80-83 (1996); Jing ら、Cell 85:1113-1124 (1996); Trupp ら、Nature 381:785-789 (1996); Durbec ら、Nature 381:789-793 (1996))。NTN シグナルは、GFR α 2 により伝達され、それはまた Ret と会合する。本明細書中には、GFR α 3 と称される GPI 連結タンパク質およびその遺伝子の単離、配列、および組織分布が記載されている。これは、NTN および GDNF ファミリーにおける新規なリガンドに対する応答を調整することが示されている。NTN に対する細胞応答の場合、細胞は、GFR α 2 の存在を要求する。リガンド結合 GFR α 2 は、チロシンキナーゼレセプター Ret のリン酸化を誘導する。これらの所見は、Ret および GFR α 2 を、それぞれ NTN および関連リガンドのレセプターのシグナル伝達成分およびリガンド結合成分として同定する。このことは、共有された膜貫通タンパク質チロシンキナーゼ (Ret) およびリガンド特異的 GPI 連結タンパク質成分 (GFR α) を含む、レセプターの新規な神経栄養および分化因子レセプターファミリーを定義する。

10

【0078】

グリア細胞株由来神経栄養因子 (「GDNF」) (Lin ら、Science 260:1130-1132 (1993); WO93/06116、これらは、その全体が本明細書中に参考として援用される) は、中脳ドパミン作用ニューロン (Lin ら、Science 260:1130-1132 (1993); Stroemberg ら、Exp. Neurol.、124:401-412 (1993); Beck ら、Nature、373:339-341 (1995); Kearns ら、Brain Res.、672:104-111 (1995); Tomac ら、Nature、373:335-339 (1995))、脊髄運動ニューロン (Henderson ら、Science 266:1062-1064 (1994); Oppenheim ら、Nature、373:344-346 (1995); Yan ら、Nature 373:341-344 (1995))、およびノルアドレナリン作用ニューロン (Arenas ら、Neuron、15:1436-1473 (1995)) の強力な生存因子である。これらは、それぞれ、パーキンソン病 (Hirsch ら、Nature、334:345-348 (1988); Hornykiewicz、Mt. Sinai J. Med.、55:11-20 (1988))、筋萎縮側索硬化 (Hirano ら、Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Diseases, P. Rowland 編 (New York: Raven Press Inc. 91~101 頁 (1991))、およびアルツハイマー病 (Marcyniuk ら、J. Neurol. Sci. 76:335-345 (1986); Cash ら、Neurology、37:42-46 (1987); Chan-Palay ら、Comp. Neurol.、287:373-392 (1989)) において変性する。GDNF を欠損するように遺伝的に操作されたマウスに基づいて、GDNF に関するさらなる生物学的役割が報告されている: その役割は、腸ニューロン、交感神経ニューロン、および感覚ニューロン、および腎臓系の発達および/または生存であって、中枢神経系 (CNS) におけるカテコールアミン作用ニューロンではない (Moore ら、Nature 382:76-79 (1996); Pichel ら、Nature 382:73-76 (1996); Sanchez ら、Nature 382:70-73 (1996))。GDNF の生理学および臨床的重要性にも関わらず、その作用機構に関してはほとんど知られていない。

20

30

40

【0079】

サイトカインレセプターは、頻繁に、多サブユニット複合体に集合する。時に、この複合体の α サブユニットは、同族の増殖因子への結合に関与し、そして β サブユニットは、細胞にシグナルを伝達する能力を含み得る。理論に縛られることを望まないが、これらのレセプターは、形成される複合体に依存して3つのサブファミリーに割り当てられる。サブ

50

ファミリー1は、EPO、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、インターロイキン-4（IL-4）、インターロイキン-7（IL-7）、成長ホルモン（GH）、およびプロラクチン（PRL）に対するレセプターを包含する。このサブファミリーに属するレセプターに対するリガンド結合は、レセプターのホモ二量体化を生じると考えられる。サブファミリー2は、IL-3、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-5（IL-5）、インターロイキン-6（IL-6）、白血球阻害因子（LIF）、オンコスタチンM（OSM）、および毛様体神経栄養因子（CNTF）に対するレセプターを包含する。サブファミリー2レセプターは、リガンド結合のために α サブユニット、およびシグナル伝達のために β サブユニット（IL-3、GM-CSF、およびIL-5レセプターの共有された β サブユニット、またはIL-6、LIF、OSM、およびCNTFレセプターのgp130サブユニットのいずれか）を有するヘテロ二量体である。サブファミリー3は、インターロイキン-2（IL-2）レセプターのみを含む。IL-2レセプター複合体の β および γ サブユニットは、非関連Tac抗原の α -サブユニットと会合するサイトカイン-レセプターポリペプチドである。

10

【0080】

本発明は、GFR α 3の発見に基づく。これは、その天然リガンドが未知である、GFRファミリー中のタンパク質である。本明細書中に記載の実験は、この分子が、新規なGDNFファミリーリガンドに対する応答を媒介することにおいて役割を果たすようであるレセプターであることを実証する。特に、このレセプターは、種々の組織および細胞集団（ニューロンを含む）に存在することが見出され、従って、GFR α 3リガンド（例えば、アゴニスト抗体）は、GFR α 3含有細胞およびRet含有細胞の増殖、成長、生存、分化、代謝、または再生を刺激するために使用され得ることが示される。

20

【0081】

（B. GFR α 3改変体）

本明細書中に記載の全長ネイティブ配列GFR α 3に加えて、GFR α 3改変体が調製され得ることが意図される。GFR α 3改変体は、GFR α 3 DNAに適切なヌクレオチド変化を導入することによるか、または所望のGFR α 3のポリペプチド合成により、調製され得る。当業者は、アミノ酸変化が、GFR α 3の翻訳後プロセスを変化させ得る（例えば、グリコシル化部位の数または位置を変化させるか、あるいは膜付着特性を変化させる）ことを認識する。実際、スプライスGFR α 3スプライス改変体は、DNA48614によってコードされ、そしてマウス改変体は、配列番号4によってコードされる。他の改変体としては、実施例において記載のように作製されたIgGタグ化およびgD-RSEキメラが挙げられる。

30

【0082】

ネイティブな全長配列GFR α 3における、または本明細書中に記載のGFR α 3の種々のドメインにおける改変は、例えば、保存的および非保存的変異についてのいずれかの技術および指針（例えば、米国特許第5,364,934号において記載）を用いて作製され得る。改変は、ネイティブ配列GFR α 3と比較して、GFR α 3のアミノ酸配列の変化を生じる、GFR α 3をコードする1つ以上のコドンの置換、または欠失、または挿入であり得る。随意には、この改変は、GFR α 3のドメインの1つ以上における、少なくとも1つのアミノ酸と任意の他のアミノ酸での置換による。所望の活性に有害に影響することなくどのアミノ酸残基が挿入、置換または欠失され得るかを決定する指針は、GFR α 3の配列を、相同な公知のタンパク質分子の配列と比較し、そして高相同性領域において作製されたアミノ酸配列変化の数を最少にすることにより見出され得る。アミノ酸置換は、あるアミノ酸を、類似の構造および／または化学特性を有する別のアミノ酸で置換した結果（例えば、ロイシンのセリンでの置換（すなわち、保存的アミノ酸置換））であり得る。挿入または欠失は、随意には、1～5アミノ酸の範囲であり得る。可能とされる改変は、配列中のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を系統的に作製し、そして以下の実施例に記載のインビトロアッセイにおいて活性について、得られた改変体を試験することにより決定され得る。

40

50

【0083】

改変体は、(a) 配列番号15のアミノ酸27～400、配列番号17のアミノ酸27～369、もしくは配列番号5のアミノ酸27～374の配列を含むGFR α 3ポリペプチドをコードする核酸配列、または(b) (a)の核酸分子の相補体、に対して少なくとも約65%配列同一性を有する、単離された核酸分子によってコードされた改変体であり得る。さらに、改変体は、配列番号15のアミノ酸84～360；配列番号17のアミノ酸84～329；もしくは配列番号20のアミノ酸110～386の配列の、GFR α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメインを含む核酸分子配列、またはそれらの相補的な核酸によってコードされ得る。これらの単離された核酸分子は、好ましくは本発明のGFR α 3ポリペプチドをコードする核酸配列にストリンジェントな条件下で優先的にハイブリダイズするGFR α 3コード配列を含む。配列同一性は、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約85%、さらにより好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%の配列同一性を有する。代表的には、ポリペプチドは、配列番号15のアミノ酸残基27～400を有するポリペプチド、配列番号17のアミノ酸27～369を有するポリペプチド、配列番号5のアミノ酸27～374を有するポリペプチド、配列番号15のアミノ酸84～360の配列のGFR α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメイン、配列番号17のアミノ酸84～329の配列のGFR α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメイン、もしくは配列番号20のアミノ酸110～386の配列のGFR α 3ポリペプチドのリガンド結合ドメインと、少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも約95%配列同一性を有する。好ましくは、同一性は、配列番号15のアミノ酸残基27～400およびそれをコードするDNAに対してである。単離された核酸分子は、配列番号15のアミノ酸残基27から400を有するGFR α 3ポリペプチドをコードするDNAを含み得るか、またはこのようなコード核酸配列に対して相補的であり、そして少なくとも中程度の条件下、随意には高いストリンジェンシーの条件下でそれに安定して結合したままである。タンパク質はまた、それぞれ受託番号ATCC 209752 (名称：DNA48613-1268)、ATCC 209751 (名称：DNA48614-1268)、およびATCC _____で、1998年4月7日にATCCに寄託された、クローンDNA48613、DNA48614、もしくはマウスGFR α 3 (クローン13)の全長タンパク質をコードする核酸、またはストリンジェントな条件下でそれにハイブリダイズする核酸によりコードされ得る。

【0084】

改変は、当該分野で公知の方法（例えば、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）変異誘発、アラニンスキャニング、およびPCR変異誘発）を用いて作製され得る。部位特異的変異誘発（Carterら、Nucleic Acids Res.、13：4331（1986）；Zollerら、Nucleic Acids Res.、10：6487（1987））、カセット変異誘発（Wellsら、Gene 34：315（1985））、制限選択変異誘発（Wellsら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A、317：415（1986））、または他の公知の技術が、GFR α 3改変体DNAを生成するためにクローン化DNAに対して実施され得る。

【0085】

スキャニングアミノ酸分析がまた、連続した配列に沿って1つ以上のアミノ酸を同定するために用いられ得る。好ましいスキャニングアミノ酸の中には、比較的小さな中性アミノ酸がある。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインが挙げられる。アラニンは、このグループ間において、代表的に好ましいスキャニングアミノ酸である。なぜなら、これは、 β 炭素を超える側鎖を排除しており、そして改変体の主鎖のコンフォメーションを変えるとはあまり思われえないからである。アラニンはまた、それが最も一般的なアミノ酸であるので、代表的に好ましい。さらに、それは、包埋された位置および露出された位置の両方において頻繁に見られる（Creighton、The Proteins (W. H. Freeman & Co., N. Y.)；Chot

hia、J. Mol. Biol. 150:1 (1976))。アラニン置換が十分な量の
改変体を生じない場合、イソステリック (isoteric) アミノ酸が使用され得る。

【0086】

(C. GFR α 3の修飾)

GFR α 3の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれる。共有結合修飾の1つのタイプは、GFR α 3の標的化されたアミノ酸残基を、GFR α 3のN末端またはC末端残基の選択された側鎖と反応し得る有機誘導体化剤と反応させることを包含する。二官能性薬剤での誘導体化は、例えば、抗GFR α 3抗体を精製するための方法において使用するために、GFR α 3を水溶性支持マトリックスまたは表面に架橋させるため、およびその逆のために有用である。一般的に使用される架橋剤としては、例えば、1, 1-ビス (ジアゾアセチル) - 2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル)、ホモ二官能性イミドエステル (ジスクシンイミジルエステル (例えば、3, 3'-ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート) を含む)、二官能性マレイミド (例えば、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン)、およびメチル-3- ((p-アジドフェニル) ジチオ) プロピオイミデート) のような薬剤が挙げられる。

10

【0087】

他の修飾としては、グルタミル残基およびアルパラギニル残基のそれぞれ対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基への脱アミド化、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリル残基またはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 79~86頁 (1983))、N末端アミンのアセチル化、および任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

20

【0088】

本発明の範囲内に含まれるGFR α 3ポリペプチドの共有結合的修飾の別のタイプは、ポリペプチドのネイティブグリコシル化パターンの変化を包含する。「ネイティブグリコシル化パターンの変化」とは、本明細書中の目的では、ネイティブ配列GFR α 3において見出される1つ以上の炭水化物部分を欠失させること、および/またはネイティブ配列GFR α 3に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加すること、および/またはグリコシル化部位に結合された糖残基の割合および/または組成の変化を意味することが意図される。

30

【0089】

GFR α 3ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を変化させることにより達成され得る。この変化は、例えば、ネイティブ配列GFR α 3への1つ以上のセリンまたはトレオニン残基の付加、またはこれらの残基による置換 (O-連結グリコシル化部位について) によって行われ得る。GFR α 3アミノ酸配列は、必要に応じて、DNAレベルでの変化 (特に、所望のアミノ酸に翻訳するコドンが生成されるように、予め選択した塩基の位置でGFR α 3ポリペプチドをコードするDNAを変異させることによって) を通じて変化され得る。

40

【0090】

GFR α 3ポリペプチドにおける炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学的もしくは酵素的カップリングによる。このような方法は、当該分野で、例えば、WO 87/05330 (1987年9月11日に公開) ならびにAppl inおよびWriston、CRC Crit. Rev. Biochem., 259~306頁 (1981) において記載されている。

【0091】

GFR α 3ポリペプチドに存在する炭水化物部分の除去は、化学的もしくは酵素的に、またはグリコシル化のための標的としての役割を有するアミノ酸残基をコードするコドン

50

の変異置換によって達成され得る。化学的脱グリコシル化技術は、当該分野で公知であり、そして例えば、Hakimuddinら、Arch. Biochem. Biophys. 259:52 (1987) およびEdgeら、Anal. Biochem. 118:131 (1981) に記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら、Meth. Enzymol. 138:350 (1987) により記載されるように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用により達成され得る。

【0092】

GFR α 3の共有結合修飾の別のタイプは、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号；または第4,179,337号に記載の様式における種々の非タンパク質性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン）の1つへのGFR α 3ポリペプチドの連結を包含する。

【0093】

本発明のGFR α 3はまた、別の異種のポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合されたGFR α 3を含むキメラ分子を形成するように修飾され得る。1つの実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとのGFR α 3の融合物を含む。エピトープタグは、一般に、GFR α 3のアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。GFR α 3のこのようなエピトープタグ化形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出され得る。また、エピトープタグの提供は、GFR α 3が、抗タグ抗体、またはエピトープタグに結合する別のタイプの親和性マトリクスを用いるアフィニティー精製により容易に精製されるようにすることを可能にする。代替の実施態様では、キメラ分子は、GFR α 3と免疫グロブリンもしくは免疫グロブリンの特定の領域との融合を含み得る。キメラ分子の二価形態について、このような融合は、IgG分子のFc領域に対してであり得る。

【0094】

種々のタグポリペプチドおよびそれらのそれぞれの抗体が当該分野で周知である。例としては、ポリヒスチジン（ポリ-his）またはポリヒスチジン-グリシン（ポリ-his-gly）タグ；flu-HAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5（Fieldら、Mol. Cell. Biol.、8:2159-2165 (1988)）；c-mycタグおよびそれらに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7、および9E10抗体（Evanら、Molecular and Cellular Biology、5:3610-3616 (1985)）；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D（gD）タグおよびその抗体（Paborskyら、Protein Engineering、3(6):547-553 (1990)）が挙げられる。他のタグポリペプチドには、Flagペプチド（Hoppら、BioTechnology、6:1204-1210 (1988)）；KT3エピトープペプチド（Martinら、Science、255:192-194 (1992)）； α -チューブリンエピトープペプチド（Skinnerら；J. Biol. Chem. 266:15163-15166 (1991)）；およびT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ（Lutz-Freyermuthら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87:6393-6397 (1990)）が含まれる。

【0095】

（D. GFR α 3の調製）

以下の記載は、主に、GFR α 3核酸を含むベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞を培養することによるGFR α 3の生成に関する。もちろん、当該分野で周知である代替の方法が、GFR α 3を調製するために使用され得ることは考慮される。例えば、GFR α 3配列、またはその部分は、固相技術を用いる直接ペプチド合成によって生成され得る（例えば、Stewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis、W. H. Freeman Co., San Francisco、C

A (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963) を参照のこと)。インビトロでのタンパク質合成は、手動技術を用いてまたは自動化によって実施され得る。自動化合成は、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) を用いて、製造者の指示を用いて行われ得る。GFR α 3 の種々の部分は、別個に化学合成され、そして化学的方法もしくは酵素的方法を用いて組み合わされて、全長 GFR α 3 を生成し得る。

【0096】

(1. GFR α 3 をコードする DNA の単離)

GFR α 3 をコードする DNA は、GFR α 3 mRNA を有し、かつ検出可能なレベルでそれを発現すると考えられている組織から調製された cDNA ライブラリーから得られ得る。従って、ヒト GFR α 3 DNA は、実施例に記載のような、ヒト組織から調製された cDNA ライブラリーから好都合に得られ得る。GFR α 3 をコードする遺伝子はまた、ゲノムライブラリーから、またはオリゴヌクレオチド合成によって得られ得る。

【0097】

ライブラリーは、目的の遺伝子またはそれによりコードされるタンパク質を同定するように設計されたプローブ（例えば、GFR α 3 に対する抗体または少なくとも約 20～80 塩基のオリゴヌクレオチド）を用いてスクリーニングされ得る。選択されたプローブを用いて cDNA ライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることは、標準的な手順（例えば、Sambrook ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載の手順）を用いて実施され得る。GFR α 3 をコードする遺伝子を単離するための代替の手段は、PCR 技術（Sambrook ら、前出；Dieffenbach ら、PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995) を使用することである。

【0098】

以下の実施例は、cDNA ライブラリーをスクリーニングするための技術を記載する。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、擬陽性が最小限になるのに十分な長さであり、かつ十分に明白であるべきである。このオリゴヌクレオチドは、好ましくは、それが、スクリーニングされるライブラリー中の DNA へのハイブリダイゼーションの際に検出され得るように標識される。標識化の方法は、当該分野で周知であり、そして³²P 標識化 ATP のような放射性標識、ビオチン化、または酵素標識の使用を包含する。ハイブリダイゼーション条件（中程度のストリンジェンシーまたは高度のストリンジェンシーを含む）は、Sambrook ら、前出において提供される。

【0099】

このようなライブラリースクリーニングによって同定された配列は、公共のデータベース（例えば、GenBank）または他の私有の配列データベースにおいて寄託されそして入手可能な他の公知の配列に対して、比較および整列され得る。分子の所定の領域内でのまたは全長配列にわたる配列同一性（アミノ酸またはヌクレオチドのいずれかのレベルで）は、相同性を測定するために種々のアルゴリズムを使用するコンピューターソフトウェアプログラム（例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、DNASTAR、および INHERIT）を用いる配列アラインメントを通じて決定され得る。

【0100】

タンパク質コード配列を有する核酸は、最初に、選択された cDNA ライブラリーまたはゲノムライブラリーを、本明細書中において開示された推定アミノ酸配列を用いてスクリーニングし、そして必要であれば、Sambrook ら（前出）に記載のような従来のプライマー伸長手順を用いて、前駆体を検出し、そして cDNA に逆転写されなかったかもしれない mRNA の中間体をプロセッシングすることによって得られ得る。

【0101】

(2. 宿主細胞の選択および形質転換)

宿主細胞は、GFR α 3生成のための本明細書中に記載の発現ベクターもしくはクローニングベクターを用いてトランスフェクトまたは形質転換され、そしてプロモーターを誘導するか、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適切に改変された従来の栄養培地において培養される。培養条件（例えば、培地、温度、pHなど）は、過度の実験を行うことなく当業者によって選択され得る。一般に、細胞培養物の生産性を最大にするための原理、プロトコル、および実用的な技術は、*Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler、編、(IRL Press、1991) および *Sambrook*ら、前出において見出され得る。

10

【0102】

トランスフェクションの方法は、当業者に公知である（例えば、CaPO₄およびエレクトロポレーション）。使用した宿主細胞に依存して、形質転換は、このような細胞に適した標準的な技術を使用して実施される。塩化カルシウムを使用するカルシウム処理（*Sambrook*ら、前出に記載のような）、またはエレクトロポレーションは、一般に、原核生物またはかなりの細胞壁障壁を含む他の細胞のために使用される。*Agrobacterium tumefaciens*を用いる感染は、*Shaw*ら、*Gene*、23:315（1983）およびWO89/05859（1989年6月29日公開）において記載されるように、特定の植物細胞の形質転換のために使用される。このような細胞壁のない哺乳動物細胞については、*Graham*および*van der Eb*、*Virology*、52:456-457（1978）のリン酸カルシウム沈殿方法が使用され得る。哺乳動物細胞宿主系形質転換の一般的な局面は、米国特許第4,399,216号において記載されている。酵母への形質転換は、代表的には、*Van Solingen*ら、*J. Bact.*、130:946（1977）および*Hsiao*ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76:3829（1979）の方法に従って実施される。しかし、DNAを細胞に導入するための他の方法（例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、インタクトな細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリカチオン（例えば、ポリブレン、ポリオルニチン））もまた使用され得る。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術について、*Keown*ら、*Methods in Enzymology*、185:527-537（1990）および*Mansour*ら、*Nature* 336:348-352（1988）を参照のこと。

20

30

【0103】

本明細書中においては、ベクターにおいてDNAをクローニングするかまたは発現させるための適切な宿主細胞は、原核生物細胞、酵母細胞、または高等真核生物細胞を包含する。適切な原核生物は、真正細菌（例えば、グラム陰性またはグラム陽性生物（例えば、腸内細菌（例えば、*E. coli*）））を含むが、これらに限定されない。種々の*E. coli*株は、公的に入手可能である（例えば、*E. coli* K12株MM294（ATCC 31,466）；*E. coli* X1776（ATCC 31,537）；*E. coli* 株W3110（ATCC 27,325）；およびK5 772（ATCC 53,635））。

40

【0104】

原核生物に加えて、真核生物微生物（例えば、糸状菌または酵母）が、GFR α 3コードベクターについての適切なクローニング宿主または発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae*は、一般的に用いられる下等真核生物宿主微生物である。

【0105】

グリコシル化GFR α 3の発現のための適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、昆虫細胞（例えば、*Drosophila* S2および*Spodoptera* Sf9）ならびに植物細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）およびCOS細胞が挙げられる

50

。より詳細な例には、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚性腎臓株(293または懸濁培養中の増殖のためにサブクロニングされた293細胞、Grahamら、J. Gen. Virol. 36:59(1977))；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR(CHO、UrlaubおよびChasin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980))；マウスセルトリー細胞(TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980))；ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞(Hep G2、HB8065)；およびマウス乳癌(MMT060562、ATCC CCL 51)が含まれる。適切な宿主細胞の選択は、当業者の能力の範囲内であると考えられる。

10

【0106】

(3. 複製可能ベクターの選択および使用)

GFRα3をコードする核酸(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)のためにまたは発現のために複製可能ベクターに挿入され得る。種々のベクターは、公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列は、種々の手順によってベクターに挿入され得る。一般に、DNAは、当該分野で公知の技術を用いて、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分は、一般に、1つ以上のシグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列を含むが、これらに限定されない。これらの成分の1つ以上を含む適切なベクターの構築は、当業者に公知の標準的な連結技術を使用する。

20

【0107】

GFRα3は、直接的だけでなく、異種ポリペプチド(これは、シグナル配列または成熟タンパク質もしくはポリペプチドのN末端に特異的開裂部位を有する他のポリペプチドであり得る)との融合ポリペプチドとしてもまた、組換えにより生成され得る。一般に、シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはそれは、ベクターに挿入され得るGFRα3 DNAの一部であり得る。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であり得る。酵母選択について、シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、α因子リーダー(SaccharomycesおよびKluyveromyces α-因子リーダーを含み、後者は、米国特許第5,010,182号に記載)または酸ホスファターゼリーダー、C. albicansグルコアミラーゼリーダー(EP362,179(1990年4月4日公開))、またはWO90/13646(1990年11月15日公開)に記載のシグナルであり得る。哺乳動物細胞発現では、哺乳動物シグナル配列は、タンパク質の分泌を指向させるために使用され得る(例えば、同じまたは関連した種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列、ならびにウイルス分泌リーダー)。

30

【0108】

発現ベクターおよびクローニングベクターの両方が、ベクターが、1つ以上の選択された宿主細胞において複製するのを可能にする核酸配列を含む。このような配列は、種々の細菌、酵母、およびウイルスについて周知である。プラスミドpBR322由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌について適切であり、2：プラスミド起点は酵母に適切であり、そして種々のウイルス起点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV、もしくはBPV)は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターのために有用である。

40

【0109】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、選択遺伝子(選択性マーカーとも呼ばれる)を含む。代表的な選択遺伝子は、(a)抗生物質もしくは他の毒素(例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、もしくはテトラサイクリン)に対する耐性を与えるタンパク質、(b)栄養要求性欠損を補足するタンパク質、または(c)複合培地から利用可能ではない必須栄養素を供給するタンパク質をコードする(例えば

50

、BacilliについてのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子)。哺乳動物細胞についての適切な選択マーカーの例は、GFR α 3核酸の取り込み能を有する細胞の同定に可能にするマーカーである(例えば、DHFRまたはチミジンキナーゼ)。野生型DHFRが使用される場合の適切な宿主細胞は、Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4216(1980)により記載のように調製され増殖された、DHFR活性が欠損するCHO細胞株である。酵母における使用のための適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcombら、Nature、282:39(1979);Kingsmanら、Gene、7:141(1979);Tschemperら、Gene、10:157(1980))。trp1遺伝子は、トリプトファンで増殖する能力を欠損する酵母の変異株の選択マーカーを提供する(例えば、ATCC番号44076またはPEP4-1)(Jones、Genetics、85:12(1977))。

