

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-187111

(P2012-187111A)

(43) 公開日 平成24年10月4日(2012.10.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 C O 8 6

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-118337 (P2012-118337)	(71) 出願人	596129215
(22) 出願日	平成24年5月24日 (2012. 5. 24)		シェーリング コーポレイション
(62) 分割の表示	特願2001-582389 (P2001-582389)		Schering Corporation
原出願日	平成13年5月10日 (2001. 5. 10)		アメリカ合衆国, ニュージャージー, 07
(31) 優先権主張番号	60/203, 426		033, ケニルワース, ギャロッピング
(32) 優先日	平成12年5月10日 (2000. 5. 10)		ヒル ロード 2000
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物レセプタータンパク質；関連する試薬および方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】哺乳動物の生理機能（免疫系の機能を含む）に影響を与える、組成物および方法を提供する。発生および／または免疫系を調節する方法を提供する。

【解決手段】実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチドであって、特定の配列の細胞内部分の少なくとも10個連続したアミノ酸を含む、ポリペプチド。このポリペプチドは、a) 特定の配列の細胞内部分の少なくとも25個連続したアミノ酸を含むか；b) 特定の配列の細胞内部分を含む組換え体であるか；c) 特定の配列の非細胞内部分の少なくとも10個連続したアミノ酸をさらに含むか；d) 特定の配列の細胞外部分の少なくとも25個のアミノ酸を含むか；e) 成熟した特定の配列を含むか；またはf) 実質的に純粋な天然ポリペプチドである。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本明細書中に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、哺乳動物の生理機能（免疫系の機能を含む）に影響を与える、組成物および方法に関する。特に、本発明は、発生および／または免疫系を調節する方法を提供する。これらの物質の診断的使用および治療的使用もまた開示される。

10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

組換え DNA 技術とは一般に、ドナー供給源由来の遺伝情報を、（例えば、宿主への導入を通して）その後の処理のためにベクター中に組み込み、それにより、移入された遺伝情報が新たな環境においてコピーおよび／または発現される技術をいう。通常、遺伝情報は、所望のタンパク質産物をコードするメッセンジャー RNA (mRNA) から誘導された相補的 DNA (cDNA) の形態で存在する。キャリアは頻繁に、後の複製のための cDNA を宿主中に組み込み、そしていくつかの場合には実際にこの cDNA の発現を制御し、そしてそれによって宿主におけるコード産物の合成を導く能力を有する、プラスミドである。例えば、非特許文献 1 を参照のこと。

20

【0003】

かなり長い間、哺乳動物免疫応答が、「免疫ネットワーク」と呼ばれる、一連の複雑な細胞性相互作用に基づくことが知られている。近年の研究は、このネットワークの内部活動に新たな洞察を提供した。免疫応答の多くは実際に、リンパ球、マクロファージ、顆粒球および他の細胞のネットワーク様相互作用の周囲を廻ることが明らかであるが、免疫学者は現在一般に、リンホカイン、サイトカインまたはモノカインとして公知の可溶性タンパク質が、これらの細胞相互作用を制御する際に重要な役割を果たすという見解を支持する。従って、細胞調節因子の単離、特徴付けおよび作用機構にかなりの興味が存在し、その理解は、多数の医学的異常（例えば、免疫系の障害）診断および治療において著しい進歩を導く。

30

【0004】

リンホカインは明らかに、細胞活性を種々の方法で媒介する。例えば、非特許文献 2；および非特許文献 3 を参照のこと。これらは、多能性造血幹細胞の増殖 (proliferation)、成長 (growth) および／または複雑な免疫系を作り上げる多様な細胞性系列を含む莫大な数の子孫への分化を支持することが示された。健常な免疫応答のためには、細胞性成分間の適切かつバランスのとれた相互作用が必要である。リンホカインが他の薬剤とともに投与された場合、異なる細胞系列はしばしば、異なる様式で応答する。

【0005】

40

免疫応答に特に重要である細胞系列としては、以下の 2 つのクラスのリンパ球が挙げられる：B 細胞（これは、免疫グロブリン（異物を認識して結合し、その除去をもたらす能力を有するタンパク質）を産生および分泌し得る）およびリンホカインを分泌し、そして免疫ネットワークを作り上げる B 細胞および種々の他の細胞（他の T 細胞を含む）を誘導または抑制する種々のサブセットの T 細胞。これらのリンパ球は、他の多くの細胞型と相互作用する。

【0006】

種々の免疫障害をより良好に理解し、そして処置するための研究は、免疫系の細胞をインビトロで維持することが通常できないことによって妨げられている。免疫学者は、これらの細胞の多くを培養することが、T 細胞および他の細胞の上清（これは、多くのリンホ

50

カインを含めて、種々の増殖因子を含む)の使用を通して達成され得ることを見出した。

形態形成発生を調節する種々の増殖因子および調節因子が存在する。サイトカインについての多くのレセプターが公知である。しばしば、機能的レセプターには少なくとも2つの重要なサブユニットが存在する。例えば、非特許文献4；非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；ならびに非特許文献9を参照のこと。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Sambrookら(1989)Molecular Cloning : A Laboratory Manual (第2版)第1~3巻, CSH Press, NY

10

【非特許文献2】Paul編(1996)Fundamental Immunology 第3版, Raven Press, New York

【非特許文献3】Thomson編(1994)The Cytokine Handbook 第2版, Academic Press, San Diego

【非特許文献4】Heinrichら(1998)Biochem. J. 334: 297 - 314

【非特許文献5】GondaおよびD'Andrea(1997)Blood 89: 355 - 369

【非特許文献6】Preskyら(1996)Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93: 14002 - 14007

20

【非特許文献7】DrachmanおよびKaushansky(1995)Curr. Opin. Hematol. 2: 22 - 28

【非特許文献8】Theze(1994)Eur. Cytokine Netw. 5: 353 - 368

【非特許文献9】LemmonおよびSchlessinger(1994)Trends Biochem. Sci. 19: 459 - 463

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

30

前述のことから、新たな可溶性タンパク質およびそれらのレセプター(リンホカインに類似する可溶性タンパク質およびそれらのレセプターを含む)の発見および開発が、例えば、免疫系および/または造血細胞の発生、分化または機能を直接的または間接的に含む、広範な変性状態または異常状態のための新たな治療に寄与するはずであることが明らかである。特に、他のリンホカインの有益な活性を増強または強化するリンホカイン様分子に対する新規レセプターの発見および理解は、非常に有利である。本発明は、サイトカイン様組成物に対する類似性を示すリガンドについての新たなレセプターおよび関連する化合物、ならびにそれらの使用のための方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

40

(発明の要旨)

本発明は、サイトカインレセプターに関連した新規レセプター(例えば、DNA X サイトカインレセプターサブユニット(DCRS)と称される、霊長類のサイトカインレセプター様分子構造体)およびそれらの生物学的活性に関する。特に、本発明は、DCRS5と称される1つのサブユニットの説明を提供する。本発明は、ポリペプチド自体をコードする核酸、ならびにそれらの産生および使用のための方法を包含する。本発明の核酸は、本明細書中に含まれるクローニングされた相補的なDNA(cDNA)配列へのそれらの相同性によって部分的に特徴付けられる。さらに、本発明は、レセプターサブユニットDCRS5およびIL-12R 1とのp40/IL-B30リガンドの適合を提供し、この対形成は、アゴニストおよびアンタゴニストに対する試薬に基づいた、アゴニストおよ

50

びアンタゴニストの使用のための指標の洞察を提供する。

【0010】

本発明は、配列番号2の細胞内部分の少なくとも10個連続したアミノ酸を含む実質的に純粋なまたは組換えポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、このポリペプチドは以下である：配列番号2の細胞内部分の少なくとも25個連続したアミノ酸を含む；配列番号2の細胞内部分を含む組換え体である；配列番号2の非細胞内部分の少なくとも10個連続したアミノ酸をさらに含む；配列番号2の細胞外部分の少なくとも25個のアミノ酸を含む；成熟した配列番号2を含む；または実質的に純粋な天然ポリペプチドである。他では、この組換えポリペプチドは以下である：表1の成熟配列からなる；非グリコシル化ポリペプチドである；ヒト由来である；配列番号2の少なくとも40個連続したアミノ酸を含む；配列番号2の少なくとも15個連続したアミノ酸の少なくとも3個の非重複セグメントを示す；配列番号2の天然の多型改変体である；少なくとも約30アミノ酸の長さを有する；霊長類DCRS5に特異的である少なくとも2個の非重複エピトープを示す；天然グリコシル化状態で少なくとも30kDの分子量を有する；合成ポリペプチドである；無菌形態にある；水溶液もしくは緩衝化溶液中に存在する；固体基材に結合している；別の化学的部分に結合している；またはIL-12R 1ポリペプチドと物理的に会合している。

10

【0011】

本発明の他の実施形態は、以下を提供する：配列番号2の細胞内部分の少なくとも6個連続したアミノ酸の少なくとも2個の別個の非重複セグメントを含む、実質的に純粋なもしくは組換えポリペプチド；配列番号2の細胞内部分の少なくとも12個連続したアミノ酸を含む、実質的に純粋なもしくは組換えポリペプチド；または成熟した配列番号2を含む、実質的に純粋な天然配列ポリペプチド。特定の形態では、配列番号2の細胞内部分の少なくとも6個連続したアミノ酸の少なくとも2個の別個の非重複セグメントを含むポリペプチドは、ここで、別個の非重複セグメントが：第一の少なくとも12個のアミノ酸を含む；第一の少なくとも7個のアミノ酸および第二の少なくとも9個のアミノ酸を含む；少なくとも6個のアミノ酸の第三の別個のセグメントを含む；またはR355-L373、P378-L405、V407-D426、K428-D439、P441-V452、I454-G460、I465-T587もしくはN592-606のうちの1つを含む；あるいはこのポリペプチドが、配列番号2の細胞外部分の少なくとも6個連続したアミノ酸の少なくとも2個の別個の非重複セグメントをさらに含む。あるいは、配列番号2の細胞内部分の少なくとも12個連続したアミノ酸を含むポリペプチドは、以下のポリペプチドである：少なくとも12個連続したアミノ酸セグメントが、R355-L373、P378-L405、V407-D426、K428-D439、P441-V452、I454-G460、I465-T587もしくはN592-606のうちの1つを含む；またはこのポリペプチドが、配列番号2の細胞外部分の少なくとも6個連続したアミノ酸の少なくとも2個の別個の非重複セグメントをさらに含む。または、成熟した配列番号2を含む、純粋な天然配列ポリペプチドは、精製エピトープまたは検出エピトープをさらに含み得る。このようなポリペプチドは以下であり得る：表1の成熟配列からなる；非グリコシル化ポリペプチドである；ヒト由来である；配列番号2の少なくとも40個連続したアミノ酸を含む；配列番号2の少なくとも15個連続したアミノ酸の少なくとも3個の非重複セグメントを示す；配列番号2の天然の多型改変体である；少なくとも約30アミノ酸の長さを有する；霊長類DCRS5に特異的である少なくとも2個の非重複エピトープを示す；天然のグリコシル化状態で少なくとも30kDの分子量を有する；合成ポリペプチドである；無菌形態にある；水溶液もしくは緩衝化溶液中に存在する；固体基材に結合している；別の化学的部分に結合している；またはIL-12R 1ポリペプチドと物理的に会合している。

20

30

40

【0012】

例えば以下を含む、種々の他の組成物が提供される：IL-12R 1タンパク質と合わされた実質的に純粋なポリペプチド；またはキャリア中のこのようなポリペプチド（こ

50

ここで、このキャリアは、水、生理食塩水および／もしくは緩衝液を含む、水性化合物である；ならびに／または経口的、直腸的、鼻腔内、局所的または非経口的な投与のために処方される）。

【0013】

このようなポリペプチドおよび以下を含むキットが提供される：このポリペプチドを含む区画；I L - 1 2 R 1ポリペプチドを含む区画；p 4 0、I L - B 3 0もしくはp 4 0 / I L - B 3 0ポリペプチドを含む区画；またはこのキット中の試薬の使用もしくは廃棄に関する使用説明書。

【0014】

D C R S 5の細胞内部分に特異的に結合する、例えば、抗体由来の抗原結合部位を含む、抗体および他の結合化合物が提供され、ここで：この結合化合物は、容器中に存在する；このポリペプチドは、ヒト由来である；この結合化合物は、F v、F a bもしくはF a b 2フラグメントである；この結合化合物は、別の化学的部分に結合している；またはこの抗体は：表1の成熟ポリペプチドのペプチド配列に対して惹起される；成熟D C R S 5に対して惹起される；精製ヒトD C R S 5に対して惹起される；免疫選択される；ポリクローナル抗体である；変性したD C R S 5に結合する；少なくとも30 μ Mの、抗原に対するK dを示す；ビーズもしくはプラスチックメンブレンを含む、固体基材に結合されている；無菌組成物である；または放射性標識もしくは蛍光標識を含め、検出可能に標識されている。結合化合物および以下を含むキットもまた提供される：この結合化合物を含む区画；区画であって、p 4 0ポリペプチド；I L - B 3 0ポリペプチド；D C R S 5ポリペプチド；および／もしくはI L - 1 2 R 1ポリペプチドを含む、区画；抗体を含む区画であって、この抗体が、p 4 0ポリペプチド；I L - B 3 0ポリペプチド；D C R S 5ポリペプチド；および／もしくはI L - 1 2 R 1ポリペプチドに選択的に結合する、区画；またはこのキット中の試薬の使用もしくは廃棄に関する使用説明書。

【0015】

例えば、抗原：抗体複合体を産生する方法であって、適切な条件下で、霊長類D C R S 5ポリペプチドと抗体とを接触させ、それによって複合体を形成させる工程を包含する、方法また提供される。このような方法においては、以下であり得る：この複合体が、他のサイトカインレセプターから精製される；この複合体が、他の抗体から精製される；接触させる工程が、インターフェロンを含むサンプルとである；接触させる工程が、抗原の定量的検出を可能にする；接触させる工程が、抗体を含むサンプルとである；または接触させる工程が、前記抗体の定量的検出を可能にする。他の組成物（例えば、無菌の結合化合物、または結合化合物およびキャリアを含む組成物）が提供される：ここで、このキャリアは：水、生理食塩水および／もしくは緩衝液を含む、水性化合物である；ならびに／または経口的、直腸的、鼻腔内、局所的または非経口的な投与のために処方される。

【0016】

本発明はまた、D C R S 5ポリペプチドをコードする、単離されたまたは組換え核酸を提供し、ここで：D C R S 5はヒト由来である；あるいはこの核酸は：表1の抗原性ペプチド配列をコードする；表1の複数の抗原性ペプチド配列をコードする；少なくとも13ヌクレオチドにわたって、このセグメントをコードする天然のc D N Aに対する同一性を示す；発現ベクターである；複製起点をさらに含む；天然の供給源由来である；検出可能な標識を含む；合成ヌクレオチド配列を含む；6 k b未満、好ましくは3 k b未満である；霊長類由来である；天然の全長コード配列を含む；D C R S 5をコードする遺伝子についてのハイブリダイゼーションプローブである；またはP C Rプライマー、P C R産物もしくは変異誘発プライマーである。細胞が以下であるものを含めて、この組換え核酸を含む細胞が提供される：原核生物細胞；真核生物細胞；細菌細胞；酵母細胞；昆虫細胞；哺乳動物細胞；マウス細胞；霊長類細胞；またはヒト細胞。

【0017】

キットの実施形態としては、この核酸および以下を含むキットが挙げられる：この核酸を含む区画；核酸を含む区画であって、この核酸が、p 4 0ポリペプチド；I L - B 3 0

10

20

30

40

50

ポリペプチド；DCRS5ポリペプチド；および／もしくはIL-12R 1ポリペプチドをコードする、区画；p40ポリペプチド；IL-B30ポリペプチド；DCRS5ポリペプチド；および／もしくはIL-12R 1ポリペプチドを含む、区画；抗体を含む区画であって、この抗体が、p40ポリペプチド；IL-B30ポリペプチド；DCRS5ポリペプチド；および／もしくはIL-12R 1ポリペプチドに選択的に結合する、区画；またはこのキット中の試薬の使用もしくは廃棄に関する使用説明書。

【0018】

他の核酸実施形態としては、以下である実施形態が挙げられる：30分間、30 で、そして2M未満の塩の洗浄条件下で、細胞内部分をコードする配列番号1の部分にハイブリダイズする；または少なくとも約30ヌクレオチドのストレッチにわたって、霊長類DCRS5の細胞内部分に対する同一性を示す。好ましくは、このような核酸は、以下である核酸である：洗浄条件が、45 および／もしくは500mM塩；または55 および／もしくは150mM塩；またはこのストレッチが少なくとも55ヌクレオチドまたは75ヌクレオチドである。

【0019】

治療的使用としては、細胞の生理機能または発達を調節する方法であって、この細胞を、以下と接触させる工程を包含する方法が挙げられる：霊長類DCRS5の細胞外部分および／または霊長類IL-12R 1の細胞外部分を含む複合体である、p40/IL-B30のアンタゴニスト；霊長類DCRS5および／または霊長類IL-12R 1を含む複合体を結合する抗体である、p40/IL-B30のアンタゴニスト；DCRS5に結合する抗体である、p40/IL-B30のアンタゴニスト；IL-12R 1に対する抗体である、p40/IL-B30のアンタゴニスト；DCRS5もしくはIL-12R 1に対するアンチセンス核酸である、p40/IL-B30のアンタゴニスト；または霊長類DCRS5および／もしくは霊長類IL-12R 1を含む複合体を結合する抗体である、p40/IL-B30のアゴニスト。1つの型の方法では、この接触させる工程は、アンタゴニストとであり、そして、この接触させる工程は、IL-12、IL-18、TNFまたはIFN に対するアンタゴニストとの組合せにおいてである；あるいはこの細胞は、慢性TH1媒介性疾患の徴候もしくは症状を示す；多発性硬化症、慢性関節リウマチ、変形性関節症、炎症性腸疾患、糖尿病、乾癬もしくは敗血症の症状もしくは徴候を示す；または同種異系移植を受けている宿主由来である。逆に、この方法は、アゴニストと接触させ得、そして：この接触させる工程は、IL-12、IL-18、TNFまたはIFN との組合せにおいてである；あるいはこの細胞は、慢性Th2応答の徴候もしくは症状を示す；腫瘍、ウイルスもしくは真菌の増殖に罹っている；ワクチンを受けている；またはアレルギー応答に罹っている宿主由来である。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する：

(項目1) 実質的に純粋なポリペプチドまたは組換えポリペプチドであって、配列番号2の細胞内部分の少なくとも10個連続したアミノ酸を含む、ポリペプチド。

(項目2) 項目1に記載のポリペプチドであって、ここで：

a) 前記ポリペプチドが、配列番号2の細胞内部分の少なくとも25個連続したアミノ酸を含む；

b) 前記ポリペプチドが、配列番号2の細胞内部分を含む組換え体である；

c) 前記ポリペプチドが、配列番号2の非細胞内部分の少なくとも10個連続したアミノ酸をさらに含む；

d) 前記ポリペプチドが、配列番号2の細胞外部分の少なくとも25個のアミノ酸を含む；

e) 前記ポリペプチドが、成熟した配列番号2を含む；または

f) 前記ポリペプチドが、実質的に純粋な天然ポリペプチドである、ポリペプチド。

(項目3) 項目1に記載の組換えポリペプチドであって、該ポリペプチドが：

a) 表1の成熟配列からなる；

10

20

30

40

50

- b) 非グリコシル化ポリペプチドである；
- c) ヒト由来である；
- d) 配列番号 2 の少なくとも 40 個連続したアミノ酸を含む；
- e) 配列番号 2 の少なくとも 15 個連続したアミノ酸の少なくとも 3 個の非重複セグメントを示す；
- f) 配列番号 2 の天然の多型改変体である；
- g) 少なくとも約 30 アミノ酸の長さを有する；
- h) 霊長類 D C R S 5 に特異的である少なくとも 2 個の非重複エピートープを示す；
- i) 天然のグリコシル化状態で少なくとも 30 k D の分子量を有する；
- j) 合成ポリペプチドである；
- k) 無菌形態にある；
- l) 水溶液もしくは緩衝化溶液中に存在する；
- m) 固体基材に結合している；
- n) 別の化学的部分に結合体化している；または
- o) I L - 1 2 R 1 ポリペプチドと物理的に会合している、
ポリペプチド。

10

(項目 4) 組成物であって、以下：

- a) 配列番号 2 の細胞内部分の少なくとも 6 個連続したアミノ酸の少なくとも 2 個の別個の非重複セグメントを含む、実質的に純粋なポリペプチドもしくは組換えポリペプチド
i
- b) 配列番号 2 の細胞内部分の少なくとも 12 個連続したアミノ酸を含む、実質的に純粋なポリペプチドもしくは組換えポリペプチド；または
- c) 成熟した配列番号 2 を含む、実質的に純粋な天然配列ポリペプチド
から選択される物質の組成物。