10

【0110】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、通常、GFR α 3核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターを含み、mRNA合成を指向させる。種々の潜在的な宿主細胞により認識されるプロモーターは、周知である。原核生物宿主と共に使用するために適切なプロモーターとしては、b-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系(Changら、Nature、275:615(1978);Goeddel、Nature、281:544(1979))、アルカリホスファターゼ、a-トリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddel、Nucleic Acids Res.、8:4057(1980);EP36,776)、およびハイブリッドプロモーター(例えば、tacプロモーター)(deBoerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80:21-25(1983))が挙げられる。細菌系において使用するためのプロモーターはまた、GFR α 3をコードするDNAに作動可能に連結されたシャインダルガルノ(S.D.)配列を含む。

20

【0111】

酵母宿主と共に使用するための適切な促進配列の例としては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター(Hitzemanら、J. Biol. Chem.、255:2073(1980))または他の解糖酵素のプロモーター(Hessら、J. Adv. Enzyme Reg.、7:149(1968);Holland、Biochemist ry、17:2073(1978))(例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼ)が挙げられる。

30

【0112】

他の酵母プロモーター(これは、増殖条件により制御される転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである)は、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロームC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連した分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ならびにマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素、についてのプロモーター領域である。酵母発現における使用のための適切なベクターおよびプロモーターは、EP73,657においてさらに記載されている。哺乳動物宿主細胞におけるベクターからのGFR α 3転写は、例えば、ウイルス(例えば、ポリオーマウイルス、トリ水痘ウイルス(UK 2,211,504(1989年7月5日に公開))、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス2)、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、およびシミアンウイルス40(SV40))のゲノムから得られるプロモーターにより、異種哺乳動物プロモーター(例えば、アクチンプロモーターもしくは免疫グロブリンプロモーター)から得られるプロモーターにより、および熱ショックプロモーターから得られるプロモーターにより、このようなプロモーターが宿主細胞系と適合性である限り、制御される。

40

50

【0113】

高等真核生物によるGFR α 3をコードするDNAの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することにより増大され得る。エンハンサーは、その転写を増大させるためにプロモーターに対して作用する、通常10～300bpのDNAのシス作用エレメントである。多くのエンハンサー配列は、いまや、哺乳動物遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリン）から公知である。しかし、代表的には、当業者は、真核生物ウイルスからのエンハンサーを使用する。例は、複製起点の後ろ側（bp100-270）のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後ろ側のポリオマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーを含む。エンハンサーは、GFR α 3コード配列に対して5'位または3'位でベクターにスプライシングされ得るが、好ましくは、プロモーターから5'側の部位に位置する。

10

【0114】

真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物からの有核細胞）で使用される発現ベクターはまた、転写の終結のためにおよびmRNAの安定化のために必要な配列を含む。このような配列は、真核生物またはウイルスのDNAもしくはcDNAの5'および、場合によっては3'の非翻訳領域から一般に利用可能である。これらの領域は、GFR α 3をコードするmRNAの非翻訳領域においてポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。組換え脊椎動物細胞培養物におけるGFR α 3の合成に対して適合させるために適切なさらなる他の方法、ベク

20

【0115】

（4．遺伝子増幅／発現の検出）

遺伝子増幅および／または発現は、本明細書中に提供された配列に基づいて、適切な標識化プローブを用いて、サンプルにおいて直接的に（例えば、従来のサザンブロッティング、ノーザンブロッティング（mRNAの転写を定量するため）（Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)）、ドットブロッティング（DNA分析）、またはインサイチュハイブリダイゼーションにより

30

測定され得る。あるいは、特異的二重鎖（DNA二重鎖、RNA二重鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖、もしくはDNA-タンパク質二重鎖を含む）を認識し得る抗体が、用いられ得る。この抗体は、次に、標識化され得、そしてこのアッセイは、二重鎖が表面に結合され、従って、表面上での二重鎖の形成の際に、二重鎖に結合される抗体の存在が検出され得るように、実行され得る。

【0116】

あるいは、遺伝子発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量するために、免疫学的方法（例えば、細胞もしくは組織切片の免疫組織学的染色、および細胞培養物もしくは体液のアッセイ）によって測定され得る。サンプル液体の免疫組織学的染色および／またはアッセイのために有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであり得、そして任意の哺乳動物において調製され得る。好都合には、この抗体は、ネイティブ配列GFR α 3ポリペプチドに対して、または本明細書中で提供されるDNA配列に基づく合成ペプチドに対して、またはGFR α 3 DNAに融合され、かつ特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して、調製され得る。

40

【0117】

（5．ポリペプチドの調製）

GFR α の形態は、培養培地から、または宿主細胞溶解物から回収され得る。膜結合型である場合、それは、適切な界面活性溶液（例えば、Triton-X100）を使用して、または酵素的切断によって膜から放出され得る。GFR α 3の発現に用いられる細胞は、種々の物理的または化学的手段（例えば、凍結-解凍サイクリング、超音波処理、機械

50

的破壊、または細胞溶解剤)によって破壊され得る。組換え細胞タンパク質またはポリペプチドからGFR α 3を精製することが望まれ得る。以下の手順は、適切な精製手順を代表する:イオン交換カラム上での分画;エタノール沈降;逆相HPLC;シリカもしくはカチオン交換樹脂(例えば、DEAE)上でのクロマトグラフィー;クロマトフォーカシング;SDS-PAGE;硫酸アンモニウム沈降;ゲルろ過(例えば、Sephadex G-75を使用する);夾雑物(例えばIgG)を除去するためのプロテインA Sepharoseカラム;およびGFR α 3のエピトープタグ化形態を結合するための金属キレート化カラム。タンパク質精製の種々の方法が用いられ得、そしてこのような方法は、当該分野で公知であり、そしてDeutscher、Methods in Enzymology、182(1990);Scopes、Protein Purification:Principles and Practice、Springer-Verlag、New York(1982)に記載されている。選択される精製工程は、例えば、使用される生成プロセスおよび生成される特定のGFR α 3の性質に依存する。

【0118】

(E. GFR α 3についての使用)

GFR α 3をコードするヌクレオチド配列(またはそれらの相補体)は、分子生物学の分野において種々の適用を有し、これは、染色体および遺伝子マッピングにおける、ならびにアンチセンスRNAおよびDNAの生成におけるハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む。GFR α 3核酸はまた、本明細書中に記載の組換え技術によるGFR α 3ポリペプチドの調製に有用である。

【0119】

全長ネイティブ配列GFR α 3(配列番号14)遺伝子、またはその一部分は、全長遺伝子を単離するためか、または配列番号15に開示されるGFR α 3配列に対する所望の配列同一性を有するなお他の遺伝子(例えば、GFR α 3天然に存在する改変体または他の種由来のGFR α 3をコードする遺伝子)を単離するための、cDNAライブラリーについてのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。必要に応じて、このプローブの長さは、約20~約50塩基である。ハイブリダイゼーションプローブは、配列番号14のヌクレオチド配列に由来し得るか、またはネイティブ配列GFR α 3のプロモーターエレメント、エンハンサーエレメントおよびイントロンを含むゲノム配列に由来し得る。例として、スクリーニング方法は、約40塩基の選択されたプローブを合成するために、公知のDNA配列を用いてGFR α 3遺伝子のコード領域を単離する工程を含む。ハイブリダイゼーションプローブは、種々の標識(^{32}P または ^{35}S のような放射性ヌクレオチド、またはアビジン/ビオチンカップリング系を介してプローブとカップリングされるアルカリホスファターゼのような酵素的標識)によって標識化され得る。本発明のGFR α 3遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識化プローブを使用して、このようなライブラリーのどのメンバーにこのプローブがハイブリダイズするかを決定するために、ヒトcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングし得る。ハイブリダイゼーション技術は、以下の実施例にさらに詳細に記載される。

【0120】

このプローブはまた、密接に関連するGFR α 3配列の同定のための配列のプールを作製するために、PCR技術において使用され得る。

【0121】

GFR α 3をコードするヌクレオチド配列はまた、GFR α 3をコードする遺伝子をマッピングするための、および遺伝的障害を有する個体の遺伝子解析のためのハイブリダイゼーションプローブを構築するために、使用され得る。本明細書に提供されるヌクレオチド配列は、公知の技術を用いて(例えばインサイチュハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する連鎖解析、およびライブラリーを用いたハイブリダイゼーションスクリーニング)、染色体および染色体の特定の領域にマッピングされ得る。

【0122】

GFR α 3のコード配列が、別のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合(例

10

20

30

40

50

えば、GFR α 3がレセプターである場合）、GFR α 3は、結合相互作用に關与する他のタンパク質または分子を同定するためのアッセイにおいて使用され得る。このような方法によって、レセプター／リガンド結合相互作用のインヒビターが、同定され得る。このような結合相互作用に關与するタンパク質はまた、結合相互作用のペプチドまたは低分子のインヒビターもしくはアゴニストについてスクリーニングするために使用され得る。また、レセプターGFR α 3は、相関性のリガンドを単離するために使用され得る。スクリーニングアッセイは、ネイティブなGFR α 3またはGFR α 3のレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すように設計され得る。このようなスクリーニングアッセイは、化学ライブラリーの高処理能力スクリーニングに適合したアッセイを含み、そのライブラリーを低分子薬物候補物の同定に特に適するものとされる。意図される低分子は、合成有機化合物または無機化合物を含む。このアッセイは、種々の形式（タンパク質－タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、イムノアッセイおよび細胞ベースアッセイを含む、これらは、当該分野で良く特徴付けられている）で実施され得る。

10

【0123】

GFR α 3またはその修飾形態をコードする核酸はまた、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物（次に治療学的に有用な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用である）のいずれかを生ずるために使用され得る。トランスジェニック動物（例えばマウスまたはラット）は、導入遺伝子を含む細胞を有する動物であり、その導入遺伝子は、誕生前（例えば、胚段階）にその動物に、またはその動物の先祖に導入された。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組込まれるDNAである。1つの実施態様において、GFR α 3をコードするcDNAが、確立された技術に従って、GFR α 3をコードするゲノムDNAをクローニングするために使用され得、そしてゲノム配列GFR α 3をコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。トランスジェニック動物（特にマウスまたはラットのような動物）を作製するための方法は、当該分野において慣用的になっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号および同第4,870,009号に記載される。代表的には、特定の細胞は、組織特異的エンハンサーとのGFR α 3導入遺伝子組込みについて標的化される。胚段階で動物の生殖系列に導入されたGFR α 3をコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物は、GFR α 3をコードするDNAの発現の増大の効果を試験するために使用され得る。このような動物は、例えば、その過剰発現と関連した病理状態からの防御を付与すると考えられる試薬についての試験用動物として使用され得る。本発明のこの面に従って、動物は、試薬で処置され、そして導入遺伝子を保有する未処置の動物と比較した病理状態の発生率の減少は、その病理状態についての治療的介入の可能性を示す。

20

30

【0124】

GFR α 3の非ヒトホモログは、GFR α 3をコードする内因性遺伝子と動物の胚細胞に導入されるGFR α 3をコードする変更されたゲノムDNAとの間の相同組換えの結果として、GFR α 3をコードする欠損遺伝子または変更された遺伝子を有するGFR α 3「ノックアウト」動物を構築するために使用され得る。例えば、GFR α 3をコードするcDNAは、確立された技術に従ってGFR α 3をコードするゲノムDNAをクローニングするために使用され得る。GFR α 3をコードするゲノムDNAの一部は、欠失され得るか、または別の遺伝子（例えば、組込みをモニターするために使用され得る選択マーカーをコードする遺伝子）で置換され得る。代表的には、数キロベースの変更されていない隣接DNA（5'末端および3'末端の両方で）が、ベクター中に含まれる（例えば、相同組換えベクターの記載については、ThomasおよびCapecci、Cell、51:503（1987）を参照のこと）。このベクターを、胚幹細胞株に導入し（例えばエレクトロポレーションにより）、そして導入されたDNAが内因性DNAと相同的に組換えされた細胞を選択する（例えば、Lira、Cell、69:915（1992）を参照のこと）。次いで、選択された細胞を動物（例えば、マウスまたはラット）の胚盤胞

40

50

に注入し、凝集キメラを形成する（例えば、Bradley、Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編（IRL、Oxford、1987）113～152頁を参照のこと）。次いで、キメラ胚を、適切な偽妊娠雌養育動物に移植し、そして胚を一定期間養育して「ノックアウト」動物を作出する。それらの原基細胞中に相同的に組換えられたDNAを保有する子孫が、標準的技術によって同定され得、そしてその動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させるために使用され得る。ノックアウト動物は、例えば、特定の病理状態に対して防御するための能力について、およびGFR α 3ポリペプチドの非存在による病理状態のそれらの発達について特徴付けられ得る。

10

【0125】

GFR α 3分子に結合する薬剤は、末梢神経系を含む疾患または状態の処置に有用であり得る。例えば、このようなりガンドは、糖尿病、HIV、化学治療剤処置と関連した末梢神経障害を処置するために使用され得る。GFR α 3に結合するリガンドは、神経障害性疼痛の処置において有用であると期待され、GFR α 3のアンタゴニストは、非神経性障害性質の慢性疼痛（例えば、種々の炎症状態と関連した慢性疼痛、しかしこれに限定されない）を処置するのに有用であると期待される。上記治療は、実施例5のデータと一致する。実施例5では、発達中および成体の知覚神経節内でのGFR α 3の強力な発現が観察された。GFR α 3またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、自律神経系機能障害を包含する状態（血圧または心拍（cardiac rhythm）の不整、胃腸機能、虚弱および尿節制を含むがそれらに限定されない）を処置するために使用され得る。GFR α 3に結合するリガンドについての他の徴候は、ヘルペス後神経痛、帯状ヘルペス、ぜん息、過敏性腸、炎症性腸、膀胱炎、頭痛（片頭痛）、関節炎、脊髄損傷、便秘、高血圧、粘膜炎（mucositis）、口内乾燥症もしくはドライアイ（dry mouth or eye）、線維素血症、慢性背部疼痛、または創傷治癒を含む。これらの使用は、交感神経節において観察された発現と一致する。

20

【0126】

多くの器官（背部脳（notably brain）、腸および腎臓を含む）におけるGFR α 3の発現の驚くべき相対的欠如は、このレセプターに結合するリガンド（および他のアゴニストまたはアンタゴニスト）には、GFR α 1およびGFR α 2（GDNFおよびニューツリン）に結合するリガンドと関連し得るいくつかの副作用がないことを示す。従って、GFR α 3を介して作用するリガンドは、末梢神経系の障害を処置するために特に有用であるが、体重減少、運動機能、または腎臓機能に関して、GFR α 1またはGFR α 2を介して作用するリガンドよりも、低い効果を誘導する。

30

【0127】

（F. 抗GFR α 3抗体）

本発明は、抗GFR α 3抗体をさらに提供する。例示的な抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、および異種結合体抗体が挙げられる。

40

【0128】

（1. ポリクローナル抗体）

抗GFR α 3抗体は、ポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体を調製する方法は、当業者に公知である。ポリクローナル抗体は、哺乳動物において、例えば、免疫化剤（および所望される場合、アジュバント）の1回以上の注射によって惹起され得る。代表的には、免疫化剤および／またはアジュバントは、複数回の皮下注射または腹腔内注射により哺乳動物中に注射される。免疫化剤は、GFR α 3ポリペプチドまたはその融合タンパク質を含み得る。免疫される哺乳動物において免疫原性であると公知のタンパク質に免疫化剤を結合体化することは、有用であり得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、およびダイズトリプシンインヒビターが挙げられるが、それらに限定されない。用いられ

50

得るアジュバントの例は、フロイント完全アジュバントおよびMPL-TDMアジュバント（モノホスホリスリルリピドA、合成トレハロースジコリノマイコレート（dicorynomycolate））を含む。免疫化プロトコルは、過度の実験を行うことなく当業者によって選択され得る。

【0129】

（2. モノクローナル抗体）

あるいは、抗GFR α 3抗体は、モノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein、Nature、256:495（1975）により記載されるようなハイブリドーマ方法を使用して調製され得る。ハイブリドーマ方法では、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物が、代表的に、免疫化剤に特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生し得るリンパ球を誘起するように免疫化剤で免疫される。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化され得る。

10

【0130】

免疫化剤は、代表的には、GFR α 3ポリペプチドまたはその融合タンパク質を含む。一般的に、ヒト起源の細胞が所望される場合、末梢血リンパ球（「PBL」）が使用されるか、または非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合、脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用される。次いで、リンパ球は、ポリエチレングリコールのような適切な融合剤を使用して、不死化細胞株と融合されて、ハイブリドーマ細胞が形成される（Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、Academic Press、（1986）59～103頁）。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髓腫細胞である。通常ラットまたはマウス骨髓腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、非融合の不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を好ましくは含む適切な培養培地において培養され得る。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホシルトランスフェラーゼ（HGPR TまたはHPR T）を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む（「HAT培地」）。これらの物質は、HGPR T欠損細胞の増殖を妨げる。

20

【0131】

好ましい不死化細胞株は、効率良く融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支持し、そしてHAT培地のような培地に感受性である。より好ましい不死化細胞株は、マウス骨髓腫株である。これは、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California およびアメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville、Marylandより入手され得る。ヒト骨髓腫細胞株およびマウス-ヒト異種骨髓腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている（Kozbor、J. Immunol.、133:3001（1984）；Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、Marcel Dekker, Inc., New York、（1987）51～63頁）。

30

【0132】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、次いで、GFR α 3に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によるか、またはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA））により決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、MunsonおよびPollard、Anal. Biochem. 107:220（1980）のスキッチャード分析によって決定され得る。所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは、制限希釈手順によってサブクローニングされ得、そして標準方法（Goding、前出）によって増殖され得る。この目的のために適切な培養培地としては、例えば、ダルベッコ

40

50

改変イーグル培地およびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物中の腹水としてインビボで増殖され得る。

【0133】

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィー）により、培養培地または腹水から単離または精製され得る。モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,567号に記載される方法）により作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）容易に単離され得、そして配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として働く。一旦単離されると、DNAは、発現ベクター中に位置され得、次いで、このベクターは、そうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞（例えば、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞）にトランスフェクトされて、組換え宿主細胞でモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば、コード配列を、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖の定常ドメインに置換することによって（米国特許第4,816,567号；Morrisonら、前出）かまたは非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列の全部または一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合させることによって改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドが、本発明の抗体の定常ドメインについて置換され得るか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインについて置換されて、キメラ二価抗体を作製し得る。

【0134】

抗体は、一価の抗体であり得る。一価の抗体を調製するための方法は、当該分野において周知である。例えば、1つの方法は、免疫グロブリン軽鎖および改変された重鎖の組換え発現を包含する。重鎖は、重鎖の架橋を防ぐように、一般的にFc領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基は、架橋を防ぐように別のアミノ酸残基で置換されるかまたは欠失される。

【0135】

インビトロでの方法もまた、一価の抗体を調製するのに適切である。抗体のフラグメント、特にFabフラグメントを生成するための抗体の消化は、当該分野において公知の慣用的技術を用いて達成され得る。

【0136】

（3．ヒト化抗体）

本発明の抗GFRA3抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体をさらに含む。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合部分配列）である。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）由来残基が、所望の特異性、親和性および許容を有する非ヒト種（ドナー抗体）（例えば、マウス、ラットまたはウサギ）のCDR由来の残基によって置換される、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。ある場合、ヒト免疫グロブリンのFv枠組み残基は、対応する非ヒト残基により置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても、および移入されたCDR配列もしくは枠組み配列においても見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、および代表的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、そこでは、CDR領域の全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、そしてFR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリンの定常領域（Fc）（代表的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域）の少なくとも一部分を最適に含む（Jonesら、Nature、321:522-525（1986）；Riechmannら、Nature、332:32

10

20

30

40

50

3-329 (1988) ; および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)) 。

【0137】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野において周知である。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からヒト化抗体に導入される1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基といわれ、これは、代表的には、「移入」可変ドメインから採取される。ヒト化は、基本的には、Winterおよび共同研究者らの方法 (Jonesら、Nature、321:522-525 (1986) ; Riechmannら、Nature、332:323-327 (1988) ; Verhoeyenら、Science、239:1534-1536 (1988)) に従って、げっ歯類CDRまたはCDR配列にヒト抗体の対応する配列を置換することによって、実行され得る。従って、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり (米国特許第4,816,567号)、ここでは、インタクトなヒト可変ドメインより実質的により少ないものか、非ヒト種由来の対応する配列によって置換された。実際には、ヒト化抗体は、代表的にはいくつかのCDR残基およびおそらくはいくつかのFR残基が、げっ歯類抗体中の類似の部位由来の残基によって置換されるヒト抗体である。

10

【0138】

ヒト抗体はまた、当該分野で公知の種々の技術 (ファージディスプレイライブラリーを含む) を使用して産生され得る (HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Biol.、227:381 (1991) ; Marksら、J. Mol. Biol.、222:581 (1991)) 。ColeらおよびBoernerらの技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である (Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁 (1985) ならびにBoernerら、J. Immunol.、147 (1) :86-95 (1991)) 。

20

【0139】

(4. 二重特異性抗体)

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原について結合特異性を有するモノクローナル (好ましくは、ヒトまたはヒト化) 抗体である。本場合、結合特異性の一方は、GFR α 3についてであり、他方は、任意の他の抗原について、および好ましくは、細胞表面タンパク質またはレセプターもしくはレセプターサブユニットについてである。

30

【0140】

二重特異性抗体を生成するための方法は、当該分野において公知である。古典的には、二重特異性抗体の組換え生成は、2つの免疫グロブリンの重鎖/軽鎖対の同時発現に基づき、この場合、2つの重鎖が異なる特異性を有する (MilsteinおよびCuello、Nature、305:537-539 (1983)) 。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の無作為な組み合わせのために、これらのハイブリドーマ (クアドローマ (quadromas)) は、10の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、それらの1つのみが正確な二重特異性構造を有する。正確な分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順が、WO 93/08829 (1993年5月13日公開) およびTraunckerら、EMBO. J.、10:3655-3659 (1991) に開示される。

40

【0141】

所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン (抗体-抗原結合部位) は、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合され得る。融合物は、好ましくは、免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり、これは、ヒンジ、CH2およびCH3領域の少なくとも部分を含む。融合物の少なくとも1つに存在する軽鎖の結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域 (CH1) を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、および所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別々の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物体に同時トランスフェクトされる。二重特異性抗体の生成のさらなる詳細については、例

50

えば、Sureshら、Methods in Enzymology、121:210 (1986)を参照のこと。

【0142】

(5. 異種結合体抗体)

異種結合体抗体もまた、本発明の範囲内にある。異種結合体抗体は、2つの共有結合された抗体で構成される。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を望まない細胞に対して標的化すること（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の処置（WO 91/00360；WO 92/200373；EP03089）について提唱されている。抗体は、合成タンパク質化学における公知の方法（架橋剤を包含する方法を含む）を使用してインビトロで調製され得ることが意図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエーテル結合を形成することによって構築され得る。この目的に対して適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチルー4-メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第4,676,980号に開示される試薬が挙げられる。

【0143】

(G. 抗GFR α 3抗体についての使用)

本発明の抗GFR α 3抗体は、種々の利用性を有する。例えば、抗GFR α 3抗体は、GFR α 3についての診断アッセイ（例えば、特定の細胞、組織または血清中のその発現を検出する）において使用され得る。当該分野において公知の種々の診断アッセイ技術（例えば、競合結合アッセイ、直接的もしくは間接的サンドイッチアッセイおよび異質相または同質相のいずれかにおいて行われる免疫沈降アッセイ）が使用され得る（Zola、Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques、CRC Press, Inc., (1987) 147-158頁）。診断アッセイにおいて使用される抗体は、検出可能な部分で標識され得る。検出可能な部分は、直接的かまたは間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得るべきである。例えば、検出可能な部分は、放射性同位元素（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、または ^{125}I ）、蛍光化合物または化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリン）、あるいは酵素（例えば、アルカリホスホターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る。当該分野において公知の、検出可能な部分と抗体とを結合体化させるための任意の方法（Hunterら、Nature、144:945 (1962)；Davidら、Biochemistry、13:1014 (1974)；Painら、J. Immunol. Meth., 40:219 (1981)；およびNygren、J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982)により記載される方法を含む）が、使用され得る。

【0144】

抗GFR α 3抗体はまた、組換え細胞培養物または天然の供給源からのGFR α 3のアフィニティー精製に有用である。このプロセスにおいて、GFR α 3に対する抗体は、当該分野で周知の方法を用いて適切な支持体（例えば、Sephadex樹脂または濾紙）上で固定化される。次いで、固定化抗体は、精製されるべきGFR α 3を含むサンプルと接触され、その後、その支持体は、GFR α 3を除くサンプル中の実質的に全ての物質を除去する適切な溶媒を用いて洗浄され、GFR α 3は固定化抗体に結合される。最終的に、その支持体は、GFR α 3を抗体から放出させるのに適切な別の溶媒を用いて、洗浄される。

【0145】

(H. リガンド誘導 α -サブユニット活性についてのアッセイ)

本発明の化合物および方法は、GFR α 3シグナル伝達を活性化するかまたは阻害する分子を検出するためのアッセイにおいて使用され得、そして実際は、リガンドまたは他のアゴニストによる活性化の際にホモ二量体化するかまたはホモオリゴ量体化する他の α -サブユニットレセプター分子（例えばGFR α 1、GFR α 2、GFR α 4）に適用され得る。このアッセイは、リガンド結合の際、 α -サブユニットレセプターがホモ二量体化、

またはホモオリゴ量体化し得るという驚くべき事実に基づく。そして、さらなることに、キナーゼ活性、好ましくはチロシンキナーゼ活性が可能なレセプタータンパク質キナーゼ細胞内ドメインに融合される場合、 α -サブユニットのこの二量体化は、キナーゼ活性（例えば、容易に検出可能な自己リン酸化）をもたらす。本明細書中の方法および構築物は、本明細書中に開示される1つのまたは別のGFR α サブユニットレセプターについて議論されているが、その方法は、 α -サブユニットレセプターファミリー（ α -サブユニットレセプターが、代表的には、リガンド活性化 α -サブユニットが β サブユニットに結合する際に活性化されるチロシンキナーゼ活性を含む、 β サブユニットを含む多サブユニットシグナル伝達複合体のリガンド結合パートナーである、ファミリー）において、任意の α -レセプターに容易に適用される。

10

【0146】

キナーゼ活性、および特にチロシンキナーゼ活性を測定する種々のアッセイが、開発されている。これらのアッセイのいくつかは、チロシンキナーゼ酵素が合成基質ポリペプチドをリン酸化する能力を測定する。例えば、ATPの γ -リン酸の適切なアクセプター基質への転移を触媒するキナーゼの能力を測定することによって、増殖因子刺激チロシンキナーゼ活性を測定するアッセイが開発されている。例えば、Pike, L., *Methods of Enzymology* 146:353-362 (1987) および Hunter, *Journal of Biological Chemistry* 257(9):4843-4848 (1982) を参照のこと。このアッセイにおいて、(γ - ^{32}P) ATPの使用は、リン酸化基質（これは、合成チロシンを含むペプチドである）の放射性標識を許容する。他にも、タンパク質キナーゼアッセイが記載されており、そこでは、チロシンキナーゼレセプター（例えば、EGFレセプター（Donatoら、*Cell Growth Differ.* 3:259-268 (1992) を参照のこと）、インスリンレセプター（Kasugaraら、*Journal of Biological Chemistry* 257(17):9891-9884 (1982) および Kasugaraら、*Methods in Enzymology* 109:609-621 (1985) を参照のこと）ならびに肝臓成長ホルモンレセプター（Wangら、*Journal of Biological Chemistry* 267(24):17390-17396 (1992) を参照のこと）への ^{32}P の取り込みが測定される。

20

【0147】

Rseまたは他のチロシンキナーゼドメインへの融合物を含む α レセプター構築物の構築、そのような構築物を発現するためのベクター、これらの構築物を発現するトランスフェクトされた宿主細胞または形質転換された宿主細胞、ならびに細胞表面でそれらの発現を増大するための手段は、例えば、GFR α 3の発現について本明細書中に記載されるような技術を用いて、当該分野で公知のように達成される。いくつかの特定の好ましい手段は、以下に提供される。

30

【0148】

（1. キナーゼレセプター活性化-KIRA）

本発明のアッセイの第1段階は、レセプター構築物のキナーゼドメインのリン酸化を包含し、ここで、そのレセプター構築物は、真核生物細胞の細胞膜に存在する。レセプター構築物は、細胞に形質転換され得るレセプター構築物（本明細書中に記載されるように）をコードする核酸由来であり得る。本発明の1つの実施態様において、レセプター構築物をコードする核酸は、細胞へ形質転換される。レセプターまたはレセプター構築物の核酸のいずれかを用いて細胞を形質転換するための好ましくかつ例示的な技術は、以下である。

40

【0149】

（a. 細胞の形質転換）

本発明は、インサイチュでの α -サブユニットレセプターの活性をより正確に反映すると考えられる範囲で、インビトロでの可溶性キナーゼレセプターアッセイを超える実質的な改善を提供する。レセプター構築物が、細胞膜において適切にそれ自体を集合させて、そしてなおアッセイのELISA段階において検出され得るキナーゼ活性を保持するように

50

、真核生物細胞をレセプター構築物（ α -サブユニットレセプターおよびキナーゼドメイン融合物、ならびに必要に応じてアミノ末端フラッグポリペプチドまたはカルボキシ末端フラッグポリペプチドのいずれかを含む）で形質転換することが可能であることが発見された。これは、リガンド結合の際にホモ二量体化するか、またはホモオリゴ量体化する目的の任意の α -サブユニットレセプターの、融合物のキナーゼアッセイを介した、リガンド結合活性を測定するための一般的なアッセイを提供する。

【0150】

本明細書中に記載されるような適切な捕捉薬剤が、選択されたレセプター構築物について入手可能である場合、細胞は、フラッグポリペプチドを有さない、レセプター構築物のみをコードする核酸で形質転換され得る。

10

【0151】

レセプター構築物をコードする核酸を提供するために、 α -サブユニットレセプターをコードする核酸は、その3'末端で、膜貫通ドメインを含むレセプターキナーゼ（好ましくはrPTK）の細胞内触媒性キナーゼドメインをコードする核酸に融合され、そして必要に応じてフラッグポリペプチドのN末端に融合される。あるいは、 α -サブユニットレセプターキナーゼドメイン融合物をコードする核酸は、その5'末端で、フラッグポリペプチドのカルボキシ末端をコードする核酸に融合される。従って、このフラッグポリペプチドは、レセプター構築物のカルボキシ末端またはアミノ末端のいずれかにおいて、提供される。適切なフラッグポリペプチドの例は、上記に提供される。他の適切なフラッグポリペプチドの選択は、本明細書中に記載の技術を用いて可能である。

20

【0152】

Rse. フラッグ試薬と目的の α -サブユニットレセプターとの間の融合を生ずるために、目的の α -サブユニットレセプターのECD（またはGPIアンカーマイナス改変体）をコードする核酸が、その3'末端で、Rse. フラッグ試薬のアミノ末端をコードする核酸に融合される。

【0153】

シグナル配列の発現ベクターへの組み込みは、レセプター構築物が、ECDが細胞の外部環境に直面するようにそれが位置するように、細胞膜へ輸送されなければならないため、必要とされる。従って、このような様式でレセプター構築物を配置するために適切なシグナル配列が使用される。このシグナル配列は、一般的に、ベクターの成分であるか、またはそのベクターに挿入されるレセプター構築物DNAの一部であり得る。異種のシグナル配列が用いられる場合、それは、宿主細胞により認識され、そしてプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される）配列由来である。

30

【0154】

（b. アッセイにおける使用のための細胞の選択）

上記のように、アッセイに供される細胞は、好ましくは、レセプター構築物で形質転換された細胞である。このアッセイにおける使用のための細胞の適合性が試験される。

【0155】

細胞株がレセプター構築物（フラッグポリペプチドを有さない）で形質転換される場合、細胞株がこのアッセイにおける使用のために適切か否かは、容易に発見され得る。第1の工程の際、レセプター構築物をコードする核酸の首尾良い形質転換および発現が決定される。米国特許第5,766,863号、またはその対応WO公開物（「キナーゼレセプター活性化アッセイ」と称される）に見出される戦略に従い得る。レセプター構築物のECDが細胞表面上に存在するか否かを同定するために、フローサイトメトリー分析が、 α -サブユニットレセプターのECDに対する抗体を用いて実施され得る。その抗体は、本明細書中で議論される抗体を産生するための技術を用いて作製され得る。フローサイトメトリー分析は、例えば、Current Protocols in Immunology, Coligenら編、Wiley publishers、第一巻および第二巻に記載される技術を用いて、実行され得る。手短には、フローサイトメトリー分析は、インタクトな細胞（レセプターを有する）をそのECDに対する抗体と共にインキュベートし、

40

50

続いて洗浄する工程を含む。次いで、抗体が結合した細胞が、蛍光色素に結合体化された種特異的抗-抗体抗体とインキュベートされる。洗浄後、標識化細胞は、ECDがその細胞表面上に存在するか否かを検出するために、蛍光活性化フローサイトメトリーにより分析される。

【0156】

以下の工程において、細胞結合レセプターが活性化される能力が試験される。これを決定するために、形質転換された細胞は、レセプターに対する公知のアゴニスト（例えば、内因性リガンドまたはそのレセプターのアゴニスト抗体）に曝露される。GFRA3の場合、天然リガンドは、アルテミン（artemin）である。曝露後、その細胞は、適切な緩衝液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水中のドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム；PBS中のSDS）中に溶解され、そして、以下に記載されるような抗ホスホチロシン抗体を用いてウェスタンブロッティングに供される：例えば、Wang、Molecular and Cellular Biology 5（12）：3640-3643（1985）；Glenneryら、Journal of Immunological Methods 109：277-285（1988）；Kamps、Methods in Enzymology 201：101-110（1991）；Kozmaら、Methods in Enzymology 201：28-43（1991）；Holmesら、Science 256：1205-10（1992）；またはCorfasら、PNAS, USA 90：1624-1628（1993）。

【0157】

ウェスタンブロッティング工程が、レセプター構築物が活性化され得ることを示すと仮定すると、KIRA ELISA試験の実行が、形質転換された細胞株がアッセイに用いられ得るか否かをさらに確立するために実施され得る。

【0158】

本発明の好ましい実施態様において、KIRA ELISAは、目的の任意の α -サブユニットレセプターがレセプター特異的試薬（すなわち、捕捉薬剤）の利用可能性に関わらず研究され得る範囲で、「一般的な」アッセイである。この実施態様は、そのレセプターのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにフラッグポリペプチドを有するレセプター構築物を使用する。

【0159】

フラッグポリペプチドがNH₂末端にて提供される場合（例えば、gD、trkA、BおよびCレセプター構築物）、このアッセイにおける使用のための形質転換された細胞株を選択するための手順は、上記の手順と類似している。この実施態様において、細胞は、本明細書中に先に記載されるように、フラッグポリペプチド-レセプター構築物で形質転換される。レセプターおよびフラッグポリペプチド（すなわち、本実施例中のレセプター構築物）の首尾良い形質転換が確認される。このことを研究するために、二次元フローサイトメトリー分析が、フラッグポリペプチドおよびレセプターのECDの両方に対する抗体を用いて実施され得る。二次元フローサイトメトリー分析についての技術は、Current Protocols in Immunology、前出に開示される。

【0160】

C末端フラッグポリペプチドを有するレセプター構築物で首尾良く形質転換された細胞はまた、このアッセイにおける使用に適切である。細胞の形質転換後、レセプターの首尾良い形質転換は、例えば、目的のレセプターのECDに対する抗体を使用したフローサイトメトリーによって決定される。フローサイトメトリー分析は、実質的に上記のように実行され得る。

【0161】

次いで、レセプター構築物全体（COOH末端フラッグポリペプチドを含む）の首尾良い形質転換が分析される。これは、細胞の溶解（本明細書中に開示される細胞の溶解についての技術を用いて）、および目的の α -サブユニットレセプターに対する抗体を用いた膜抽出物の免疫沈降によって達成され得る。次いで、この免疫沈降膜抽出物は、フラッグポ

リペプチドに特異的な抗体を用いたウェスタンブロット分析に供される。あるいは、抗フラッグポリペプチド捕捉膜溶解物の α -サブユニット特異的ELISA分析が、実行され得る。手短には、これは、適切なフラッグ特異的捕捉薬剤でELISAウェルをコーティングすることを包含する。このウェルを、ブロックし、洗浄し、次いで、溶解物をウェル中でインキュベートする。非結合レセプター構築物を、洗浄により除去する。次いで、このウェルを、HRPOに直接的にかまたは間接的に結合体化されたレセプター特異的抗体（単数または複数）と反応させる。このウェルを洗浄し、次いで、HRPOを色素生産性基質（例えばTMB）に曝露する。レセプター活性化の検出およびKIRA ELISA試験の実施は、基本的に上記の工程と同じである。

【0162】

一旦、有用な細胞が同定されると、それらを本願請求のアッセイのKIRA段階に供する。

【0163】

（c. 細胞での第1の固相のコーティング）

第1の固相（例えば、第1のアッセイプレートのウェル）を、先の章に従って形質転換された細胞で、コートする。

【0164】

好ましくは、付着細胞株は、細胞が第1の固相に天然に付着するように選択される。しかし、付着細胞株の使用は、必須ではない。例えば、非付着細胞（例えば、赤血球）が、例えばBecton Dickinson Labware、Lincoln Park、New Jerseyにより市販されるようなアッセイプレートの丸底ウェルに、添加され得る。次いで、このアッセイプレートをプレートキャリア中に配置し、それらのウェルの底に付着する細胞のペレットを作製するために遠心分離する。細胞培養物の上清を、ピペットを用いて除去する。従って、付着細胞の使用は、非付着細胞よりも明らかに有利である。なぜならば、それは、このアッセイにおける変動性を減少させるからである（すなわち、丸底ウェルのペレット中の細胞は、代替的な方法を用いる場合に、上清と共に採取され得る）。

【0165】

第1のアッセイプレートのウェルに添加される細胞を、組織培養フラスコ中に維持し得、そして約70%～90%のコンフルエントな細胞密度が達せられる場合に利用し得る。次いで、一般的に、1つの平底ウェルあたり、約 1×10^4 から 3×10^5 （および好ましくは $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ ）の間の細胞を、例えば、ピペットを用いて播種する。上記の細胞濃度の添加が、その前に細胞または細胞溶解物を濃縮または澄清化する必要なく、アッセイのELISA段階で測定されるレセプター構築物の活性化を可能にするのに十分であることが、予想に反して見出された。しばしば、細胞は、マイクロタイタープレートのウェル中に播種される前に培養培地で希釈され、所望の細胞密度にされる。

【0166】

通常、それらのウェルへの付着を最適化するのに充分であるが、細胞が悪化し始めるほど長すぎない時間で、細胞をマイクロタイタープレート中で培養する。従って、細胞が生理的に最適である温度で（通常約37℃）、約8～16時間のインキュベーションが好ましい。細胞の培養に適切な培地を、上記の第1A章に記載する。5%CO₂中の培養を推奨する。

【0167】

一晚のインキュベーション後、ウェルの上清をデカンテーションし、そして過剰の上清は吸着基材（例えば、ペーパータオル）を用いて、マイクロタイタープレートを軽くタンピングすることによりさらに除去され得るが、スポンジは同等に作用する。従って、実質的に均一な付着細胞層が、マイクロタイタープレートの個々のウェルの内部表面に残ったままである。次いで、これらの付着細胞を分析物に曝露する。

【0168】

（d. 分析物の調製および添加）

上記のように、分析物は、目的の α -サブユニットレセプターについてのアゴニストリガンド（もしくはアゴニストの疑いのある）またはアンタゴニスト（もしくはアンタゴニストの疑いのある）を含み得る。このリガンドは、内因性ポリペプチド、または合成分子（例えば、無機分子または有機分子）であり得る。通常、このリガンドは、ポリペプチドである。このアッセイは、目的の α -サブユニットレセプターを活性化する（または活性化を拮抗する）分子をスクリーニングするために有用である。従って、このアッセイは、治療学的に有効な分子の開発に使用され得る。

【0169】

リガンドがアゴニストである場合、分子は、ネイティブな増殖因子（例えば、アルテミン（artemin）、ニューツリン、GDNF、およびペルセフィン（persephin））を含み得る。これらの増殖因子の多くは市販されている。あるいは、増殖因子は、本明細書中に記載されるペプチド合成または組換え技術によって作製され得る。合成低分子アゴニストは、同様に、従来の化学合成技術を使用して、当業者によって作製され得る。好ましくは、1つは、アゴニスト抗体またはアンタゴニスト抗体についてアッセイすることである。

10

【0170】

リガンドが生物学的流体中に存在する場合、分析物は、当該分野で周知の技術を用いて調製され得る。血液または羊水のような体液を直接使用し得るが、濃縮液が要求され得る。試験されるべき分析物が特定の組織を含む場合、それらの細胞を、細胞培養物中で増殖し得、そして上清を分泌リガンドについて試験し得る。

20

【0171】

しばしば、そのリガンドは、水性希釈剤（例えば、細胞培養培地）に希釈され、その結果、標準曲線が作成され得る。しかし、そのリガンドは、細胞または細胞成分（例えば、細胞膜）において存在し得る。特に、そのアッセイを使用して、選択した細胞株の細胞膜においてリガンドの存在を検出し得ることが見い出された。これは、公知の α -サブユニットレセプターについて新規の内在性リガンドを発見することに明らかに有用である。

【0172】

例えば、このリガンド組成物を、ピペットを用いて、付着する細胞を含む各ウェルに添加する。少なくとも1つのコントロールウェル（例えば、そのリガンドに対する水性希釈剤が添加されたもの）がそのアッセイに含まれる。

30

【0173】

付着する細胞は通常、そのシグナルについて最適化するに十分な時間であるが、長すぎない期間刺激され、その結果、そのシグナルが、そのレセプターの内在性ホスファターゼによる脱リン酸化の結果として減少する。適切な刺激時間は、その細胞について生理的に最適な温度（通常約37℃）において、約10分～60分の間であり、好ましくは約30分である。

【0174】

活性化後、ウェルの上清をデカントし、次いでそのプレートを、吸収基質を軽く詰めて過剰の上清を除去し得る。

【0175】

このアッセイを使用して、目的のレセプターに対するアンタゴニストリガンドを検出し得る。アンタゴニストは、一般に、2つのカテゴリーに分類される：（a）そのレセプターに結合し、そしてそのことにより、そのレセプターに対するアゴニストによるそのレセプターの結合および／または活性化をブロックするもの（このアンタゴニストは、ECDに結合し得るが、これは、必ずしもそうであるとは限らない）、ならびに（b）そのアゴニストに結合し、従って、そのアゴニストによるレセプターの活性化を妨害するもの。

40

【0176】

上記カテゴリー（a）からアンタゴニスト分子を検出するために、その細胞を、上記に実質的に言及した疑いのあるアンタゴニストリガンドに対して曝露する。そのアンタゴニストへの曝露後、そのウェル上清をデカントし、そしてそのプレートを軽く叩く。次いで、

50

公知のアゴニスト（例えば、内因性増殖因子）を、前パラグラフにおいて実質的に記載したように洗浄した細胞に対して添加する。その後、ウェル上清をデカントし、そしてプレートを軽く叩く。あるいは、そのアンタゴニストおよびアゴニストの両方を含む組成物を、実質的に上記に記載のように付着する細胞へと添加し得る。続いて、そのレセプターの結合および／または活性化をブロックする、疑われるアンタゴニストの能力は、以下に議論されるように E L I S A によって測定され得る。

【0177】

上記カテゴリー（b）からアンタゴニスト分子を検出するために、公知のアゴニストを、そのアッセイの K I R A 段階の前に、疑われるアンタゴニストと予備インキュベートする。このインキュベーションを、アンタゴニストーアゴニストの複合体が形成することを可能にするに十分な期間のあいだ行う（例えば、30分～12時間）。次いで、この複合体を、複合体化していないアゴニストおよびアンタゴニストをコントロールとして使用したアッセイに供する。

10

【0178】

そのアゴニスト（および必要に応じてそのアンタゴニスト）リガンドへの曝露後、その細胞を、以下に記載のように溶解する。

【0179】

（e. 細胞の溶解）

そのアッセイのこの工程において、その細胞を、そのアッセイの E L I S A の段階について、活性化されたまま（すなわち、チロシン残基はリン酸化されたままである）であるように、そのレセプター構築物を可溶化するように溶解した。従って、この細胞を、上記のように、レセプター構築物を可溶化する働きをする溶解緩衝液を用いて溶解するが、なお、そのレセプター構築物を脱リン酸化も変性もさせない。

20

【0180】

マイクロタイタープレートを、上記のように使用する場合、約 75～200 μ l の溶解緩衝液を、各ウェルに添加する。次いで、このプレートを、プレートシェーカー（例えば、Bellco Instruments、Vineland, NJ により販売されるプレートシェーカー）を用いて、約 1～2 時間緩やかに振盪し得る。振盪は、室温で実施され得る。

【0181】

（2. 酵素結合イムノソルベント検定法－E L I S A）

このアッセイの第二段階は、第二のアッセイプレートにおいて実施されるサンドイッチ E L I S A を含む。この E L I S A を行うために、捕捉薬剤を調製する。

30

【0182】

（a. 捕捉薬剤の調製）

上記に言及したように、捕捉薬剤はしばしば、ポリクローナル抗体（通常、アフィニティー精製したポリクローナル抗体）またはモノクローナル抗体を含む。他の捕捉薬剤は、上記の定義の節において触れられそして説明されている。捕捉薬剤は、そのレセプター、またはそのフラッグポリペプチド（すなわち、抗原）のいずれかに特異的に結合する。

【0183】

抗原（そのレセプターまたはそのフラッグポリペプチドのいずれか）に対するポリクローナル抗体は、一般に、その抗原またはその抗原性フラグメント（しばしば、 α サブユニットレセプターの E C D）およびアジュバントの複数の皮下（s c）または腹腔内（i p）注射によって動物中で惹起される。その抗原またはその標的アミノ酸配列を含むフラグメントを、免疫されるべき種において免疫原性であるタンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン）に対して、二官能性薬剤または誘導体化薬剤を用いて、結合体化させることは有用であり得る。

40

【0184】

宿主動物またはそれから培養される抗体産生細胞に対して免疫原を投与するための経路およびスケジュールは、一般的に、抗体の刺激および産生について確立され、そして慣用さ

50

れる技術を用いて維持する。マウスは、しばしば、試験モデルとして使用されるが、任意の哺乳動物被験体（ヒト被験体またはそれから得られた抗体産生細胞を含む）を、本発明のプロセスに従って操作して、哺乳動物（ヒト、ハイブリッド細胞株を含む）の産生のための基礎として作用させ得ることが意図される。

【0185】

動物を、代表的に、免疫原性結合体または誘導体に対して、1 mg または 1 μ g の結合体（それぞれ、ウサギまたはマウスに対して）を、3 容量のフロイント完全アジュバントと組み合わせること、および複数部位で溶液を皮内に注射することによって免疫する。1 ヶ月後、その動物を、フロイント完全アジュバント（または、他の適切なアジュバント）中で、結合体のもとの量の 1/5 ~ 1/10 の量で、複数の部位での皮下注射によって、追加免疫する。7 ~ 14 日後に動物から採血し、そしてその血清を、抗抗原力価についてアッセイする。動物を、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、その動物を、同一の抗原ではあるが異なるタンパク質とおよび／または異なる架橋剤を介して結合体化されている結合体を用いて追加免疫する。結合体をまた、組換え細胞培養物中で、タンパク質融合体として作製し得る。また、凝固剤（例えば、ミョウバン）を使用して、免疫応答を増強する。

【0186】

免疫後、モノクローナル抗体を、免疫した動物から免疫細胞（代表的には、脾臓細胞またはリンパ節組織からのリンパ球）を回収すること、およびその細胞を、従来の様式（例えば、ミエローマ細胞との融合またはエプスタインバーウイルス（EB）ウイルスでの形質転換による）不死化すること、および所望の抗体を産生するクローンについてスクリーニングすることによって調製し得る。Kohler および Milstein, Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976) によってもともと記載され、そしてまた、Hammerling ら, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y. 563 ~ 681 頁 (1981) に記載されるハイブリドーマ技術は、多数の特定の抗原に対して高レベルのモノクローナル抗体を分泌するハイブリッド細胞株を産生するために広汎に適用されている。

【0187】

ある種の細胞と、別の種の細胞とを融合させることも可能である。しかし、免疫された抗体産生細胞およびミエローマの供給源は、同じ種由来であることが好ましい。

【0188】

ハイブリッド細胞株を、細胞培養培地中での培養物において維持し得る。本発明の細胞株は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン（HAT）培地において連続的な細胞株を含む組成物中で選択および／または維持され得る。事実、一旦、そのハイブリドーマ細胞株が確立されると、これは、種々の栄養的に適切な培地において維持され得る。さらに、ハイブリッド細胞株は、かなり多数の慣用的な方法において貯蔵および保存され得る。これには、凍結および液体窒素下での貯蔵が含まれる。凍結細胞株は、モノクローナル抗体の再開された合成および分泌によって無限に再生および培養され得る。

【0189】

分泌された抗体は、沈降、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などのような従来の方法によって組織培養上清から回収される。本明細書において記載される抗体はまた、事情が許せば、IgG または IgM の精製のため従来の方法によって、ハイブリドーマ細胞培養物から回収される。これらの従来の方法は、プールした血漿からこれらの免疫グロブリンを精製するためにこれまで使用されてきた（例えば、エタノール沈降手順またはポリエチレングリコール沈降手順）。次いで、精製した抗体を、濾過滅菌する。この抗体がポリクローナル抗体である場合、一般に、目的の抗原から実質的に特異的な捕捉抗体を提供するように生成したアフィニティークラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーには、通常、他の精製技術（例えば、液体クロマトグラフィー）が先行する。

【0190】

さらなる実施態様において、抗体または抗体フラグメントは、McCaffertyら、Nature, 348: 552-554 (1990)に記載される技術を介して、フラッグポリペプチド、 α サブユニットレセプター、またはそれらのフラグメントを用いて生成した抗体ファージライブラリーから単離して、適切な抗体または抗体フラグメントを選択し得る。Clacksonら、Nature 352: 624-628 (1991)およびMarksら、J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)は、それぞれ、ファージライブラリーを用いるマウスおよびヒトの抗体の単離を記載する。後続の刊行物は、鎖シャフリング(Markら、Bio/Technol. 10: 779-783 (1992))による高親和性(nM範囲)のヒト抗体の産生、ならびに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としての組合せ感染およびインビボ組換え(Waterhouseら、Nuc. Acids Res. 21: 2265-2266 (1993))を記載する。従って、これらの技術は、本発明に包含される「モノクローナル」抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な代替である。

10

【0191】

本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に対して特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)容易に単離および配列決定される。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源として働く。一旦単離されると、このDNAは、発現ベクターに配置され得、次いで、これを、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を生成しないミエローマ細胞のような宿主細胞へとトランスフェクトされて、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得る。このDNAはまた、例えば、相同性マウス配列の代わりにヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメインをコードする配列を置換すること(Morrisonら、Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 (1984))、または非免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列のすべてまたは部分を、免疫グロブリンコード配列に共有結合させることによって、改変され得る。この様式で、本明細書中の抗レセプターまたは抗フラッグポリペプチドのモノクローナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体を調製する。従って、この抗体は、組換えDNA方法(Cabillyら、米国特許第4, 816, 567号)によって作製され得る。

20

30

【0192】

捕捉薬剤の結合は、そのレセプターに結合したリガンドの存在または非存在によっては影響されず、そしてその捕捉薬剤は、抗ホスホチロシン抗体によってリン酸化されたチロシンへの接近を、立体的にブロックしない。さらに、この捕捉薬剤は、当然、目的のレセプターを活性化しない。