20

(項目 5) ポリペプチドであって：

- 1) 項目 4 a に記載のポリペプチドであって、ここで：
 - a) 前記別個の非重複セグメントが：
 - i) 第一の少なくとも 12 個のアミノ酸を含む；
 - i i) 第一の少なくとも 7 個のアミノ酸および第二の少なくとも 9 個のアミノ酸を
含む；
 - i i i) 少なくとも 6 個のアミノ酸の第三の別個のセグメントを含む；または
 - i v) R 3 5 5 - L 3 7 3、P 3 7 8 - L 4 0 5、V 4 0 7 - D 4 2 6、K 4 2 8
- D 4 3 9、P 4 4 1 - V 4 5 2、I 4 5 4 - G 4 6 0、I 4 6 5 - T 5 8 7 もしくは N
5 9 2 - 6 0 6 のうちの 1 つを含む；あるいは
 - b) 前記ポリペプチドが、配列番号 2 の細胞外部分の少なくとも 6 個連続したアミノ
酸の少なくとも 2 個の別個の非重複セグメントをさらに含む；
- 2) 項目 4 b に記載のポリペプチドであって、ここで：
 - a) 該少なくとも 12 個連続したアミノ酸セグメントが、R 3 5 5 - L 3 7 3、P 3
7 8 - L 4 0 5、V 4 0 7 - D 4 2 6、K 4 2 8 - D 4 3 9、P 4 4 1 - V 4 5 2、I 4
5 4 - G 4 6 0、I 4 6 5 - T 5 8 7 もしくは N 5 9 2 - 6 0 6 のうちの 1 つを含む；ま
たは
 - b) 前記ポリペプチドが、配列番号 2 の細胞外部分の少なくとも 6 個連続したアミノ
酸の少なくとも 2 個の別個の非重複セグメントをさらに含む；あるいは
- 3) 精製エピートープまたは検出エピートープをさらに含む、項目 4 c のポリペプチド
である、ポリペプチド。

30

40

(項目 6) 項目 4 に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドが：

- a) 表 1 の成熟配列からなる；
- b) 非グリコシル化ポリペプチドである；
- c) ヒト由来である；
- d) 配列番号 2 の少なくとも 40 個連続したアミノ酸を含む；

50

e) 配列番号 2 の少なくとも 15 個連続したアミノ酸の少なくとも 3 個の非重複セグメントを示す；

f) 配列番号 2 の天然の多型改変体である；

g) 少なくとも約 30 アミノ酸の長さを有する；

h) 霊長類 D C R S 5 に特異的である少なくとも 2 個の非重複エピトープを示す；

i) 天然のグリコシル化状態で少なくとも 30 k D の分子量を有する；

j) 合成ポリペプチドである；

k) 無菌形態にある；

l) 水溶液もしくは緩衝化溶液中に存在する；

m) 固体基材に結合している；

n) 別の化学的部分に結合体化している；または

o) I L - 1 2 R 1 ポリペプチドと物理的に会合している、ポリペプチド。

(項目 7) 組成物であって；

a) I L - 1 2 R 1 タンパク質と組み合わされた、項目 4 に記載の実質的に純粋なポリペプチド；または

b) 項目 4 に記載のポリペプチドおよびキャリアであって、ここで、該キャリアは；

i) 水、生理食塩水および / もしくは緩衝液を含む、水性化合物である；ならびに / または

i i) 経口的、直腸的、鼻腔内、局所的または非経口的な投与のために処方される、ポリペプチドおよびキャリアを含む、組成物。

(項目 8) キットであって、該キットは、項目 4 に記載のポリペプチドおよび；

a) 該ポリペプチドを含む区画；

b) I L - 1 2 R 1 ポリペプチドを含む区画；

c) p 4 0、I L - B 3 0 もしくは p 4 0 / I L - B 3 0 ポリペプチドを含む区画；または

d) 該キット中の試薬の使用もしくは廃棄に関する使用説明書を備える、キット。

(項目 9) 抗体由来の抗原結合部位を含む結合化合物であって、該結合化合物は、項目 1 に記載のポリペプチドの細胞内部分に特異的に結合し、ここで；

a) 該結合化合物は、容器中に存在する；

b) 該ポリペプチドは、ヒト由来である；

c) 該結合化合物は、F v、F a b もしくは F a b 2 フラグメントである；

d) 該結合化合物は、別の化学的部分に結合体化している；または

e) 該抗体は；

i) 表 1 の成熟ポリペプチドのペプチド配列に対して惹起される；

i i) 成熟 D C R S 5 に対して惹起される；

i i i) 精製ヒト D C R S 5 に対して惹起される；

i v) 免疫選択される；

v) ポリクローナル抗体である；

v i) 変性した D C R S 5 に結合する；

v i i) 少なくとも 30 μ M の、抗原に対する K d を示す；

v i i i) ビーズもしくはプラスチックメンブレンを含む、固体基材に結合されている；

i x) 無菌組成物である；または

x) 放射性標識もしくは蛍光標識を含み、検出可能に標識されている、結合化合物。

(項目 10) キットであって、項目 9 に記載の結合化合物および；

a) 該結合化合物を含む区画；

10

20

30

40

50

b) 区画であって、以下：

i) p 4 0 ポリペプチド；

i i) I L - B 3 0 ポリペプチド；

i i i) D C R S 5 ポリペプチド；および / もしくは

i v) I L - 1 2 R 1 ポリペプチド

を含む、区画；

c) 抗体を含む区画であって、該抗体が、以下：

i) p 4 0 ポリペプチド；

i i) I L - B 3 0 ポリペプチド；

i i i) D C R S 5 ポリペプチド；および / もしくは

i v) I L - 1 2 R 1 ポリペプチド

に選択的に結合する、区画；または

d) 該キット中の試薬の使用もしくは廃棄に関する使用説明書を備える、キット。

(項目 1 1) 抗原：抗体複合体を産生する方法であって、適切な条件下で、霊長類 D C R S 5 ポリペプチドと項目 9 に記載の抗体とを接触させ、それによって該複合体を形成させる工程を包含する、方法。

(項目 1 2) 項目 1 1 に記載の方法であって、ここで：

a) 前記複合体が、他のサイトカインレセプターから精製される；

b) 前記複合体が、他の抗体から精製される；

c) 前記接触させる工程が、インターフェロンを含むサンプルとの接触である；

d) 前記接触させる工程が、前記抗原の定量的検出を可能にする；

e) 前記接触させる工程が、前記抗体を含むサンプルとの接触である；または

f) 前記接触させる工程が、前記抗体の定量的検出を可能にする、

方法。

(項目 1 3) 組成物であって、以下：

a) 項目 9 に記載の無菌の結合化合物、または

b) 項目 9 に記載の結合化合物およびキャリアであって、ここで、該キャリアは：

i) 水、生理食塩水および / もしくは緩衝液を含む、水性化合物である；ならびに /

または

i i) 経口的、直腸的、鼻腔内、局所的または非経口的な投与のために処方される、

ポリペプチドおよびキャリア

を含む、組成物。

(項目 1 4) 項目 1 に記載の D C R S 5 ポリペプチドをコードする、単離された核酸または組換え核酸であって、ここで、

a) D C R S 5 が、ヒト由来であるか；または

b) 該核酸が、

i) 表 1 の抗原性ペプチド配列をコードする；

i i) 表 1 の複数の抗原性ペプチド配列をコードする；

i i i) 少なくとも 1 3 ヌクレオチドにわたって、このセグメントをコードする天然

c D N A に対する同一性を示す；

i v) 発現ベクターである；

v) 複製起点をさらに含む；

v i) 天然の供給源由来である；

v i i) 検出可能な標識を含む；

v i i i) 合成ヌクレオチド配列を含む；

i x) 6 k b 未満、好ましくは 3 k b 未満である；

x) 霊長類由来である；

x i) 天然の全長コード配列を含む；

x i i) D C R S 5 をコードする遺伝子についてのハイブリダイゼーションプローブ

10

20

30

40

50

である；または

x i i i) P C R プライマー、P C R 産物もしくは変異誘発プライマーである。

(項目 1 5) 項目 1 4 に記載の組換え核酸を含む、細胞または組織。

(項目 1 6) 項目 1 5 に記載の細胞であって、ここで該細胞が：

a) 原核生物細胞；

b) 真核生物細胞；

e) 細菌細胞；

d) 酵母細胞；

e) 昆虫細胞；

f) 哺乳動物細胞；

g) マウス細胞；

h) 霊長類細胞；または

i) ヒト細胞

である、細胞。

(項目 1 7) キットであって、該キットは、項目 1 4 に記載の核酸および：

a) 該核酸を含む区画；

b) 核酸を含む区画であって、該核酸が、以下：

i) p 4 0 ポリペプチド；

i i) I L - B 3 0 ポリペプチド；

i i i) D C R S 5 ポリペプチド；および / もしくは

i v) I L - 1 2 R 1 ポリペプチド

をコードする、区画；

c) 区画であって、以下：

i) p 4 0 ポリペプチド；

i i) I L - B 3 0 ポリペプチド；

i i i) D C R S 5 ポリペプチド；および / もしくは

i v) I L - 1 2 R 1 ポリペプチド

を含む、区画；

d) 抗体を含む区画であって、該抗体が、以下：

i) p 4 0 ポリペプチド；

i i) I L - B 3 0 ポリペプチド；

i i i) D C R S 5 ポリペプチド；および / もしくは

i v) I L - 1 2 R 1 ポリペプチド

に選択的に結合する、区画；または

e) 該キット中の試薬の使用もしくは廃棄に関する使用説明書

を備える、キット。

(項目 1 8) 核酸であって、a) 3 0 分間、3 0 で、そして 2 M 未満の塩の洗浄条件下で、細胞内部分をコードする配列番号 1 の部分にハイブリダイズする；または b) 少なくとも約 3 0 ヌクレオチドのストレッチにわたって、霊長類 D C R S 5 の細胞内部分に対する同一性を示す。

(項目 1 9) a) 前記洗浄条件が、4 5 および / もしくは 5 0 0 m M 塩；または b) 前記ストレッチが少なくとも 5 5 ヌクレオチドである、項目 1 8 に記載の核酸。

(項目 2 0) a) 前記洗浄条件が、5 5 および / もしくは 1 5 0 m M 塩；または b) 前記ストレッチが少なくとも 7 5 ヌクレオチドである、項目 1 8 に記載の核酸。

(項目 2 1) 細胞の生理機能または発達を調整する方法であって、該方法は、該細胞を、以下：

a) 以下を含む複合体である、p 4 0 / I L - B 3 0 のアンタゴニスト：

i) 霊長類 D C R S 5 の細胞外部分；および / もしくは

i i) 霊長類 I L - 1 2 R 1 の細胞外部分；

b) 以下を含む複合体を結合する抗体である、p 4 0 / I L - B 3 0 のアンタゴニスト

10

20

30

40

50

：

i) 霊長類 D C R S 5 ; および / もしくは

i i) 霊長類 I L - 1 2 R 1 ;

c) D C R S 5 に結合する抗体である、p 4 0 / I L - B 3 0 のアンタゴニスト ;

d) I L - 1 2 R 1 に対する抗体である、p 4 0 / I L - B 3 0 のアンタゴニスト ;

e) D C R S 5 もしくは I L - 1 2 R 1 に対するアンチセンス核酸である p 4 0 / I L - B 3 0 のアンタゴニスト ; または

f) 以下を含む複合体を結合する抗体である、p 4 0 / I L - B 3 0 のアゴニスト :

i) 霊長類 D C R S 5 ; および / もしくは

i i) 霊長類 I L - 1 2 R 1

と接触させる工程を包含する、方法。

(項目 2 2) 項目 2 1 に記載の方法であって、ここで、前記接触させる工程が、アンタゴニストとの接触であり、そして :

a) 該接触させる工程が、以下 :

i) I L - 1 2 ;

i i) I L - 1 8 ;

i i i) T N F ; または

i v) I F N

に対するアンタゴニストとの組合せにおいてである ; あるいは

b) 前記細胞が、以下 :

i) 慢性 T h 1 媒介性疾患の徴候もしくは症状を示す ;

i i) 多発性硬化症、慢性関節リウマチ、変形性関節症、炎症性腸疾患、糖尿病、乾癬もしくは敗血症の症状もしくは徴候を示す ; または

i i i) 同種異系移植を受けている

宿主由来である、方法。

(項目 2 3) 項目 2 1 に記載の方法であって、ここで、前記接触させる工程が、アゴニストとの接触であり、そして :

a) 該接触させる工程が、以下 :

i) I L - 1 2 ;

i i) I L - 1 8 ;

i i i) T N F ; または

i v) I F N

との組合せにおいてである ; あるいは

b) 前記細胞が、以下 :

i) 慢性 T H 2 応答の徴候もしくは症状を示す ;

i i) 腫瘍、ウイルスもしくは真菌の増殖に罹っている ;

i i i) ワクチンを受けている ; または

i v) アレルギー応答に罹っている

宿主由来である、方法。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 0 】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

(大要)

I . 概要

I I . 活性

I I I . 核酸

A . コードするフラグメント、配列、プローブ

B . 変異誘発、キメラ、融合物

C . 核酸の作製

D . 含むベクター、細胞

10

20

30

40

50

- I V . タンパク質、ペプチド
 - A . フラグメント、配列、免疫原、抗原
 - B . ムテイン
 - C . アゴニスト / アンタゴニスト、機能的等価物
 - D . タンパク質の作製

- V . 核酸、タンパク質の作製
 - A . 合成
 - B . 組換え体
 - C . 天然の供給源

- V I . 抗体
 - A . ポリクローナル
 - B . モノクローナル
 - C . フラグメント ; K d
 - D . 抗イディオタイプ抗体
 - E . ハイブリドーマ細胞株

10

- V I I . キット、診断および定量
 - A . E L I S A
 - B . コードする m R N A のアッセイ
 - C . 定性的 / 定量的
 - D . キット

20

- V I I I . 治療組成物、方法
 - A . 組合せ組成物
 - B . 単位用量
 - C . 投与

- I X . スクリーニング
 - (I . 概要)

本発明は、構造的および生物学的の両方の特定の規定された特性を有する哺乳動物（本明細書中では霊長類）サイトカインレセプター様サブユニット分子のアミノ酸配列および DNA 配列を提供し、この分子は、DNA X サイトカインレセプターサブユニット 5（DCRS5）と称される。これらの分子をコードする種々の cDNA は、霊長類（例えば、ヒト）の cDNA 配列ライブラリーから入手された。他の霊長類または他の哺乳動物の対応物もまた所望される。

30

【0021】

さらに、本発明は、p40 / IL - B30 リガンドとレセプターサブユニット DCRS5 および IL - 12R 1 との適合を提供し、この対形成は、アゴニストおよびアンタゴニストに対する試薬に基づいた、アゴニストおよびアンタゴニストの使用のための指標の洞察を提供する。

【0022】

適用可能な標準的な方法のうちのいくつかは、例えば、以下に記載または参照される：Maniatis ら（1982）Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook ら（1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual,（第2版）, 第13巻, CSH Press, NY; Ausubel ら, Biology, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; または Ausubel ら（1987 および定期補充物）Current Protocols in Molecular Biology, Greene / Wiley, New York; これらの各々は、本明細書中に参考として援用される。

40

【0023】

霊長類（例えば、ヒト）の DCRS5 コードセグメントのヌクレオチド（配列番号 1）

50

および対応するアミノ酸配列（配列番号 2）を表 1 に示す。予測されるシグナル配列が示されるが、細胞型に依存し得るか、またはいずれかの方向のいくつかの残基であり得る。潜在的 N グリコシル化部位は、アスパラギン残基 6、24、58、118、157、209 および 250 にある。ジスルフィド結合は、29 位のシステイン残基と 78 位のシステイン残基との間に見出されるようである；そして保存された C_{XX}W モチーフは、110 位 / 121 位 / 123 位に見出される。219 位のトリプトファン；および 281 ~ 285 の W_{XX}WS モチーフが注目される。約 1 ~ 約 101 のセグメントは、Ig ドメインであり；約 102 ~ 約 195 のセグメントはサイトカイン結合ドメイン 1 であり；約 196 ~ 約 297 のセグメントはサイトカイン結合ドメイン 2 であり；約 298 ~ 約 330 のセグメントはリンカーであり；約 329 ~ 約 354 のセグメントは膜貫通セグメントであり；そして約 356 ~ 約 606 のセグメントは細胞内ドメインである。細胞内の特徴としては、Y374 - I377、Y461 - Q464 および Y588 - Q591 の推定 SH2 結合部位；ならびに 406、427、440 および 453 の潜在的に重要なチロシン残基が挙げられる。これらの部位および境界が注目される。

10

【0024】

ORF は、上記で示すように、...CHG/GIT... で切断されると予測される推定シグナル配列を含む。328 アミノ酸の予測細胞外ドメインには、推定膜貫通セグメントが続いており、そして最終的に約 252 アミノ酸の細胞質ドメインが続いている。リガンド結合機能は、細胞外ドメインに存在すると推定される。

20

【0025】

逆方向の翻訳核酸配列を表 2 に提供する。

【0026】

【表 1】

表1:DNA Xサイトカインレセプターサブユニット様実施形態(DCRS5)のヌクレオチド配列およびポリペプチド配列。霊長類(例えば、ヒトの実施形態(配列番号1および配列番号2を参照のこと)。予測されるシグナル配列が示されるが、いくつかの位置によって変動し得、そして細胞型に依存し得る。同定されたバリエーションの位置は、ヌクレオチド127およびヌクレオチド563であり;これらは、対になったGおよびG(QとGとの組合せへと翻訳される)または対になったTおよびA(HおよびRへと翻訳される)である。

gtggtacggg aattccattg tgttgggcag ccaacaaggg tggcagcctg gctctgaagt	60	
ggaattatgt gcttcaaaca gggtgaaaga gggaaacagt cttttcctgc ttccagac	118	
atg aat cak gtc act att caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata	166	
Met Asn Xaa Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile		10
-20 -15 -10		
ctc ttc agc tgg tgt cat gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc	214	
Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly		
-5 -1 1 5		
cac atc tgg gta gaa cca gcc aca att ttt aag atg ggt atg aat atc	262	
His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile		
10 15 20 25		
tct ata tat tgc caa gca gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt	310	
Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu		
30 35 40		
cat ttt tat aaa aat ggc atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att	358	
His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile		20
45 50 55		
aat aaa aca aca gct cgg ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat	406	
Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His		
60 65 70		
gct tct atg tac tgc act gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca	454	
Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr		
75 80 85		
ctg ata tgt gga aaa gac att tct tct gga tat ccg cca gat att cct	502	
Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro		
90 95 100 105		
gat gaa gta acc tgt gtc att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc	550	
Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys		30
110 115 120		
acc tgg aat gct rgg aag ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta	598	
Thr Trp Asn Ala Xaa Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val		
125 130 135		
cat gtg aag agt tta gag aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca	646	
His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser		
140 145 150		

(表1の続き)

agc tat att aac atc tcc act gat tca tta caa ggt ggc aag aag tac	694
Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr	
155 160 165	
ttg gtt tgg gtc caa gca gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa	742
Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys	
170 175 180 185	
caa ctg caa att cac ctg gat gat ata gtg ata cct tct gca gcc gtc	790
Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val	
190 195 200	
att tcc agg gct gag act ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att	838
Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile	
205 210 215	
tat tgg gat agt caa aca aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga	886
Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg	
220 225 230	
tac aag gct aca aca aac caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc	934
Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr	
235 240 245	
aat ttt aca tat gtg caa cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att	982
Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile	
250 255 260 265	
aag tac gta ttt caa gtg aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg	1030
Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp	
270 275 280	
cag cct tgg agt tca ccg ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca gtt ccc	1078
Gln Pro Trp Ser Ser Pro Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro	
285 290 295	
cag gtc aca tca aaa gca ttc caa cat gac aca tgg aat tct ggg cta	1126
Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu	
300 305 310	
aca gtt gct tcc atc tct aca ggg cac ctt act tct gac aac aga gga	1174
Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly	
315 320 325	
gac att gga ctt tta ttg gga atg atc gtc ttt gct gtt atg ttg tca	1222
Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser	
330 335 340 345	
att ctt tct ttg att ggg ata ttt aac aga tca ttc cga act ggg att	1270
Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile	
350 355 360	
aaa aga agg atc tta ttg tta ata cca aag tgg ctt tat gaa gat att	1318
Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile	
365 370 375	

10

20

30

(表1の続き)

cct aat atg aaa aac agc aat gtt gtg aaa atg cta cag gaa aat agt	1366
Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser	
380 385 390	
gaa ctt atg aat aat aat tcc agt gag cag gtc cta tat gtt gat ccc	1414
Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro	
395 400 405	
atg att aca gag ata aaa gaa atc ttc atc cca gaa cac aag cct aca	1462
Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr	
410 415 420 425	
gac tac aag aag gag aat aca gga ccc ctg gag aca aga gac tac ccg	1510
Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro	
430 435 440	
caa aac tcg cta ttc gac aat act aca gtt gta tat att cct gat ctc	1558
Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu	
445 450 455	
aac act gga tat aaa ccc caa att tca aat ttt ctg cct gag gga agc	1606
Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser	
460 465 470	
cat ctc agc aat aat aat gaa att act tcc tta aca ctt aaa cca cca	1654
His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro	
475 480 485	
gtt gat tcc tta gac tca gga aat aat ccc agg tta caa aag cat cct	1702
Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro	
490 495 500 505	
aat ttt gct ttt tct gtt tca agt gtg aat tca cta agc aac aca ata	1750
Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile	
510 515 520	
ttt ctt gga gaa tta agc ctc ata tta aat caa gga gaa tgc agt tct	1798
Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser	
525 530 535	
cct gac ata caa aac tca gta gag gag gaa acc acc atg ctt ttg gaa	1846
Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu	
540 545 550	
aat gat tca ccc agt gaa act att cca gaa cag acc ctg ctt cct gat	1894
Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp	
555 560 565	
gaa ttt gtc tcc tgt ttg ggg atc gtg aat gag gag ttg cca tct att	1942
Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile	
570 575 580 585	
aat act tat ttt cca caa aat att ttg gaa agc cac ttc aat agg att	1990
Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile	
590 595 600	