【0193】

第一に、一旦、捕捉薬剤(例えば、抗体またはストレプトアビジン)が選択されると、レセプターまたはフラッグポリペプチドのいずれかへの結合(ここで、レセプター構築物は、そのアッセイにおいて使用される)が確認される。これは、例えば、フローサイトメトリ分析、免疫沈降または抗原コーティングELISAによって決定され得る。フローサイトメトリ分析は上記に記載されている。免疫沈降は、通常、適切な緩衝液(例えば、PBS)中の非イオン性界面活性剤(例えば、0.5% Triton X-100)中で、その細胞(レセプター構築物を有する)を溶解することを包含し、次いでこのようにして得られたこの細胞溶解物は、潜在的な抗レセプターまたは抗フラッグポリペプチド捕捉薬剤とインキュベートされる。免疫複合体は、(a)その免疫複合体の沈降を増強するポリエチレングリコール(PEG)の存在下での抗捕捉薬剤抗体を用いるか、または(b)不溶性の(例えば、アガロース結合)プロテインAまたはプロテインGのいずれかを用いて、沈降される。次いで、免疫沈降した物質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって分析される。抗原コーティングELISAについて、ELISAウェルは、

40

50

精製したレセプター、精製したフラッグポリペプチド、または精製したレセプター構築物のいずれかを用いて一晩コーティングされる。次いで、このコーティングウェルは、潜在的な捕捉薬剤に対して曝露され、そしてHRPO結合体化された種特異的な抗捕捉薬剤抗体を用いてスクリーニングされる。

【0194】

この捕捉薬剤が、そのレセプターに対するリガンドの存在下でそのレセプターまたはフラッグポリペプチドに結合する能力もまた、確認される。これは、そのレセプター構築物を、そのレセプターに対する公知のリガンド（例えば、内因性増殖因子またはそれに対するアゴニスト抗体）とともにインキュベートすることによって分析され得る。次いで、フローサイトメトリ分析、免疫沈降法、または抗原コーティングELISAが、上記に実質的に記載されるように実施されて、その捕捉薬剤の結合が調査され得る。

10

【0195】

この捕捉薬剤が、上記の2工程によって決定される場合に適切であると仮定すると、次いで、その捕捉薬剤は、細胞溶解の前または後のいずれかでレセプター活性化（すなわち、自己リン酸化）を誘導しないことが示される。従って、その細胞結合レセプター構築物は、潜在的な捕捉薬剤またはネガティブコントロール（例えば、そのレセプターを活性化しないコントロール抗体）のいずれかに曝露される。細胞溶解後、そのレセプター構築物は、標識された抗ホスホチロシン抗体を用いたウェスタンブロット分析に供される。例えば、Glenneryら、Journal of Immunological Methods 109:277-285 (1988); Kamps, Methods in Enzymology 201:101-110 (1991); Kozmaら、Methods in Enzymology 201:28-43 (1991); またはHolmesら、Science 256:1205-10 (1992)を参照のこと。その捕捉薬剤が細胞溶解後にレセプター活性化を誘導するか否かを確立するために、KIRA ELISA（上記のようなその捕捉薬剤およびネガティブコントロールの両方を用いた）の試行が行われ得る。

20

【0196】

最後に、抗ホスホチロシン抗体（例えば、ビオチン化抗ホスホチロシン抗体）が、潜在的な捕捉薬剤の存在下で活性化レセプターを結合する能力は、本明細書において開示したKIRA ELISAにおける試行によって確認される。

30

【0197】

その捕捉薬剤が、上記に特定した基準の全てを満たすと仮定すると、KIRA ELISAにおける使用のための良好な潜在性を有する。

【0198】

一旦適切な捕捉薬剤が調製されると、第二の固相がそれでコーティングされる。約0.1 $\mu\text{g/ml}$ ~ 10 $\mu\text{g/ml}$ の間の捕捉薬剤は、例えば、ピペットを使用して第二のアクセイプレートの各ウェルに添加され得る。捕捉薬剤は、しばしば、高pH（例えば、約7.5 ~ 9.6）の緩衝液中に提供され、その結果、それは、増加した全体の荷電を有し、そしてそれゆえ、その第二のアクセイプレートへの結合の増加を示す。通常、その捕捉薬剤は、約8 ~ 72時間の間にわたってウェル中でインキュベートされて、捕捉薬剤の十分なコーティングがそのウェルの内側の壁上で形成されることを可能にする。このインキュベーションは、一般に、低温（例えば、約3 ~ 8℃）で行われて、捕捉薬剤の分解を回避または減少させる。

40

【0199】

インキュベーション後、そのプレートのウェルをデカントし、そして吸着基質を軽く詰める。次いで、非特異的結合をブロックする。これを達成するために、ブロック緩衝液をウェルに添加する。例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)を含むブロック緩衝液（例えば、Intergen Company Purchase、NYによって販売されるもの）が適切である。約100 ~ 200 μl の間のブロック緩衝液の各ウェルへの添加に続く室温での1 ~ 2時間の間の緩和の振盪が、非特異的な結合をブロックするのに充分である

50

ことが見出されている。また、第二のアッセイプレートではなく以前の工程において得られた細胞溶解物に直接ブロック緩衝液を添加することも可能である。

【0200】

この後、捕捉薬剤コートプレートを何回か洗浄緩衝液で洗浄する（通常、約3～8回）。この洗浄緩衝液は、例えば、リン酸緩衝化生理緩衝液（PBS）、pH7.0～7.5を含み得る。しかし、他の洗浄緩衝液もまた利用可能であり、これもまた、使用され得る。簡便には、自動プレート洗浄器（例えば、Scan Washer 300（Skatron Instruments、Inc.、Sterling、VA）がこれに使用され得、そして他のものがそのアッセイの洗浄工程に使用され得る。

【0201】

（B. チロシンリン酸化の測定）

次いで、活性化し、可溶化されたレセプター構築物を、それに付着する捕捉薬剤を有するウェルに添加する。一般的な提唱として、上記の節において言及したように得られた約80%の細胞溶解物を各ウェルに添加し得る（すなわち、そのウェルのもとの容量に依存して約60～160 μ l）。この溶解物を、適切な期間、捕捉薬剤とともにインキュベートして、レセプター構築物がそのウェルにおいて捕捉されることを可能にする（例えば、1～3時間）。インキュベーションは、室温で実施され得る。

【0202】

次いで、結合していない細胞溶解物を、洗浄緩衝液で洗浄することによって除く。この洗浄工程後、以前に添加したブロック緩衝液の量と等量、またはそれ未満の量の抗ホスホチロシン抗体を各ウェルに添加する。例えば、約0.3～0.5 μ g/mlの抗体を適切な緩衝液中に有する約50～200 μ lの抗ホスホチロシン抗体調製物を（例えば、溶解緩衝液中に含まれるもののような界面活性剤を有するPBS）、そのウェルに添加する。これにつづいて、洗浄工程を行って、結合していない抗ホスホチロシン抗体を除く。

【0203】

次いで、チロシンリン酸化は、第二固相への抗ホスホチロシン抗体結合の量によって定量される。抗体の存在を検出するための多くの系が当業者に利用可能である。いくつかの例を続ける。

【0204】

一般に、抗ホスホチロシン抗体は、検出可能な標識で直接的または間接的のいずれかで標識される。一般に以下のカテゴリーにグループ分けされ得る多くの標識が利用可能である：

（a）放射性同位体（例えば、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H および ^{131}I ）。この抗体は、例えば、Current Protocols in Immunology、前出に記載される技術を用いて放射性同位体を用いて標識され得、そして放射能はシンチレーション計数を使用して測定され得る。

【0205】

（b）蛍光標識（例えば、希土類キレート（ユーロピウムキレート）またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリン、およびテキサスレッドが利用可能である。この蛍光標識は、例えば、Current Protocols in Immunology、前出に開示される技術を用いて抗体と結合体化され得る。蛍光は、蛍光測定器（Dynatech）を用いて定量され得る。

【0206】

（c）種々の酵素基質標識が利用可能であり、そして米国特許第4,275,149号は、それらのいくつかの概説を提供する。酵素は、一般的に、色素原性基質の化学変化を触媒し、その変化は、種々の技術を用いて測定され得る。例えば、その酵素は、基質における色の変化を触媒し得、これは、分光光度的に測定され得る。あるいは、その酵素は、その基質の蛍光または化学発光を変化させ得る。蛍光の変化を定量するための技術は上記に記載されている。化学発光基質は、化学反応によって電氣的に励起され、次いで、これは

10

20

30

40

50

、測定され得る（例えば、Dynatech ML3000化学発光測定器を使用して）光を発光し得るか、または蛍光アクセプタへエネルギーを付与する。酵素標識の例は、ルシフェラーゼ（例えば、蛍光ルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、マレイン酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO））、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ）、複素環オキシダーゼ（例えば、ウレアーゼおよびキサンチンオキシダーゼ）、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどを含む。酵素を抗体と結合体化するための技術は、O'Sullivanら、Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, Methods in Enzym. (J. LangoneおよびH. Van Vunakis編)、Academic press, New York, 73:147-166 (1981) および Current Protocols in Immunology、前出に記載される。

10

【0207】

酵素-基質の組合せの例は、例えば、以下を含む：

(i) 基質として水素ペルオキシダーゼを用いる西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）、ここでこの水素ペルオキシダーゼは、色素前駆体（例えば、オルトフェニレンジアミン（OPD））または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンヒドロクロリド（TMB））を酸化する。

20

【0208】

(ii) 色素原基質としてパラニトロフェニルリン酸塩を用いるアルカリホスファターゼ（AP）

(iii) 色素原基質（例えば、p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシダーゼ）または蛍光原性基質（4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシダーゼ）を用いる β -D-ガラクトシダーゼ（ β -D-Gal）

多くの他の酵素-基質の組合せは当業者に利用可能である。これらの一般的な概説については、米国特許第4,275,149号および同第4,318,980号を参照のこと。

30

【0209】

ときに、その標識は、その抗体と間接的に結合体化される。当業者は、これを達成するための種々の技術を知っている。例えば、その抗体は、ビオチンと結合体化され得、そして上記に言及した3つの広汎なカテゴリーの標識のいずれかが、アビジンと結合体化され得、またはその逆をなされ得る。ビオチンは、選択的にアビジンに結合し、そして従って、その標識は、この間接的な様式でその抗体と結合体化され得る。ビオチン-アビジン結合体に関する技術の総説については、Current Protocols in Immunology、前出を参照のこと。あるいは、この標識の抗体との間接的な結合体化を達成するために、その抗体は、小さなハプテン（例えば、ジゴキシン）と結合体化される。そして、上記において言及した標識の異なる型のいずれか一つが、抗ハプテン抗体と結合体化される（例えば、抗ジゴキシン抗体）。従って、この標識の抗体との間接的な結合体化が達成され得る。

40

【0210】

本発明の別の実施態様において、抗ホスホチロシン抗体は、標識される必要がない。そして、その存在は、標識抗-抗ホスホチロシン抗体（例えば、HRPOと結合体化した抗マウス抗ホスホチロシン抗体）を使用して検出され得る。

【0211】

好ましい実施態様において、抗ホスホチロシン抗体は、酵素標識で標識される。この酵素標識は、基質（例えば、テトラメチルベンズイミジン（TMB）またはオルトフェニレンジアミン（OPD））の色の変化を触媒する。従って、放射性物質の使用が回避される。

50

試薬の色の変化は、適切な波長で分光光度的に決定され得る（例えば、TMBについて450nm、およびOPDについて490nm、ここで参照波長は、650nmである）。

【0212】

（3．細胞内キナーゼ活性）

本明細書中に記載されるアッセイはまた、 α サブユニットレセプターに融合された細胞内キナーゼドメイン（例えば、細胞質チロシンキナーゼおよび／または細胞質セリンスレオニンキナーゼを形成する）のリン酸化および／または活性化を測定することによって、使用される。これらの分子のリン酸化は、キナーゼレセプターまたは「レセプター複合体」（これは、細胞膜に存在する1以上のキナーゼレセプターを含む）による細胞内キナーゼドメインのトランスリン酸化の結果として生じ得る。細胞内チロシンキナーゼの例としては、例えば、インスリンレセプター基質（IRS-1）、Shc、RasおよびGRB2が挙げられる。ヒトShc、ヒトRasおよびGRB2に対する抗体は、UBI、NYから商業的に入手され得る。これは、これらのチロシンキナーゼについての捕捉薬剤として使用され得る。細胞内セリンスレオニンキナーゼの例としては、MEKおよびMAPKが挙げられる。

10

【0213】

これらのキナーゼからの触媒ドメインを含むレセプター構築物のリン酸化を測定するためには、その手順は、本質的に上記されているとおりであり、キメラは、「キナーゼ構築物」と称される。一般に、真核細胞生物は、キナーゼ構築物をコードする核酸を用いて形質転換される。この核酸の発現の際に、このキナーゼ構築物は、細胞内（すなわち、細胞質）に存在する。キナーゼ構築物を含む細胞は、上記のKIRAに供される。このアゴニストへの曝露は、細胞内キナーゼ構築物のトランスリン酸化を生じ得、これは、上記で詳説するようにELISAにおいて定量され得る。ELISA中の捕捉薬剤は、細胞内キナーゼ構築物またはフラッグポリペプチドのいずれかへ結合する。

20

【0214】

（4．セリンスレオニンキナーゼ活性）

このアッセイは、 α サブユニットレセプターに融合されたセリンスレオニンキナーゼICDドメインのリン酸化および／または活性化について測定することによってさらに使用される。用語「セリンスレオニンキナーゼ」とは、少なくとも1つのホスフェート受容アルコール基を有する基質をリン酸化するキナーゼをいう。セリンスレオニンキナーゼは、それが、リガンド結合性ECD、TMドメインおよびICDを有する限り通常「レセプター」である。ICDは、通常、触媒キナーゼドメインを含み、そして一般に、1つ以上のホスフェート受容セリンおよび／またはスレオニンの残基を有する。細胞内セリンスレオニンキナーゼの例としては、MEKおよびMAPKが挙げられる。細胞内セリンスレオニンキナーゼのリン酸化を測定することは、本明細書に記載されるようになされ得る。レセプター構築物を作製するための融合について適切なICDドメインを提供し得るセリンスレオニンキナーゼレセプターの例は、daf-1、アクチビンII型レセプター（ActR-II）、アクチビンIIB型レセプター（ActR-IIB）、TGF- β II型レセプター（T β R-II）、アクチビンレセプター様キナーゼ（ALK）-1、ALK-2、ALK-3、ALK-4、およびTGF- β I型レセプター（T β R-1）／ALK-5を含む。ten Dijkeら、前出を参照のこと。セリンスレオニンキナーゼアッセイは、上記においてチロシンキナーゼについて記載したものと、リン酸が抗ホスホセリン抗体および／または抗ホスホスレオニン抗体を用いて定量されることを除いて本質的に同じである。抗ホスホセリンモノクローナル抗体および抗ホスホスレオニンモノクローナル抗体は、例えば、Sigma Immuno Chemicals, St. Louis、MOから購入され得る。

30

40

【0215】

（5．ホスファターゼ活性）

ホスファターゼ活性は、同様に、本明細書中上記に記載したアッセイを用いて測定され得る。ホスファターゼ酵素は、リン酸化したチロシン、セリンおよび／またはスレオニンの

50

残基を脱リン酸化し得る（すなわち、そのようなアミノ酸残基のリン酸エステルから無機ホスフェートを遊離し得る）。一般に、ホスファターゼ酵素は、チロシン残基またはセリンスレオニン残基のいずれかについて特異的であるが、ときには、チロシン、セリンおよびスレオニンの残基を脱リン酸化し得る。時に、「内因性」ホスファターゼ活性が測定され、そしてこれを、選択される細胞において天然に存在するホスファターゼ酵素の活性と呼ぶ。内因性ホスファターゼ活性を定量するために、少なくとも1つホスファターゼを有する細胞は、1以上のホスファターゼインヒビターの存在下および非存在下で刺激される。タンパク質チロシンホスファターゼ（PTPase）インヒビターの例としては、オルトバナジン酸ナトリウム、およびモリブデン酸ナトリウム（Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO）が挙げられる。ICN Biochemicalsは、オカダ酸を供給する。このオカダ酸は、セリンスレオニンホスファターゼのインヒビターである。一般的な提唱として、約1～10 μ Mの間のホスファターゼインヒビターがそのアッセイプレートの各ウェルに添加され得る。他の全ての面において、このアッセイは、本質的に上記に記載したとおりに実施される。従って、内因性ホスファターゼが、選択される細胞においてキナーゼを脱リン酸化する能力が定量され得る。

【0216】

好ましい実施態様において、目的のホスファターゼ酵素が研究され得る。タンパク質チロシンホスファターゼ（PTPase）の例としては、PTP1B、PTPMEG、PTP1c、Yop51、VH1、cdc25、CD45、HLAR、PTP18、HPTP α 、およびDPTP10Dが挙げられる。ZhangおよびDixon、Adv. Enzym. 68:1-36（1994）を参照のこと。タンパク質セリンスレオニンホスファターゼの例としては、PP1、PP2A、PP2BおよびPP2Cが挙げられる。Meth. Enzym. HunterおよびSefton編、Academic press、New York、201:389-398（1991）を参照のこと。これらのタンパク質は、市販され得るか、または本明細書に記載の組換え技術を使用して作製され得る。ホスファターゼ活性を測定するために、KIRA ELISAは、上記に本質的に記載のように、以下の改変を伴って実施され得る。キナーゼまたはキナーゼ構築物（例えば、レセプター構築物）の第二の固相への捕捉および洗浄工程（結合していない細胞溶解物を除去するために）の後に、目的のホスファターゼを、第二のアッセイプレートのウェルに添加し、そして付着するキナーゼまたはキナーゼ構築物とともにインキュベートする。例えば、適切な希釈緩衝液（Meth. Enzym. HunterおよびSefton編、Academic press、New York、201:416-440（1991）を参照のこと）中にある約50～200 μ lの間のホスファターゼが各ウェルに添加され得る。この後に、一般に、室温（または37℃）で約30分から2時間の間にわたる緩和の振盪を行って、そのホスファターゼにそのキナーゼを脱リン酸化させる。洗浄してそのホスファターゼを除いた後、コントロール（すなわち、ホスファターゼの添加なし）に比してそのキナーゼの減少した程度のリン酸化は、本明細書において上記に記載したようにELISAによって定量される。

【0217】

（6. キット）

簡便さのために、試薬は、その分析物が目的の α サブユニットレセプターを活性化するかまたは活性化を妨害する能力をアッセイするにおいてその分析物と組合せるために、キット（すなわち、試薬の包装された組合せ）中で提供され得る。このキットの成分は、所定の比率で提供される。従って、キットは、アッセイのための特定の第二の固相および抗フラッグポリペプチド捕捉薬剤（別個に包装されるか、または第二の固相（例えば、マイクロタイタープレート）へ捕捉されているかのいずれか）を含む。通常、他の試薬（例えば、酵素標識で直接または間接的に標識された抗ホスチロシン抗体）もまた、そのキット中に提供される。検出可能な標識が酵素である場合、そのキットは、基質およびその酵素が必要とする補因子（例えば、検出可能な発色団または発蛍光団を提供する基質前駆体）を含む。さらに、他の添加物（例えば、安定化剤、緩衝剤（例えば、ブロック緩衝液およ

び溶解緩衝液) など) もまた含まれ得る。簡便には、このキットはまた、そのレセプター構築物で形質転換した均質な集団の細胞を供給し得る。相対的な量の種々の試薬が試薬の溶液における濃度を提供するために広汎に変動され得、これは、実質的にそのアッセイの感受性を最適化する。特に、その試薬は、乾燥粉末(通常凍結乾燥される)(これは、溶解すると、適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む)として提供され得る。このキットはまた、適切には、K I R A E L I S Aを実施するための指示書を含む。

【0218】

(7. アッセイのための使用)

本出願は、信頼の高い、高感度な、そして定量的なキナーゼ活性化の検出のために有用である2つのアッセイを提供する。キナーゼ活性化は、ホモダイマー化またはホモオリゴマー化によって生じる α サブユニットレセプターによるリガンド結合を反映する。本明細書において記載される所望の特性を有するレセプター特異的な捕捉抗体が利用可能であるか、または調製されている場合、第一のアッセイが使用され得る。第二のアッセイは、任意のレセプター構築物の活性化がフラッグポリペプチドおよびそれに特異的に結合する捕捉薬剤の使用を介して測定されることを可能にする包括的なアッセイである。

10

【0219】

これらのアッセイは、選択されるレセプターについて新規のアゴニスト/アンタゴニストを同定するために有用である。また、このアッセイは、リガンド-レセプター相互作用を研究するため(すなわち、力学的研究)の手段を提供する。また、内因性レセプターの選択される細胞株における存在は、そのアッセイを使用して定量され得る。そのアッセイは、さらに、生物学的なサンプルにおいて選択されるレセプターについてのリガンドの存在を同定するために、および例えば、増殖因子が精製手順に従って単離されたか否かを確立するために、有用である。これらの増殖因子がそれらのそれぞれのレセプターを活性化する能力を測定するためのアッセイを有することが所望される。

20

【0220】

このアッセイはまた、ヒトから採取した生物学的サンプル中で選択されるレセプター(例えば、GFR α 3レセプター)についてのリガンドの存在を検出するための臨床適用を有する。従って、上昇または下降したレベルのリガンドを有する患者が同定され得る。これは、上昇または下降したレベルのリガンドが病因の状態を生じる場合に特に所望される。従って、選択されるリガンド(例えば、インスリン)の投与のための候補は、この診断方法を通じて同定され得る。本明細書において開示したアッセイを用いて、患者に投与したアゴニストまたはアンタゴニストのpKをアッセイすることが可能である。このアッセイはまた、生物学的なサンプルにおいて隠れたレセプターの検出を容易にする。

30

【0221】

このアッセイはまた、内因性ホスファターゼのホスファターゼの活性、または好ましい実施態様においては目的のホスファターゼを定量するために有用である。これは、例えば、ホスファターゼインヒビターをスクリーニングするために使用され得る。

【0222】

以下の実施例は、例示的な目的のみに提供される。そして、いかなる方法においても本発明の範囲を制限することを意図しない。本明細書において引用したすべての特許文献および刊行物文献は、本明細書において参考としてその全体が援用される。

40

【0223】

(実施例)

実施例において言及される市販の試薬は、特に言及しない限り、製造業者の指示に従って使用した。以下の実施例においておよび本明細書を通して、ATCC受託番号によって示されるそれらの細胞の供給源は、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville、Marylandである。

【0224】

(実施例1: マウスGFR α 3のクローニング)

ニューツリン(neurturin)レセプター(現在では、GFR α 2(「神経膠細胞

50

株由来神経栄養因子ファミリーレセプター α 」として知られる)からの配列を用いて、GFR α ファミリーの新規の潜在的なメンバーを、公の遺伝子データベース中でマウスESTとして同定した(受託番号、W99197(配列番号1)、AA041935(配列番号2)、およびAA050083(配列番号3))。この潜在的に新しいレセプターに対応するDNAフラグメントを、マウスE15 cDNA(Clontech、Inc. USA)を、テンプレートとして、およびマウスESTに由来するPCRプライマーを用いたMarathon PCRによって得た。次いで、このPCR産物を用いて、 λ gt10マウスE15ライブラリー(Clontech、Inc. USA)をスクリーニングして、全長クローンを得た。この全長マウスcDNAのヌクレオチド配列を、配列番号4に提供する(図1A~1B)。単離されたDNAによってコードされるタンパク質配列(配列番号5;図1A~1Bを参照のこと)を、GFR α 3と命名した。なぜなら、これは、GFR α 1(以前は、GDNFレセプター α)およびGFR α 2(以前は、ニューツリンレセプター α ;NTNR α)と配列同一性を有する新規なタンパク質であると決定されたからである。397アミノ酸のマウスGFR α 3タンパク質配列(配列番号5)の、ラットGFR α 1(配列番号8)およびラットGFR α 2(配列番号9)との比較を、図2に提供する。mGFR α 3配列は、GFRレセプターファミリーに属するホモログの新規なシリーズを同定すると考えられる。潜在的なN結合型グリコシル化部位が図2に斜線で示される。GPIアンカーに参与する疎水性配列を、図2に上書きする。潜在的なGPI結合部位を、アステリスクで示す。マウスGFR α 3 DNAの改変体は、図1Aにおける290位にて「T」塩基の欠失を含み、これは、フレームシフトおよび短縮型タンパク質改変体を生じる。それにもかかわらず、改変体DNAは、ハイブリダイゼーション、診断、および本明細書を通じて議論されるDNAの他の使用(全長タンパク質産生を除く)について有用である。この塩基のすぐ上流のGFR α 3コード領域を含むDNA(89位~289位)は、本発明における使用を見出す。直ぐ下流(291~1279)の配列を含むDNAは、本発明の別の有用な実施態様を提供する。

【0225】

マウスGFR α 3をコードするDNAを用いたインサイチュハイブリダイゼーション研究によって、末梢感覚ニューロンおよび交感神経ニューロンにおける発現のパターンが示された(データは示さず)。

【0226】

(実施例2:ヒトGFR α 3をコードするcDNAクローンの単離)

この新しいレセプターのヒトホモログが、存在し得るか否かを迅速に同定するために、発現配列タグ(EST)DNAデータベース(専有的ESTデータベース、LIFESeqTM、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto、CA)を検索し、そしてEST(INC3574209)は、以下の配列を有すると同定された:

【0227】

【化1】

```
GCGCTGNNTGNCNGNANGNGGGGGCGGGAGGTGCCGGTCGAGGGAGCCCCGCTCTCAGAG
CTCCAGGGGAGGAGCGANGGGAGCGCGGAGCCCGGCCCTACAGCTCGCCATGGTGCGC
CCCCTGAACCCGCGACCGCTGCCGCCCCGTAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNGCCTCTCGCAGCCGGAGACCCCTTCCACAGAAAGCCGACTCATGAACAGC
TGTCTCCAGGCCAGGAGGAAGTGCCAGGCTGATCCACCTGC (配列番号 10)
```

【0228】

この配列は、マウスGFR α 3と61%の同一性を有した。

【0229】

対応する全長cDNAをクローニングするために、cDNAライブラリーのパネルを、以下のプライマーを使用してスクリーニングした:

【0230】

【化2】

newa3.F 5' GCC TCT CGC AGC CGG AGA CC 3' (配列番号 11)

newa3.R 5' CAG GTG GGA TCA GCC TGG CAC 3' (配列番号 12)

【0231】

このライブラリーからのDNAを、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology (1995) のとおりに、そのPCRプライマー対を用いるPCR増幅によってスクリーニングした。

10

強力なPCR産物を、分析したすべてのライブラリー中に同定した（胎児肺、胎児腎臓、および胎盤）。

【0232】

このタンパク質をコードするcDNAクローンを単離するために、ヒト胎児肺pRK5ベクターライブラリーを、newa3.Rプライマーを用いる乳房／肛門（dug-/bung-）宿主中で増殖させたプラスミドライブラリーからの一本鎖DNAの伸長によって陽性cDNAクローンについて選択し、そして富化した。cDNAライブラリーの構築のためのRNAを、ヒト胎児肺組織から単離した。cDNAクローンを単離するために使用したcDNAライブラリーを、市販の試薬（例えば、Invitrogen、San Diego、CA；Clontechなど）を用いる標準的な方法によって構築した。このcDNAを、NotI部位を含むオリゴdTを用いてプライミングし、SalIヘミキナーゼ化アダプターに対する平滑末端を用いて連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動によって適切にサイズ分けし、そして適切なクローニングベクター中に所定の方向で、独特なXhoIおよびNotI部位において、クローニングした（pRKBまたはpRKD；pRK5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmesら、Science、253；1278-1280（1991）を参照のこと）。陽性cDNAクローンについて富化するために、プライマー伸長反応物は、10μlの10×PCR緩衝液（Perkin Elmer、USA）、1μl dNTP（20mM）、1μlライブラリーDNA（200ng）、1μlプライマー、86.5μl H₂Oおよび1μlのAmplitaq（Perkin Elmer、USA）（これは、ホットスタート後に添加した）を含んでいた。この反応物を、95℃で1分間変性し、60℃で1分間アニールし、次いで、72℃で15分間伸長した。そのDNAを、フェノール／クロロホルムで抽出し、エタノールで沈降させ、次いで、DH10B宿主細菌にエレクトロポレーションによって形質転換した。形質転換混合物の全体を、10のプレートに播種し、そしてコロニーを形成させた。コロニーを、ナイロンメンブレン上にリフトし、そしてIncycyte ESTに由来するオリゴヌクレオチドプローブ（newa3. プローブ：5' TCT TCGC AGC CGG AGA CCC CCT TCC CAC AGA AAG CCG ACT CA 3'（配列番号13））を用いてスクリーニングした。フィルターをそのプローブと、42℃で、50%ホルムアミド、5×SSC、10×デンハルト溶液、0.05M リン酸ナトリウム（pH6.5）、0.1%ピロリン酸ナトリウム、および50μg/mlの超音波処理したサケ精子DNA中で、一晩ハイブリダイズさせた。次いで、フィルターを、2×SSC中でリンスし、0.1×SSC、0.1% SDS中で洗浄し、次いで、Kodak X-Rayフィルムに一晩曝露した。5つの陽性クローンを同定した。純粋な陽性クローンを、コロニー精製および二次スクリーニングの後に得た。

20

30

40

【0233】

単離されたクローンのうち2つを配列決定した。これらのcDNA配列を、DNA48613（配列番号14）およびDNA48614（配列番号16）と命名した。DNA48163のアミノ酸配列分析によって、推定26アミノ酸長のN末端シグナルペプチドを有

50

する400アミノ酸長のオープンリーディングフレームの配列（配列番号15）が示された。推定成熟タンパク質は、約41kDaの計算分子量を有し、374アミノ酸長である。潜在的なN結合型グリコシル化部位は、マウス配列におけるホース（horse）と類似する。マウスおよびヒトのGFR α 3タンパク質配列を、図3において比較する。

【0234】

DNA48164の推定アミノ酸配列（配列番号17）および配列番号15に対する比較によって、この推定アミノ酸配列は、図4に示されるように、30アミノ酸の欠失（開始メチオニンから数えて、アミノ酸127位～157位）を有する、DNA48163の選択的にスプライシングされた形態であることが示された。興味深いことに、このクローンにおいてシステインは全く欠失されなかった。クローンであるDNA48613、DNA48614およびmGFR α 3（クローン13）改変体をATCCに寄託し、そしてそれぞれ、ATCC受託番号209752（名称：DNA48613-1268）、209751（名称：DNA48614-1268）および_____が割り当てられた。DNA48613をコードする核酸配列とヒトGFR α 1をコードする核酸配列およびGFR α 2をコードする核酸配列との比較を、図5A～Bに提供する。クローニングされたDNA48613における開始ATGのすぐ上流の5'非翻訳GFR α 3配列は、以下である：

【0235】

【化3】

GCGAGGGGAGCGCGGAGCCCGCGCCTACAGCTCGCC(配列番号21).

【0236】

以下に議論されるように、DNA48613によってコードされるタンパク質のGFR α 1およびGFR α 2に対する配列比較（図6）は、2つのヒトタンパク質がGFR α レセプターファミリーの新たなメンバーであり、そしてマウスGFR α 3のヒトホモログであることを示した。従って、DNA48613は、ヒトGFR α 3と命名されたタンパク質をコードし、そしてDNA48614は、そのスプライス改変体をコードする。

【0237】

GFR α ファミリーメンバー間のアミノ酸配列比較を、全長配列のBLAST-2およびFastA配列アラインメント分析に基づいて、表1に提供する。

【0238】

【表1】

表 1

GFR α ファミリーのメンバー間の配列同一性

比較したタンパク質	% 同一性
rGFR α 1 対 hGFR α 1	92%
rGFR α 2 対 hGFR α 2	94%
mGFR α 3 対 hGFR α 3	77%
hGFR α 3 対 hGFR α 1	34%
hGFR α 3 対 hGFR α 2	34%
hGFR α 1 対 hGFR α 2	48%

【0239】

配列比較から、ヒトGFR α 3は、GFR α 1またはGFR α 2のいずれかよりも、その

齧歯類ホモログへの関連が少ないことが理解され得る。さらに、GFR α 3は、GFR α 1とGFR α 2とが互いに関連するよりも、GFR α 1およびGFR α 2への関連が遠いようである。

【0240】

(実施例3：ハイブリダイゼーションプローブとしてのGFR α 3の使用)

以下の方法は、GFR α 3をコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用を記載する。

【0241】

GFR α 3のコード配列(配列番号4、配列番号14、または配列番号16に示される)を含むDNAまたはそのフラグメントをプローブとして利用して、相同なDNA(例えば、天然に存在するGFR α 3またはGFR α 3の改変体をコードするDNA)についてヒト組織cDNAライブラリー、ヒト組織ゲノムライブラリー、組織から単離されたRNA、インサイチュでの組織調製物、または染色体調製物(例えば、染色体マッピングのため)においてスクリーニングする。

10

【0242】

いずれかのライブラリーを含むフィルターのハイブリダイゼーションおよび洗浄を、以下の高ストリンジェンシー条件下で行う。放射標識したGFR α 3由来プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションを、50%ホルムアミド、5×SSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2×デンハルト溶液、および10%リン酸デキストランの溶液中で42℃にて20時間行う。このフィルターの洗浄を、0.1×SSCおよび0.1%SDSの水溶液中、42℃にて行う。

20

【0243】

次いで、全長のネイティブGFR α 3の配列をコードするDNAとの所望の配列同一性を有するDNAを、当該分野で公知の標準的な技術を用いて同定し得る。

【0244】

(実施例4：ノザンブロット分析)

ヒト組織におけるGFR α 3 mRNAの発現を、ノザンブロット分析によって試験した。複数のヒト組織RNAブロットを、ランダムプライミングによって標識したヒトGFR α 3 cDNAのコード領域全体を含む³²P標識DNAプローブにハイブリダイズした。ヒト胎児RNAブロットMTN(Clontech, Inc. USA)およびヒト成体RNAブロットMTN-1およびMTN-II(Clontech)をDNAプローブとともにインキュベートする。ブロットを、ハイブリダイゼーション緩衝液(5×SSC; 10×デンハルト溶液; 0.05Mリン酸ナトリウムpH6.5、50μg/ml超音波処理サケ精子DNA; 50%ホルムアミド; 0.1%ピロリン酸ナトリウム)中、1×10⁶cpm/mlのプローブとともに、42℃で一晩インキュベートした。このブロットを、2×SSC中、室温で10分間洗浄し、次いで、0.1%SDS中0.2×SSC中で、42℃で30分間洗浄した。このブロットを、x線フィルムに曝し、そして一晩曝した後、ホスホリメジャー(phosphorimager)分析(Fuji)によって現像した。

30

40

【0245】

図7に示されるように、GFR α 3 mRNA転写物が検出された。心臓、消化管(脾臓、小腸、結腸)、胸腺、精巣および前立腺における高レベルでの発現が観察された。

【0246】

(実施例5：GFR α 3のインサイチュハイブリダイゼーションによる位置決定)

以下の組織を、GFR α 3 mRNA発現について、インサイチュハイブリダイゼーションによって調査した：13日目のマウス胚、15日目および17日目の胚のマウス脳、生後一日目のマウス脳、成体マウス脳(視神経とともに)、成体マウス脊髄、成体マウス三叉神経節および三叉神経根、成体マウス網膜、ならびに数段階の胚性卵形嚢。

【0247】

50

インサイチュハイブリダイゼーションについては、E13.5マウス胚を4℃で一晩、4%パラホルムアミド中で浸漬固定し、15%スクロース中で一晩凍結防止し、O.T.C.中に包埋し、そして液体窒素で凍結した。成体マウス脊髄、三叉神経節、網膜、およびP1マウス脳を、O.T.C.中に包埋し、そして液体窒素で新鮮に凍結させた。成体マウス脳を、粉末化ドライアイスで新鮮に凍結した。切片を16μmで切り出し、そしてGFRα3についてのインサイチュハイブリダイゼーションのために、以前に記載された方法(Phillipsら、Science 250:290(1990))により処理した。33P-UTPを使用して、標識RNAプローブを、マウスGFRα3をコードする326bpフラグメントとともにT7ポリメラーゼを用いて、記載のように(Meltonら、Nucleic Acids Res. 12:7035(1984))作製した。

10

【0248】

E13マウスにおいて、GFRα3 mRNAは、後根神経節において、交感神経節において、および末梢神経において非常に強く発現した。前庭神経節はまた、強いシグナルを示した。中程度の発現は、ひげパッド(whisker pad)において、腋窩の領域において、および膀胱周辺にみられた。中程度の発現はまた、胸椎脊髄の灰白質の中間外側領域、腹内側視床下部(ventromedial hypothalamus)、および背側菱脳における細胞クラスタにおいてみられた。脳の大部分の他の領域は、実証可能なシグナルを欠いていた。多くの他の器官(肺、心臓、肝臓、消化管、および腎臓を含む)は、弱いかまたは検出不能かのいずれかのシグナルを発現した。

20

【0249】

発生後期(E15、E17、P1、および成体)において、CNS内のGFRα3発現は、非常に制限された。脳および脊髄の大部分の領域は、センス鎖コントロールプローブとハイブリしたコントロール切片においてみられたバックグラウンドレベルを超えるハイブリダイゼーションシグナルを示さなかった。このことの例外は、菱脳において見出された細胞クラスタであった。成体においては、三叉神経節ニューロンの亜集団は非常に強く標識されたが、衛星細胞においても神経根においても標識がみられなかった。視神経はまた、検出可能なシグナルを示さなかった。

【0250】

成体マウスの心臓の切片において、心臓伝導系と関連する増加したシグナル焦点領域を有する心房および心室の心筋に拡散性シグナルが存在した。

30

【0251】

GFRα1、GFRα2およびGFRα3での標識の比較を、図8に示す。GFRα3の発現は、他のレセプターと比較して非常に制限され、そして局在している。

【0252】

センス配列GCGCGCGACCTCCACTGCTG(gfrp1と命名された;配列番号22)およびアンチセンス配列CTGTGGGGAGCGGCGGCG(gfrp2.r.c.と命名された;配列番号23)を含むプライマーを使用して、マウスGFRα3に由来する671bpのハイブリダイゼーションプローブを生成した。センス配列CTGAACCTATGGTAACCTGG(配列番号24)およびアンチセンス配列ACCCAGTCCCTCCCTAAC(配列番号25)を含むプライマーを使用して、マウスGFRα3に由来する378bpのハイブリダイゼーションプローブを生成した。

40

【0253】

試験したE12~E16週におけるヒト胎児組織は、胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大きな血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、脊髄、体壁(body wall)、骨盤および下肢を含んでいた。試験した成体組織は、腎臓(正常および末期)、副腎、心筋、大動脈、肺、皮膚、眼(網膜を含む)、膀胱、肝臓(正常、肝硬変、および急性不全)、腎臓癌腫、および軟組織肉腫を含んでいた。試験した非ヒト霊長類組織は、チンパンジーの唾液腺、胃、甲状腺、上皮小体、皮膚および胸腺を含んでいた。378塩基対のアンチセンス鎖プローブに対するハイブリダイゼーションは、胎児お

50

よび成体のヒトDRG、胎児の末梢神経（胎児の体壁および下肢において見られるように）、ならびに腸間膜神経において検出された。胎児脊髄においても脳においても発現は観察されなかった。試験された神経芽細胞腫において発現は観察されなかった。

【0254】

671塩基対のアンチセンスプローブを使用して、GFR α 3 mRNAハイブリダイゼーションは、初期および後期および成体ラットにおいて、E14神経節、三叉神経、皮膚および骨格筋の末梢神経；E17皮膚、背側根節、末梢神経、軟骨、骨格筋、および脳；E19背側根節、末梢神経、脳、皮膚の角質層、歯、骨格筋、軟骨、肝臓および腸において検出された。特異的なシグナルは、胎仔ラット脾臓においても成体ラット脾臓においても検出されなかった。本節の実施例の全てにおいて、対応するセンスプローブは、予測され得るようにハイブリダイズしなかった。

10

【0255】

（実施例6：E. coliにおけるGFR α 3の発現）

GFR α 3（例えば、ヒトGFR α 3）をコードするDNA配列を、最初に、選択したPCRプライマーを使用して増幅した。このプライマーは、選択された発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含むべきである。種々の発現ベクターが使用される。適切なベクターの例は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を含むpBR322（E. coli由来；Bollivarら、Gene 2:95（1977）を参照のこと）である。ベクターを、制限酵素を用いて消化し、そして脱リン酸化する。次いで、PCR増幅した配列を、ベクターに連結する。ベクターは、好ましくは、抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリhisリーダー（最初の6STIIコドン、ポリhis配列、およびエンテロキナーゼ切断部位を含む）、哺乳動物GFR α 3コード領域、λ転写終結因子、およびargU遺伝子をコードする配列を含む。

20

【0256】

次いで、連結混合物を使用して、選択されたE. coli株をSambrookら（前出）に記載の方法を用いて形質転換する。形質転換体を、LBプレート上で増殖する能力によって同定し、次いで、抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、そして制限分析およびDNA配列決定によって確認し得る。

【0257】

選択されたコロニーを、液体培養培地（例えば、抗生物質を補充したLBブロス）中で一晩増殖させ得る。一晩培養物を引き続き用いて、大規模培養物へ接種し得る。次いで、細胞を所望の光学密度まで増殖させ、その間に発現プロモーターのスイッチを入れる（turn on）。

30

【0258】

さらに数時間細胞を培養した後、細胞を遠心分離によって採取し得る。遠心分離によって得た細胞ペレットを、当該分野で公知の種々の薬剤を用いて可溶化し得、次いで、可溶化した哺乳動物GFR α 3タンパク質を、このタンパク質の強固な結合を可能にする条件下で金属キレートカラムを使用して精製し得る。

【0259】

（実施例7：哺乳動物細胞におけるGFR α 3の発現）

40

本実施例は、哺乳動物細胞における組換え発現によって哺乳動物GFR α 3のグリコシル化形態の調製を例示する。

【0260】

ベクターpRK5（例えば、1989年3月15日に公開された欧州特許第307,247号を参照のこと）を発現ベクターとして使用する。必要に応じて、GFR α 3 DNAを、Sambrookら（前出）に記載されたような連結方法を用いて、選択された制限酵素でpRK5に連結して、GFR α 3 DNAの挿入を可能にする。得られたベクターをpRK5-GFR α 3と呼ぶ。

【0261】

1つの実施態様において、選択された宿主細胞は、293細胞であり得る。ヒト293細胞

50

胞 (ATCC CCL 1573) をウシ胎仔血清、ならびに必要なに応じて栄養成分および／または抗生物質を補充したDMEMのような培地中で組織培養プレートでコンフルエントになるまで増殖させる。約10 μ gのpRK5-GFR α 3 DNAをVA RNA 遺伝子 (Thimmappayaら、Cell 31:543 (1982)) をコードする約1 μ gのDNAと混合し、そして500 μ lの1mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl₂中に溶解する。この混合物に、500 μ lの50mM HEPES (pH7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄を滴下して添加し、そして沈澱物を25℃で10分間にわたって形成させる。沈澱物を懸濁し、そして293細胞に添加し、そして37℃で約4時間にわたって沈ませる。培養培地を吸引除去し、そして2mlのPBS中の20% グリセロールを30秒間にわたって添加する。次いで、293細胞を無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、そして細胞を約5日間インキュベートする。

10

【0262】

トランスフェクションの約24時間後、培養培地を取り除き、そして培養培地 (単独) または200 μ Ci/ml ³⁵S-システインおよび200 μ Ci/ml ³⁵S-メチオニンを含む培養培地に置き換える。12時間のインキュベーション後、馴化培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、そして15% SDSゲルにロードする。処理したゲルを乾燥し、そしてゲルを、選択された時間にわたりフィルムに曝して、哺乳動物GFR α 3ポリペプチドの存在を明らかにし得る。トランスフェクトした細胞を含む培養物は、さらなるインキュベーションを (無血清培地において) 受け得、そして培地を、選択したバイオ

20

【0263】

代替的な技術において、哺乳動物GFR α 3をSomparyracら、Proc. Natl. Acad. Sci. 12:7575 (1981) によって記載された硫酸デキストラン法を使用して一過性に293細胞へ導入し得る。293細胞をスピナーフラスコ中に最大密度まで増殖させ、そして700 μ gのpRK5-GFR α 3 DNAを添加する。細胞を、最初にスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、そしてPBSで洗浄する。DNA-デキストラン沈澱物を、4時間にわたり細胞ペレット上でインキュベートする。細胞を、20% グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、そして組織培養培地、5 μ g/ml ウシインスリンおよび0.1 μ g/ml ウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコへ再導入する。約4日後に、馴化培地を遠心分離し、そして濾過して細胞および細片を取り除く。次いで、発現された哺乳動物GFR α 3を含むサンプルを濃縮して、そして任意の選択された方法 (例えば、透析および／またはカラムクロマトグラフィー) によって精製し得る。

30

【0264】

別の実施態様において、哺乳動物GFR α 3を、CHO細胞で発現させ得る。pSU1-GFR α 3を、公知の試薬 (例えば、CaPO₄またはDEAE-デキストラン) を使用して、CHO細胞へトランスフェクトし得る。上記のように、細胞培養物をインキュベートし得、そして培養培地 (単独) または放射性標識 (例えば、³⁵S-メチオニン) を含む培地で培地を置き換え得る。哺乳動物GFR α 3ポリペプチドの存在を決定した後に、培養培地を無血清培地で置き換え得る。好ましくは、培養物を約6日間インキュベートし、次いで、馴化培地を回収する。次いで、発現された哺乳動物GFR α 3を含む培地を濃縮し、そして任意の選択された方法によって精製し得る。

40

【0265】

エピトプタグ化哺乳動物GFR α 3もまた、宿主CHO細胞において発現させ得る。哺乳動物GFR α 3をpRK5ベクターからサブクロニングし得る。サブクローン挿入物はPCRを受けて、選択されたエピトプタグ (例えば、ポリhisタグ) を用いて発現ベクターヘインフレームで融合され得る。次いで、ポリhisタグ化した哺乳動物GFR α 3挿入物を、安定なクローンについての選択のための選択マーカー (例えば、DHFR) を含むSV40駆動ベクターへサブクロニングし得る。最後に、CHO細胞を、SV

50

40 駆動ベクターで（上記のように）トランスフェクトし得る。標識を上記のように行って、発現を確認し得る。次いで、発現したポリHisタグ化哺乳動物GFR α 3を含む培養培地を、濃縮し、そして任意の選択された方法（例えば、Ni²⁺キレートアフィニティークロマトグラフィー）によって精製し得る。

【0266】

（実施例8：バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるGFR α 3の発現）

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるGFR α 3の組換え発現を記載する。

【0267】

GFR α 3をバキュロウイルス発現ベクター内に含まれるエピトープタグの上流で融合した。このようなエピトープタグはポリHisタグおよびイムノグロブリンタグ（IgGのFc領域のような）を含む。GFR α 3-IgG融合物のアミノ酸配列を、配列番号18に提供する。種々のプラスミド（pVL1393（Novagen）のような市販のプラスミド由来のプラスミドを含む）を利用し得る。手短に述べると、細胞外ドメインをコードするGFR α 3配列を、5'領域および3'領域に相補的なプライマーを用いてPCRで増幅した。この5'プライマーは、隣接する（選択された）制限酵素部位を取り込む。次いで、この産物を、それらの選択された制限酵素で消化し、そして発現ベクターにサブクローニングした。昆虫細胞におけるGFR α 3-IgGの発現のためのベクターは、pb.PHであった（ここで、バキュロウイルスにおける発現は、ポリヘドリンプロモーターの制御下にあった）。 10 20

【0268】

組換えバキュロウイルスを、上記のプラスミドおよびBaculoGoldTMウイルスDNA（Pharmingen）をSpodoptera frugiperda（「Sf9」）細胞（ATCC CRL 1711）に、リポフェクチン（GIBCO-BRLから市販される）を用いて同時トランスフェクトすることによって生成した。28℃でインキュベートして4～5日後、遊離したウイルスを採取し、そしてさらなる増幅のために使用した。ウイルス感染およびタンパク質発現を、O'Reillyら、「Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual」、Oxford: Oxford University Press（1994）に記載のように行った。IgGタグ化（またはFcタグ化）GFR α 3の精製を、公知のクロマトグラフィー技術（プロテインAまたはプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む）を用いて行った。 30

【0269】

あるいは、発現されたポリHisタグ化GFR α 3を、例えば、Ni²⁺キレートアフィニティークロマトグラフィーによって以下のとおり精製し得る。抽出物を、Rupertら、Nature 362:175-179（1993）に記載のように、組換えウイルス感染Sf9細胞から調製する。簡潔には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理緩衝液（25 mlのHepes、pH7.9；12.5 mM MgCl₂；0.1 mM EDTA；10% グリセロール；0.1% NP-40；0.4 M KCl）中に懸濁し、そして氷上で20秒間、2回超音波処理する。超音波処理した物を遠心分離によって明澄化し、そして上清をローディング緩衝液（50 mM リン酸、300 mM NaCl、10% グリセロール、pH7.8）で50倍に希釈し、そして0.45 Fmのフィルターを通して濾過する。Ni²⁺-NTAアガロースカラム（Qiagenから市販される）を、5 mlのベッド容積で調製し、25 mlの水で洗浄し、そして25 mlのローディング緩衝液で平衡化する。濾過した細胞抽出物を、このカラムに1分あたり0.5 mlでロードする。カラムを、ローディング緩衝液でA₂₈₀が基線になるまで洗浄し、この時点で、フラクション収集を開始させる。次いで、カラムを、非特異的結合タンパク質を溶出させる二次洗浄緩衝液（50 mM リン酸；300 mM NaCl、10% グリセロール、pH6.0）で洗浄する。再びA₂₈₀が基線に達した後、カラムを、二次洗浄緩衝液中0～500 mM イミダゾールの勾配で展開する。1 mLの画分を収集し、SDS-PAGE、および 40 50

銀染色またはアルカリホスファターゼに結合体化した Ni^{2+} -NTA (Qiagen) を用いたウェスタンブロットによって分析する。溶出された His_{10} タグ化GFR α 3を含む画分をプールし、そしてローディング緩衝液に対して透析する。

【0270】

(実施例9：GFR α 3への結合)

任意の公知のGDNFファミリーのメンバー（リガンドGDNF、ニューツリン (Neurturin) (NTN) またはパーセフィン (Persephin) (PSN)）がGFR α 3に結合し得るか否かを決定するために、各リガンドをマイクロタイタープレート上にコーティングして、実施例8で調製したGFR α 1-IgG、GFR α 2-IgG、またはGFR α 3-IgG（配列番号18）のいずれかとともにインキュベートした。次いで、GFR α -IgGの結合を、そのIgG部分に対する二次抗体を用いて検出した。GDNF、NTN、およびPSNを50mM 炭酸緩衝液 (pH9.6) 中、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ でマイクロタイタープレートに4℃で一晩コーティングした。次いで、プレートを、PBS/0.05% Tween20で洗浄し、次いで、PBS/0.05% BSA/0.05% Tween20で1～2時間室温でブロッキングした。種々の濃度のIgGタグ化キメラレセプター (GFR α 1-IgG、GFR α 2-IgG、GFR α 3-IgG; $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $1.95\text{ng}/\text{ml}$) を各ウェルに添加し、そしてプレートを室温で1時間インキュベートした。次いで、プレートを上記のように洗浄し、そしてヤギ抗ヒトIgG (Fc)-HRP (1:1000) の存在下で、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、結合したHRPを、OPD基質に5～10分間曝し、次いで、490nmでプレートを読みとった。結果を図9A～Cに示す。

【0271】

GFR α 1はGDNFに結合し（図9A）、GFR α 2はGDNFおよびNTNに結合する（図9B）が、GFR α 3は、これらの分子のいずれにも結合しない（図9C）。従って、GFR α 3は、オーファンレセプターである。