10

20

30

(表1の続き)

tca ctc ttg gaa aag tagagctgtg tgggtcaaaat caatatgaga aagctgcctt 2045
 Ser Leu Leu Glu Lys
 605

gcaatctgaa cttgggtttt ccctgcaata gaaattgaat tctgcctctt tttgaaaaa 2105
 atgtattcac atacaaatct tcacatggac acatgttttc atttcccttg gataaatacc 2165
 taggtagggg attgctgggc catatgataa gcatatgttt cagttctacc aatcttggtt 2225
 ccagagtagt gacatttctg tgctcctacc atcaccatgt aagaattccc gggagctcca 2285
 tgccttttta attttagcca ttcttctgcc tmatttctta aaattagaga attaaggtcc 2345
 cgaaggtgga acatgcttca tgggtcacaca tacaggcaca aaaacagcat tatgtggacg 2405
 cctcatgtat tttttataga gtcaactatt tcctctttat tttccctcat tgaaagatgc 2465
 aaaacagctc tctatttgtt acagaaaggg taaataatgc aaaatacctg gtagtaaaat 2525
 aaatgctgaa aattttcctt taaaaataga tcattaggcc aggcgtgggtg gctcatgctt 2585
 gtaatcccag cactttggta ggctgaggtr ggtggatcac ctgaggtcag gagtcogagt 2645
 ccagcctggc caatatgctg aaaccctgtc tctactaaaa ttacaaaaat tagccggcca 2705
 tgggtggcagg tgcttgtaat ccagctact tgggaggctg aggcaggaga atcacttgaa 2765
 ccaggaaggc agaggttgca ctgagctgag attgtgccac tgcactccag cctgggcaac 2825
 aagagcaaaa ctctgtctgg aaaaaaaaaa aaaa 2859

10

20

MN(Q/H)VTIOWDAVIALYILEFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFKMGMNISYICQAAIKNCQPRKLHF
 YKNGIKERFQITRINKTTARLWYKNFLEPHASMYCTAECPKHFQETLICGDISSGYPPDIPDEVTCVIY
 EYSGNMTCTWNA(G/R)KLTYIDTKYVVHVKSLETEEEQQYLTSYINISTDSLQGGKKYLVVWQAANAL
 GMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKTIYWDSQTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFDT
 NFTYVQQSEFYLEPNIKYVFQVRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTPETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASIS
TGHLTSDNRCDIGLLGLMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLIIPKWLYEDIPNMKNSNVKML
 QENSELMNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNT
 GYKQIISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLI
 LNQGECSSPDIQNSVEBETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSLGIVNEELPSINTYFPQNILESHFN
 RISLLEK

30

【 0 0 2 7 】

【表 2】

表 2：霊長類（例えば、ヒト）の DCRS 5 の逆翻訳物（配列番号 3）：

ATGAAYCAYGTNACNATHCARTGGGAYGCNGTNATHGCNYTNTAYATHYTNTTYWSNTGGTGYCAYGGNGGNAT
HACNAAYATHAAYTGYWSNGGNCAYATHTGGGTNGARCCNGCNACNATHTTTAAARATGGGNATGAAYATHWSNA
THTAYTGYCARGCNGCNATHAARAAYTGYCARCCNMGNAARYTNCAYTTYTAYAARAAYGGNATHAARGARMGN
TTYCARATHACNMGNATHAAYAARACNACNGCNMGNYTNTGGTAYARAAYTTYTNGARCCNCAYGCNWSNAT
GTAYTGYACNGCNGARTGYCCNAARCAITTYCARGARACNYTNATHHTGYGGNAARGAYATHWSNWSNGGNTAYC
CNCNGAYATHCCNGAYGARGTNACNTGYGTNATHHTAYGARTAYWSNGGNAAYATGACNTGYACNTGGAAAYGCN
MGNAARYTNACNTAYATHGAYACNAARTAYGTNGTNCAYGTNAARWSNYTNGARACNGARGARGARCARTTA
YYTNACNWSNWSNTAYATHAAYATHWSNACNGAYWSNYTNCARGGNGGNAARAARTAYYTNGTNTGGGTNCARG
CNGCNAAYGCNYTNGGNATGGARGARWSNAARCARYTNCARATHCAYTNGAYGAYATHGNTNATHCCNWSNGCN
GCNGTNATHWSNMCNGCNGARACNATHAAYGCNACNGTNCNAARACNATHATHHTAYTGGGAYWSNCARACNAC
NATHGARAARGTNSNTGYGARATGMGNTAYAARGCNACNACNAAYCARACNTGGAAAYGTNAARGARTTYGAYA
CNAAYTTYACNTAYGTNCARCARWSNGARTTYTAYTNGARCCNAYATHAARTAYGTNTTYCARGTNGMNTGY
CARGARACNGGNAARMGNTAYTGGCARCCNTGGWSNWSNCCNTTYTTYCAYAARACNCCNGARACNGTNCNCNA
RGTNACNWSNAARGCNTTYCARCAYGAYACNTGGAAAYWSNGGNYTNACNGTNGCNWSNATHWSNACNGGNCAYY
TNACNWSNGAYAAVMGNGGNGAYATHGGNYTNYTNYTNGGNATGATHGTNTTYGCNGTNATGYTNWSNATHYT
WSNYTNATHGGNATHHTTYAAYMGNWSNTTYMGNACNGGNATHAARMGNMGNATHYTNYTNYTNATHCCNAARTG
GYTNTAYGARGAYATHCCNAYATGAARAAYWSNAYGTNGTNAARATGYTNCARGARAAYWSNGARYTNATGA
AYAAAYWSNWSNGARCARGTNYTNTAYGTNGAYCCNATGATHACNGARATHAARGARATHHTTYATHCCNGAR
CAYAARCCNACNGAYTAYAARAARGARAAYACNGGNCNYTNGARACNMGNNGAYTAYCCNCARAAYWSNYTNTT
YGAYAAAYACNACNGTNGTNTAYATHCCNGAYYTNAAYACNGGNTAYAAARCCNCARATHWSNAAYTTYTNCNG
ARGGNWSNCAYYTNSNAAYAAAYGARATHACNWSNYTNACNYTNAARCCNCCNGTNGAYWSNYTNGAYWSN
GGNAAYAAAYCCNMGNNTNCARAARCAAYCCNAYTTYGCNTTYWSNGTNWSNWSNGTNAAYWSNYTNWSNAAYAC
NATHHTTYTNGGNGARYTNWSNYTNATHYTNAAYCARGGNGARTGYWSNWSNCCNGAYATHCARAAYWSNGTNG
ARGARGARACNACNATGYTNYTNGARAAYGAYWSNCCNWSNGARACNATHCCNGARACNATNYTNTCCNGAY
GARTTYGTNWSNTGYTNGGNATHGTNAAYGARGARYTNCNWSNATHAAYACNTAYTTYCCNCARAAYATHYT
NGARWSNCAYTTYAAYMGNATHWSNYTNYTNGARAAR

10

20

【0 0 2 8】

【表 3】

表 3：種々のサイトカインレセプターサブユニットの整列。ヒト IL-6 レセプター
タンパク質 gp 130 は配列番号 4 (GenBank M57230) であり；ヒ
ト IL-12 レセプター β 2 サブユニットは配列番号 5 (GenBank U641
98) である。

huIL-12R 2	1	MAHTFRGCSLAFMFIIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVN	48
hugp130	1	MLTLQTVVQALFIFLTTESTGELLDPG---YISPESPVVQLHSNFT	45
huDCRS5	1	MNHVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCS-GHIWVEPATIFKMGMNIS	49
		* . *	
huIL-12R 2	49	ITCSLKPRQGCFFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLSNSQVTGLPLG---	95
hugp130	46	AVCVLKEKCMDYFHVNNANYIVKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIA	95
huDCRS5	50	IYCQAAIKN--CQP--RKLHPYKNGIKER-FQITRINKTTARLWYKNFL	93
		* . *	
huIL-12R 2	96	--TTLFVCKLACINS-D-EIQICGAEIFVGVAPQPNLSQIQKGEQGTVA	142
hugp130	96	SLNIQLTCNLTFTGQL-EQNVYGITIIISGLPPEKPKNLSCIVN-EGKKMR	143
huDCRS5	94	EPHASMCTAECPKHFQETLICGKDISSGYPPDIPDEVTCVIYEYSGNMT	143
		* . * . * * * . * . * .	
huIL-12R 2	143	CTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDGFINLTPESP	192
hugp130	144	CEWDGGRETHLETNFTLKS--EWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYS-TVY	190
huDCRS5	144	CTWNARKLTYIDTKYVHVHKSLETEEEQQYLTSSYINISTDSLQGG---	189
		* * . * . * . .	
huIL-12R 2	193	ESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSR	242
hugp130	191	FVNIEVWVEAENALGKVTSDHINFDVPYKVKPNPPHNLSVINSEELSSIL	240

40

(表3の続き)

```

huDCRS5      190 -KKYLWVWQAANALGMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKT 238
                * * * . * * * * *
huIL-12R 2    243 TLYWRD---EGLVLNRLRYRPSNSRLWNMVN---VTKAKGRHDLDDLK 285
hugp130       241 KLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLK 290
huDCRS5      239 IIYWDS--QTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFD-TNFTYVQQSEFYLE 285
                . * . . . * . *
huIL-12R 2    286 PFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHID 335
hugp130       291 PFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEASGITVEDRPSKAPSFYWKIDPSH 340
huDCRS5      286 PNIKYVFPQVRCQ-ETGKRYWPWSSPFFHKTPETVP----- 320
                * * * . . * * * * *
huIL-12R 2    336 YS-RQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQVTLQELTGGKAMTQNTGHTSWT 384
hugp130       341 TQGYRTVQLVWKTLPPEFANGKILDYEVT---LTRWKSHLQNYTVNATKL 387
huDCRS5      321 -----QVTSKAFQHDTWNSGLTVASISTG-----HLTSDN--RGDIGLL 357
                . . . . .
huIL-12R 2    385 TVIPRTGNWAVAVSAANSKGSLLPTRINIMNLCEAGLLAPRQVSANSEGM 434
hugp130       388 TVMLTNDRYLATLTVRNLVGKSDAAVLTIIP-ACDFQATHPVMDLKAFPKD 436
huDCRS5      358 LGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRR----- 387
                . . . . * . .
huIL-12R 2    435 DNILVTWQPPRKDPSSAVQYEVVEWRELHPG-GDTQVPLNWLRSRPYNVSA 483
hugp130       437 NMLWVEWTTPRE---SVKKYILEWCVL---DKAPCITDWQQEDGTVHRT 480
huDCRS5      388 -----ILLIPKWLYEDIPNMKNSNVKMLQEN----SE 417
                . . * .
huIL-12R 2    484 LISENIKSYICYEIRVYALSGDQ-GGCSSILGNSKHKAPLSGPHINAITE 532
hugp130       481 YLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPVTRTKKV 530
huDCRS5      418 LMNNNSSE-----QVLVVD-----MITTEIKEIFIPEHKPTDYKKE- 453
                . * . . * * * *
huIL-12R 2    533 EKGSILISWNSIPVQEOMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQLCEIPYRVSQNS 582
hugp130       531 GKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIIRNYTIFYRTIIGN----ETAVNVDSSTE 576
huDCRS5      454 --NTGPLETRDYP--QNSLFDNTTVVYIPDLNTG-----YKPQISN-- 490
                . . * * . . *
huIL-12R 2    583 HPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHGNEREFCLOQKAN-WMAFVAPSI 631
hugp130       577 YTLSSLTSDTFLYVMRMAAYTDEG-GKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPV 625
huDCRS5      491 -----FLPEG----- 495
                *
huIL-12R 2    632 CIAIIMVGIFSTHYFQOKVFLAALRP-----QWCSREIPDPA 670
hugp130       626 CLAFLLTTLGLVLCFNFNRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRH 675
huDCRS5      496 -----SHLSNNN-EITSLTLKP-----PVDSLDSG 519
                . . . *
huIL-12R 2    671 NSTCAKKYPIABEKTQLPLDRLLID-WPTPEDPEPLVIS--EVLHQVTPV 717
hugp130       676 FNSKDQMYSDGNFTDVSVEIEANDKKPFEDLKSLLDFKKEKINTEGHS 725
huDCRS5      520 NNPRQLQHPN-FAFSVSSVNSLSNT-----I---FLGELSLI 552
                . .
huIL-12R 2    718 FRHPPCSNWPQREKGIQGHQASEKMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLY 767
hugp130       726 SGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVHSGYRHQVPSVQ 775
huDCRS5      553 LNQGECS---S--PDIQNSVEEETTMLENDSP----- 580
                . * * *

```

10

20

30

40

(表3の続き)

huIL-12R 2	768	KVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAAGDLPTHGYLPSN---IDDLPSHEAP	814
hugp130	776	VFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDILPRQYFKQNCQSHESS	825
huDCRS5	581	--SETIPEQTLLPDEFVSLGIVNEELPSINTYFPQN---ILESHEFNR--	623
		* .	
huIL-12R 2	815	LADSLLEELEPQHISLS-----VFPSSSLHPLTFSCG-----	845
hugp130	826	PDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMFMFQEVSAAD	875
huDCRS5	624	--ISLLEK	629
		* *	
huIL-12R 2	846	-----DKLTLDQLKMRCDLML	862
hugp130	876	AFGPGTEGQVERFETVGMEEATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ	918
huDCRS5	630		629

10

「IL-30R」の細胞外ドメインの最も近縁のものは、IL-6シグナル伝達因子 (signal transducer) gp130 および IL-12R 2 である。いくらより近縁でないものは、GCSFレセプター、レプチンレセプター、白血病阻害因子レセプターおよびCNTFレセプターである。従って、「IL-30R」は、サイトカインレセプタースーパーファミリーのクラスI部門 (branch) のメンバーであり、IL-6R/IL-12Rファミリーに密接に関連している。

【0029】

表3は、霊長類 (例えば、ヒト) のDCRS5 (IL-30R) との霊長類レセプターサブユニットの利用可能な配列の比較を示す。DCRS5は、IL-6レセプターサブユニットgp130 (例えば、IL-6Rサブユニット) およびIL-12R 2サブユニットに対する類似性を示す。DCRS5は、サブユニットの構造的特徴を示すが、タンパク質の相互作用およびシグナル伝達の実際の順序は、未解明のままである。

20

【0030】

本明細書中で使用される場合、用語DCRS5は、表1に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質を記載するように使用される。多くの場合、それらの実質的なフラグメントは、例えば、さらなる細胞外セグメントを含め、機能的または構造的に等価である。本発明はまた、配列が提供されるそれぞれのDCRS5対立遺伝子のタンパク質のバリエーション (例えば、ムテインまたは他の構築物) を含む。代表的には、このような改変体は、標的領域との約10%未満の配列の相違を示し、従ってしばしば、1重置換と11重置換との間の置換 (例えば、2重、3重、5重、7重など) を有する。これはまた、記載されるタンパク質の対立遺伝子改変体および他の改変体 (例えば、天然の多型) を包含する。代表的に、これは、その対応する生物学的リガンドに、おそらく、レセプターサブユニットとの二量体化状態において、例えば、少なくとも約100nM、通常約30nMより良好、好ましくは約10nMより良好、そしてより好ましくは約3nMより良好な高い親和性で結合する。この用語はまた、この哺乳動物タンパク質の関連した天然に存在する形態 (例えば、対立遺伝子、多型改変体および代謝改変体) をいうように本明細書中で使用される。好ましい形態のレセプター複合体は、リガンド-レセプター相互作用に適切な親和性および選択性で適切なリガンドを結合する。

30

【0031】

本発明はまた、表1中のアミノ酸配列と実質的なアミノ酸配列同一性を有する、タンパク質またはペプチドの組合せを包含する。本発明は、比較的わずかな (例えば、好ましくは約3~5より少ない) 置換を有する配列改変体を包含する。

40

【0032】

実質的なポリペプチド「フラグメント」または「セグメント」は、少なくとも約8アミノ酸、一般的に少なくとも10アミノ酸、より一般的に少なくとも12アミノ酸、しばしば少なくとも14アミノ酸、よりしばしば少なくとも16アミノ酸、代表的に少なくとも18アミノ酸、より代表的に少なくとも20アミノ酸、通常は少なくとも22アミノ酸、より通常は少なくとも24アミノ酸、好ましくは少なくとも26アミノ酸、より好ましくは少なくとも28アミノ酸、そして特に好ましい実施形態では、少なくとも約30以上の

50

アミノ酸のアミノ酸残基のストレッチである。異なるタンパク質のセグメントの配列は、適切な長さのストレッチにわたって互いに比較され得る。多くの状況では、フラグメントは、インタクトなサブユニットの機能的特性を示し得る。例えば、膜貫通レセプターの細胞外ドメインは、リガンド結合特徴を保持し得、そしてこれを使用して可溶性レセプター様複合体を調製し得る。

【0033】

アミノ酸配列相同性または配列同一性は、残基の一致を最適化することによって決定される。いくつかの比較では、必要に応じてギャップが導入され得る。例えば、Needlehamら(1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453; Sankoffら(1983) Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparisonの第1章, Addison-Wesley, Reading, MA; および IntelliGenetics, Mountain View, CAからのソフトウェアパッケージ; および University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), Madison, WIを参照のこと; これらの各々は、本明細書中に参考として援用される。これは、保存的置換を一致として考慮する場合、変動する。保存的置換としては代表的に、以下のグループ内での置換が挙げられる: グリシン、アラニン; バリン、イソロイシン、ロイシン; アスパラギン酸、グルタミン酸; アスパラギン、グルタミン; セリン、トレオニン; リジン、アルギニン; およびフェニルアラニン、チロシン。相同なアミノ酸配列は、そのサイトカイン配列における天然の対立遺伝子バリエーションおよび種間バリエーションを含むことが意図される。代表的な相同タンパク質または相同ペプチドは、表1のアミノ酸配列セグメントと、50%~100%の相同性(ギャップが導入され得る場合)~60%~100%相同性(保存的置換が含まれる場合)を有する。相同性の限度は、少なくとも約70%、一般に少なくとも76%、より一般的に少なくとも81%、しばしば少なくとも85%、よりしばしば少なくとも88%、代表的には少なくとも90%、より代表的には少なくとも92%、通常は少なくとも94%、より通常は少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、そしてより好ましくは少なくとも97%、そして特に好ましい実施形態では、少なくとも98%以上である。相同性の程度は、比較されるセグメントの長さに伴って変動する。相同タンパク質または相同ペプチド(例えば、対立遺伝子改変体)は、表1に記載される実施形態(特に細胞内部分)と大部分の生物学的活性を共有する。

【0034】

本明細書中で使用される場合、用語「生物学的活性」は、シグナル伝達、炎症応答、先天免疫および/またはサイトカイン様リガンドによる形態形成的発生に対する効果を限定することなく記載するように使用される。例えば、これらのレセプターは、ホスファターゼ活性またはホスホリラーゼ活性を媒介すべきであり、これらの活性は、標準的な手順によって容易に測定される。例えば、Hardieら編(1995) The Protein Kinase Fact Book、第I巻および第II巻, Academic Press, San Diego, CA; Hanksら(1991) Meth. Enzymol. 200: 38-62; Hunterら(1992) Cell 70: 375-388; Lewin(1990) Cell 61: 743-752; Pinesら(1991) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 56: 449-463; およびParkerら(1993) Nature 363: 736-738を参照のこと。レセプターまたはその部分は、一般的基質または特異的基質を標識するためのリン酸標識酵素として有用であり得る。サブユニットはまた、認識抗体を惹起する機能的な免疫原または抗体を結合し得る抗原であり得る。

【0035】

例えば、DCRS5の、用語リガンド、アゴニスト、アンタゴニストおよびアナログは、(例えば、レセプターが天然のレセプターまたは抗体である場合の)リガンド-レセプター相互作用の特徴をいう。細胞性応答は代表的には、レセプターチロシンキナーゼ経路

によって媒介されるようである。

【0036】

また、リガンドは、上記レセプターもしくはそのアナログが結合する天然のリガンドまたはその天然のリガンドの機能的アナログである分子のいずれかとして役立つ分子である。機能的アナログは、構造的改変を有するリガンドであり得るか、または適切なりガンド結合決定基と相互作用する分子形状を有する、完全に無関係の分子であり得る。このリガンドは、アゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る。例えば、Goodmanら編(1990) Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, Pergamon Press, New York。

10

【0037】

合理的薬物設計はまた、レセプターまたは抗体および他のエフェクターもしくはリガンドの分子形状の構造研究に基づき得る。例えば、Herzら(1997) J. Recept. Signal Transduct. Res. 17: 671 - 776; および Chaikenら(1996) Trends Biotechnol. 14: 369 - 375を参照のこと。エフェクターは、リガンド結合に応じて他の機能を媒介する他のタンパク質またはこのレセプターと通常相互作用する他のタンパク質であり得る。どの部位が特定の他のタンパク質と相互作用するかを決定するための1つの手段は、物理的構造決定(例えば、X線結晶学または二次元NMR技術)である。これらは、どのアミノ酸残基が分子接触領域を形成するかに関するガイダンスを提供する。タンパク質の構造決定の詳細な説明については、例えば、本明細書中に参考として援用される、BlundellおよびJohnson(1976) Protein Crystallography, Academic Press, New Yorkを参照のこと。

20

【0038】

(II. 活性)