【0272】

(実施例10：GFR α 3アゴニストについてのアッセイ)

GDNFファミリーのリガンドは、独自のレセプターシステムを使用する：GPI連結リガンド結合タンパク質 (α 成分) およびシグナル伝達成分、チロシンキナーゼレセプターRet。この多成分レセプター複合体の活性化の機構は、未だ未知であるが、チロシンキナーゼレセプターは、リガンド誘導ダイマー化の際に活性化されることが公知である。従って、GFR活性化のあり得る機構は、 α 成分ダイマー化を誘導する、 α 成分に対する結合リガンドによるものである。次に、2つの α 鎖は2つのRet分子を複合体にし、この複合体は、キナーゼドメインの活性化およびレセプターおよび/または他のシグナル伝達分子上の標的チロシン残基のリン酸化を導く。

【0273】

リガンドが α 成分のダイマー化を確かに誘導することを実証するために、ラットGFR α 2の細胞外ドメインならびにTPOレセプター (c-mp1) またはRseチロシンキナーゼレセプターの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインから構成されるキメラレセプターを構築した。これらの2つのレセプターは、異なるレセプターのファミリーに属するが、ともに、リガンド誘導ダイマー化またはアゴニスト-抗体誘導ダイマー化によって活性化されることが公知である。

【0274】

(GFR α 2-c-mp1) gDエピトプタグ、次いで、rGFR α 2細胞外ドメイン (GPIシグナルを除く)、次いで、TPOレセプターの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインから構成されるキメラレセプターを、CMVプロモーターの制御下で、pRKtkneoベクターへ組換えPCRによってアセンブリした。Ba/F3細胞を、NotIで線状化したpRKtkneo-GFR α 2-mp1とともにエレクトロポレーションし、そしてクローンを、限界希釈により得た。個々のクローンを、抗gD抗体を用いてFACS分析により、レセプターの発現について分析した。陽性クローンを選択し、そしてN

TN刺激（GFR α 2 についてのリガンド）に応答して増殖するそれらの能力についてさらに特徴付けした。図10に示されるように、GFR α 2-mp1を発現するBa/F3細胞は、³Hチミジン取り込みによって評価されるように、NTN刺激に応答して増殖し得る。

【0275】

（GFR α 2-Rse） キメラレセプターを、gDエピトープタグ、次いで、ラットGFR α 2細胞外ドメイン（GPISIGNALを除く）、次いで、Rseチロシンキナーゼレセプターの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン、ならびに別のgDエピトープタグを用いて構築し、そしてSV40プロモーターの制御下でpSViベクターへ組換えPCRによってアセンブリした。このgD-GFR α 2-Rse-gD配列を、配列番号19に示す。CHO細胞をリポフェクタミン法によりトランスフェクトした（GIBCO-BRL）。単一のトランスフェクトしたCHOクローンを拾い、そして抗gD抗体を用いるFACS分析によりレセプターの発現について分析した。次いで、レセプター陽性クローンをKIRAアッセイ（例えば、米国特許第5,709,858号）を使用して、NTN刺激の際のレセプター誘導リン酸化について分析した。図11に示すように、NTN刺激は、レセプターの自己リン酸化を引き起こした。

【0276】

（GFR α 3-Rse） とともに、上記のデータはGFRの活性化がリガンド誘導ダイマー化によって媒介され、そしてそれらのリガンドに加えて、種々のレセプターが抗体媒介活性化に感受性であることを示す。従って、1つの実施態様において、哺乳動物GFR α 3 20 3 についてのアゴニスト抗体および天然のリガンド（または他のアゴニスト）を同定するアッセイは、GFR α 2-Rse についての上記の方法に従う。キメラGFR α 3レセプターを、gDエピトープタグ、次いで、マウスGFR α 3細胞外ドメイン（GPISIGNALを除く；好ましくは、ヒトGFR α 3が使用される）、次いで、Rseチロシンキナーゼレセプターの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインならびに第2のgDタグを用いて、組換えPCRを使用して、pSViベクター中へSV40プロモーターの制御下で構築した。CHO細胞を、リポフェクタミン法によりトランスフェクトした（GIBCO-BRL）。単一のトランスフェクトしたクローンを拾い、そして抗gD抗体を用いるFACS分析によりGFR α 3キメラレセプターの発現について分析した。次いで、陽性クローンを、GDNF、NTNまたはPSNのいずれかでの処理の際のレセプター誘導リン酸化に 30 について分析した。結果を図12に示す。この結果によって、GFR α 3がGDNFファミリーの新規なリガンドについてのレセプターであることが確認された。gD-GFR α 3-Rse-gDの配列を、配列番号20に示す。この構築物の配列および他のGFRファミリーメンバーに対するその相溶性から明らかなように、十分なリガンド結合領域は、配列番号20のアミノ酸110～アミノ酸386であり、これは、配列番号15のアミノ酸残基84～360に対応する。本発明のGFR α 3の天然のリガンドは、アルテミン（artemin）として同定され（Ballouら、Neuron 21:1291-1302（1998））、これは、本発明のGFR α 3およびそのgD-GFR α 3-Rse-gD融合物と結合することが見出された。GFR α 3（または他の候補アゴニスト）に対して生成された抗体を、CHO細胞において発現されたGFR α 3構築物を使用してアゴ 40 ニスト活性についてスクリーニングし得る。あるいは、アンタゴニストを、このアッセイにおいて、アゴニスト機能を阻害するそれらの能力によってスクリーニングする。

【0277】

（実施例11：GFR α 3と結合する抗体の調製）

本実施例は、GFR α 3と特異的に結合し得るモノクローナル抗体の調製を例示する。モノクローナル抗体を調製する技術は当該分野で公知であり、そして例えば、Goding（前出）に記載される。使用され得る免疫原は、精製GFR α 3、GFR α 3を含む融合タンパク質、および細胞表面上で組換えGFR α 3を発現する細胞を含む。免疫原の選択は、過度な実験をすることなく、当業者によってなされ得る。マウス（例えば、Balb/c）を、フロイント完全アジュバント中に乳化され、そして1～100 μ gの量で皮下 50

または腹腔内に注射されたGFR α 3免疫原で免疫する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)中に乳化し、そして動物の後肢パッドに注射する。次いで、免疫したマウスを10～12日後に、選択されたアジュバント中で乳化した、さらなる免疫原で追加免疫する。その後、数週間にわたって、マウスをまた、さらなる免疫注射で追加免疫し得る。血清サンプルを、眼窩採血により、ELISAアッセイにおいて試験するためにマウスから周期的に得て、GFR α 3抗体を検出し得る。

【0278】

適切な抗体力価が測定された後、抗体「陽性」である動物に、最後のGFR α 3の静脈内注射により注射し得る。3～4日後、マウスを屠殺し、そして脾臓細胞を採取する。次いで、この脾臓細胞を、選択したマウス骨髄腫細胞株(例えば、P3X63AgU.1、ATCCから番号CRL1597で入手可能)と(35%ポリエチレングリコールを用いて)融合する。この融合物は、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するために、次いで、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン)培地を含有する96ウェル組織培養プレートにプレートされるハイブリドーマ細胞を生成する。

10

【0279】

ハイブリドーマ細胞を、GFR α 3に対する反応性についてELISAでスクリーニングする。GFR α 3に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性」ハイブリドーマ細胞の決定は、当該分野の技術範囲内である。陽性ハイブリドーマ細胞を、同系Balb/cマウスに腹腔内注射して、抗GFR α 3モノクローナル抗体を含む腹水を生成し得る。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコまたはローラーボトル中で増殖させ得る。腹水中で生成されたモノクローナル抗体の精製を、硫酸アンモニウム沈澱、次いで、ゲル排除クロマトグラフィーを用いて達成し得る。あるいは、プロテインAまたはプロテインGへの抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーを利用し得る。

20

【0280】

(実施例12：ダイマー化スクリーニングアッセイ)

候補アゴニスト(例えば、GFRファミリー(例えば、GFR α 3、GFR α 2、またはGFR α 1)の α サブユニットレセプターに対して生成された抗体)を、CHO細胞またはKIRAアッセイにおける他の適切な細胞中で発現された α レセプター-Rse様構築物を用いてアゴニスト活性についてスクリーニングし得る。gD-GFR α 2-Rse構築物のgD部分に対するモノクローナル抗体を使用する例示的なKIRAプロトコルを示す。

30

【0281】

gD-GFR α 2-Rse融合タンパク質を発現するCHO細胞培養物を調製し、そして以下のとおり培養した。1日目に、培養フラスコ由来のトランスフェクトCHO細胞は、好ましくは70～90%コンフルエント(浮遊している(剥がれた)細胞がほとんどない)である。培養プレートは、カバー付きのFalcon(1270)平底96ウェル滅菌組織培養プレートであった。剥離緩衝液は、1:50希釈 5mM EDTA(250mMストック)含有PBSであった。細胞培養培地は、NaHCO₃(50:50)+10%ダイアフィルトレーションしたFBS、25mM HEPES、2mM L-グルタミン含有のGHTを含まないHam F-12で、グリシンを含まない低グルコースDMEMであった。2日目に、刺激培地は、Excelsior-401昆虫細胞培地(JRH Biosciences カタログ番号14401-78頁)および0.5% BSAであった。溶解緩衝液は、50mM HEPESおよび0.5% Triton-X 100含有150mM NaClであった。使用前に溶解緩衝液に添加したプロテアーゼインヒビターは、1:100希釈を使用する100×AEB SF(100mM)ストック、1:1000希釈を使用する1000×アプロチニン(液体)ストック、および1:1000希釈を使用する1000×ロイペプチン(50mM)ストックであった。使用前に溶解緩衝液に添加したホスファターゼインヒビターは、1:50希釈を使用する50×オルト

40

50

バナジン酸 (orthovanadate) ナトリウム (100mM) ストックであった。

【0282】

ELISA形式は、以下の材料を使用した。固体支持体は、Nunc Maxisorp イムノプレート4-39454であった。コーティング緩衝液は、PBS pH7.4であった。洗浄緩衝液は、0.05% Tween20含有PBS (pH7.4)であった。ブロッキング緩衝液は、0.5% BSA含有PBSであった。アッセイ緩衝液は、0.5% BSA、0.05% Tween20および5mM EDTA含有PBS (pH7.4)であった。基質は、Kirkgaard and PerryからのTMB基質キット (2ボトル：A；TMB基質、B；TMB過酸化溶液)であった。停止溶液は、1.0M H_3PO_4 であった。抗原は、細胞培養ウェル由来の可溶化し、トランスフェクトした「レセプター-gD」であった (細胞溶解物)。抗体は、(一次)3C8 (抗gDペプチド)濃縮物1.0 μ g/ml、1.3mg/mlストック (ロット24564-7#1766)の1:1300希釈物、(二次)ビオチン化4G10 (UBI)濃縮物、4 $^{\circ}$ Cストック (50 μ g/ml) #100796からの1:1000であった。結合体は、ストレプトアビジン/HRP Zymed 濃縮物1:50000、ロット#26246-91、(1:100凍結ストック)であった。

10

【0283】

細胞を組織培養フラスコから細胞培養上清を吸引することによって採取し、滅菌PBSで1回リンスし、そして10mlの細胞剥離緩衝液を添加した。細胞を37 $^{\circ}$ Cで約10分間細胞が剥がれるまでインキュベートした。剥がれた細胞を遠心管に移し、そして等容量の細胞培養培地を添加した。細胞計数を血球計算盤で行った。細胞を遠心分離し、上清を吸引によって取り除き、そして細胞を1 $\times$ 10⁶細胞/mlになるように懸濁した。100 μ lの細胞懸濁物を各ウェルに添加した (最終、約1 $\times$ 10⁵細胞/ウェル)。プレートを37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。

20

【0284】

レセプター活性化を以下のとおり、行った。代表的には、リガンドのストック (本実施例においては2mg/mlのhNTNFP調製物)を使用して、各ウェルでのNTNの最終濃度を0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.00312、0.001、および0.0 μ g/mlとした。マイクロタイタープレート中の溶液を、外部の振盪によって穏やかに混合した。100 μ lのサンプル、コントロール、またはNSBを各ウェルに添加し、そして37 $^{\circ}$ Cで25分間インキュベートした。プレートの穏やかな混合を行った。各ウェルに130 μ lのプロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビター含有溶解緩衝液を添加した。細胞溶解を組織培養プレート中で30分間進行させた。保存のために、細胞溶解物を-70 $^{\circ}$ Cにおいた。

30

【0285】

ELISAを、以下のようにおこなった。ELISAプレートをコーティングするために、100 μ lの一次mAb (一次；3C8 1 μ g/ml)溶液を各ウェルに添加し、そしてウェルに一晩4 $^{\circ}$ Cでコーティングさせた。捕捉 (ELISA) プレートにおいてアッセイを行うために、コーティング溶液を廃棄し、そして150 μ lのブロッキング緩衝液を各ウェルに添加した。ブロッキングを1時間継続させた。細胞溶解物を穏やかに攪拌しながら解凍する。ELISAプレートを、洗浄緩衝液で (Skatron Washer 300を用いて) 3回リンスした。各捕捉ELISAプレートのウェルに、100 μ lの細胞溶解物を、各移動ごとに新しいピペットチップを使用して移した。プレートを室温で2時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。アッセイ緩衝液中にビオチン化4G10 (二次Ab；二次抗体；4 $^{\circ}$ C) 1:1000希釈物を調製した。各ウェルを洗浄緩衝液で10回リンスした。各ウェルに100 μ lの二次Abを添加し、次いで、室温で2時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で6回洗浄した。アッセイ緩衝液中にストレプトアビジン/HRP 1:50000希釈物を調製した。各ウェルに100 μ lの希釈したStrAv/HRPを添加し、次いで、室温

40

50

で1時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で6回洗浄した。各ウェルに、100 μ lの基質溶液：1容量のK & P TMB基質および1容量のK & P TMB過酸化溶液を添加した。反応色を、15分間発色させ、次いで、50 μ lの1.0M H_3PO_4 の添加によって発色をクエンチした。各ウェルについてのO. D. (450 nm)を読みとった。図13は、3つの異なるアゴニスト抗体を使用した活性化の結果を示す—この場合においては、抗体をgD flagエピトープに対して惹起したが、 α サブユニットオリゴマー化および引き続くチロシンキナーゼドメイン(Rse領域)活性化を誘導し得た。

【0286】

(材料の寄託)

以下の材料を、American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC)に寄託した。

【0287】

【表2】

<u>材料</u>	<u>ATCC寄託番号</u>	<u>寄託日</u>
mGFR α 3(7p-13)		
DNA48613	209752	1998年4月7日
DNA48614	209751	1998年4月7日

【0288】

この寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約およびその条約に基づく規則(ブタペスト条約)の規定の下でなされた。これは、寄託の日から少なくとも30年間にわたって寄託物の可能な培養物生存の維持を保証する。寄託物は、ブタペスト条約の規約の下でATCCによって分譲され、そしてGenentech, Inc.とATCCとの間の合意を条件として、この寄託物は、適切な米国特許の発行の際に、任意の米国特許出願または外国特許出願が公に公開される際に、どちらが先であろうと、公に寄託物の培養物の子孫が永久的にかつ制限なく利用可能であることを保証し、そして米国特許商標庁長官によって米国特許法122条および米国特許法122条に拠るこの長官の規則(米国特許施行規則1.14条(特に886OG638を参照して))を含む)に従って、そこに権利を与えることが決定されたものへのこの子孫の利用可能性、を保証する。

【0289】

適切な条件下で培養したときに寄託した材料の培養物が死滅するか、もしくは失われるか、もしくは破壊された場合には、その通告に対して、この培養物が、同一の別の培養物で迅速に補充されることを、本特許出願の譲受人は同意した。寄託物の利用可能性は、いずれの政府機関当局の下でその特許法に従って譲渡された権利に違反して本発明を実施するライセンスとして解釈されるべきではない。

【0290】

前述の記載された明細書は、当業者が本発明を実施することを可能とするに十分であると見なされる。本発明は、寄託された構築物によって範囲を制限されるべきではない。なぜなら、寄託された実施態様は、本発明の特定の局面の一例示として意図され、そして機能的に等価である任意の構築物が、本発明の範囲内にあるからである。本明細書中の材料の寄託物は、本明細書中に含まれる記載された説明(その最良の実施形態を含む)が本発明の任意の局面の実施を可能とするに不適切であるという認証を構成するのでもなく、それが示す特定の例示に請求の範囲を制限することが解釈されるのでもない。事実、本明細書

10

20

30

40

50

中に示され、そして記載されるものに加えて、本発明の種々の改変は、前述の説明から当業者に明らかであり、添付の請求の範囲の範囲内に入る。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1A～Bは、マウスGFR α 3のネイティブ配列のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す。

【図2】 図2は、マウスGFR α 3（配列番号5）、ラットGFR α 1（配列番号8）、およびラットGFR α 2（配列番号9）のアミノ酸配列のアラインメントを示す。N末端シグナルペプチドを示す。GPIアンカーと関連するC末端疎水性配列の上方に線を付す。アステリスクは、GPIアンカー付着のためのアミノ酸を示す。可能性のあるグリコシル化部位を、影付き四角で示す。保存された同一の残基を四角で囲む。

10

【図3】 図3は、マウスGFR α 3アミノ酸配列とヒトGFR α 3アミノ酸配列との間のアラインメント比較を示す。保存された残基を四角で囲む。

【図4】 図4は、ヒトGFR α 3（DNA48613より）とそのスプライス改変体（DNA48614より）との間のアラインメント比較を示す。保存された配列を四角で囲む。30アミノ酸欠失配列を示す。

【図5】 図5A～Bは、ヒトGFR α 3をコードするDNA配列（配列番号14）と、それぞれ、ヒトGFR α 1（配列番号6）をコードするDNA（配列番号21）およびヒトGFR α 2（配列番号7）をコードするDNA（配列番号22）との核酸配列アラインメントを示す。

【図6】 図6は、ヒトGFR α 3（配列番号15）、ヒトGFR α 1（配列番号6）、およびヒトGFR α 2（配列番号7）のアミノ酸配列アラインメントを示す。

20

【図7】 図7は、プローブとしてGFR α 3を使用する複数の組織のノーザンブロットを示す。

【図8】 図8は、GFR α 1、GFR α 2およびGFR α 3に特異的なDNAプローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーションによって決定されたRNA発現局在化を比較する。

【図9A】 図9A～Cは、IgGタグ化レセプターGFR α 1（図9A）、GFR α 2（図9B）、またはGFR α 3（図9C）への、リガンド結合（ラットGDNF、ヒトニューツリン（NTN）、またはヒトペルセフィン（PSN））の結果を示す。

【図9B】 図9A～Cは、IgGタグ化レセプターGFR α 1（図9A）、GFR α 2（図9B）、またはGFR α 3（図9C）への、リガンド結合（ラットGDNF、ヒトニューツリン（NTN）、またはヒトペルセフィン（PSN））の結果を示す。

30

【図9C】 図9A～Cは、IgGタグ化レセプターGFR α 1（図9A）、GFR α 2（図9B）、またはGFR α 3（図9C）への、リガンド結合（ラットGDNF、ヒトニューツリン（NTN）、またはヒトペルセフィン（PSN））の結果を示す。

【図10】 図10は、NTNまたはGDNFに応答した組換えキメラGFR α 2-mp1を発現する細胞の増幅を示す。

【図11】 図11は、NTNに応答した、組換えによって発現されたレセプターGFR α 2-Rseの自己リン酸化を示す。

【図12】 図12は、GDNF、NTN、またはPSNによる、レセプターGFR α 2またはGFR α 3の刺激についてのアッセイを示す。

40

【図13】 図13は、gD-GFR α 2-Rse KIRAアッセイにおける種々の抗gD抗体のアゴニスト活性を示す。

【配列表】

Sequence Listing

<110> Genentech, Inc.

<120> GFRalpha3 and its Uses

<130> P1268R1PCT

<141> 1999-03-19

<150> US 60/079,124

<151> 1998-03-23

<150> US 60/081,569

<151> 1998-04-13

<160> 25

<210> 1

<211> 387

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

ctgatttgca gcctgtggtg ggagagaact cgccagcctg tggaagaaga 50

cgcagcgcgc tacacagcaa cccggaacca accaggcatt ccgcagcaca 100

tcccgtctgc tccagaagag gtcttagaag tgagggtctg gacccttccg 150

atcctgagcg gctagtttcc aaacctccct tgccccctgct tccttctggc 200

tcaggctgct cctccttagg actttgtggg tccagttttg ccttctgttc 250

tgatggtgat tagcggtcca cctccagcgc ttcttctgtt tcccaggac 300

caccagagg ctaaggaatc agtcattccc tgttgccctc tccaggaagg 350

caggctaagg gttctgaggt gactgagaaa aatgttt 387

<210> 2

<211> 353

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

cgcggcgccc agcgaggcag agcgctgtcg catcccgggc gtccaccgcg 50

catggggctc tcttgagacc cgcgacctcc actgctgatg atcctgctac 100

tggtgctgtc gttgtggctg ccacttgag caggaaactc ccttgccaca 150

gagaacaggt ttgtgaacag ctgtaccag gccagaaaga aatgcgaggc 200

taatcccgct tgcaaggctg cctaccagca cctgggctcc tgcacctcca 250

gttaagcagg ccgctgccct tagaggagtc tgccatgtct gcagactgcc 300

10

20

30

tagaggcagc agaacaactc aggaacagct ctctgataga ctgcagggtgc 350

cat 353

<210> 3

<211> 498

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

aattcgggaa gaggggtgaag gagcttcgca agtcccaagg ccctttggaa 50

gtcgtctgaag ctgccgtcag ccaatccagt ggactcgcag ccaaatttgt 100

catccactgt cacatcccc agtgggactc cgacaaatgt gaagaacagc 150

tggaagagac catcaaaaac tgctgtctg cagcagagga caagaagctt 200

aaatccgtcg ccttcccacc gttccccagt ggcagaaact gcttcccaa 250

acagacggcc gccaggtga cctcaaggc catctcggct cacttcgacg 300

actcgagctc gtcctcgtg aagaatgtgt acttctgct cttcgacagc 350

gagacatcgg catctacgtg caggagatgg ccaaactgga caccaagtag 400

ctctctccag tggcggcgaa ggaggaggat cggcgtgacg tcacaagagc 450

gggggtttta ttttttataa ggattgcaga aggggtgacg ggcatggg 498

<210> 4

<211> 1935

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

gaatttggcc ctcgaggcca agaattcggc acgaggcgcg gcgcccagcg 50

caggcagagc gctgtcgcac ccggggcgtc caccgccat ggggctctcc 100

tggagccgc gacctccact gctgatgac ctgctactgg tgctgtcgtt 150

gtggctgcca cttggagcag gaaactccct tgccacagag aacagggtttg 200

tgaacagctg taccagggcc agaaagaaat gcgaggctaa tcccgtttgc 250

aaggctgcct accagcacct gggctcctgc acctccagtt taagcaggcc 300

gctgccetta gaggagtctg ccatgtctgc agactgccta gaggcagcag 350

aacaactcag gaacagctct ctgatagact gcaggtgcca tcggcgcatg 400

aagcaccaag ctacctgtct ggacatttat tggaccgttc accctgcccg 450

aagccttggg gactacgagt tggatgtctc accctatgaa gacacagtga 500

ccagcaaacc ctggaaaatg aatcttagca agttgaacat gctcaaacca 550

10

20

30

gactcggacc tctgcctcaa atttgctatg ctgtgtactc ttcaacgacaa 600
 gtgtgaccgc ctgcgcaagg cctacgggga ggcattgctca gggatccgct 650
 gccagcgcca cctctgccta gccagctgc gctccttctt tgagaaggca 700
 gcagagtccc acgtcaggg tctgctgctg tgtccctgtg caccagaaga 750
 tgcgggctgt ggggagcggc ggcgtaacac catcgccccc agttgcgccc 800
 tgccttctgt aacccccaat tgcttgatc tgcggagctt ctgccgtgcg 850
 gaccctttgt gcagatcacg cctgatggac ttccagacc actgtcatcc 900
 tatggacatc cttgggactt gtgcaactga gcagtcaga tgtctgcggg 950
 catacctggg gctgattggg actgccatga ccccaaactt catcagcaag 1000
 gtcaaacacta ctgttgccct aagctgcacc tgccgaggca gggcaacct 1050
 acaggacgag tgtgaacagc tggaaaggtc cttctcccag aacccctgcc 1100
 tcgtggaggc cattgcagct aagatgcgtt tccacagaca gctcttctcc 1150
 caggactggg cagactctac tttttcagt gtgcagcagc agaacagcaa 1200
 cctgctctg agactgcagc ccaggtacc cattctttct ttctccatcc 1250
 ttcccttgat tctgctgcag accctctggt agctgggctt cctcagggtc 1300
 ctttgcctc tccaccacac ccagactgat ttgcagcctg tgggtggaga 1350
 gaactcgcca gcctgtggaa gaagacgag cgtgctacac agcaaccggg 1400
 aaccaaccag gcattccgca gcacatccc tctgctccag aagaggctct 1450
 agaagtgagg gctgtgaccc ttccgatcct gagcggctag ttttcaaacc 1500
 tcccttgccc ctgcttccct ctggctcagg ctgctcctcc ttaggacttt 1550
 gtgggtccag ttttgccctc tgttctgatg gtgattagcg gtcacctcc 1600
 agcgttctt cctgtttccc aggaccacc agaggctaag gaatcagtca 1650
 ttccctgttg cttctccag gaaggcaggc taagggttct gaggtgactg 1700
 agaaaaatgt ttctttgtg tggaggctg gtgctccagc ctccacgtcc 1750
 ctctgaatgg aagataaaaa cctgctggtg tcttgactgc tctgccaggc 1800
 aatcctgaac atttgggcat gaagagctaa agtctttggg tcttgtttaa 1850
 ctcctattac tgtcccaaaa ttccctagt cccttgggtc atgattaaac 1900
 attttgactt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1935

10

20

30

<211> 622
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5

Glu	Phe	Gly	Pro	Arg	Gly	Gln	Glu	Phe	Gly	Thr	Arg	Arg	Gly	Ala	
1				5					10					15	
Gln	Arg	Arg	Gln	Ser	Ala	Val	Ala	Ser	Arg	Ala	Ser	Thr	Arg	His	
				20					25					30	
Gly	Ala	Leu	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Thr	Ala	Asp	Asp	Pro	Ala	
				35					40					45	
Thr	Gly	Ala	Val	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Trp	Ser	Arg	Lys	Leu	Pro	
				50					55					60	
Cys	His	Arg	Glu	Gln	Val	Cys	Glu	Gln	Leu	Tyr	Pro	Gly	Gln	Lys	
				65					70					75	
Glu	Met	Arg	Gly	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	
				80					85					90	
Leu	Leu	His	Leu	Gln	Phe	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Leu	Arg	Gly	Val	
				95					100					105	
Cys	His	Val	Cys	Arg	Leu	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Thr	Thr	Gln	Glu	
				110					115					120	
Gln	Leu	Ser	Asp	Arg	Leu	Gln	Val	Pro	Ser	Ala	His	Glu	Ala	Pro	
				125					130					135	
Ser	Tyr	Leu	Ser	Gly	His	Leu	Leu	Asp	Arg	Ser	Pro	Cys	Pro	Lys	
				140					145					150	
Pro	Trp	Leu	Arg	Val	Gly	Cys	Leu	Thr	Leu	Arg	His	Ser	Asp	Gln	
				155					160					165	
Gln	Thr	Leu	Glu	Lys	Ser	Gln	Val	Glu	His	Ala	Gln	Thr	Arg	Leu	
				170					175					180	
Gly	Pro	Leu	Pro	Gln	Ile	Cys	Tyr	Ala	Val	Tyr	Ser	Ser	Arg	Gln	
				185					190					195	
Val	Pro	Pro	Ala	Gln	Gly	Leu	Arg	Gly	Gly	Met	Leu	Arg	Asp	Pro	
				200					205					210	
Leu	Pro	Ala	Pro	Pro	Leu	Pro	Ser	Pro	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Glu	
				215					220					225	
Gly	Ser	Arg	Val	Pro	Arg	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Cys	
				230					235					240	
Thr	Arg	Arg	Cys	Gly	Leu	Trp	Gly	Ala	Ala	Ala	His	His	Arg	Pro	
				245					250					255	
Gln	Leu	Arg	Pro	Ala	Phe	Cys	Asn	Pro	Gln	Leu	Pro	Gly	Ser	Ala	

10

20

30

260	265	270
Glu Leu Leu Pro Cys Gly Pro Phe Val Gln Ile Thr Pro Asp Gly		
275	280	285
Leu Pro Asp Pro Leu Ser Ser Tyr Gly His Pro Trp Asp Leu Cys		
290	295	300
Asn Ala Val Gln Met Ser Ala Gly Ile Pro Gly Ala Asp Trp Asp		
305	310	315
Cys His Asp Pro Lys Leu His Gln Gln Gly Gln His Tyr Cys Cys		
320	325	330
Leu Lys Leu His Leu Pro Arg Gln Arg Gln Pro Thr Gly Arg Val		
335	340	345
Thr Ala Gly Lys Val Leu Leu Pro Glu Pro Leu Pro Arg Gly Gly		
350	355	360
His Cys Ser Asp Ala Phe Pro Gln Thr Ala Leu Leu Pro Gly Leu		
365	370	375
Gly Arg Leu Tyr Phe Phe Ser Gly Ala Ala Ala Glu Gln Gln Pro		
380	385	390
Cys Ser Glu Thr Ala Ala Gln Ala Thr His Ser Phe Phe Leu His		
395	400	405
Pro Ser Leu Asp Ser Ala Ala Asp Pro Leu Val Ala Gly Leu Pro		
410	415	420
Gln Gly Pro Leu Ser Ser Pro Pro His Pro Asp Phe Ala Ala Cys		
425	430	435
Gly Gly Arg Glu Leu Ala Ser Leu Trp Lys Lys Thr Gln Arg Ala		
440	445	450
Thr Gln Gln Pro Gly Thr Asn Gln Ala Phe Arg Ser Thr Ser Arg		
455	460	465
Leu Leu Gln Lys Arg Ser Lys Gly Leu Pro Phe Arg Ser Ala Ala		
470	475	480
Ser Phe Gln Thr Ser Leu Ala Pro Ala Ser Phe Trp Leu Arg Leu		
485	490	495
Leu Leu Leu Arg Thr Leu Trp Val Gln Phe Cys Leu Leu Phe Trp		
500	505	510
Leu Ala Ala His Leu Gln Arg Phe Phe Leu Phe Pro Arg Thr Thr		
515	520	525
Gln Arg Leu Arg Asn Gln Ser Phe Pro Val Ala Phe Ser Arg Lys		
530	535	540
Ala Gly Gly Phe Gly Asp Glu Lys Cys Phe Leu Cys Val Glu Gly		

10

20

30

545	550	555
Trp Cys Ser Ser Leu His Val Pro Leu Asn Gly Arg Lys Pro Ala		
560	565	570
Gly Val Leu Thr Ala Leu Pro Gly Asn Pro Glu His Leu Gly Met		
575	580	585
Lys Ser Ser Leu Trp Val Leu Phe Asn Ser Tyr Tyr Cys Pro Gln		
590	595	600
Ile Pro Leu Val Pro Trp Val Met Ile Lys His Phe Asp Leu Lys		
605	610	615
Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys		
620	622	

<210> 6
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Phe Leu Ala Thr Leu Tyr Phe Ala Leu Pro Leu Leu Asp Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Ala Glu Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Asp Cys Val
 20 25 30
 Lys Ala Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Thr Lys
 35 40 45
 Tyr Arg Thr Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe
 50 55 60
 Ser Leu Ala Ser Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala
 65 70 75
 Met Glu Ala Leu Lys Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys
 80 85 90
 Arg Gly Met Lys Lys Glu Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser
 95 100 105
 Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro
 110 115 120
 Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu Ser Asp Ile Phe Arg Val Val
 125 130 135
 Pro Phe Ile Ser Val Glu His Ile Pro Lys Gly Asn Asn Cys Leu
 140 145 150
 Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asp Asp Ile Cys Lys Lys Tyr
 155 160 165
 Arg Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr Ser Val Ser Asn Asp

10

20

30

170	175	180
Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe		
185	190	195
Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser		
200	205	210
Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Val		
215	220	225
Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn		
230	235	240
Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu		
245	250	255
Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser		
260	265	270
Ser Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser		
275	280	285
Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser		
290	295	300
Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn		
305	310	315
Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn		
320	325	330
Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Ser Asp		
335	340	345
Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val Gln Thr Thr Thr Ala		
350	355	360
Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys Pro Leu Gly Pro		
365	370	375
Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu Pro Pro Cys		
380	385	390
Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser Gly Asn		
395	400	405
Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly Leu		
410	415	420
Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro		
425	430	435
Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu		
440	445	450
Ser Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr Ser		

10

20

30

<210> 7
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Met	Ile	Leu	Ala	Asn	Val	Phe	Phe	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Asp	Glu	
1				5					10					15	
Thr	Leu	Arg	Ser	Leu	Ala	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Gln	Asp	Pro	Glu	
				20					25					30	
Leu	His	Gly	Trp	Arg	Pro	Pro	Val	Asp	Cys	Val	Arg	Ala	Asn	Glu	
				35					40					45	
Leu	Cys	Ala	Ala	Glu	Ser	Asn	Cys	Ser	Ser	Arg	Tyr	Arg	Thr	Leu	
				50					55					60	
Arg	Gln	Cys	Leu	Ala	Gly	Arg	Asp	Arg	Asn	Thr	Met	Leu	Ala	Asn	
				65					70					75	
Lys	Glu	Cys	Gln	Ala	Ala	Leu	Glu	Val	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Leu	
				80					85					90	
Tyr	Asp	Cys	Arg	Cys	Lys	Arg	Gly	Met	Lys	Lys	Glu	Leu	Gln	Cys	
				95					100					105	
Leu	Gln	Ile	Tyr	Trp	Ser	Ile	His	Leu	Gly	Leu	Thr	Glu	Gly	Glu	
				110					115					120	
Glu	Phe	Tyr	Glu	Ala	Ser	Pro	Tyr	Glu	Pro	Val	Thr	Ser	Arg	Leu	
				125					130					135	
Ser	Asp	Ile	Phe	Arg	Leu	Ala	Ser	Ile	Phe	Ser	Gly	Thr	Gly	Ala	
				140					145					150	
Asp	Pro	Val	Val	Ser	Ala	Lys	Ser	Asn	His	Cys	Leu	Asp	Ala	Ala	
				155					160					165	
Lys	Ala	Cys	Asn	Leu	Asn	Asp	Asn	Cys	Lys	Lys	Leu	Arg	Ser	Ser	
				170					175					180	
Tyr	Ile	Ser	Ile	Cys	Asn	Arg	Glu	Ile	Ser	Pro	Thr	Glu	Arg	Cys	
				185					190					195	
Asn	Arg	Arg	Lys	Cys	His	Lys	Ala	Leu	Arg	Gln	Phe	Phe	Asp	Arg	
				200					205					210	
Val	Pro	Ser	Glu	Tyr	Thr	Tyr	Arg	Met	Leu	Phe	Cys	Ser	Cys	Gln	
				215					220					225	
Asp	Gln	Ala	Cys	Ala	Glu	Arg	Arg	Arg	Gln	Thr	Ile	Leu	Pro	Ser	
				230					235					240	
Cys	Ser	Tyr	Glu	Asp	Lys	Glu	Lys	Pro	Asn	Cys	Leu	Asp	Leu	Arg	

10

20

30

245	250	255
Gly Val Cys Arg Thr Asp His Leu Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp		
260	265	270
Phe His Ala Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Gln Thr Val Thr Ser Cys		
275	280	285
Pro Ala Asp Asn Tyr Gln Ala Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Gly Met		
290	295	300
Ile Gly Phe Asp Met Thr Pro Asn Tyr Val Asp Ser Ser Pro Thr		
305	310	315
Gly Ile Val Val Ser Pro Trp Cys Ser Cys Arg Gly Ser Gly Asn		
320	325	330
Met Glu Glu Glu Cys Glu Lys Phe Leu Arg Asp Phe Thr Glu Asn		
335	340	345
Pro Cys Leu Arg Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Thr Asp		
350	355	360
Val Asn Val Ser Pro Lys Gly Pro Ser Phe Gln Ala Thr Gln Ala		
365	370	375
Pro Arg Val Glu Lys Thr Pro Ser Leu Pro Asp Asp Leu Ser Asp		
380	385	390
Ser Thr Ser Leu Gly Thr Ser Val Ile Thr Thr Cys Thr Ser Val		
395	400	405
Gln Glu Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asn Ser Lys Glu Leu Ser Met		
410	415	420
Cys Phe Thr Glu Leu Thr Thr Asn Ile Ile Pro Gly Ser Asn Lys		
425	430	435
Val Ile Lys Pro Asn Ser Gly Pro Ser Arg Ala Arg Pro Ser Ala		
440	445	450
Ala Leu Thr Val Leu Ser Val Leu Met Leu Lys Leu Ala Leu		
455	460	464

<210> 8

<211> 468

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

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

10

20

30

35	40	45
Tyr Arg Thr Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys Glu Thr Asn Phe		
50	55	60
Ser Leu Thr Ser Gly Leu Glu Ala Lys Asp Glu Cys Arg Ser Ala		
65	70	75
Met Glu Ala Leu Lys Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg Cys Lys		
80	85	90
Arg Gly Met Lys Lys Glu Lys Asn Cys Leu Arg Ile Tyr Trp Ser		
95	100	105
Met Tyr Gln Ser Leu Gln Gly Asn Asp Leu Leu Glu Asp Ser Pro		
110	115	120
Tyr Glu Pro Val Asn Ser Arg Leu Ser Asp Ile Phe Arg Ala Val		
125	130	135
Pro Phe Ile Ser Asp Val Phe Gln Gln Val Glu His Ile Ser Lys		
140	145	150
Gly Asn Asn Cys Leu Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asp Asp		
155	160	165
Thr Cys Lys Lys Tyr Arg Ser Ala Tyr Ile Thr Pro Cys Thr Thr		
170	175	180
Ser Met Ser Asn Glu Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala		
185	190	195
Leu Arg Gln Phe Phe Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly		
200	205	210
Met Leu Phe Cys Ser Cys Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg Arg		
215	220	225
Arg Gln Thr Ile Val Pro Val Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Arg		
230	235	240
Pro Asn Cys Leu Ser Leu Gln Asp Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile		
245	250	255
Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe Thr Asn Cys Gln Pro Glu		
260	265	270
Ser Arg Ser Val Ser Asn Cys Leu Lys Glu Asn Tyr Ala Asp Cys		
275	280	285
Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val Met Thr Pro Asn		
290	295	300
Tyr Val Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp Cys Asp Cys		
305	310	315
Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Asp Cys Leu Lys Phe Leu Asn		

10

20

30

320	325	330
Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys	Asn Ala Ile Gln Ala Phe	
335	340	345
Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Met Trp	Gln Pro Ala Pro Pro Val	
350	355	360
Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr	Ala Phe Arg Val Lys Asn	
365	370	375
Lys Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu	Asn Glu Ile Pro Thr His	
380	385	390
Val Leu Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln	Ala Gln Lys Leu Lys Ser	
395	400	405
Asn Val Ser Gly Ser Thr His Leu Cys	Leu Ser Asp Ser Asp Phe	
410	415	420
Gly Lys Asp Gly Leu Ala Gly Ala Ser	Ser His Ile Thr Thr Lys	
425	430	435
Ser Met Ala Ala Pro Pro Ser Cys Ser	Leu Ser Ser Leu Pro Val	
440	445	450
Leu Met Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu	Leu Ser Val Ser Leu Ala	
455	460	465
Glu Thr Ser		
468		
<210> 9		
<211> 464		
<212> PRT		
<213> Rattus Norvegicus		
<400> 9		
Met Ile Leu Ala Asn Ala Phe Cys Leu	Phe Phe Phe Leu Asp Glu	
1	5	10
Thr Leu Arg Ser Leu Ala Ser Pro Ser	Ser Leu Gln Gly Ser Glu	
20	25	30
Leu His Gly Trp Arg Pro Gln Val Asp	Cys Val Arg Ala Asn Glu	
35	40	45
Leu Cys Ala Ala Glu Ser Asn Cys Ser	Ser Arg Tyr Arg Thr Leu	
50	55	60
Arg Gln Cys Leu Ala Gly Arg Asp Arg	Asn Thr Met Leu Ala Asn	
65	70	75
Lys Glu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Val	Leu Gln Glu Ser Pro Leu	
80	85	90
Tyr Asp Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met	Lys Lys Glu Leu Gln Cys	

10

20

30

95	100	105
Leu Gln Ile Tyr Trp Ser Ile His Leu Gly Leu Thr Glu Gly Glu		
110	115	120
Glu Phe Tyr Glu Ala Ser Pro Tyr Glu Pro Val Thr Ser Arg Leu		
125	130	135
Ser Asp Ile Phe Arg Leu Ala Ser Ile Phe Ser Gly Thr Gly Thr		
140	145	150
Asp Pro Ala Val Ser Thr Lys Ser Asn His Cys Leu Asp Ala Ala		
155	160	165
Lys Ala Cys Asn Leu Asn Asp Asn Cys Lys Lys Leu Arg Ser Ser		
170	175	180
Tyr Ile Ser Ile Cys Asn Arg Glu Ile Ser Pro Thr Glu Arg Cys		
185	190	195
Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe Asp Arg		
200	205	210
Val Pro Ser Glu Tyr Thr Tyr Arg Met Leu Phe Cys Ser Cys Gln		
215	220	225
Asp Gln Ala Cys Ala Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Leu Pro Ser		
230	235	240
Cys Ser Tyr Glu Asp Lys Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asp Leu Arg		
245	250	255
Ser Leu Cys Arg Thr Asp His Leu Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp		
260	265	270
Phe His Ala Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Arg Thr Ile Thr Ser Cys		
275	280	285
Pro Ala Asp Asn Tyr Gln Ala Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Gly Met		
290	295	300
Ile Gly Phe Asp Met Thr Pro Asn Tyr Val Asp Ser Asn Pro Thr		
305	310	315
Gly Ile Val Val Ser Pro Trp Cys Asn Cys Arg Gly Ser Gly Asn		
320	325	330
Met Glu Glu Glu Cys Glu Lys Phe Leu Arg Asp Phe Thr Glu Asn		
335	340	345
Pro Cys Leu Arg Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn Gly Thr Asp		
350	355	360
Val Asn Met Ser Pro Lys Gly Pro Ser Leu Pro Ala Thr Gln Ala		
365	370	375
Pro Arg Val Glu Lys Thr Pro Ser Leu Pro Asp Asp Leu Ser Asp		

10

20

30

380	385	390
Ser Thr Ser Leu Gly Thr Ser Val Ile Thr Thr Cys Thr Ser Ile		
395	400	405
Gln Glu Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asn Ser Lys Glu Leu Ser Met		
410	415	420
Cys Phe Thr Glu Leu Thr Thr Asn Ile Ser Pro Gly Ser Lys Lys		
425	430	435
Val Ile Lys Leu Asn Ser Gly Ser Ser Arg Ala Arg Leu Ser Ala		
440	445	450
Ala Leu Thr Ala Leu Pro Leu Leu Met Leu Thr Leu Ala Leu		
455	460	464

10

<210> 10
 <211> 282
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <221> unknown
 <222> 7-8, 11, 13, 15, 17, 19, 78, 152-188
 <223> unknown base

<400> 10
 gcgctgntg ncngnangng ggggcgggag gtgccggtcg agggagcccc 50
 gctctcagag ctccagggga ggagcgangg gagcgcggag cccggccgcc 100
 tacagctcgc catggtgcgc cccctgaacc cgcgaccgct gccgcccgtg 150
 gnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnngc ctctcgcagc 200
 cggagacccc ctccccacag aaagccgact catgaacagc tgtctccagg 250
 ccaggaggaa gtgccaggct gatccacact gc 282

20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 11
 gcctctcgca gccggagacc 20

30

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 12
 cagggtgggat cagcctggca c 21

<210> 13

<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 13
tctcgcagcc ggagaccccc ttccacaga aagccgactc a 41

<210> 14
<211> 1792
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
atggtgcgcc cctgaaccc ggcacgctg ccgcccgtag tctgatgtt 50
gctgctgctg ctgcgcgct cgccgctgcc tctcgcagcc ggagaccccc 100
ttccacaga aagccgactc atgaacagct gtctccaggc caggaggaag 150
tgccaggctg atccacactg cagtgcctgcc taccaccacc tggattcctg 200
cacctctagc ataagcacc cactgccttc agaggagcct tcggtccctg 250
ctgactgcct ggaggcagca cagcaactca ggaacagctc tctgataggc 300
tgcatgtgcc accggcgcat gaagaaccag gttgcctgct tggacatcta 350
ttggaccgtt caccgtgcc gcagccttgg taactatgag ctggatgtct 400
ccccctatga agacacagt accagcaaac cctggaaaat gaatctcagc 450
aaactgaaca tgctcaaacc agactcagac ctctgcctca agtttgccat 500
gctgtgtact ctcaatgaca agtgtgaccg gctgcgcaag gcctacgggg 550
aggcgtgctc cgggccccac tgccagcgcc acgtctgcct caggcagctg 600
ctcactttct togagaaggc cgcgagccc caccgcgagg gcctgctact 650
gtgccatgt gccccaacg accggggctg cggggagcgc cggcgcaaca 700
ccatgccccc caactgcgcg ctgcgcctg tggccccaa ctgcctggag 750
ctgcggcgcc tctgcttctc cgaccgctt tgcagatcac gcctgggtga 800
tttcagacc cactgccatc ccatggacat cctaggaact tgtgcaacag 850
agcagtccag atgtctacga gcatacctgg ggctgattgg gactgccatg 900
acccccaaact ttgtcagcaa tgtcaacacc agtgttgct taagctgcac 950
ctgcgagggc agtggcaacc tgaggagga gtgtgaaatg ctggaagggt 1000
tcttctccca caaccctgc ctacggagg ccattgcagc taagatgcgt 1050
tttcacagcc aactcttctc ccaggactgg ccacacccta cctttgctgt 1100

10

20

30

gatggcacac cagaatgaaa accctgctgt gagggcacag ccctgggtgc 1150
 cctctctttt ctctgcacg cttcccttga ttctgctcct gagcctatgg 1200
 tagctggact tccccagggc cctcttcccc tccaccacac ccaggtggac 1250
 ttgcagccca caaggggtga ggaaaggaca gcagcaggaa ggaggtgcag 1300
 tgcgcagatg agggcacagg agaagctaag ggttatgacc tccagatcct 1350
 tactgggtcca gtctcattc cctccacccc atctccactt ctgattcatg 1400
 ctgcccctcc ttggtggcca caatttagcc atgtcatctg gtggtgacca 1450
 gctccaccaa gcccttttct gagcccttcc tcttgactac caggatcacc 1500
 agaatctaata agtttagcct ttctctattg cattccagat tagggttagg 1550
 gtagggagga ctgggtgttc tgaggcagcc tagaaagtca ttctcctttg 1600
 tgaagaaggc tctgcccccc tcgtctctct ctctgagtgg aggatggaaa 1650
 actactgcct gcactgcctt gtccccggat cctgccgaac atctgggcat 1700
 caggagctgg agcctgtggg ccttgcttta ttctatttat tgtcctaaag 1750
 tctctctggg ctcttggatc atgattaaac ctttgactta ag 1792

<210> 15

<211> 400

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

10

20

30

His Arg Ala Arg Ser Leu Gly Asn Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro
 125 130 135
 Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser
 140 145 150
 Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser Asp Leu Cys Leu Lys Phe
 155 160 165
 Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys Asp Arg Leu Arg Lys
 170 175 180
 Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys Gln Arg His Val
 185 190 195
 Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala Ala Glu Pro
 200 205 210
 His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn Asp Arg
 215 220 225
 Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys Ala
 230 235 240
 Leu Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys
 245 250 255
 Phe Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr
 260 265 270
 His Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln
 275 280 285
 Ser Arg Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met
 290 295 300
 Thr Pro Asn Phe Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser
 305 310 315
 Cys Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met
 320 325 330
 Leu Glu Gly Phe Phe Ser His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile
 335 340 345
 Ala Ala Lys Met Arg Phe His Ser Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp
 350 355 360
 Pro His Pro Thr Phe Ala Val Met Ala His Gln Asn Glu Asn Pro
 365 370 375
 Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Val Pro Ser Leu Phe Ser Cys Thr
 380 385 390
 Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu Trp
 395 400

10

20

30

<210> 16
 <211> 1837
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 cccaggaccc tgggtgggaga gtgtgtgcgt cgcgctggag ggcgggaggc 50
 gggggcggga ggtgccggtc gagggagccc cgctctcaga gctccagggg 100
 aggagcgagg ggagcgcgga gcccggcgcc tacagctcgc catggtgcgc 150
 cccctgaacc cgcgaccgct gccgcccgtg gtctgatgt tgctgtgtgt 200
 gctgcgcgcg tcgcccgtgc ctctcgcagc cggagacccc cttcccacag 250
 aaagccgact catgaacagc tgtctccagg ccaggaggaa gtgccaggct 300
 gatccccact gcagtgtgtc ctaccaccac ctggattcct gcacctctag 350
 cataagcacc ccactgccct cagaggagcc ttccgtccct gctgactgcc 400
 tggaggcagc acagcaactc aggaacagct ctctgatagg ctgcatgtgc 450
 caccggcgca tgaagaacca ggttgccctg ttggacatct attggaccgt 500
 tcaccgtgcc cgcagccttg actcagacct ctgcctcaag tttgccatgc 550
 tgtgtactct caatgacaag tgtgaccggc tgcgcaaggc ctacggggag 600
 gcgtgctccg ggccccactg ccagcggcac gtctgcctca ggcagctgct 650
 cactttcttc gagaaggccg ccgagcccca cgcgcagggc ctgctactgt 700
 gcccatgtgc ccccaacgac cggggctgcg gggagcgcg gcgcaacacc 750
 atcgcaccca actgcgcgct gccgcctgtg gcccccaact gcctggagct 800
 gcggcgccct tgcttctccg acccgctttg cagatcacgc ctggtggatt 850
 tccagaccca ctgccatccc atggacatcc taggaacttg tgcaacagag 900
 cagtccagat gtctacgagc atacctgggg ctgattggga ctgccatgac 950
 ccccaacttt gtcagcaatg tcaacaccag tgttgcccta agctgcacct 1000
 gccgaggcag tggcaacctg caggaggagt gtgaaatgct ggaagggttc 1050
 ttctcccaca acccctgcct caccgaggcc attgcagcta agatgcgttt 1100
 tcacagccaa ctcttctccc aggactggcc acacctacc tttgctgtga 1150
 tggcacacca gaatgaaaac cctgctgtga ggccacagcc ctgggtgccc 1200
 tctcttttct cctgcacgct tcccttgatt ctgctcctga gcctatggta 1250
 gctggacttc cccaggggcc tcttcccctc caccacacc aggtggactt 1300

10

20

30

gcagcccaca aggggtgagg aaaggacagc agcaggaagg aggtgcagtg 1350
 cgcagatgag ggcacaggag aagctaaggg ttatgacctc cagatcctta 1400
 ctggtccagt cctcattccc tccaccccat ctccacttct gattcatgct 1450
 gccctccttt ggtggccaca atttagccat gtcattctggt ggtgaccagc 1500
 tccaccaagc ccttttctga gcccttcctc ttgactacca ggatcaccag 1550
 aatctaataa gttagccttt ctctattgca ttccagatta gggttagggt 1600
 agggaggact ggggtgtctg aggcagccta gaaagtcatt ctctttgtg 1650
 aagaaggctc ctgccccctc gtctcctcct ctgagtggag gatggaaaac 1700
 tactgcctgc actgcctgt ccccgatcc tgcgaacat ctgggcatca 1750
 ggagctggag cctgtgggccc ttgctttatt cctattattg tcctaaagtc 1800
 tctctgggct cttggatcat gattaaacct ttgactt 1837