サイトカインレセプター様タンパク質は、多数の異なる生物学的活性(例えば、(例えば、STAT4を介した)細胞内シグナル伝達、細胞増殖の調節)を有するか、またはリン酸代謝において、特定の基質(代表的にタンパク質)に添加されるかもしくは特定の基質から除去される。このようなことは一般に、炎症機能、他の先天免疫応答、または形態学的効果の調節をもたらす。サブユニットはおそらく、リガンドに対する特異的低親和性結合を有する。

30

【0039】

DCRS5は、JAK経路を通したレセプターシグナル伝達の特有のモチーフを有する。例えば、Ihleら(1997) Stem Cells 15(補遺1.1): 105 - 111; Silvennoinenら(1997) APMIS 105: 497 - 509; Levy(1997) Cytokine Growth Factor Review 8: 81 - 90; WinstonおよびHunter(1996) Current Biol. 6: 668 - 671; Barrett(1996) Baillieres Clin. Gastroenterol. 10: 1 - 15; ならびにBriscoeら(1996) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 351: 167 - 171を参照のこと。特に興味深いのは、上記のSH2結合モチーフである。

40

【0040】

サイトカインレセプターサブユニットの生物学的活性は、代表的には特定の様式において、しかし、時々是非特異的な様式で、基質へのリン酸部分の添加または除去に関連している。標準的方法によって、例えば、Hardieら編(1995) The Protein Kinase Fact Book、第I巻および第II巻, Academic Press, San Diego, CA; Hanksら(1991) Meth. Enzymol. 200: 38 - 62; Hunterら(1992) Cell 70: 375 - 388; Lewin(1990) Cell 61: 743 - 752; Pinesら(1991

50

) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 56: 449 - 463; ならびに Parker ら (1993) Nature 363: 736 - 738 に記載されるように、基質が同定され得るか、または酵素的活性についての条件がアッセイされ得る。

【0041】

レセプターサブユニットは組み合わされて、(例えば、リガンドを結合するためまたは抗体を調製するために有用であり得る) 機能的複合体を形成し得る。これらは、検出または定量を含め、実質的な診断的用途を有する。レセプターと p40 / IL - B30 リガンドとの機能的結合は、このレセプターが有用である臨床的指標に重要な洞察を提供する。従って、アンタゴニストおよびアゴニストは、予測された機能的効果を有する。

10

【0042】

(III. 核酸)

本発明は、例えば、対応するポリペプチド(好ましくは、生物学的に活性であるポリペプチド)をコードするための、(例えば、これらのタンパク質もしくは密接に関連するタンパク質またはそれらのフラグメントをコードする) 単離された核酸またはフラグメントの使用を意図する。さらに、本発明は、(例えば、DCRS5 単独の、または他のもの(例えば、IL - 12R 1 (Showe ら (1996) Ann. N. Y. Acad. Sci. 795: 413 - 425; Gately ら (1998) Ann. Rev. Immunol. 16: 495 - 521; GenBank U03187, NM_005535 を参照のこと) サブユニット) と組み合わせた) 特有の配列を有する、このようなタンパク質またはポリペプチドの組合せをコードする、単離された DNA または組換え DNA を包含する。代表的に、この核酸は、適切な条件下で、表 1 に示される核酸配列セグメントとハイブリダイズし得るが、好ましくは、表 3 に記載されるレセプターの、対応するフラグメントとはハイブリダイズし得ない。この生物学的に活性なタンパク質またはポリペプチドは、全長タンパク質またはフラグメントであり得、そして表 1 に示すものに対して代表的に非常に相同な(例えば、重大な同一性ストレッチを示す) アミノ酸配列のセグメントを有する。さらに、本発明は、DCRS5 タンパク質に等価であるフラグメント(例えば、細胞内部分) を有するタンパク質をコードする、単離された核酸もしくは組換え核酸またはそれらのフラグメントの使用を包含する。単離された核酸は、それぞれの調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリ A 付加シグナルおよび天然の遺伝子由来の他のもの) を 5' 隣接部 (flank) および 3' 隣接部に有し得る。上記の通りの組合せ(例えば、リガンドアンタゴニストとして、DCRS5 と IL - 12R 1 とを組合せること、またはそれらの細胞外リガンド結合部分を組み合わせること) もまた提供される。例えば、診断的有用性はまた明らかに、多型または他の改変体の重要事項である。

20

30

【0043】

「単離された」核酸は、実質的に純粋な(例えば、天然ではネイティブな配列に付随する他の成分(例えば、リボソーム、ポリメラーゼおよび起源種由来の隣接ゲノム配列) から分離された) 核酸(例えば、RNA、DNA または混合ポリマー) である。この用語は、その天然に存在する環境から取り出された核酸配列を包含し、そしてそれによって天然に存在する組成物とは区別され得る、組換え DNA 単離物もしくはクローニングされた DNA 単離物、および化学合成されたアナログもしくは異種の系によって生物学的に合成されたアナログを包含する。実質的に純粋な分子としては、完全に純粋または実質的に純粋のいずれかの、単離された形態の分子が挙げられる。

40

【0044】

単離された核酸は一般に、分子の均質組成物であるが、いくつかの実施形態においては、不均質性(好ましくは微量)を含む。この不均質性は代表的に、ポリマーの末端または所望の生物学的機能もしくは活性に重要でない部分に見出される。

【0045】

「組換え」核酸は代表的に、その産生法またはその構造によって規定される。その産生法に関して(例えば、プロセスによって作製される産物)、このプロセスは、(例えば、

50

ヌクレオチド配列においてヒトの介入を含む)組換え核酸技術の使用である。代表的に、この介入は、インピトロでの操作を含むが、特定の環境下では、この介入は、より古典的な動物育種技術を含み得る。あるいは、これは、天然では互いに連続していない2つのフラグメントの融合物を含む配列を作製することによって作製される核酸であり得るが、これは、天然の産物(例えば、それらの天然の状態において見出されるような、天然に存在する変異体)を除外することを意味する。従って、例えば、細胞を、天然に存在しないベクターで形質転換することによって作製される産物は、任意の合成オリゴヌクレオチドプロセスを用いて誘導される配列を含む核酸と同様に包含される。このようなプロセスはしばしば、代表的には、制限酵素配列認識部位を導入もしくは除去しながら、または何らかの構造-機能解析のために、例えば、あるコドン、同じまたは保存的アミノ酸をコードする冗長なコドンで置換することによって行われる。あるいは、このプロセスを行って、所望の機能の核酸セグメントと一緒に連結して、(例えば、融合タンパク質をコードする)通常利用可能な天然の形態で見出されない機能の所望の組合せを含む単一の遺伝的実体が作製される。制限酵素認識部位はしばしば、このような人工的操作の標的であるが、他の部位特異的標的(例えば、プロモーター、DNA複製部位、調節配列、制御配列または他の有用な特徴)は設計により取り込まれ得る。同様の概念は、組換え(例えば、融合)ポリペプチドについて意図される。これは、DCRS5の二量体反復物またはDCRS5のIL-12R 1サブユニットとの融合物を含む。特に含まれるのは、遺伝暗号の冗長性によって、DCRS5のフラグメントに対する等価なポリペプチドおよび種々の異なる関連分子(例えば、他のサイトカインレセプターファミリーのメンバー)由来の配列の融合物をコードする合成核酸である。

10

20

30

40

50

【0046】

核酸の状況での「フラグメント」は、少なくとも約17ヌクレオチド、一般に少なくとも21ヌクレオチド、より一般的に少なくとも25ヌクレオチド、通常は少なくとも30ヌクレオチド、より通常は少なくとも35ヌクレオチド、しばしば少なくとも39ヌクレオチド、よりしばしば少なくとも45ヌクレオチド、代表的には少なくとも50ヌクレオチド、より代表的には少なくとも55ヌクレオチド、通常は少なくとも60ヌクレオチド、より通常は少なくとも66ヌクレオチド、好ましくは少なくとも72ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも79ヌクレオチド、そして特に好ましい実施形態では、少なくとも85以上のヌクレオチド(90、100、120、140、160、180、200などを含む)の連続したセグメントである。代表的に、異なる遺伝的配列のフラグメントは、適切な長さのストレッチ(特に、規定されたセグメント(例えば、以下に記載のドメイン))にわたって互いに比較され得る。

【0047】

DCRS5をコードする核酸は、それ自体または近縁のタンパク質をコードする、遺伝子種、mRNA種およびcDNA種、ならびに多型変異体、対立遺伝子変異体または遺伝的変異体をコードするDNAを、例えば、異なる個体または関連の種から同定するために特に有用である。このようなスクリーニングのための好ましいプローブは、レセプターのうちの、異なる多型変異体間で保存されている領域またはレセプターのうちの、特異性を欠くヌクレオチドを含む領域であり、そして好ましくは全長もしくはそれに近い。他の状況では、多型変異体特異的配列は、より有用である。DCRS5の多型変異体とIL-12R 1の変異体との組合せもまた調査分析され得る。

【0048】

本発明はさらに、本明細書中に示される単離されたDNAと同一であるかまたは高度に相同である核酸配列を有する、組換え核酸分子および組換えフラグメントを包含する。特に、この配列はしばしば、転写、翻訳およびDNA複製を制御するDNAセグメントに作動可能に連結される。これらのさらなるセグメントは代表的に、所望の核酸セグメントの発現を補助する。

【0049】

相同または高度に同一な核酸配列は、互いに(例えば、DCRS5配列と)比較された

場合、有意な類似性を示す。核酸における相同性の基準は、配列比較による、当該分野で一般に使用される相同性についての尺度であるか、またはハイブリダイゼーション条件に基づくかのいずれかである。匹敵するハイブリダイゼーション条件は、以下でさらに詳細に記載される。

【0050】

核酸配列比較の状況における実質的な同一性とは、比較した場合、適切なヌクレオチドの挿入または欠失を伴って最適に整列したとき、セグメントまたはそれらの相補鎖のいずれかが、そのヌクレオチドの少なくとも約60、一般に少なくとも66、通常は少なくとも71%、しばしば少なくとも76%、よりしばしば少なくとも80%、通常少なくとも84%、より通常少なくとも88%、代表的には少なくとも91%、より代表的には少なくとも約93%、好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96~98%以上、そして特定の実施形態では、このヌクレオチドの約99%以上の高さ（例えば、構造ドメインをコードするセグメントまたは記載される他のセグメントを含む）において同一であることを意味する。あるいは、このセグメントが、選択的ハイブリダイゼーション条件下で、代表的には表1から誘導される配列を用いた鎖またはその相補体にハイブリダイズする場合、実質的な同一性が存在する。代表的には、少なくとも約14ヌクレオチド、より代表的には少なくとも約65%、好ましくは少なくとも約75%、そしてより好ましくは少なくとも約90%のストレッチにわたって少なくとも約55%の相同性が存在する場合、選択的ハイブリダイゼーションが生じる。本明細書中に参考として援用される、Kanehisa(1984)Nucleic Acids Res. 12:203-213を参照のこと。記載されるように、相同性比較の長さは、より長いストレッチにわたり得、そして特定の実施形態では、少なくとも約17ヌクレオチド、一般に少なくとも約20ヌクレオチド、通常は少なくとも約24ヌクレオチド、通常は少なくとも約28ヌクレオチド、代表的には少なくとも約32ヌクレオチド、より代表的には少なくとも約40ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約50ヌクレオチド、そしてより好ましくは少なくとも約75~100以上のヌクレオチドのストレッチにわたる。これとしては、例えば、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350などおよび他の長さが挙げられる。

【0051】

ハイブリダイゼーションの状況において相同性をいう際、ストリンジェントな条件は、ハイブリダイゼーション反応において代表的に制御される、塩、温度、有機溶媒および他のパラメータのストリンジェントな組み合わせられた条件である。ストリンジェントな温度条件は、通常約30を超え、より通常は約37を超え、代表的には約45を超え、より代表的には約55を超え、好ましくは約65を超え、そしてより好ましくは約70を超える温度を含む。ストリンジェントな塩条件は、通常、約500mM未満、通常約400mM未満、より通常は約300mM未満、代表的に約200mM未満、好ましくは約100mM未満、そしてより好ましくは約80mM未満であり、さらには約50mMまたは20mM未満まで下がりさえする。しかし、パラメータの組合せは、任意の単一のパラメータの限度よりもさらにずっと重要である。例えば、本明細書中に参考として援用される、WetmurおよびDavidson(1968)J. Mol. Biol. 31:349-370を参照のこと。

【0052】

単離されたDNAは、ヌクレオチド置換、ヌクレオチド欠失、ヌクレオチド挿入およびヌクレオチドストレッチの逆位によって容易に改変され得る。これらの改変は、このタンパク質またはその誘導体をコードする新規なDNA配列をもたらす。これらの改変された配列を使用して、変異体タンパク質（ムテイン）を産生し得るかまたは改変体種の発現を増強し得る。増強された発現は、遺伝子の増幅、転写増大、翻訳増大および他の機構を含み得る。このような変異DCRS5は、上記に示すような、しかし、欠失、置換または挿入のいずれによってであるかかわらず、天然に見出される他のサイトカインレセプター様タンパク質のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する、DCRS5の定義を含む

(i n i t i o n)。特に、「部位特異的変異DCRS5」は、表1のタンパク質と実質的配列同一性を有し、そして代表的には本明細書中に開示される形態の生物学的活性または効果の大部分を共有するタンパク質を包含する。種々の天然の多型改変体配列もまた同定される。

【0053】

部位特異的変異部位は所定であるとはいえず、変異体は、部位特異的である必要はない。哺乳動物DCRS5変異誘発は、発現と結び付いたアミノ酸の挿入または欠失を遺伝子中に作製することによって達成され得る。置換、欠失、挿入または多くの組合せが作製されて、最終的な構築物に到達され得る。挿入物としては、アミノ末端融合物またはカルボキシ末端融合物が挙げられる。ランダム変異誘発は、標的コドンで行われ得、次いで発現される哺乳動物DCRS5変異体は、所望の活性についてスクリーニングされ得、構造と活性との関係のいくつかの局面を提供する。既知配列を有するDNA中の所定の部位で置換変異を作製するための方法は、例えば、M13プライマー変異誘発によって当該分野で周知である。Sambrookら(1989)ならびにAusubelら(1987および定期補充物)もまた参照のこと。特に有用な構築物は、IL-12R 1セグメントに関連したDCRS5の細胞外部分である。

10

【0054】

DNA中の変異は通常、コード配列をリーディングフレームから外すべきでなく、そして好ましくはハイブリダイズして二次mRNA構造(例えば、ループまたはヘアピン)を生じ得る相補的領域を作製しない。

20

【0055】

BeaucageおよびCarruthers(1981)Tetra.Letts. 22:1859-1862によって記載されるホスホルアミダイト法は、適切な合成DNAフラグメントを産生する。二本鎖フラグメントはしばしば、相補鎖を合成し、そして鎖を適切な条件下で一緒にアニーリングすること、または適切なプライマー配列を有するDNAポリメラーゼを用いて相補鎖を付加することのいずれかによって入手される。

【0056】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術はしばしば、変異誘発において適用され得る。あるいは、変異誘発プライマーは、規定された変異を所定の部位で作製するために通常使用される方法である。例えば、Innisら編(1990)PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego, CA;ならびにDieffenbachおよびDveksler編(1995)PCR Primer: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, CSH, NYを参照のこと。

30

【0057】

本発明の特定の実施形態は、記載されるレセプター配列を含む組合せ組成物に関する。他の実施形態では、この配列の機能的部分は、融合タンパク質をコードするように連結され得る。他の形態では、記載された配列の改変体が置換され得る。

40

【0058】

(IV. タンパク質、ペプチド)

上記のように、本発明は、霊長類DCRS5(例えば、その配列が表1に開示され、そして上記に記載される)を包含する。対立遺伝子改変体および他の改変体もまた意図され、これらとしては、例えば、このような配列の部分と他の部分(例えば、IL-12R 1、エピトープタグおよび機能的ドメインが挙げられる)とを組み合わせた融合タンパク質が挙げられる。

【0059】

本発明はまた、組換えタンパク質(例えば、これらの霊長類またはげっ歯類のタンパク質由来のセグメントを用いた異種融合タンパク質)を提供する。異種融合タンパク質は、同じ様式では天然では通常融合されていない、タンパク質またはセグメントの融合物であ

50

る。従って、DCRS5と別のサイトカインレセプターとの融合産物は、代表的には、単一翻訳産物として作製された、代表的なペプチド結合において融合された配列を有し、そして各供給源ペプチドから誘導された特性（例えば、配列または抗原性）を示す、連続したタンパク質分子である。同様の概念が異種核酸配列に適用される。複合体への、種々の指定されたタンパク質の組合せもまた提供される。

【0060】

さらに、新たな構築物は、種改変体を含め、他の関連したタンパク質（例えば、サイトカインレセプターまたはToll様レセプター）由来の同様の機能的ドメインまたは構造的ドメインを組み合わせることから作製され得る。例えば、リガンド結合セグメントまたは他のセグメントは、異なる新たな融合ポリペプチドまたはフラグメントの間で「交換」され得る。例えば、Cunninghamら（1989）Science 243:1330-1336；およびO'Dowdら（1988）J. Biol. Chem. 263:15985-15992（これらの各々は、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。従って、特異性の新たな組合せを示す新たなキメラポリペプチドは、レセプター結合特異性の機能的結合からもたらされる。例えば、他の関連したレセプター分子由来のリガンド結合ドメインは、このタンパク質または関連したタンパク質の他のドメインに付加され得るかまたはこのドメインと置換され得る。得られるタンパク質はしばしば、ハイブリッドの機能および特性を有する。例えば、融合タンパク質は、特定の細胞内（subcellular）細胞小器官への融合タンパク質の隔離を提供するのに役立ち得る標的化ドメインを含み得る。

10

20

【0061】

候補融合パートナーおよび候補融合配列は、種々の配列データベース（例えば、GenBank, c/o IntelliGenetics, Mountain View, CA；およびBCG, University of Wisconsin Biotechnology Computing Group, Madison, WI（これらは各々、本明細書中に参考として援用される））から選択され得る。特に、表1および表3に提供されるポリペプチド配列の組合せが特に好ましい。改変体形態のタンパク質は、記載される組合せで置換され得る。

【0062】

本発明は特に、サイトカイン様リガンドに結合する、および/またはシグナル伝達において影響を受ける、ムテインを提供する。ヒトDCRS5とサイトカインレセプターファミリーの他のメンバーとの構造的整列は、保存的特徴/保存的残基を示す。表3を参照のこと。ヒトDCRS5配列とサイトカインレセプターファミリーの他のメンバーとの整列は、種々の構造的および機能的に共有された特徴を示す。また、Bazanら（1996）Nature 379:591；Lodiら（1994）Science 263:1762-1766；SayleおよびMilner-White（1995）TIBS 20:374-376；ならびにGronenbergら（1991）Protein Engineering 4:263-269を参照のこと。

30

【0063】

マウス配列またはヒト配列のいずれかでの置換が特に好ましい。逆に、リガンド結合相互作用領域から離れた保存的置換はおそらく、大部分のシグナル伝達活性を保存する；そして細胞内ドメインから離れた保存的置換はおそらく、大部分のリガンド結合特性を保存する。

40

【0064】

霊長類DCRS5の「誘導体」としては、アミノ酸配列変異体、グリコシル化改変体、代謝誘導体および他の化学的部分との共有結合結合体または凝集結合体が挙げられる。共有結合誘導体は、DCRS5アミノ酸側鎖中に見出される基への、またはN末端での、例えば、当該分野で周知である手段による官能基の結合によって調製され得る。これらの誘導体としては、カルボキシル末端の、またはカルボキシル側鎖を含む残基の、脂肪族エステルまたはアミド、ヒドロキシル基含有残基のOアシル誘導体、およびアミノ末端アミノ

50

酸またはアミノ基含有残基（例えば、リジンもしくはアルギニン）のNアシル誘導体が挙げられ得るがこれらに限定されない。アシル基は、それによってアルカノールアロイル種を形成する、アルキル部分（C3～C18のノルマルアルキルを含む）の群から選択される。

【0065】

特に、例えば、その合成およびプロセシングの間の、またはさらなるプロセシング工程における、ポリペプチドのグリコシル化パターンを改変することによって作製される、グリコシル化の変更が含まれる。これを達成するための特に好ましい手段は、通常このようなプロセシングを提供する細胞由来のグリコシル化酵素（例えば、哺乳動物グリコシル化酵素）にポリペプチドを暴露することによる。脱グリコシル化（*deglycosylation*）酵素もまた意図される。他のマイナーな改変（リン酸化されたアミノ酸残基（例えば、ホスホチロシン、ホスホセリンまたはホスホトレオニン）を含む）を有する同じ一次アミノ酸配列のバージョンもまた包含される。

【0066】

主な誘導体の群は、レセプターまたはそのフラグメントと他のタンパク質のポリペプチドとの共有結合結合体である。これらの誘導体は、組換え培養において（例えば、N末端融合物）、または反応性側鎖基を通してタンパク質を架橋させる際のそれらの有用性が当該分野で公知の薬剤の使用によって、合成され得る。架橋剤での好ましい誘導体化部位は、遊離アミノ基、糖質部分およびシステイン残基である。

【0067】

レセプターと他の同種タンパク質または異種タンパク質との間の融合ポリペプチドもまた提供される。同種ポリペプチドは、異なるレセプターの間での融合物であり得、例えば、複数の異なるサイトカインリガンドについての結合特異性を示すハイブリッドタンパク質、または広まったかもしくは弱まった基質特異性効果を有し得るレセプターを生じる。同様に、誘導体タンパク質の特性または活性の組合せを示す異種融合物が構築され得る。代表例は、所望のリガンドの存在または位置が容易に決定され得るような、レポーターポリペプチド（例えば、ルシフェラーゼ）とレセプターのセグメントまたはドメイン（例えば、リガンド結合セグメント）との融合物である。例えば、これによって本明細書中に参考として援用される、Dullら、米国特許第4,859,609号を参照のこと。他の遺伝子融合パートナーとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、細菌性 - ガラクトシダーゼ、trpE、プロテインA、 - ラクタマーゼ、アミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよび酵母 接合因子が挙げられる。例えば、Godowskiら（1988）*Science* 241:812-816を参照のこと。標識タンパク質はしばしば、タンパク質の記載された組合せにおいて置換される。記載したように、DCRS5とIL-12R 1との会合が特に重要である。

【0068】

BeaucageおよびCarruthers（1981）*Tetra, Letts* 22:1859-1862によって記載されるホスホルアミダイト法は、適切な合成DNAフラグメントを生じる。二本鎖フラグメントはしばしば、相補鎖を合成し、そして鎖を適切な条件下で一緒にアニーリングすること、または適切なプライマー配列を用い、DNAポリメラーゼを用いて相補鎖を付加することのいずれかによって入手される。

【0069】

このようなポリペプチドもまた、リン酸化、スルホン化、ビオチン化、または他の部分（特に、リン酸基と類似の分子形状を有する部分）の付加もしくは除去によって化学的に改変されたアミノ酸残基を有し得る。いくつかの実施形態では、改変は、有用な標識試薬であるか、または精製標的（例えば、親和性リガンド）として役立つ。

【0070】

融合タンパク質は代表的に、組換え核酸法または合成ポリペプチド法のいずれかによって作製される。核酸操作および発現のための技術は一般に、例えば、Sambrookら（1989）*Molecular Cloning: A Laboratory Man*

10

20

30

40

50

ual (第2版), 第1-3巻, Cold Spring Harbor Laboratory, および Ausubelら編 (1987 および 定期補充物) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York (これらは各々、本明細書中に参考として援用される) に記載されている。ポリペプチドの合成のための技術は、例えば、Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156; Merrifield (1986) Science 232: 341-347; および Athertonら (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford に記載されている; これらの各々は、本明細書中に参考として援用される。より大きなポリペプチドを作製するための方法について Dawsonら (1994) Science 266: 776-779 もまた 参照のこと。

10

【0071】

本発明はまた、アミノ酸配列またはグリコシル化におけるバリエーション以外の DCRS5 の誘導体の使用を意図する。このような誘導体は、化学部分との共有結合的または凝集的な会合を含み得る。これらの誘導体は一般に、以下の3つのクラスに分類される: (1) 塩、(2) 側鎖および末端残基の共有結合改変、ならびに (3) 例えば、細胞膜との吸着複合体。このような共有結合的または凝集的な誘導体は、免疫原として、免疫アッセイにおいて試薬として、または (例えば、レセプターまたは他の結合分子 (例えば、抗体) のアフィニティー精製のための) 精製方法において有用である。例えば、サイトカインリガンドは、サイトカインレセプター、抗体または他の同様の分子のアッセイまたは精製における使用のために、当該分野で周知である方法によって固体支持体 (例えば、臭化シアン活性化 Sepharose) に共有結合することによって固定され得るか、またはグルタルアルデヒド架橋を用いてもしくはこれを用いずにポリオレフィン表面に吸着され得る。このリガンドはまた、診断アッセイにおける使用のために、検出可能な基で標識され得る (例えば、クロラミンT手順によって放射性ヨウ素標識され得る、希土キレートへと共有結合され得る、または別の蛍光部分へと結合体化され得る)。

20

【0072】

本発明の組合せ (例えば、DCRS5 を含む) は、記載される組合せについて特異的な (例えば、他のサイトカインレセプターファミリーのメンバー間を区別し得る) 抗血清または抗体の産生のための免疫原として使用され得る。複合体を使用して、このタンパク質を含む種々の形態の不純な調製物での免疫によって調製されたモノクローナル抗体または抗原結合フラグメントをスクリーニングし得る。特に、用語「抗体」はまた、天然の抗体の抗原結合フラグメント (例えば、Fab、Fab2、Fv など) を包含する。精製されたDCRS5 はまた、内因性レセプターに対する抗体産生を導く、上昇したレベルの発現または免疫学的障害の存在に応じて生成された抗体を検出するための試薬として使用され得る。さらに、DCRS5 フラグメントはまた、すぐ下に記載されるように、本発明の抗体を産生するための免疫原として役立ち得る。例えば、本発明は、表1に示されるアミノ酸配列もしくはそのフラグメントもしくは種々の相同ペプチドに対する結合親和性を有するか、またはそれらに対して惹起される、抗体を意図する。特に、本発明は、ネイティブなDCRS5 の外部タンパク質表面に露出していると予測されているかもしくは実際に露出している特異的フラグメントに対して結合親和性を有するか、またはそれらのフラグメントに対して惹起されている、抗体を意図する。タンパク質の組合せの複合体もまた有用であり、そしてそれらに対する抗体調製物が作製され得る。

30

40

【0073】

特定の他の実施形態では、(例えば、IL-12R α 1 とのDCRS5 の細胞外リガンド結合セグメントの) 可溶性構築物は、このリガンドについての結合組成物であり得、そしてリガンド媒介性シグナル伝達をブロックするためのリガンドアンタゴニストまたは抗原のいずれかとして有用であり得る。これらは、診断的 (例えば、リガンドについての組織学的標識のために) または治療的 (例えば、リガンドアンタゴニストとして) のいずれ

50

かで有用であり得る。

【0074】

レセプターリガンドに対する生理学的応答のブロックは、おそらく競合阻害を通した、レセプターに対するリガンドの結合の阻害からもたらされ得る。従って、本発明のインビトロアッセイはしばしば、抗体もしくはこれらの抗体の抗原結合セグメント、可溶性レセプター構築物、または固相基材に結合されたフラグメントを使用する。これらのアッセイはまた、リガンド結合領域の変異および改変または（例えば、シグナル伝達機能もしくは酵素機能に影響を与える）他の変異および改変のいずれかの効果の診断決定を可能にする。

【0075】

本発明はまた、競合的薬物スクリーニングアッセイの使用を意図し、例えば、ここで、レセプター複合体またはフラグメントに対する中和抗体は、リガンドまたは他の抗体に対する結合について試験化合物と競合する。このようにして、中和抗体またはフラグメントを使用して、レセプターに対する1以上の結合部位を共有するポリペプチドの存在を検出し得、そしてまたこれを使用して、レセプター上の、そうでなければリガンドを結合し得る結合部位を占有し得る。DCRS5の細胞外（すなわち、リガンド結合）ドメインとIL-12R 1とを組合せた可溶性レセプター構築物は、p40/IL-B30リガンドの競合結合についての有用なアンタゴニストであり得る。

【0076】

（V．核酸およびタンパク質の作製）

タンパク質またはそのフラグメントをコードするDNAは、化学合成、cDNAライブラリーのスクリーニング、または広範な種々の細胞株もしくは組織サンプルから調製されたゲノムライブラリーのスクリーニングによって入手され得る。天然の配列は、標準的方法および本明細書中に（例えば、表1に）提供される配列を用いて単離され得る。他の種対応物は、配列データベース（例えば、GenBank）の検索と組み合わせた、またはこの検索により、ハイブリダイゼーション技術によって、または種々のPCR技術によって、同定され得る。

【0077】

このDNAは、全長レセプターまたはフラグメントの合成のための広範な種々の宿主細胞において発現され得、このレセプターまたはフラグメントは次いで、例えば、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を作製するために；結合研究のために；改変されたりリガンド結合もしくはキナーゼ/ホスファターゼドメインの構築および発現のために；ならびに構造/機能研究のために使用され得る。改変体またはフラグメントは、適切な発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞において発現され得る。これらの分子は、組換え宿主に由来する夾雑物以外にはタンパク質夾雑物も細胞性夾雑物も実質的に含まなくてもよく、それゆえ、薬学的に受容可能なキャリアおよび/または希釈剤と組み合わせられた場合、薬学的組成物中で特に有用である。このタンパク質またはその部分は、他のタンパク質との融合物として発現され得る。記載されたタンパク質またはそれらをコードする核酸の組合せは特に興味深い。

【0078】

発現ベクターは代表的に、通常、適切な宿主細胞中で認識される適切な遺伝的制御エレメントに作動可能に連結された、所望のレセプター遺伝子、そのフラグメントまたは遺伝子の組合せを含む、自己複製するDNA構築物またはRNA構築物である。これらの制御エレメントは、適切な宿主内での発現をもたらし得る。複数の遺伝子は、協調して発現され得、そしてポリシストロン性メッセージに存在し得る。発現をもたらすために必要な特定の型の制御エレメントは、使用される最終的な宿主細胞に依存する。一般に、遺伝的制御エレメントは、原核生物プロモーター系または真核生物プロモーター発現制御系を含み得、そして代表的には転写プロモーター、転写の開始を制御するための必要に応じたオペレーター、mRNA発現のレベルを上昇させるための転写エンハンサー、適切なりボソーム結合部位をコードする配列ならびに転写および翻訳を終結させる配列を含み得る。発現

10

20

30

40

50

ベクターはまた通常、宿主細胞に依存してベクターを複製させる複製起点を含む。

【0079】

本発明のベクターとしては、上記のようなタンパク質または生物学的に活性な等価なポリペプチドの組合せをコードするDNAを含むベクターが挙げられる。このDNAは、ウイルス性プロモーターの制御下にあり得、そして選択マーカをコードし得る。本発明はさらに、このようなタンパク質をコードする真核生物cDNAを原核生物宿主または真核生物宿主において発現し得るような発現ベクターの使用を意図し、ここで、このベクターは、この宿主と適合性であり、そしてここで真核生物cDNAは、このベクターを含む宿主の増殖によって問題のcDNAを発現するようにこのベクター中に挿入されている。通常、発現ベクターは、それらの宿主細胞における安定な複製のために、または細胞あたりの所望の遺伝子の総コピー数を大いに増大させる増幅のために設計される。発現ベクターが宿主細胞において複製するのを要求することは常に必要なわけではなく、例えば、その宿主細胞によって認識される複製起点を含まないベクターを用いて、種々の宿主においてタンパク質またはそのフラグメントの一過性の発現をもたらすことは可能である。組換えによって宿主DNAへのタンパク質コード部分の組込みを引き起こすベクターを使用することもまた可能である。

10

【0080】

本明細書中で使用される場合、ベクターとしては、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組込み可能なDNAフラグメントおよび宿主のゲノムへのDNAフラグメントの組込みを可能にする他のビヒクルが挙げられる。発現ベクターは、作動可能に連結された遺伝子の発現をもたらす遺伝的制御エレメントを含む、特化されたベクターである。プラスミドは、最も普通に使用される形態のベクターであるが、等価な機能を果たし、そして当該分野で公知であるかまたは公知となる、他の全ての形態のベクターは、本明細書中の使用のために適切である。例えば、Pouwelsら(1985および補充物)Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., およびRodriguezら編(1988)Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston(これらは本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

20

【0081】

形質転換された細胞は、組換えDNA技術を用いて構築された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(好ましくは哺乳動物)である。形質転換された宿主細胞は通常、所望のタンパク質を発現するが、そのDNAをクローニング、増幅および操作する目的のためには、その対象タンパク質を発現する必要はない。本発明はさらに、形質転換された細胞を栄養培地中で培養し、従ってタンパク質が蓄積するのを可能にすることを意図する。このタンパク質は、培養物から、または特定の例では培養培地からのいずれかから、回収され得る。

30

【0082】

本発明の目的のためには、核配列が互いに機能的に関連している場合、核配列は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、プレタンパク質として発現されるか、このポリペプチドを細胞膜へと指向させることもしくはこのポリペプチドの分泌に関与する場合、このポリペプチドに作動可能に連結されている。プロモーターは、ポリペプチドの転写を制御する場合、コード配列に作動可能に連結されている; リボソーム結合部位は、翻訳を可能にするように配置されている場合、コード配列に作動可能に連結されている。通常、作動可能に連結されたとは、連続し、そしてリーディングフレームが一致していることを意味するが、特定の遺伝的エレメント(例えば、リプレッサー遺伝子)は、連続して連結されていないが、オペレーター配列に依然として結合し、このことは次いで発現を制御する。

40

【0083】

適切な宿主細胞としては、原核生物、下等真核生物および高等真核生物が挙げられる。

50

原核生物としては、グラム陰性生物およびグラム陽性生物（例えば、*E. coli* および *B. subtilis*）の両方が挙げられる。下等真核生物としては、酵母（例えば、*S. cerevisiae* および *Pichia*）ならびに *Dictyostelium* 属の種が挙げられる。高等真核生物としては、非哺乳動物起源（例えば、昆虫細胞および鳥類）および哺乳動物起源（例えば、ヒト、霊長類および齧歯類）の両方の、動物細胞由来の確立された組織培養細胞株が挙げられる。

【0084】

原核生物宿主ベクター系としては、多くの異なる種のための広範な種々のベクターが挙げられる。本明細書中で使用される場合、*E. coli* およびそのベクターは、他の原核生物において使用される等価なベクターを含むように包括的に使用される。DNAを増幅するための代表的なベクターは、pBR322またはその誘導体の多くである。レセプターまたはそのフラグメントを発現するために使用され得るベクターとしては、以下を含むようなベクターが挙げられるがこれらに限定されない：*lac*プロモーター（*pUC*シリーズ）；*trp*プロモーター（*pBR322 trp*）；*Ipp*プロモーター（*pIN*シリーズ）；*pP*もしくは*pR*プロモーター（*pOTS*）；またはハイブリッドプロモーター（例えば、*ptac*（*pDR540*））。Brosiusら（1988）「Expression Vectors Employing Lambda, and Ipp derived Promoters」, Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, (RodriguezおよびDenhardt編), Butterworth, Boston, 第10章, 205 - 236頁（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

【0085】

下等真核生物（例えば、酵母および *Dictyostelium*）は、DCRS5配列含有ベクターで形質転換され得る。本発明の目的のためには、最も普通の下等真核生物宿主は、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* である。これは、下等真核生物を包括的に示すために使用されるが、多数の他の株および種もまた利用可能である。酵母ベクターは代表的に、複製起点（組換え型の場合を除く）、選択遺伝子、プロモーター、レセプターまたはそのフラグメントをコードするDNA、ならびに翻訳終結、ポリアダニル化および転写終結のための配列からなる。酵母についての適切な発現ベクターは、3ホスホグリセレートキナーゼおよび種々の他の解糖酵素遺伝子のプロモーターのような構成的プロモーター、またはアルコールデヒドロゲナーゼ2プロモーターもしくはメタロチオネインプロモーターのような誘導性プロモーターを含む。適切なベクターとしては、以下の型の誘導体が挙げられる：自己複製する低コピー数（例えば、*YRp*シリーズ）、自己複製する高コピー数（例えば、*YEp*シリーズ）；組込み型（例えば、*YIp*シリーズ）またはミニ染色体（例えば、*YCp*シリーズ）。

【0086】

高等真核生物の組織培養細胞は通常、機能的に活性なインターロイキンまたはレセプタータンパク質の発現のために好ましい宿主細胞である。原則として、無脊椎動物供給源由来であるか脊椎動物供給源由来であるかにかかわらず、多くの高等真核生物の組織培養細胞株（例えば、昆虫バキュロウイルス発現系）が実行可能である。しかし、哺乳動物細胞が好ましい。このような細胞の形質転換またはトランスフェクションおよび増殖は、慣用的手順となっている。有用な細胞株の例としては、*HeLa*細胞、チャイニーズハムスター卵巣（*CHO*）細胞株、ベビーラット腎臓（*BRK*）細胞株、昆虫細胞株、鳥類細胞株、およびサル（*COS*）細胞株が挙げられる。このような細胞株についての発現ベクターは通常、複製起点、プロモーター、翻訳開始部位、RNAスプライス部位（ゲノムDNAを使用する場合）、ポリアダニル化部位および転写終結部位を含む。これらのベクターはまた通常、選択遺伝子または増幅遺伝子を含む。適切な発現ベクターは、例えば、アデノウイルス、SV40、パルボウイルス、ワクシニアウイルスまたはサイトメガロウイルス由来のような供給源から誘導されたプロモーターを保有する、プラスミド、ウイルスまた

はレトロウイルスであり得る。適切な発現ベクターの代表例としては、pCDNA1 ; pCD (Okayamaら (1985) Mol. Cell Biol. 5 : 1136 - 1142 を参照のこと) ; pMC1neo ポリA (Thomasら (1987) Cell 51 : 503 - 512 を参照のこと) ; およびバキュロウイルスベクター (例えば、pAC 373 または pAC 610) が挙げられる。

【0087】

分泌タンパク質およびいくつかの膜タンパク質について、オープンリーディングフレームは通常、そのN末端でシグナルペプチドに共有結合した、成熟産物または分泌産物からなるポリペプチドをコードする。このシグナルペプチドは、成熟ポリペプチドまたは活性なポリペプチドの分泌の前に切断される。切断部位は、高い程度の精度で、経験的法則 (例えば、von-Heijne (1986) Nucleic Acids Research 14 : 4683 - 4690 および Nielsenら (1997) Protein Eng. 10 : 1 - 12) から予測され得、そしてシグナルペプチドの正確なアミノ酸組成はしばしば、その機能に重要ではないようである (例えば、Randallら (1989) Science 243 : 1156 - 1159 ; Kaiserら (1987) Science 235 : 312 - 317)。本発明の成熟タンパク質は、標準的方法を用いて容易に決定され得る。

【0088】

これらのポリペプチドを、特異的または規定のグリコシル化パターンを提供する系において発現することがしばしば望ましい。この場合、通常のパターンは、その発現系によって天然で提供されるパターンである。しかし、このパターンは、このポリペプチド (例えば、非グリコシル化形態) を、異種発現系に導入された適切なグリコシル化タンパク質に暴露することによって改変され得る。例えば、レセプター遺伝子は、哺乳動物または他のグリコシル化酵素をコードする1以上の遺伝子で同時形質転換され得る。このアプローチを用いて、特定の哺乳動物グリコシル化パターンが、原核生物細胞または他の細胞において達成され得る。原核生物細胞における発現は代表的に、非グリコシル化形態のタンパク質をもたらす。

【0089】

DCRS5の供給源は、例えば、上記に記載される、組換えDCRS5を発現する、真核生物宿主または原核生物宿主であり得る。この供給源もまた、細胞株であり得るが、他の哺乳動物細胞株もまた本発明によって意図され、好ましい細胞株はヒト種由来である。

【0090】

配列が公知であるので、霊長類DCRS5、それらのフラグメントまたは誘導体は、ペプチドを合成するための従来のプロセスによって調製され得る。これらとしては、以下に記載されるようなプロセスが挙げられる : StewartおよびYoung (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL ; BodanszkyおよびBodanszky (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, New York ; ならびに Bodanszky (1984) The Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, New York ; これらの各々は、本明細書中に参考として援用される。例えば、アジドプロセス、酸塩化物プロセス、酸無水物プロセス、混合無水物プロセス、活性エステルプロセス (例えば、pニトロフェニルエステル、Nヒドロキシスクシンイミドエステル、もしくはシアノメチルエステル)、カルボジイミダゾールプロセス、酸化的還元プロセス、またはジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD) 添加プロセスが使用され得る。固相合成および液相合成は両方とも、上記のプロセスに適用可能である。同様の技術は、部分的DCRS5配列について使用され得る。

【0091】

DCRS5タンパク質、そのフラグメントまたは誘導体は、一般に、末端アミノ酸に対してアミノ酸を1つずつ順番に縮合させることを含む、いわゆる段階的プロセスによって

、またはペプチドフラグメントを末端アミノ酸に対してカップリングすることによってのいずれかによって、ペプチド合成において代表的に用いられるような上記のプロセスに従って適切に調製される。カップリング反応において使用されないアミノ基は代表的に、不適切な位置でのカップリングを防ぐために保護されなければならない。

【0092】

固相合成が採用される場合、C末端アミノ酸は、そのカルボキシル基を通して、不溶性のキャリアまたは支持体へと結合される。この不溶性キャリアは、反応性カルボキシル基に対する結合能力を有する限り、特に限定されない。このような不溶性キャリアの例としては、ハロメチル樹脂（例えば、クロロメチル樹脂またはブロモメチル樹脂）、ヒドロキシメチル樹脂、フェノール樹脂、tertアルキルオキシカルボニルヒドラジド化樹脂などが挙げられる。

10

【0093】

アミノ基が保護されたアミノ酸は、その活性化されたカルボキシル基と以前に形成されたペプチドまたは鎖の反応性アミノ基との縮合を通して順番に結合されて、ペプチドが少しずつ合成される。完全な配列を合成した後、このペプチドは、不溶性キャリアから切り離されて、このペプチドが産生される。この固相アプローチは、本明細書中に参考として援用される、Merrifieldら(1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2156によって一般に記載される。

【0094】

調製されるタンパク質およびそのフラグメントは、ペプチド分離によって（例えば、抽出、沈澱、電気泳動、種々の形態のクロマトグラフィー、免疫親和性などによって）反応混合物から単離および精製され得る。本発明のレセプターは、所望の使用に依存して種々の程度の純度で入手され得る。精製は、本明細書中に開示されるタンパク質精製技術（以下を参照のこと）の使用によって、または免疫吸着アフィニティークロマトグラフィー（immunoabsorbant affinity chromatography）の方法において本明細書中に記載される抗体の使用によって達成され得る。この免疫吸着アフィニティークロマトグラフィーは、この抗体を固体支持体に最初に連結し、次いで連結した抗体を、適切な細胞の可溶化溶解産物、このレセプターを発現する他の細胞の溶解産物、またはDNA技術（以下を参照のこと）の結果によってこのタンパク質を産生する細胞の溶解産物もしくは上清と接触させることによって実施される。

20

30

【0095】

一般に、精製したタンパク質は、少なくとも約40%純粋、普通少なくとも約50%純粋、通常少なくとも約60%純粋、代表的には少なくとも約70%純粋、より代表的には少なくとも約80%純粋、好ましくは少なくとも約90%純粋、そしてより好ましくは少なくとも約95%純粋、そして特定の実施形態では、97%~99%以上純粋である。純度は通常、重量基準であるが、モル基準であってもよい。異なるアッセイは、必要に応じて適用される。個々のタンパク質が精製され得、その後合わされ得る。

【0096】

（VI. 抗体）

抗体は、天然に存在するネイティブな形態およびそれらの組換え形態の両方の、種々の哺乳動物（例えば、霊長類）のDCRS5タンパク質およびそのフラグメントに対して惹起され得、その差は、活性なレセプターに対する抗体は、ネイティブなコンホメーションにしか存在しないエピトープを認識する可能性がより高いことである。DCRS5とIL-12R-1との組合せ（例えば、官能基）によって提示されるエピトープを認識する抗体もまた意図される。変性させた抗原の検出もまた、例えば、ウェスタン分析において有用であり得る。抗イディオタイプ抗体もまた意図され、これは、天然のレセプターまたは抗体のアゴニストまたはアンタゴニストとして有用である。

40

【0097】

タンパク質の所定のフラグメントに対する抗体（結合フラグメントおよび単鎖バージョンを含む）は、このフラグメントと免疫原性タンパク質との結合体を用いた動物の免疫に

50

よって惹起され得る。モノクローナル抗体は、所望の抗体を分泌する細胞から調製される。これらの抗体は、正常タンパク質もしくは欠損タンパク質に対する結合についてスクリーニングされ得るか、またはアゴニスト活性もしくはアンタゴニスト活性についてスクリーニングされ得る。これらのモノクローナル抗体は通常、少なくとも約 1 mM、より通常は少なくとも約 300 μ M、代表的には少なくとも約 100 μ M、より代表的には少なくとも約 30 μ M、好ましくは少なくとも約 10 μ M、そしてより好ましくは少なくとも約 3 μ M またはより良好な KD で結合する。

【0098】

本発明の抗体（抗原結合フラグメントを含む）は、顕著な診断価値または治療価値を有し得る。これらは、このレセプターに結合し、かつリガンドに対する結合を阻害するかもしれない。これはこのレセプターが生物学的応答を誘発する（例えば、その基質に作用する）能力を阻害する、強力なアンタゴニストであり得る。これらはまた、非中和抗体として有用であり得、そして毒素または放射性核種に対してカップリングされて、産生細胞またはインターロイキンの供給源に局在した細胞に結合し得る。さらに、これらの抗体は、薬物または他の治療剤に、直接的、またはリンカーによって間接的のいずれかで、結合体化され得る。

10

【0099】

本発明の抗体はまた、診断適用において有用であり得る。捕捉抗体または非中和抗体として、これらは、リガンドまたは基質の結合を阻害することなく、このレセプターに結合し得る。中和抗体として、これらは、競合結合アッセイにおいて有用であり得る。これらはまた、リガンドを検出または定量する際に有用である。これらは、ウェスタンブロット分析、またはそれぞれのタンパク質の免疫沈降もしくは免疫精製のための試薬として使用され得る。同様に、核酸およびタンパク質は、アフィニティー精製法またはアフィニティー検出法のために固体支持体に固定され得る。基材は、例えば、固体樹脂ビーズまたはプラスチックシートであり得る。

20

【0100】

タンパク質フラグメントは、免疫原として作用されるべき融合ポリペプチドまたは共有結合ポリペプチドとして、他の物質（特に、ポリペプチド）と連結され得る。哺乳動物サイトカインのレセプターおよびフラグメントは、種々の免疫原（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、破傷風トキソイドなど）に融合または共有結合され得る。Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper および Row, 1969; Landsteiner (1962) Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York; ならびに Williams ら (1967) Methods in Immunology and Immunochimistry, 第1巻, Academic Press, New York を参照のこと; これらの各々は、ポリクローナル抗血清の調製方法の記載に関して本明細書中に参考として援用される。代表的な方法は、抗原での動物の超免疫を含む。次いで、この動物の血液は、反復免疫のすぐ後に収集され、そして グロブリンが単離される。

30

【0101】

いくつかの例では、モノクローナル抗体を種々の哺乳動物宿主（例えば、マウス、齧歯類、霊長類、ヒトなど）から調製することが望ましい。このようなモノクローナル抗体を調製するための技術の説明は、以下に見出され得る：例えば、Stites ら（編）Basic and Clinical Immunology（第4版）, Lange Medical Publications, Los Altos, CA およびその中の参考文献; Harlow および Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice（第2版）Academic Press, New York; ならびに特に Kohler および Milstein (1975) Nature 256: 495 - 497（これ

40

50

は、モノクローナル抗体を生成する1つの方法を考察する)。これらの参考文献の各々は、本明細書中に参考として援用される。手短にまとめると、この方法は、動物に免疫原を注射することを含む。次いでこの動物は屠殺され、そして細胞がその脾臓から採取され、次いでこれは骨髓腫細胞と融合される。この結果は、インビトロで繁殖し得る、ハイブリッド細胞または「ハイブリドーマ」である。次いで、ハイブリドーマの集団はスクリーニングされて個々のクローンが単離され、このクローンの各々は、この免疫原に対する単一の抗体種を分泌する。このようにして、得られる個々の抗体種は、免疫原性物質上で認識される特異的部位に応じて生成された、免疫動物由来の、不死化されてクローン化された単一B細胞の産物である。

【0102】

他の適切な技術は、抗原性ポリペプチドに対する、あるいはファージまたは類似のベクター中の抗体のライブラリーの選択に対する、リンパ球のインビトロ暴露を含む。Hus e ら(1989)「Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda」, Science 246:1275-1281; および Ward ら(1989) Nature 341:544-546 (これらの各々は、これにより、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。本発明のポリペプチドおよび抗体(キメラ抗体またはヒト化抗体を含む)は、改変して、または改変せずに、使用され得る。頻繁に、このポリペプチドおよび抗体は、検出可能なシグナルを提供する物質を共有結合的または非共有結合的のいずれかで連結することによって標識される。広範な種々の標識および結合体化技術は公知であり、そして科学文献および特許文献の両方において広範に報告されている。適切な標識としては、放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光部分、化学発光部分、磁性粒子などが挙げられる。このような標識の使用を教示する特許としては、米国特許第3,817,837号;同第3,850,752号;同第3,939,350号;同第3,996,345号;同第4,277,437号;同第4,275,149号;および同第4,366,241号が挙げられる。また、組換えまたはキメラの免疫グロブリンは、産生され得る(Cabilly, 米国特許第4,816,567号を参照のこと);またはトランスジェニックマウス中に作製され得る(Mendez ら(1997) Nature Genetics 15:146-156)。これらの参考文献は、本明細書中に参考として援用される。

【0103】

本発明の抗体はまた、DCRS5のタンパク質またはペプチドを単離する際にアフィニティークロマトグラフィーのために使用され得る。カラムが調製され得、ここで、この抗体は固体支持体(例えば、粒子(例えば、アガロース、Sephadex など))に結合されており、細胞溶解産物をこのカラムに通過させ得、カラムを洗浄し得、続いて軽度変性剤(mild denaturant)の濃度を増大させ得、それによって、精製タンパク質が放出される。あるいは、このタンパク質を使用して、抗体を精製し得る。適切な交叉吸収(cross absorption)または除去が適用され得る。

【0104】

この抗体をまた使用して、発現ライブラリーを特定の発現産物についてスクリーニングし得る。通常、このような手順において使用される抗体は、抗体結合によって抗原の存在の容易な検出を可能にする部分を用いて標識される。

【0105】

サイトカインレセプターに対して惹起された抗体をまた用いて、抗イディオタイプ抗体を惹起する。これらは、このタンパク質の発現に関連した種々の免疫学的状態またはこのタンパク質を発現する細胞を検出または診断する際に有用である。これらはまた、天然に存在するリガンドについての競合的レセプターインヒビターまたは置換物であり得る、このリガンドのアゴニストまたはアンタゴニストとして有用である。レセプターサブユニットまたは組合せに対する特定の抗体は活性化抗体として役立ち得、この活性化抗体は、シグナル伝達をもたらしてそれによって例えば、リガンドアゴニストとして役立ち得る。

【0106】

規定された免疫原（例えば、配列番号2のアミノ酸配列からなる免疫原）に対して作製された抗体に特異的に結合するかまたは特異的に免疫反応性であるサイトカインレセプタータンパク質は代表的に、免疫アッセイにおいて決定される。この免疫アッセイは代表的に、例えば、配列番号2のタンパク質に対して惹起されたポリクローナル抗血清を使用する。この抗血清は、（好ましくは同じ種由来の）他のサイトカインレセプターファミリーのメンバー（例えば、IL-12R₂レセプターサブユニットまたはIL-6レセプターサブユニットgp130に対して低い交叉反応性を有するように選択され、そしてあらゆるこのような交叉反応性は、この免疫アッセイにおける使用の前に免疫吸収によって除去される。

10

【0107】

免疫アッセイにおいて使用するための抗血清を産生するために、このタンパク質（例えば、配列番号2のタンパク質）は、本明細書中に記載される通りに単離される。例えば、組換えタンパク質は、哺乳動物細胞株中で産生され得る。適切な宿主（例えば、マウスの近交系系統（例えば、Balb/c））は、代表的には標準的なアジュバント（例えば、Freundアジュバント）および標準的なマウス免疫プロトコル（HarlowおよびLane, 前出を参照のこと）を用いて選択されたタンパク質で免疫される。あるいは、本明細書中に開示された配列から誘導され、かつキャリアタンパク質に結合体化された合成ペプチドは、免疫原として使用され得る。ポリクローナル血清が収集され、そして免疫アッセイ（例えば、免疫原が固体支持体に固定された固相免疫アッセイ）において、この免疫原タンパク質に対して力価測定される。10⁴以上の力価を有するポリクローナル抗血清が選択され、そして他のサイトカインレセプターファミリーのメンバー（例えば、gp130またはIL-12R₁）に対するそれらの交叉反応性について、競合結合免疫アッセイ（例えば、HarlowおよびLane, 前出, 570-573頁に記載される競合結合免疫アッセイ）を用いて試験される。好ましくは、少なくとも2つのサイトカインレセプターファミリーのメンバーは、この決定において使用される。これらのサイトカインレセプターファミリーのメンバーは、本明細書中に記載されるような標準的な分子生物学およびタンパク質化学の技術を用いて、組換えタンパク質として産生され得、そして単離され得る。

20

【0108】

競合結合形式の免疫アッセイは、交叉反応性決定のために使用され得る。例えば、配列番号2のタンパク質は、固体支持体に固定され得る。このアッセイに添加されたタンパク質は、固定された抗原に対するこの抗血清の結合と競合する。上記のタンパク質が、固定されたタンパク質に対するこの抗血清のタンパク質を競合する能力は、タンパク質（例えば、gp130またはIL-12R₂のタンパク質）と比較される。上記のタンパク質についての交叉反応性パーセントが、標準的算出を用いて算出される。上記に列挙したタンパク質の各々と10%未満の交叉反応性を有する抗血清が選択され、そしてプールされる。次いで、交叉反応性抗体は、上記のタンパク質を用いた免疫吸収によってプールされた抗血清から除去される。

30

【0109】

次いで、免疫吸収およびプールされた抗血清を上記のように競合結合免疫アッセイにおいて使用して、免疫原タンパク質（例えば、配列番号2のDCRS5様タンパク質）に対する第二のタンパク質を比較する。この比較を行うために、この2つのタンパク質は、広い濃度範囲で各々アッセイされ、そして固定されたタンパク質に対するこの抗血清の結合の50%を阻害するために必要とされる各タンパク質の量が決定される。必要とされる第二のタンパク質の量が、必要とされる選択されたタンパク質のタンパク質量の二倍よりも少ないならば、第二のタンパク質は、この免疫原に対して生成された抗体に特異的に結合するといわれる。

40

【0110】

これらのサイトカインレセプタータンパク質が、多くの同定された遺伝子を含む相同タ

50

ンパク質のファミリーのメンバーであることが理解される。特定の遺伝子産物（例えば、DCRS5）に関して、この用語は、本明細書中に開示されたアミノ酸配列だけでなく、対立遺伝子改変体、非対立遺伝子改変体または種改変体である他のタンパク質をもいう。この用語が、従来の組換え技術（例えば、単一部位変異）を用いる意図的な変異によって、またはそれぞれのタンパク質をコードするDNAの短いセクションを切り出すことによって、または新たなアミノ酸を置換することによって、または新たなアミノ酸を付加することによって導入された非天然変異を含むこともまた理解される。このような重要でない変更は代表的に、元の分子の免疫的個性（immunoidentity）および/またはその生物学的活性を実質的に維持する。従って、これらの変更としては、指定された天然に存在するDCRS5タンパク質と特異的に免疫反応性であるタンパク質が挙げられる。変更されたタンパク質の生物学的特性は、適切な細胞株中でこのタンパク質を発現し、そして適切な効果（例えば、トランスフェクトされたリンパ球に対する効果）を測定することによって決定され得る。重要でないといみなされる特定のタンパク質改変としては、全体として、サイトカインレセプターファミリーについて上記の通りの、類似の化学的特性を有する、アミノ酸の保存的置換が挙げられる。タンパク質をサイトカインレセプターのタンパク質と最適に整列することによって、および免疫的個性を決定するために本明細書中に記載される従来の免疫アッセイを使用することによって、本発明のタンパク質組成物を決定し得る。

10

【0111】

さらに、レセプターサブユニットに対する抗体は、機能的レセプターに対するリガンド結合を立体化学的にブロックするのに役立ち得る。このような抗体は、サブユニット単独またはDCRS5とIL-12R α 1との組合せのいずれかに対して惹起され得る。抗体アンタゴニストが生じる。

20

【0112】

（VII．キット、診断および定量）

天然に存在する形態および組換え形態の両方の本発明のサイトカインレセプター様分子は、キットおよびアッセイ方法において特に有用である。例えば、これらの方法はまた、例えば、これらのタンパク質についてのリガンドを結合活性についてスクリーニングするために適用され得る。アッセイを自動化するいくつかの方法が近年開発されており、その結果、1年あたり数万の化合物のスクリーニングが可能である。例えば、BIOMEK自動化ワークステーション、Beckman Instruments, Palo Alto, California, およびFodorら(1991) Science 251: 767-773（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。後者は、固体支持体上で合成された複数の規定されたポリマーによって結合を試験するための手段を記載する。リガンドまたはアゴニスト/アンタゴニスト相同タンパク質についてスクリーニングするために適切なアッセイの開発は、本発明によって提供されるような、活性な状態の、大量の精製された可溶性サイトカインレセプターの入手可能性によって大いに促進され得る。

30

【0113】

精製されたDCRS5は、上記のリガンドスクリーニング技術における使用のためにプレートに直接コーティングされ得る。しかし、これらのタンパク質に対する非中和抗体は、例えば、診断的使用において有用な、それぞれのレセプターを固相に固定するための捕捉抗体として使用され得る。

40

【0114】

本発明はまた、DCRS5タンパク質またはそのリガンドの存在を検出するための種々の診断キットおよび診断方法におけるDCRS5、そのフラグメント、ペプチドおよびそれらの融合産物の使用を意図する。あるいは、またはさらに、この分子に対する抗体は、このキットおよび方法に組み込まれ得る。代表的には、このキットは、DCRS5ペプチドもしくは遺伝子セグメントまたは一方もしくは他方を認識する試薬のいずれかを含む区画を有する。代表的に、認識試薬は、ペプチドの場合、レセプターもしくは抗体であり、

50

または遺伝子セグメントの場合、通常、ハイブリダイゼーションプローブである。他のキット成分は、このリガンド/レセプター対合の p 40、I L - B 30 または I L - 1 2 R 1 ポリペプチドに関連した他のタンパク質または試薬を含み得る。

【0115】

サンプル中の D C R S 5 の濃度を決定するための好ましいキットは代表的に、D C R S 5 に対して既知の結合親和性を有する標識化合物（例えば、リガンドまたは抗体）、ポジティブコントロールとしての D C R S 5（天然に存在するかまたは組換え体）の供給源、および結合した標識化合物を遊離の標識化合物から分離するための手段（例えば、試験サンプル中の D C R S 5 を固定するための固相）を含む。試薬を含む区画および使用説明書は通常提供される。適切な核酸またはタンパク質を含有するキットもまた提供される。

10

【0116】

哺乳動物 D C R S 5 もしくはペプチドフラグメントまたはレセプターフラグメントに特異的な抗体（抗原結合フラグメントを含む）は、上昇したレベルのリガンドおよび/またはそのフラグメントの存在を検出するための診断適用において有用である。診断アッセイは、均質（遊離試薬と抗体-抗原複合体との間の分離工程を伴わない）または不均質（分離工程を伴う）であり得る。種々の商業的アッセイ（例えば、放射免疫アッセイ（R I A）、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、酵素免疫アッセイ（E I A）、酵素増幅免疫アッセイ技術（E M I T）、基質標識蛍光免疫アッセイ（S L F I A）など）が存在する。例えば、未標識の抗体は、標識されかつサイトカインレセプターまたはその特定のフラグメントに対する抗体を認識する第二の抗体を用いることによって用いられ得る。これらのアッセイはまた、文献に広範に考察されている。例えば、Harlow および Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH, ならびに Coligan 編 (1991 および定期補充物) Current Protocols In Immunology Greene/Wiley, New York を参照のこと。

20

【0117】

抗イディオタイプ抗体は、サイトカインレセプターのアゴニストまたはアンタゴニストとして役立つ、同様の用途を有し得る。これらは、適切な環境下では治療試薬として有用であるはずである。

【0118】

頻繁に、診断アッセイについての試薬は、アッセイの感度を最適化するようにキット中に供給される。本発明に関して、アッセイ、プロトコルおよび標識の性質に依存して、標識抗体もしくは未標識抗体、または標識リガンドのいずれかが提供される。これは通常、他の添加物（例えば、緩衝剤、安定剤、シグナル産生について必要な物質（例えば、酵素についての基質）など）とともにある。好ましくは、このキットはまた、内容物の適切な使用および使用後の内容物の廃棄に関する使用説明書を含む。代表的には、このキットは、各有用な試薬についての区画を有し、そして試薬の適切な使用および廃棄に関する使用説明書を含む。望ましくは、この試薬は、乾燥した凍結乾燥粉末として提供され、ここで、この試薬は、アッセイを実施得るために適切な濃度を有する水性媒体中で再構成され得る。

30

40

【0119】

診断アッセイの上記の構成要素は、改変することなく使用され得るか、または種々の方法で改変され得る。例えば、標識は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に提供する部分を共有結合的または非共有結合的に連結することによって達成され得る。これらのアッセイの多くでは、試験化合物、サイトカインレセプターまたはそれに対する抗体は、直接的または間接的のいずれかで標識され得る。直接的標識についての可能性は、標識基を含む：放射性標識（例えば、¹²⁵I）、酵素（米国特許第 3,645,090 号）（例えば、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼ）、ならびに蛍光強度、波長のシフトまたは蛍光偏光における変化をモニタリングし得る蛍光標識（米国特許第 3,940,475 号）。両方の特許は、本明細書中に参考として援用される。間接的標識の可能

50

性は、一つの構成要素のビオチン化、続いて上記の標識基のうちの１つにカップリングしたアビジンに対する結合を含む。

【 0 1 2 0 】

結合したリガンドを遊離のリガンドから分離するか、あるいは結合した試験化合物を遊離の試験化合物から分離する多数の方法もまた存在する。サイトカインレセプターは、種々のマトリックスに固定され得、続いて洗浄され得る。適切なマトリックスとしては、E L I S A プレート、フィルター、およびビーズのようなプラスチックが挙げられる。このレセプターをマトリックスに固定する方法としては、プラスチックへの直接接着、捕捉抗体の使用、化学的カップリングおよびビオチンアビジンが挙げられるがこれらに限定されない。このアプローチにおける最後の工程は、例えば、有機溶媒（例えば、ポリエチレングリコール）または塩（例えば、硫酸アンモニウム）を利用する方法を含むいくつかの方法のうちのいずれかによる、抗体 / 抗原複合体の沈澱を含む。他の適切な分離技術としては、R a t t l e ら (1 9 8 4) C l i n . C h e m . 3 0 (9) : 1 4 5 7 - 1 4 6 1 に記載されるフルオレセイン抗体磁化性粒子法および二重抗体磁性粒子分離（例えば、米国特許第 4 , 6 5 9 , 6 7 8 号に記載される通り）が挙げられるがこれらに限定されない（これらの各々は、本明細書中に参考として援用される）。

10

【 0 1 2 1 】

タンパク質またはフラグメントを種々の標識に対して連結するための方法は、文献に広範に報告されており、本明細書での詳細な考察を必要としない。この技術の多くは、ペプチド結合を形成するためのカルボジイミドもしくは活性なエステルの使用、メルカプト基と活性化ハロゲン（例えば、クロロアセチル）の反応によるチオエーテルの形成、または連結のための活性化オレフィン（例えば、マレイミド）などをのいずれかを通した、活性化されたカルボキシル基の使用を含む。融合タンパク質はまた、これらの適用において用途を見出す。

20

【 0 1 2 2 】

本発明の別の診断局面は、サイトカインレセプターの配列から得られたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列の使用を含む。これらの配列は、免疫学的障害を有することが疑われる患者におけるそれぞれのサイトカインレセプターのレベルを検出するためのプローブとして使用され得る。RNA および DNA の両方のヌクレオチド配列の調製、この配列の標識およびこの配列の好ましい大きさは、文献において豊富に記載および考察されている。通常、オリゴヌクレオチドプローブは、少なくとも約 1 4 ヌクレオチド、通常少なくとも約 1 8 ヌクレオチドを有するはずであり、そしてポリヌクレオチドプローブは、数千塩基までを有し得る。種々の標識が用いられ得、最も通常は、放射性核種（特に ^{32}P ）が用いられ得る。しかし、ポリヌクレオチドへの導入のためにビオチンで改変したヌクレオチドを用いるような、他の技術もまた用いられ得る。次いで、ビオチンは、アビジンまたは抗体への結合のための部位として役立ち、アビジンまたは抗体は、広範な種々の標識（例えば、放射性核種、蛍光剤、酵素など）で標識され得る。あるいは、特異的二重鎖（DNA 二重鎖、RNA 二重鎖、DNA - RNA ハイブリッド二重鎖または 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。次いで、この抗体は標識され得、そしてアッセイが実施され得、ここで、この二重鎖は表面に結合されており、その結果、この表面上で二重鎖が形成されると、この二重鎖に結合した抗体の存在が検出され得る。新規のアンチセンス RNA に対するプローブの使用は、核酸ハイブリダイゼーション、プラスおよびマイナスのスクリーニング、組換えプロービング、ハイブリッド翻訳放出（HRT）およびハイブリッド翻訳阻害（HART）のような従来技術において実施され得る。これはまた、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような増幅技術を含む。

30

40

【 0 1 2 3 】

他のマーカーの定性的または定量的な存在についても試験する診断キットもまた意図される。診断または予後は、マーカーとして使用される複数の指標の組合せに依存し得る。従って、キットは、マーカーの組合せについて試験し得る。例えば、V i a l l e t ら (1 9 8 9) P r o g r e s s i n G r o w t h F a c t o r R e s . 1 : 8 9 -

50

97を参照のこと。機能的レセプターシグナル伝達の相違を反映し得る多型バリエーションの検出は、治療ストラテジーを決定する際に有用であり得る。リガンドに対する、より大きいかまたはより小さい応答を反映するバリエーションは、応答性／非応答性の患者プールのサブセット化(subsetting)を可能にし得る。

【0124】

(VII. 治療有用性)

本発明は、顕著な治療的価値を有する試薬を提供する。例えば、Levitzki(1996)Curr. Opin. Cell Biol. 8:239-244を参照のこと。サイトカインレセプター(天然に存在するかまたは組換え体)、そのフラグメント、ムテインレセプターおよび抗体は、このレセプターまたは抗体に対する結合親和性を有すると同定された化合物とともに、このレセプターまたはそれらのリガンドの異常な発現を示す状態の処置において有用であるはずである。このような異常は代表的に、免疫学的障害によって症状が発現する。本明細書中に参考として援用される、WO 01/18051を参照のこと。さらに、本発明は、このリガンドに対する応答の異常な発現または異常な誘発に関連した種々の疾患または障害において治療的価値を提供するはずである。例えば、p40/IL-B30リガンドは、細胞媒介性免疫(例えば、抗腫瘍活性)の発達、体液性免疫および細胞性免疫の上昇、ならびに抗ウイルス効果に関与することが示唆されている。特に、このリガンドは、NK細胞およびT細胞を活性化するのである。治療は、IL-18、IL-12、TNF、IFN、放射線治療/化学療法、アジュバントまたは抗腫瘍化合物、抗ウイルス化合物もしくは抗真菌化合物と組み合わせられ得る。

【0125】

逆に、TNF、IFN、IL-18もしくはIL-12のアンタゴニストと、またはIL-10もしくはステロイドと組み合わせられ得るアンタゴニストは、慢性Th1媒介性疾患、自己免疫または移植および/もしくは拒絶状態、多発性硬化症、乾癬、慢性炎症状態、慢性関節リウマチ、変形性関節症あるいは炎症性腸疾患において示され得る。アンタゴニストは、このレセプターサブユニットに対する抗体、可溶性レセプター構築物、またはこのレセプターサブユニットのうちの1以上に対するアンチセンス核酸の形態をとり得る。p40/IL-B30リガンドとレセプターサブユニットDCRS5およびIL-12R1との適合は、このアゴニストおよびアンタゴニストの使用のための指標についての洞察を提供する。

【0126】

治療的には、記載されるp40/IL-B30活性に基づいて、このサイトカインのアンタゴニストが、例えば、可溶性IL-12R1を伴うかもしくは伴わない可溶性DCRS5またはいずれかのレセプターサブユニットに対する抗体によってもたらされ得る。アンタゴニストは、望ましくない免疫応答もしくは炎症応答のインヒビターとして、記憶T細胞を標的とするために、またはIL-12/IL-12Rアンタゴニスト、または他の抗炎症剤もしくは免疫抑制剤との組合せにおいて有用であり得る。臨床的指標は、慢性の炎症または移植状態であり得る。種々の多型は、レセプターの機能を増強または減少させ得、そして有性の場合、治療剤として有用であり得る。このような改変体の同定は、応答性または非応答性の患者のプールのサブセット化を可能にし得る。試薬は、検出試薬もしくは標識試薬または記憶T細胞および/もしくはNK細胞についての除去試薬として有用であり得る。

【0127】

遺伝子治療は、例えば、腫瘍免疫治療のためのアジュバントとして、所望の細胞集団をp40/IL-B30リガンドに対して応答性にして、腫瘍浸潤リンパ球、T細胞またはNK細胞の活性化を容易にし得る。アンチセンスストラテジーを適用して、例えば、レセプター応答性を妨害し得る。

【0128】

種々の異常な状態は、ノーザンブロット分析によってIL-12 p40および/またはIL-B30の両方のmRNAを産生することが示されている細胞型において公知であ

る。Berkow (編) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N. J.; Thornら, Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, N. Y.; および Weatherallら (編) Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, Oxford を参照のこと。多くの他の医学的状態および疾患は、本明細書中に提供されるアゴニストまたはアンタゴニストによる処置に対して応答性である。例えば、Stites および Terr 編 (1991) Basic and Clinical Immunology Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut; ならびに Samterら (編) Immunological Diseases Little, Brown and Co. を参照のこと。処置についての他の同様の指標としては、骨再造型、性機能障害、神経変性疾患の予防、痴呆、ストレスなどが挙げられる。これらの問題は、本明細書中に提供される組成物を用いた予防または処置に対して感受性であるべきである。

10

20

30

40

50

【0129】

組換えサイトカインレセプター、ムテイン、それらに対するアゴニストもしくはアンタゴニスト抗体、または抗体は精製され得、次いで患者に投与され得る。これらの試薬は、治療的使用のために、例えば、生理学的に無害の安定剤および賦形剤を伴う従来の薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤中で、さらなる活性成分と組み合わせられ得る。これらの組合せは、無菌（例えば、濾過される）であり得、そして投薬形態にされ得る（例えば、投薬バイアル中での凍結乾燥または安定化された水性調製物中での貯蔵によって）。本発明はまた、補体結合性でない、抗体またはその結合フラグメントの使用を意図する。

【0130】

サイトカインレセプターまたはそのフラグメントを用いたリガンドスクリーニングを実施して、このレセプターに対する結合親和性を有する分子を同定し得る。次いで、その後の生物学的アッセイを利用して、固有の刺激活性をブロックし得る競合結合を推定のリガンドが提供し得るか否かを決定し得る。レセプターフラグメントは、リガンドの活性をブロックするという点で、ブロッカーまたはアンタゴニストとして使用され得る。同様に、固有の刺激活性を有する化合物は、このレセプターを活性化し得、従って、リガンドの活性を刺激する（例えば、シグナル伝達を誘導する）という点で、アゴニストである。本発明はさらに、サイトカインレセプターに対する抗体の、アンタゴニストとしての治療的使用を意図する。

【0131】

効果的な治療のために必要な試薬の量は、多くの異なる要因（投与手段、標的部位、試薬の生理学的寿命、薬理学的寿命、患者の生理学的状態、および投与される他の医薬（medicant）を含む）に依存する。従って、処置投薬量は、力価測定されて、安全性および効力が最適化されるべきである。代表的に、インビトロで使用される投薬量は、これらの試薬のインサイチュでの投与のために有用な量における有用なガイダンスを提供し得る。特定の障害の処置についての有効用量の動物試験は、ヒトでの投薬量のさらなる予測指標を提供する。種々の考慮事項が、例えば、Gilmanら編 (1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第8版, Pergamon Press; および Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版 (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. (これらの各々は、これにより、本明細書中に参考として援用される) に記載されている。投与方法は、それらの中および以下で、例えば、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与または筋肉内投与、経皮拡散などについて考察されている。薬学的に受容可能なキャリアとしては、水、生理食塩水、緩衝液および例えば、Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jersey に記載される他の化合物が挙げられる。推定リガンドとそのレセプターとの間の親和性結合または代謝回転数が高いようである

ので、低投薬量のこれらの試薬は、最初は有効であると期待される。そしてシグナル伝達経路は、極めて少量のリガンドが効果を有し得ることを示唆する。従って、投薬量の範囲は通常、適切なキャリアを伴って、1 mM濃度未満、代表的には約10 μ M濃度未満、通常約100 nM未満、好ましくは約10 pM（ピコモル濃度）未満、そして最も好ましくは約1 fM（フェムトモル濃度）未満の量であると期待される。徐放処方物または徐放装置はしばしば、連続投与のために利用される。

【0132】

サイトカインレセプター、そのフラグメント、ならびに抗体またはそのフラグメント、アンタゴニストおよびアゴニストは、処置されるべき宿主に直接投与され得るか、または、その化合物の大きさに依存して、それらの投与前にそれらをキャリアタンパク質（例えば、オポアルブミンまたは血清アルブミン）に結合体化することが所望され得る。治療処方物は、多くの従来の投薬処方物において投与され得る。活性成分を単独で投与することは可能であるが、活性成分を薬学的処方物として提示することが好ましい。処方物は、上記に規定されるような、少なくとも1つの活性成分を、その1以上の受容可能なキャリアと一緒に含む。各キャリアは、他の成分と適合性であり、かつ患者に対して有害でないという意味で薬学的かつ生理学的の両方で受容可能でなければならない。処方物としては、経口投与、直腸投与、鼻腔内投与または非経口投与（皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与および皮内投与を含む）に適切な処方物が挙げられる。処方物は、単位投薬量形態で便利に提示され得、そして製薬分野で周知の方法によって調製され得る。例えば、Gilmanら編（1990）Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第8版, Pergamon Press; および Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版（1990）, Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avisら編（1993）Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY; Liebermanら編（1990）Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY; および Liebermanら編（1990）Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NYを参照のこと。本発明の治療は、他の治療剤（特に、他のサイトカインレセプターファミリーのメンバーのアゴニストまたはアンタゴニスト）と組み合わせられ得るかまたはそれとともに使用され得る。

【0133】

（IX. スクリーニング）

DCRS5またはそのフラグメントを用いた薬物スクリーニングを実施して、このレセプターサブユニットに対して結合親和性を有する化合物を同定し得る（関連成分の単離を含む）。次いで、その後の生物学的アッセイを利用して、この化合物が固有の刺激活性を有するか否かを、それゆえ、このリガンドの活性をブロックするという点でこの化合物がブロッカーまたはアンタゴニストであるか否かを決定し得る。

【0134】

さらに、p40/IL-B30リガンドと、IL-12R 1を有するDCRS3の機能的レセプターとの一致は、正のシグナル伝達制御を有するアンタゴニストおよびアゴニストについてのスクリーニングを可能にする。低分子または抗体スクリーニングが行われ得る。

【0135】

薬物スクリーニングの1つの方法は、別のサイトカインレセプターサブユニット（例えば、IL-12R 1）との組み合わせでDCRS5を発現する、組換えDNA分子で安定に形質転換された、真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を利用する。このシグナル伝達は、STAT4を使用すると考えられる。他の機能的レセプターとは孤立してレセプターを発現する細胞が単離され得る。生存形態または固定形態のいずれかの、このような細胞は、標準的な抗体/抗原またはリガンド/レセプター結合アッセイのために使用さ

れ得る。細胞性応答を検出するための高感度の方法を記載する、Parceら(1989) Science 246:243-247;およびOwiczkiら(1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:4007-4011もまた参照のこと。競合アッセイは特に有用であり、ここで、この細胞は、このリガンドに対する既知の結合親和性を有する、標識されたレセプターまたは抗体(例えば、¹²⁵I抗体)およびその結合組成物に対する結合親和性が測定される試験サンプルと接触およびインキュベートされる。次いで、結合した標識結合組成物および遊離の標識結合組成物が分離されて、リガンド結合の程度が評価される。結合した試験化合物の量は、既知の供給源に対する標識レセプター結合の量に逆に比例する。多くの技術を使用して、結合したリガンドを遊離のリガンドから分離し、リガンド結合の程度を評価し得る。この分離工程は代表的に、フィルターへの接着とその後の洗浄、プラスチックへの接着とその後の洗浄、または細胞膜の遠心分離のような手順を含み得る。生存細胞をまた使用して、サイトカイン媒介機能(例えば、STAT4シグナル伝達など)に対する薬物の効果についてスクリーニングし得る。いくつかの検出方法(例えば、近接高感度検出システム)は、分離工程の除去を可能にする。

10

【0136】

本発明の広範な範囲は、以下の実施例を参照して最良に理解される。実施例は、本発明を特定の実施形態に限定することを意図しない。

【実施例】

20

【0137】

(実施例)

(I. 一般的方法)

標準的方法のいくつかは、例えば、Maniatisら(1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrookら(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版), 第1-3巻, CSH Press, NY; または Ausubelら(1987および補充物) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New Yorkにおいて記載または参照される。タンパク質精製のための方法としては、硫酸アンモニウム沈澱、カラムクロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、結晶化などのような方法が挙げられる。例えば、Ausubelら(1987および定期補充物); Coliganら編(1996)および定期補充物, Current Protocols In Protein Science Greene/Wiley, New York; Deutscher(1990)「Guide to Protein Purification」、Methods in Enzymology, 第182巻およびこのシリーズの他の巻; ならびにタンパク質精製製品の使用についての製造業者の文献(例えば、Pharmacia, Piscataway, N.J. または Bio-Rad, Richmond, CA)を参照のこと。組換え技術との組合せは、適切なセグメント(例えば、FLAG配列またはプロテアーゼによって除去可能な配列を介して融合され得る等価物)に対する融合を可能にする。例えば、Hochuli(1990)「Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent」、Setlow(編) Genetic Engineering, Principle and Methods 12:87-98, Plenum Press, N.Y.; および Croweら(1992) QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CAを参照のこと。

30

40

【0138】

コンピュータ配列分析は、例えば、GCG(U. Wisconsin)およびGenB

50

a n k 供給源製のソフトウェアプログラムを含めて、入手可能なソフトウェアプログラムを用いて行われる。例えば、G e n B a n k などからの公の配列データベースもまた使用された。

【0139】

例えば、本明細書中に参考として援用される米国特許第5,789,192号(I L - 10レセプター)に記載されるような、 I L - 10レセプターに適用可能な多くの技術は、 D C R S 5 に適用され得る。

【0140】

(I I . 機能的クローニング)

抗 h I L - 12 R 1抗体が p 40 / I L - B 30に対するヒトT細胞の応答をブロッ
クし、そして p 40 / I L - B 30は I L - 12 R 1に結合することが観察された。こ
のことは、 I L - 12 R 1が p 40 / I L - B 30についてのレセプター複合体のサブ
ユニットの1つであることを示唆した。

10

【0141】

p 40 / I L - B 30に応答するが I L - 12には応答しないマウスT細胞集団、およ
び I L - 12には応答するが p 40 / I L - B 30には応答しない別の集団が同定された
。さらに、組換え m I L - 12 R 1および m I L - 12 R 2を発現する B a / F 3細
胞が I L - 12には応答するが、 p 40 / I L - B 30には応答しないことが観察された
。これらの結果は集合的に、 p 40 / I L - B 30についてのレセプター複合体が、 I L
- 12 R 1および I L - 12 R 2ではない少なくとも1つの他のサブユニットを含む
ことを示した。従って、発現クローニングストラテジーを発明して、この第二のレセプ
ター成分を単離した。

20

【0142】

c D N Aライブラリーを、 K i t 225細胞(I L - 12および p 40 / I L - B 30
の両方に応答する I L - 2依存性ヒトT細胞株)由来の m R N Aから調製した。この c D
N Aライブラリーを、レトロウイルス発現ベクター p M Xを用いて作製した。組換え h I
L - 12 R 1を発現する B a / F 3細胞にこの c D N Aライブラリーを感染させ、 I L
- 3中で3~4日間回復させ、次いで洗浄し、そして96ウェルプレート中で、50 n g
/ m lの過剰な h p 40 / h I L - B 30(h y p e r - h p 40 / h I L - B 30)を
含有する培地中に約15,000細胞/ウェルでプレーティングした。W O 01/18
051を参照のこと。培養物に約5日毎にさらに過剰な h p 40 / h I L - B 30を補充
した。約2週間後、5%~10%のウェルは、細胞増殖を示した。細胞を各ウェルから回
収し、過剰な h p 40 / h I L - B 30中で、より大きな培養物中で個々に増殖させ、そ
して過剰な h p 40 / h I L - B 30に対する増殖依存性について試験した。

30

【0143】

増殖について p 40 / I L - B 30依存性である細胞を、P C Rによってレトロウイル
ス c D N A挿入物について分析した。分析した40を超える単離物のうち、1つを除く全
てが、新規レセプター D C R S 5をコードする c D N Aを含んでいた。この候補ヒト c D
N Aを発現ベクター中にクローニングし、そして h I L - 12 R 1を発現する B a / F
3細胞中にトランスフェクトした。これらの細胞は、 p 40 / I L - B 30に対して応答
性となった；従って、本発明者らは、この新規 c D N Aが、機能的な I L - B 30レセプ
ターサブユニットである所望の D C R S 5をコードすると結論した。

40

【0144】

(I I I . 全長 D C R S 5の特徴；染色体位置決定)

D C R S 5の細胞質ドメインは、他のサイトカインレセプター細胞質ドメイン(これは
、このファミリーの分子における共通の観察結果である)に対して全体としては近縁で
ない。この細胞質ドメインは、7個の t y r 残基を含み、このうちの少なくとも3個は、
認識可能な S H 2結合モチーフの一部である： Y E D I、Y K P Qおよび Y F P Q。この
Y E D Iモチーフは、チロシンホスファターゼ s h p 2について同定された結合部位に類
似する。後者の2つのモチーフは、それぞれ S t a t 1 / S t a t 3または S t a t 3を

50

結合することが公知の配列に非常に類似している。Y K P Qモチーフはまた、近傍の隣接配列と一緒にあって、S t a t 1 ~ 3を結合することが公知である、S t a t 4およびI L - 1 2 R 2中のモチーフにある程度まで類似する。これは、予備的なデータと一致し、このことは、p 4 0 / I L - B 3 0がI L - 1 2と同様にS t a t 4を活性化することを示唆する。

【0145】

D C R S 5 配列から誘導されたP C Rプライマーを使用して、ヒトc D N Aライブラリーをプローブする。配列（好ましくは配列の末端に隣接する配列）は、例えば、表1から誘導され得る。霊長類、齧歯類または他の種のD C R S 5についての全長c D N Aは、例えば、g t 1 0ファージのD N Aハイブリダイゼーションスクリーニングによってクロ

10

【0146】

染色体展開物（c h r o m o s o m e s p r e a d）を調製する。インサイチュハイブリダイゼーションを、72時間にわたって培養したフィットヘマグルチニン刺激ヒトリンパ球から入手した染色体調製物について行う。5 - プロモデオキシウリジンを、培養の最後の7時間にわたって添加して（60 μ g / ml 培地）、ハイブリダイゼーション後の良好な品質の染色体染色を確実にした。

【0147】

プライマーの助けを借りて増幅したP C Rフラグメントを、適切なベクター中にクローニングする。このベクターを、³Hを用いたニック翻訳によって標識する。放射性標識プローブを、分裂中期展開物に対して、M a t t e i ら（1985）Hum . Genet . 69 : 327 - 331に記載されるように200 ng / ml ハイブリダイゼーション溶液の最終濃度でハイブリダイズする。

20

【0148】

核追跡エマルジョン（n u c l e a r t r a c k e m u l s i o n ; K O D A K N T B 2）を用いてコーティングした後、スライドを暴露する。分染手順の間の銀粒子のあらゆるすべりを回避するために、染色体展開物を、緩衝化G i e m s a 溶液で最初に染色し、そして分裂中期を写真撮影する。次いで、蛍光色素 - 光分解 - G i e m s a（F P G）法によってRバンド染色を行い、そして分裂中期を分析前に再度写真撮影する。

30

【0149】

同様の適切な方法を、他の種について使用する。

【0150】

（I V . D C R S 5 m R N A の位置決定）

ヒト複数組織プロット（カタログ番号1、2）および癌細胞株プロット（カタログ番号7757 - 1）（1レーンあたり約2 μ gのポリ（A）⁺RNAを含む）を、C l o n t e c h（P a l o A l t o , C A）から購入する。プローブを、例えば、A m e r s h a m R e d i p r i m e ランダムプライマー標識キット（R P N 1633）を用いて[³²P] d A T Pで放射性標識する。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを、例えば、0.5 M N a₂H P O₄、7% S D S、0.5 M E D T A（p H 8.0）中で65 °Cで行う。高ストリンジェンシーの洗浄を、例えば、2 x S S C、0.1% S D S中で40分間にわたる最初の2回の洗浄、続いて0.1 x S S C、0.1% S D S中で20分間にわたる洗浄を用いて65 °Cで行う。次いで、メンブレンを、増感スクリーンの存在下で-70 °CでX線フィルム（K o d a k）に暴露する。c D N Aライブラリーサザンによる、より詳細な研究は、選択された適切なヒトD C R S 5クローンをを用いて行われて、造血細胞サブセットまたは他の細胞サブセット中でのそれらの発現が調べられる。

40

【0151】

あるいは、2つの適切なプライマーを、表1から選択する。R T - P C Rは、メッセージの存在について選択した適切なm R N A サンプルについて使用して、c D N A（例えば

50

、遺伝子を発現するサンプル)を産生する。

【0152】

全長クローンを、PCRシグナルによって予め選択された適切な組織由来のcDNAライブラリーのハイブリダイゼーションによって単離し得る。ノーザンブロットを行い得る。

【0153】

DCRS5をコードする遺伝子についてのメッセージを、適切な技術(例えば、PCR、免疫アッセイ、ハイブリダイゼーションまたは他の技術)によってアッセイする。組織および器官のcDNA調製物を、例えば、Clontech, Mountain View, CAから入手し得る。天然の発現の供給源の同定は、記載される通り、有用である。そして、機能的レセプターサブユニット対合の同定は、どの細胞が、サイトカインリガンドの各々の生理学的応答性をもたらすレセプターサブユニットの組合せを発現するかを予測することを可能にする。

10

【0154】

マウスでの分布について、例えば、サザン分析を行い得る：一次増幅cDNAライブラリー由来のDNA(5 μg)を適切な制限酵素で消化して挿入片を遊離させ、1%アガロースゲルで泳動し、そしてナイロンメンブレン(SchleicherおよびSchuell, Keene, NY)に移した。

【0155】

マウスmRNA単離のためのサンプルとしては以下が挙げられ得る：休止マウス線維芽細胞性L細胞株(C200)；Braf：ER(エストロゲンレセプターに対するBraf融合物)トランスフェクト細胞(コントロール)(C201)；T細胞(TH1に偏向)(脾臓由来のMe114明CD4+細胞(IFN-および抗IL-4を用いて7日間偏向させた)；T200)；T細胞(TH2に偏向)(脾臓由来のMe114明CD4+細胞(IL-4および抗IFN-を用いて7日間偏向させた)；T201)；T細胞(高度にTH1に偏向)(Openshawら(1995)J. Exp. Med. 182: 1357-1367を参照のこと；2時間、6時間、16時間にわたって抗CD3を用いて活性化し、プールした；T202)；T細胞(高度にTH2に偏向)(Openshawら(1995)J. Exp. Med. 182: 1357-1367を参照のこと；2時間、6時間、16時間にわたって抗CD3を用いて活性化し、プールした；T203)；CD44-CD25+プレT細胞(胸腺から選別された)(T204)；TH1 T細胞クローンD1.1(抗原を用いた最後の刺激後、3週間にわたって休止)(T205)；TH1 T細胞クローンD1.1(10 μg/ml ConAで15時間にわたって刺激した)(T206)；TH2 T細胞クローンCDC35(抗原を用いた最後の刺激後、3週間にわたって休止)(T207)；TH2 T細胞クローンCDC35(10 μg/ml ConAで15時間にわたって刺激した)(T208)；脾臓由来のMe114+未刺激(naive)T細胞(休止)(T209)；Me114+ T細胞(IFN-/IL-12/抗IL-4を6時間、12時間、24時間にわたって用いてTh1に対して偏向し、プールした)(T210)；Me114+ T細胞(IL-4/抗IFN-を6時間、13時間、24時間にわたって用いてTh2に対して偏向し、プールした)(T211)；未刺激の成熟B細胞の白血病細胞株A20(B200)；未刺激のB細胞株CH12(B201)；脾臓由来の未刺激の大きなB細胞(B202)；全脾臓由来のB細胞(LPS活性化)(B203)；脾臓由来のメトリザミド富化樹状細胞(休止)(D200)；骨髓由来の樹状細胞(休止)(D201)；単球細胞株RAW 264.7(LPSを4時間用いて活性化)(M200)；GMおよびM-CSFを用いて誘導した骨髓マクロファージ(M201)；マクロファージ細胞株J774(休止)(M202)；マクロファージ細胞株J774+LPS+抗IL-10(0.5時間、1時間、3時間、6時間、12時間でプール)(M203)；マクロファージ細胞株J774+LPS+IL-10(0.5時間、1時間、3時間、5時間、12時間でプール)(M204)；エアゾールチャレンジマウスの肺組織(Th2プライマー、エアゾールOVAチャレンジ

20

30

40

50

、7時間、14時間、23時間でプール) (Garlissら(1995) *Clinical Immunology and Immunopathology* 75:75-83を参照のこと; X206); Nippostrongulus 感染肺組織 (Coffmanら(1989) *Science* 245:308-310を参照のこと; X200); 全成人肺(正常) (O200); 全肺(rag-1) (Schwarzら(1993) *Immunodeficiency* 4:249-252; O205を参照のこと); IL-10 K.O. 脾臓 (Kuhnら(1991) *Cell* 75:263-274を参照のこと; X201); 全成人脾臓(正常) (O201); 全脾臓(rag-1) (O207); IL-10 K.O. パイアー斑 (O202); 全パイアー斑(正常) (O210); IL-10 K.O. 腸間膜リンパ節 (X203); 全腸間膜リンパ節(正常) (O211); IL-10 K.O. 結腸 (X203); 全結腸(正常) (O212); NODマウス膵臓 (Makinoら(1980) *Jikken Dobutsu* 29:1-13を参照のこと; X205); 全胸腺(rag-1) (O208); 全腎臓(rag-1) (O209); 全心臓(rag-1) (O202); 全脳(rag-1) (O203); 全精巣(rag-1) (O204); 全肝臓(rag-1) (O206); ラット正常関節組織 (O300); およびラット関節炎関節組織 (X300)。

【0156】

ヒトmRNA単離についてのサンプルとしては、以下が挙げられ得る：末梢血単核細胞(単球、T細胞、NK細胞、顆粒球、B細胞)(休止)(T100); 末梢血単核細胞(抗CD3を用いて2時間、6時間、12時間にわたって活性化し、プールした)(T101); T細胞(TH0クローンMot 72)(休止)(T102); T細胞(TH0クローンMot 72)(抗CD28および抗CD3を用いて3時間、6時間、12時間にわたって活性化し、プールした)(T103); T細胞(TH0クローンMot 72)(特異的ペプチドを用いて2時間、7時間、12時間にわたってアネルギー処理し、プールした)(T104); T細胞(TH1クローンHY06)(休止)(T107); T細胞(TH1クローンHY06)(抗CD28および抗CD3を用いて3時間、6時間、12時間にわたって活性化し、プールした)(T108); T細胞(TH1クローンHY06)(特異的ペプチドを用いて2時間、6時間、12時間にわたってアネルギー処理し、プールした)(T109); T細胞(TH2クローンHY935)(休止)(T110); T細胞(TH2クローンHY935)(抗CD28および抗CD3を用いて2時間、7時間、12時間にわたって活性化し、プールした)(T111); T細胞CD4+CD45RO(抗CD28、IL-4および抗IFN- γ 中で27日間にわたって偏向し(polarize)、TH2偏向し、抗CD3および抗CD28を用いて4時間活性化しT細胞た)(T116); T細胞腫瘍株JurkatおよびHut78(休止)(T117); プールしたT細胞クローンAD130.2、Tc783.12、Tc783.13、Tc783.58、Tc782.69(休止)(T118); T細胞ランダム T細胞クローン(休止)(T119); 脾細胞(休止)(B100); 脾細胞(抗CD40およびIL-4を用いて活性化)(B101); プールしたB細胞EBV株WT49、RSB、JY、C VIR、721.221、RM3、HSY(休止)(B102); B細胞株JY(PMAおよびイオノマイシンを用いて1時間、6時間活性化し、プールした)(B103); プールしたNK 20クローン(休止)(K100); プールしたNK 20クローン(PMAおよびイオノマイシンを用いて6時間にわたって活性化)(K101); NK Lクローン(LGL白血病患者の末梢血から誘導される)(IL-2処理)(K106); NK細胞傷害性クローン640-A30-1(休止)(K107); 造血前駆体株TF1(PMAおよびイオノマイシンを用いて1時間、6時間にわたって活性化し、プールした)(C100); U937前単球株(休止)(M100); U937前単球株(PMAおよびイオノマイシンを用いて1時間、6時間にわたって活性化し、プールした)(M101); 溶出した単球(LPS、IFN- γ 、抗IL-10を用いて1時間、2時間、6時間、12時間、24時間にわたって活性化し、プールした)(M102); 溶出した単球(LPS、IFN- γ 、IL-10を用いて1時間、2時間、6時間、12時間、24

10

20

30

40

50

時間にわたって活性化し、プールした) (M103); 溶出した単球 (LPS、IFN、抗IL-10を用いて4時間、16時間にわたって活性化し、プールした) (M106); 溶出した単球 (LPS、IFN、IL-10を用いて4時間、16時間にわたって活性化し、プールした) (M107); 溶出した単球 (1時間にわたって活性化したLPS) (M108); 溶出した単球 (6時間にわたって活性化したLPS) (M109); DC 70% CD1a + (CD34 + GM-CSF、TNF で12日間由来) (休止) (D101); DC 70% CD1a + (CD34 + GM-CSF、TNF で12日間由来) (PMAおよびイオノマイシンを用いて1時間にわたって活性化) (D102); DC 70% CD1a + (CD34 + GM-CSF、TNF で12日間由来) (PMAおよびイオノマイシンを用いて6時間にわたって活性化) (D103); DC 95% CD1a + (CD34 + GM-CSF、TNF で12日間由来、FACS選別、PMAおよびイオノマイシンで1時間、6時間にわたって活性化し、プールした) (D104); DC 95% CD14 + (ex CD34 + GM-CSF、TNF で12日間、FACS選別、PMAおよびイオノマイシンで1時間、6時間にわたって活性化し、プールした) (D105); DC CD1a + CD86 + (CD34 + GM-CSF、TNF で12日間由来、FACS選別、PMAおよびイオノマイシンを用いて1時間、6時間にわたって活性化し、プールした) (K106); DC (単球GM-CSF、IL-4で5日間由来) (休止) (D107); DC (単球GM-CSF、IL-4で5日間由来) (休止) (D108); DC (単球GM-CSF、IL-4で5日間由来) (LPSで4時間、16時間活性化し、プールした) (D109); DC (単球GM-CSF、IL-4で5日間由来) (TNF、単球スープで4時間、16時間にわたって活性化し、プールした) (D110); 平滑筋腫L11良性腫瘍(X101); 正常子宮筋層M5(O115); 悪性平滑筋肉腫GS1(X103); 肺線維芽細胞肉腫株MRC5(PMAおよびイオノマイシンで1時間、6時間にわたって活性化し、プールした) (C101); 腎臓上皮癌細胞株CHA(PMAおよびイオノマイシンで1時間、6時間にわたって活性化し、プールした) (C102); 腎臓胎児28週雄(O100); 肺胎児28週雄(O101); 肝臓胎児28週雄(O102); 心臓胎児28週雄(O103); 脳胎児28週雄(O104); 胆嚢胎児28週雄(O106); 小腸胎児28週雄(O107); 脂肪組織胎児28週雄(O108); 卵巣胎児25週雌(O109); 子宮胎児25週雌(O110); 精巣胎児28週雄(O111); 脾臓胎児28週雄(O112); 成体胎盤28週(O113); および12歳のときから炎症にかかった扁桃(X100)。

【0157】

同様のサンプルは、評価のために他の種において単離され得る。

【0158】

(V.DCRS5の種対応物のクローニング)

種々のストラテジーは、(好ましくは他の霊長類または齧歯類から)DCRS5の種対応物を得るために使用される。1つの方法は、近縁種DNAプローブを用いた交叉ハイブリダイゼーションによる。進化的に類似の種を中間工程として入れることは有用であり得る。別の方法は、遺伝子間の類似性ブロックまたは相違ブロック(例えば、高度に保存されたかまたは保存されていないポリペプチド配列またはヌクレオチド配列の領域)の同定に基づいた特異的PCRプライマーを用いることによる。

【0159】

データベース検索は、類似の配列を同定し得、そして適切なプローブの産生を可能にし得る。

【0160】

(VI.哺乳動物DCRS5タンパク質の産生)

適切な(例えば、GST)融合構築物は、例えば、E.coliにおける発現のために操作される。例えば、マウスIGIF pGexプラスミドは構築物され、そしてE.coli中に形質転換される。新鮮に形質転換された細胞は、例えば、50μg/mlアンピシリンを含むLB培地中で増殖され、そしてIPTG(Sigma, St. Louis

、MO)を用いて誘導される。一晚の誘導後、細菌は収集され、そしてDCRS5タンパク質を含むペレットが単離される。このペレットは、例えば、2リットルのTE緩衝液(50mM Tris-塩基(pH8.0)、10mM EDTAおよび2mMペファブロック(pefabloc))中で均質化される。この物質を、マイクロフルイダイザー(Microfluidics, Newton, MA)に3回通過させる。流動化された上清は、Sorvall GS-3ローターで13,000rpmで1時間にわたってスピンドウンされる。サイトカインレセプタータンパク質を含む得られる上清は濾過され、50mM Tris-塩基(pH8.0)中で平衡化されたグルタチオン-SEPHAROSEカラムに通される。DCRS5-GST融合タンパク質を含む画分はプールされ、そして例えば、トロンピン(Enzyme Research Laboratories, Inc., South Bend, IN)で切断される。次いで、切断されたプールは、50mM Tris-塩基中で平衡化されたQ-SEPHAROSEカラムに通される。DCRS5を含む画分はプールされ、そして冷蒸留H₂O中で希釈されて伝導率が下げられ、そして新鮮なQ-Sepharoseカラムに単独で、または免疫親和性抗体カラムと連続して通される。DCRS5タンパク質を含む画分がプールされ、アリコートに分けられ、そして-70のフリーザー中で保存される。

10

【0161】

サイトカインレセプタータンパク質とのCDスペクトルの比較は、このタンパク質が正確に折り畳まれていることを示唆し得る。Hazudaら(1969)J. Biol. Chem. 264:1689-1693を参照のこと。

20

【0162】

(VII. DCRS5について特異的な抗体の調製)

近交系Balb/cマウスは、組換え形態のタンパク質(例えば、精製したDCRS5)または安定なトランスフェクトNIH-3T3細胞で腹腔内免疫される。動物は、さらなるアジュバントを含むかまたは含まないタンパク質を適切な時点で追加免疫されて、抗体産生がさらに刺激される。血清は収集されるか、または収集された脾臓を用いてハイブリドーマが産生される。

【0163】

あるいは、Balb/cマウスは、内因性細胞または外因性細胞のいずれかである、この遺伝子もしくはそのフラグメントで形質転換した細胞で免疫されるか、またはこの抗原の発現について富化された単離された膜で免疫される。血清が適切な時点で、代表的には多数のさらなる投与後に収集される。種々の遺伝子治療技術は、例えば、免疫応答を生じするためのタンパク質をインサイチュで産生する際に有用であり得る。血清または抗体の調製物は、交叉吸収または免疫選択されて、規定の特異性および高親和性の実質的に純粋な抗体が調製され得る。

30

【0164】

モノクローナル抗体が作製され得る。例えば、脾細胞は、適切な融合パートナーと融合され、そしてハイブリドーマは、標準的な手順によって増殖培地中で選択される。ハイブリドーマ上清は、DCRS5に結合する抗体の存在について、例えば、ELISAまたは他のアッセイによってスクリーニングされる。特異的DCRS5実施形態を特異的に認識する抗体もまた選択または調製され得る。

40

【0165】

別の方法では、合成ペプチドまたは精製タンパク質は、免疫系に対して提示されて、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が作製される。例えば、Coligan編(1991)Current Protocols in Immunology Wiley/Greene;ならびにHarlowおよびLane(1989)Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Pressを参照のこと。適切な状況では、結合試薬は、(例えば、蛍光もしくは他のもので)上記の通りに標識されるかまたはパニング方法のために基材に固定されるかのいずれかである。核酸もまた、動物内の細胞中に導入されて抗原を産生し得、この抗原

50

は、免疫応答を惹起するのに役立つ。例えば、Wangら(1993)Proc. Nat'l. Acad. Sci. 90: 4156 - 4160; Barryら(1994)Bio Techniques 16: 616 - 619; およびXiangら(1995)Immunity 2: 129 - 135を参照のこと。

【0166】

(VII. DCRS5を有する融合タンパク質の産生)

例えばIL-12R 1配列を合わせる実施形態を含め、種々の融合構築物は、DCRS5を用いて作製される。適切な遺伝子の一部分は、エピトープタグ(例えば、FLAGタグ)またはツーハイブリッドシステム構築物に融合される。例えば、FieldsおよびSong(1989)Nature 340: 245 - 246を参照のこと。

10

【0167】

エピトープタグは、発現クローニング手順において使用され、抗FLAG抗体を用いて検出されて、結合パートナー(例えば、それぞれのサイトカインレセプターについてのリガンド)が検出され得る。このツーハイブリッドシステムはまた使用されて、DCRS5に特異的に結合するタンパク質が単離され得る。

【0168】

(IX. 構造活性関係)

特定の残基の重要性についての情報は、標準的な手順および分析を用いて決定される。標準的な変異誘発分析は、例えば、多くの異なる改変体を所定の位置(例えば、上記で同定した位置)で作製し、そして改変体の生物学的活性を評価することによって行われる。これは、活性を改変する位置を決定する程度まで、または特定の位置に焦点を当てて、置換されると生物学的活性を保持、ブロックもしくは調節するかのいずれかであり得る残基を決定するために行われ得る。

20

【0169】

あるいは、天然の改変体の分析は、どの位置が天然の変異に耐えるかを示し得る。これは、個体間の、または系統もしくは種をまたがったバリエーションの集団分析から生じ得る。選択された個体由来のサンプルは、例えば、PCR分析および配列決定によって分析される。これは、集団多型の評価を可能にする。

【0170】

(X. DCRS5とIL-12R 1との同時発現)

30

それぞれの遺伝子をコードするベクターは、細胞中にトランスフェクトされ得る。好ましくは、このようなベクターは、どの細胞が好首尾に形質転換されたかを同定するための選択マーカーを有する。2つの遺伝子の同時発現は、遺伝子産物が正確に会合して活性なレセプター複合体を形成するのを可能にする。

【0171】

あるいは、機能的ダイマーの会合を引き起こす方法の使用が利用可能である。例えば、O'Sheaら(1989)Science 245: 646 - 648; Kostelnýら(1992)J. Immunol. 148: 1547 - 1553; およびPatelら(1996)J. Biol. Chem. 271: 30386 - 30391を参照のこと。細胞外ドメインの発現および例えば、Fos/Junロイシンジッパー親和性によって駆動される物理的会合は、診断的使用または治療的使用のために結合化合物として作用するはずであるリガンド結合構築物をもたらす。

40

【0172】

本明細書中の全ての引用物は、あたかも各々の個々の刊行物または特許出願が具体的かつ個々に参考として援用されると示されたかのような程度まで、本明細書中に参考として援用される。

【0173】

本発明の多くの改変およびバリエーションは、当業者に明らかであるように、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく行われ得る。本明細書中に記載される特定の実施形態は、例としてのみ提供され、そして本発明は、このような請求の範囲に権利が与えられ

50

る全範囲の等価物とともに添付の特許請求の範囲によって限定される；そして本発明は、例として本明細書中に提示された特定の実施形態によって限定されない。

【配列表】

2012187111000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 A	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	C 0 7 K 14/715	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
	A 6 1 P 37/06	

- (72)発明者 マダリン チリカ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 1 , パロ アルト , ユニバーシティ アベニュー
1 5 2 0
- (72)発明者 ロバート エイ . カステレイン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 2 , レッドウッド シティ , サミット ドライブ
4 6 3
- (72)発明者 ケビン ダブリュー . ムーア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 6 , パロ アルト , カロリナ レーン 2 5 1
- (72)発明者 クリスティ エル パラム
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 6 , サン フランシスコ , 3 0 ティーエイチ ア
ベニュー 2 3 8 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 CA04 DA02 DA06 EA02 EA04 HA14
4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA87X AA93X AA97X AB01 AC14 BA02
BB37 CA25 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 CA53 CA59 DA01 DA45
NA14 ZA02 ZA68 ZA89 ZA96 ZB08 ZB15 ZB35 ZC35
4C085 AA13 AA14 AA15 AA19 BB17 CC02 CC23 DD62 DD63 DD88
EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA68 ZA89 ZA96
ZB08 ZB15 ZB35 ZC35
4H045 AA11 DA76 EA20 FA74 GA23 GA26

【外国語明細書】
2012187111000001.pdf