<210> 17
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Met Val Arg Pro Leu Asn Pro Arg Pro Leu Pro Pro Val Val Leu
 1 5 10 15
 Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Ser Pro Leu Pro Leu Ala Ala
 20 25 30
 Gly Asp Pro Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser Cys Leu
 35 40 45
 Gln Ala Arg Arg Lys Cys Gln Ala Asp Pro Thr Cys Ser Ala Ala
 50 55 60
 Tyr His His Leu Asp Ser Cys Thr Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu
 65 70 75
 Pro Ser Glu Glu Pro Ser Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala
 80 85 90
 Gln Gln Leu Arg Asn Ser Ser Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg
 95 100 105
 Arg Met Lys Asn Gln Val Ala Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val
 110 115 120
 His Arg Ala Arg Ser Leu Asp Ser Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala
 125 130 135
 Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys Asp Arg Leu Arg Lys Ala
 140 145 150

10

20

30

Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys Gln Arg His Val Cys
 155 160 165
 Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala Ala Glu Pro His
 170 175 180
 Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn Asp Arg Gly
 185 190 195
 Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys Ala Leu
 200 205 210
 Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys Phe
 215 220 225
 Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr His
 230 235 240
 Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser
 245 250 255
 Arg Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr
 260 265 270
 Pro Asn Phe Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys
 275 280 285
 Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met Leu
 290 295 300
 Glu Gly Phe Phe Ser His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala
 305 310 315
 Ala Lys Met Arg Phe His Ser Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Pro
 320 325 330
 His Pro Thr Phe Ala Val Met Ala His Gln Asn Glu Asn Pro Ala
 335 340 345
 Val Arg Pro Gln Pro Trp Val Pro Ser Leu Phe Ser Cys Thr Leu
 350 355 360
 Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu Trp
 365 369
 <210> 18
 <211> 628
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <400> 18
 Met Val Arg Pro Leu Asn Pro Arg Pro Leu Pro Pro Val Val Leu
 1 5 10 15
 Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Ser Pro Leu Pro Leu Ala Ala
 20 25 30

10

20

30

Gly Asp Pro Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser Cys Leu
 35 40 45
 Gln Ala Arg Arg Lys Cys Gln Ala Asp Pro Thr Cys Ser Ala Ala
 50 55 60
 Tyr His His Leu Asp Ser Cys Thr Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu
 65 70 75
 Pro Ser Glu Glu Pro Ser Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala
 80 85 90
 Gln Gln Leu Arg Asn Ser Ser Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg
 95 100 105
 Arg Met Lys Asn Gln Val Ala Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val
 110 115 120
 His Arg Ala Arg Ser Leu Gly Asn Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro
 125 130 135
 Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser
 140 145 150
 Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser Asp Leu Cys Leu Lys Phe
 155 160 165
 Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys Asp Arg Leu Arg Lys
 170 175 180
 Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys Gln Arg His Val
 185 190 195
 Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala Ala Glu Pro
 200 205 210
 His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn Asp Arg
 215 220 225
 Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys Ala
 230 235 240
 Leu Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys
 245 250 255
 Phe Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr
 260 265 270
 His Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln
 275 280 285
 Ser Arg Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met
 290 295 300
 Thr Pro Asn Phe Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser
 305 310 315

10

20

30

Cys Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met
 320 325 330
 Leu Glu Gly Phe Phe Ser His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile
 335 340 345
 Ala Ala Lys Met Arg Phe His Ser Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp
 350 355 360
 Pro His Pro Thr Phe Ala Val Met Ala His Gln Asn Glu Asn Pro
 365 370 375
 Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Val Pro Ser Leu Phe Ser Cys Thr
 380 385 390
 Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu Trp Pro Asp Lys Thr His
 395 400 405
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 410 415 420
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 425 430 435
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 440 445 450
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 455 460 465
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 470 475 480
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 485 490 495
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 500 505 510
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 515 520 525
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 530 535 540
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 545 550 555
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 560 565 570
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 575 580 585
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 590 595 600

10

20

30

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 605 610 615
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 620 625 628
 <210> 19
 <211> 951
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val
 1 5 10 15
 Val Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala
 20 25 30
 Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys
 35 40 45
 Asp Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Leu Glu Pro Ser Ser Leu Gln
 50 55 60
 Gly Ser Glu Leu His Gly Trp Arg Pro Gln Val Asp Cys Val Arg
 65 70 75
 Ala Asn Glu Leu Cys Ala Ala Glu Ser Asn Cys Ser Ser Arg Tyr
 80 85 90
 Arg Thr Leu Arg Gln Cys Leu Ala Gly Arg Asp Arg Asn Thr Met
 95 100 105
 Leu Ala Asn Lys Glu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Val Leu Gln Glu
 110 115 120
 Ser Pro Leu Tyr Asp Cys Arg Cys Lys Arg Gly Met Lys Lys Glu
 125 130 135
 Leu Gln Cys Leu Gln Ile Tyr Trp Ser Ile His Leu Gly Leu Thr
 140 145 150
 Glu Gly Glu Glu Phe Tyr Glu Ala Ser Pro Tyr Glu Pro Val Thr
 155 160 165
 Ser Arg Leu Ser Asp Ile Phe Arg Leu Ala Ser Ile Phe Ser Gly
 170 175 180
 Thr Gly Thr Asp Pro Ala Val Ser Thr Lys Ser Asn His Cys Leu
 185 190 195
 Asp Ala Ala Lys Ala Cys Asn Leu Asn Asp Asn Cys Lys Lys Leu
 200 205 210
 Arg Ser Ser Tyr Ile Ser Ile Cys Asn Arg Glu Ile Ser Pro Thr
 215 220 225

10

20

30

Glu Arg Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe
 230 235 240
 Phe Asp Arg Val Pro Ser Glu Tyr Thr Tyr Arg Met Leu Phe Cys
 245 250 255
 Ser Cys Gln Asp Gln Ala Cys Ala Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile
 260 265 270
 Leu Pro Ser Cys Ser Tyr Glu Asp Lys Glu Lys Pro Asn Cys Leu
 275 280 285
 Asp Leu Arg Ser Leu Cys Arg Thr Asp His Leu Cys Arg Ser Arg
 290 295 300
 Leu Ala Asp Phe His Ala Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Arg Thr Ile
 305 310 315
 Thr Ser Cys Pro Ala Asp Asn Tyr Gln Ala Cys Leu Gly Ser Tyr
 320 325 330
 Ala Gly Met Ile Gly Phe Asp Met Thr Pro Asn Tyr Val Asp Ser
 335 340 345
 Asn Pro Thr Gly Ile Val Val Ser Pro Trp Cys Asn Cys Arg Gly
 350 355 360
 Ser Gly Asn Met Glu Glu Glu Cys Glu Lys Phe Leu Arg Asp Phe
 365 370 375
 Thr Glu Asn Pro Cys Leu Arg Asn Ala Ile Gln Ala Phe Gly Asn
 380 385 390
 Gly Thr Asp Val Asn Met Ser Pro Lys Gly Pro Ser Leu Pro Ala
 395 400 405
 Thr Gln Ala Pro Arg Val Glu Lys Thr Pro Ser Leu Pro Asp Asp
 410 415 420
 Leu Ser Asp Ser Thr Ser Leu Gly Thr Ser Val Ile Thr Thr Cys
 425 430 435
 Thr Ser Ile Gln Glu Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asn Ser Lys Glu
 440 445 450
 Leu Ser Met Cys Phe Thr Glu Leu Thr Thr Asn Ile Ile Pro Gly
 455 460 465
 Trp Arg Ala Trp Val Pro Val Val Leu Gly Val Leu Thr Ala Leu
 470 475 480
 Val Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ile Leu Leu Arg Lys Arg Arg
 485 490 495
 Lys Glu Thr Arg Phe Gly Gln Ala Phe Asp Ser Val Met Ala Arg
 500 505 510

10

20

30

Gly Glu Pro Ala Val His Phe Arg Ala Ala Arg Ser Phe Asn Arg
 515 520 525
 Glu Arg Pro Glu Arg Ile Glu Ala Thr Leu Asp Ser Leu Gly Ile
 530 535 540
 Ser Asp Glu Leu Lys Glu Lys Leu Glu Asp Val Leu Ile Pro Glu
 545 550 555
 Gln Gln Phe Thr Leu Gly Arg Met Leu Gly Lys Gly Glu Phe Gly
 560 565 570
 Ser Val Arg Glu Ala Gln Leu Lys Gln Glu Asp Gly Ser Phe Val
 575 580 585
 Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ala Asp Ile Ile Ala Ser Ser
 590 595 600
 Asp Ile Glu Glu Phe Leu Arg Glu Ala Ala Cys Met Lys Glu Phe
 605 610 615
 Asp His Pro His Val Ala Lys Leu Val Gly Val Ser Leu Arg Ser
 620 625 630
 Arg Ala Lys Gly Arg Leu Pro Ile Pro Met Val Ile Leu Pro Phe
 635 640 645
 Met Lys His Gly Asp Leu His Ala Phe Leu Leu Ala Ser Arg Ile
 650 655 660
 Gly Glu Asn Pro Phe Asn Leu Pro Leu Gln Thr Leu Ile Arg Phe
 665 670 675
 Met Val Asp Ile Ala Cys Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser Arg Asn
 680 685 690
 Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Ala Glu
 695 700 705
 Asp Met Thr Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Lys Ile
 710 715 720
 Tyr Ser Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Cys Ala Ser Lys Leu Pro
 725 730 735
 Val Lys Trp Leu Ala Leu Glu Ser Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Thr
 740 745 750
 Val Gln Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile
 755 760 765
 Met Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Ala Gly Ile Glu Asn Ala Glu
 770 775 780
 Ile Tyr Asn Tyr Leu Ile Gly Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Pro
 785 790 795

10

20

30

Glu Cys Met Glu Asp Val Tyr Asp Leu Met Tyr Gln Cys Trp Ser
 800 805 810
 Ala Asp Pro Lys Gln Arg Pro Ser Phe Thr Cys Leu Arg Met Glu
 815 820 825
 Leu Glu Asn Ile Leu Gly Gln Leu Ser Val Leu Ser Ala Ser Gln
 830 835 840
 Asp Pro Leu Tyr Ile Asn Ile Glu Arg Ala Glu Glu Pro Thr Ala
 845 850 855
 Gly Gly Ser Leu Glu Leu Pro Gly Arg Asp Gln Pro Tyr Ser Gly
 860 865 870
 Ala Gly Asp Gly Ser Gly Met Gly Ala Val Gly Gly Thr Pro Ser
 875 880 885
 Asp Cys Arg Tyr Ile Leu Thr Pro Gly Gly Leu Ala Glu Gln Pro
 890 895 900
 Gly Gln Ala Glu His Gln Pro Glu Ser Pro Leu Asn Glu Thr Gln
 905 910 915
 Arg Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gly Leu Leu Pro His Ser Ser Cys
 920 925 930
 Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly
 935 940 945
 Lys Asp Leu Pro Val Leu
 950 951
 <210> 20
 <211> 888
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <400> 20
 Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val
 1 5 10 15
 Val Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala
 20 25 30
 Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys
 35 40 45
 Asp Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Leu Glu Ala Gly Asn Ser Leu
 50 55 60
 Ala Thr Glu Asn Arg Phe Val Asn Ser Cys Thr Gln Ala Arg Lys
 65 70 75
 Lys Cys Glu Ala Asn Pro Ala Cys Lys Ala Ala Tyr Gln His Leu
 80 85 90

10

20

30

Gly Ser Cys Thr Ser Ser Leu Ser Arg Pro Leu Pro Leu Glu Glu
 95 100 105
 Ser Ala Met Ser Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Glu Gln Leu Arg
 110 115 120
 Asn Ser Ser Leu Ile Asp Cys Arg Cys His Arg Arg Met Lys His
 125 130 135
 Gln Ala Thr Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Pro Ala Arg
 140 145 150
 Ser Leu Gly Asp Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr
 155 160 165
 Val Thr Ser Lys Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met
 170 175 180
 Leu Lys Pro Asp Ser Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys
 185 190 195
 Thr Leu His Asp Lys Cys Asp Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu
 200 205 210
 Ala Cys Ser Gly Ile Arg Cys Gln Arg His Leu Cys Leu Ala Gln
 215 220 225
 Leu Arg Ser Phe Phe Glu Lys Ala Ala Glu Ser His Ala Gln Gly
 230 235 240
 Leu Leu Leu Cys Pro Cys Pro Pro Glu Asp Ala Gly Cys Gly Glu
 245 250 255
 Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Ser Cys Ala Leu Pro Ser Val
 260 265 270
 Thr Pro Asn Cys Leu Asp Leu Arg Ser Phe Cys Arg Ala Asp Pro
 275 280 285
 Leu Cys Arg Ser Arg Leu Met Asp Phe Gln Thr His Cys His Pro
 290 295 300
 Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg Cys Leu
 305 310 315
 Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn Phe
 320 325 330
 Ile Ser Lys Val Asn Thr Thr Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg
 335 340 345
 Gly Ser Gly Asn Leu Gln Asp Glu Cys Glu Gln Leu Glu Arg Ser
 350 355 360
 Phe Ser Gln Asn Pro Cys Leu Val Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met
 365 370 375

10

20

30

Arg Phe His Arg Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Ala Asp Ser Thr	380	385	390
Phe Ser Val Val Gln Gln Gln Asn Ser Asn Pro Ala Trp Arg Ala	395	400	405
Trp Val Pro Val Val Leu Gly Val Leu Thr Ala Leu Val Thr Ala	410	415	420
Ala Ala Leu Ala Leu Ile Leu Leu Arg Lys Arg Arg Lys Glu Thr	425	430	435
Arg Phe Gly Gln Ala Phe Asp Ser Val Met Ala Arg Gly Glu Pro	440	445	450
Ala Val His Phe Arg Ala Ala Arg Ser Phe Asn Arg Glu Arg Pro	455	460	465
Glu Arg Ile Glu Ala Thr Leu Asp Ser Leu Gly Ile Ser Asp Glu	470	475	480
Leu Lys Glu Lys Leu Glu Asp Val Leu Ile Pro Glu Gln Gln Phe	485	490	495
Thr Leu Gly Arg Met Leu Gly Lys Gly Glu Phe Gly Ser Val Arg	500	505	510
Glu Ala Gln Leu Lys Gln Glu Asp Gly Ser Phe Val Lys Val Ala	515	520	525
Val Lys Met Leu Lys Ala Asp Ile Ile Ala Ser Ser Asp Ile Glu	530	535	540
Glu Phe Leu Arg Glu Ala Ala Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro	545	550	555
His Val Ala Lys Leu Val Gly Val Ser Leu Arg Ser Arg Ala Lys	560	565	570
Gly Arg Leu Pro Ile Pro Met Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His	575	580	585
Gly Asp Leu His Ala Phe Leu Leu Ala Ser Arg Ile Gly Glu Asn	590	595	600
Pro Phe Asn Leu Pro Leu Gln Thr Leu Ile Arg Phe Met Val Asp	605	610	615
Ile Ala Cys Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser Arg Asn Phe Ile His	620	625	630
Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Ala Glu Asp Met Thr	635	640	645
Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Lys Ile Tyr Ser Gly	650	655	660

10

20

30

Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Cys Ala Ser Lys Leu Pro Val Lys Trp
 665 670 675
 Leu Ala Leu Glu Ser Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Thr Val Gln Ser
 680 685 690
 Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Met Thr Arg
 695 700 705
 Gly Gln Thr Pro Tyr Ala Gly Ile Glu Asn Ala Glu Ile Tyr Asn
 710 715 720
 Tyr Leu Ile Gly Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Pro Glu Cys Met
 725 730 735
 Glu Asp Val Tyr Asp Leu Met Tyr Gln Cys Trp Ser Ala Asp Pro
 740 745 750
 Lys Gln Arg Pro Ser Phe Thr Cys Leu Arg Met Glu Leu Glu Asn
 755 760 765
 Ile Leu Gly Gln Leu Ser Val Leu Ser Ala Ser Gln Asp Pro Leu
 770 775 780
 Tyr Ile Asn Ile Glu Arg Ala Glu Glu Pro Thr Ala Gly Gly Ser
 785 790 795
 Leu Glu Leu Pro Gly Arg Asp Gln Pro Tyr Ser Gly Ala Gly Asp
 800 805 810
 Gly Ser Gly Met Gly Ala Val Gly Gly Thr Pro Ser Asp Cys Arg
 815 820 825
 Tyr Ile Leu Thr Pro Gly Gly Leu Ala Glu Gln Pro Gly Gln Ala
 830 835 840
 Glu His Gln Pro Glu Ser Pro Leu Asn Glu Thr Gln Arg Leu Leu
 845 850 855
 Leu Leu Gln Gln Gly Leu Leu Pro His Ser Ser Cys Ala Asp Ala
 860 865 870
 Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu
 875 880 885
 Pro Val Leu
 888

10

20

30

<210> 21
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 gcgaggggag cgcgaggccc ggcgctaca gctcgcc 37
 <210> 22

```

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 22
gccccgcgacc tccactgctg 20

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 23
ctgtggggag cggcggcg 18

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 24
cctgaaccta tggtaactgg 20

<210> 25
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 25
accagtcct ccctacc 17

```

10

20

【図 1 A】

[illegible]

FIG. 1A

【図 1 B】

[illegible]

FIG. 1B

FIG. 5B

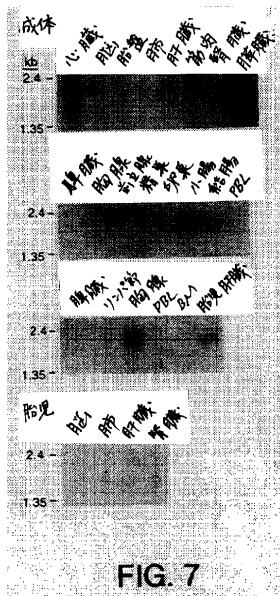
FIG. 5C

FIG. 5D

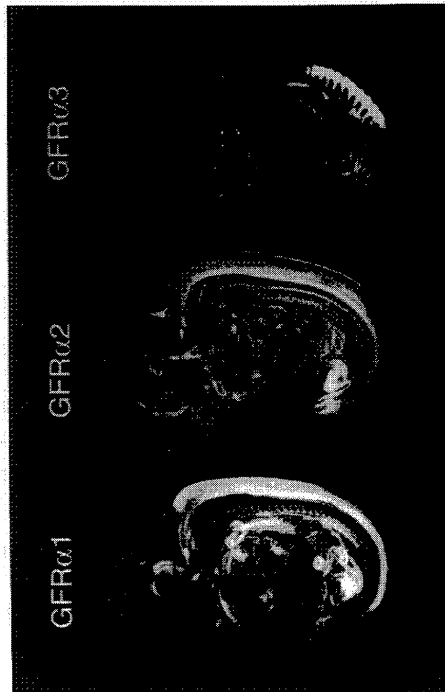
[illegible]

FIG. 6

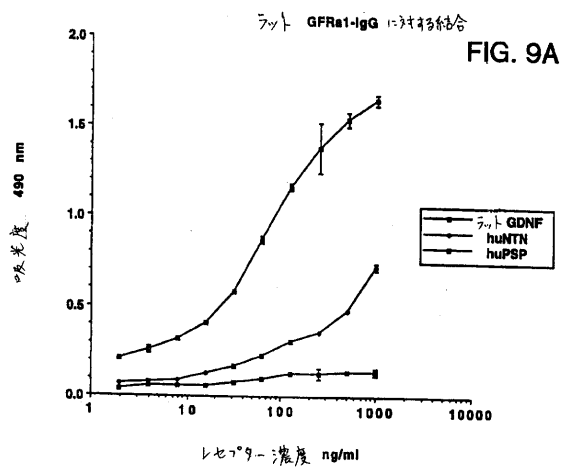
【図 7】



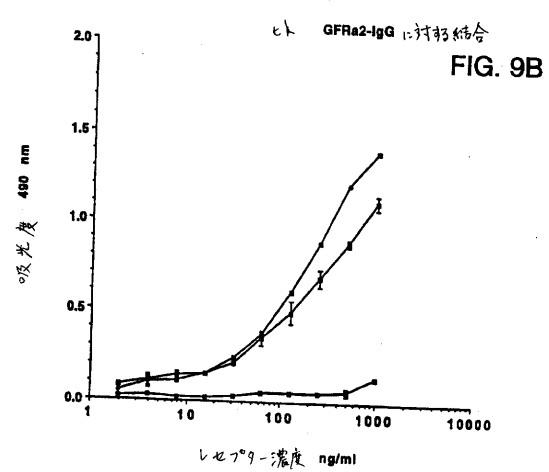
【図 8】



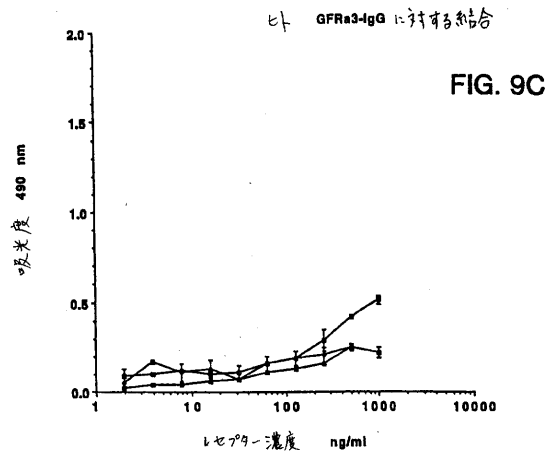
【図 9 A】



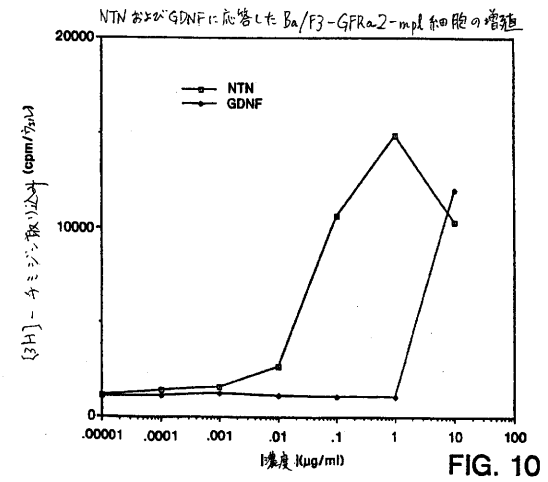
【図 9 B】



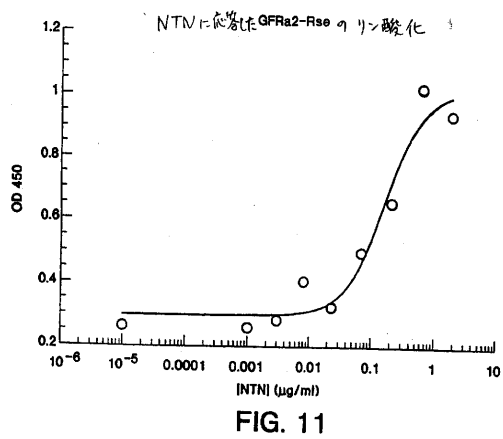
【図 9 C】



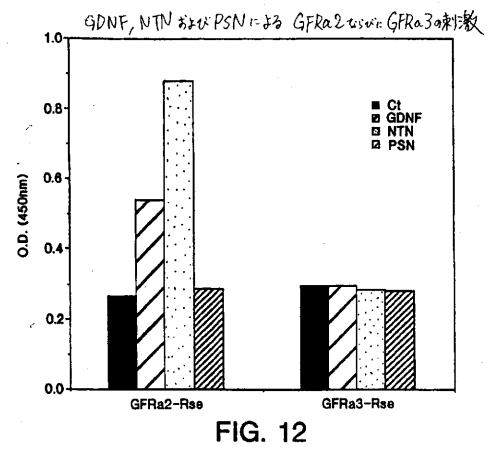
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【図 13】

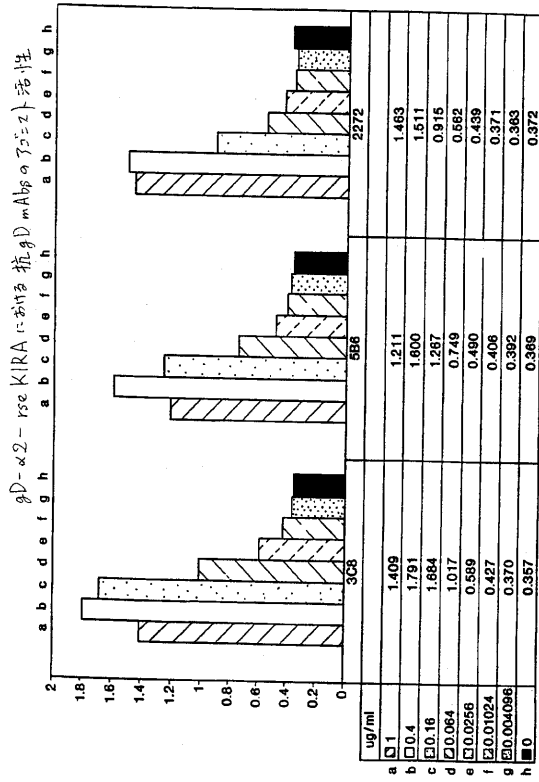


FIG. 13

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)

C 1 2 N	5/00	1 0 2
C 1 2 P	21/02	C

微生物の受託番号 ATCC 209752

前置審査

(72)発明者 クライン, ロバート ディー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 1, パロ アルト, ウェブスター ストリート
1 0 4 4

(72)発明者 フィリップス, ハイジ エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, パイン アベニュー 1 5

(72)発明者 ローゼンザル, アーノン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, バーリンゲイム, チューリップ コート 4
0

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第9 7 / 0 4 4 3 5 6 (WO, A 1)
特表2 0 0 2 - 5 0 5 5 7 6 (J P, A)
特開平1 0 - 3 3 7 1 8 9 (J P, A)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.95,No.3(1998.Feb.)p.1295-1300
J.Biol.Chem.,Vol.272,No.52(1997)p.33111-33117
J.Biol.Chem.,Vol.271,No.39(1996)p.23634-23637
Prog.Growth Factor Res.,Vol.5,No.1(1994)p.37-54

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq